

# 下位ペプチドの TGR5 活性評価

## 1 起眠

1. 凍結バイアルを保管容器から取り出し、37°C の恒温槽で溶解する。

**注意** 液体窒素から出してすぐ蓋を少し開け、ショックとなったらすぐ閉める。

**注意** 完全解凍してはいけない。米粒くらい残っている状態で高温層から出し、あとは常温解凍。

2. GM5mLを入れた 15mL 遠沈管にバイアルの中身を移す。

3. 1000rpm で 4 分遠心し、上清を除去する。

4. ペレット ( $1.0 \times 10^5$  cells) を 1mL の GM で懸濁する。

5. GM 4mLを入れた 60mmdish に 1mL を播種する。

**注意** 播きムラができないように、傾けて十分ピペッティングをしてから水平にする。

**注意** その後、縦横に dish を振る。

6. 37°C, 5%CO<sub>2</sub> インキュベーターで培養を開始する。

## 2 繼代

1. 2 日間培養後、壁面から GM を除去する。

2. 壁面から PBS3mL で 2 度洗浄する。

3. 0.05% トリプシン/EDTA0.5mL を加える。

4. 37°C, 5%CO<sub>2</sub> インキュベーターで 1 分静置する。

5. GM3mL を加え、dish を傾けながら細胞が剥がれるように 2 度洗い流す。

6. 15mL 遠沈管に全てを回収する。

7. 1000rpm で 4 分遠心し、上清を除去する。

8. 新しい GM2mL を加え、ペレットを懸濁する。

9. トリパンブルー色素排除染色法により、セルカウントを行う。

10. 100mmdish に、 $8.0 \times 10^5$  cells/dish になるように撒く。

11. 37°C, 5%CO<sub>2</sub> インキュベーターで培養を開始する。

## 3 繼代

1. 3 日間培養後、壁面から GM を除去する。

2. 壁面から PBS5mL で 2 度洗浄する。

3. 0.05% トリプシン/EDTA1mL を加える。

4. 37°C, 5%CO<sub>2</sub> インキュベーターで 1 分静置する。

5. GM5mL を加え、dish を傾けながら細胞が剥がれるように 2 度洗い流す。

6. 15mL 遠沈管に全てを回収する。

7. 1000rpm で 5 分遠心し、上清を除去する。

8. 新しいGM5mLを加え、ペレットを懸濁する。
9. トリパンブルー色素排除染色法により、セルカウントを行う。
10. 60mm dishに、 $1.2 \times 10^6$  cells/dishになるように撒く。
11. 37°C, 5%CO<sub>2</sub> インキュベーターで培養を開始する。

## 4 トランスフェクション

### 4.1 1日目

1. Opti-MEMを51.25mL分注する。
2. エッペンに、表1の溶液1を調整し、5分間静置する。

表1: トランスフェクション用の溶液調整(5dish分)

| 試薬名                             | 溶液1   | 溶液2   |
|---------------------------------|---|---|
| Opti-MEM                        | $500\mu\text{M} + 50\mu\text{L} \times 5 = 2750\mu\text{L}$ | $500\mu\text{M} \times 5 = 2500\mu\text{L}$ |
| 各プラスミド溶液(hTGR5, CRE-luc, β-gal) | -   | $2.5\mu\text{L} \times 5 = 12.5\mu\text{L}$ |
| Lipofectamine 3000 Reagent      | $7.5\mu\text{L} + 0.75\text{L} \times 5 = 41.25\mu\text{L}$ | -   |
| P3000 Reagent                   | -   | $15\mu\text{L} \times 5 = 75\mu\text{L}$    |

3. 5分間静置している間、溶液2をエッペンに調整
4. 5分後に溶液1を溶液2に1:1で添加し、優しくピペッティングして室温で20分間静置する。  
**注意** ここからのピペッティングは優しく行う。
5. 20分後、溶液1, 2混合溶液をOpti-MEM(37°C)で5倍量に希釈することで、DNA-Lipofectamine複合液とする。
6. 成長培地を除去し、Opti-MEM(37°C)5mLを細胞が剥がれないように壁面に沿って穏やかに添加する。
7. Opti-MEMを除去し、DNA-Lipofectamine複合液を5mLを60mm dishの壁面に沿って穏やかに添加する。
8. 37°C, 5%, CO<sub>2</sub> インキュベーターで24時間インキュベートする。

