

Product Information

CellLytic™ Y

酵母細胞溶解/抽出用試薬

製品番号 C4482

室温で保存してください。

TECHNICAL BULLETIN(使用説明書)

製品概要

酵母細胞には強固な細胞壁があるため溶解が困難です。酵母タンパク質の抽出は一般に、機械的手法(4℃でのガラスビーズ破碎法)や酵素処理、タンパク質の失活をもたらすような過酷な条件(pH、温度、クロロホルム)での処理といった簡便でない方法で行われています。

CellLytic™ Y 試薬は、タンパク質の分解およびタンパク質の免疫反応性・生物学的活性への干渉を防ぎつつ、効率よく細胞を溶解してタンパク質を可溶化します。

CellLytic Y 試薬による処理は、標準的な細胞溶解条件(弱い界面活性剤を使用、pH 8)の下で短時間(20~30分間)室温にて行われるものであり、他の手法では必要とされる過酷な条件やガラスビーズを使う必要はありません。

CellLytic Y は新鮮な酵母細胞と凍結した酵母細胞のどちらからもタンパク質を抽出できます。本製品による細胞抽出物は以下の用途に使用できます。

- レポーター遺伝子発現アッセイ(例: β-ガラクトシダーゼ、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)
- アフィニティー精製(FLAG、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)、ヒスチジンタグ融合タンパク質)
- DNA-タンパク質間相互作用アッセイ(ゲルシフトアッセイ)
- 泳動ゲルの Coomassie® Blue 染色および銀染色
- リン酸基が反応に関与するアッセイ(アルカリホスファターゼアッセイ、一般的なホスファターゼアッセイ)

用途によっては、細胞溶解プロセスを4℃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、種々の塩類などがあります。

CellLytic Y 試薬のタンパク質抽出効率は *Saccharomyces cerevisiae* の種々の菌株 [Y187, Y190, W303(a), S288C, SP1, Σ1278b(二倍体および一倍体), BJ2168, cdc25] および *Schizosaccharomyces pombe* でテストされました。

試薬

CellLytic Y 試薬は1本あたり酵母細胞ペレット100~200g分の抽出にご利用いただけます。

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 P8215
- ジチオトレイトール(DTT)、製品番号 D9779
- 試験管
- シェーカー
- 遠心分離機
- マイクロ遠心機、Eppendorf® 5417R 型機(製品番号 Z366013 または Z366021) または同等品

ご使用前の注意と免責事項

弊社の製品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。

保存安定性

室温で保存してください。

手順

細胞溶解およびタンパク質抽出で最良の結果を得るため、対数増殖期の菌体を回収してください。

一般的に、プロテアーゼインヒビターカクテルの添加をお勧めします。

高分子量のタンパク質(>70 kDa)を抽出する時や対数増殖期を過ぎた菌体を用いる際はガラスビーズを添加すると収率が向上する場合があります。

*Schizosaccharomyces pombe*を使用する際に最良の結果を得るには、合成培地(Edinburgh Minimal Medium, EMM など)で培養してください。栄養培地(YES 培地など)で培養した場合は、対数増殖期中に細胞を回収しなければなりません。培養条件が最適でないときは、ガラスビーズを添加すると収率が向上する場合があります。

1. 適切な遠心用コニカルチューブに細胞を回収します。約 3,000 x g (4 °C)で 5 分間遠心分離します。その後、上清を除去します。
2. DTT の添加がその後の用途に影響しない場合は常に、ステップ 3 の前に CellLytic Y 試薬に DTT を添加することをお勧めします(最終濃度は 5~10 mM)。DTT の添加は総タンパク質の収率を大きく向上させます。
3. 適切な量の CellLytic Y 試薬に菌体ペレットを再懸濁します。CellLytic Y 試薬の推奨使用量は酵母菌体ペレット 1 グラムあたり 2.5~5 mL です。細胞に加える CellLytic Y 試薬の量は菌体ペレットの湿重量によって異なり、また、必要なタンパク質濃度にも左右されます。
4. 15~30 分間、穏やかに細胞を振盪します。
5. 溶解処理後の細胞を 12,000~20,000 x g で 10 分間遠心分離し、細胞破片を沈殿させます。
6. タンパク質を含む上清を冷却した試験管に移します。すぐに使用する場合は氷上に置きます。それ以外の場合は、タンパク質溶液は-20 °C(さらに安定に保存するには-70 °C)で保存します。

関連製品

- CellLytic B(細菌細胞溶解/抽出用試薬)、製品番号 B7435
- CellLytic B 2x(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
- CellLytic MT(哺乳類組織溶解/抽出用試薬)、製品番号 C3228
- Mammalian Cell Lysis Kit(哺乳類細胞溶解キット)、製品番号 MCL1
- CellLytic NuCLEAR Extraction Kit(核タンパク質抽出キット)、製品番号 NXTRACT

Coomassie は Imperial Chemical Industries, PLC.の登録商標です。

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

YA,AC,CMH,MAM 07/05-1

トラブルシューティングガイド

問題	原因	対策
総タンパク質の収率が低い	前培養液が古かった、または対数増殖期を過ぎた細胞を使用した。	新鮮な前培養液を使用してください。 培養は対数増殖期までとしてください。 対数増殖期を大きく過ぎた培養液、または新鮮でない培養液の場合は、ステップ3の後で、菌体湿重量1グラムあたり4グラムのガラスビーズ(製品番号G8772)を加えてください。次いで、振盪の代わりに、懸濁液を最大スピードで30秒間ボルテックスします(4°C)。このステップを5~6回繰り返します。ボルテックス1回ごとに懸濁液を1分間氷冷してください。
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> からのタンパク質抽出率が低い	培養条件が最適でない。	<i>Schizosaccharomyces pombe</i> を使用する際に最良の結果を得るには、合成培地(Edinburgh Minimal Medium, EMMなど)で培養してください。栄養培地(YES培地など)で培養した場合は、対数増殖期中に細胞を回収しなければなりません。培養条件が最適でないときは、ガラスビーズを添加すると収率が向上する場合があります。
高分子量(>70 kDa)タンパク質の収率が低い	培養条件が最適でない。	高分子量タンパク質の収率を向上させるには、ステップ3の後で、菌体湿重量1グラムあたり4グラムのガラスビーズ(製品番号G8772)を加えてください。次いで、振盪の代わりに、懸濁液を最大スピードで30秒間ボルテックスします(4°C)。このステップを5~6回繰り返します。ボルテックス1回ごとに懸濁液を1分間氷冷してください。
タンパク質が分解されている	抽出物中に活性のあるプロテアーゼが存在する。	プロテアーゼインヒビターカクテル(製品番号P8215)を添加してください。

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。