

バイオ実験で失敗しない!

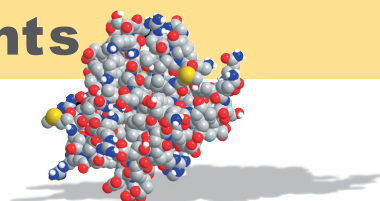
タンパク質精製と 取扱いのコツ



序 森山達哉

第1章 タンパク質の取扱いと抽出のコツ

- ① 変性・分解を防ぐ取扱いと保存のコツ 森山達哉 10
はじめに／バッファーの選択／変性・分解を防ぐ基本的な注意点／変性・分解を防ぐ取扱いと保存のコツ
- ② 動物細胞・組織からの抽出およびオルガネラの分画 森山達哉 16
はじめに／動物組織・臓器からの抽出の一般的な流れ／培養細胞からのタンパク質抽出／細胞内オルガネラおよびそれらの膜画分の分画／動物細胞・組織からの抽出のコツ
- ③ 植物からの抽出 武田 徹 23
はじめに／抽出液の調製／破碎法／オルガネラの調製法／植物からのタンパク質抽出のコツ
- ④ 溶解性の差などを利用した分画抽出 安達 伸 30
はじめに／塩析（硫酸沈殿）／硫酸沈殿のコツ／有機溶媒による沈殿／少量のタンパク質の分画抽出／キットを上手に利用するためのコツ／得られたタンパク質の定量のコツ
- ⑤ 膜タンパク質の可溶化 森山達哉 38
はじめに／膜表在性タンパク質の可溶化／膜タンパク質の可溶化／タンパク質の可溶化のコツと注意点
- ⑥ タンパク質の定量 森山達哉 43
はじめに／タンパク質の精製過程におけるタンパク質定量／精製行程での大まかなタンパク質濃度の検討／さまざまなタンパク質定量法／キットを用いたタンパク質定量のコツとヒント



第2章

タンパク質精製のコツ（基本編）

- ① 精製の目的と戦略 森山達哉 52
はじめに／精製前にチェックしておくべき項目／精製の一般的な流れ／精製の戦略のコツ
- ② タンパク質をモニターする方法 森山達哉 58
はじめに／酵素活性をモニターする／酵素活性以外のタンパク質のモニター方法／抗体を用いたモニター法／タンパク質をモニターする際のコツと注意点
- ③ カラムクロマトグラフィーによる精製計画の基本 稲川淳一 62
はじめに／精製計画の立て方
- ④ 各種カラムクロマトグラフィー技術の特徴 稲川淳一 67
はじめに／クロマトグラフィー装置／カラムクロマトグラフィーの技術の種類／カラムクロマトグラフィーの組み合わせ方／バッファーの調製／カラムの取扱い・メンテナンス
- ⑤ 限外濾過膜を用いた濃縮・精製 松井有紀子 82
はじめに／膜材質／濾過様式／限外濾過膜を選択する際のコツ／界面活性剤を含む試料を濾過する際のコツ／濾液を回収する際のコツ
- ⑥ 電気泳動と純度検定 安達 伸 87
はじめに／ポリアクリルアミドゲル電気泳動（PAGE）による純度検定／サンプル調製時のコツ／ゲル染色に失敗しないためのコツ／CCDカメラタイプでの撮影のコツ／可視染色したゲルをスキャナーで取り込む際のコツ／チップ型電気泳動を用いたタンパク質の純度検定

第3章

タンパク質精製のコツ（応用編）

- ① 微量タンパク質の精製・取扱い 長野光司 98
はじめに／タンパク質・ペプチドのチューブへの吸着を防ぐ／外来不純物の混入を避ける／微量タンパク質・ペプチド回収のコツ
- ② 電気泳動を用いた分離・精製 緒方訓子 102
はじめに／分取用電気泳動装置を用いた分離・精製／電気泳動を用いたタンパク質精製のコツ
- ③ 酵素消化とペプチドの単離・精製—質量分析用試料の調製 長野光司 109
はじめに／電気泳動を行う場合の試料調製／電気泳動を行わない場合の試料調製／MS解析を行うサンプル調製のコツ
- ④ 質量分析による同定 長野光司 116
はじめに／質量分析計による測定／データベース検索によるタンパク質同定／質量分析計によるタンパク質同定のコツ