### 4.2 2日目

1. 成長培地に交換し、37°C, 5%, CO<sub>2</sub> インキュベーターで4時間インキュベートする。  
**注意** 培地を除去するときには優しくピペットマンで行うこと。
2. 壁面からGMを除去する。
3. 壁面からPBS3mLで2度洗浄する。
4. 0.05%トリプシン/EDTA0.5mLを加える。
5. 37°C, 5%CO<sub>2</sub> インキュベーターで1分静置する。
6. GM3mLを加え、dishを傾けながら細胞が剥がれるように2度洗い流す。
7. 15mL遠沈管に全てを回収する。
8. 1000rpmで4分遠心し、上清を除去する。

9. 新しい GM2mL を加え、ペレットを懸濁する。
10. トリパンブルー色素排除染色法により、セルカウントを行う。
11. 24well plate に、 $3.0 \times 10^5$  cells/well になるように撒く。

## 5 DCA, ペプチド添加

1. 表 2 のように、溶液を調整する。

表 2: トランスフェクション用の溶液調整 (4dish 分)

|          | $4\mu\text{L}$ DCA | ペプチド溶出液         | GM               |
|----------|--------------------|-----------------|------------------|
| control  | -                  | -               | $500\mu\text{L}$ |
| DCA only | $250\mu\text{L}$   | -               | $250\mu\text{L}$ |
| ペプチド添加   | -                  | $50\mu\text{L}$ | $500\mu\text{L}$ |

2. 成長培地を除去し、表 3, 4 に従って、サンプル入り培地を 24well plate の壁面に沿って穏やかに添加する。

表 3: 24well plate へのサンプル入り培地の添加

|         |          |     |     |     |     |
|---------|----------|-----|-----|-----|-----|
| control | DCA only | FRT | TRT | FDT | FNT |
| control | DCA only | FRT | TRT | FDT | FNT |
| control | DCA only | FRT | TRT | FDT | FNT |
|         |          |     |     |     |     |

表 4: 24well plate へのサンプル入り培地の添加

|     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| FQT | PET | PHT | FST | FET | PFT |
| FQT | PET | PHT | FST | FET | PFT |
| FQT | PET | PHT | FST | FET | PFT |
|     |     |     |     |     |     |

3.  $37^\circ\text{C}, 5\%, \text{CO}_2$  インキュベーターで 2 時間インキュベートする。
4.  $5\times$ Lysis buffer を純粋で希釈して、 $1\times$ Lysis buffer に調整する。
5. PBS $250\mu\text{L}$  で 2 回 wash する。
6.  $1\times$ Lysis buffer を  $100\mu\text{L}/\text{well}$  で添加する。
- 注意  $\beta$ -gal アッセイで使用するので捨てないこと。
7. 遠心機を  $4^\circ\text{C}$  に冷やす。
8. 620 の振盪機で 15 分間振盪する。
9. 各ウェルの溶液を水上の 1.5mL マイクロチューブに回収する。
10. 氷冷して超音波洗浄機で 5 分間超音波をかけることで、細胞を完全に破碎する。
11. 10 秒間ボルテックスし、 $4^\circ\text{C}13000\text{g}$  で 10 分間遠心分離する。

12. ここで得られた上清を別の 1.5mL マイクロチューブに 50 $\mu$ L ずつ回収する。

## 6 アッセイ

### 6.1 ホタルルシフェラーゼアッセイ

1. アシストチューブ内で Lusiferase Assay Reagent 50 $\mu$ L と cell lysate 10 $\mu$ L を混合する。

**注意** 予め冷蔵庫で溶かしておくと良い。

2. 5 秒間ボルテックスする。

3. シングルチューブルミノメーターで発光測定する。

### 6.2 $\beta$ -gal アッセイ

1. 1M MgCl<sub>2</sub> 20 $\mu$ L, 2-メルカプトエタノール 63 $\mu$ L, 純水 117 $\mu$ L を混合することにより 100 × Mg Sol. を作成する。

2. 0.1M リン酸ナトリウムバッファー : 1×OPNG : 100 × Mg Sol. = 67 : 22 : 1 の割合で混合することで、 $\beta$ gal Substrate Reagent を調整する。

3. 氷冷した 96well プレート上で、cell lysate 10 $\mu$ L と  $\beta$ gal Substrate Reagent 90 $\mu$ L を混合し、37°C で 2 時間インキュベートする。

**注意** ブランクとして、cell lysate の代わりに 1× lysis buffer 10 $\mu$ L を混合したものも用意する。

4. 2 時間後、吸光プレートリーダー epoch2 を用いて 415nm での吸光波長を測定する。

5. 式 1 を用いて、Luc activity を算出する。

$$\text{Luc activity}(/ \beta\text{-gal}) = \frac{\text{Luc activity}}{\beta\text{-gal activity}} \quad (1)$$