筋タンパクおよび代謝物の抽出

薬品に肩についたアルファベットは，試薬の保存場所.
a―室温; b―冷蔵庫(- 4℃); c―冷凍庫(- 20℃); d―冷凍庫(- 80℃)
pH は，特に指定がない場合は，塩酸 (HCl) か水酸化ナトリウム (NaOH) であわせる.

I. 尿素抽出

筋に含まれるほぼ全てのタンパクが抽出でき，二次元電気泳動あるいは SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法に利用できる.

1. 抽出液

		最終濃度
尿素[a] (Urea; 60.06)	1.5 g	5 M
チオ尿素[a] (Thiourea; 76.12)	0.775 g	2.04 M
二リン酸ナトリウム[a]（ﾋﾟﾛﾘﾝ酸ﾅﾄﾘｳﾑ） (Sodium Diphosphate Decahydrate; 446.06)	0.0225 g	10 mM
2-メルカプトエタノール[b] (2-Mercaptoethanol)	6.5 μl	0.13%

以上を取り，蒸留水を加え 5 ml にする.
*使用する当日に調整する.

2. ホモジネイト

(1) ガラスホモジナイザーを氷冷する.
(2) 筋の水分をよく取り，筋重量を量った後，ホモジナイザーに入れる.
(3) 筋重量の 40 倍の抽出液 [例; 筋 25 mg に対して抽出液 1000 μl (25×40)] をホモジナイザーに加える.
(4) スティックで筋をよくつぶす.
*小分けにして，- 80℃で保存する.
*タンパク濃度は，約 4 mg/ml となる.

3. 希釈

(1) 二次元電気泳動法
得られた抽出液をそのまま用いる.
(2) SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (クーマシー染色)
0.4 mg/ml になるよう SDS sample buffer (SDS 電気泳動法 p 2 参照) で希釈する.
約 10 倍
(3) SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (銀染色)
0.04 mg/ml になるよう SDS sample buffer で希釈する.
約 100 倍

II. 筋原線維の抽出 1 (crude)

主として，isomyosin の分析に用いるが，ミオシン重鎖や軽鎖にも使用できる．

1. 抽出液

2 種類の抽出液があるが，全筋を抽出する場合は，どちらを用いても差異はない．しかしながら，単一筋線維の場合は，抽出液 2 の方が良い結果が得られる．

a. 抽出液 1 (pH 6.5)

		最終濃度
塩化カリウム[a] (Potassium Chloride, KCl; 74.55)	4.47 g	0.3 M
リン酸二水素カリウム[a] (Potassium Dihydrogenphosphate, KH_2PO_4; 136.09)	2.72 g	0.1 M
リン酸水素二カリウム[a] (Dipotassium Hydrogenphosphate, K_2HPO_4; 174.18)	1.74 g	0.05 M
100 mM EDTA[a]	2 ml	1 mM

以上を取り，pH を 6.5 にあわせた後，200 ml にする．

*冷蔵庫で保存

b. 抽出液 2 (pH 8.5)

		最終濃度
二リン酸ナトリウム[a]（ﾋﾟﾛﾘﾝ酸ﾅﾄﾘｳﾑ） (Sodium Diphosphate Decahydrate; 446.06)	8.92 g	0.1 M
塩化カリウム[a] (Potassium Chloride, KCl; 74.56)	4.47 g	0.3 M
100 mM 塩化マグネシウム[a]	10 ml	5 mM
EGTA [a] (380.35)	0.38 g	5 mM

以上を取り，pH を 8.5 にあわせた後，200 ml にする．

*冷蔵庫で保存

使用時に，この抽出液 5 ml に対し，ATP (551.1) 14 mg (最終濃度—5 mM) を加える．

2. ホモジネイト

(1) 筋をパウダーにする．

(2) 秤量計に 1.5 ml のチューブを置き，その中にパウダーを入れ，筋重量を量る．

*40～60 mg 程度の筋を使う．

(3) 筋重量の 8 倍の抽出液 [例; 筋 40 mg に対して抽出液 320 μl (40×8)] をチューブに加えた後，よくボルテックスする．

*パウダーにせず，ホモジナイザーでホモジナイズしてもよい．

(4) 約 10 分間 16,000 rpm (4℃) で遠心分離する．

(5) 上清をグリセロールで 2 倍に希釈する．

*タンパク濃度を測定する場合は，ここで行う．

*得られた抽出液は，- 80℃で保存する．

(6) 目的により，以下のように処理する．

Isomyosin の分析ー得られた抽出液を PPAGE sample buffer (ピロリン酸電気泳動法 p1)で 20 倍に希釈する (銀染色).

