

タンパク質実験ノート



タンパク質をとり出そう

(抽出・精製・発現編)

contents

改訂第4版の発行に際して 岡田雅人

初版序 宮崎香 岡田雅人

第1章 タンパク質実験の進め方

宮崎香 12

I-1 基本的な実験の流れ	12
I-2 タンパク質実験のポイント	14

第2章 タンパク質の基本的な実験操作

I バッファーの調製法 西望 17

I-1 バッファーの選択	17
I-2 バッファーの調製例	19

① Phosphateバッファー（リン酸バッファー） ② Trisバッファー ③ GTAバッファー

II タンパク質の安定化 西望 23

II-1 タンパク質の構造	23
II-2 安定化試薬	25

① タンパク質を取り扱う際の一般的な注意事項 ② 防腐剤 ③ プロテアーゼ阻害剤
④ 多水酸基性化合物 ⑤ SH基保護剤、酸化防止剤 ⑥ 吸着防止剤 ⑦ その他

III タンパク質の定量法 奥村宣明 29

III-1 UV法 (280 nm)	30
III-2 Biuret法	31
III-3 Lowry法	31
III-4 BCA法	32
III-5 Bradford法	33



第3章 タンパク質の抽出法

I 細胞の破碎と分画	35
I-1 動物組織	中村正彦 35
① 原理と基礎知識 ② 分画の実際（肝臓の摘出と分画）③ 細胞小器官の分離精製	
I-2 培養細胞	宮崎 香 44
① バッファーの選択 ② 培養液に分泌されたタンパク質の抽出法	
③ 細胞からの抽出一（1）細胞分画法 ④ 細胞からの抽出二（2）全細胞抽出法	
I-3 酵母	中井正人 中井由実 53
酵母の破碎と分画	
I-4 植物	藤田祐一 58
II タンパク質の可溶化法	中村正彦 63
II-1 生体膜成分の分離	63
① 核膜の分離 ② ミトコンドリアの膜成分の分離 ③ 細胞膜の単離精製	
II-2 膜タンパク質の可溶化	67
① 膜タンパク質の存在様式 ② 生体膜組成と膜タンパク質の安定性	
③ 膜タンパク質の可溶化の方法	

第4章 タンパク質の分離精製法

I 精製の組み立て方	宮崎 香 73
I-1 精製をはじめる前に	73
① 活性測定 ② 精製の目標 ③ よい出発材料の確保 ④ タンパク質の安定化	
I-2 精製の進め方	74
II 硫安分画, 濃縮, 脱塩操作	宮崎 香 79
II-1 硫安分画	79
II-2 有機溶媒や酸によるタンパク質の沈殿濃縮	81
① アセトンによるタンパク質の沈殿 ② 三塩化酢酸（TCA）によるタンパク質の沈殿	
II-3 膜濃縮（限外濾過）	83
II-4 その他の濃縮法	85
II-5 透析	85
III 低圧クロマトグラフィーの基本操作	越川直彦 88
III-1 軟質担体の種類	88
III-2 必要な装置と器具	89
III-3 実験操作	91
① カラムへの担体の充填 ② クロマトグラフィーの操作 ③ バッチ法による分離	
④ 担体の洗浄・保存	
IV 中高圧液体クロマトグラフィーの基本操作（FPLC, HPLCなどの利用）	安光英太郎 94
IV-1 システムに必要な機械類	94
IV-2 実際の操作	96
① 展開溶媒の調製と脱気 ② コントローラーの設定 ③ システムのMilliQ Wによる洗浄	
④ カラムのシステムへの取り付け・洗浄と平衡化	
⑤ 溶出グラジェントのプログラム設定方法とそのプログラムの改良の仕方	
⑥ 予備的溶出（溶出用のグラジェントプログラムを用いたプレラン）⑦ サンプルの調製	

- ⑧ サンプルの注入と溶出 ⑨ ピークの分画と捕集 ⑩ カラムの洗浄と再平衡化
- ⑪ カラムを保存溶媒に置換 ⑫ カラムの取りはずし ⑬ システムのMilliQ Wによる洗浄
- ⑭ 後片づけ

V イオン交換クロマトグラフィー ━━━━━━ 吉川大和 111

V-1 イオン交換クロマトグラフィーの原理	111
V-2 実験条件	112
① 担体（ゲル）の選択 ② 緩衝液（バッファー） ③ 試料液 ④ 流速 ⑤ 溶出、カラムの保存	
V-3 陰イオン交換HPLCの実験例—ラミニン332の精製	115
V-4 軟質ゲルイオン交換クロマトグラフィー	117
V-5 その他	117

