プロテオミクス関連試薬

DOJINDO

http://www.dojindo.co.jp

DOJINDO
http://www.dojindo.co.jp

プロテオミクス関連試薬

ヒトゲノムの完全配列が解読されプロテオミクス解析が注目を集めている。なかでも細胞膜に存在する膜タンパク質は、細胞内外のエネルギー交換や情報伝達などの役割を担い、その機能解析は非常に重要な研究分野である。

小社では、膜タンパク質を抽出・精製する際に使用する界面活性剤を多種取り揃えており、近年、トレハロース型の新規界面活性剤や二次元電気泳動用タンパク質溶解剤 SpotRight™ シリーズも発売した。

タンパク質定量キットとそれぞれのプロトコルとともに、プロテオミクス関連試薬を紹介する。

製品紹介

1. Detergent Screening Set 2
   - Detergent Screening Set (first choice-II)
   - Detergent Screening Set (for crystallization)

2. 非イオン性界面活性剤

トレハロース (エステル）タイプ 3
   - Trehalose C8
   - Trehalose C10
   - Trehalose C12
   - Trehalose C14
   - Trehalose C16

グルコースタイプ 4
   - *n*-Octyl-β-D-glucoside
   - *n*-Octyl-β-D-thioglucoside
   - *n*-Heptyl-β-D-thioglucoside

マンノースタイプ 4
   - 3-Oxatridecyl-α-D-mannoside

マルトースタイプ 5
   - *n*-Decyl-β-D-maltoside
   - *n*-Octyl-β-D-maltoside
   - *n*-Dodecyl-β-D-maltoside
   - *n*-Nonyl-β-D-thiomaltoside
   - *n*-Undecyl-β-D-maltoside

グルコンアミドタイプ 6
   - BIGCHAP
   - deoxy-BIGCHAP

グルカミンタイプ 6
   - MEGA-8
   - MEGA-9
   - MEGA-10

3. 陰イオン性界面活性剤

コール酸タイプ 7
   - Sodium cholate (purified)
   - Sodium deoxycholate (for protein crystallization)

4. 両性界面活性剤

コールアミドタイプ 7
   - CHAPS
   - CHAPSO

応用例 8

プロトコル
   - 膜タンパク質等を可溶化したい。 12

5. 二次元電気泳動用タンパク質溶解剤
   - SpotRight™ 14

6. タンパク質定量キット 17
   - *-Proteostain*-Protein Quantification Kit-Rapid
   - *-Proteostain*-Protein Quantification Kit-Wide Range

7. タンパク質蛍光標識試薬 18
   - IC3-OSu special packaging
   - IC5-OSu special packaging
   - FITC-I
   - Sulforhodamine 101 acid chloride

プロトコル
   - タンパク質を蛍光標識したい。 19

デタージェントとは

脂質二分子膜は、細胞膜の基本的構成成分である。細胞の最も重要な役割は、細胞膜を介した物質の輸送やエネルギー交換、情報伝達である。これらの機能は、細胞膜に存在する膜タンパク質が行っている。

細胞膜に関する研究においては、膜タンパク質を分離してその構造や機能を調べることが行われている。細胞膜に存在しているタンパク質は、疎水部分と親水性部分を持ち、通常、疎水性部分は、脂質二分子膜に埋もれており、親水性部分は、細胞膜外へ突き出している構造をとる。デタージェントは、親水性部分と疎水性部分を持つため、膜タンパク質の疎水性部分をデタージェントの疎水性部分が重なり合って覆い隠すことで、膜タンパク質が水に可溶化されると考えられている。デタージェントが存在しないと、膜タンパク質はその疎水性部分で会合し、不溶化してしまう。不溶化した膜タンパク質は高次構造が壊れるため、本来の機能を失ってしまう場合がある。また、膜タンパク質の分離には、各膜タンパク質に適したデタージェントを選択し、分離条件を見出す必要がある。デタージェントには、陰イオン (アニオン) 性デタージェント、陽イオン (カチオン) 性デタージェント、中性 (非イオンおよび両性) デタージェントがある。膜タンパク質の抽出には、中性のデタージェントが用いられる場合が多い。求められるデタージェントの性質を下記に示す。

・タンパク質溶解容量が大きいこと
・タンパク質を変性や不活性化しないこと
・タンパク質活性に影響しないこと
・4°C で沈殿を生じないこと
・適当な臨界ミセル濃度 (Critical Micelle Concentration : cmc) とミセルサイズであること

・紫外領域に吸収を持たないこと
・毒性が無いこと
・測定方法や検出手段があること
・中性分子（非イオン性分子、あるいは、Zwitter 型分子）であること

これまで、ポリオキシエチレン－アルキル型のデタージェントが広く使用されてきたが、タンパク質が変性したり cmc が低すぎたりといった問題があった。cmc が低すぎると、透析によるデタージェントの除去が難しくなる。そのため、近年では、糖ヘッドやコール酸ヘッドのデタージェントが用いられるようになってきた。これらのデタージェントは、中性分子でタンパク質の変性を起こしにくく、cmc 値も高いため、希釈と透析で容易に除去することができる。また、タンパク質の吸収がある 280 nm 付近の吸収がないため、280 nm の吸光度を測定することにより、タンパク質量の測定やモニタリングを行うことができる。膜タンパク質からデタージェントを除く場合、適当量のデタージェントが存在しないとタンパク質が不溶化するため、除去方法も重要である。
デタージェントは膜タンパク質の抽出や分離以外に、酸素の安定化や生体サンプルの前処理などにも利用されている。

臨界ミセル濃度について
デタージェントは、両親媒性化合物で、親水性部分と疎水性部分とからなり、ミセルを形成する。ミセルの形成はその化合物の濃度に依存し、ミセルを形成する最小濃度を臨界ミセル濃度 (Critical Micelle Concentration) と呼ぶ。デタージェントの可溶化能力は、cmc を境にして急激に変化する。cmc 値以上であればミセルが形成され、cmc 以下であればミセル構造とならない。そのため、希釈することによりミセルを壊すことができる。

	CHAPS	CHAPSO	BC	d-BC	DDM	DM	NTM	OG	OM	HTG	OTG	M-8	M-9	M-10	CHO	Triton
タンパク質変性作用	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－
低温での水溶性	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋ /－	＋	＋	＋	－	＋
測定に対する妨害性	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	＋ /－
280 nm の吸収	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	＋
cmc(mmol/l)	8	8	2.9	1.4	0.17	1.8	2.4	25	23.4	30	9	55 ～ 67	25	7	14	0.24
透析による除去	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋
毒性	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－
イオン交換処理の可否	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	－	＋

BC :　BIGCHAP　d-BC : deoxy-BIGCHAP　DDM : *n*-Dodecyl- β -D-maltoside　DM : *n*-Decyl- β -D-maltoside
NTM : *n*-Nonyl- β -D-thiomaltoside　OG : *n*-Octyl- β -D-glucoside　OM : *n*-Octyl- β -D-maltoside
HTG : *n*-Heptyl- β -D-thioglucoside　OTG : *n*-Octyl- β -D-thioglucoside　M-8 : MEGA-8　M-9 : MEGA-9　M-10 : MEGA-10
CHO : Sodium cholate　Triton : triton X-100
[土屋友房著 ," 膜タンパク質の可溶化と界面活性剤 ", 化学と生物実験ライン 5, 廣川書店 , **1990**. より一部引用]

1. Detergent Screening Set

現在のところ、すべての膜タンパク質の可溶化に有効な万能の界面活性剤は知られていない。試行錯誤を繰り返しつつ選ばれているのが現状である。そのため小社では少量ずつの各種界面活性剤を揃えたスクリーニングセットを準備している。
また、界面活性剤の使用条件の最適化、例えば界面活性剤の濃度、界面活性剤と膜の比率、緩衝液の種類、pH、共存イオン、脂質添加の可否、温度等について考慮検討する必要がある。

一可溶化用一
Detergent Screening Set (first choice-II)　1 set　;　同仁品コード (DS06)
本製品は、よく使われている代表的な Detergent 5 種類の組み合わせである。
セット内容 : CHAPS, *n*-Dodecyl- β -D-maltoside, *n*-Octyl- β -D-glucoside, Sodium cholate(purified), MEGA-8
以上 5 種類の各 200 mg 包装

一結晶化用一
Detergent Screening Set (for crystallization)　1 set　;　同仁品コード (DS05)

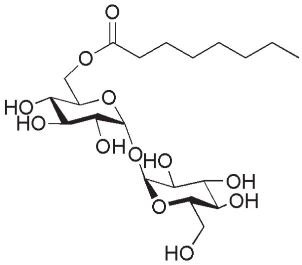
本製品は、タンパク質の構造解析のための結晶化に用いられた実績のある 5 種類の Detergent を組み合わせたタイプである。
セット内容 : *n*-Decyl- β -D-maltoside, *n*-Dodecyl- β -D-maltoside, *n*-Octyl- β -D-glucoside, *n*-Octyl- β -D-maltoside, MEGA-10
以上 5 種類の各 200 mg 包装

