

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、シュッとに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 継代

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 継代

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。

- 新しい GM5mL を加え、ペレットを懸濁する。
- 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。
- 60mmdish に、 1.2×10^6 cells/dish になるように撒く。
- 37°C , 5% CO_2 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

- Opti-MEM を 51.25mL 分注する。
- 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	-	$15\mu\text{L} \times 5 = 75\mu\text{L}$

- 5 分間静置している間、溶液 2 をエッペンに調整
- 5 分後に溶液 1 を溶液 2 に 1:1 で添加し、優しくピペティングして室温で 20 分間静置する。
注意 ここからのピペティングは優しく行う。
- 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。
- 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。
- 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。
- 37°C , 5%, CO_2 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

- 成長培地に交換し、 37°C , 5%, CO_2 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。
- 壁面から GM を除去する。
- 壁面から PBS3mL で 2 度洗浄する。
- 0.05% トリプシン/EDTA0.5mL を加える。
- 37°C , 5% CO_2 インキュベーターで 1 分静置する。
- 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。
- 15mL 遠沈管に全てを回収する。
- 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、 3.0×10^5 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 μ L DCA	ペプチド溶出液	GM
control	-	-	500 μ L
DCA only	250 μ L	-	250 μ L
ペプチド添加	-	50 μ L	500 μ 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°C, 5%, CO₂ 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. PBS250 μ L で 2 回 wash する。
6. 1 \times Lysis buffer を 100 μ L/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. 各ウェルの溶液を氷上の 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°C13000g 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 Luciferase 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和良好的。

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 \times Mg Sol. を作成する。
2. 0.1M リン酸ナトリウムバッファー : 1 \times OPNG : 100 \times 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 \times 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。

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