

Product Information

CellLytic™ NuCLEAR™ Extraction Kit
(核タンパク質抽出キット)

製品番号 NXTRACT

TECHNICAL BULLETIN(使用説明書)

製品概要

核タンパク質およびそれらの相互作用に関する研究では多くの場合、最初に核抽出物を調製します。得られた抽出物は、そのまま電気泳動度シフトアッセイ(EMSA)やフットプリント法、転写アッセイ¹⁻⁴に使用できるほか、調節タンパク質を精製する際の出発原料として用いることができます。

核タンパク質の抽出手順では、まず細胞を低浸透圧バッファで膨潤させます。次いで細胞を破壊し、細胞質画分を除去してから、高塩濃度バッファを用いて核から核タンパク質を遊離させます¹⁻³。

このプロトコールは、機能を保った状態の核タンパク質粗抽出物を様々な細胞種から得ることを目的としています。CellLytic™ NuCLEAR™ Extraction Kit は HeLa、CHO、COS、PC-12、Jurkat、ウシ大動脈内皮細胞(BAEC)といった細胞でテストされました。核タンパク質は、少量の細胞($10^6 \sim 10^7$ 個、細胞ペレットとして 20~100 μ L)からも、多量の細胞($10^8 \sim 10^{10}$ 個、細胞ペレットとして約 1 mL)からも抽出できます。マウスの脳および肺、ラットの肝臓、ウサギの筋肉といった組織(新鮮または凍結組織)からも核タンパク質を抽出できます。抽出した核タンパク質は、ゲルシフトアッセイや DNase I フットプリント法などによる DNA-タンパク質相互作用検出に適しています。

キットに含まれている試薬

細胞ペレット 100 μ L からの抽出なら 100 回分、細胞ペレット 1 mL からの抽出なら 10 回分です。

- 10x Lysis Buffer, hypotonic, 7 mL
製品番号 L9161
100 mM HEPES (pH 7.9), 15 mM $MgCl_2$, 100 mM KCl
- 5x Lysis Buffer, isotonic, 14 mL
製品番号 L9036
50 mM Tris HCl (pH 7.5), 10 mM $MgCl_2$,
15 mM $CaCl_2$, 1.5 M ショ糖

- Extraction Buffer, 10 mL
製品番号 E2525
20 mM HEPES (pH 7.9), 1.5 mM $MgCl_2$, 0.42 M NaCl, 0.2 mM EDTA, 25% (v/v) グリセロール
- 3x Dilution and Equilibration Buffer, 90 mL
製品番号 D0187
60 mM HEPES (pH 7.9), 4.5 mM $MgCl_2$, 0.6 mM EDTA, 30 mM KCl, 75% (v/v) グリセロール
- Dithiothreitol (DTT), 0.4 mL
製品番号 D7059
1 M DTT (脱イオン水に溶解)
- Protease Inhibitor Cocktail, 1 mL
製品番号 P8340
4-(2-アミノエチル)ベンゼンスルホニルフルオリド(AEBSF), ペプスタチン A, ベスタチン, ロイペプチン, アプロチニン, trans-エポキシスクシニル-L-ロイシルアミド(4-グアニジノ)-ブタン(E-64)を含む
- IGEPAL® CA-630 10% Solution, 4 mL
製品番号 I5402
10% IGEPAL CA-630 (脱イオン水に溶解)

抽出に際してキット以外にご用意いただく試薬および器具
(製品番号を適宜付記しております)

- 遠心用チューブ
- 遠心分離機(Eppendorf® A-4-62 ローター付き製品または同等品)(オプション)
- マイクロ遠心分離機(Eppendorf 5417R 型または同等品)
- ガラス製組織ホモジナイザー
(外筒およびタイプ B の内筒を使用)(オプション)

- 顕微鏡
- シリンジ(1 mL) (製品番号 Z230723)
- Precision Glide Needles, SS, 27 ゲージ(製品番号 Z192376) (オプション)
- スライドグラス(製品番号 S8902)
- カバーグラス(製品番号 C9802)
- セルスクレーパー(製品番号 CLS3010)
- Dulbecco リン酸緩衝生理食塩水(DPBS) (製品番号 D8537)
- トリパンブルー溶液(製品番号 T8154)

