



アッセイプロトコル

タンパク質抽出

創薬研究用ヒト腎細胞

3D-RPTEC[®]

日機装株式会社

はじめに

このたびは、3D-RPTEC[®]をお買い上げいただきありがとうございます。本稿は3D-RPTECのタンパク質抽出プロトコルの例を示したものになります。3D-RPTECを用いた評価のご参考になれば幸いです。

目次

1. 使用機器・試薬類.....	- 3 -
2. タンパク質回収量の目安.....	- 3 -
3. 実施方法	- 4 -
3-1. スフェロイドの回収.....	- 4 -
3-2. 膜タンパク質の抽出.....	- 5 -
3-2. 全タンパク質の抽出.....	- 5 -
4. 問い合わせ先.....	- 6 -

1. 使用機器・試薬類

以下にタンパク質抽出に必要な機器や試薬の一例を示しています。各施設での使用に合わせて適宜改変ください。

機材

製品名	製造販売	カタログ番号	規格/容量
細胞回収用遠沈管ステムフル*	住友ベークライト	MS-90150	15 mL
プロテオセーブ®SS マイクロチューブ 1.5 mL R	住友ベークライト	MS-4265M	1.5 mL チューブ

*：スフェロイドの紛失防止のため、低吸着タイプの遠沈管の使用を推奨しています。

試薬類

製品名	製造販売	カタログ番号	規格/容量
D-PBS(-)	富士フイルム和光 純薬	045-29795	500 mL
3D-RPTEC 専用培地	日機装株式会社	NCP03CM	100 mL
ProteoExtract® Native Membrane Protein Extraction Kit	Sigma Aldrich	444810	
炭酸水素アンモニウム	Thermo Scientific	A18566	500 g
デオキシコール酸ナトリウム一水和物	ナカライテスク株式会社	10712-54	5 g
N-ラウリルサルコシン ナトリウム塩	Sigma-Aldrich	814715	100 g
cOmplete™、EDTA フリー、プロテアーゼ阻害剤カクテル	Roche	05056489001	20 TABS

2. タンパク質抽出量の目安

全タンパク質と膜タンパク質の抽出目安を以下に示します。

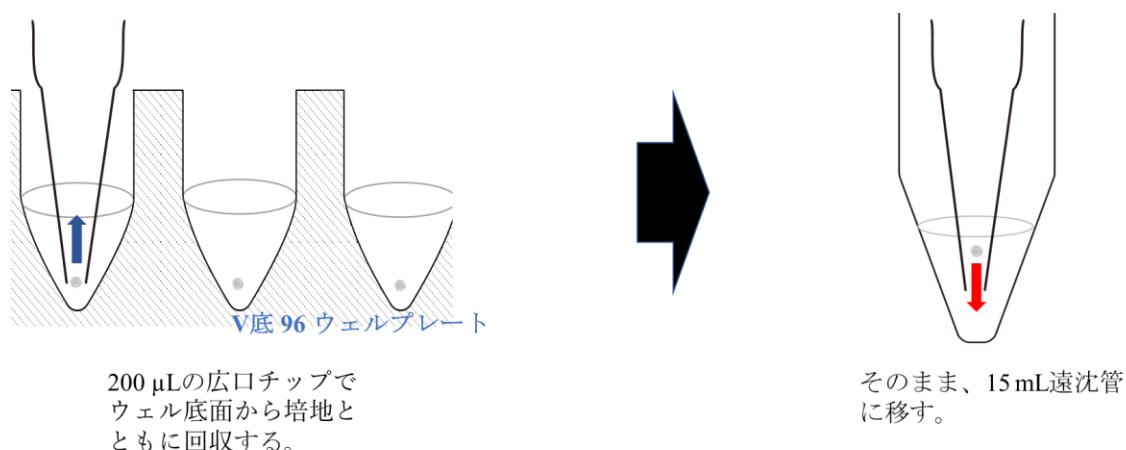
抽出対象	使用量	タンパク質抽出量*
全タンパク質	96 well プレート 1プレート分	20~50 µg
膜タンパク質	96 well プレート 1プレート分	2.0~5.0 µg

*：タンパク質抽出量は抽出の方法や精度によって変わるため、あくまで目安です。本プロトコルで示しますタンパク質抽出方法で実施いたしました。

一般的なプロテオーム解析には最低 10 μg 必要ですので、膜タンパク質でプロテオーム解析を実施される方は、複数枚での実施か 6 well プレート製品（製品名：3D-RPTEC 6well-Multi、製品番号：NCP04SP）の購入をお勧めしております。

