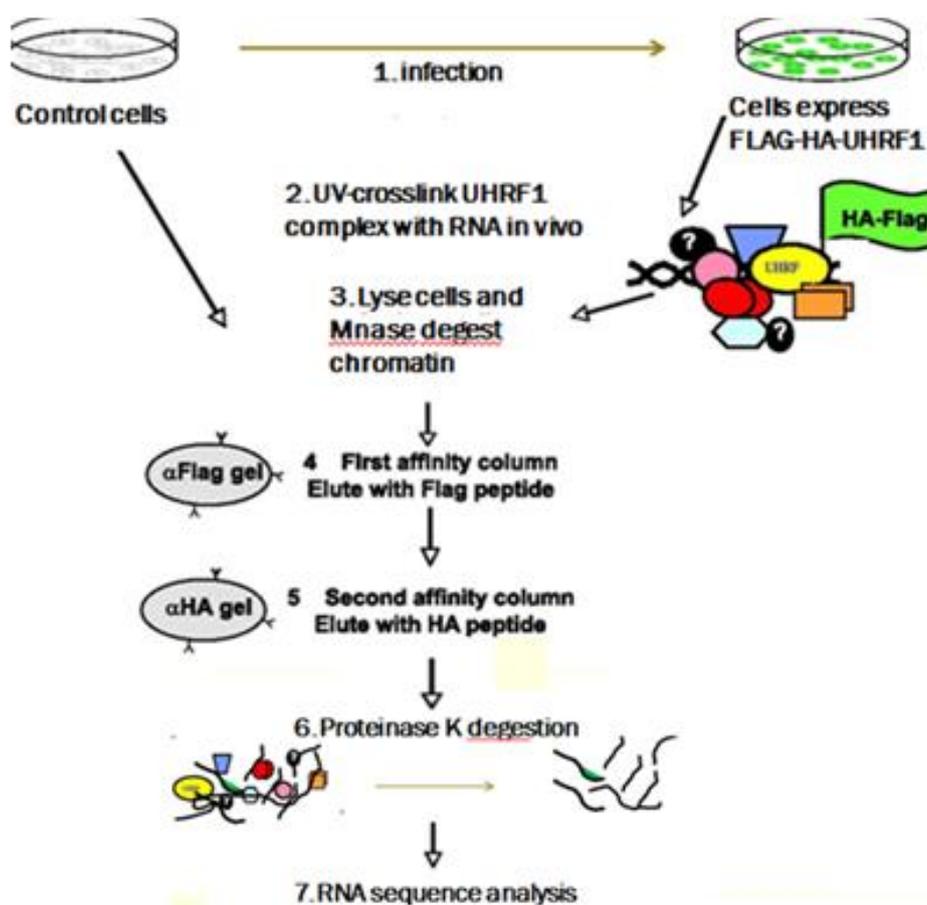


TAP (Tandem Affinity Purification)

一、准备工作

- 1、5 mL、1 mL、100 μ L、10 μ L 的移液器及对应枪头；1.5 mL、15 mL、50 mL 离心管预冷。
- 2、启动离心机预冷。
- 3、将所需要的冰块准备好，取出 cocktail 放冰上解冻。
- 4、预先配制部分 Buffer，具体试剂及配制附后。
- 5、准备好 Timer、1 \times PBS。



实验流程图

二、操作步骤

A. 交联细胞

1. DMEM/高糖（10%血清，双抗）培养 HEK293T-FLAG-HA-UHRF1 细胞。
2. 紫外交联，在含有 100 mM 4-SU(Sigma)的培养基中培养细胞 14h 后，用冰冷的 PBS 洗细胞，365 nm UV 照射细胞 (0.15 J/cm², CL-1000, 打开培养皿盖子)。

