

Product Information

CellLytic™ MEM Protein Extraction Kit
(膜タンパク質抽出キット)

製品番号 CE0050

TECHNICAL BULLETIN(使用説明書)

製品概要

CellLytic™ MEM Protein Extraction Kit は、細胞から疎水性タンパク質やラフト(スフィンゴ糖脂質およびコレステロールを多く含む膜マイクロドメイン)局在タンパク質を迅速かつ簡単に単離します。この方法は相分離に基づくため、細胞膜を単離する必要はありません。疎水性タンパク質およびラフト局在タンパク質は疎水相に濃縮され、その後の実験に使用できます。本キットで得られた抽出物は以下の実験に使用できます。

- 免疫沈降
- ゲル電気泳動—Coomassie® Brilliant Blue 染色および銀染色
- ドットブロットおよびウェスタンブロット

本キットは HeLa、HEK-293、NIH 3T3、COS、CHO といった細胞株でテストされました。

キット内容

Lysis and Separation Buffer(溶解・分離バッファー)
製品番号 L2417 50 mL

Wash Buffer for CellLytic Kit(洗浄バッファー)
製品番号 W2514 50 mL

Sodium Chloride, 4 M solution(NaCl 溶液)
製品番号 S2568 1.5 mL

プロテアーゼインヒビターカクテル(哺乳類細胞・組織用)
製品番号 P8340 1 mL

本製品以外にご用意いただく試薬および器具

- 組織培養用コニカル遠心チューブ(15 mL)
- マイクロ遠心チューブ
- 遠心分離機
- マイクロ遠心機(冷却機能付)—Eppendorf® 5417R 型機(製品番号 Z366013 または Z366021)または同等品
- Dulbecco リン酸緩衝生理食塩水(DPBS)(製品番号 D8537)
- 1 mM EDTA 含有 PBS
- セルスクレーパー(製品番号 CLS3010)

ご使用前の注意と免責事項

弊社の製品は試験研究用のみを目的として販売されています。医薬品、家庭用その他試験研究以外の用途には使用できません。危険性や安全な取り扱いに関しては化学物質安全データシート(MSDS)をご覧ください。

保存安定性

本キットは保冷剤と共に配送します。開封前のキットの保存温度は-20 °C を推奨します。開封後は、プロテアーゼインヒビターカクテル(哺乳類細胞・組織用)は-20 °C で、他のキット内容品は 2~8 °C で保存してください。

調製

溶解・分離ワーキング液の調製

溶解・分離バッファーは常に冷蔵するか氷上に置いてください。溶解・分離バッファーは使用前に混合してください。6 µL のプロテアーゼインヒビターカクテル(哺乳類細胞・組織用)を 600 µL の溶解・分離バッファーに加えて、溶解・分離バッファーワーキング液とします(使用当日に調製してください)。

溶解・分離ワーキング液および洗浄バッファーの改変

- 溶解・分離バッファーを洗浄バッファーで希釈(1:1)すると疎水相の量が少なくなるため、より濃度の高い疎水性タンパク質サンプルが得られます。溶解・分離バッファーを洗浄バッファーで希釈して調製した溶解・分離ワーキング液は、疎水相中のタンパク質の収率に重大な影響は及ぼしません。
- 溶解・分離バッファーおよび洗浄バッファーは 150 mM NaCl を含みます。疎水性タンパク質の中には、疎水相への抽出にさらに高い塩濃度を要求するものがあります。付属の 4 M NaCl 溶液を用いて、目的のタンパク質が必要とする濃度に NaCl 濃度を調整してください。

手順

この手順は $10^6 \sim 10^7$ 個の細胞からの抽出に適しています。これより多量の細胞を使用する場合または複数の抽出作業を並行して行う場合は手順を適宜調節してください。

