

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) $>10^7$ 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 (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)

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

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, 10min) 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, 5min) 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, 5min) を行い、上清を廃棄する。

ホール細胞の調製

- 4) 準備した細胞にPBS (-) を加える。
- 5) 遠心分離 (1,500×g, 4°C, 5min) を行い、上清を廃棄する。
- 6) 工程4)~5)を1回繰り返す、PBS (-) による洗浄を計2回行う。
- 7) 細胞の2倍量 (2PCV) のBuffer Aを加え、ピペッティングする。
- 8) 氷上で15分静置する。
- 9) 10%の界面活性剤を最終濃度が下記となるように添加し、ピペッ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
- c) 1% NP-40
- d) 1% Tween20
- e) 1% Triton X-100

- 10) Vortexで10秒攪拌する。

- 11) 遠心分離 (20,000 ×g, 4°C, 5min) 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。

実験プロトコール 402

細胞質画分と細胞膜画分の調製

12) 工程9) でオクチルグルコシドを使用した場合は、工程11) 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。

13) 液体窒素で冷凍し、 -80°C 保存する。→細胞質画分と細胞膜画分の混合物

細胞核画分の分画

14) 工程11) 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。

15) 遠心分離 ($20,000 \times g$, 4°C , 5min)を行い、上清を新しいチューブに回収する。

16) Buffer Cで透析する。 (4°C)

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

18) 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