

組織・細胞からのタンパク質抽出方法

2023年4月30日

1. 概要

「Protein」の語源はギリシャ語の「Proteios（一番重要なもの）」に由来するそうです。たしかにタンパク質は生体の構造や機能を担うのに不可欠な存在だといえます。タンパク質の機能を調べるためには、まず生体サンプルからタンパク質を抽出して可溶化することが重要です。今回は、アトーの製品を使用したタンパク質抽出方法についてご紹介します。

一般的な注意点として

タンパク質を抽出する際の一般的な注意点としては、①サンプルの選択（新鮮で目的の事象がとらえやすいサンプルを選択）、②温度（一般的には0~4℃）、③pH、イオン強度（一般的にはpH 4~7、イオン強度は0.1 M）、④チオール基（酸化を保護するためのDTT等の還元剤の添加）、⑤安定化剤の添加（糖やグリセリン等の添加）、⑥プロテアーゼインヒビターの添加、⑦金属イオンのキレートなどがあげられます。

2. 大腸菌からのタンパク質抽出方法

大腸菌などの微生物には細胞壁があるため、哺乳類の細胞に比べて破壊するのが困難です。一般的には超音波破碎、凍結融解による破碎、リソソームなどの酵素による溶解などによりタンパク質を抽出します。しかし、超音波や凍結融解による物理的破碎は、操作が煩雑な上に、しばしばタンパク質が壊れる原因になります。アトーの EzBactYeast Crusher は菌体に混ぜるだけでタンパク質を安定に抽出可能です。

2-1. 実験方法

実験材料： 大腸菌および培養液（10mL）
 EzBactYeast Crusher（WSE-7423）
 蒸留水
 マイクロ遠心チューブ、ピペットチップ等
 遠心機、マイクロピペット等

大腸菌培養



大腸菌を適当な培地で O.D.600=0.5~1.0 になるまで培養します（菌体量としては 50~100 mg 相当です）。

※大腸菌発現タンパク質を抽出する場合は、発現用大腸菌および発現タンパク質に適切な条件下で培養することを推奨します。

集菌・洗浄



大腸菌を 2,000xg で 5 分間遠心して集菌します。遠心沈査に 5~10mL の蒸留水を加えて懸濁し、再度、2,000xg で 5 分間遠心して集菌します。

※洗浄後の遠心沈査（菌体）は -80℃ で凍結保存可能です。一般的に、一度、凍結した方が抽出効率は上がります。

菌体の溶解



遠心上清を捨て、菌体をボルテックスして細胞塊をよくほぐします（重要）。0.5mL の EzBactYeast Lysis buffer を添加し、室温で 10 分間静置します。

※ EzBactYeast Lysis buffer にはあらかじめ EzBactYeast Crusher キット添付の Protease Inhibitor と DNase I を添加しておきます。

タンパク質抽出

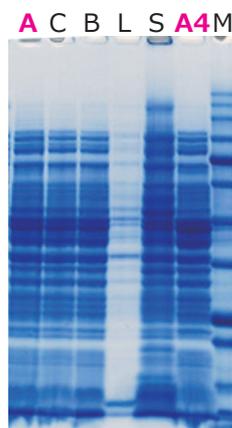


細胞溶解液を 10,000xg（4℃）で 5 分間遠心し、遠心上清を回収します。

※不溶性タンパク質は遠心沈査に回収されます。不溶性タンパク質を抽出する際は、遠心沈査に 8M 尿素含有緩衝液や 6M グアニジン塩酸含有緩衝液などを添加して溶解し、タンパク質を抽出してください。

2-2. 参考データ

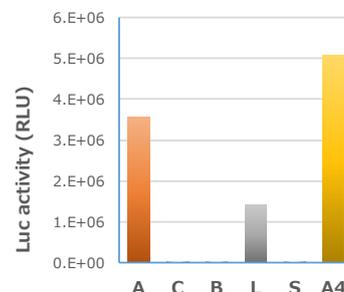
実験例 1：抽出効率



抽出に使用した試薬

A: EzBactYeast Crusher（室温）
 C: 他社市販試薬
 B: 他社市販試薬
 L: Lysozyme
 S: SDSサンプルバッファ
 A4: EzBactYeast Crusher（4℃）
 M: EzProtein Ladder