取扱注意　1. 保存方法 : 冷蔵　2. 吸湿注意

2. 非イオン性界面活性剤

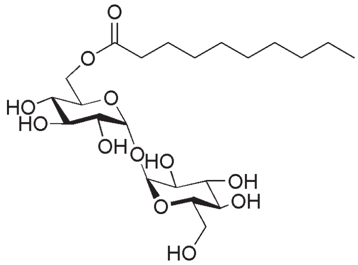
トレハロース (エステル）タイプ

Trehalose C8 ; 同仁品コード (T459)



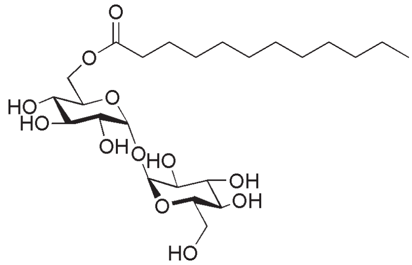
α -D-Glucopyranosyl- α -D-glucopyranoside monooctanoate
$C_{20}H_{36}O_{12}$=468.49
CAS No. 64622-90-8　　cmc=5.6 mmol/l

Trehalose C10 ; 同仁品コード (T460)



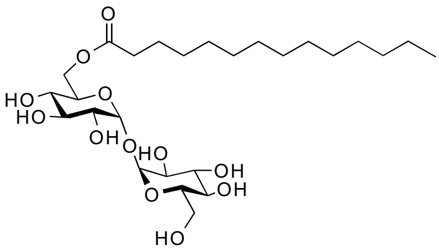
α -D-Glucopyranosyl- α -D-glucopyranoside monodecanoate
$C_{22}H_{40}O_{12}$=496.55
CAS No. 924885-56-3　　cmc=3.0 mmol/l

Trehalose C12 ; 同仁品コード (T461)



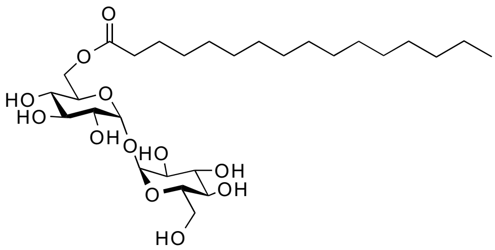
α -D-Glucopyranosyl- α -D-glucopyranoside monododecanoate
$C_{24}H_{44}O_{12}$=524.60
CAS No. 64622-91-9　　cmc=0.15 mmol/l

Trehalose C14 ; 同仁品コード (T464)



α -D-Glucopyranosyl- α -D-glucopyranoside monomyristate
$C_{26}H_{48}O_{12}$=552.65
CAS No. 64622-92-0　　cmc=0.012 mmol/l

Trehalose C16 ; 同仁品コード (T465)



α -D-Glucopyranosyl- α -D-glucopyranoside monopalmitate
$C_{28}H_{52}O_{12}$=580.71
CAS No. 42939-93-5　　cmc=0.0061 mmol/l

規格　(1) 性状 : 白色粉末
(2) 純度 (GC) : 95.0% 以上
(3) 水溶状：試験適合　0.100 以下 (260 nm)

溶解例　100 mg/10 ml (水)：Trehalose C8, C10, C12
100 mg/10 ml (熱水)、100 mg/10 ml(メチルアルコール）: Trehalose C14, C16

取扱注意　1. 保存方法 : 冷蔵　2. 吸湿注意

【実験例】　トレハロース型デタージェントを用いた膜タンパク質結晶化

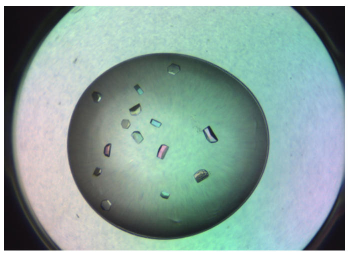
① 膜タンパク質結晶化剤として知られている *n*-Decyl- β -D-maltoside と Trehalose C8 を混合して使用することにより、1.55Å の分解能を持つ X 線解析像を得ることができた。(未発表データ）

結晶化条件

膜タンパク質	ウシ心筋チトクロム酸化酵素
Detergent	*n*-Decyl- β -D-maltoside ＋ Trehalose C8
分解能	1.55Å

(兵庫県立大学理学部 教授 吉川 信也先生よりご提供)

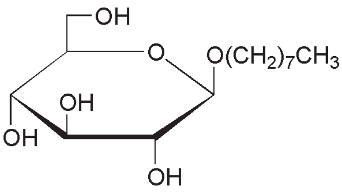
② Trehalose C12 を用いて、12 回膜貫通型膜タンパク質を可溶化し、結晶化する事に成功している。



(ユーザー様よりご提供)

グルコースタイプ

n-Octyl- β -D-glucoside ; 同仁品コード (O001)

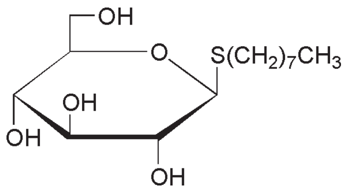


n-Octyl- β -D-glucopyranoside
$C_{14}H_{28}O_6$=292.37
CAS No. 29836-26-8　　cmc=25 mmol/l

規格
(1) 性状 : 白色粉末
(2) 純度 (GC) : 98.0% 以上
(3) 水溶状 : 試験適合　0.025 以下 (400 nm)
0.300 以下 (280 nm)
(4) 比旋光度 (20°C) : -32.0 ～ -29.0°cm^2deg^{-1}
(5) IR スペクトル : 試験適合

溶解例　1 g/5 ml (水)
取扱注意　保存方法 : 冷蔵

n-Octyl- β -D-thioglucoside ; 同仁品コード (O003)

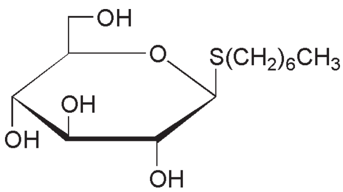


n-Octyl- β -D-thioglucopyranoside
$C_{14}H_{28}O_5S$=308.44
CAS No. 85618-21-9　　cmc=9 mmol/l

規格
(1) 性状 : 白色粉末
(2) 純度 (GC) : 98.0% 以上
(3) 水溶状 : 試験適合　0.120 以下 (280 nm)
(4) 吸光度 : 0.130 以下 (400 nm)
(5) 比旋光度 (20°C) : -46.0° cm^2 deg^{-1} 以下
(6) IR スペクトル : 試験適合

溶解例　1 g/5 ml (水)
取扱注意　保存方法 : 冷蔵

n-Heptyl- β -D-thioglucoside ; 同仁品コード (H015)



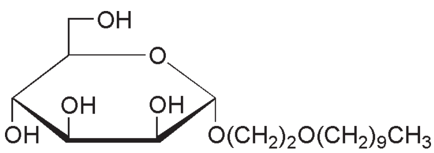
n-Heptyl- β -D-thioglucopyranoside
$C_{13}H_{26}O_5S$=294.41
CAS No. 85618-20-8　　cmc=30 mmol/l

規格
(1) 性状 : 白色粉末又はワックス状固体
(2) 純度 (GC) : 98.0% 以上
(3) 水溶状 : 試験適合 0.050 以下 (280 nm)
(4) 吸光度 : 0.040 以下 (400 nm)
(5) 比旋光度 (20°C) : -50.0°cm^2deg^{-1} 以下
(6) IR スペクトル : 試験適合

溶解例　1 g/5 ml (水)
取扱注意　保存方法 : 冷蔵

マンノースタイプ

3-Oxatridecyl- α -D-mannoside ; 同仁品コード (O401)



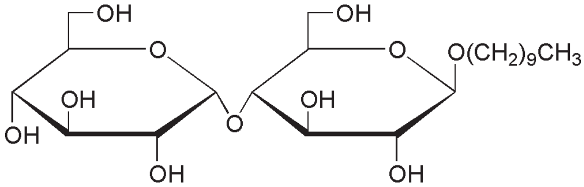
3-Oxatridecyl- α -D-mannopyranoside
$C_{18}H_{36}O_7$=364.47　　cmc=0.63 mmol/l

規格
(1) 性状 : 白色粉末
(2) 純度 (GC) : 95.0% 以上
(3) メチルアルコール溶状 : 試験適合
(4) 水分 : 1.0% 以下
(5) 比旋光度 (20°C) : 43.0 ～ 49.0°cm^2deg^{-1}
(6) IR スペクトル : 試験適合

溶解例　0.5 g/25 ml(メチルアルコール)
取扱注意　1. 保存方法 : 冷蔵 , 2. 吸湿注意

マルトースタイプ

***n*-Decyl-β-D-maltoside** ; 同仁品コード (D382)



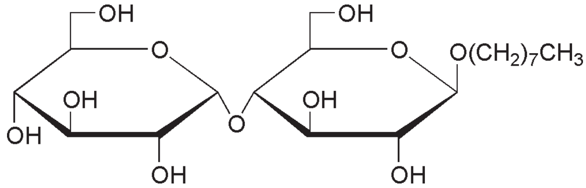
n-Decyl-β-D-maltopyranoside
$C_{22}H_{42}O_{11}$=482.57
CAS No. 82494-09-5　　cmc=1.8 mmol/l

