

コード No. 127-07101

《研究用試薬》

LysoPure™ Protein Extraction-PTS Solution

【製品情報】

コード No.	製品名	容量	保存条件
127-07101	LysoPure™ Protein Extraction-PTS Solution	5 mL	冷蔵

【概要】

本製品は、PTS 法（Phase Transfer Surfactant）を用いたプロテオミクス解析に用いる前処理用の試薬です。本試薬を用いることで、消化酵素の活性を阻害しない条件下で膜タンパク質を可溶化しつつ、酸性条件下で疎水性度があがり、液液分配で可溶化剤の除去が可能です。

また細胞外小胞（EV）研究におけるプロテオミクス解析の前処理用試薬として使用することも可能です。

【細胞からのタンパク質抽出を行う場合に本品以外に準備するもの（□: チェック欄）】

1. 試薬

細胞 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 細胞/本品 1 mL

2. 器材および試薬

遠心分離機器

遠心チューブ

1.5 mL マイクロ遠心チューブ

マイクロピペット

細胞洗浄液（PBS など）

細胞スクレーパー

ジチオスレイトール（DTT）

ヨードアセトアミド（IAA）

- トリプシン/Lys-C
- 酢酸エチル
- トリフルオロ酢酸 (TFA)
- プロテアーゼ阻害剤カクテル (必要に応じて)
- ホスファターゼ阻害剤カクテル (必要に応じて)
- 脱塩処理用ユニット

【MagCaptureTM Exosome Isolation Kit PS Ver.2で精製したEVからタンパク質抽出を行う場合に本品以外に準備するもの（□: チェック欄）】

1. 器材および試薬

- MagCaptureTM Exosome Isolation Kit PS Ver.2 (コード No. 294-84101, 290-84103)
 - 遠心チューブ
 - 1.5mL マイクロ遠心チューブ (MagCaptureTM Exosome Isolation Kit PS Ver.2に同梱されているものとは別)
 - マイクロピペット
 - 冷却式遠心分離機 (Max > 10,000×g)
 - ボルテックスミキサー
 - 卓上遠心機
 - 磁気スタンド
 - 回転式攪拌機 (ローター) またはチューブミキサー
 - 超音波破碎機
 - ボイラー (必要に応じて)
 - マイクロピペット
 - 15 mL 遠沈管 (必要に応じて)
 - 50 mL 遠沈管 (必要に応じて)
 - 精製水
 - TBS (必要に応じて)
 - ジチオスレイトール (DTT)
 - ヨードアセトアミド (IAA)
 - トリプシン/Lys-C
 - 酢酸エチル
 - トリフルオロ酢酸 (TFA)

- プロテアーゼ阻害剤カクテル（必要に応じて）
- ホスファターゼ阻害剤カクテル（必要に応じて）
- 脱塩処理用ユニット

【操作方法】

※使用する PTS 溶液量やその他処理条件などは適宜微調整してください。

A. 接着細胞 ($1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$) からのタンパク質抽出

- (1) 目的の細胞株を培養する。
- (2) 培養液を除いた後、氷冷した PBS (-) で2回洗浄を行う。
- (3) トリプシン-EDTA 溶液または細胞スクレーパーを用いて細胞をディッシュから剥がし、遠心チューブに細胞を回収する。トリプシン-EDTA 溶液を用いる場合には、細胞を剥がした後、血清入り培地などを加え、細胞へのダメージをできるだけ抑えるようにする。
- (4) 細胞懸濁液を4°C、1,000 rpm (200×g) で5分間遠心分離し、上清を除く。
- (5) 氷冷した PBS (-) 1 mL を添加し、細胞ペレットを懸濁後、1.5 mL マイクロ遠心チューブに移す。
- (6) 4°C、1,000 rpm (200×g) で5分間遠心分離し、上清を除く。
- (7) 氷冷した PBS (-) 1 mL を添加し、細胞ペレットを懸濁後、4°C、1,000 rpm (200×g) で5分間遠心分離し、上清を除く。

※膜タンパク質ではなく総タンパク質を解析したい場合は、上清を除かずに次のステップを実施してください。

- (8) PTS 溶液 1 mL を添加し、ピペッティングで細胞を懸濁する。
- (9) 氷上で試料溶液の粘性が下がるまで超音波処理を実施する。
- (10) 95°C、5分でボイルを実施する。

※必要に応じて、消化酵素の最適な添加量や、その後の質量分析計に導入するペプチド量を概算するためにタンパク質定量の工程を加えてください。一般的には、還元アルキル化前に BCA Assay を行います。

- (11) 10 mmol/L DTT で30分間還元し、55 mmol/L IAA で30分間アルキル化を実施する（室温）。
- (12) Lys-C/トリプシンでタンパク質を消化する。
- (13) 酢酸エチルと TFA を添加し、混合物を1分間振とうした後、遠心分離を実施する、酢酸エチル層（上層）を除去し、水層を解析用サンプルとする（MS 解析前に脱塩処理を行ってください）。

B. 浮遊細胞 ($1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$) からのタンパク質抽出

- (1) 目的の細胞種を培養する。
- (2) 細胞懸濁液を 4°C 、1,000 rpm (200×g) で5分間遠心分離し、上清（培地）を除く。
- (3) 〔操作方法〕 A. Step 5)～11)と同様。

C. MagCaptureTM Exosome Isolation Kit PS Ver.2で精製した EV からのタンパク質抽出

- (1) MagCaptureTM Exosome Isolation Kit PS Ver.2の現品説明書の「5. 細胞外小胞結合ビーズの洗浄」の6) 工程まで実施する。
※チューブ内壁に吸着しているものも一緒に回収されるため、こちらを回避したい場合は5) 工程で磁気ビーズ懸濁液を新しいチューブに移してから磁気スタンドを使用して上清を除去し、PTS 溶液添加工程に進んでください。
※オプションプロトコル：
磁気ビーズに直接吸着しているものも一緒に回収される可能性があるため、この点を懸念される場合は溶出した状態からの操作実施を推奨いたします。その場合は、MagCaptureTM Exosome Isolation Kit PS Ver.2の現品説明書の「6. 細胞外小胞の溶出」の4) 工程まで実施してください。
- (2) 細胞外小胞結合ビーズに PTS 溶液 50 ~ 100 μL を添加し、ボルテックスミキサーでよく懸濁する。卓上遠心機でスピンドダウンした後、 60°C で10分間インキュベートを行う。
※オプションプロトコルにて実施した場合は、溶出済細胞外小胞サンプル100 μL に PTS 溶 11 μL を添加し、ボルテックスでよく懸濁してください。
- (3) サンプルに10 mmol/L DTT で30分間還元し、20 mmol/L IAA で30分間アルキル化を実施する（室温/ 37°C ）。
- (4) Lys-C/トリプシンでタンパク質を消化する。
※添加量は BCA アッセイでタンパク質濃度を測定し、それに応じた量の酵素を添加ください。
- (5) 酢酸エチルと TFA 添加し、混合物を1分間振とうした後、遠心分離を実施する、酢酸エチル層（上層）を除去し、水層を解析用サンプルとする（MS 解析前に脱塩処理を行ってください）。