

Product Information

ProteoPrep® Sample Extraction Kit

製品番号 PROT-TOT

保存温度 2～8 °C

TECHNICAL BULLETIN (使用説明書)

製品概要

Sigma の ProteoPrep® Sample Extraction Kit は、あらゆるタイプの細胞または組織からタンパク質を抽出できるようにデザインされています。本製品には、タンパク質抽出に広く用いられている 2 種類の試薬とより多くのタンパク質を抽出する溶解度の高い 2 種類の新しい試薬が含まれています。本キットには、ジスルフィド結合の還元剤とアルキル化剤も含まれています。細胞を付属の 4 種類の変性剤のいずれかに再懸濁し、超音波またはその他の適切な方法で破壊します。抽出物を清澄化し、その後タンパク質溶液を還元、アルキル化処理をします。最終的に塩濃度の低い可溶性の総タンパク質サンプルが得られ、二次元電気泳動の第一段階である等電点電気泳動 (IEF) で分離可能です。本キットは、4 種類全ての試薬を用いて、少なくとも 10 回の 2 mL サンプルを得ることができます。

キット構成

Protein Extraction Reagent Type 1
(CHAPS/尿素)、粉末入りボトル 1 本。最終液量を 25 mL に調製。製品番号 C 0481

Protein Extraction Reagent Type 2 (CHAPS/尿素/チオ尿素/SB3-10)、粉末入りボトル 1 本。最終液量を 25 mL に調製。製品番号 C0606

Protein Extraction Reagent Type 3
粉末入りボトル 1 本。溶解後に最終液量 25 mL。製品番号 C0731

Protein Extraction Reagent Type 4
粉末入りボトル 1 本。溶解後に最終液量 23 mL。製品番号 C0356

Tributylphosphine Stock Solution (トリブチルホスフィンストック溶液)
5 x 0.5 mL、フレイムシールアンプル。製品番号 T7567

Alkylating Reagent, Iodoacetamide (アルキル化試薬、ヨードアセトアミド)
5 x 56 mg、褐色ガラス製バイアル入り。製品番号 A3221

キットの他にご用意いただく試薬および器具

- 高純度水 (製品番号 W4502)
- 37 °C のウォーターバス
- マイクロピペット
- メスシリンダー
- ソニケーター (Branson デジタルソニケーター、model 450 または同等品など)
- 遠心機および遠心管

注意事項と免責事項

サンプルに高濃度の塩およびバッファーが含まれる場合は、このキットが使えない可能性があります。使用前に透析する必要があります。

本製品は試験研究用のみを目的として販売されています。医薬品、家庭用その他試験研究以外の用途には使用できません。危険性や安全な取り扱いに関しては化学物質安全データシート (MSDS) をご覧ください。

使用前の準備

下記の通り使用直前に試薬を新たに調製します。本キットに付属するほとんどの試薬は、繰り返し使用する場合は未使用の溶液を凍結できます。

Protein Extraction Reagent Type 1 - ボトルに 17 mL の高純度水を添加します。この溶液は冷たくなるので、固体を全て溶液にするには 20～25 °C に温める必要があります。37 °C のウォーターバスでの溶解に役立ちます。タンパク質を阻害するシアン酸塩が形成され始めるので、30 °C を超えないようにして下さい。未使用の溶液は 1～2 mL 量ずつ分注して、今後の使用のために -20 °C で凍結して下さい。

Protein Extraction Reagent Type 2 - ボトルに 15 mL の高純度水を添加します。この溶液は冷たくなるので、固体を全て溶液にするには 20～25 °C に温める必要があります。37 °C のウォーターバスが溶解に役立ちます。**タンパク質を阻害するシアン酸塩が形成され始めるので、30 °C を超えないようにして下さい。**未使用の溶液は 1～2 mL 量ずつ分注して、今後の使用のために -20 °C で凍結して下さい。

Protein Extraction Reagent Type 3 - ボトルに 15 mL の高純度水を添加します。この溶液は冷たくなるので、固体を全て溶液にするには 20～25 °C に温める必要があります。37 °C のウォーターバスでの溶解に役立ちます。**タンパク質を阻害するシアン酸塩が形成され始めるので、30 °C を超えないようにして下さい。**未使用の溶液は 1～2 mL 量ずつ分注して、今後の使用のために -20 °C で凍結して下さい。

