

Isolation of mitochondria from cultured cells

2014.6 ver.1

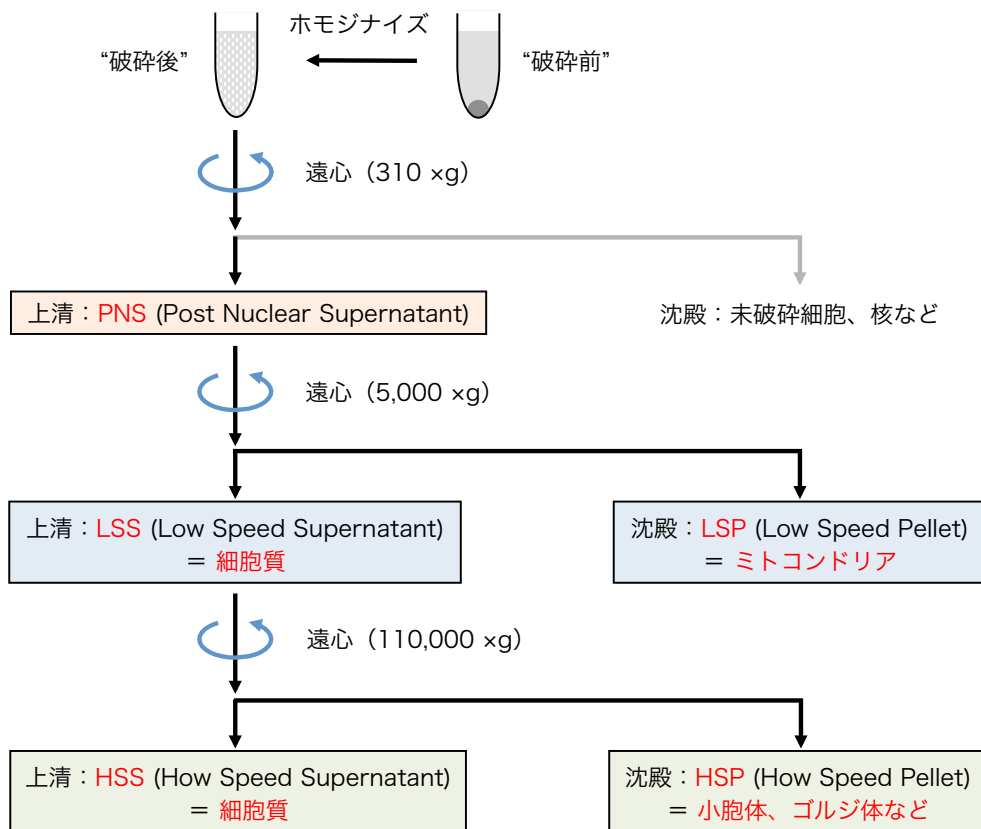
by Ura, Nishihara & Takeda

1. <前日> $\phi 10\text{cm}$ dish 1 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. <以下、氷上操作> PBS で洗浄した後、PBS 1 mL にて細胞を 1.5 mL チューブに回収する。
3. 5,000 rpm (2,400 x g) $\times$ 2 min 遠心し、上清を除く。
4. Homogenization Buffer (HB)を 800 μL 加え、細胞をピペッティングにて懸濁し、氷上に 2 min 静置する。
☞ ピペッティングする際は細胞にダメージを与えないよう温和に行うこと。
5. 5,000 rpm (2,400 x g) $\times$ 2 min 遠心し、上清を除く。
6. HB を 800 μL 加え、細胞を温和なピペッティングにて懸濁し、氷上に 5 min 静置する。
☞ このときの懸濁液を“破砕前”サンプルとして少量回収しておく。
7. 5,000 rpm (2,400 x g) $\times$ 2 min 遠心し、上清を除く。
8. HB を 800 μL 加え、細胞を温和なピペッティングにて懸濁した後、シリンジ [1 mL]+注射針 [27G (3/4 inch)]で細胞を破砕する (5 strokes $\times$ 2 ~ 4 sets)。
☞ ここで破砕したものを“破砕後”サンプルとし、6 の“破砕前”サンプルと位相差顕微鏡にて比較し、破砕されていることを確認する。
9. 1,800 rpm (310 x g) $\times$ 5 min で遠心し、上清を別のチューブに回収する (PNS)。
☞ Western blot (WB)を行う場合は、50 μL を別チューブに移し、4 $\times$ SDS Sample Buffer を 17 μL 加えて boil する。
10. 7,200 rpm (5,000 x g) $\times$ 5 min で遠心し、上清を別のチューブに回収する (LSS)。得られた沈殿 (LSP) がミトコンドリア画分である。
☞ WBを行う場合は、HB 50 μL を加えて懸濁した後、4 $\times$ SDS Sample Buffer を 17 μL 加えて boil する。

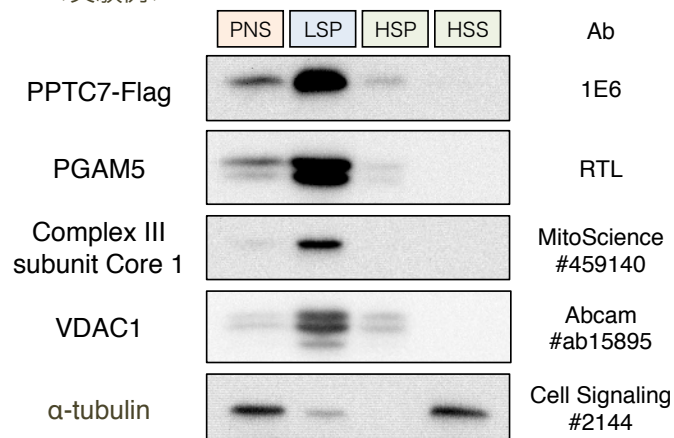
<以下、オプション>
11. LSS を 43,000 rpm (110,000 x g) $\times$ 5 min で遠心し、上清 (HSS) と沈殿 (HSP) に分ける。
☞ バックマン卓上超遠心機 (@ゲノム創薬学研究室、TLA110 ローター) を、4°C, Accel: Max, Decel: Max に設定して用いる。
☞ WBを行う場合は、HB 50 μL で懸濁した HSP および HSS 50 μL にそれぞれ 4 $\times$ SDS Sample Buffer を 17 μL 加えて boil する。

Homogenization Buffer (HB)

	<Final>	<Stock>	
Hepes	20 mM	1 M	0.2 mL
Mannitol	0.22 M	1 M	2.2 mL
Sucrose	0.08 M	2 M	0.4 mL
Aprotinin	1 ×	200 ×	50 μL
PMSF	1 ×	100 ×	100 μL
Milli-Q H ₂ O			<u>7.2 mL</u>
		Total	10 mL



<実験例>



HEK293-PPTC7-Flag cells