脱塩操作に推奨される試薬および器具 (手順Dを参照)

- Sephadex[®] PD-10 カラム(脱塩カラム、2.5 mL 用) (製品番号 54805)
- 4-(2-アミノエチル)ベンゼンスルホニルフルオリド (AEBSF) (製品番号 A8456)

注意事項と免責事項

弊社の製品は試験研究用のみをも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。

保存安定性

本キットはドライアイスと共に配送します。保存温度は -20°C を推奨します。DTT 溶液およびプロテアーゼインヒビターカクテルは必ず -20°C で保存し、使用直前にバッファーに添加してください。すべてのバッファー溶液は $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ で数週間は保存できます。10% IGEPAL CA-630 溶液は $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ で長期間保存できます。

手順

各ステップはすべて $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ で実施します。バッファーおよび器具はあらかじめ冷却しておいてください。すべての溶液が解凍されており均一であることを確認してください。遠心分離はあらかじめ冷却しておいたローターにて、すべて 4°C で実施します。溶液中の DTT の最終濃度は 1 mM としてください。プロテアーゼインヒビターカクテルは最終溶液で 100 倍希釈としてください。

A. 100 μL の細胞ペレットからの界面活性剤(IGEPAL CA-630)を用いた核タンパク質抽出法 試薬量はペレット体積に応じて算出してください。

1. 1 M DTT 溶液を滅菌脱イオン水で希釈して 0.1 M とします。小スケール(サンプル量が 100 μL 未満)の抽出の場合、1 M DTT ストック溶液は 0.01 M に希釈します。

2. 10 $\times$ Lysis Buffer, hypotonic を滅菌脱イオン水で 10 倍希釈し、1 $\times$ Lysis Buffer, hypotonic とします。壊れやすい細胞の場合は 1 $\times$ Lysis Buffer, hypotonic の代わりに 5 $\times$ Lysis Buffer, isotonic を希釈して調製した 1 $\times$ Lysis Buffer, isotonic を使用します。500 μL の 1 $\times$ Lysis Buffer (hypotonic または isotonic) に、上記で調製した 0.1 M DTT 溶液 5 μL およびプロテアーゼインヒビターカクテル 5 μL を加えます。

3. 細胞を回収します。

a. 接着細胞の場合(70~90%コンフルエントの単層培養)

- 培地を除去して細胞だけにします。
- 細胞が剥がれないよう注意しながら DPBS で細胞を 2 回洗います。
- DPBS を捨てます。
- 新たに DPBS を加えて細胞を剥がし取り、適切なコニカル遠心チューブに回収します。
- $450 \times g$ で 5 分間遠心分離します。
- デカントして上清を捨てます。

b. 懸濁細胞の場合

- 適切なコニカル遠心チューブに細胞を回収します。
- $450 \times g$ で 5 分間遠心分離します。
- デカントして上清を捨てます。
- 細胞ペレットを DPBS に再懸濁してから $450 \times g$ で 5 分間遠心分離することを 2 回繰り返し、細胞を洗浄します。
- デカントして上清を捨てます。

4. 細胞ペレットの体積(PCV)を見積もります。

5. PCV 100 μL あたり、500 μL (PCV の 5 倍量) の 1 $\times$ Lysis Buffer (DTT およびプロテアーゼインヒビターカクテルを添加したもの) を加えます。細胞ペレットを静かに再懸濁します。気泡を作らないようにしてください。サンプル量が少ないときは、細胞懸濁液をマイクロ遠心チューブに移すことができます。

6. 適切な Lysis Buffer に懸濁した細胞を氷上で 15 分間静置し、細胞を膨潤させます。懸濁液を数 μL 分取して顕微鏡で観察します。顕微鏡下で広範な細胞溶解やゼラチン状の塊が見られた場合は、その細胞は「壊れやすい細胞」であると考えられます。この場合は細胞溶解に Lysis Buffer, isotonic を用います。また、氷上静置ステップの省略を検討してください。

