

改訂

# タンパク質実験 ハンドブック

取り扱いの基礎から機能解析まで完全網羅!

## 目次

改訂第2版序 .....	竹縄忠臣
初版序 .....	竹縄忠臣

### 第1章 タンパク質研究ストラテジー

タンパク質研究のストラテジー .....	竹縄忠臣 ● 16
----------------------	-----------

### 第2章 タンパク質取り扱いの基礎技術

1. タンパク質の定量法 .....	廣明秀一 ● 21
2. タンパク質の濃縮法 ～限外濾過法を中心に .....	廣明秀一 ● 26
3. タンパク質の透析法 .....	廣明秀一 ● 30
4. タンパク質の保存法 .....	廣明秀一 ● 34
5. SDS電気泳動法 (SDS-PAGE) によるタンパク質の分離 .....	近藤晃弘 ● 38
6. ウエスタンブロッティング .....	徳田恵美 ● 45

### 第3章 タンパク質精製法

1. タンパク質の分画・沈殿法 .....	廣明秀一 ● 49
2. カラムクロマトグラフィーによる精製	
I) クロマトグラフィー総論 ～オープンカラムとバックドカラム .....	濱田大三 ● 53

II) イオン交換クロマトグラフィー	濱田大三 ● 56
III) ゲル濾過クロマトグラフィー	天野剛志 ● 60
IV) 疎水クロマトグラフィー	廣明秀一 ● 65
V) リガンドアフィニティークロマトグラフィー	天野剛志 ● 69
VI) 金属アフィニティークロマトグラフィー ～His タグを中心に	天野剛志 ● 75
VII) 抗体アフィニティークロマトグラフィー	天野剛志 ● 80
VIII) 逆相HPLC (逆相高速液体クロマトグラフィー)	濱田大三 ● 84
3. タンパク質の巻き戻し	
I) タンパク質の巻き戻しとは	濱田大三 ● 87
II) 封入体の回収	濱田大三 ● 90
III) 希釈法	濱田大三 ● 92
IV) 段階的透析法	濱田大三 ● 94
V) 金属アフィニティークロマトグラフィーを用いた方法	濱田大三 ● 96
4. 構造研究のためのタンパク質精製前処理 ～NMR・X線解析に必要なタンパク質	廣明秀一 ● 98

## 第4章 質量分析を利用したタンパク質同定法

1. 質量分析を利用したタンパク質同定法の概要と 質量分析用の銀染色法	吉野健一 ● 103
2. タンパク質のゲル内消化と試料の前処理	吉野健一 ● 110
3. ペプチドマスフィンガープリンティングによるタンパク質の同定	吉野健一 ● 115
4. LC/MS/MSによるタンパク質の同定	吉野健一 ● 122
5. LC/MS/MSによるショットガンプロテオミクス解析のための サンプル調製法	長野光司 ● 131
6. 知識データベースを利用した同定タンパク質の アノテーション情報の取得	長野光司 ● 138

## 第5章 酵素活性測定法

1. 発現タンパク質を用いての酵素活性測定例 ～Km値, Vmax値	伊集院 壮 ● 143
2. PI3キナーゼの活性測定法	伊集院 壮 ● 148

## 第6章 抗体作製と精製

1. 免疫動物の選択と免疫 ..... 長谷川純矢 ● 154
2. ポリクローナル抗体の作製 ..... 長谷川純矢 ● 156
3. モノクローナル抗体の作製 ..... 長谷川純矢 ● 159
4. ペプチド抗体の作製 ..... 徳田恵美 ● 164
5. 抗体の精製 ..... 徳田恵美 ● 168

## 第7章 リン酸化タンパク質の検出と利用

1. Phos-tag™を用いたタンパク質リン酸化解析 ..... 長谷川純矢 ● 172
2. MSを用いてのリン酸化部位の同定 ..... 波多野直哉 ● 175
3. リン酸化ペプチド抗体の作製と応用 ..... 辻田和也 ● 180
4. 抗リン酸化チロシン・セリン・スレオニン抗体を用いた  
イムノブロットィング ..... 辻田和也 ● 182
5. リン酸化部位変異体 (mimic) の導入と応用 ..... 辻田和也 ● 185

## 第8章 発現タンパク質の作製と利用

1. タンパク質発現系の選択 ..... 入野康宏 ● 188
2. 大腸菌を使った組換えタンパク質の発現と精製 ..... 入野康宏 ● 190
3. バキュロウイルスを利用した組換えタンパク質の発現と精製 ..... 山崎大輔 ● 195
4. 哺乳類細胞を用いたタンパク質の発現と精製 ..... 徳田恵美 ● 200
5. *in vitro* translation (無細胞系タンパク質合成) ..... 辻田和也 ● 203
6. タンパク質の蛍光標識  
～脂質結合タンパク質を蛍光プローブとしたイノシトールリン脂質検出法 ..... 入野康宏 ● 206

## 第9章 動物細胞でのタンパク質の発現とその応用

1. 遺伝子導入によるタンパク質の発現
  - I) プラスミドを用いた一過的な発現 ..... 福本未記 ● 209

II) ウイルスベクターを用いた遺伝子の導入	栗栖修作	215
III) マイクロインジェクション	山崎大輔	220
2. タンパク質の培養細胞への導入法	伊集院 壮	224
3. 安定形質発現株の作製法	栗栖修作	228
4. 蛍光タンパク質の構築, 発現と生細胞での解析	山崎大輔	233
5. 蛍光タンパク質プローブを用いた 細胞内イノシトールリン脂質の観察	入野康宏	238
6. 哺乳類培養細胞での RNAi	栗栖修作	241
7. FRET イメージング	山口英樹	248
8. 全反射蛍光 (TIRF) 顕微鏡法	山口英樹	253

## 第10章 タンパク質の免疫染色

1. 組織の免疫染色	村上大輔	256
2. 培養細胞の蛍光免疫染色	澤井治子, 徳田恵美	261

## 第11章 タンパク質の性質の解析

1. プルダウンアッセイ ~個々の相互作用から網羅的解析まで	山崎大輔	265
2. プルダウンアッセイの応用 ~低分子量Gタンパク質の活性測定	山崎大輔	269
3. 免疫沈降法	伊藤俊樹	273
4. タンパク質とリン脂質の相互作用の検出法	辻田和也	276
5. タンパク質複合体の解析① ~ $K_D$ 値の算出法	伊集院 壮	281
6. タンパク質複合体の解析② ~密度勾配遠心法	栗栖修作	285
7. タンパク質の二次構造予測とモチーフ/ドメイン検索	栗栖修作	290

● 索引		297
------	--	-----