規格
(1) 性状 : 白色粉末
(2) 純度 (GC) : 98.0% 以上
(3) 水溶状 : 試験適合 0.150 以下 (260 nm)
(4) 水分 : 1.0% 以下
(5) 比旋光度 (20°C) : 46.0 ～ 53.0°cm^{2}deg^{-1}
(6) IR スペクトル : 試験適合

溶解例　1 g/10 ml (水)

取扱注意　1. 保存方法 : 冷蔵 , 2. 吸湿注意

***n*-Octyl-β-D-maltoside** ; 同仁品コード (O393)



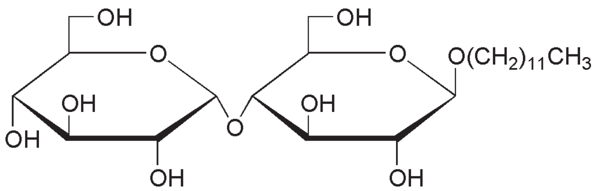
n-Octy-β-D-maltopyranoside
$C_{20}H_{38}O_{11}$=454.51
CAS No. 82494-08-4　　cmc=23.4 mmol/l

規格
(1) 性状 : 白色粉末
(2) 純度 (GC) : 98.0% 以上
(3) 水溶状 (10%) : 試験適合
(4) 水溶状 (4%) : 試験適合 0.150 以下 (260 nm)
(5) 水分 : 3.0% 以下
(6) 比旋光度 (20°C) : 55.0 ～ 57.0°cm^{2}deg^{-1}
(7) IR スペクトル : 試験適合

溶解例　1 g/10 ml (水)

取扱注意　1. 保存方法 : 冷蔵 , 2. 吸湿注意

***n*-Dodecyl-β-D-maltoside** ; 同仁品コード (D316)



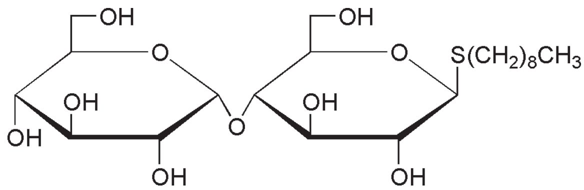
n-Dodecyl-β-D-maltopyranoside
$C_{24}H_{46}O_{11}$=510.62
CAS No. 69227-93-6　　cmc=0.17 mmol/l

規格
(1) 性状 : 白色粉末
(2) 純度 (GC) : 98.0% 以上
(3) 水溶状 (0.1%) : 試験適合
(4) 水溶状 (1%) : 試験適合 0.100 以下 (260 nm)
(5) 比旋光度 (20°C) : 46.0 ～ 50.0°cm^{2}deg^{-1}
(6) 水分 : 1.0% 以下
(7) IR スペクトル : 試験適合

溶解例　100 mg/10 ml (水)

取扱注意　保存方法 : 冷蔵

***n*-Nonyl-β-D-thiomaltoside** ; 同仁品コード (N373)



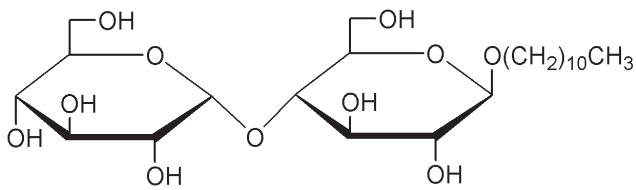
n-Nonyl-β-D-thiomaltopyranoside
$C_{21}H_{40}O_{10}S$=484.60
CAS No. 148565-55-3　　cmc=2.4 mmol/l

規格
(1) 性状 : 白色粉末
(2) 純度 (GC) : 98.0% 以上
(3) 水溶状 : 試験適合 0.220 以下 (280 nm)
(4) 吸光度 : 0.070 以下 (400 nm)
(5) 比旋光度 (20°C) : 34.0 ～ 36.0°cm^{2}deg^{-1}
(6) IR スペクトル : 試験適合

溶解例　1 g/5 ml (水)

取扱注意　保存方法 : 冷蔵

***n*-Undecyl-β-D-maltoside** ; 同仁品コード (U214)



n-Undecyl-β-D-maltopyranoside
$C_{23}H_{44}O_{11}$=496.59
CAS No. 253678-67-0　　cmc=0.55 mmol/l

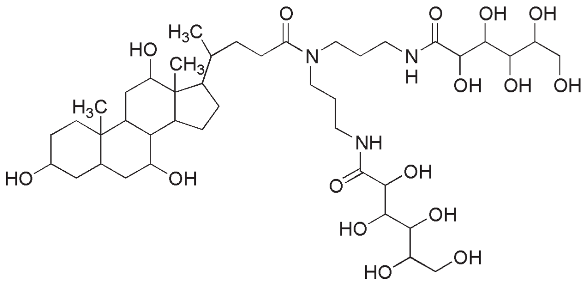
規格
(1) 性状 : 白色粉末
(2) 純度 (GC) : 99.5% 以上
(3) α体 (GC) : 0.1% 以下
(4) 水溶状 (1%) : 試験適合
0.050 以下 (260 nm)
(5) 水分 : 1.0% 以下
(6) 比旋光度 (20°C) : 46.0 ～ 52.0°cm^{2}deg^{-1}
(7) IR スペクトル : 試験適合

溶解例　100 mg/10 ml (水)

取扱注意　1. 保存方法 : 冷蔵　2. 吸湿注意

グルコンアミドタイプ

BIGCHAP ; 同仁品コード (B043)

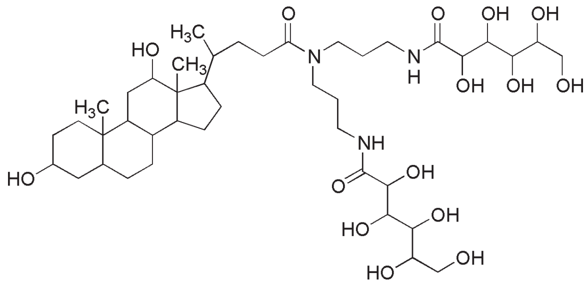


N,N-Bis(3-D-gluconamidopropyl)cholamide
$C_{42}H_{75}N_{3}O_{16}$=878.06
CAS No. 86303-22-2　　cmc =2.9 mmol/l

規格　(1) 性状 : 白色粉末
(2) 純度 (HPLC) : 95.0% 以上
(3) 水溶状 : 試験適合
(4) 吸光度 (1%): 0.100 以下 (260 nm)
(5) IR スペクトル : 試験適合

溶解例　0.5 g/10 ml (水)

deoxy-BIGCHAP ; 同仁品コード (D045)



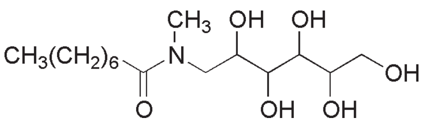
N,N-Bis(3-D-gluconamidopropyl)deoxycholamide
$C_{42}H_{75}N_{3}O_{15}$=862.06
CAS No. 86303-23-3　　cmc=1.4 mmol/l

規格　(1) 性状 : 白色粉末
(2) 純度 (HPLC) : 95.0% 以上
(3) 水溶状 : 試験適合
(4) 吸光度 (1%): 0.100 以下 (260 nm)
(5) IR スペクトル : 試験適合

溶解例　1 g/20 ml (水)

グルカミンタイプ

MEGA-8 ; 同仁品コード (M014)

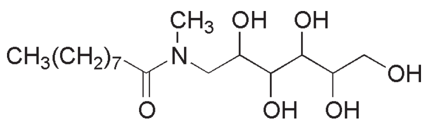


n-Octanoyl-*N*-methyl-D-glucamine
$C_{15}H_{31}NO_{6}$=321.41
CAS No. 85316-98-9　　cmc=55 ～ 67 mmol/l

規格　(1) 性状 : 白色粉末
(2) 純度 (HPLC) : 98.0% 以上
(3) 水溶状 : 試験適合 0.020 以下 (280 nm)
(4) 融点 : 80 ～ 90°C
(5) pH(25°C) : 5.0 ～ 8.0
(6) IR スペクトル : 試験適合

溶解例　0.5 g/50 ml (水)

MEGA-9 ; 同仁品コード (M015)

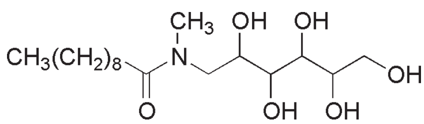


n-Nonanoyl-*N*-methyl-D-glucamine
$C_{16}H_{33}NO_{6}$=335.44
CAS No. 85261-19-4　　cmc=25 mmol/l

規格　(1) 性状 : 白色粉末
(2) 純度 (HPLC) : 98.0% 以上
(3) 水溶状 : 試験適合 0.020 以下 (280 nm)
(4) 融点 : 85 ～ 92°C
(5) pH(25°C) : 5.0 ～ 8.0
(6) IR スペクトル : 試験適合

溶解例　0.5 g/50 ml (水)

MEGA-10 ; 同仁品コード (M016)



n-Decanoyl-*N*-methyl-D-glucamine
$C_{17}H_{35}NO_{6}$=349.46
CAS No. 85261-20-7　　cmc=7 mmol/l