7. Lysis Buffer 中で膨潤した細胞に対し、最終濃度が 0.6%となるように 10% IGEPAL CA-630 溶液を添加します(反応液 100 μ L あたり 6 μ L 添加)。10 秒間ボルテックスしてよく混合します。
8. その後ただちに 10,000~11,000 $\times g$ で 30 秒間遠心分離します。
 - 細胞溶解の程度を調べるため、遠心分離の前に細胞懸濁液から少量のサンプルをとり、顕微鏡で細胞核を観察します。細胞溶解の様子を観察するには、細胞懸濁液にトリパンブルー溶液を添加します。この色素は無傷の細胞は染色しませんが、溶解した細胞の核は染色します。顕微鏡下で核の溶解やゼラチン状の塊が見られた場合は、細胞溶解に使用する IGEPAL CA-630 の最終濃度を低くしてください。
 - 細胞が溶解されていない場合は、ステップ 7 で細胞懸濁液に加える IGEPAL CA-630 の最終濃度を高くしてください。
 - 壊れやすい細胞の場合は IGEPAL CA-630 の使用濃度を低くします。また、ボルテックスは行わず、遠心分離も低速で実施します。
9. 上清を別のチューブに移します。この上清が細胞質画分です。
10. 1 μ L の 0.1 M DTT 溶液および 1 μ L のプロテアーゼインヒビターカクテルを 98 μ L の Extraction Buffer に加えます。対象タンパク質を低塩濃度で抽出する必要がある場合は、Extraction Buffer を 1 $\times$ Dilution and Equilibration Buffer で希釈します。

注: Extraction Bufferの塩濃度は一般的な抽出条件である 0.42 Mです。しかし、まれなケースとして、ある種のタンパク質はこれよりも低い(または高い)塩濃度で抽出しなければならないことがあります。そのような場合は、Extraction Bufferを 1 $\times$ Dilution and Equilibration Bufferで希釈するか、またはExtraction BufferにNaClを添加して、希望する塩濃度に合わせてください。
11. 粗精製された核ペレットを約 70 μ L (2/3 $\times$ PCV) の Extraction Buffer (DTT およびプロテアーゼインヒビターカクテルを含む)に再懸濁します。
12. チューブをボルテックスミキサーにセットし、中~高速で 15~30 分間振盪混合します。気泡を作らないようにしてください。

13. 20,000~21,000 $\times g$ で 5 分間遠心分離します。
 14. あらかじめ冷却しておいた清浄なチューブに上清を移します。
 15. 上清はアリコートに分けて液体窒素で急速冷凍し、 -70°C で保存します。
- B. 200 μ Lの細胞ペレットからの界面活性剤を用いない核タンパク質抽出法
試薬量はペレット体積に応じて算出してください。

界面活性剤は、抽出したタンパク質の活性や結合能に影響を及ぼすことがあります。そのため、以下に界面活性剤を使用しない核タンパク質抽出手順を示します。このプロトコールは、シリンジまたはガラス製組組織ホモジナイザーを用いた粗製核抽出物の調製方法を示しています。

注: この手順では 100 μ L以上のPCVが必要です。サンプルが少量の場合(0.1~1 mL)はシリンジの使用を推奨します。ニードルのゲージが細いため、1 mLを超えるサンプルはシリンジを通過しにくくなることがあります。

1. 1 M DTT 溶液を滅菌脱イオン水で希釈して 0.1 M とします。
2. 1 $\times$ Lysis Buffer, hypotonic を調製します。壊れやすい細胞からタンパク質を抽出する場合は、1 $\times$ Lysis Buffer, isotonic を調製して 1 $\times$ Lysis Buffer, hypotonic の代わりに使用します。1,400 μ L の 1 $\times$ Lysis Buffer (hypotonic または isotonic)に、上記で調製した 0.1 M DTT 溶液 14 μ L およびプロテアーゼインヒビターカクテル 14 μ L を加えます。
3. 細胞を回収します。
 - a. 付着細胞の場合(70~90%コンフルエントの単層培養)
 - 培地を除去して細胞だけにします。
 - 細胞が剥がれないよう注意しながら DPBS で細胞を 2 回洗います。
 - DPBS を捨てます。
 - 新たに DPBS を加えて細胞を剥がし取り、適切なコニカル遠心チューブに回収します。
 - 450 $\times g$ で 5 分間遠心分離します。
 - デカントして上清を捨てます。
 - b. 懸濁細胞の場合
 - 適切なコニカルチューブに細胞を回収します。
 - 450 $\times g$ で 5 分間遠心分離します。
 - デカントして上清を捨てます。