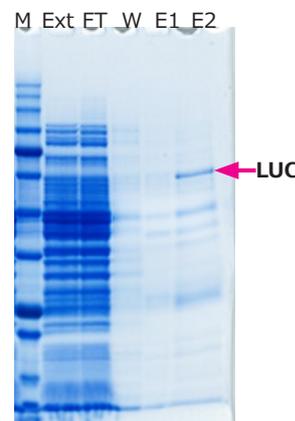
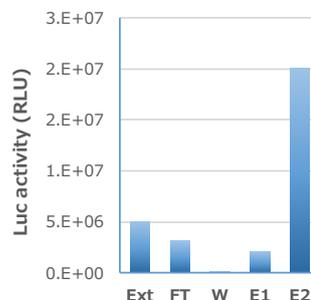
抽出タンパク質の酵素活性



図はルシフェラーゼ発現大腸菌から図表に記載された試薬を使用してタンパク質を抽出し、電気泳動した結果（左）と酵素活性を測定した結果（右）を示しています。アトーの EzBactYeast Crusher は室温でも低温（4℃）でも同様に、他社市販試薬と同等以上の抽出効率でタンパク質を回収できます。また上記グラフに示されたように、室温で抽出した場合でも、酵素活性を高く保持した状態でタンパク質が抽出可能なことが分かります。

実験例 2：発現タンパク質の精製

精製過程の酵素活性



M: EzProtein Ladder
 Ext: Whole Extract
 FT: Flow through
 W: Wash
 E1: Extraction 1
 E2: Extraction 2 (Purified protein)

図は His tag - ルシフェラーゼ発現大腸菌から EzBactYeast Crusher を使用して抽出したタンパク質を Ni-Sepharose カラムで精製した結果を示しています。EzBactYeast Crusher は、カラムへの結合、各精製ステップの反応を阻害することなく、また酵素活性も保持した状態でタンパク質を精製できます。このように EzBactYeast Crusher は、大腸菌系発現タンパク質の抽出・精製にも適していることが示されました。

一般的な大腸菌タンパク質の抽出方法

- 大腸菌を破碎用溶液（50 mM Tris/pH8.0, 500 mM NaCl, 15% glycerol, 10 mM imidazole）で 3 回洗浄する。
- 細胞塊を 3 倍容量の Sonication buffer に懸濁し、終濃度が 1 mg/mL Lysozyme, 1 mM DTT, 0.5 mM EDTA になるように添加する。
- 大腸菌が破碎されるまで、冷却しながら、超音波破碎を行う（顕鏡確認）。
- 終濃度が 0.1 mg/mL DNase I になるように添加する。
- 遠心（10,000g ~ 25,000g × 10 ~ 30 分）して、上清を回収する。

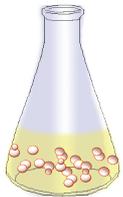
3. 酵母からのタンパク質抽出方法

酵母には多糖類を主成分とした硬質の細胞壁があるため、大腸菌よりも破壊するのが困難です。一般的にはガラスビーズなどの研磨剤を加えたホモジェナイズ、フレンチプレスなどの加圧減圧処理による破碎、超音波破碎、ザイモリエースなどの酵素によりプロトプラスト化してからの溶解などが主流です。しかし、物理的破壊は抽出効率は高いものの、操作が煩雑で物理的ダメージが大きく、またプロトプラスト化も条件の至適化が難しいといわれています。アトーの **EzBactYeast Crusher** はプロテアーゼインヒビターと DNase I が付属されており、ガラスビーズ法に匹敵した抽出効率で、菌体に混ざるだけでタンパク質を安定に抽出可能です（分裂酵母は抽出効率が下がります）。

3-1. 実験方法

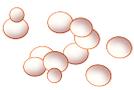
実験材料： 菌体および培養液 (10mL)
EzBactYeast Crusher (WSE-7423)
 蒸留水
 マイクロ遠心チューブ、ピペットチップ等
 遠心機、マイクロピペット等

酵母培養



酵母を適当な培地で O.D.600=0.5~1.0 になるまで培養します（菌体量としては 50~100 mg 相当です）。
 ※発現タンパク質を抽出する場合は、発現用酵母および発現タンパク質に適切な条件下で培養することを推奨します。

集菌・洗浄



酵母を 2,000xg で 5 分間遠心して集菌します。遠心沈査に 5~10mL の蒸留水を加えて懸濁し、再度、2,000xg で 5 分間遠心して集菌します。
 ※洗浄後の遠心沈査（菌体）は -80℃ で凍結保存可能です。一般的に、一度、凍結した方が抽出効率は上がります。

