

■■■ 培養細胞のライセートの調製 ■■■

■ ウェスタンブロッティングないし免疫沈降などに利用するライセートの調製方法です。必ず氷の上で冷やしながら操作してください。

■ バッファーは二種類、Lysis buffer と RIPA buffer を示しました。免疫沈降には SDS が入っていない RIPA buffer が合います。SDS-PAGE によるウェスタンブロッティングに用いるだけであれば Lysis buffer を使います。

■ タンパク質分解酵素阻害剤 (protease inhibitor) の種類は、ライセートを用いるその後の実験により選択してください。また、脱リン酸化阻害剤、脱 SUMO 化阻害剤 (de-SUMOylation inhibitor) を実験に応じて選択します。

■ 以下に手順をお示ししますが、用いる機器、細胞、あるいは用いる試薬のロット等によって条件が異なる場合があります。

■ サンプルの調製

1. 細胞を 6-well プレートに培養する。
2. プレートを氷上に置き冷やしながら PBS (-) で 2 回洗う。
3. PBS (-) を除き、150 μ l の Lysis buffer または RIPA buffer を細胞にかける。
4. 氷の上で冷やしながらプレートをよく揺すり細胞をけん濁する。
5. 細胞とバッファーを 1.5 ml マイクロチューブに移す。
6. マイクロチューブを氷上で 15 分間冷やす。
7. 15,000 rpm、4°C、10 分の遠心により上清を分離

する。

8. 分離した上清を新しいチューブに分取し、-80°C に保存する。

■ 「どんな場合これが最適」というプロトコールはありません。培養細胞ライセートの調製に関してはネット上でも様々なプロトコールを入手することができます。ここに示した方法もその一つと考えてください。細胞の種類や量、培養の状態や用いる試薬に依存して操作の適切な条件は異なりますので、使用する試薬量やインキュベーション時間を変えて予備実験を行い、実験を個別に最適化する必要があります。また、「量の効果」、すなわち同じ濃度の試薬を使っても反応容量が違うために結果が異なること、がありますので、大量調製には注意が必要です。予備実験は本番と同じ反応容量で行うことが原則です。予備実験の 10 倍量が必要であれば、10 倍容量の 1 本の反応を行うのではなく、同一容量の 10 本の反応を行うことをお勧めします。(T.M.)

(Mail News 2006.09.21 掲載記事)

発行

理化学研究所・バイオリソースセンター

遺伝子材料開発室

dnabank@brc.riken.jp

<http://www.brc.riken.jp/lab/dna/ja/>

Reagents

<u>Lysis buffer</u>	final	<u>40 ml</u>
10% SDS	0.1%	0.4 ml
10% NP-40	1%	4.0 ml
sodium deoxycholate	0.5%	0.2 g
0.25 M EDTA, pH 8.0	1 mM	160 μ l
1 M tris, pH 7.8	50 mM	2.0 ml
5 M NaCl	150 mM	1.2 ml
inhibitor	<u>appropriate volume</u>	

<u>RIPA buffer</u>	final	<u>40 ml</u>
10% NP-40	1%	4.0 ml
sodium deoxycholate	0.25%	0.1 g
0.25 M EDTA, pH 8.0	1 mM	160 μ l
1 M tris, pH 7.8	50 mM	2.0 ml
5 M NaCl	150 mM	1.2 ml
inhibitor	<u>appropriate volume</u>	

<u>Protease inhibitor</u>	final	<u>40 ml</u>
100 mM PMSF	1 mM	0.4 ml
1 mg/ml leupeptin	1 μ g/ml	40 μ l
1 mg/ml pepstatin A	1 μ g/ml	40 μ l

<u>de-SUMOylation inhibitor</u>	final	<u>40 ml</u>
1 M NEM in ethanol	1 mM	40 μ l