

細胞抽出液の分画および調製(大スケール)

本実験プロトコールでは、文献1)を参考とした細胞の分画および抽出法を示し、細胞核、細胞質、および細胞質の各組織をきれいに分画することができます。この方法は一度に多くの細胞を処理したい場合に最適です。

1. 準備するもの

1.1 細胞

- ・培養細胞（浮遊細胞、接着細胞） $>10^9$ Cells

1.2 試薬

- ・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 ($MgCl_2$)
- ・塩化ナトリウム (NaCl) ・塩化カルシウム ($CaCl_2$) ・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サルホニル (PMSF)

1.3 機器

- ・微量高速遠心機 (日立工機社 CF15RX II、など)
- ・高速冷却遠心機 (BECKMAN COULTER社 Avanti HP30I、など)
- ・ホモジナイザー (Kontes all glass Dounce homogenizer、など)
- ・マグネチックスターラー

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, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.5 mM DTT

Buffer Bの組成：0.3 M HEPES-NaOH (pH7.9), 1.4 M KCl, 30 mM $MgCl_2$

Buffer Cの組成：20 mM HEPES-NaOH (pH7.9), 0.42 M NaCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.2 mM EDTA, 25% (v/v) glycerol, 0.5 mM DTT, 0.5 mM PMSF

Buffer Dの組成：20 mM HEPES-NaOH (pH7.9), 100 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 0.2 mM $CaCl_2$, 0.2 mM EDTA, 10% (v/v) glycerol, 1 mM DTT, 0.2 mM PMSF

2.2 手順

細胞の準備

浮遊細胞の場合：

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

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 (-) を加え、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 min) を行い、上清を廃棄する。

ホール細胞の調製

- 4) 準備した細胞の5倍量 (5PCV) のPBS (-) を加える。
- 5) 遠心分離 (2,000rpm, 4°C, 5 min) を行い、上清を廃棄する。
- 6) 細胞の5倍量 (5PCV) のBuffer Aを加え、氷上で10分静置する。
- 7) 遠心分離 (2,000rpm, 4°C, 5 min) を行い、上清を廃棄する。
- 8) 細胞の2倍量 (2PCV) のBuffer Aを加え、ガラスホモジナイザーで破碎する。
(Kontes all glass Dounce homogenizerの場合はB type pestleで10-20ストロークが目安)

実験プロトコール 401

9) 顕微鏡で核を確認する。

10) 遠心分離 (600×g, 4°C, 10 min) 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。

細胞質画分、細胞膜画分の分画

11) 手順10) の上清に細胞の0.11倍量のBuffer Bを加える。

12) 遠心分離 (100,000×g, 4°C, 60 min) を行い、上清を新しいチューブに回収する。

→沈殿は細胞膜画分を含む

13) 回収した上清の50倍量のBuffer Dで透析する。(4°C)

14) 遠心分離 (100,000×g, 4°C, 60 min) を行い、上清を新しいチューブに回収する。

15) 液体窒素で凍結し、-80°Cで保存する。→細胞質画分

細胞膜画分の可溶化

16) 手順12) の沈殿に界面活性剤を最終濃度が下記となるように添加し、ピペッティングで懸濁する。4°Cで一晩放置。

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

c) 1% NP-40

d) 1% Tween20

e) 1% Triton X-100

17) オクチルグルコシドの場合は透析で抜く。それ以外の界面活性剤を使用した場合は、Buffer Dで1/10希釈し、界面活性剤濃度を0.1%とする。

18) 液体窒素で凍結し、-80°Cで保存する。

細胞核画分の分画

19) 手順10) の沈殿を遠心分離 (20,000×g, 4°C, 20 min) し、上清を廃棄する。

20) 細胞と等量 (1PCV) のBuffer Cを加え、ガラスホモジナイザーで破碎する。

(Kontes all glass Dounce homogenizerの場合はB type pestleで10ストロークが目安)

21) マグネチックスターラーにて4°Cで30分攪拌する。

22) 遠心分離 (20,000×g, 4°C, 30 min) を行い、上清を新しいチューブに回収する。

23) 回収した上清の50倍量のBuffer Dで4°Cにて5時間透析する。

24) 遠心分離 (20,000×g, 4°C, 30 min) を行い、上清を新しいチューブに回収する。

25) 液体窒素で凍結し、-80°Cで保存する。→細胞核画分

3. 注意事項

- ・手順4) で分画する前の細胞量 (PVC) は、5-10 mLくらいあることが望ましい。
- ・ホモジナイザーを使用する際は、液を泡立てず、ゆっくりと引き上げる。
- ・膜画分は界面活性剤濃度が1%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。

参考文献1) J.D.Dignam, R.M.Lebovitz, and R.G.Roeder, *Nucleic Acids Res.* **11**, 1475 (1983)

以上