



cytiva

《2-D Clean-Up Kit》 Quick Reference

【コンポーネント】

- ・Precipitant : サンプル溶液中に含まれるタンパク質を沈殿させます。
- ・Co-precipitant : サンプル溶液中のタンパク質の沈殿を高めます。
- ・Wash buffer : 沈殿したタンパク質からタンパク質以外の物質を除去します。
- ・Wash additive : 沈殿したタンパク質を素早く完全に懸濁するように促進させる試薬が含まれています。

【始める前の準備】

Wash buffer を -20°C で少なくとも 1 時間は冷却しておきます。すべての操作は氷冷しながら行ってください。

プロトコール A

サンプル量 1~100 μl (タンパク質量 1~100 μg)* の場合

* サンプルのタンパク質濃度は、操作前に確認してください。二次元電気泳動、SDS-PAGE などのサンプルのタンパク質定量にデザインされた 2-D Quant Kit (コード番号:80648356) が便利です。

1. 1~100 μl のタンパク質サンプル(1 ~100 μg)を 1.5 ml チューブに入れます。
2. Precipitant を 300 μl 加え、Vortex ミキサーなどで攪拌します。4~5 $^{\circ}\text{C}$ で 15 分間インキュベートします。
3. Co-precipitant を 300 μl 加え、混合します。
4. $>12,000 \times g$ で 5 分間遠心します。遠心後は、小さなペレット状の沈殿物が確認できます。
Note: サンプルによって沈殿したペレットの形状が異なりますが、チューブ底、壁面に付着しています。
5. ペレットが再懸濁する前に、すばやく上清を除きます。再度遠心し、残っている溶液を完全に除去します。
6. ペレットを拡散させないように注意して、co-precipitant を 40 μl 、ペレットの上に積層させます。チューブを 5 分間氷冷します。
7. $>12,000 \times g$ で 5 分間遠心します。上清を除去します。
Note: 残液があると二次元電気泳動の一次元目泳動の際、電流が流れすぎて電圧が上昇しない現象を引き起こす場合があります。
8. 超純水を 25 μl 加え、Vortex ミキサーなどで 5~10 秒間攪拌します。ペレットは拡散しますが溶解はしません。
9. -20°C で >1 時間冷却した Wash buffer を 1 ml、Wash additive を 5 μl 加えます。超音波水浴で 5 分間冷却しながらペレットを分散します。
Note: タンパク質ペレットは、Wash buffer に溶解しません。超音波水浴などを用いてペレット状タンパク質を十分に分散させます。分散が不十分だと、一次元目泳動の際、電圧が上昇しない現象を引き起こします。
10. -20°C で 30 分間以上インキュベートします。この間、10 分ごとに 20~30 秒間、超音波水浴もしくは Vortex ミキサーなどで攪拌します。
Note: このステップで操作を中断したサンプルは、 -20°C で 1 週間保存することができます。
11. $>12,000 \times g$ で 5 分間遠心します。
12. 上清を除き、ペレットを風乾します(5 分間以内)。
Note: ペレットを乾燥させすぎると再懸濁が困難になります。
13. 一次元目用のサンプルバッファー(膨潤バッファー)で溶解します。検出方法やサンプル添加方法に適したバッファー量で溶解します。Vortex ミキサーなどで 30 秒間以上攪拌し、完全にペレットを溶解します。
Note: ペレットが大きかったり乾燥しすぎたりした場合は、溶解に時間がかかります。
14. $>12,000 \times g$ で 5 分間遠心し、不溶性物質や残存物質を除去します。上清はそのままサンプル溶液として使用することも、 -80°C で保存することも可能です。

プロトコール B

サンプル量 **100 μ l** 以上 (タンパク量 **100 μ g** 以上) の場合

1. $8,000 \times g$ で遠心でき、サンプル量の少なくとも 12 倍の容量をもつポリプロピレンまたはガラス製のチューブにサンプルを入れます。
Note: ポリプロピレン以外のプラスチック製のチューブはこのキットに含まれる溶媒に耐久性がありません。また、遠心操作に耐性のあるチューブを用いてください。
2. サンプル量の 3 倍量の Precipitant を加え、Vortex ミキサーなどで攪拌します。4~5 $^{\circ}\text{C}$ で 15 分間インキュベートします。
3. サンプル量の 3 倍量の Co-precipitant を加え、混合します。
4. $>8,000 \times g$ で 10 分間遠心します。遠心後は、小さなペレット状の沈殿物が確認できます。
Note: サンプルによって沈殿したペレットの形状が異なりますがチューブ底、壁面に付着しています。
5. ペレットが再懸濁する前に、すばやく上清を除きます。再度遠心し、残っている溶液を完全に除去します。
6. ペレットの 3~4 倍量の Co-precipitant を加えます。
7. $>12,000 \times g$ で 5 分間遠心します。上清を除去します。
Note: 残液があると二次元電気泳動の一次元目泳動の際、電流が流れすぎて、電圧が上昇しない現象を引き起こす場合があります。
8. ペレットを覆うように超純水を加え、Vortex ミキサーなどで数秒間攪拌します。ペレットは拡散しますが溶解はしません。
9. -20°C で >1 時間冷却した Wash buffer をサンプル量の 10 倍量、Wash additive を 5 μ l 加えます (Wash additive はサンプル量に関わりなく 5 μ l 加えます)。冷却しながら超音波水浴で 5 分間ペレットを分散します。
Note: タンパク質ペレットは、Wash buffer に溶解しません。超音波水浴などを用いてペレット状タンパク質を十分に分散させます。分散が不十分ですと、一次元目の泳動の際、電圧が上昇しない現象を引き起こします。
10. -20°C で 30 分間以上インキュベートします。この間、10 分ごとに 20~30 秒間、超音波水浴もしくは、Vortex ミキサーなどで攪拌します。
Note: のステップで操作を中断したサンプルは、 -20°C で 1 週間保存することができます。
11. $>8,000 \times g$ で 10 分間遠心します。
12. 上清を除き、ペレットを風乾します (5 分間以内)。
Note: ペレットを乾燥させすぎると再懸濁が困難になります。
13. 一次元目用のサンプルバッファー (膨潤バッファー) で溶解します (サンプル量の 1/20 量程度)。Vortex ミキサーなどで 30 秒間以上攪拌し、完全にペレットを溶解します。
Note: ペレットが大きかったり乾燥しすぎたりした場合は、溶解に時間がかかります。
14. $>8,000 \times g$ で 10 分間遠心し、不溶性物質や残存物質を除去します。上清はそのままサンプル溶液として使用することも、 -80°C で保存することも可能です。

当Quick Referenceは2-D Clean-Up Kit のプロトコールを示したものです。
使用上の注意、トラブルシューティング等は製品に添付されているInstructionをご参照ください。

製品に関するお問合せはバイオダイレクトラインまで

Cytiva (サイティバ)

グローバルライフサイエンステクノロジーズジャパン株式会社
〒169-0073

東京都新宿区百人町3-25-1 サンケンビルディング

お問合せ: バイオダイレクトライン

TEL: 03-5331-9336

e-mail: Tech-JP@cytiva.com

