

商品名: UltraRIPA kit for Lipid Raft
商品コード: F015

<キット構成>

A バッファー (RIPA バッファー) 100 mL
B バッファー 10 mL

<保存条件>

4°C (品質保持期間: 製品受け取り後 1 年)

<製品紹介>

RIPA (Radio-ImmunoPrecipitation Assay) バッファーは、最も汎用される組織・細胞溶解バッファーの一つです。ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) を含むバッファーは優れた可溶化能を有する一方でタンパク質の構造を破壊するのに対し、RIPA バッファーはタンパク質変性作用が小さく多くのタンパク質機能を維持するため、様々なアプリケーションに応用することができます。しかし、RIPA バッファーでは一部の膜タンパク質が溶け残り、SDS バッファーのように完全に細胞・組織を可溶化することはできません (図 1)。

脂質ラフト (Lipid raft) は、スフィンゴミエリンなどの特殊な脂質、コレステロール、機能性タンパク質を含む脂質二重層における高度に機能化されたマイクロドメインです。神経細胞におけるシナプス、免疫細胞における免疫シナプス、上皮細胞におけるタイトジャンクション、接着細胞における接着斑などが脂質ラフトの代表的な例です。これら脂質ラフトは界面活性剤不溶性膜画分 (Detergent resistant membrane (DRM)) と呼ばれることもあり、脂質ラフトに含まれるタンパク質の多くは 1% Triton X100 や RIPA バッファーのような温和な界面活性剤バッファーへは通常溶解が困難とされています。

UltraRIPA kit は 2 種類の界面活性剤含有バッファーで構成されており、脂質ラフトに含まれる膜タンパク質/膜構成タンパク質を、変性作用の小さい条件下で、効率的かつ迅速に抽出することができます。UltraRIPA kit は、タンパク質変性作用の小さいバッファーでありながら、RIPA バッファーでは抽出が困難であった DRM 中のタンパク質を効率的に抽出することができます。UltraRIPA kit で抽出した脂質ラフトタンパク質は、酵素活性測定アッセイやタンパク質間相互作用解析 (免疫沈降などの結合実験) など、様々な生物学的アッセイに用いることができます。

