

実験プロトコール 401

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)
>10⁹ Cells

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 MgCl₂, 0.5 mM DTT

Buffer Bの組成

0.3 M HEPES-NaOH(pH7.9), 1.4 M KCl, 30 mM MgCl₂

Buffer Cの組成

20 mM HEPES-NaOH(pH7.9), 0.42 M NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 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 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。

実験プロトコール 401

- 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) 準備した細胞の5倍量(5PCV)のPBS(-)を加える。
- 2) 遠心分離 (2,000 rpm、4°C、5分)を行い、上清を廃棄する。
- 3) 細胞の5倍量(5PCV)のBuffer Aを加え、氷上で10分静置する。
- 4) 遠心分離 (2,000 rpm、4°C、5分)を行い、上清を廃棄する。
- 5) 細胞の2倍量(2PCV)のBuffer Aを加え、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)
- 6) 顕微鏡で核を確認する。
- 7) 遠心分離 (600 g、4°C、10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、細胞膜画分の分画

- 1) 2.2.2項 7)の上清に細胞の0.11倍量のBuffer Bを加える。
- 2) 遠心分離 (100,000 g、4°C、60分)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
- 3) 回収した上清の50倍量のBuffer Dで透析する。(4°C)
- 4) 遠心分離 (100,000 g、4°C、60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で保存する。→細胞質画分

2.2.4 細胞膜画分の可溶化

- 1) 2.2.3項 2)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
- 2) 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。
- 3) 液体窒素で凍結し、-80°Cで保存する。

2.2.5 細胞核画分の分画

- 1) 2.2.2項 7)の沈殿を遠心分離 (20,000 g、4°C、20分)し、上清を廃棄する。
- 2) 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)
- 3) マグネチックスターラーで攪拌する。(4°C、30分)
- 4) 遠心分離 (20,000 g、4°C、30分)を行い、上清を新しいチューブに回収する。
- 5) 回収した上清の50倍量のBuffer Dで5時間透析する。(4°C)
- 6) 遠心分離 (20,000 g、4°C、30分)を行い、上清を新しいチューブに回収する。
- 7) 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

- ・2.2.2項で分画する前の細胞量は、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。
- ・膜画分を可溶化する場合、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.Lebowitz, and R.G.Roeder, *Nucleic Acids Res.* 11, 1475(1983)

以上