前処理



遠心上清を捨て、菌体をボルテックスして細胞塊をよくほぐします（重要）。0.5mL の **Yeast PreLysis buffer** を添加してボルテックスし、室温で 5 分間静置します。
 ※実験系に支障がない場合は、DTT を 5~50mM 添加するとタンパク質抽出効率が上がります。

菌体の溶解



細胞懸濁液を 10,000xg で 5 秒間（4℃）遠心し、回収した菌体をボルテックスして細胞塊をよくほぐします（重要）。0.5mL の **EzBactYeast Lysis buffer** を添加し、室温で 10 分間静置します。
 ※ **EzBactYeast Lysis buffer** にはあらかじめ **EzBactYeast Crusher** キット添付の **Protease Inhibitor** と **DNase I** を添加しておきます。
 ※抽出効率を上げる場合は、酸洗浄ガラスビーズ（φ 0.5 mm）を使用します（分裂酵母は必須）。

タンパク質抽出



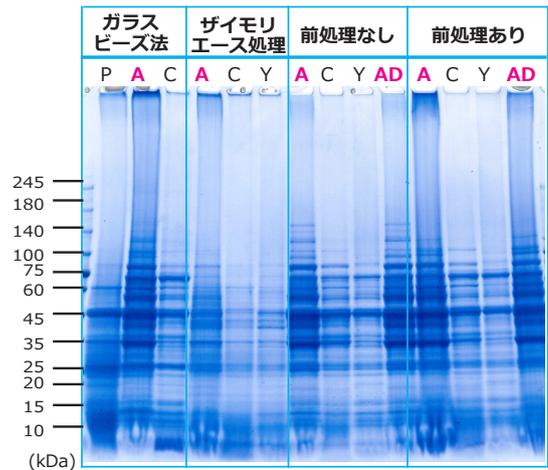
細胞溶解液を 10,000xg（4℃）で 5 分間遠心し、遠心上清を回収します。

一般的な酵母タンパク質の抽出方法

1. 酵母を破碎用溶液（0.33M Sucrose, 0.3M Tris/pH8.0, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 2mM DTT, 100mM 6-Aminohexanoic acid）で洗浄する。
2. 破碎容器に菌体を入れ、容器の 40% 容量のガラスビーズ（酸洗浄済み）を添加する。
3. ビーズ破碎機にセットし 1 分間のパルスで 3~5 分間破碎する。
4. 破碎後、必要であれば 1M Tris/pH7.4 を添加して pH 調整する。
5. 14,000xg で 30 分間遠心して上清を回収する。

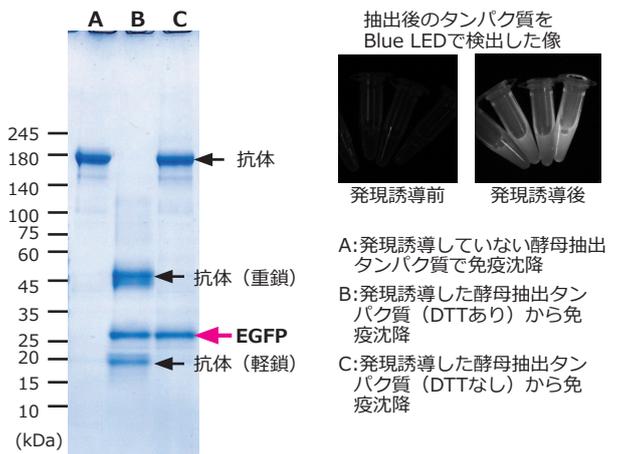
3-2. 参考データ

実験例 3：酵母タンパク質抽出効率の比較



図は YPD 培地で培養した出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 5mL の培養液から細胞を回収し、記載の方法でタンパク質を抽出して、電気泳動を行った結果を示しています。ガラスビーズ法は細胞の約 2.5 倍容量のガラスビーズと各抽出液を 0.2mL 添加し、10 分間ボルテックスを行うことによりタンパク質を抽出しました。ザイモリエース処理法は 5mg/mL のザイモリエースで 37℃ で 30 分間処理した後に、細胞を PBS で洗浄し、さらに細胞に各抽出液を 0.2mL 添加して 10 分間インキュベーションしてタンパク質を抽出しました。前処理なしおよび前処理ありは、細胞に各抽出液を 0.2mL 添加して 10 分間インキュベーションすることによりタンパク質を抽出しました。前処理はタンパク質抽出前に、**EzBactYeast Crusher** に添付された **Pre-Lysis buffer** を細胞に加えて 10 分間インキュベーション処理しました。ガラスビーズ法、ザイモリエース処理法を含め、**EzBactYeast Crusher** で抽出したレーン (A) のタンパク質は、その他の抽出試薬のレーンに比べてタンパク質バンドが多く、濃度も濃いことが示されました。とくに溶出が困難な高分子領域のタンパク質の抽出効率が高く、様々なタンパク質が高効率に溶出できることが判ります。