5 シークエンスによる同定 長野光司 124

はじめに／エドマン分解／試料の調製／N末端シークエンサー／アミノ酸シークエンスで決定できないもの／クロマトグラムからアミノ酸を正しく読むためのコツ

6 ペプチドの精製 大日向耕作, 吉川正明 129

はじめに／生理活性ペプチド検出法の選択／ペプチド構造決定／ペプチド合成／ペプチドの取扱いのコツ

第4章 組換えタンパク質の発現と精製のコツ

1 発現系の選択 本庄栄二郎, 黒木良太 136

はじめに／さまざまなタンパク質発現系／タンパク質発現系選択のコツ

2 タンパク質発現系－大腸菌コールドショックベクター 小堀博史, 高蔵 晃 140

はじめに／pColdベクターの特徴と発現ベクター構築／目的遺伝子の発現方法／pColdベクターにより目的遺伝子を発現させるコツ

3 タンパク質発現系－発現クローンの構築：Gateway[®]/MultiSite Gateway[®]法 矢幡一英, 曾根岳史, 今本文男 144

はじめに／Gateway法の原理とクローニング手順／MultiSite Gateway[®]法の原理とクローニング手順／Gateway[®]/MultiSite Gateway[®]法の利点／クローン構築上のコツ

4 タグ付き組換えタンパク質の発現と精製 小堀博史, 高蔵 晃 148

はじめに／タグ配列の特徴／目的遺伝子の発現方法／タグ付きタンパク質精製法のコツ／プロテアーゼによるタグ配列切断のコツ／目的タンパク質分離のコツ

5 組換えタンパク質の発現 本庄栄二郎, 黒木良太 155

はじめに／細胞内タンパク質の発現／分泌タンパク質の発現／膜タンパク質の発現／発現量を向上させるコツ

6 組換えタンパク質の精製 本庄栄二郎, 黒木良太 161

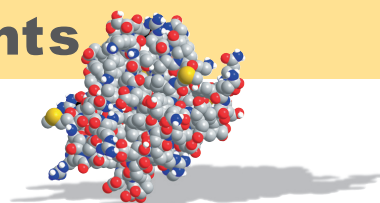
はじめに／菌体や細胞からのタンパク質の精製／組換えタンパク質の精製度の評価／組換えタンパク質精製のコツ

7 分解や封入体への対応 本庄栄二郎, 黒木良太 168

はじめに／組換えタンパク質のプロテアーゼ分解への対応／組換えタンパク質の化学反応による分解への対応／組換えタンパク質の封入体への対応／組換えタンパク質リフォールディングのコツ

8 タグ付き組換えタンパク質の検出 森山達哉 175

はじめに／さまざまなタグとその検出方法／ハイスルーブットでの検出方法／タグ付き組換えタンパク質検出のコツとポイント



第5章 抗体作製と使用のコツ

- ① 抗体作製の目的と手順 森山達哉 180
はじめに／抗体の主な使用法と目的／抗体作製の手順／抗血清を得てからの流れ／抗体利用と作製のコツ
- ② モノクローナル抗体作製法 片岡千和 188
はじめに／モノクローナル抗体作製計画の立案／実験室環境と必要設備／モノクローナル抗体作製の流れ
- ③ 抗体精製方法 稲川淳一 196
はじめに／抗体の評価，多様な利用法／抗体の精製方法／抗体精製のコツ

付録：タンパク質研究に便利なツール，委託抗体作製等の情報 森山達哉 204

索引 209

表紙写真解説



タンパク質の微量ハンドリング

写真は，マイクロチューブ内へ回収したHPLC溶出フラクションの一部を分取し，酵素活性測定を行う作業の一コマ



中圧カラムクロマトグラフィーによるタンパク質の精製操作

写真は，シリンジを用いてサンプルをゆっくりとアプライしている様子。泡を入れないように慎重な作業を行う必要がある

写真提供：森山達哉（近畿大学農学部応用生命化学科）