3. 実施方法

3-1. スフェロイドの回収



1. 96 well プレートで培養中のスフェロイドを、以下の図を参考にして、広口チップなどで 15 mL チューブに回収してください。15 mL チューブは通常の遠沈管でも使用可能ですが、スフェロイドの紛失防止や回収率向上のため、低吸着タイプの遠沈管を使用することが望ましいです。
2. 測定に必要な細胞を回収後、遠心(160 g $\times$ 3 min)を行い、10 mL の PBS(-)で洗浄します。2 回繰り返し洗浄します。
3. 洗浄後、低吸着タイプの 1.5 mL チューブに細胞を移し、可能な限り PBS(-)を取り除いてください。
※細胞を移す際に、血清入りの培地(弊社の専用培地など)でチップをピペッティングしてコーティングすると、細胞のロスを防げます。
4. ここまで一旦終了する場合は、液体窒素で直接急速凍結を行い、-60°C以下の冷凍庫で保存します。
5. 膜タンパク質を抽出する場合は「3-2. 膜タンパク質の抽出」を参考に実施し、処理後は「3-3. 全タンパク質の抽出」を実施ください。
6. 全タンパク質の抽出を行う場合は「3-2.」をスキップし、「3-3.」から実施してください。

3-2. 膜タンパク質の抽出

1. 以下、「ProteoExtract® Native Membrane Protein Extraction Kit」を用いて、膜タンパク質の抽出を行います。詳細はキットのプロトコルをご参照ください。使用する試薬はキット内のものをご使用ください。
(参考文献：https://www.merckmillipore.com/JP/ja/product/ProteoExtract-Native-Membrane-Protein-Extraction-Kit,EMD_BIO-444810#documentation)
2. Extraction Buffer IとIIを氷上で保管し、Protease Inhibitor Cocktail（キット内にあり）は室温で静置を行います。
3. 細胞懸濁液を 500 μ L の氷上で冷やした Wash Buffer で細胞塊が残らないように懸濁し洗浄します。
4. 3-4 回洗浄した後、300 g、4°C、3 分間で遠心を行い、最終的には洗浄液が残らないように取りきります。
※もしこの段階で保存する場合は、液体窒素で直接凍らせ-60°C以下で保存を行います。
5. 5 μ L の Protease Inhibitor Cocktail を加え、すぐに 500 μ L の氷上で冷やした Extraction Buffer Iを加え、優しく細胞塊を崩すようにピペティングを行った後、10 分間、4°C で静置します。
6. 16,000 g、4°C、15 分間遠心を行います。
7. 細胞ペレットを崩さずに、上清を全て取り除きます。
8. 5 μ L の Protease Inhibitor Cocktail を加え、すぐに 100 μ L の氷上で冷やした Extraction Buffer IIを加えます。
9. 優しく細胞塊を崩すようにピペティングを行った後、30 分間 氷上でゆっくりインキュベートを行います。
10. 16,000 g、4°C、15 分間遠心を行います。
11. 上清を別のサンプルチューブに移し、残りを捨てます。
12. 同日中に使用する場合は氷上で保管し、同日中に使用しない場合は-60°C以下で保存します。

3-2. 全タンパク質の抽出

1. PTS 溶液（0.5 mM 炭酸水素アンモニウム、0.12 mM デオキシコール酸ナトリウム水和物、0.12 mM N-ラウリルサルコシン ナトリウム塩、cOmplete™-EDTA フリー-ブロッテアーゼ阻害剤カクテル）を調製します。ブロッテアーゼ阻害剤カクテルは 25 倍濃度のストック液から調製します。

※ PTS 溶液の液量および試料量はあくまで目安であり、これらの適正な量は研究目的によって異なります。

2. PTS 溶液を細胞数に応じた量 (1×10^5 cells で 100 μ L の PTS 溶液) を加え、ボルテックスした後、スピンドウンします。
3. 酵素類を失活させるため、95°C で 5 分間加温し、スピンドウンを行います。
4. BIORUPTER II などの超音波破碎機を用いて、ソニケーション(High 出力、30 秒、15 サイクルの設定)を行います。

※透明でさらさらになれば OK です。糸を引くようであれば再度ソニケーションを行ってください。

5. スピンドウンし、同日中に使用しない場合は-60°C以下で保存します。
6. BCA 測定などを行うことでタンパク質抽出量を算出できます。

4. 問い合わせ先

日機装株式会社

創薬研究用ヒト腎細胞お問い合わせアドレス

Mail: 3D-RPTEC@nikkiso.co.jp

HP: <https://www.nikkiso.co.jp/products/industrial/3drptec/>

