

- ⑩ 洗浄後、上清を除去した担体に 100～200 μ L (ゲル体積の5～10倍量) の溶出バッファーを添加する ※7
- ⑪ 30分間穏やかに震盪する ※8
- ⑫ 7,300～9,400 rpm (5,000～8,200G) ※5 で30秒間遠心、上清を回収する (溶出画分)
- ⑬ ⑩～⑫のステップを3回以上繰り返す ※9
- 0.1 M Glycine-HCl, pH 3.5 を用いた溶出方法
- ⑩ 100～200 μ L (ゲル体積の5～10倍量) の0.1 M Glycine-HCl, pH 3.5 溶出バッファーを担体に添加する
- ⑪ 5分間穏やかに震盪する ※10
- ⑫ 7,300～9,400 rpm (5,000～8,200G) で30秒間遠心して上清を回収し、あらかじめ10～20 μ L の0.5 M Tris-HCl, pH 7.4, 1.5 M NaClが入ったチューブに移す ※11
- ※7 3×FLAGペプチド溶出バッファーは必要量だけ準備する。
- ※8 ゲルが溶液中で均一にならない場合は、何度かタッピングする。
- ※9 各溶出画分は別々に回収し、SDS-PAGEなどでチェックする。
- ※10 **重要** 長時間酸性条件下におくとタンパク質の変性を招くので、担体をバッファーに20分以上さらさないように注意する。
- ※11 この処理によりpHが中性付近に中和される。

FLAG タグ精製

トラブルシューティング



FLAG タグタンパク質が担体に結合しない

- 原因**
- ① FLAG タグタンパク質の発現量が低い
 - ② 結合バッファーのpHが適当でない
 - ③ 担体のFLAG M2抗体が変性している

原因の究明と対処法

- ① FLAG タグタンパク質の量が少ないと、抗体との結合効率が低下する。結合ステップでの細胞抽出液の量を増やす。あるいは抗原抗体反応は時間にも依存するので、8～12時間をかけて担体と結合させる。
- ② 中性付近 (pH 7～8) でFLAG タグと抗体は結合する。結合バッファーのpHが中性付近であることを確認する。
- ③ バッファーに含まれる成分によっては、FLAG M2抗体が変性している可能性がある。グアニジン塩酸塩や尿素などのカオトロピック試薬は使用できない (ただし、尿素は1 M以下であれば使用可能)。DTTなどの還元剤も、抗体のジスルフィド結合を切断して抗体が壊れるため使用できない。SDSは抗体を変性させ、デオキシコール酸はFLAG M2抗体とFLAG タグタンパク質の結合を阻害するため、これら界面活性剤も使用できない。



FLAG タグタンパク質が担体から溶出されない

- 原因**
- ① FLAG タグタンパク質と担体との親和性が高い
 - ② 静電的相互作用によるFLAG タグタンパク質の担体への非特異的吸着
 - ③ 疎水性相互作用によるFLAG タグタンパク質の担体への非特異的吸着

原因の究明と対処法

- ① 溶出バッファーの3 xFLAGペプチドの濃度を上げる。
- ② 溶出バッファーのNaCl濃度を上げることで改善される可能性がある。ただし、1 Mまで上げてしまうと、抗原抗体反応自体が弱まり、担体への吸着量が低下してしまうので注意する。
- ③ 溶出バッファーに適度な界面活性剤を添加することで改善される可能性がある。例えばTriton X-100なら5%まで使用可能である。

4

非特異的なタンパク質の溶出がみられる

原因

- ① 静電的相互作用による細胞由来タンパク質の担体への非特異的吸着
- ② 疎水性相互作用による細胞由来タンパク質の担体への非特異的吸着
- ③ 酸性pHによる非特異的タンパク質の溶出

原因の究明と対処法

- ① 溶出バッファーのNaCl濃度を上げることで改善される可能性がある。ただし、1 Mまで上げてしまうと、抗原抗体反応自体が弱まり、担体への吸着量が低下する。
- ② Triton X-100やTween 20などの非イオン性界面活性剤の濃度（5%程度まで）を上げることで改善される可能性がある。ただし濃度を上げすぎると、抗体が変性する可能性がある。
- ③ Glycine-HCl, pH 3.5で溶出を行う場合、非特異的に担体に結合したタンパク質も溶出されやすい。場合によっては、ペプチドを用いた溶出方法を選択する。

2 クロマトグラフィーによる精製

ここでは、タグを付加せずにタンパク質を精製する場合を想定したプロトコールの実際について記す。タグをもたないタンパク質を精製する場合、重要なのは目的タンパク質の性質(pI, 疎水性度, 分子量, 特異的リガンドとの結合の有無, 細胞内局在など)を理解することで、それに合わせた抽出液の調製法やカラムクロマトグラフィーを選択する必要がある。

1 抽出液の調製

タグをもたないタンパク質を精製する場合、可能な限り夾雑タンパク質を除いた抽出液を調製する必要がある。その最も簡便な方法として、目的タンパク質の細胞内局在にあわせた細胞内小器官ごとの分画法が挙げられる。ここでは、哺乳動物細胞を用いた場合を想定し、おおまかに核、細胞質、および細胞膜の単離法について記す。

準備するもの

- ダウンスホモジナイザー
- PBS (ー)
- 低張バッファー ※1
 - 10 mM HEPES (pH 7.9)
 - 10 mM KCl
 - 1.5 mM MgCl₂
 - 0.5 mM DTT

