

実験プロトコール 402

細胞抽出液の分画および調製(小スケール)

1. 準備するもの

1.1 細胞

- ・培養細胞(浮遊細胞、接着細胞)
>10⁷Cells

1.2 試薬

- ・リン酸緩衝生理食塩水(PBS(-))
- ・2-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]エタンスルホン酸(HEPES)
- ・水酸化ナトリウム(NaOH) ・塩化カリウム(KCl) ・塩化マグネシウム(MgCl₂)
- ・塩化ナトリウム(NaCl) ・塩化カルシウム(CaCl₂) ・エチレンジアミン四酢酸(EDTA)
- ・グリセロール(グリセリン) ・ジチオスレイトール(DTT)
- ・フッ化フェニルメタンスルホニル(PMSF)

1.3 機器

- ・微量高速遠心機(日立工機社 CF15RX II、など)

2. 方法

2.1 試薬溶液調製

Buffer Aの組成

10 mM HEPES-NaOH(pH7.9), 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF

Buffer Bの組成

20 mM HEPES-NaOH(pH7.9), 0.42 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF

Buffer Cの組成

20 mM HEPES-NaOH(pH7.9), 100 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 0.2 mM CaCl₂, 0.2 mM EDTA, 10%(v/v) glycerol, 1 mM DTT, 0.2 mM PMSF

2.2 手順

2.2.1 細胞の準備

2.2.1.1 浮遊細胞の場合

- 1) 適切な遠心チューブに細胞を回収する。
- 2) 遠心分離(500 g, 4°C, 10分)を行い、上清を廃棄する。
- 3) 細胞にPBS(-)を加え、適切な遠心チューブに移す。
- 4) 遠心分離(2,000 rpm, 4°C, 5分)を行い、上清を廃棄する。

2.2.1.2 付着細胞の場合

- 1) 細胞にPBS(-)を加え、1度か2度洗浄する。
- 2) 洗浄後PBS(-)を添加し、スクレイパーで適切な遠心チューブに細胞を回収する。
- 3) 遠心分離(1,000 rpm, 15°C, 5分)を行い、上清を廃棄する。

2.2.2 ホール細胞の調製

- 1) 準備した細胞にPBS(-)を加える。
- 2) 遠心分離(1,500 g, 4°C, 5分)を行い、上清を廃棄する。
- 3) 1)~2)を1回繰り返す、PBS(-)による洗浄を計2回行う。
- 4) 細胞の2倍量(2PCV)のBuffer Aを加え、ピペティングする。
- 5) 氷上で15分静置する。
- 6) 10%の界面活性剤を最終濃度が下記となるように添加し、ピペティングで懸濁する。
界面活性剤溶液の種類:
 - a) 1%~3% オクチルグルコシド
 - b) 1% CHAPS

実験プロトコール 402

- c) 1% NP-40
 - d) 1% Tween20
 - e) 1% Triton X-100
- 7) Vortexで10秒攪拌する。
- 8) 遠心分離(15,000 rpm、4°C、5分)を行い、上清および沈殿をそれぞれ新しいチューブへ回収する。

2.2.3 細胞質画分と細胞膜画分の調製

- 1) 2.2.2項 6)でオクチルグルコシドを使用した場合は、2.2.2項 8)の上清から透析でオクチルグルコシドを抜く。オクチルグルコシド以外を使用した場合は、上清において界面活性剤濃度が0.1%となるようにBufferCで希釈する。
- 2) 液体窒素で凍結し、-80°C保存する。→細胞質画分と細胞膜画分の混合物

2.2.4 細胞核画分の分画

- 1) 2.2.2項 8)の沈殿に細胞と等量(1PCV)のBuffer Bを加え、4°Cで15分インキュベートする。
- 2) 遠心分離(15,000 rpm、4°C、5分)を行い、上清を新しいチューブに回収する。
- 3) Buffer Cで透析する。(4°C)
- 4) 遠心分離(15,000 rpm、4°C、30分)を行い、上清を新しいチューブに回収する。
- 5) 液体窒素で凍結し、-80°C保存する。→細胞核画分

3. 注意事項

- ・界面活性剤で可溶化した後に界面活性剤濃度が1%以上そのままFG beadsとの結合反応に使用すると、反応が阻害され結合タンパク質を回収できない。必ず透析または希釈を行い、界面活性剤濃度を0.1%まで下げて使用する。

以上