

Topological analysis of mitochondrial proteins

2014. 6 ver.1

by Ura, Nishihara & Takeda

1. <前日> $\phi 10\text{cm}$ dish 4 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. HB-PI (-) を 800 μL ずつ加えて懸濁する。
4. 7,200 rpm (5,000 x g) $\times$ 5 min 遠心し、上清を除く。
5. 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。
 - ①② HB-PI (-) 100 μL
 - ③ Hepes 100 μL
 - ④ TX/HB-PI (-) 100 μL
6. ②~④に ProK 溶液を 3 μL ずつ加え、氷上に 30 min 静置する。
7. 50%トリクロロ酢酸 (TCA) 溶液 (100%溶液を希釈したもの) を 25 μL ずつ加え (final 10%)、さらに氷上に 15 min 静置する。
8. 7,200 rpm $\times$ 2 min 遠心し、上清を別のチューブに移す (ロスした場合に備えて一応保存しておく)。
9. あらかじめ冷やしておいたアセトンを 100 μL 沈殿に加えてチューブをタッピングした後、再び 7,200 rpm $\times$ 2 min 遠心し、上清を除く。
☞ アセトンは、タンパク沈殿に影響を与えずに Triton X-100 や TCA を除くことができる。
10. 沈殿を風乾させた後、2 $\times$ SDS Sample Buffer を 50 μL 加え、ただちに boil (99°C $\times$ 5 min) する。
☞ ProK を完全に失活させるために素早く boil を行うよう気をつける。

HB-PI (-): Homogenization Buffer Protease Inhibitors (-)

20 mM Hepes	1 M	x 80 μL
0.22 M Mannitol	1 M	x 880 μL
0.08 M Sucrose	2 M	x 160 μL
Milli-Q H ₂ O		<u>2,880 μL</u>
Total		4 mL

Hepes

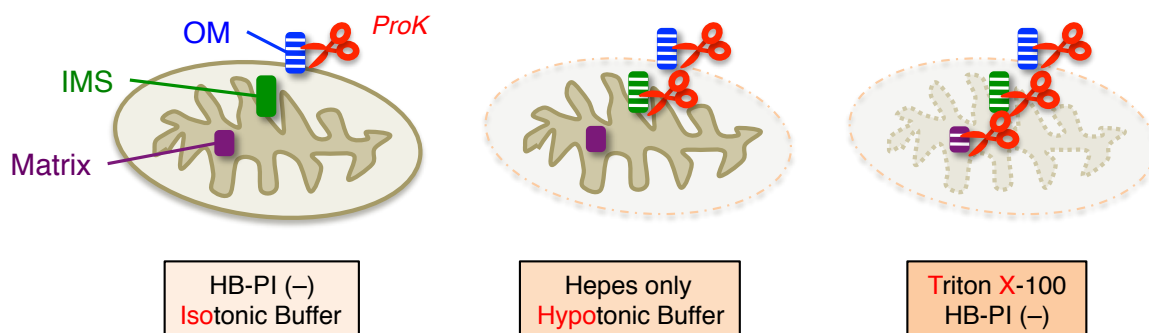
20 mM Hepes	1 M	x 2 μL
Milli-Q H ₂ O		<u>98 μL</u>
Total		100 μL

TX/HB-PI (-)

0.5% Triton X-100	20%	x 2.5 μ L
HB-PI (-)		<u>97.5 μL</u>
Total		100 μ L

Proteinase K (ProK) : Merck #124568 100 mg

用事に適当量を秤量し、2 mg/mL になるように HB-PI (-)に溶解する (例: 1 mg + 500 μ L)。
使用後の残りは保存せずに廃棄する。



<実験例>

