

Product Information

ProteoPrep® Universal Extraction Kit

製品番号 PROT-TWO

保存温度 2~8 °C

TECHNICAL BULLETIN (使用説明書)

製品概要

Sigma の ProteoPrep® Universal Extraction Kit は、多くのタイプの細胞から可溶性細胞質および膜タンパク質を分離できるようにデザインされています。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。細胞を低電導率のバッファーに再懸濁し、超音波またはその他の適切な方法で破壊します。膜および膜タンパク質を遠心分離後、バッファーで1回洗浄します。可溶性タンパク質画分を乾燥後、変性バッファーに再懸濁します。不溶性物質は別の変性バッファー溶液に再懸濁して可溶化します。その後、両方のタンパク質溶液を還元およびアルキル化処理します。得られた2つの可溶性タンパク質サンプルの塩濃度は低く、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、10 回分の 2 mL サンプルです。

構成

Soluble Cytoplasmic Extraction Reagent、粉末入りボトル 2 本。それぞれ 125 mL の 5 mM Trizma® で調製。製品番号 S2688

Soluble Protein Resuspension Reagent、粉末入りボトル 1 本。溶解後に、7.0 M 尿素、2.0 M チオ尿素、1% C7BzO 界面活性剤含有の溶液 (pH 10.4) で最終液量 23 mL。製品番号 S3688

Protein Extraction Reagent Type 4、粉末入りボトル 1 本。溶解後に、7.0 M 尿素、2.0 M チオ尿素、1% C7BzO 界面活性剤、40 mM Trizma 含有の溶液 (pH 10.4) で最終液量 23 mL。製品番号 C0356

Tributylphosphine Stock Solution、5 x 0.5 mL、フレームシールされたアンプル入り。N-メチル-2-ピロリドンに溶解した 200 mM トリブチルホスフィンを含有。製品番号 T7567

Alkylating Reagent, Iodoacetamide、5 x 56 mg、褐色ガラスバイアル入り。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 W 4502)
- 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
- 凍結乾燥機または SpeedVac®
- 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

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用時調製します。下記のように、いくつかの未使用のキットコンポーネントは、複数回使用するために凍結できるものがあります。

Soluble Cytoplasmic Extraction Reagent - ボトルに 125 mL の高純度水を添加します。溶解するまで混和します。未使用の溶液は 2~8 °C で 3 日間は保存可能です。長期保存の場合は、分注して -20 °C で 6 カ月間凍結保存できます。

Soluble Protein Resuspension Reagent - 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、完全に溶解するには 20~25 °C に温める必要があります。材料の溶解には 30 °C のウォーターバスが有効です。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。残りを 1~2 mL ずつ分注して、-20 °C で 6 カ月間凍結保存します。

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、完全に溶解するには 20~25 °C に温める必要があります。材料の溶解には 30 °C のウォーターバスが有用です。**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、室温以上で保存しないで下さい。** 残りを 1~2 mL ずつ分注して、-20 °C で 6 カ月間凍結保存します。

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、そのまま使用できます (ready-to-use)。このストック溶液を 1:40 倍に希釈します (25 µL の TBP stock solution を 1 mL のサンプルに添加)。

一旦アンプルを開封したら、未使用の試薬は密封可能なバイアルに入れて、不活性ガスを充填して -20 °C で 2 週間保存できます。

Alkylating Reagent, Iodoacetamide (IAA) - 1 バイアル (製品番号 A3221) を 0.6 mL の高純度水で溶解します。0.5 M のストック溶液になります。このストック溶液をサンプル 1 mL につき 30 µL 添加すると、15 mM IAA 溶液になります。長期保存の場合は、-20 °C で 2 週間まで保存できます。

保存/安定性

付属の試薬は未開封で 1 年間は安定です。

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

- 凍結乾燥した 20 mg の *E. coli* (製品番号 EC-1, K12 株) を 10 mL の Soluble Cytoplasmic Extraction Reagent (S2688) に懸濁します。
- この懸濁液を超音波プローブを用いて氷上で 1~2 分間超音波処理して、細胞および DNA を破壊します。
- 懸濁液を約 14,000 x g、4 °C で 45 分間遠心して、菌体破片および不溶性タンパク質をペレット化します。
- 上清を別の容器に移して、氷上に置いておきます。
- ペレットに 10 mL の Soluble Cytoplasmic Extraction Reagent を加え、上記の超音波処理と遠心を繰り返します。上清とペレットになります。ステップ 4 からの上清と一緒にプールすると、約 20 mL の総可溶性タンパク質抽出物 (SUP1) になります。
- SUP1 をオーバーナイトで凍結乾燥するか、濃縮乾燥装置 (SpeedVac など) で乾燥します。
- 凍結乾燥または乾燥した可溶性タンパク質を 2.0 mL の Soluble Protein Resuspension Reagent (S3688) に再懸濁します。ステップ 11 まで氷上で保存します。
- ステップ 5 の細胞ペレットを 2 mL の Protein Extraction Reagent Type 4 (C 0356) に再懸濁して、