ミオシン重鎖の分析ーisomyosin 用の溶液を SDS sample buffer で 10 倍に希釈する（銀染色）.

筋原線維の抽出 2

1. 溶液
   溶液は 3 種類あるが，全て冷蔵庫で保存する．溶液 1 については，あまり長く保存はできないので注意すること．

(1) 溶液 1（pH 6.8）

		最終濃度
ショ糖[a] (Sucrose; 342.2)	17.1 g	250 mM
塩化カリウム[a] (Potassium Chloride, KCl; 74.55)	1.49 g	100 mM
イミダゾール[a] (Imidazole; 68.1)	0.272 g	20 mM
EDTA [a] (372.2)	0.372 g	5 mM

塩化カリウム, イミダゾールおよび EDTA を取り, 蒸留水を加え pH を 6.8 にあわせる．その後，ショ糖および蒸留水を加え，200 ml にする．

(2) 溶液 2（pH 6.8）

		最終濃度
塩化カリウム[a] (Potassium Chloride, KCl; 74.55)	2.61 g	175 mM
Triton X-100 [a]	1 ml	0.5 %

塩化カリウムを取り，蒸留水を約 180 ml 加え pH を 6.8 にあわせる．その後，Triton X-100 および蒸留水を加え，200 ml にする．

(3) 溶液 3（7.0）

塩化カリウム[a] (Potassium Chloride, KCl; 74.55)	2.24 g	150 mM
イミダゾール[a] (Imidazole; 68.1)	0.272 g	20 mM

以上を取り，蒸留水を加え pH を 7.0 にあわせる．その後，蒸留水を加え 200 ml にする．

2. 手順
   (1) 筋をパウダーにする．
   (2) 約 60 mg の筋を取り，溶液 1 を 1.5 ml 加え，ガラスホモジナイザーでホモジナイズする．
       *筋の重さを記録しておく．
   (3) 得られた抽出液 1.0 ml をチューブに取る．
   (4) 3000 rpm (4℃) で 10 分間遠心分離する．
   (5) 上清を捨て，300 µl の抽出液 2 を入れ，ペレットを再びホモジナイズする．
   (6) (4)ー(5)をさらに 2 回繰り返す．
   (7) 上清を捨て，300 µl の抽出液 3 を入れ，ペレットを再びホモジナイズする．
   (8) 3000 rpm (4℃) で 10 分間遠心分離する．
   (9) (7)ー(8)をもう 1 度繰り返す．
   (10) 抽出液 3 を加え，1 ml にする．
       *タンパク濃度は，2.5 mg/ml 程度になる．

参考文献

Tsika RW et al. (1987) J Appl Physiol 62: 2180-2186

III.　筋小胞体の精製 (crude)

精製したものから，Ca^{2+}取り込み・放出速度あるいはCa^{2+}-ATPase活性などを測定する場合は以下のことに特に注意すること.

- 使用するビーカーおよび水はできる限りきれいなものを用いる.
- pH は指定された温度で合わせる.
- 試料およびビーカーは，常に冷却された状態を保つ.

1. 溶液

(1)　200 mM MOPS-KOH (pH 7.4; 4℃)

MOPS[a] (209.39)を 8.37 g取り，蒸留水を約 160 ml加える．水酸化カリウム[a] (Potassium Hydroxide, KOH)でpHを 7.4 にあわせた後，蒸留水を加え 200 mlにする.

*冷蔵庫で保存

(2)　100 mM Tris-Malate (pH 7.0; 4℃)

トリス[a] (2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol, Tris; 121.14)を 2.42 g取り，蒸留水を約 160 ml加える. マレイン酸[a] (Maleic Acid) でpHを 7.0 にあわせた後,蒸留水を加え, ,200 ml にする.

*冷蔵庫で保存

(3)　100 mM Phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF)

PMSF[a] (174.2) を 174 mg取り，エタノールを 10 ml加える.

*冷凍庫 (- 20℃) で保存

(4)　14 mM PepstatinA

Pepstatin A[b] (685.9) を 25 mg取り，メタノールを 2.603 ml加える.