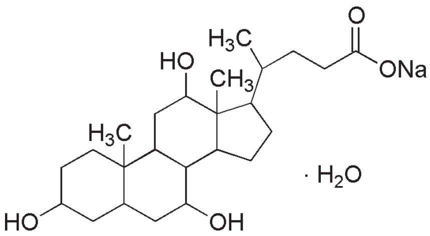
規格　(1) 性状 : 白色粉末又は顆粒
(2) 純度 (HPLC) : 98.0% 以上
(3) 水溶状 : 試験適合 0.020 以下 (280 nm)
(4) 融点 : 88 ～ 95°C
(5) pH(25°C) : 5.0 ～ 8.0
(6) IR スペクトル : 試験適合

溶解例　0.5 g/50 ml (水)

3. 陰イオン性界面活性剤

コール酸タイプ

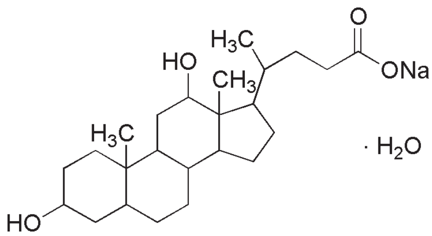
Sodium cholate (purified) ; 同仁品コード (C321)



Cholic acid, sodium salt, monohydrate
$C_{24}H_{39}NaO_5 \cdot H_2O$=448.57
CAS No. 361-09-1　　cmc=14 mmol/l

規格　(1) 性状 : 白色粉末
(2) 純度 (HPLC) : 98.0% 以上
(3) 水溶状 : 試験適合 0.052 以下 (280 nm)
(4) 水分：3.5 ～ 5.0%
(5) IR スペクトル：試験適合
溶解例　0.3 g/10 ml(水)
取扱注意　吸湿注意

Sodium deoxycholate (for protein crystallization) ; 同仁品コード (D520)



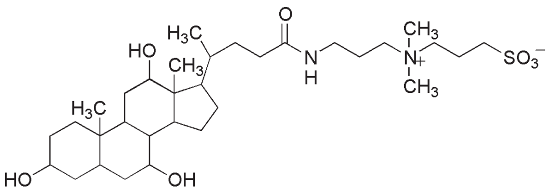
Deoxycholic acid, sodium salt, monohydrate
$C_{24}H_{39}NaO_4 \cdot H_2O$=432.57
CAS No. 145224-92-6　　cmc=5 mmol/l

規格　(1) 性状 : 白色粉末
(2) 純度 (HPLC) : 98.0% 以上
(3) 水溶状 : 試験適合
(4) 吸光度 : 0.065 以下 (280 nm)
(5) 水分 : 3.0 ～ 6.0%
(6) IR スペクトル：試験適合
溶解例　0.3 g/10 ml(水)
取扱注意　吸湿注意

4. 両性界面活性剤

コールアミドタイプ

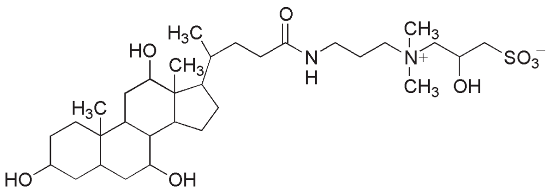
CHAPS ; 同仁品コード (C008)



3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]propanesulfonate
$C_{32}H_{58}N_2O_7S$=614.88
CAS No. 75621-03-3　　cmc=8 mmol/l

規格　(1) 性状 : 白色粉末
(2) 純度 (HPLC) : 97.0% 以上
(3) 水溶状 (20%) : 試験適合
(4) 水溶状 (3%) : 試験適合 0.220 以下 (280 nm)
(5) 水分 : 3.0% 以下
(6) IR スペクトル：試験適合
溶解例　1 g/5 ml(水)

CHAPSO ; 同仁品コード (C020)



3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-2-hydroxypropanesulfonate
$C_{32}H_{58}N_2O_8S$=630.88
CAS No. 82473-24-3　　cmc=8 mmol/l

規格　(1) 性状 : 白色粉末
(2) 純度 (HPLC) : 96.0% 以上
(3) 水溶状 : 試験適合
(4) 水分 : 3.0% 以下
(5) IR スペクトル：試験適合
溶解例　1 g/20 ml(水)

応用例

Detergent	細胞	タンパク質	用途	文献
BIGCHAP	ラット肝細胞ミクロソーム	11β- ヒドロキシシステロイドデヒドロゲナーゼ (11-HSD)	抽出	1)
	マウス肺組織のミクロソーム画分	カルシウム非依存性 -PAFAT	溶解	2)
CHAPS	マウス肝細胞	ミクロソーム	電気泳動	3)
	哺乳類の培養細胞	繊維芽細胞成長因子	抽出・精製	4)
	ウシ肝細胞	T_3 結合性タンパク質	抽出・精製	5)
	NG108-15, Hybrid cell	Opiate recepters	抽出・精製	6)
	リンパ球	5'- ヌクレオチダーゼ	抽出・単離・精製	7)
	-----------	anti-GST antibody, etc.	非特異的吸着防止 (SPR)	8)
	-----------	Hepatic RHE	単離	9)
	-----------	bacteriorhodospin	抽出	10)
	マウス肝細胞	プロラクチンレセプター	抽出	11)
	COS-1 細胞	FLAG-tagged HAS 1	抽出	12)
	酵母	Inositolphosphorylceramide(IPC)	精製	13)
	ラット肝臓	-----------	溶解	14)
	大腸菌	CYP27B1	溶解	15)
	大腸菌 BL21	NAPD-PLD-GSH, NAPD-PLD	抽出・溶解	16)
	ラット胚	-----------	溶解	17)
	-----------	シナプス後肥厚部	抽出	18)
	CD3-LGL 細胞 , YT 細胞	LFA-1(leukocyte function-assosiate antigen-1	溶解	19)
	マウス小脳	IP3R	溶解	20)
	ウィスターラット肝臓 (Cytochrome P450 2D1)	MBP (3[H]Mepyramine Binding Protein)	溶解	21)
CHAPSO	-----------	Hepatic RHE	単離	9)
	マウス肝細胞	プロラクチンレセプター	抽出	11)
	グラム陰性菌	β-lactamase	抽出	22)
	HEK293T 細胞	ほうれん草の葉緑体	結晶化	23)
	大腸菌	β- ガラクトシダーゼ EBNA 融合タンパク	溶解	24)
deoxy-BIGCHAP	プラスチック分解菌 TB-35	PUR sterase(polyesterpolyurethanedegrading enzyme)	溶解・精製・抽出	25)
n-Decyl-β-D-maltoside	ウシ心臓	cytochrome c oxidase	結晶化	26)
	グラム陰性菌	tetracyclin cation/proton antiporter	結晶化	27)
	HEK293 細胞	FLAG-tagged TRP C3	溶解・精製	28), 29)
	HEK293 細胞	TRPM2(transient receptor potential melastatin type 2)	抽出・電気泳動	30)
	Sf9 細胞	ABCA 1 (ATP-binding cassette protein 1)	抽出・精製	30)
	ヒト血清	Paraoxonase(PON 1)	精製	31)

Detergent	細胞	タンパク質	用途	文献
n-Dodecyl-β-D-maltoside	グラム陰性菌	tetracyclin cation/proton antiporter	抽出・精製	27)
	ウシ心臓ミトコンドリア	ATP synthase	結晶化	32)
	Paracoccus denitrificans	nitricoxide reductase BC comples	抽出・精製	33)
	大腸菌	NA^+/H^+ antiporter	抽出・精製	34)
	sf9 細胞	His-rTRPV4	溶解	35)
	express SF+	CXCR4	抽出・溶解	36)
	sf9 細胞 Trichoplusia ni(HighFive^{TM})	YMOR	溶解	37)
	大腸菌 BL21(DE3), Sf9 細胞	LolCDE, Pal-LolCDE complex, LolA and LolCDE, DHHC protein	溶解・精製・抽出	38)
	Sf9 細胞	DHHC protein	抽出・精製	39)
	大腸菌 JM83	LolCDE	溶解・精製	40)
	HEK293 細胞	FLAG-tagged TRPC3 (canonical transient receptor potential subtype 3)	溶解	28)
	C. acidovorans TB-35	PUR esterase	抽出	25)
	ミトコンドリア	Cytochrome c oxidase	抽出	83)
n-Heptyl-*β*-D-thioglucoside	大腸菌	H^+ 輸送性 ATPase メリビオース輸送担体	抽出・再構成	41)
	腸炎ビブリオ	膜結合性 5'- ヌクレオチダーゼ	抽出・精製	42), 81)
	ブタ好中球	Cytochrome b558, FAD	結晶・抽出・精製	43)
	-----------	Photosystem II	抽出	44)
	sf21 細胞	recombinant 3OST (3-O-sulfotransferase)protein	抽出	45)
	ブタ好中球	Cytochrome b558	溶解・精製	46), 47)
	好中球	Flavocytochrome b558	溶解	48)
	ブタ肺	Phospholipase D	抽出	49)
	S. acidocaldarius strain 7	acid PPace	溶解	50)
MEGA-8	*Trypanosoma cruzi*	Trypanothione reductase	結晶化	51)
	Hi5	Mgm 1	抽出・精製	52)
MEGA-9	RBL 2H3 細胞	human FKAG-tagged GPV 1	精製	53)
	S. acidocaldarius strain 7	aacid PPace	溶解	50), 54)
	メタン精製菌	ATPase	溶解	55)
	Sulfobus	cytochromes	溶解	56)
	B. stearothermophilus K1041 (グラム陽性芽細胞形成好熱性細菌)	novel oxidase (バクテリア細胞膜)	溶解	57)
	K17q8 cell	Cytochrome bo3	溶解・精製	58)
	Thermophilic bacterium PS3	Quinol oxidase	溶解	59)
	Bacilli (グラム陽性芽細胞形成好熱性細菌)	novel oxidase (バクテリア細胞膜)	溶解	60)
MEGA-10	ウシ心臓ミトコンドリア	ubiquinol-cytochrome c reductase	結晶化	61)