Protein Extraction Reagent Type 4 - ボトルに 15 mL の高純度水を添加します。この溶液は冷たくなるので、固体を全て溶液にするには 20～25 °C に温める必要があります。37 °C のウォーターバスでの溶解に役立ちます。**タンパク質を阻害するシアン酸塩が形成され始めるので、30 °C を超えないようにして下さい。**未使用の溶液は 1～2 mL 量ずつ分注して、今後の使用のために -20 °C で凍結して下さい。

Tributylphosphine (TBP) Stock Solution - 本試薬はアルゴン充填のフレイムシールしたアンプルに保存されており、すぐに使用できます。一旦アンプルを開封したら、未使用の試薬は密閉したバイアルに入れ、-20 °C で保存の場合は 2 週間まで保存可能です。本ストック溶液はタンパク質サンプルで 1:40 に希釈する必要があります (2 mL のサンプルに 50 µL の TBP ストック溶液を添加)。

アルキル化試薬、ヨードアセトアミド - 1 バイアルの製品 A3221 に 0.6 mL の高純度水を加え、再懸濁します。全ての固体が溶解するまでよく混和します。0.5 M のストック溶液ができます。2 mL のサンプルにつき 60 µL のストック溶液を添加します。一旦溶解するとすぐに分解されるので残った溶液は捨てて下さい。

保存/安定性

付属の試薬は未開封で 6 カ月間は安定です。

手順

細胞として *E. coli* (大腸菌) を用いた場合の一般的な方法

1. 10 mg の凍結乾燥した *E. coli* (製品番号 EC-1、K12 株) を 2 mL の試薬 1、2、3 または 4 に懸濁して、超音波プローブを用いて氷上で超音波処理します (4 x 15 秒)。乾燥重量の 80～90 % の大腸菌タンパク質が抽出されます。超音波処理中の溶液の温度は 30 °C を超えないようにして下さい。また、尿素およびチオ尿素が沈殿するので、温度が 15 °C より下がらないようにして下さい。
2. 懸濁液を 15,000 x g、15 °C で 30 分間遠心します。
3. 上清を別の新しいチューブに移して、不溶性のペレットを捨てます。
4. 還元処理のため上清に最終濃度が 5 mM になるように TBP を添加して (50 µL の TBP ストック溶液)、室温で 1 時間インキュベートします。
5. アルキル化処理のため最終濃度が 15 mM になるようにヨードアセトアミドを添加して (60 µL の Alkylating Reagent, iodoacetamide)、室温で 1.5 時間インキュベートします。
6. 還元およびアルキル化処理したサンプルを 20,000 x g、室温で 5 分間遠心 (マイクロ遠心) して、不溶性物質をペレット化します。
7. IEF ゲルにローディングできます。このサンプルはさらに抽出試薬の希釈が必要になる場合があります。ゲルにローディングするタンパク質量がわかるようにタンパク質濃度を測定することをお勧めします。

他の種類のサンプルへの応用

他の種類のサンプルもこの手順が使えます。出発材料の量は抽出スケールを合わせるために調整できます。次の情報は参考程度に使って下さい。最後に希釈できるので、抽出試薬量あたりの材料を多くするほうが簡単です。細胞の破壊は細胞の種類によって異なります。酵母細胞にはビーズミルを用いたより激しい破壊条件が必要ですが、組織や哺乳動物細胞はホモジナイゼーションまたは単に混ぜることによって破壊できます。

試薬 2 mL あたりの最低使用量:

湿細胞ペースト (全生物種) = 50～100 mg

組織 = 250 mg

特定のサンプルのタンパク質プロファイルを保つためにはプロテアーゼインヒビターまたはプロテアーゼインヒビターカクテルが必要です。サンプルの高分子量の DNA による粘度を低下させるには、ヌクレアーゼの添加も必要です。非特異的ヌクレアーゼの添加が役立ちます²。

参考文献

1. Molloy, M.P., et al., Electrophoresis, **19**, 837-844 (1998).
2. Herbert, B.R., Electrophoresis, **19**, 845-851 (1998).

Proteome Systems™と共同開発された技術

RM/AC/MAM 07/04

Sigma ブランド製品は Sigma-Aldrich, Inc.を通じて販売されています。

Sigma-Aldrich, Inc.は同社製品がこの文書およびその他の Sigma-Aldrich 発行文書に含まれる情報に合致していることを保証します。お客様の個別の用途と製品の適合性についてはお客様にてご判断ください。掲載の品目、製品情報、価格などは予告なく変更される場合がございます。納品伝票または同梱の内容明細書の裏面をご覧ください。