実験例 4：酵母抽出タンパク質の免疫沈降



上図は V5 tag-EGFP 発現酵母から **EzBactYeast Crusher** を使用して抽出したタンパク質を、V5 抗体を使用して免疫沈降した結果を示しています。写真は抽出後のタンパク質を Blue LED で励起して EGFP の蛍光をとらえた像です。電気泳動パターンはレーン A は発現誘導していないため、EGFP のバンドは検出されていません。しかし発現誘導したレーン B と C には明瞭に EGFP のバンドが検出されました。またレーン B は還元剤である DTT を添加した状態からタンパク質を抽出したため、免沈で使用した抗体由来のバンドも還元され重鎖 (75kDa) と軽鎖 (25kDa) に分かれています。一方、レーン A と C は還元剤を添加せずに抽出したため、抗体は還元されておらず、150kDa のバンドとして検出されました。このように、**EzBactYeast Crusher** を使用して抽出したタンパク質はタンパク質の変性が最小限に抑えられているため、コンプレックス（抗原サイトおよび抗体）が壊れることなく、また活性を保った状態 (EGFP 蛍光) であることが判ります。

4. 動物細胞からのタンパク質抽出方法

比較的柔らかい組織の場合 Potter 型ホモジェナイザーが、また大量の組織を取り扱う場合はフーリングブレンダーやミキサーなどが利用されています。もちろん微生物と同様に超音波破碎や凍結融解法による破碎も用いられます。また動物細胞には細胞壁がないため、浸透圧ショックにより細胞膜を破壊しオルガネラ等を分画する方法があります。ある種の酵素の抽出には有機溶媒（アセトン）による抽出法が利用されます。その他、酵素や界面活性剤を利用した抽出方法も一般的によく用いられます。アトーの EzRIPA Lysis kit はプロテアーゼインヒビターとホスファターゼインヒビターが付属されており、細胞に混ぜるだけでタンパク質を安定に抽出可能です。

4-1. 実験方法

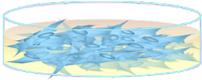
実験材料： 培養細胞（10cm ディッシュ、 $5\sim 20 \times 10^6$ 細胞）
EzRIPA Lysis kit（WSE-7420）
EzPBS(-)（WSE-7430、10 × 濃度）
 マイクロ遠心チューブ、ピペットチップ等
 遠心機、マイクロピペット等

細胞培養



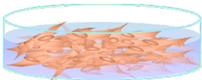
細胞を適当な培地でコンフルエントになるまで培養します（ $5\sim 20 \times 10^6$ 細胞相当）
 ※使用する細胞によって、細胞の大きさや密度によって回収される細胞数は異なります。

洗浄



細胞を EzPBS(-) で 2 回洗浄します。
 ※ EzPBS(-) は使用前に蒸留水で 10 倍希釈します。
 ※接着細胞は剥がさずに洗浄します。浮遊細胞はマイクロ遠心チューブに集菌し、EzPBS(-) に懸濁して洗浄します。
 ※洗浄後の細胞は -80℃ で保存可能です。

細胞の溶解



1.0 mL の RIPA Lysis buffer を添加して氷上で 15 分間静置します。
 ※ RIPA Lysis buffer にはあらかじめ EzRIPA Lysis buffer kit 添付の Protease Inhibitor と Phosphatase inhibitor を添加します。
 ※浮遊細胞は遠心沈渣に RIPA Lysis buffer（調整済み）を添加してピペティングにより懸濁し、氷上に 15 分間静置します。

抽出液の回収



細胞をスクレイパー等でかきとり、マイクロ遠心チューブに回収します。
 この細胞抽出液を 15,000xg で 5~15 分間（4℃）遠心します。
 ※浮遊細胞も上記と同様に遠心します。