- 細胞ペレットを DPBS に再懸濁してから $450 \times g$ で 5 分間遠心分離することを 2 回繰り返し、細胞を洗浄します。
 - デカントして上清を捨てます。
4. 細胞ペレットの体積 (PCV) を見積もります。
 5. PCV 200 μL あたり、1 mL (PCV の 5 倍量) の 1 $\times$ Lysis Buffer (DTT およびプロテアーゼインヒビターカクテルを添加したもの) を加えます。細胞ペレットを静かに再懸濁します。気泡を作らないようにしてください。サンプル量が少ないときは、細胞懸濁液をマイクロ遠心チューブに移すことができます。Lysis Buffer に懸濁した細胞を 15 分間静置し、細胞を膨潤させます。
 6. 細胞懸濁液を $420 \times g$ で 5 分間遠心分離します。デカントして上清を捨て、細胞ペレットを 400 μL (2 $\times$ PCV) の 1 $\times$ Lysis Buffer に再懸濁します。
 7. 細胞の破碎
 - a. ガラス製の組織ホモジナイザーを使用します。細胞をガラス製外筒に移し入れます。タイプ B の内筒を差し込み、氷上でゆっくりと 5 回上下に動かします。気泡を作らないようにしてください。または、
 - b. 細いゲージの皮下注射用ニードル (No. 27) をつけたシリンジを使用します。まずシリンジを 1 $\times$ Lysis Buffer で満たします。シリンジのプランジャーを動かし、バッファーをできるだけ押し出します。こうすることでシリンジ内のすべての空気を除き、細胞破碎操作中に懸濁液に気泡を生じないようにします。細胞懸濁液をゆっくりシリンジに吸い上げ、次いで一度にすばやく押し出します。これを 5 回繰り返します。

注: ホモジナイザーまたはシリンジでの破碎操作の必要回数は細胞株によって異なります。まず 5 回操作してから、顕微鏡で細胞破碎の状態を確認してみてください。80~90% が破碎されるようにします。破碎が十分でなかったら、ちょうどよく破碎されるまで数回操作を追加します。細胞溶解の様子を観察するには、細胞懸濁液にトリパンブルー溶液を添加します。この色素は無傷の細胞は染色しませんが、溶解した細胞の核は染色します。破壊された核や核凝集物、あるいはゼラチン状の塊が見える場合は、細胞の破碎条件が強すぎたか、破碎操作の回数が多すぎたということです。

8. 破碎した細胞の懸濁液を $10,000 \sim 11,000 \times g$ で 20 分間遠心分離します。

9. 上清を別のチューブに移します。この上清が細胞質画分です。
 10. 1.5 μL の 0.1 M DTT 溶液および 1.5 μL のプロテアーゼインヒビターカクテルを 147 μL の 1 $\times$ Extraction Buffer に加えます。対象タンパク質を低塩濃度で抽出する場合は、Extraction Buffer を 1 $\times$ Dilution and Equilibration Buffer で希釈します。
- 注: Extraction Buffer の塩濃度は一般的な抽出条件である 0.42 M です。しかし、まれなケースとして、ある種のタンパク質はこれよりも低い (または高い) 塩濃度で抽出しなければならないことがあります。そのような場合は、Extraction Buffer を 1 $\times$ Dilution and Equilibration Buffer で希釈するか、または Extraction Buffer に NaCl を添加して、希望する塩濃度に合わせてください。
11. 粗精製された核ペレットを約 140 μL (2/3 $\times$ PCV) の Extraction Buffer (DTT およびプロテアーゼインヒビターカクテルを含む) に再懸濁します。組織ホモジナイザーで細胞を破碎した場合は、この時点でさらに 10 回破碎操作を加えることを推奨します。
 12. 30 分間穏やかに振盪します。
 13. $20,000 \sim 21,000 \times g$ で 5 分間遠心分離します。
 14. あらかじめ冷却しておいた清浄なチューブに上清を移します。
 15. 上清はアリコートに分けて液体窒素で急速冷凍し、 -70°C で保存します。