A. 細胞の回収

接着細胞の場合はステップ 1a～3a が必要です。浮遊細胞の場合はステップ 3a から始めてください。

- 1a. 組織培養用容器から培地を吸引除去し、細胞を Dulbecco's PBS で洗浄します。
- 2a. 培養面積 1 cm^2 あたり 0.1 mL の 1 mM EDTA 含有 PBS を加えます。細胞が剥がれるまで静置します。または PBS を加えてセルスクレーパーで細胞をかき取ります。
- 3a. 細胞懸濁液を 15 mL コニカルチューブに移して $600 \times g$ で 5 分間遠心分離し、細胞を回収します。上清を吸引除去し、細胞ペレットを氷上に置きます。

B. 疎水性タンパク質と親水性タンパク質の分離

- 1b. 調製した溶解・分離ワーキング液(プロテアーゼインヒビターカクテルを含む)を使用前に混合します。 $10^6 \sim 10^7$ 個の細胞を $600 \mu\text{L}$ の氷冷した溶解・分離ワーキング液に再懸濁します。ピペッティングで静かに混和し、短時間ボルテックスします。懸濁液をマイクロ遠心チューブに移します。
- 2b. 細胞懸濁液を氷上で 10 分間静置します。
- 3b. ライセートを、あらかじめ冷却 (4°C) しておいたマイクロ遠心機にて $10,000 \times g$ で 5 分間遠心分離します。ライセート上清を新しいマイクロ遠心チューブに移します。分析用として、このライセート(総タンパク質画分)を $30 \sim 50 \mu\text{L}$ 分取しておくことができます。
- 4b. ライセートを 30°C で 3～5 分間インキュベートします。インキュベーション中に 1 回チューブを転倒混和します。ライセートはインキュベーション中に濁りを生じます。
注: 好ましいインキュベーション温度は 30°C ですが、 37°C までは加温可能です。

5b. チューブを室温のマイクロ遠心機にセットして $3,000 \times g$ で 3 分間遠心分離します。遠心機の温度は 20°C 以上としてください。遠心後のチューブは氷上に置かないでください。上層の親水相(親水性タンパク質を含む)を新しいマイクロ遠心チューブに移します。下層の疎水相には疎水性タンパク質およびラフト局在タンパク質が多量に含まれています。

6b. 疎水相を洗浄バッファーで洗うことで、疎水相に残存する親水性タンパク質を除去できます。その場合は $400 \mu\text{L}$ の洗浄バッファーを疎水相に加えます。静かに混和し、氷上で 10 分間静置します。その後、ステップ 4b と 5b を繰り返します。

C. 抽出後の用途

- 1c. SDS-PAGE電気泳動
親水相および疎水相のサンプルはそのままアクリルアミドゲル電気泳動に用いることができます。泳動先端の色素が拡散して見えることがありますが、最終的なタンパク質泳動パターンには影響しません。より高濃度のサンプルを得るために TCA でサンプルを沈殿させることもできます。各相に分離されたタンパク質を比較分析するには、ゲルにロードするサンプルを同量にすることをお勧めします。
- 2c. ドットプロット
特定のタンパク質の抽出状況を迅速に分析する目的で、 $1 \sim 2 \mu\text{L}$ のサンプルを用いてドットプロットを行うことができます。
- 3c. 免疫沈降
固定化抗体を加える前に、洗浄バッファーで疎水相を 10～12 倍に希釈し、抗体結合に適した状態としてください。
- 4c. その他の用途
低塩濃度を要する用途の場合は、サンプルを透析することができます。

Coomassie は Imperial Chemical Industries, PLC. の登録商標です。
Eppendorf は Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH の登録商標です。

PY,CMH,MAM 07/05-1

Sigma ブランド製品は Sigma-Aldrich, Inc.を通じて販売されています。

Sigma-Aldrich, Inc.は同社製品がこの文書およびその他の Sigma-Aldrich 発行文書に含まれる情報に合致していることを保証します。お客様の個別の用途と製品の適合性についてはお客様にてご判断ください。掲載の品目、製品情報、価格などは予告なく変更される場合がございます。納品伝票または同梱の内容明細書の裏面をご覧ください。