タンパク質回収



遠心上清を新しいマイクロ遠心チューブに回収します。可溶化したタンパク質溶液は使用時まで氷上で静置、もしくは -80℃ で保存してください。
 ※核タンパク質も抽出する場合は、SDS を最終濃度が 0.5% になるように添加すると抽出効率が上がります。DNA の溶出により粘性が上がるため、超音波破碎あるいは DNase I で処理します。

一般的な動物細胞タンパク質の抽出方法

動物組織・細胞からタンパク質を抽出するためにはサンプルを破壊する必要があります。一般的に生体サンプルを破壊する方法としては①細断・摩砕（溶媒をサンプルの 3~10 倍添加してホモジェナイズする）、②超音波破碎（50mg/mL 以下の濃度で 1~10 分冷却しながら超音波をかける）、③凍結融解、④加圧破碎（フレンチプレスなどの）⑤浸透圧ショック（pH、イオン強度の変化）⑥有機溶媒（アセトン、アルコールにより脂質膜構造を破壊）⑦酵素処理（細胞壁の酵素破壊など）⑧界面活性剤の利用などがあげられます。

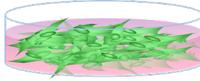
5. オルガネラからのタンパク質抽出方法

細胞内のタンパク質には細胞質や核、ミトコンドリアなどある特定の領域に局在するものがあります。これらのタンパク質は、刺激応答や細胞周期などの影響を受けて局在や機能が変化することがあります。一方で、細胞全体には非常に多くのタンパク質が存在するため、ターゲットタンパク質の同定や単離・精製が難しい場合があります。このような場合、細胞を細胞小器官ごとに分けて解析することで、タンパク質を絞りこむことができ、ターゲットタンパク質の同定や機能解析をより簡単に行うことが可能になります。アトーの EzSubcell Extract はプロテアーゼインヒビターと DNase I が付属されており、細胞に混ぜるだけで細胞質分画、核分画、ミトコンドリアなどの膜分画、不溶性分画それぞれを分離・抽出可能です。

5-1. 実験方法

実験材料： 培養細胞（10cm ディッシュ、 $5\sim 20 \times 10^6$ 細胞）
EzSubcell Extract（WSE-7421）
EzPBS(-)（WSE-7430、10 × 濃度）
 マイクロ遠心チューブ、ピペットチップ等
 遠心機、ボルテックスミキサー、マイクロピペット