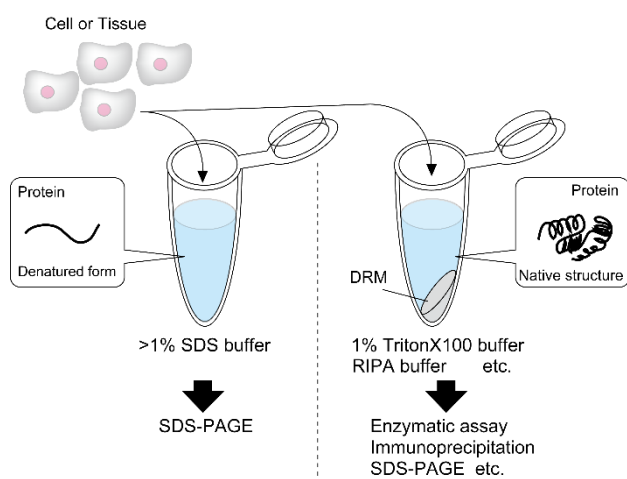


図 1: 界面活性剤不溶性膜画分(DRM)のイメージ

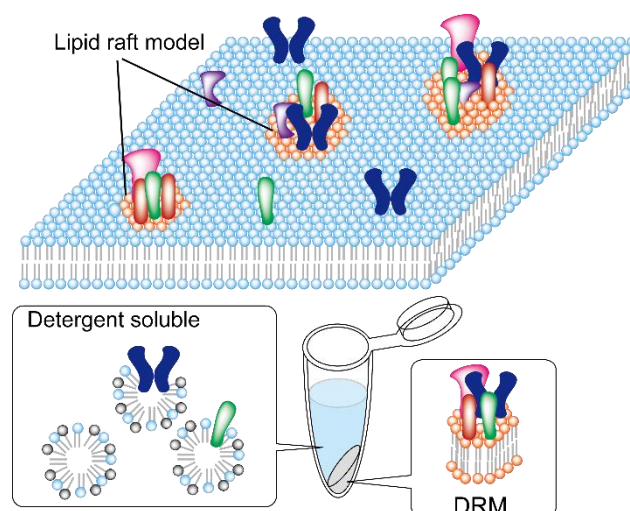


図 2: 脂質ラフトと DRM

<UltraRIPA kit の概要>

UltraRIPA kit は DRM に含まれるタンパク質を 2-ステップで抽出します。まず初めに、培養細胞もしくは組織を A バッファー（従来の RIPA バッファー(50 mM Tris-HCl (pH8.0), 150 mM NaCl, 1% NP-40 alternative, 0.1% SDS and 0.5% sodium deoxycholate)）で溶解し、RIPA 不溶性画分を精製します。続いて付属の B バッファーにより RIPA 不溶性画分から脂質ラフトタンパク質を含む DRM タンパク質を抽出します。A バッファー抽出物、B バッファー抽出物とも様々な用途にご利用いただけます。

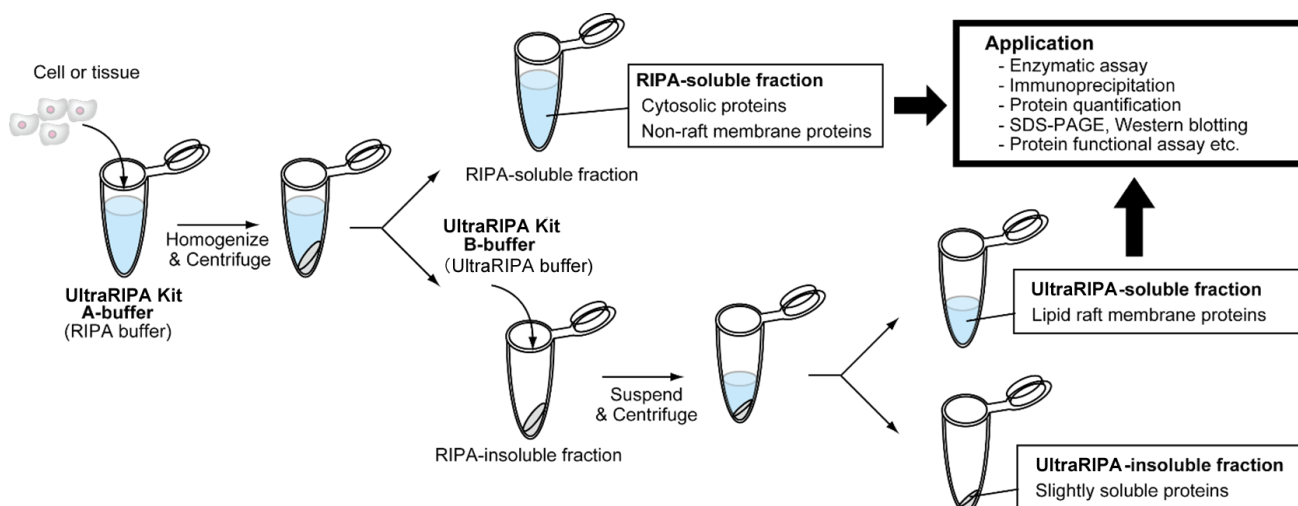


図 3: UltraRIPA kit のプロトコール概要

表: UltraRIPA kit の利点

	タンパク質抽出			タンパク質 構造	タンパク質 機能	アプリケーション
	細胞質	細胞膜				
		非脂質ラフト	脂質ラフト			
>1%SDS buffer	○	○	○	×	×	SDS-PAGE
RIPA buffer	○	○	×	○	○	酵素活性アッセイ
UltraRIPA	○	○	○	○	○	免疫沈降などの結合実験 SDS-PAGE など

<注意>

- ・A バッファーおよび B バッファーは界面活性剤を含むため Bradford アッセイにはご使用いただけません。
- ・タンパク質濃度測定を行う場合には BCA タンパク質アッセイにて行ってください。
- ・必要に応じて、B バッファーに含まれる界面活性剤は一般的な透析処理により簡単に除去することができます。
(ただし、透析により抽出した膜タンパク質が凝集する可能性がありますので目的タンパク質での検討が必要です)。