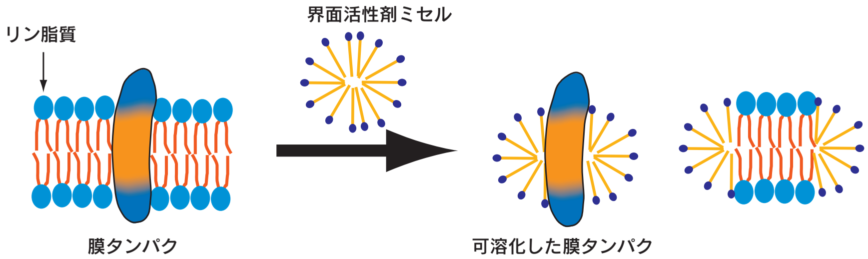
Detergent	細胞	タンパク質	用途	文献
MEGA-10	Sulfobus	cytochromes	溶解	56)
	B. stearothermophilus K1041 (グラム陽性芽細胞形成好熱性細菌)	novel oxidase (バクテリア細胞膜)	溶解	57)
	K17q8 細胞	Cytochrome bo3	溶解	58)
	ラット肝臓（メス）	microsomal 25-hydroxylase	溶解・精製	62)
n-Octyl-*β*-D-glucoside	*Trypanosoma cruzi*	Trypanothione reductase	精製	51)
	Rhodobacter sphaeroids	reaction center	結晶化	63)
	Thermus thermophilus HB8	DNA excision repair enzyme UvrB	結晶化	64)
	ヒト	17*β*-hydroxysteroid dehydrogenase (17*β*-HSD1)	結晶化	65)
	大腸菌	SecE	結晶化	66)
	大腸菌	ラクトース輸送担体	抽出・精製	67), 81)
	HL-60, HL-60R	PKC	抽出	68)
	ラット細胞	SP-A, SP-D	抽出	69)
	COS-7 細胞	NAPE-PLD	精製	16)
	Wistar ラット心臓細胞 , COS-7 細胞	NAPE-PLD	抽出・精製	70)
	Wistar ラット肺組織	NAAA	精製	71)
	R. oligospoeus	Chirinase I	精製	72)
	大腸菌 , BL21(DE3)pLysS	VAMP-2 (vesicle-associated membrane protein-2)	抽出	73)
	HEK293T 細胞	ほうれん草の葉緑体	結晶化	23)
n-Octyl-*β*-D-thioglucoside	硫黄細菌	チトクロム c オキシダーゼ	抽出・精製	74)
	大腸菌	H^+ 輸送性 ATPase メリビオース輸送担体	抽出・再構成	41)
	Halobacterium salinarium strain JW3	bacteriorhodopsin	抽出	75)
	大腸菌	Translocon, SecTEG and its mutans	精製	76)
	ブタ肺	Phospholipase D (PLD)	精製	49)
	E. tarda NUF806	antigenic proteins of E. tarda	溶解	77)
	C. acidovorans TB-35	PUR esterase	抽出	25)
	HEK293T 細胞	POMT 1, POMT 2 (O-mannosyltransferase)	精製	78)
Sodium cholate	sf9 細胞	M2 mAchR (M2 muscarinic acetylcholine receptor)	精製	79)
	ウシ心臓組織	Bovine mitochondrial complex 1	精製	80)
deoxy cholate	大腸菌	ATP synthase(F0F1)	溶解	81), 82)
Sodium cholate + deoxy cholate	好熱菌	アラニン輸送担体	溶解	81), 84)

参考文献

1) V. Lakshmi, *et al.*, *Steroid Biochem.*, **1985**, *22*, 331.
2) T. Harayama, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **2008**, *283*, 11097.
3) G. H. Perdew, *et al.*, *Anal. Biochem.*, **1983**, *135*, 453.
4) Y. Matuo, *et al.*, *Cytotechnology*, **1988**, *1*, 309.
5) R. Horiuchi, *et al.*, *Eur. J. Biochem.*, **1989**, *183,* 529.
6) W. F. Simods, *et al.*, *Proc. Natl. Acad Sci.*, **1980**, *77*, 4623.
7) M. T. Lehto, *et al.*, *Biochem. J.*, **1998**, *332*, 101.
8) K. Andersson, *et al.*, *Anal. Chem.*, **1999**, *71*, 2475.
9) R. Scindler, *et al.*, *Eur. J. Biochem.*, **1998**, *251*, 863.
10) J. Cladera, *et al.*, *Eur. J. Biochem.*, **1997**, *243*, 798.
11) D. S. Liscia, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **1982**, *257*, 9401.
12) M. Yoshida, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **2000**, *275*, 497.
13) K. Sato, *et al.*, *Mol. Biol. Cell.*, **2009**, *20*, 4444-4457.
14) A. Yamashita, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **2003**, *278*, 30382.
15) K. Yamamoto, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **2005**, *280*, 30511.
16) J. Wang, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **2006**, *281*, 12325.
17) N. Ueda, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **2001**, *276*, 35552.
18) K. Satoh, *et al.*, *Genes Cells*, **2002**, *7*, 187.
19) K. Sugie, *et al.*, *J. Immunol.*, **1995**, *154*, 1691.
20) J. Hirota, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **1995**, *270*, 19046.
21) H. Fukui, *et al.*, *J. Biochem.*, **1995**, *117*, 993.
22) T. Aeai, *et al.*, *15th International Congress of Chemotherapy*, **1987**, 19.
23) C. Miyake, *et al.*, *Plant Cell Physiol.*, **1993**, *34*, 881.
24) N. Inoue, *et al.*, *J. Clin. Microbiol.*, **1992**, *30*, 1442.
25) Y. Akutsu, *et al.*, *Appl. Envir. Microbiol.*, **1998**, *64*, 62.
26) T. Tsukihara, *et al.*, *Science*, **1995**, *269*, 1069.
27) C. Yin, *et al.*, *Molecular Mocrobiology*, **2000**, *38*, 482.
28) K. Mio, *et al.*, *J. Electron Microsc.(Tokyo)*, **2007**, *56*, 111.
29) Y. Maruyama, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **2007**, *282*, 36961.
30) K. Takahashi, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **2006**, *281*, 10760.
31) J. F. Teiber, *et al.*, *J. lipid Res.*, **2004**, *45*, 2260-2268.
32) R. Lutter, *et al.*, *Biochem. J.*, **1993**, *295*, 799.
33) J. Hendriks, *et al.*, *Biochemistry*, **1998**, *37*, 13102.
34) K. A. Williams, *et al.*, *The EMBO J.*, **1999**, *18*, 3558.
35) H. Shigematsu, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **2010**, *285*, 11210.
36) Y. Kofuku, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **2009**, *284*, 35240.
37) A. J. Kuszak, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **2009**, *284*, 26732.
38) S. Okuda, *et al.*, *PNAS*, **2009**, *106*, 5877.
39) B. C. Jennings, *et al.*, *J. Lipid Res.*, **2009**, *50*, 233.
40) N. Taniguchi, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **2008**, *283*, 8538.
41) T. Shimamoto, *et al.*, *J. Biochem.*, **1989**, *105*, 785.
42) H. Itami, *J. Biochem.*, **1989**, *105*, 785.
43) T. Miki, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **1992**, *267*, 18695.
44) Y. Kashino, *et al.*, *Plant Cell Physiol.*, **1996**, *37*, 976.
45) H. Michizuki, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **2008**, *283*, 31237.
46) H. Fujii, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **1995**, *270*, 12685.
47) S. Hashida, *J. Biol. Chem.*, **2004**, *279*, 26378-26386.
48) S. Nishida, *et al.*, *Infect. Immun.*, **2005**, *73*, 235.
49) S. Okamura, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **1994**, *269*, 31207.
50) K. Ito, *et al.*, *J. Biochem.*, **1992**, *112*, 88.
51)R. L. Krauth-Siegel, *et al.*, *FEBES Lett.*, **1993**, *317*, 105.
52) R. M. DeVay, *et al.*, *J. Cell Biol.*, **2009**, *186*, 793.
53) D. Locke, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **2003**, *278*, 15441.
54) T. Amano, *et al.*, *J. Biochem.*, **1993**, *114*, 329.
55) K. Inatomi, *et al.*, *J. Bacteriol.*, **1993**, *175*, 80.
56) T. Iwasaki, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **1995**, *270*, 30893.
57) J. Sakamoto, *et al.*, *J. Biochem.*, **1997**, *122*, 764.
58) N. Sone, *et al.*, *J. Biochem.*, **2000**, *127*, 551.
59) N. Sone, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **1987**, *262*, 15386.
60) T. Tanaka, *et al.*, *J. Biochem.*, **1996**, *119*, 482.
61) W. Yue, *et al.*, *Biochemistry*, **1991**, *30*, 2303.
62) T. Yamasaki, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **2004**, *279*, 22848.
63) J. P. Allen, *Proteins*, **1994**, *20*, 283.
64) A. Shibata, *et al.*, *Acta Cryst.*, **1999**, *D55*, 704.
65) S-X. Lin, *et al.*, *J. Endocrinol.*, **1996**, *150*, S13.
66) H. Tokuda, *et al.*, *Fed. Eur. Biochem. Soc.*, **1991**, *279*, 233.
67) M. J. Newman, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **1981**, *256*, 11804.
68) M. Nishikawa, *et al.*, *Canser Res.*, **1990**, *50*, 621.
69) J. R. Wright, *et al.*, *Am. J. Physiol.*, **1999**, *276*, 650.
70) Y. Okamoto, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **2004**, *279*, 5298.
71) K. Tsuboi, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **2005**, *280*, 11082.
72) N. Takaya, *et al.*, *Microbioligy*, **1998**, *144*, 2647.
73) S. Kozaki, *et al.*, *Infect. Immun.*, **1998**, *66*, 4811.
74) M. Kai, *et al.*, *J. Biochem.*, **1992**, *112*, 816.
75) K. Takeda, *et al.*, *J. Mol. Biol.*, **1998**, *283*, 463.
76) H. Mori, *et al.*, *J. Bacteriol.*, **2003**, *185*, 405.
77) T. Sakai, *et al.*, *J Vet Diagn Invest*, **2009**, *21*, 504.
78) K. Akasaka-Manya, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **2006**, *281*, 19339.
79) H. Furukawa, *et al.*, *Mol. Pharmacol.*, **2002**, *62*, 778.
80) I. M. Fearnley, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **2001**, *276*, 38345.
81) 土屋友房 ," 膜タンパク質の可溶化と界面活性剤 ", 化学と生物実験ライン 5, 廣川書店 (1990).
82) D. L. Foster, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **1979**, *254*, 8230.
83) T. Vanaken, *et al.*, *Methods in Enzymol.*, **1986**, *125*, 27.
84) H. Hirata, *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1976**, *69*, 665.

