

## Product Information

## CelLytic™ MT

哺乳類組織溶解/抽出用試薬

製品番号 C3228

室温で保存してください。

## TECHNICAL BULLETIN(使用説明書)

## 製品概要

細胞タンパク質を抽出するには効率よく細胞を溶解してタンパク質を可溶化する必要がありますが、一方、タンパク質の分解や試薬によるタンパク質の免疫反応性や生物学的活性への干渉は避けなければなりません。

CelLytic™ MT 哺乳類組織溶解/抽出用試薬は分析用の組織タンパク質を効率よく抽出します。溶解バッファーは、透析除去可能な弱い少量の界面活性剤(タンパク質の相互作用や生物学的活性への干渉は最小に抑えられています)、ピシン(生物学的活性の評価に適したバッファー成分)、150 mM NaCl で構成されています。CelLytic MT は、溶解バッファーに高い塩濃度が必要な細胞株のタンパク質を効率よく抽出するためにも利用できます。溶解バッファーが高塩濃度でなくてよい細胞の場合は、CelLytic M(製品番号 C2978)をご利用ください。

CelLytic MT による抽出物は、レポーター遺伝子発現アッセイ( $\beta$ -gal, CAT, アルカリホスファターゼ)、イムノアッセイ(ウェスタンブロット、免疫沈降、ELISA)、キナーゼアッセイ(PKC、チロシンキナーゼ)、ホスファターゼアッセイ(一般的なホスファターゼ、チロシンホスファターゼ)などに使用できます。本製品は Coomassie® Blue 染色および銀染色に適合しています。タンパク質を含むライセートは DNA-タンパク質間相互作用アッセイ(ゲルシフトアッセイ)にも使用できます。

CelLytic MT 試薬は、ラット(脳、肝臓、筋肉、腎臓、心臓、脾臓)およびマウス(脳、腎臓、筋肉)の組織からのタンパク質抽出に使用されてきました。

用途によっては、細胞溶解プロセスを 4 °C で実施したり、特定の物質を加えたりすることが好結果をもたらすかもしれません。添加できる物質の例としては、プロテアーゼまたはホスファターゼに対するインヒビターカクテル、還元剤、キレート剤、塩類などがあります(塩類はイムノアッセイの結果を改善したり核タンパク質の抽出効率を高めたりすることがあります)。

## 試薬

CelLytic MT 試薬は組織 2.5 g 用(50 mL)と組織 25 g 用(500 mL)があります。

本製品以外にご用意いただく試薬および器具  
(製品番号を適宜付記しております)

- プロテアーゼインヒビターカクテル、製品番号 P8340
- 試験管
- シューカー
- ホモジナイザー
- マイクロ遠心分離機(Eppendorf® 5417R 型機、製品番号 Z36,601-3 または Z36,602-1、または同等品)
- Dulbecco リン酸緩衝食塩水(DPBS)、製品番号 D8537

## ご使用前の注意と免責事項

Sigma の CelLytic MT 哺乳類組織溶解/抽出用試薬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。

## 手順

## A. 組織タンパク質の抽出

この手順では、組織と CelLytic MT 試薬の比率は 1:20 (組織 1 グラムに対して試薬 20 mL)とすることを推奨しています。濃いライセートが必要な場合は、CelLytic MT 試薬の量を減らして組織溶解を行うこともできます。CelLytic MT 試薬にはプロテアーゼインヒビターカクテルを加えることができます。

1. 組織サンプルの重さを量ります。
2. 適切な量の CelLytic MT 試薬を組織サンプルに加えます。
3. あらかじめ冷却しておいたマイクロホモジナイザーにサンプル(溶解/抽出用試薬を加えたもの)を移し、組織をホモジナイズします。標的タンパク質の機能的な完全性に関して、ホモジナイズ手順は重大な意味をもっているということに注意してください。

4. 溶解処理後のサンプルを  $12,000\sim 20,000 \times g$  で 10 分間遠心分離し、組織破片を沈殿させます。
5. タンパク質を含む上清を冷却した試験管に移します。

注：ライセートの保存は低温で行う必要があります。ライセートを長期保存する際は  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存をお勧めします。

## B. 細胞タンパク質の抽出

細胞に加える CellLytic MT 試薬の量は、細胞の量および必要なタンパク質濃度によって異なります。一般的には、 $10^6\sim 10^7$  個の細胞に対して  $125\ \mu\text{L}$  の CellLytic MT を加えるようお勧めします。接着細胞の場合、培養プレートの大さきによってプレート表面を覆う試薬の必要量が決まります。直径  $100\ \text{mm}$  のプレートなら 1 枚あたり  $500\sim 1000\ \mu\text{L}$ 、 $35\ \text{mm}$  のプレートなら  $200\sim 400\ \mu\text{L}$  を使用します。

1. 細胞を洗浄して以下のように溶解処理します。
  - a. 接着細胞の場合：  
アッセイ対象の細胞から培地を除去します。細胞が剥がれないよう注意しながら DPBS で細胞を 1 回洗います。DPBS を捨てます。適切な量の CellLytic MT 試薬を加えて細胞を溶解します。
  - b. 浮遊細胞の場合：  
適切な遠心チューブに細胞を回収します。 $450 \times g$  で 5 分間遠心分離します。デカントして上清を捨てます。細胞を DPBS で洗浄し、 $450 \times g$  で 5 分間遠心分離します。デカントして上清を捨てます。CellLytic MT 試薬に細胞ペレットを再懸濁します。

2. シェーカーで 15 分間振盪します。
3. 細胞ライセートを回収します。
  - a. 接着細胞の場合：細胞をプレートから回収します（細胞をかき集めると総タンパク質の収率が向上することがあります）。
  - b. 浮遊細胞の場合：ステップ 4 に進みます。
4. 溶解した細胞を  $12,000\sim 20,000 \times g$  で 10 分間遠心分離し、細胞破片を沈殿させます。
5. タンパク質を含む上清を冷却した試験管に移します。

注：ライセートの保存は低温で行う必要があります。ライセートを長期保存する際は  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存をお勧めします。

## 関連製品

- CellLytic B (細菌細胞溶解/抽出用試薬)、製品番号 B7435
- CellLytic B II (細菌細胞溶解/抽出用試薬)、製品番号 B7310
- CellLytic M (哺乳類細胞溶解/抽出用試薬)、製品番号 C2978
- Mammalian Cell Lysis Kit (哺乳類細胞溶解キット)、製品番号 MCL-1
- NuClear Protein Extraction Kit (核タンパク質抽出キット)、製品番号 N-XTRACT

CellLytic は Sigma-Aldrich Co. および Sigma-Aldrich Biotechnology LP の商標です。

Coomassie は ICI PLC の登録商標です。

Eppendorf は Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH の登録商標です。

JWM/KMR/MAM 11/03

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。