

# タンパク質実験ノート

## 上 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

<b>I バッファーの調製法</b>	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	
<b>II タンパク質の安定化</b>	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
<b>III タンパク質の定量法</b>	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

<b>I 細胞の破碎と分画</b>	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—（1）細胞分画法 ④ 細胞からの抽出—（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
<b>II タンパク質の可溶化法</b>	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

<b>I 精製の組み立て方</b>	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
<b>II 硫酸分画，濃縮，脱塩操作</b>	宮崎 香 79
II-1 硫酸分画	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
<b>III 低圧クロマトグラフィーの基本操作</b>	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	
<b>IV 中高压液体クロマトグラフィーの基本操作（FPLC，HPLCなどの利用）</b>	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 溶出グラジエ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（溶出用のグラジエ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の実験例ーラミニン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 ゲル濾過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を用いたゲル濾過クロマトグラフィーーラミニン332の精製への応用	121
VI-4	Superdexカラムを用いたゲル濾過HPLC	123
VI-5	ゲル濾過による脱塩	124
	① カラム ② 試料の添加と溶出	

## VII アフィニティークロマトグラフィー 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クロマトグラフィー	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クロマトグラフィーの操作法	
VII-3	その他のクロマトグラフィー	133
	① ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィー ② 疎水（ハイドロフォービック）クロマトグラフィー	

## VIII 逆相クロマトグラフィー 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クラムからの溶出 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	



<b>II 動物細胞での遺伝子導入組換えタンパク質の発現</b> .....	苺谷慶喜	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
<b>III 無細胞タンパク質合成系</b> .....	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
<b>IV 高次構造解析のためのタンパク質の調製</b> .....		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		
<b>● 本書で調製する試薬類・バッファー・培地の一覧</b> .....		209
<b>● 索引</b> .....		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

### 第2章 電気泳動によるタンパク質の分離同定

- 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** 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4章 タンパク質相互作用の解析

- 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 プルダウン
    - ② 共免疫沈降
    - ③ ファーウエスタン

④ Blue Native PAGE

⑤ ゲル濾過

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

### 第5章 タンパク質修飾の解析

**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

### 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

※掲載内容は一部変更になる場合がございます