※1 緩衝液はHEPESあるいはTrisを用いる。その後の実験の使用目的に合わせて選択すればよい。高張バッファーのNaCl濃度は、抽出されるタンパク質の性質に依存して変更可能である。

- 高張バッファー ※1
 - 20 mM HEPES (pH 7.9)
 - 420 mM NaCl
 - 1.5 mM MgCl₂
 - 0.2 mM EDTA
 - 0.5 mM DTT
 - 0.5 mM PMSF
 - 25 % Glycerol
- 透析バッファー ※1
 - 20 mM HEPES (pH 7.9)
 - 100 mM KCl
 - 12.5 mM MgCl₂
 - 0.2 mM EDTA
 - 0.5 mM DTT
 - 0.5 mM PMSF
 - 20 % Glycerol
- スクロース

核および細胞質画分の単離 (Dignam 法)

細胞を低張液にさらすと浸透圧によって、細胞膜は膨らむ。膨らんだ細胞をホモジナイザーで破碎することによって、細胞膜が除かれた単離核を調製することができる。ホモジナイザーはガラス製の外筒と内筒（ペッセル）の間隔（クリアランス）で細胞を押し潰す方法である。ここでは、試験管内転写反応を再構成するために報告された調製法を原典として一部改変したものを紹介する³⁾。なお、3章-2では昆虫細胞を用いた場合の方法を紹介しているので、参照いただきたい。

プロトコール

- ① 2,000 rpm (800G) ※1, 4℃で10分間遠心して細胞を回収する
 - ② PBS (-) で細胞を洗う
 - ③ 沈殿した細胞の容量 (packed cell volume : pcv) を測る ※2
- ※1 回転数はJLA10.500ローター（ベックマン・コールター社）の場合。
- ※2 ②でPBS (-) を加えた際に、増えた分を細胞の容量としてよい。

1) ステップ②で
PBSをA mL
加えたとき



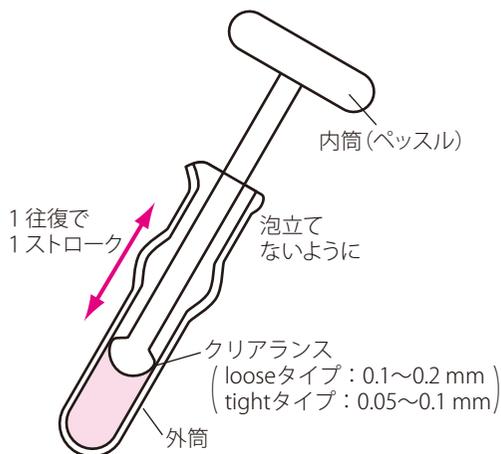
2) 全量がB mLになったら
 $1 \text{ pcv} = (B - A) \text{ mL}$

- ④ pcvの5倍量 (5pcv) の低張バッファーを加え、穏

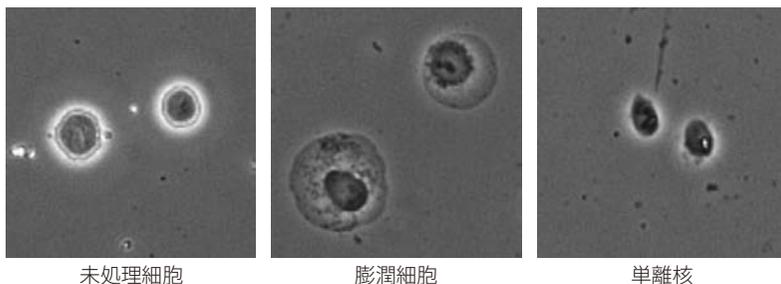
やかに細胞を懸濁する

- ⑤氷上で10分間静置 ※3
- ⑥2,000 rpm (800G), 4°Cで10分間遠心
- ⑦上清を除き, 2pcvの低張バッファーに再び懸濁
- ⑧ダウンスホモジナイザーに移し, looseタイプのペッスルで15~20ストロークして細胞膜を壊す

※3 この操作によって十分に細胞を膨張させる。またこのときには膨張の効率を上げるため5pcvのバッファーを加えているが、そのままホモジナイズしたのでは細胞質画分のタンパク質濃度が薄くなってしまう。そのため、一度遠心してバッファーを除いたのち再度2pcvの低張バッファーを加えてホモジナイズする。



⑨実体顕微鏡で単離核を確認



- ⑩2,000 rpm (800G), 4°Cで10分間遠心
- ⑪上清 ※4 と沈殿に分け, 沈殿を12,300 rpm (13,500G) ※5, 4°Cで20分間遠心して, 残渣を除く
- ⑫沈殿と等量の高張バッファーを加える ※6
- ⑬ダウンスホモジナイザーで~10ストロークして細胞を懸濁する

※4 **重要** この上清は細胞質画分であり, リボソームやミトコンドリアなどが含まれる。-80°C保存。

※5 回転数はF0630ローター(ベックマン・コールター社)の場合。

※6 **重要** 10^{10} 細胞からだと7~10 mLくらい。多すぎると最終濃度が薄くなる。

ONE POINT



その他の分画法

Dignam法のような物理的な細胞質と核の単離法以外に, 界面活性剤を用いた分画法もある。例えば, ジギトニンはコレステロールを可溶化するため, コレステロール含

量の高い細胞膜を選択的に透過処理できる。また, ストレプトリシンOのような細胞膜に孔を形成するものも用いられる。