<実験方法>

*ご使用の前に

- A および B バッファーにはプロテアーゼ阻害剤は含まれておりません。必要に応じてプロテアーゼ阻害剤を加えてください。
- B バッファーは 4℃保存品ですが、室温に戻してからご使用ください。冷却した B バッファーを抽出に用いた場合、抽出効率が低下する可能性があります。

○哺乳動物組織サンプルを用いる場合の手順

1. 組織サンプルに冷却した A バッファーを適量加えます（終濃度：1-10 mg/ml 総タンパク質が目安）。
2. ダウンス型ホモジナイザーおよび超音波破碎装置により組織をよく破碎します。
*組織の破碎が不十分であると未破碎の組織片や細胞核が RIPA 不溶性画分に残留する可能性があります。超音波破碎装置による十分な破碎を推奨しています。
3. 組織ライセートを 0.5 もしくは 1.5ml チューブに移します。
4. 10,000 xg 以上で 5 分間遠心します。
5. 上清を新しいチューブに移します。……………RIPA 可溶性画分
6. 洗浄のため残ったペレット(RIPA 不溶性画分)に冷却した A バッファーを 0.5 ml 加え、ピペッティングやボルテックスにより十分に再懸濁させます。
7. 10,000 xg 以上で 5 分間遠心します。
8. 上清を除去します。
9. ペレット(RIPA 不溶性画分)に室温に戻した B バッファーを 50-200 μ l 加えます。そしてピペッティングやボルテックスにより十分に再懸濁させます。(氷上での超音波破碎でも可能です。)
10. 室温にて 5 分間インキュベーションします。
11. 10,000 xg 以上で 5 分間遠心します。
12. 上清を新しいチューブに移します。……………UltraRIPA 可溶性画分

○哺乳動物培養細胞サンプルを用いる場合の手順(接着細胞と浮遊細胞どちらも可)

1. ディッシュから培地を除去し、細胞を PBS で洗浄します。
2. 冷却した A バッファーを適量加え(例: 6 well ($\sim 10^6$ cells)では 1ml、12 well ($\sim 5 \times 10^5$ cells)では 0.5 ml)、ピペッティングおよび超音波破碎したのち、氷上にて 10 分間インキュベートします。
*細胞の破碎が不十分であると未破碎の細胞塊や細胞核が RIPA 不溶性画分に残留する可能性があります。超音波破碎装置による十分な破碎を推奨しています。
3. ライセートを 0.5 もしくは 1.5ml チューブに移します。
4. 10,000 xg 以上で 5 分間遠心します。
5. 上清を新しいチューブに移します。……………RIPA 可溶性画分
6. 洗浄のため残ったペレット(RIPA 不溶性画分)に冷却した A バッファーを 0.5 ml 加え、ピペッティングやボルテックスにより十分に再懸濁させます。
7. 10,000 xg 以上で 5 分間遠心します。
8. 上清を除去します。
9. ペレット(RIPA 不溶性画分)に室温に戻した B バッファーを 50-200 μ l 加え、ピペッティングやボルテックスにより十分に再懸濁させます。(氷上での超音波破碎でも可能です。)
10. 室温にて 5 分間インキュベーションします。
11. 10,000 xg 以上で 5 分間遠心します。
12. 上清を新しいチューブに移します。……………UltraRIPA 可溶性画分

<トラブルシューティング>

トラブル	考えられる原因	解決方法
RIPA 不溶性画分が低収率	タンパク量が少ない	用いる細胞もしくは組織を多くする
タンパク質濃度が低い	バッファー量が過剰	使用するバッファー量を少なくする
タンパク質が分解している	プロテアーゼ阻害剤を添加していない	使用前に両方のバッファーへ適当なプロテアーゼ阻害剤を加える