B. 提取核蛋白

1. 收细胞，PBS 洗两次。（收细胞的速度要快，注意加 1mM PMSF）。1000 rpm (180rcf) 离心 10 min 4°C。
2. 加两倍体积（细胞沉淀的体积）的 Buffer 1，重悬细胞沉淀，冰上 2 min。
3. 加入等量的 Buffer 2 并加入 NP40 (20%) (放在室温，不要放在 4 度，终浓度为 0.2%)。冰上 10-15 min （这一步破坏细胞膜，不要放置时间太长，避免核膜破裂）
4. 2000rpm 离心 3 min 4°C, 上清即为胞浆部分(C)，沉淀即为高纯度的细胞核（去除 C 时 要小心，但要去除干净）
5. 加入和 Buffer 1 等量的 Buffer C 到细胞核中，冰上 20min。（每 5min 混匀 一次）（加入 Buffer C 可能会有絮状沉淀，迅速混匀）
6. 14,000rpm 离心 15 min 4°C,上清即为细胞核裂解液(N)，沉淀为不溶的染色质部分（有些蛋白和染色质结合较紧密，也可能存在有沉淀中）。
7. 将沉淀溶解于 MNase Buffer，加入 MNase (20U/mL) 低速涡旋 2 s, 37°C 水浴酶切 6 min (需要严格控制酶切时间，以保证大部分的染色质被切成 1 到 5 nucleosomes)
8. 加入终浓度 20mM 的 EDTA（最好是 EGTA, 0.5M）（低速涡旋，冰上 2 min。EP 管最好预先预冷）
9. 蛋白溶液中的盐离子浓度要调节到 150mM (加入 1/2 体积的 Buffer C)，14 000rpm 4°C离心 15 min (取出 100μL 做 input)。
10. 用预冷的 1×PBS 润洗 anti-FLAG beads (1000rpm for 3 min 4°C)。

三、所需 Buffer 配方

Buffer A		Buffer C	
10mM	Hepes pH7.5	20mM	Hepes pH7.5
1.5mM	MgCl ₂	10% (V/V)	Glycerol
10mM	KCl	0.42M	KCl
0.5mM	DTT	4mM	MgCl ₂
1.0mM	PMSF	0.2mM	EDTA
		0.5mM	DTT
		1.0mM	PMSF

MNasebuffer (随酶提供)

Buffer1 (10mL)		Buffer2 (10mL)	
1.5M sucrose	2mL	1.5M sucrose	2mL
Salt premix	0.932mL	Salt premix	0.932mL
H ₂ O	7.068mL	H ₂ O	6.868mL
		20% NP40	0.2mL

C. FLAG 和 HA beads 纯化蛋白

1. FLAG-agrose beads 纯化

- 准备好润洗的 anti-FLAG beads
- 将 beads 和核裂解液混匀 (100 μ L beads for 10^8 cell; 600 μ L beads for 10^9 cell)
- 4°C 孵育 2-4h 或孵育过夜。
- 4°C 1000 rpm 离心 5 min
- 去除 FLAG-FT 取其中的 30 μ L 做银染
- 洗涤 beads 4-5 次。(洗涤 beads 时操作不能太剧烈)
- 4°C 1000 rpm 离心 5 min

2. 洗脱 beads.

- 加入 1 mL/0.8 mL Elution Buffer 到 beads 中，充分混匀，在配制 elute

buffer 时可适当增加 peptide 的浓度，以提高洗脱效率

---4°C 摇床上 1 h （不要放置时间太长，1h 足够）

---4°C 1000 rpm 离心 5 min，取出上清 FLAG-E1 (30 μL 做银染，其余做 HA-beads 第二次纯化)

---再次洗脱 beads，用 0.9/0.7 mL 混合 NE beads，取出上清作为 FLAG-E2 (30 μL 做银染)。（在做下一步之前最好高速离心（15000rpm）FLAG-E）

3. HA-agarose beads 纯化

---取出 40μL HA-agarose beads (10⁸ cell)。

---预冷的 1×PBS 润洗 anti-HA beads。

--- 将 anti-HA beads 和 FLAG-E1 4°C 孵育 4-6 或孵育过夜。

--- 1000 rpm 离心 5 min 4°C 取出上清作为 HA-FT 。

---洗涤 beads 4-5 次。

--- 1000 rpm 离心 5 min 4°C

4. 洗脱 HA- beads.

--- 加入 300 μL HA-peptide 洗脱液（充分混匀，4°C 摇床 1 h）

---4°C 1000 rpm 离心 5 min，取出上清作为 HA-E1 (其中 30 μL 做银染)

---再加入 300 μL 洗脱液，室温孵育 40 min

---离心取上清作为 HA-E2 (30 μL 做银染)

---进行下一步实验（可提取 RNA 等操作）。

Wash buffer			Final conc
TrisCl pH 7.9	1 M	2.5 mL	50 mM
Glycerol			10%
KCl	2.5 M	2 mL	100 mM
EDTA	0.5 M	20 μL	0.2 mM
MgCl ₂	1 M	250 μL	5 mM
2-ME	14.4 M	35 μL	10 mM
NP 40	10%	500 μL	0.1%
Total volume 50 mL			

Elution Buffer			Final Conc
Wash buffer		200 μ L	
Tris.Cl pH 7.9	1M	50 μ L	200 mM
FLAG/HA peptide (1:20)	4 mg/mL	12.5 μ L	0.2 mg/mL
Total volume 262.5 μ L			