プロトコル

膜タンパク質等を可溶化したい



Ⅰ *n*-Octyl-*β*-D-glucoside を用いた大腸菌ラクトース輸送担体の可溶化[1,4]

1. 試薬
- *lac* Y 組み換え大腸菌 T206 より調製した膜小胞
- *n*-Octyl-*β*-D-glucoside(Code.O001)
- Sodium cholate(Code.C321)
- Dithiothreitol(DTT)
- 大腸菌由来リン脂質 (Avanti Polar Lipids 社、もしくは参考文献 5)参照)
- DEAE-Sepharose CL-6B(GE ヘルスケア社)
- リン酸カリウム
- ラクトース
- 尿素(生化学用)
- リン酸

2. 方法

以下の操作は、特にことわらない限り 4°C で行った。また、ほとんどの撹拌には Vortex mixer を用いた。

1) 別に調製した反転膜小胞 12.5 mg を 10 mg タンパク質 /ml となるように緩衝液 (50 mmol/l リン酸カリウム、pH7.5、0.5 mmol/l DTT、10 mmol/l ラクトース) に懸濁する。
2) 等量の尿素溶液 (10 mmol/l) を室温下で撹拌しながら滴下する。
3) 氷浴中で 10 分間放置し、175,000 x *g* で 1 時間遠心する。
4) 沈殿を 1.75 ml の緩衝液 (50 mmol/l リン酸カリウム、pH7.5) に懸濁し、Sodium cholate が終濃度で 6% となるように Sodium cholate 溶液 (20% w/v、pH7.8) を撹拌しながら加える。
5) 氷浴中で 20 分間放置後、26,000 x *g* で 15 分間遠心する。(これまでの操作で、膜の不要タンパク質が除去されている)
6) 沈殿を 5 ml の緩衝液 (10 mmol/l リン酸カリウム、pH5.8) に懸濁し、遠心を繰り返す。
7) 沈殿を 1.45 ml の緩衝液 (10 mmol/l リン酸カリウム、pH5.8) に懸濁し、DTT 溶液 (100 mmol/l)17.5 µl、ラクトース 13 mg、リン脂質溶液 (50 mg/ml)131 µl を加え撹拌する。
8) これに、*n*-Octyl-*β*-D-glucoside の終濃度が 1.25% となるように、*n*-Octyl-*β*-D-glucoside 溶液 (15% w/v、10 mmol/l リン酸カリウム、pH5.8)146 µl を加える。このとき、タンパク質 / リン脂質 / 界面活性剤の比率は、1：3：10 となる。
9) これを泡立たないように注意してよく撹拌し、氷浴中で 10 分間放置してからさらに撹拌した後、175,000 x *g* で 1 時間遠心する。
10) 上清を取り、リン酸 (10 mmol/l リン酸 ,1.25% の *n*-Octyl-*β*-D-glucoside を含む) で pH5.8 に合わせる。
11) 1 ml のタンパク質抽出液 (約 300 µg のタンパク質を含む) を、前もって準備した DEAE-Sepharose カラムにて精製する。

溶出液：10 mmol/l リン酸カリウム、pH5.8、1 mmol/l DTT、20 mmol/l ラクトース、0.25 mg リン脂質 /ml、1.25 % (w/v) *n*-Octyl-*β*-D-glucoside

Ⅱ *n*-Heptyl-*β*-D-thioglucosideを用いた腸炎ビブリオの膜結合性 5'- ヌクレオチダーゼの可溶化[1,6]

1. 試薬
- フレンチプレス法にて調製した反転膜小胞
- *n*-Heptyl-*β*-D-thioglucoside (Code.H015)
- EDTA-2K (Code.K001)
- Dithiothreitol(DTT)
- Tricine (Code.GB19)
- MOPS (Code.GB13)
- Tris(トリスヒドロキシメチルアミノメタン)
- 塩化ナトリウム
- 硫酸マグネシウム
- 2-Mercaptoethanol
- DEAE-Sepharose CL-6B(GE ヘルスケア社)

2. 方法

以下の操作は、特にことわらない限り 4°C で行う。

1) 腸炎ビブリオの反転膜小胞 (タンパク質 145 mg を含む) を緩衝液 (3 mmol/l Tricine-Tris、pH8.0、0.5 mmol/l EDTA-2K、1 mmol/l 2-Mercaptoethanol)30 ml に懸濁し、約 30 分間氷浴中でゆるやかに撹拌した後、105,000 x *g* で 1 時間遠心する。
2) タンパク質濃度が 1 mg/ml となるように *n*-Heptyl-*β*-D-thioglucoside 40 mmol/l を含む緩衝液 (20 mmol/l MOPS-Tris、pH7.5、5 mmol/l 硫酸マグネシウム、1 mmol/l DTT) に懸濁し、氷浴中で 15 分間ゆるやかに振とうする。
3) 105,000 x *g* で 1 時間遠心して、5-'ヌクレオチダーゼが可溶化された上清を得る。
4) これを、前もって準備した DEAE-Sepharose カラムにて精製する。

溶出液：50 mmol/l MOPS-Tris、pH8.0、5 mmol/l 硫酸マグネシウム、1 mmol/l DTT、40 mmol/l *n*-Heptyl-*β*-D-thioglucoside、100 → 400 mmol/l (グラジェント) 塩化ナトリウム

III CHAPS を用いたマクロファージの細胞骨格の露出(参考文献７の改良法)[7-9]

1．試薬

・*S. typhimurium* LPS (Difco 社)
・ウシ胎児血清 (FBS)
・ヘパリン
・Dulbecco's MEM(DMEM)
・プラスチックカバースリップ (住友ベークライト社、セルデスク)
・PIPES (Code.GB15)
・HEPES (Code.GB10)
・GEDTA (Code.G002)
・Phorbol 12-myristate 13-acetate(PMA、Sigma 社)
・塩化マグネシウム
・CHAPS (Code.C008)
(シリカゲルデシケーター中で２週間ほど乾燥させて使用)

