北海道大学大学院農学研究院食品機能化学研究室
作成　加藤　英介
2017/4/10　改

2-deoxyglucose (2-DG) 取込み試験 for L6 細胞（48 well plate）

＊本プロトコルは基本的な知識を有しており、操作の意味が分かる方向けです。

- 細胞の培養と分化（DMEM 使用なので 10%CO_2 条件）

1. 6 cm ディッシュで 60-70%程度*まで培養（大体 2 日程度）
2. 1/2 から 2/3 程度を 10%FBS/DMEM 培地 20 mL に希釈して 6 cm ディッシュ(4 mL)と 48 well plate (200 µL/well, 約 10 mL)に播く（6 cm ディッシュは継代用、操作 1 に戻る）
3. 48 well plate はコンフルエントまで培養（4 日程度、培地交換不要)。
4. 2%HS/DMEM に切り替え 6-8 日間培養し分化させる（2 日毎に培地交換)。

*個人により差があるので、個人でちょうどいい条件を探す事

- 活性試験

事前準備

試験前日夕方 18：00 以降に培地交換：DMEM（血清、抗生物質無し）

活性試験当日朝（8 時-10 時の間）

サンプルによる刺激

① 12 ウェルのリザーバーに以下の要領で溶液を作る（サンプルは水や DMSO に溶解、DMSO 濃度 0.5%でも試験は出来るが低い方がいい）以下は水溶解の場合
- コントロール：サンプルに使用した溶媒を 10 µl 加える
- ポジティブコントロール：100 µM インスリン/PBS を 1 µl、サンプルに使用した溶媒を 9 µl
- サンプル：100 倍濃度の溶液を 10 µl
- それぞれのウェルに 990 µl の DMEM（血清、抗生物質無し）を加える

② 48 ウェルプレートの培地を吸引し､8 連マイクロピペットで上記の溶液をよく混合してから各 150 µl ずつ加える。

③ CO_2 インキュベーター内で 4 時間インキュベートする

2-DG の取り込み

① 水浴で温めた KRPH buffer で 2 回洗浄する(250 µl×2 回)

② 上 2 行分：KRPH buffer を 250 µl 加える（ブランク）
下 4 行分：1 mM 2-DG/KRPH buffer を 250 µl 加える

③ CO_2 インキュベーター内で 20 分間インキュベートする。この間に 0.05 M NaOH 水溶液を温めておく。

④ 冷 KRPH buffer（③の後で冷蔵庫から取り出せばちょうどいい温度）で 3 回洗浄(250 µl×3)して、最後に溶液を全て吸引除去する。

⑤　顕微鏡で細胞を確認する。細胞が剥がれているものがないかチェックする。

細胞の溶解、内在の NADPH の破壊

①　水浴で温めた 0.05 M NaOH 水溶液を 60 µl/ well 加えて振盪して細胞を完全に溶解させる。

②　-80℃の冷凍庫で凍結（20 分くらいは必要）。**止める場合はこの段階で止める。**

③　冷凍庫から取出し、85℃で約 60 分間加熱して**完全に乾固**させる。乾固していなかった場合は加熱を延長する。室温で溶かしてからでもいい。フタを外すのを忘れずに。

④　室温においておく。
　＊ある程度温かいほうが次段階での溶解に良いようです。

⑤　0.1 M HCl aq. を 30 µl、TEA buffer を 90 µl の各ウェルに加えられるように、必要量をリザーバーに準備する。（あらかじめ 0.05 M NaOH, 0.1 M HCl, TEA buffer を上記の量で混合すると pH8.1 付近になることを確認しておく、ならない場合は適宜調整。）

⑥　準備した溶液を各ウェル 120 µl 加える。冷たいと溶けにくいので暖かいぐらいがいい。軽く振盪してしっかり溶かす。

⑦　溶かしている間に次の準備をする：2-DG の定量①と②（溶かす時間が短いと問題がある場合あり）

2-DG 量の定量

①　蛍光測定用黒プレートに 2-DG スタンダード（0, 2.5, 5, 10, 20, 40, 80, 160 µM in TEA buffer）を 50 µl ずつ二連で用意する。

②　溶かしていた測定試料を再度しっかり振盪、かつピペッティングでも溶解を意識して混ぜながら、各 50 µl ずつ移す。

③　アッセイカクテル準備して各ウェル 50 µl ずつ加えて、振盪してから 37℃で 60 分間インキュベート。

④　励起波長 530 nm、蛍光波長 590nm で測定する。検出感度は毎回同じにしておくと比較しやすい。

* *Analytical Biochemistry*, 2006, 351, 139–145. 参照

＜溶液の組成など＞

細胞の分譲

JCRB 細胞バンクより分譲　JCRB9081

培養容器

6 cm ディッシュ：日本ジェネティクス　Trueline　TR4001

48 ウェルプレート：Thermo Scientific Biolite 48 ウェル　三商　12-9984

PBS (phosphate-buffered saline)

