

Analysis of membrane association of mitochondrial proteins

2014. 6 ver.1

by Ura, Nishihara & Takeda

1. <前日> ϕ 10cm dish 3 枚に細胞を播種する。
☞ 目的のタンパク質の発現量に応じて細胞数を調整する。
2. “Isolation of mitochondria from cultured cells” step 2 ~ 10 に従って、ミトコンドリア画分 (LSP) を単離する。
3. それぞれの沈殿に以下の溶液を加えて懸濁した後、氷上に 30 min 静置する。
 - ① HB 100 μ L
 - ② 0.1M Na₂CO₃ (pH 11.5) 100 μ L
 - ③ 1% TX/HB 100 μ L
4. Bioruptor を用いて溶液が透明になるまで sonication を行った後、氷上にて 30 min 静置する。
☞ 細胞によって sonication の程度は異なるが、low で 1 min (ON 10sec \Rightarrow OFF 10sec) \times 2 set を目安とする。
5. 43,000 rpm (110,000 x g : ゲノム創薬・ベックマン超遠心機 & TLA110 ローター) \times 30 min 遠心し、
☞ 沈殿 (P) \rightarrow HB 100 μ l 加えたあと (攪拌しない)、4 \times SDS Sample Buffer を 33.3 μ l を加えて boil する。
☞ 上清 (S) \rightarrow 4 \times SDS Sample Buffer を 33.3 μ l 加えて boil する。

HB: Homogenization Buffer

20 mM Hepes	1 M	0.2 mL
0.22 M Mannitol	1 M	2.2 mL
0.08 M Sucrose	2 M	0.4 mL
Aprotinin	200 \times	50 μ L
PMSF	100 \times	100 μ L
Milli-Q H ₂ O		<u>7.2 mL</u>
	Total	10 mL

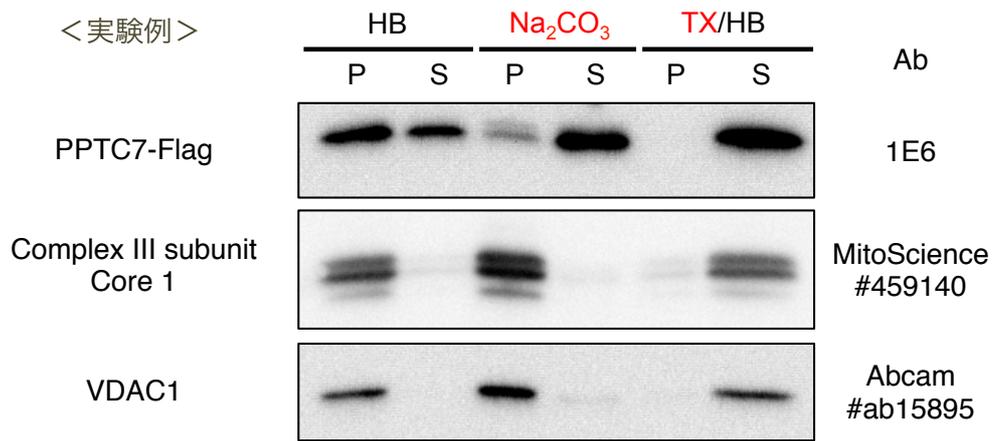
Na₂CO₃

0.1 M Na ₂ CO ₃ (pH 11.5)	1 M	1.06 g
Milli-Q H ₂ O	up to	100 mL

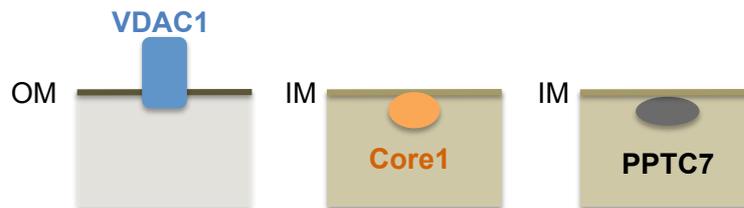
(溶解した時点でほぼ pH 11.5 になるが、必要だったら 0.2 N NaOH で調整する。)

TX/HB

1% Triton X-100	20%	5 μ L
HB-PI		<u>95 μL</u>
	Total	100 μ L



HEK293-PPTC7-Flag cells



内在性膜タンパク質（例：VDAC1）や、表在性膜タンパク質だが膜との結合の強いタンパク質（例：Core 1）は、アルカリ処理には耐性で、界面活性剤処理によって初めて膜から解離する。

一方、表在性膜タンパク質の多く（例：PPTC7）は、アルカリ処理によって膜から解離する。