

Soleus, EDL の preparation と組織からのタンパク抽出

1. マウスを頸椎脱臼後、後肢を切り落とす。
2. 皮をはぎ、筋肉を露出させる。
3. 筋肉にくっついた毛を取り、軽く膜をはぐ。
4. Total muscle として大腿筋の一部を取る。エッペンに入れ、液体窒素へ。
5. 肢を裏側にしてピンでシャーレに止める。
6. 慎重に筋肉をはいでいき、ヒラメ筋(Soleus)を露出させ、腱から腱までを摘出する。
7. 両足のヒラメ筋を摘出しエッペンに入れた後、液体窒素へ。
8. 次は肢を表側にしてすねの筋肉を一枚はくと、長指伸筋(Extensor digitorum longus; EDL)を露出させる。
9. 腱から腱までを摘出する。両足をエッペンに入れ、液体窒素へ。
10. 摘出した筋肉の両足分をまとめて1つのエッペンチューブに入れ、重さの10倍量の homogenize buffer(protease inhibitor cocktail + PMSF + DTT 1 μ l/ml)を加える(重さを量る際は、キムワイブで水分を吸い取り、あらかじめエッペンの重さを量っておいてから組織重量を測る)。
11. Homogenize bufferを加えた後、ポッター型 or テーパー型ホモジナイザーによりホモジナイズする。
12. エッペンチューブに移し変え、8000 rpm 10 min で遠心する。
13. 上清を別のエッペンに移し、それをを用いてウェスタンプロットを行う。
14. Bradford 法によるタンパク定量を行い、含有タンパク量を吸光度により測定する(検量線にはBSAを用いる)。
15. タンパク定量後、2xsample buffer (レムリー-buffer)を等量加えて SDS-PAGE を行うが、1 well につき 10 μ g のタンパクを流す。
16. Running gel は 12%、stacking gel は 7.5% で泳動する(分子量 33 kDa)。
17. 泳動後、メンブレンにトランスファーし、ブロッキングの後 wash し、一次抗体でプロットする(4 、 overnight)。
18. TBST buffer で 10 min x 3 wash した後、二次抗体に浸す(4 、 1 時間)。
19. ECL を 1 枚のメンブレンにつき、1 ml を滴下し、フィルターに貼り付ける。
20. 暗室にて自動現像機を用いて感光させる。