*冷凍庫 (- 20℃) で保存

(5)　22 mM Leupeptin

Leupeptin[b] (426.6) を 25 mg取り，蒸留水を 2.664 ml加える.

*冷凍庫 (- 20℃) で保存

(6)　100 mM Benzamidine

Benzamidine[b] (156.6) を 1.566 g取り，蒸留水を 100 ml加える.

*冷蔵庫で保存

(7)　抽出液 1

		最終濃度
塩化カリウム[a] (Potassium Chloride, KCl; 74.55)	1.491 g	100 mM
200 mM MOPS-KOH[b] (pH 7.4)	10 ml	10 mM
100 mM PMSF[c]	0.4 ml	0.2 mM
14 mM Pepstatin A[c]	20 μl	1.4 μM
22 mM Leupeptin [c]	20 μl	2.2 μM
100 mM Benzamidine[b]	1.66 ml	0.83 mM

以上を取り，蒸留水を加え 200 ml にする.

*使用当日に調製する

(8)　抽出液 2

		最終濃度
塩化カリウム[a] (Potassium Chloride, KCl; 74.55)	4.48 g	600 mM
200 mM MOPS-KOH[b] (pH 7.4)	5 ml	10 mM
100 mM PMSF[c]	0.2 ml	0.2 mM
14 mM Pepstatin A[c]	10 μl	1.4 μM
22 mM Leupeptin [c]	10 μl	2.2 μM
100 mM Benzamidine[b]	0.83 ml	0.83 mM

以上を取り，蒸留水を加え 100 ml にする.
*使用当日に調製する

(9)　抽出液 3

		最終濃度
ショ糖[a] (Sucrose; 342.2)	10.27 g	300 mM
100 mM Tris-Malate[b] (pH 7.0)	20 ml	20 mM
100 mM PMSF[c]	0.2 ml	0.2 mM
14 mM Pepstatin A[c]	10 μl	1.4 μM
22 mM Leupeptin [c]	10 μl	2.2 μM
100 mM Benzamidine[b]	0.83 ml	0.83 mM

以上を取り，蒸留水を加え 100 ml にする.
*使用当日に調製する

2.　手順

*全ての作業は 4℃でおこなう.

(1)　約 6 倍の抽出液 1 [例; 筋 100 mg に対して抽出液 600 μl (100×6)]でホモジナイズする.
(2)　3000 rpm で 20 分間遠心分離する.
(3)　上清を取り，8000 rpm で 20 分間遠心分離する.
(4)　上清を取り，10,000 rpm で 20 分間遠心分離する.
(5)　上清を取り，50,000 rpm で 60 分間遠心分離する.
*超遠心機を使用する.

使用上の注意

1)　カレンダーに，使用時間，氏名，電話番号を書き，予約を取る.
2)　ローター(90Ti)を cold room で冷却する.
*底にキズがつかないよう，キムタオルの上に置く
3)　グリースをゴムのリングに塗る.
4)　天秤を用い，溶液 1 を入れることによって，チューブのバランスをとる.
*チューブに約 70%以上溶液を入れる
5)　ローターを置く.
*軽く回して，正確に載っているか確認する
6)　バキュームを on にする.
7)　speed, temperature, rotor type をセットする.
*数値を打ち込んだら，enter を押す
8)　enter → start を押す.
*50,000 rpm にあがるのを確認した後，遠心機から離れる
9)　終了したら，バキュームを off にして，ローターを取り出す.
10)　ノートに必要事項を記入する.

(6)　上清を捨て，溶液 2 を適当量チューブに入れる．
(7)　ペレットを溶液の中に溶かし込むように混ぜる．
(8)　溶液をホモジナイザーに入れ，ホモジナイズする．
(9)　溶液をビーカーに移し，スターラーでかき混ぜながら約 30 分間放置する．
(10) 上清を取り，50,000 rpm で 60 分間遠心分離する．
　　*超遠心機を使用する．
(11) 上清を捨て，溶液 3（筋 1 g 当たり 0.33 ml）をチューブに入れる．
(12) (7)－(8)を繰り返す．
(13) 試料を均質化するために，超音波洗浄器に 20－30 分間入れる．
(14) 試料をチューブに小分けにし，－80℃で保存する．

*　Ca^{2+}-ATPase活性あるいはCa^{2+}取り込み能力などを測定する場合は, 冷凍庫に入れる前に必ず, 液体窒素中で瞬間凍結する
*　得られた試料のタンパク濃度は，速筋で 3 mg/ml，遅筋で 10 mg/ml になる

V. 筋小胞体の機能測定のためのホモジナイズ

筋小胞体のCa^{2+}取り込み・放出速度あるいはCa^{2+}-ATPase活性を測定するためのホモジナイズである.

