

WB analysis of macrophage supernatant

2016.7 ver.1

by Sadatomi & Takeda

インフラマソーム活性化に伴い培養上清中に分泌された IL-1 β および caspase-1 をメタノール-クロロホルム沈殿を用いて濃縮し、ウエスタンブロット法で検出を行う。

(タンパク質を濃縮する手法であるため、血清を含んだ培地での実験には不向き)

1. 細胞を 12 well もしくは 24 well プレートに播種する。
2. LPS priming (100 ng/mL 4 hr)を行う。
3. PBS で 3 回洗浄を行ったのち、Opti-MEM I もしくは無血清培地に交換する。
4. 各種インフラマソーム活性化刺激を行う。
5. 培養上清を 1.5 mL チューブに回収する。
6. 3,000 rpm $\times$ 1 min 遠心し、死細胞を除去する。
7. 培養上清と等量のメタノールを添加し、ボルテックス。
8. 培養上清の 1/4 量のクロロホルムを添加し、激しくボルテックス。
9. 氷上に放置(15 min)。
10. 15,000 rpm $\times$ 10 min 遠心。
(上層=水層、下層=油層、中間層=タンパク層)
11. 中間層を吸わないように注意しながら上層のみを除去する。
(100 μ L 程度残すイメージで)
12. メタノールを 500 μ L 添加し、激しくボルテックス。
13. 氷上で放置(15 min)。
14. 15,000 rpm $\times$ 10 min 遠心。
15. 沈殿を吸わないように注意しながら上清を除去する。
16. メタノールを 500 μ L 添加する (攪拌しない)。
17. 15,000 rpm $\times$ 10 min 遠心。
18. 沈殿を吸わないように注意しながら上清を除去し沈殿を風乾させる。
19. 2 $\times$ SDS サンプルバッファーで可溶化する。
20. ウエスタンブロット法により検出する。
(12 well で泳動 2 $\sim$ 3 回分、24well で 1 $\sim$ 2 回分くらい)

抗体情報

Anti-cleaved IL-1 β MBL Code No PD039

Anti-Caspase-1,p20 Adipogen # AG-20B-0042-C100

(この抗体は caspase-1 の切断を検出できるため、細胞抽出液のサンプルに使うことで細胞内での caspase-1 の活性化の程度を確認することも可能。)

【実験例】

PEC (in 12 well plate)

LPS(100 ng/mL)でプライミングを行った後、培地を Opti-MEM I 500 uL に交換した。その後、ATP (5 mM 30min) で刺激を行った。

上清 (Sup) : 回収した培養上清をメタ-クロ沈で濃縮し、 20 uL の 2×SDS サンプルバッファーで可溶化した。そのうち半量を 12 % SDS-PAGE に供した。

細胞抽出液 (Lysate) : 細胞を 1×SDS サンプルバッファー 40 uL で 直接可溶化した。そのうち半量を 12% SDS-PAGE に供した。