VI ゲルfiltrationクロマトグラフィー ━━━━━━ 吉川大和 118

VI-1 原理と特徴	118
VI-2 実験条件	119
① 担体（ゲル） ② 試料 ③ バッファー ④ その他	
VI-3 Sepharose 4Bを用いたゲルfiltrationクロマトグラフィー—ラミニン332の精製への応用	121
VI-4 Superdexカラムを用いたゲルfiltration HPLC	123
VI-5 ゲルfiltrationによる脱塩	124
① カラム ② 試料の添加と溶出	

VII アフィニティーコロマトグラフィー ━━━━━━ 越川直彦 125

VII-1 主な実験条件	126
① リガンドの選択 ② リガンド固定化担体の選択と固定化方法 ③ 吸着条件 ④ 溶出条件	
VII-2 トリプシンアフィニティーコロマトグラフィー	128
① トリプシン固定化カラムの作製 ② トリプシンアフィニティーコロマトグラフィーの操作法	
VII-3 その他のコロマトグラフィー	133
① ハイドロキシアパタイトコロマトグラフィー ② 疎水（ハイドロフォービック）コロマトグラフィー	

VIII 逆相コロマトグラフィー ━━━━━━ 中澤美起 134

VIII-1 主な実験条件	134
① カラムの選択 ② 溶媒 ③ 試料、温度、流速	
VIII-2 実験操作	135

第5章 遺伝子組換えタンパク質の発現と精製

I 大腸菌による融合タンパク質の発現と精製 ━━━━━━ 139

I-1 Hisタグタンパク質の発現と精製	安光英太郎 和久井世紀 139
① 実験の概略と予備実験 ② 大腸菌の破碎とタンパク質の抽出 ③ Hisタグタンパク質の溶解 ④ Hisタグタンパク質のアフィニティーカラムからの溶出 ⑤ ニッケルカラムの再生と保存 ⑥ タンパク質の精製を成功させるための重要ポイント	
I-2 GST融合タンパク質の発現と精製	安光英太郎 158
I-3 その他のタグ・融合タンパク質・蛍光タンパク質とタグ除去用のプロテアーゼ	安光英太郎 163
I-4 封入体からの活性再生法	三沢 悟 167
I-5 アルギニン法による組換えタンパク質の再生方法	竹内友香 東 昌市 176
原理・実験法の概略、目的	



II 動物細胞での遺伝子導入組換えタンパク質の発現	苅谷慶喜	181
II-1 発現系の設計と導入		181
II-2 レトロウイルスによる遺伝子導入例		187
II-3 その他		190
III 無細胞タンパク質合成系	清水義宏 上田卓也	191
III-1 無細胞タンパク質合成系の概要とその利点		191
III-2 PURESYSTEM® キットを用いたタンパク質の合成・精製		192
IV 高次構造解析のためのタンパク質の調製		198
IV-1 X線結晶構造解析のためのタンパク質調製法	山下栄樹	198
① 精製の純度 ② 緩衝液 ③ 安定性 ④ 検定法 ⑤ 必要な量 ⑥ 結晶化の方法		
IV-2 NMR 解析のためのタンパク質調製法	池上貴久	202
① 安定同位体導入のためのタンパク質の発現法 ② NMRサンプルの最終調製		
● 本書で調製する試薬類・バッファー・培地の一覧		209
● 索引		210

本書下巻「タンパク質をしらべよう（機能解析編）」掲載項目一覧

第1章 タンパク質の機能解析 概論

④ Blue Native PAGE
⑤ ゲル濾過

第2章 電気泳動によるタンパク質の分離同定

- I-2 表面プラズモン共鳴法
I-3 Two Hybrid法（原理と相互作用アッセイ法）
II 蛍光タンパク質を用いた解析
II-1 蛍光融合タンパク質を用いた細胞内局在・共局在の解析
II-2 FRETによるタンパク質間相互作用解析

- I SDSポリアクリルアミド電気泳動
II ウエスタンブロッティング
III 等電点電気泳動と二次元電気泳動
IV 質量分析によるタンパク質同定法
V SDS-PAGEにより分離されたタンパク質の回収法

第3章 抗体を用いたタンパク質の分離と分析

- I リン酸化
II ユビキチン化・タンパク質分解
III アセチル化・メチル化
IV 糖鎖修飾
V 質量分析によるタンパク質修飾の解析法
VI タンパク質酸化修飾の解析

- I 抗体に関する基礎知識と抗体の作製法
II 抗体カラムによるタンパク質の精製
III 免疫沈降法
IV 免疫染色法
V ELISAによる特定タンパク質の定量とタンパク質間相互作用の分析

第5章 タンパク質修飾の解析

付録

- ◎ 有用なインターネットサイトの紹介
◎ 主な試薬の分子量
◎ タンパク質分子量早見表

第4章 タンパク質相互作用の解析

※掲載内容は一部変更になることがあります

- I タンパク質間相互作用の検出
I-1 生化学的解析
 ① GST/MBP ブルダウン
 ② 共免疫沈降
 ③ ファーウエスタン