1. 500 mL メディウムビンにミリ Q を 450 mL、10×D-PBS(-)を 50 mL 加える
2. オートクレーブ

抗生物質保存溶液（×1000 times）

1. ゲンタマイシン硫酸塩 100 mg, ストレプトマイシン硫酸塩 200 mg, ペニシリン G カリウム 200,000 unit を量り、ミリ Q 水 2mL に溶かす。(最終的にゲンタマイシン硫酸塩 50 mg/mL, ストレプトマイシン硫酸塩 100 mg/mL, ペニシリン G カリウム 100,000 unit/mL)
2. クリーンベンチ内で 0.2 μm フィルターを通してフィルター滅菌する。(1.5mL マイクロチューブを使用する)
3. 冷凍庫内に保存する。(-20℃)

トリプシン溶液（0.1%トリプシン溶液）

1. 50mL 遠心管に PBS を 40 mL 量りとる。
2. トリプシン 40 mg と EDTA 2Na 4 mg を量る。
3. ②を①に加えて溶かす。
4. 溶液を 1 日冷蔵庫内に置く。
5. クリーンベンチ内で 0.2 μm フィルターを通してフィルター濾過する。(15 mL 遠心管を使用)
6. 使用するもの 1 つ残して(冷蔵庫に保存する)、その他は冷凍庫に保存する。

10%FBS/DMEM 培地

DMEM (高グルコース) (L-グルタミン、フェノールレッド含有)（和光、044-29765)：500 mL 入り

Fetal bovine serum (非働化済み): 55 mL

抗生物質保存溶液: 0.5 mL

2%HS/DMEM 培地

DMEM (高グルコース) (L-グルタミン、フェノールレッド含有)（和光、044-29765)：500 mL 入り

Horse serum (非働化済み): 10 mL

インスリン溶液

1 mg/mL　PBS 溶液として調製。溶けないので、0.1 M HCl を滴下して溶かす。

KRPH buffer

20 mM HEPES, 5 mM KH_2PO_4, 1 mM $MgSO_4$, 1 mM $CaCl_2$, 136 mM NaCl, 4.7 mM KCl, pH 7.4

・$MgSO_4$, $CaCl_2$ 以外を 800mL ほどの水に溶解して pH 調整後 900mL に調製

・$MgSO_4$, $CaCl_2$ は水 100mL に溶解

・上記二つを別々にオートクレーブ後に混合して調製完了。冷蔵保存

TEA buffer

50 mM Triethanolamine hydrochloride, 50 mM KCl, 0.5 mM $MgCl_2$, pH8.1

アッセイカクテル

(1.3 mM ATP, 20 μM $NADP^+$, 50 μM resazurin sodium salt, 12 units/mL hexokinase, 32 units/mL G6PDH, 4 unit/mL diaphorase in TEA buffer)

- ATP, NADP+溶液：TEA buffer で 5 倍濃度で調製して分注、冷凍保存。
- Resazurin 溶液：TEA buffer で 5 倍濃度で調製して分注、遮光冷凍保存。
- Hexokinase from Saccharomyces cerevisiae（Aldrich, H5000）：使用時量り取って TEA buffer に溶解。25 unit/mg だったら、1.5-2.0 mg 量り取り TEA buffer　1 mL に溶解。ロットにより結構違う。
- G6PDH（Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase, Leuconostoc sp. Recombinant、和光、077-06531）ストック溶液：TEA buffer 250 μL に溶解し、グリセロール 250 μL を加えて混合。50 μL ずつ分注して冷凍保存。保存可能期間不明。
- Diaphorase, from Clostridium kluyveri, Type III（オリエンタル酵母工業、46445003）ストック溶液：TEA buffer 350 μL に溶解し、グリセロール 350 μL を加えて混合。冷凍保存。保存可能期間不明。

つくり方は使用直前に次の順に混ぜる。

TEA buffer 1.1 mL

G6PDH ストック溶液（50 μL）、Diaphorase ストック溶液（10 μL）、Hexokinase 溶液（約 42 unit 分、1mL）

ATP, NADP+溶液：0.7mL

Resazurin 溶液：0.7mL

（計約 3.5 mL、48 ウェルプレート一枚と検量線 16 ウェル分：50 μL×64=3200+α）