

上位ペプチドの 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、37C° 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 (1.0×10^5 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%CO₂ 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%CO₂ 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、 8.0×10^5 cells/dish になるように撒く。

11. 37°C,5%CO₂ 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%CO₂ 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、 1.2×10^6 cells/dishになるように撒く。
11. 37°C, 5%CO₂ 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を必要量分注する。
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(4dish分)

試薬名	溶液1	溶液2
Opti-MEM	$500\mu\text{M} + 50\mu\text{L} \times 4 = 2200\mu\text{L}$	$500\mu\text{M} \times 4 = 2000\mu\text{L}$
各プラスミド溶液(hTGR5, CRE-luc, β-gal)	-	$2.5\mu\text{L} \times 4 = 10\mu\text{L}$
Lipofectamine 3000 Reagent	$7.5\mu\text{L} + 0.75\mu\text{L} \times 4 = 33\mu\text{L}$	-
P3000 Reagent	-	$15\mu\text{L} \times 4 = 60\mu\text{L}$

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%, CO₂ 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%, CO₂ 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%CO₂ 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、 4.0×10^5 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	PPL	PPD	PPH	PPV
control	DCA only	PPL	PPD	PPH	PPV
control	DCA only	PPL	PPD	PPH	PPV

表 4: 24well plate へのサンプル入り培地の添加

PPA	PPI	PPN	PPM	PPQ	PPC
PPA	PPI	PPN	PPM	PPQ	PPC
PPA	PPI	PPN	PPM	PPQ	PPC

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 β -gal アッセイで使用するので捨てないこと。
7. 遠心機を 4°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 μ 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 μ L と cell lysate 10 μ 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 β -gal アッセイ

1. 1M MgCl₂ 20 μ L, 2-メルカプトエタノール 63 μ L, 純水 117 μ 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、 β gal Substrate Reagent を調整する。

3. 氷冷した 96well プレート上で、cell lysate 10 μ L と β gal Substrate Reagent 90 μ 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 μ 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。

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