2．方法

1) *S. typhimurium* LPS を 200 µg/ml に滅菌蒸留水で調製し、マウス (SLC-ICR、7〜10 週齢)1 匹あたり 0.25 ml 腹腔内に注射する。
2) 5〜6 日後に 10% FBS、10 U/ml ヘパリンを添加した 10 mmol/l HEPES 含有 DMEM(pH7.1) で腹腔洗浄し、細胞を採取する。
3) この付着性腹腔細胞を 4°C の DMEM で 3 回遠心洗浄 (1000 rpm、10 分間) する。
4)10% FBS 含有 DMEM で 10^6 cells/ml となるように調製し、シャーレに移す。
5) 4°C で一夜 FBS コートしたプラスチックスリップを DMEM で 10 分間洗浄し､10^6 cells/ml に調製されたシャーレに入れ､37°C で 20 分間 CO_2 インキュベーターで培養する (スリップ 1 枚に細胞液 1 ml)。
6) 4°C の DMEM を入れたシャーレに細胞の付着したプラスチックスリップを 1 枚ずつ入れ、パスツールピペットで非付着細胞を取り除く。
7) 希釈した PMA を添加した 10% FBS 含有 DMEM で、37°C で 20 分間 CO_2 インキュベーターで培養する。
8) 得られた細胞付着スリップを室温の DMEM で 10 分間洗浄する。
9) さらに室温の PHEM buffer(60 mmol/l PIPES、25 mmol/l HEPES、10 mmol/l GEDTA、2 mmol/l 塩化マグネシウム、pH6.9) で 10 分間、2 回洗浄する。
10) あらかじめ、37°C にした PHEM buffer に細胞付着スリップを移し、5 分程度なじませる。
11) 6 cm のガラスシャーレに PHEM buffer で 0.5% に調製した CHAPS 溶液＊2,3 を 15 ml 程度入れ＊4、ふたを逆さまにのせ、溶液温度を 37°C にする。
これに、細胞付着スリップを入れ (1 枚のシャーレに 2 枚程度のスリップ)、3 分間骨格を露出する。この時、45〜60 秒間に一度軽くシャーレを揺り動かす。
12) 37°C の PHEM buffer で 3 回洗浄する (2〜3 分、10 分、10 分)。後は室温の PHEM buffer に戻し、細胞骨格試料とする。

＊1 この洗浄が十分でないと、細胞骨格の露出率が低下する。
＊2 CHAPS 溶液は使用前 1 時間以内に調製し、泡立たないように注意して混和する。また、CHAPS の濃度は正確に 0.5%(8.132 mmol/l) とする。濃度が高すぎると､カバースリップからはがれ落ちる細胞が増え、一部細胞骨格が溶出されることがある。また濃度が薄ければ、細胞膜の可溶化がうまくいかない。
＊3 CHAPS の溶液量の目安は、13.5 mmφ のカバースリップ 1 枚につき 6 ml 以上である。
＊4 振とうが強すぎると､細胞がはがれてしまうので注意する。

IV CHAPS を用いたプロトプラストからの液胞の単離[8]

1．試薬

・*Atriplex gmelini* の緑葉から調製したプロトプラスト
(1.2 mol/l Sorbitol 中で単離)
・CHAPS (Code.C008)
・GEDTA(EGTA) (Code.G002)
・HEPES (Code.GB10)
・Sorbitol
・Tris

2．方法

1) プロトプラスト 1 ml を Babcock bottle に入れる＊1。
2) これに緩衝液 (1.0 mol/l Sorbitol、1 mmol/l GEDTA、0.5 mmol/l CHAPS、20 mmol/l HEPES-Tris、pH8.0)50 ml を加え、120 x *g* で 3 分間遠心する。
3) 上清中の液胞を集め (約 1.2 ml＊2)、Babcock bottle に入れる。
4) これを緩衝液 (1.0 mol/l Sorbitol, 20 mmol/l HEPES-Tris, pH8.0) で 20 倍に希釈し、120 x *g* で 3 分間遠心して、上清中に浮遊している液胞を回収する。

＊1 プロトプラストを 0.5 mol/l Sorbitol で単離する場合は、10% Ficoll 400 等を添加して、プロトプラストを浮遊させる。
＊2 プロトプラストが上清に濃縮されない場合は、Ficoll 400 等で溶液の比重を高める。

参考文献

1) 土屋友房 ," 膜タンパク質の可溶化と界面活性剤 ," 化学と生物実験ライン 5, 廣川書店 , **1990**.
2) 笠原道弘 , 有機物の膜輸送系の再構成と精製 , 蛋白質核酸酵素 ,**1979**, *24*,1077.
3) 広瀬茂久 , 血管作動性ホルモン受容体の研究と界面活性剤 , *Dojin News*, **1987**, *39*, 3.
4) M. J. Newman, D. Foster, T. H. Wilson, H. R. Kaback, *J. Biol. Chem.*, **1981**, *256*, 11804.
5) G. F. Ames, *J. Bacteriol.*, **1968**, *95*, 833.
6) H. Itami, Y. Sakai, T. Shimamoto, H. Hama, M. Tsuda, T. Tsuchiya, *J. Biochem.*, **1989**, *105*, 785.
7) 本田秀明 , 斎藤卓也 , 山口淳二 , 両性界面活性剤による細胞骨格露出法 , 細胞 , **1990**, *22*(11), 451.
8) J. Yamaguchi, M. Shibano, T. Saito, *ICEM*, **1994**, *13*, 43.
9) T. Matoh, J. Watanabe, E. Takahashi, *Plant Physiol.*, **1987**, *84*, 173.

6. タンパク質定量キット

DOJINDO MOLECULAR TECHNOLOGIES, INC.

-Proteostain- Protein Quantification Kit-Rapid

500 tests ; 同仁品コード (PQ01)
2,500 tests ; 同仁品コード (PQ01)

-Proteostain- Protein Quantification Kit-Wide Range

500 tests ; 同仁品コード (PQ02)
2,500 tests ; 同仁品コード (PQ02)

[PQ01]

キット内容

[500 tests]

・CBB solution	100 ml × 2
・Standard BSA solution (4,000 μg/ml)	1.5 ml × 1

[2,500 tests]

・CBB solution	1,000 ml × 1
・Standard BSA solution (4,000 μg/ml)	1.5 ml × 2

取扱注意

1. 安衛法 , 2. 保存方法：冷蔵

[PQ02]

キット内容

[500 tests]

・WST-8 solution	10 ml × 1
・Buffer solution	100 ml × 1
・Standard BSA solution (10,000 μg/ml)	1.5 ml × 1

[2,500 tests]

・WST-8 solution	50 ml × 1
・Buffer solution	500 ml × 1
・Standard BSA solution (10,000 μg/ml)	1.5 ml × 2

取扱注意

1. 保存方法：遮光 , 冷蔵

キット以外に必要なもの

10 μl, 200 μl マイクロピペッター、インキュベーター、プレートリーダー

性　質

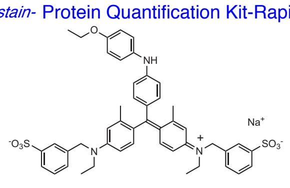
タンパク質濃度の定量法としては Lowry 法、Bicinchoninate 法 (BCA法)、Biuret 法、Bradford 法などがある。Protein Quantification Kit-Rapid は、高感度で反応が早いタンパク質検出用試薬 Coomassie Brilliant Blue G(CBB) を用いており、Bradford 法として知られている。CBB はタンパク質に作用し、酸性条件下で青色に呈色する (λ_{max}= 595 nm)。しかも呈色は 1 分以内に終了し、数分でタンパク質の定量を行うことができる。

Protein Quantification-Wide Range は、塩基性条件での tetrazolium salt の還元反応を利用したものである。Tetrazolium salt はタンパク質により容易に還元され formazan dye を生成する。WST-8 の formazan dye は中性域では黄色を示すが、高 pH 域では青色を示す。還元反応を利用しているため界面活性剤は測定に影響を及ぼしにくい。

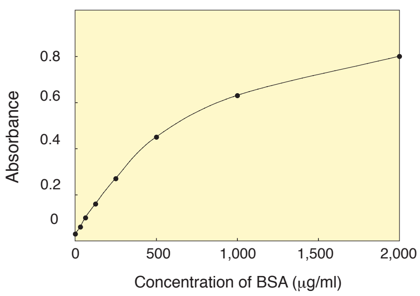
測定範囲は、それぞれ以下の通りである。

Protein Quantification Kit-Rapid　　　: BSA 換算 10 ～ 2,000 μg/ml
Protein Quantification Kit-Wide Range : BSA 換算 100 ～ 5,000 μg/ml

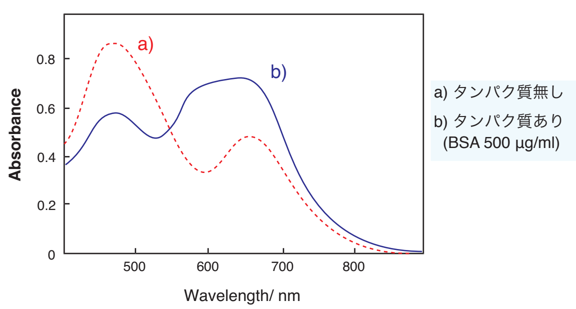
-Proteostain- Protein Quantification Kit-Rapid [PQ01]