＜実験結果＞

－ RIPA 不溶性画分からの脂質ラフトタンパク質の抽出

マウス全脳組織に UltraRIPA kit の A バッファーを添加し、ダウンス型ホモジナイザーと超音波破碎装置により破碎した。全脳ライセートを遠心分離後、上清 (RIPA 可溶性画分) を除去した後、ペレット (RIPA 不溶性画分) を A バッファーで洗浄した。次いで B バッファーで再懸濁し、ULTRARIPA 可溶性画分を得た。なお、RIPA 不溶性画分に 2% SDS または RIPA バッファーを添加したサンプルも用意し、それぞれポジティブコントロール、ネガティブコントロールとした。RIPA 不溶性画分から各バッファーで抽出されたタンパク質を、BCA タンパク質アッセイおよび脂質ラフトマーカーに対する特異的抗体を用いたウエスタンブロットティングにより分析した (図 4)。

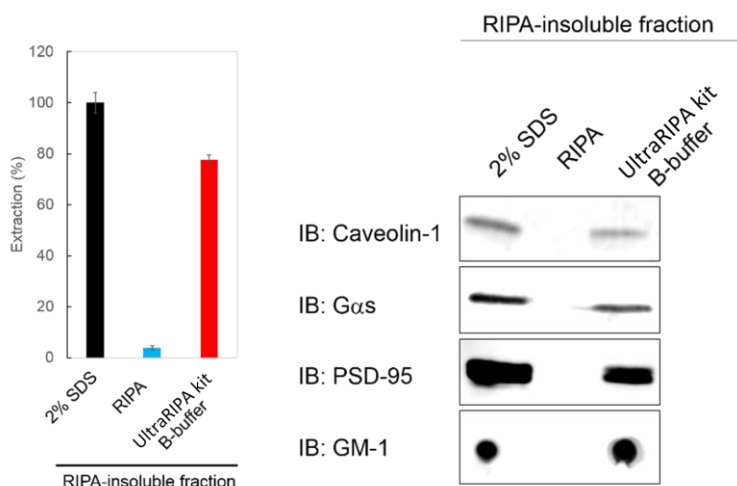


図 4: UltraRIPA kit による RIPA 不溶性画分の抽出

- 左: BCA タンパク質アッセイによる抽出された総タンパク量の定量。RIPA 不溶性画分から 2%SDS バッファーにより抽出されたタンパク質量を 100%としたとき、UltraRIPA kit は約 70%の RIPA 不溶性タンパク質を抽出できた。
- 右: 脂質ラフトマーカーのウエスタンブロットティング。RIPA 不溶性画分から脂質ラフトマーカーの抽出が確認できた。

－ 酵素的アッセイの例: タンパク質脱リン酸化酵素の総活性

マウス全脳 RIPA 不溶性画分から各バッファー (UltraRIPA kit B バッファー、RIPA バッファーもしくは 2%SDS バッファー) でタンパク質抽出を行い、それぞれタンパク質脱リン酸化酵素活性をアッセイキット (AnaSpec, #AS-71105) により測定した。2% SDS バッファーではタンパク質をほぼ完全に抽出できたが、SDS の変性作用により脱リン酸化酵素活性はほとんど認められなかった。一方、UltraRIPA kit では、2% SDS バッファーに比べてタンパク質抽出量は低いものの、タンパク質の脱リン酸化活性を検出できた (図 5)。

この結果より、UltraRIPA kit は、様々な脂質ラフトタンパク質の「未知の酵素活性」を解析するための有用なツールとして利用できる。

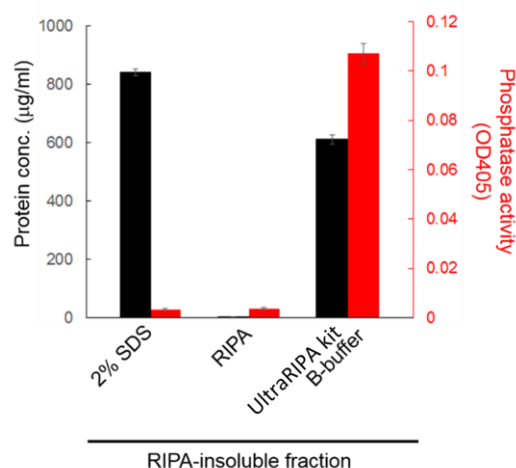


図 5: UltraRIPA kit 抽出物中のタンパク質脱リン酸化酵素活性 (総活性)
 Black: タンパク質濃度
 Red: タンパク質脱リン酸化酵素活性