超音波処理をしてこの画分 (SUP2) のタンパク質を可溶化します。

- ステップ 8 の懸濁液を約 14,000 x g、15 °C で 45 分間遠心して、菌体破片をペレット化します。
- 上清 (SUP2) を遠心チューブから新しいチューブに移して、残りのペレットを捨てます。
- SUP1 と SUP2 に別々に TBP を最終濃度が 5 mM (1 mL につき 25 µL の TBP stock solution を添加) になるように添加して、室温で 1 時間インキュベートし還元処理します。**TBP に反応するので、この時点でアルキル化試薬を添加しないで下さい。**
- SUP1 と SUP2 に別々にヨードアセトアミドを最終濃度が 15 mM になるように添加して (1 mL につき 30 µL の Alkylating Reagent, Iodoacetamide を添加)、室温で 1.5 時間インキュベートしアルキル化処理します。
- 最終濃度が 5 mM になるように TBP を添加して、さらに 15 分間インキュベートし残存するヨードアセトアミドの反応を停止します。
- インキュベーション後、還元およびアルキル化処理した 2 つのサンプルを約 20,000 x g、室温で 5 分間遠心して (マイクロ遠心)、不溶性物質をペレット化します。
- ここで SUP1 と SUP2 は IEF ゲルにローディングできます。二次元電気泳動で望ましい結果を得るためには、両サンプルを Protein Extraction Reagent Type 4 (C0356) でさらに希釈する必要がある場合があります。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もお勧めします。ブラッドフォード (製品番号 B6916) 測定法を ProteoPrep キットと一緒に使うことをお勧めします。BCA または Lowry 法よりも正確であることが知られています。

他の種類のサンプルへの応用

E. coli (大腸菌) 以外のサンプルはこの手順で調製できます。湿細胞ペーストまたは組織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用して下さい。

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ィー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。変性剤含有の2つの試薬 (Soluble Protein Resuspension Reagent および Protein Extraction Reagent Type 4) は、多くの酵素を変性させるので、これらの使用前に酵素を加えて下さい。

結果

本キットを用いて、二次元電気泳動の固定化 pH 勾配 (IPG) ストリップにすぐアプライできる2つのタンパク質サンプルが調製されます。これらの2つの画分は、可溶性タンパク質 (SUP1) および膜タンパク質 (SUP2) が濃縮されています。本キットによる膜画分は ProteoPrep Membrane Isolation Kit (製品番号 PROT-MEM) による画分とは異なります。ProteoPrep Universal Extraction Kit による膜画分には、膜画分の膜関連タンパク質および数種類の豊富な細胞質タンパク質が含まれます。膜および可溶性細胞質タンパク質画分の両方に疎水性タンパク質が認められる場合があります。一方、ProteoPrep Membrane Extraction Kit では内在性膜タンパク質のみを含む膜タンパク質画分が得られます。Membrane Extraction Kit では炭酸ナトリウムによる抽出を利用しており、ほぼ全ての膜関連タンパク質が除去されるので、従来の膜タンパク質画分が得られます。酵母、昆虫または哺乳類細胞および組織などの *E. coli* (大腸菌) よりも複雑なサンプルの場合、核およびオルガネラタンパク質は可溶性画分および膜画分に分かれます。

pH 5-8	18 cm	I4281
	7 cm	I3156
	11 cm	I3781
	18 cm	I4406
pH 6-11	7 cm	I7406
	11 cm	I7531
	18 cm	I7656
pH 8-12	7 cm	I3281
	11 cm	I3906
	18 cm	I4531
IPG Equilibration Buffer		I7281
EZBlue™ Gel Staining Reagent		G1041
ProteoSilver Plus Staining Kit		PROT-SIL2
Bradford Reagent (1~1,400 µg/ml のタンパク質にお勧めします)		B6916
ProteoMass™ MALDI-MS Calibration Kits		
	タンパク質およびペプチド	MS-CAL1
	ペプチド	MS-CAL2
	タンパク質	MS-CAL3
汎用プロテアーゼインヒビターカクテル		P2714
植物および組織抽出用プロテアーゼインヒビターカクテル		P5955
真菌および酵母抽出用プロテアーゼインヒビターカクテル		P8215
哺乳類細胞および組織抽出用プロテアーゼインヒビターカクテル		P8340

関連製品	製品番号
ProteoPrep® Kit	
Total Extraction Sample	PROT-TOT
Membrane Protein Extraction	PROT-MEM
Universal Extraction	PROT-TWO
Protein Extraction Reagent Type 4	C0356
Protein Extraction Reagent Type 1	C0481
Protein Extraction Reagent Type 2	C0606
Protein Extraction Reagent Type 3	C0731
ProteoGel™ IPG Strips	
pH 3-10	
7 cm	I2531
11 cm	I3406
18 cm	I4031

pH 4-7	
7 cm	I2906
11 cm	I3531
18 cm	I4156
pH 3-5	
7 cm	I3031
11 cm	I3656

参考文献

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

SpeedVac は Savant の登録商標です。
Proteome Systems™と共同開発された技術

RM/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。