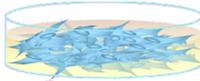
細胞培養



細胞を適当な培地でコンフルエントになるまで培養します（ $5\sim 20 \times 10^6$ 細胞相当）

※使用する細胞によって、細胞の大きさや密度によって回収される細胞数は異なります。

細胞回収



細胞を EzPBS(-) で洗浄し、トリプシン等で分散して回収します。回収後の細胞は、再度 EzPBS(-) で洗浄します。

※物理的破壊を避けるためスクレイパー等でかきとらずに、細胞は分散して回収します。

※ EzPBS(-) は使用前に蒸留水で 10 倍希釈します。

※浮遊細胞はマイクロ遠心チューブに集菌し、EzPBS(-) に懸濁して洗浄します。

※洗浄後の細胞は -80℃ で保存可能です。
 ※凍結後の細胞からも抽出可能です。

細胞質の抽出



細胞に氷冷した 1 mL の Extraction buffer 1 を添加後、ボルテックスで混合し、4℃ で 10 分間インキュベートします。

700 × g で 5 分間（4℃）遠心し、遠心上清をマイクロ遠心チューブに回収します（細胞質分画）。

膜分画の抽出



遠心沈渣に氷冷した 1 mL の Extraction buffer 2 を添加後、ボルテックスで混合し、4℃ で 30 分間インキュベートします。

4,000 × g で 5 分間（4℃）遠心し、遠心上清をマイクロ遠心チューブに回収します（膜分画）。

※膜分画にはミトコンドリア、ゴルジ体、小胞体などが含まれます。

核分画の抽出



遠心沈渣に氷冷した 0.5 mL の Extraction buffer 3 を添加後、ボルテックスで混合し、4℃ で 60 分間インキュベートします。

9,000 × g で 5 分間（4℃）遠心し、遠心上清をマイクロ遠心チューブに回収します（核分画）。

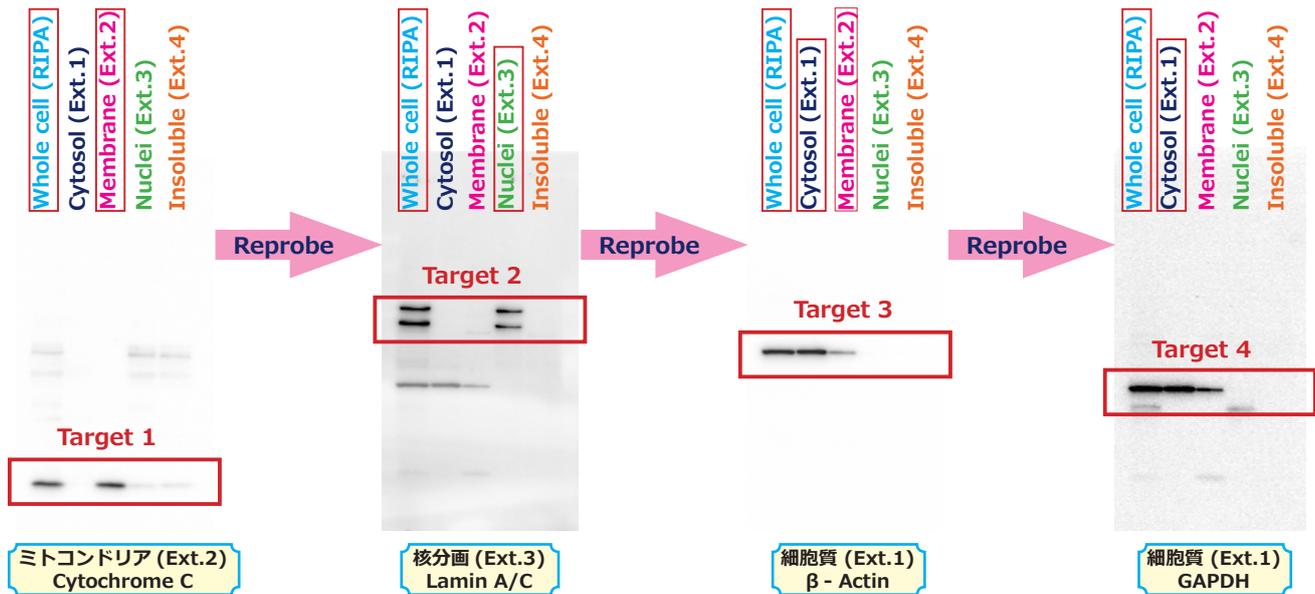
不溶性分画の抽出



細胞に室温の 0.5 mL の Extraction buffer 4 を添加してボルテックスして溶解します。

5-2. 参考データ

実験例 5：核分画におけるオルガネラマーカールの検出

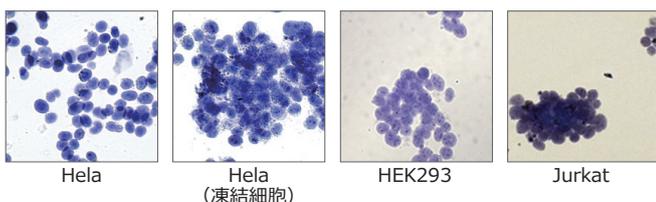


ヒト結腸癌由来細胞 SW480 (2×10^7 個細胞) から EzRIPA Lysis kit および EzSubcell Extract を使用して、全細胞 (Whole cell)、細胞質 (Cytosol, Ext.1)、膜分画 (Membrane Ext.2)、核分画 (Nuclei, Ext.3)、不溶性分画 (Insoluble, Ext.4) のタンパク質を抽出し、EzApply を使用して電気泳動サンプルを調製しました。ePAGEL (5-20% 濃度勾配ゲル) で分離し、EzFastBlot を使用して P plus 膜に転写して、EzBlock CAS で 30 分ブロッキングしました。ブロッキング後の膜をミトコンドリアマーカーの Cytochrome C 抗体、次いで HRP 標識 2 次抗体と反応し、EzWestLumi plus で検出した結果が上図左側の写真です。全細胞抽出液と膜分画にのみバンドが検出されていますが、膜分画にも検出されており、細胞質分画が膜分画にわずかに混在していることが示されました。このプロットティング膜から EzReprobe との反応により抗体を剥離し、再び EzBlock CAS でブロッキングした後に、核マーカーの LaminA/C 抗体および HRP 標識 2 次抗体と反応して EzWestLumi plus で検出した結果が左から 2 番目の写真です。全細胞抽出液と核分画にのみバンドが検出されており、核分画もまた他オルガネラのコンタミなく分離されたことが判ります。再度、同様に抗体剥離、ブロッキングを行い、βアクチン抗体と反応させて検出した結果が左から 3 番目の写真です。右側の写真はさらに同じ膜を使用して、抗体剥離、ブロッキングを行い、GAPDH 抗体と反応して検出した結果です。細胞質マーカーである β-アクチン と GAPDH は全細胞抽出液と細胞質分画にバンドが検出されましたが、膜分画にも検出されており、細胞質分画が膜分画にわずかに混在することが示されました。しかし、上述の実験では省きましたが、EzSubcell Extract によるオルガネラ分画の抽出法は、抽出時のさらなる洗浄操作を行うことにより、よりコンタミなく各オルガネラ分画を抽出することが可能です。このように EzSubcell Extract は各オルガネラ分画を細胞と混ぜるだけで抽出することができ、EzReprobe と組み合わせることにより、僅かでも貴重なサンプルからであっても、多くのタンパク質の発現を調べることが可能になります。