C. 100 mg の組織からの核タンパク質抽出法
試薬量は組織重量に応じて算出してください。

1. 1 M DTT 溶液を滅菌脱イオン水で希釈して 0.1 M とします。
2. 1 $\times$ Lysis Buffer を調製します。
 - Sigma でテストしたところ、組織からの抽出では isotonic バッファーよりも hypotonic バッファーの方がよい結果が得られています。そのため、1 $\times$ Lysis Buffer hypotonic を調製することを推奨します。組織が非常に壊れやすい場合は 1 $\times$ Lysis Buffer, isotonic を使用することもできます。
 - 10 μL の 0.1 M DTT 溶液および 10 μL のプロテアーゼインヒビターカクテルを 1,000 μL の 1 $\times$ Lysis Buffer に加えます。

3. 組織を DPBS バッファーで 2 回洗浄します。DPBS を捨てます。
4. 組織を 1,000 μ L (5 $\times$ PCV) の 1 $\times$ Lysis Buffer (DTT およびプロテアーゼインヒビターカクテルを含むもの) に静かに再懸濁します。
5. 顕微鏡下で細胞の 90% が破碎されて核が見えるようになるまで組織をホモジナイズします。
6. 破碎した細胞の懸濁液を 10,000 $\sim$ 11,000 $\times g$ で 20 分間遠心分離します。
7. 上清を別のチューブに移します。この上清が細胞質画分です。
8. 1.5 μ L の 0.1 M DTT 溶液および 1.5 μ L のプロテアーゼインヒビターカクテルを 147 μ L の Extraction Buffer に加えます。
注: 低塩濃度で核タンパク質を抽出したい場合は、Extraction Buffer を 1 $\times$ Dilution and Equilibration Buffer で希釈します。
9. 粗精製された核ペレットを約 140 μ L (2/3 $\times$ PCV) の Extraction Buffer (DTT およびプロテアーゼインヒビターカクテルを含む) に再懸濁します。この時点で短時間のホモジナイズ処理を加えると核タンパク質が抽出されやすくなります。
10. 30 分間穏やかに振盪します。
11. 20,000 $\sim$ 21,000 $\times g$ で 5 分間遠心分離します。
12. あらかじめ冷却しておいた清浄なチューブに上清を移します。
13. 上清はアリコートに分けて液体窒素で急速冷凍し、 -70°C で保存します。

D. 脱塩処理

このプロトコールに従って抽出した核タンパク質は高塩濃度の Extraction Buffer に溶解しています。一般に、タンパク質抽出物は濃縮されているため、低塩濃度のバッファー (1 $\times$ Dilution and Equilibration Buffer) で希釈できます。高塩濃度バッファーに溶解している高濃度のタンパク質抽出物は少量でも EMSA やフットプリント法などのアッセイに十分足りるので、塩はこれらの反応液中で自然に希釈されます。塩がその後の実験に影響する場合は、脱塩用ゲル濾過カラム (「脱塩操作に推奨される試薬および器具」の項を参照) を用いて短時間で塩を除去することができます。脱塩カラムは DTT を添加した 1 $\times$ Dilution and Equilibration Buffer で平衡化する必要があります。溶出させたタンパク質画分にはプロテアーゼインヒビターカクテルを添加してください。

他に、1 $\times$ Dilution and Equilibration Buffer (最終濃度 1 mM の DTT、およびプロテアーゼインヒビターカクテル (または 0.5 mM AEBSF) を含むもの) のような透析バッファーを用いて核抽出物を透析しても塩を除去できます。

参考文献

1. Dyer, R.B., and Herzog, N.K., *Biotechniques*, **19**, 192 (1995).
2. Lee, K.A.W. *et al.*, *Gene. Anal. Techn.*, **5**, 22 (1988).
3. Dignam, J.D. *et al.*, *Nucleic Acids Research*, **11**, 1475 (1983).
4. Guidez, F. *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, **18**, 3851 (1998).

Sephadex は Amersham Biosciences Ltd. の登録商標です。

Eppendorf は Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH の登録商標です。

IGEPAL は Rhone-Poulenc AG Co. の登録商標です。

NDH,EB,CMH,MAM 08/05-1

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。