

Q700 プロトコル 脂質の分散



1. 脂質を有機溶媒（例：クロロホルム）に溶解します。
 $\text{DOPC (25 mg/mL or 32 mM)} = 25 \text{ mg or } 32 \text{ } \mu\text{mol} / 1 \text{ mL}$
 $\text{DOPG (25 mg/mL or 31 mM)} = 25 \text{ mg or } 31 \text{ } \mu\text{mol} / 1 \text{ mL}$
 $\text{DOPS (10 mg/mL or 12.3 mM)} = 10 \text{ mg or } 12.3 \text{ } \mu\text{mol} / 1 \text{ mL}$
 $\text{Brain PIP2 (1 mg/mL or 0.9 mM)}$
2. ガラスチューブ内で脂質を混合します（～25 mg 1 mL / チューブ）。
 - A 670 μL **DOPC** (67 mol % = 21.4 μmol) + 330 μL **DOPG** (33 mol % = 10.2 μmol) = (100 mol % = 32 μmol)
 - B 700 μL **DOPC** (70 mol % = 22.4 μmol) + 752 μL **DOPS** (29 mol % = 10.2 μmol) + 351 μL **Brain PIP2** (1 mol % = 0.32 μmol) = (100 mol % = 32 μmol)
 - C 1mL **DOPC** (100 mol % = 32 μmol)
 - D 1mL **E.coli Phospholipid Extract** (25 mL～32 μmol)

※Small Unilamellar Vesicles (SUVs 小型単層ベシクル)を可視化するため、0.5 mol % Rhodamine-PE (分子量 1320、励起波長 560nm / 蛍光波長 583nm)を添加します。

- 1) 5mg の粉末を 5mL CHCl_3 (cf = 1mg / mol or 758 μM)に溶解します。
- 2) 0.5 mol %にするため、A～D のそれぞれの混合物に 211 μL 添加します。

3. それぞれの混合溶液を 2 本のガラスチューブに分けます（16 μmol / チューブ）。
4. ヒュームフード内で、回転させながら窒素ガスを吹き付けて乾燥させ、脂質薄膜を形成させます。
5. 完全に乾燥させるため、2 時間吸引します（最初の 1 時間は 42℃で行います）。
6. N_2 ガス置換グローブボックス内で、脱気した 2.5 mL TK150 バッファーを各チューブに添加し(cf = ~5mg/mL or 6.4mM)、パラフィルムで封をします。
7. 1 分間ボルテックスの後スピンドウンし、暗所・室温・O/N で水和します。次の日 1 分間ボルテックスの後、スピンドウンします。
8. Q700 とカップホーンを使用し、超音波処理を行います。
 - 温度を正確にコントロールするため、チラーを使用することを強くおすすめします。
 - カップ内の水位は、チューブ内サンプルのすぐ上に合わせます。
 - 1.5 mL のポリスチレンチューブを使用します。標準的なポリプロピレンチューブでは、効果的に超音波処理

が行われません。

- 温度制御がしやすいよう、Amplitude の設定を 15%(70W)にします。
- サンプルが半透明になるまで超音波処理します。

超音波処理時間

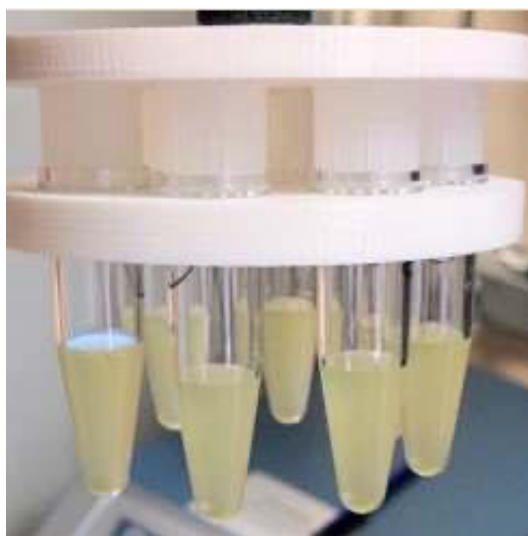
- 大腸菌リン脂質抽出物：2 分(30 秒 ON, 10 秒 OFF)
- 33% DOPE + 67% DOPC：5 分
- DOPC 単独の処理を行う場合はより長い照射時間・Amplitude・消費電力(80W)が必要です

9. スピンドアウンし、SUVs(小型単層ベシクル)をシリンジフィルターでろ過します。

10. 200 μ L ずつ分注し、空気層を N₂ ガスで置換した後、キャップをしてパラフィルムでシールし、4℃で静置します。

*分注液は、TK150 および 5 mM MgCl₂ で 0.5 mg/mL に希釈し、脂質二重層を作製します。

*分注液は 1 ヶ月間保存できます。これを過ぎると、時間とともに SUVs が融合し、液が濁ってきます。



超音波照射前



超音波照射後

TK150 バッファー

	ストック溶液 濃度	1×	1× 10mL 作製時	2×	2× 30mL 作製時
Tris-HCl pH7.4	1 M	25 mM	0.25 mL	50 mM	1.5 mL
KCl	3 M	150mM	0.5 mL	300 mM	3.0 mL
H ₂ O			9.25 mL		25.5 mL

原文は[こちら](#)からご覧いただけます。

提供：QSONICA LLC 文責：ワケンビーテック株式会社