1. 抽出液

		最終濃度
ショ糖[a] (Sucrose; 342.2)	10.27 g	300 mM
100 mM Tris-Malate[b] (pH 7.0)	20 ml	20 mM
100 mM PMSF[c]	0.2 ml	0.2 mM
14 mM Pepstatin[c]	10 μl	1.4 μM
22 mM Leupeptin A[c]	10 μl	2.2 μM
100 mM Benzamidine[b]	0.83 ml	0.83 mM

以上を取り，蒸留水を加え 100 ml にする.
*使用当日に調製する

2. ホモジネイト
   (1) ガラスホモジナイザーを氷冷する.

   (2) 筋の水分をよく取り，筋重量を量った後，ホモジナイザーに入れる.

   (3) 筋重量の 9 倍の抽出液 [例; 筋 100 mg に対して抽出液 900 μl (100×9)] をホモジナイザーに加える.

   (4) スティックで筋をよくつぶす.

   (5) 5000 rpm で 20 分間 (0－4℃) 遠心分離する.

   (6) 上清を小分けにして，- 80℃で保存する.
   *冷凍庫に入れる前に，液体窒素中で瞬間凍結する

注意： タンパク濃度は，4～5 mg/ml 前後になる.
遠心分離する前の抽出液を，全タンパク分離を目的とした二次元電気泳動法に用いることができる. この場合，尿素抽出液（p 1）で 4 倍に希釈して泳動に供する.

VI.　Na^+-K^+-ATPase活性測定のためのホモジナイズ

1.　抽出液

筋小胞体の機能測定用のものを用いる (p 7).

2.　ホモジナイズ

(1)　筋を 9 倍の抽出液で抽出する.

注意：SR Ca^{2+}-ATPaseの場合とは異なり，ホモジネイトした後，遠心分離にはかけない.

(2)　この溶液の解凍－凍結を 4 回繰り返す.

(3)　解凍－凍結を繰り返した溶液を，抽出液で 10 倍に希釈する.

注意：　タンパク濃度は，0.5-0.75 mg/ml となる.

タンパク濃度を測定するときは，溶液を 160 倍（最終希釈）に希釈する.

VII.　過塩素酸抽出

代謝物を測定するための抽出法である．大部分は上清を用いるが,グリコーゲンだけは，ペレットから測定する．

1. 溶液

(1)　2 M 過塩素酸

60%過塩素酸[a] (Perchloric acid, PCA; 密度 1.76 g/ml) 30.08 mlに，蒸留水を加え 200 ml にする．

*冷蔵庫で保存

(2)　2 M 重炭酸カリウム

重炭酸カリウム[a] (Potassium Bicarbonate, $KHCO_3$; 100.1) 2 gに，蒸留水を加え 10 ml にする．

*冷蔵庫で保存

(3)　100 mM 重炭酸カリウム (pH 7.5)

重炭酸カリウム[a] (Potassium Bicarbonate, $KHCO_3$; 100.1) 1 gに，蒸留水約 80 ml を加える．pH を 7.5 にあわせた後，蒸留水を加え 100 ml にする．

*冷蔵庫で保存

2. 手順

(1)　チューブ (1.5 ml) の中に組織を入れ，筋重量を測定する．

*凍結乾燥した試料であれば 5 mg 前後，そうでない場合は 20 mg 前後を取る．

*ペレットからグリコーゲンを測定する場合は，ねじ蓋付きのチューブを使用する．

(2)　予め冷却した 2 M 過塩素酸 300 μl を加える．

(3)　−5℃～−10℃で 20 分間放置する．

*−20℃以下にはしない

(4)　16,000 rpm で 10 分間 (0−4℃) 遠心分離する．

(5)　上清 250 μl を別のチューブ (1.5 ml) に取り，2 M 重炭酸カリウム 250 μl を加える．

*重炭酸カリウムはゆっくり加える

*ペレットは，残った溶液を取り除き，−80℃で保存する

(6)　16,000 rpm で 10 分間 (0−4℃) 遠心分離する．

(7)　上清 350 μl を取り，100 mM 重炭酸カリウム 650 μl を加える．

*試料は，−80℃で保存する