

Percoll 密度勾配遠心法による核の分画(分裂酵母)

■ 試薬類

S-buffer

2×S-buffer を等量の DW で希釈する。

[組成]

1 M Sorbitol

20 mM PIPES-NaOH pH 6.5

0.1 mM CaCl₂

2×S-buffer (300 ml)

Sorbitol	109.3 g	(2 M)
0.2 M PIPES-NaOH pH 6.5	60 ml	(40 mM)
10 mM CaCl ₂	6 ml	(0.2 mM)
DW	fill up to 300 ml	

15 % Percoll + S-buffer (100 ml)

Percoll	15 ml
2×S-buffer	50 ml
DW	35 ml

40 % Percoll + S-buffer (100 ml)

Percoll	40 ml
2×S-buffer	50 ml
DW	10 ml

15 % Ficoll buffer (20 ml)

Ficoll*	3 g	(15 %)
0.2 M PIPES-NaOH pH 6.5	2 ml	(20 mM)
10 mM CaCl ₂	0.2 ml	(0.2 mM)
DW	fill up to 20 ml	

*Ficoll は溶けにくいので、溶液を攪拌しながら少しずつ溶かす。

50×Protease inhibitor cocktail (50×PIs)

Protease Inhibitor Tablets (complete EDTA-free, Roche) 1 tablet を、1 ml の DW か適当な buffer (100 mM phosphate buffer pH 7.0 等) に溶かし、-20℃で使用直前まで保存する。必要に応じて、1

×あるいは2×の濃度に調製して使用する。

0.5 mg/ml Zymolyase + S-buffer

使用直前に 20 mg の Zymolyase 100T (SEIKAGAKU COPORATION) を 40 ml の S-buffer に溶かす。

■ 機器類

- ・グラジェントメーカー
- ・攪拌機 HEIDEN スリーワンモーター300G
- ・ホモジナイザー(30 ml 容量) ポッター型、テフロンペッスル
- ・超遠心機 HITACHI himac CP70G
- ・ローター(スイング型) P28S2-913
- ・遠心管(40 ml 容量) HITACHI 40PET TUBE(2.5×9.0)

■実験方法

すべての操作は 0~4°Cで行う。

細胞の準備

1. YEA または適切な合成培地中で培養した対数増殖期の分裂酵母細胞 $1-3 \times 10^{10}$ cells (3×10^7 cells/ml, 1L)を用意する。
2. 集菌し、40 ml の DW で細胞を洗う。このとき 50 ml 容量のファルコンチューブに移す。
3. 20 ml の S-buffer で洗う。

細胞のスフィロプラスト化

1. 細胞を 40 ml の 0.5 mg/ml Zymolyase + S-buffer に懸濁する(完全に溶けなくともよい)。
2. 泡立たないようにゆっくりと振とうしながら 32°C で 70 分間インキュベートする。
3. 細胞壁が消化されてスフィロプラスト化したか顕微鏡下で確認する。(一部を S-buffer で、適当に希釈し、スライドガラス上で DW に置換して細胞が破裂するのを確認する)
4. 集菌し、20 ml の S-buffer で 2 回洗う。

Percoll 密度勾配遠心による分画

[準備] 予め 32 ml の 15-40 % Percoll Gradient (+PIs)を作り、4°Cに冷やしておく。遠心管は HITACHI 40PET TUBE(2.5×9.0)を使用。グラジエントメーカーの流速は 1-2 ml/min、20-30 分程度で 32ml のグラジエントを作るようにする。

1. 5 ml の 15 % Ficoll buffer (+PIs)に細胞を懸濁する。
2. 30 ml 容量のポッター型ホモジナイザー(テフロンペッスル)を用いて細胞を摩砕する。(300 rpm, 20-30 strokes)。温度が上昇しないようにホモジナイザー容器を氷水につけながら行う。この条件で 5 割程度の細胞が破壊されるが、必要に応じて Hoechst33342 で DNA を染色し、核の放出を蛍光顕微鏡下で確認する。
3. 細胞摩砕液を回収し、32 ml の 15-40 % Percoll Gradient (+PIs)に静かに重層する。回収した摩砕液が 5ml に満たなければ、15 % Ficoll buffer ホモジナイザーの内壁を洗いながら回収して容量を合わせる。
4. スイングローター (P28S2-913 HITACHI)にセットし、7000 rpm、4°Cで 30 分間遠心する。バランスは 15 %と 17 %の Percoll buffer を 16 ml ずつと 5 ml の 15 % Ficoll bufer でつくっておく。
5. 遠心が終了したら、グラジエントを乱さないように注意しながら上から 1 ml ずつ分取する。
6. 各フラクションから一部を取って Hoechst33342 で染色し、蛍光顕微鏡で核が多く含まれるフラクションを調べる。

あるいは核の構成成分にタグを融合させた株(例えばヒストン H3-GFP)を用いた場合、タグに対する特異的抗体(GFP 抗体)によるウェスタンブロッティングで核のピークフラクションを調べることができる。