Coomassie Brilliant Blue G

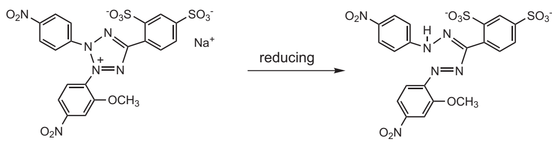


Standard BSA solutionで作成した検量線の例

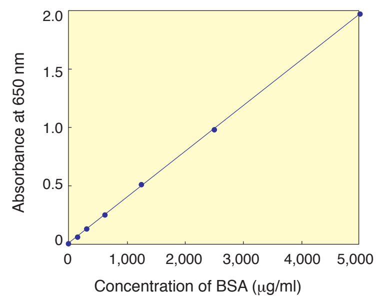


Coomassie Brilliant Blue G の吸収スペクトル

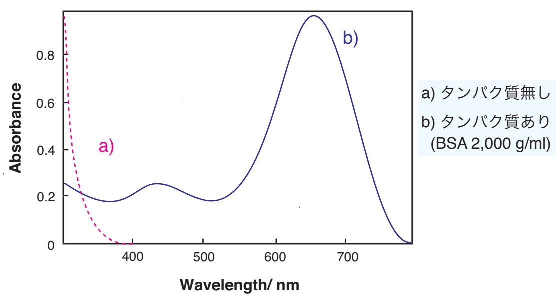
-Proteostain- Protein Quantification Kit-Wide Range [PQ02]



WST-8　　　WST-8 formazan



Standard BSA solutionで作成した検量線の例

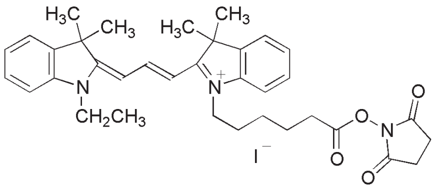


WST-8 の吸収スペクトル

7. タンパク質蛍光標識試薬

IC3-OSu special packaging

20 µg×3 ; 同仁品コード (I271)



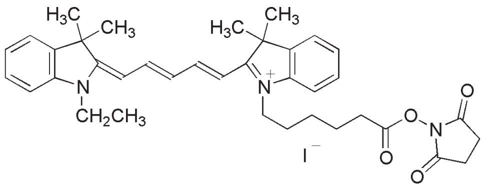
N-Ethyl-*N*'-[5-(*N*''-succinimidyloxycarbonyl)pentyl]
indocarbocyanine iodide
$C_{35}H_{42}IN_3O_4$=695.63

規格　(1) 性状 : 濃赤色固体
(2) 純度 (HPLC) : 80.0% 以上
(3) ジメチルスルホキシド溶状 ： 試験適合
(4)NMR スペクトル : 試験適合
溶解例　20 µg/40 µl(ジメチルスルホキシド)
取扱注意 保存方法 : 吸湿注意 , 冷凍

蛍光特性　$\lambda_{ex/em}$=550/570 nm

IC5-OSu special packaging

20 µg×3 ; 同仁品コード (I272)



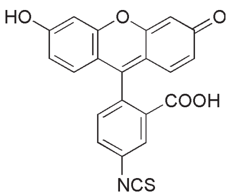
N-Ethyl-*N*'-[5-(*N*''-succinimidyloxycarbonyl)pentyl]-
3,3,3',3'-tetramethyl-2,2'-indodicarbocyanine iodide
$C_{37}H_{44}IN_3O_4$=721.67

規格　(1) 性状 : 濃青色固体
(2) 純度 (HPLC) : 80.0% 以上
(3) ジメチルスルホキシド溶状 ： 試験適合
(4)NMR スペクトル : 試験適合
溶解例　20 µg/40 µl(ジメチルスルホキシド)
取扱注意 保存方法 : 吸湿注意 , 冷凍

蛍光特性　$\lambda_{ex/em}$=640/660 nm

FITC-I

100 mg ; 349-03661 同仁品コード (F007)
500 mg ; 343-03664 同仁品コード (F007)

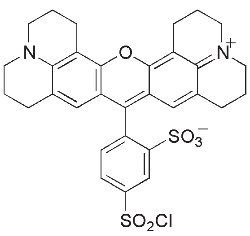


Fluorescein-4-isothiocyanate
CAS No. 3326-32-7
$C_{21}H_{11}NO_5S$=389.38

規格　(1) 性状 : 黄橙色粉末
(2) 純度 (HPLC) : 95.0% 以上
(3) アセトン溶状 ： 試験適合
(4) モル吸光係数 : 80,000 以上 (492 nm 付近)
(5)IR スペクトル : 試験適合
溶解例　100 mg/10 ml(アセトン)
取扱注意 保存方法 : 冷蔵
蛍光特性　$\lambda_{ex/em}$=495/520 nm

Sulforhodamine 101 acid chloride

10 mg ; 345-05221 同仁品コード (S016)



1*H*,5*H*,11*H*,15*H*-Xantheno[2,3,4-ij:5,6,7-i'j']diquinolizin-
18-ium,9-(2-sulfo-4-chlorosulfophenyl)-2,3,6,7,12,13,16,17-
octahydro-,inner salt
CAS No. 82354-19-6
$C_{31}H_{29}ClN_2O_6S_2$=625.16

規格　(1) 性状 : 紫色結晶性粉末
(2) 純度 (TLC) : 85.0% 以上
溶解例　1 mg/ml(クロロホルム)
取扱注意 保存方法 : 遮光 , 冷凍

蛍光特性　$\lambda_{ex/em}$=568/590 ～ 630 nm

※本製品は、二種類のスルホニルクロライド化合物を含む混合物です。

プロトコル

タンパク質を蛍光標識したい

I IC-Dye を使用したタンパク質標識例

1. 試薬
・50 mmol/l リン酸緩衝液 (pH8.0)
・1 mmol/l グアニジン液
・(Lu)DMSO (Code. LU08)
・10 mmol/l リジン溶液

2. 方法
1) タンパク質をリン酸緩衝液に溶解する (2 mg/ml)。
2) 1) の溶液 25 µl (タンパク質 50 µg) をチューブに入れる。
3) 1 mmol/l グアニジン塩酸塩 25 µl を 2) のチューブに入れる。
4) 98°C で 3 分間加熱する。
5) IC 3（もしくは IC5）OSu special packaging 20 µg を DMSO 80 µl に溶解する。→（試薬溶液）
6) 4) のチューブに 5) の試薬溶液 1 µl を添加し、混合する。
7) 氷上で 1 時間反応させる。
8) 10 mmol/l リジン溶液を 2 µl 添加し、氷上で 15 分静置する。
9) 反応液をゲルろ過もしくは TCA 沈殿を行い、未反応の色素を除去する。

II BSA への IC3(IC5) の標識例

1. 試薬
・100 mmol 炭酸緩衝液 (pH8.5)
・Dulbecco's PBS(-)
・(Lu)DMSO (Code. LU08)

2. 操作手順
1) BSA を炭酸緩衝液に溶解する。(1.2 mg/ml)。→（BSA 溶液）
2) IC3(もしくは IC5) OSu special packaging 20 µg を DMSO 6 µl に溶解する。 → （試薬溶液）
3) BSA 溶液 125 µl に試薬溶液 3 µl を加える。（試薬量は BSA に対して約 7.2 倍量となる。）
4) 30°C で 1 時間インキュベートする。
5) 反応液をゲルろ過もしくは TCA 沈殿を行い精製し、未反応の色素を除去する。

III FITC-I を使用した抗体標識例

＊「免疫の生化学」, 蛋白質核酸酵素編集部編 , 共立出版発行より引用

1) 抗体蛋白液の蛋白量を屈折計で計り (A mg/ml) ついで液量を測定 (B ml) し、総蛋白量を計算する (A×B=C mg)。
2) 総蛋白量の 1/100 ～ 1/150 量の FITC を秤量し (蛋白液量により加減する)、2% の蛋白液 (C/20=D ml) の 1/10 量 (D/10=E ml) に相当する 0.5 mol/l 炭酸緩衝液 (pH9.5) で溶解する。
※緩衝溶液中で FITC は徐々に分解していきます。速やかにご使用ください。また、DMSO やアセトンなどに FITC-I を溶解後、反応時に緩衝液に添加する方法もあります。
3) ついで蛋白溶液 B ml にあらかじめ生理食塩水 F ml(D−(B ＋ E) ＝F ml) を加え、これに FITC 溶液を加える。（ここで蛋白液は、はじめて 2% になる）
4) この場合、両液とも 1 ～ 2°C に保っておく。pH9.5 であることを確かめてから、7 ～ 9°C の温度で泡立てないように 4 時間撹拌する。
※室温で 1 ～ 2 時間程度の反応でも結構です。抗体の性質にあわせてください。
5) 反応液を Sephadex カラムろ過し、未反応の色素を除去する。(PBS pH7 使用)
6) 必要があれば、更に、DEAE カラムで分離精製する。

URL: http://www.dojindo.co.jp
E-mail: info@dojindo.co.jp
Free dial: 0120-489548
Free fax : 0120-021557

株式会社 同仁化学研究所
熊本県上益城郡益城町田原 2025-5 熊本テクノ・リサーチパーク 〒 861-2202
Tel.096-286-1515（代表）Fax.096-286-1525

ドージン・イースト (東京)
東京都港区芝大門 2-1-17 朝川ビル 7F 〒 105-0012
Tel.03-3578-9651（代表）Fax.03-3578-9650

25. 06. 18