実験例 6：抽出液のタンパク質量と核染色像

	総タンパク質量 (mg)				
	全細胞抽出液 Whole Cell RIPA	細胞質分画 Cytosol Ext.1	膜分画 Membrane Ext.2	核分画 Nuclei Ext.3	不溶性分画 Insoluble Ext.4
Hela	4.06	0.47	2.59	1.33	0.07
SW480	3.22	2.42	1.77	0.44	0.18
HEK293	3.33	2.82	1.73	1.01	0.54

EzSubcell Extract により、コンフルエントになった 1 枚の培養ディッシュ (φ 10cm、細胞数は $1 \sim 2 \times 10^7$ 個) から各細胞株のオルガネラ抽出液を調製しました。Whole cell の抽出液は EzRIPA Lysis kit により、同様にコンフルエントの培養ディッシュ 1 枚から調製しました。タンパク質濃度は BCA 法により定量しました。



抽出液 2 で処理した遠心沈渣 (核) のトリパンブルー染色像
EzSubcell Extract の Extraction buffer 2 で処理した後の遠心沈渣を、トリパンブルー染色して観察した結果です。核の形状に異常がなく、核膜が保持された状態で単離されていることが示されました。凍結保存した細胞からも同様に核の単離及び各オルガネラの抽出液を単離することができます。

関連製品

WSE-7423 EzBactYeast Crusher

大腸菌および酵母と混ぜるだけでタンパク質を抽出する可溶化バッファです。抽出タンパク質は発現タンパク質の精製、免疫沈降、酵素活性測定、ウェスタンブロットティング等に使用できます。

キットの内容:	Yeast PreLysis buffer	100mL
	BactYeastLysis buffer	100mL
	DNase	1mL
	Protease inhibitor	1mL

WSE-7420 EzRIPA Lysis kit

動物細胞からのタンパク質抽出に最もよく使用される RIPA バッファです。抽出タンパク質は上記同様、様々な用途に使用できます。

キットの内容:	EzRIPA Lysis buffer	100mL
	Protease inhibitor	1mL
	Phosphatase inhibitor	1mL

WSE-7421 EzSubcell extract

動物細胞と混ぜるだけで各オルガネラのタンパク質が抽出できるキットです。抽出タンパク質は上記同様、様々な用途に使用できます。

キットの内容:	Extraction buffer	50/25mL (4種)
	DNase	0.25mL
	Protease inhibitor	1.25mL

WSE-7423 EzSubcell Fraction

動物細胞と混ぜるだけで核、ミトコンドリア、細胞質に分画できるキットです。抽出タンパク質は上記同様、様々な用途に使用できます。

キットの内容:	Fraction buffer	50mL (2種)
	RIPA Lysis buffer	20mL
	Detergent mix	1mL
	Protease inhibitor	0.7mL

アト株式会社

■ 東京本社 〒111-0041 東京都台東区元浅草3-2-2
 ☎ (03)5827-4861 ☎ (03)5827-6647
 ■ 大阪支店 〒530-0044 大阪府北区東天満2-8-1 若杉センタービル別館 5F
 ☎ (06)6136-1421 ☎ (06)6356-3625
 ■ メンテナンスサービス 〒110-0016 東京都台東区台東2-21-6
 ☎ (03)5818-7567 ☎ (03)5818-7563