

Příprava TEV proteázy

Expres TEV proteázy.....	1
Sonikace	1
Purifikace	2
Zakoncentrování	2
Chemikálie a roztoky.....	3
Poznámky.....	4

Expres TEV proteázy

- 1) Připravit si 10 ml LB media do inkubační zkumavky. Přidat 20 µl zásobního roztoku AMP (výsledná koncentrace 100 µg/ml) a 10 µl zásobního roztoku CMP (výsledná koncentrace 30 µg/ml).
- 2) Píchnout 10 µl špičkou do zmrazeného zásobního stocku E.Coli obsahujícího TEV proteázu a špičku celou hodit do inkubační zkumavky.
- 3) Inkubovat v třepacím inkubátoru přes noc při 37 °C a 250 rpm.
- 4) Do inkubační lahve si připravit 196 ml LB media. Přidat 400 µl zásobního roztoku AMP (výsledná koncentrace 100 µg/ml), 200 µl zásobního roztoku CMP (výsledná koncentrace 30 µg/ml) a 4 ml zásobního roztoku glukózy (výsledná koncentrace 0.2%).
- 5) Inkubovat v třepacím inkubátoru při 37 °C a 250 rpm do OD₆₀₀ cca 0.5. Trvá to přibližně 2.5 hodiny.
- 6) Přidat 200 µl roztoku IPTG (výsledná koncentrace 1mM) a inkubovat při 30 °C a 250 rpm po dobu 4-6 hodin.
- 7) Zchladit na 4 °C a poté stočit ve zkumavce Beckman se šroubovacím víčkem na 5000 g po dobu 10 min při 4 °C.
- 8) Pelety zamrazit na -80 °C po dobu 2 hodin nebo -20 °C přes noc.

Sonikace

- 1) Zmrazené pelety resuspendovat v chlazeném pufru A v poměru 1:5 (hmotnost pelety v g:objem pufru v ml) a ponechat 10 minut na ledu.
- 2) Sonikovat 10× po dobu 10 sekund s 30 sekundovou přestávkou.
- 3) Suspenzi stočit na 30000 g po dobu 30 min při 4 °C.

Purifikace

- 1) Příprava přístroje ÄKTApurifier dle návodu na purifikace enzymů z SF9 buněk. V kolektoru obsadit dostatečný počet pozic zkumavkami (nejméně A1-A8).
- 2) Pro purifikaci použít poloautomatickou metodu „HisTrap 02 Ecoli purifikace“.
- 3) Nastavit požadovaný objem nástřiku a úroveň absorbance, kdy dojde k ukončení nástřiku (pokud při běhu neklesne úroveň absorbance pod danou hodnotu, lze pokračovat dále kliknutím na „Continue“).
- 4) Po ukončení nástřiku dojde k postupnému zvyšování koncentrace imidazolu. Od této fáze je nutné sledovat úroveň absorbance. Pokud se začne objevovat pík, počkat cca 0.5 ml (zpoždění mezi detektorem a kolektorem frakcí) a v manuálním režimu nastavit „Frac → Fractionation → 18 mm → 10 ml → NextTube → Volume“ a kliknout na „Insert“ a poté na „Execute“. Pokud by se jednalo o falešný pík, postup lze opakovat.
- 5) Koncentrace pufru B se zvýší na 60 % během 10 ml a poté skokově na 100 %. Během této fáze by mělo dojít k úplnému uvolnění proteinu z kolony.
- 6) Příkladový ÄKTApurifier promýt podle návodu na purifikace enzymů z SF9 buněk.

Zakoncentrování

- 1) Předchladit si centrifugu Heraeus s rotorem pro 15 ml koncentrační zkumavky Amicon Millipore 10K.
- 2) Stočit roztok s čistým enzymem na cca 1.5 ml při 7500 g a 4 °C (přibližně 25 min).
- 3) Přidat 10 ml TEV pufru a opět stočit na cca 1.5 ml při 7500 g a 4 °C. Toto opakovat celkem 3x.
- 4) Čistou TEV proteázu rozpipetovat do 1.5 ml mikrozkuvek a uchovávat při -20 °C.

Chemikálie a roztoky

Zásobní roztok AMP

50 mg/ml

Zásobní roztok CMP

30 mg/ml

Zásobní roztok glukózy (10%)

1 g glukózy rozpustit v 10 ml LB media. Roztok přefiltrovat u kahanu přes stříkačkový filtr.

Pufr A

20mM Tris 0.606 g

150mM NaCl 2.192 g

10% (v/v) glycerol 50 ml

30mM imidazol 0.511 g

Doplnit ultračistou vodou do 250 ml. Upravit pH na 7.4 pomocí HCl. Uchovávat v lednici.

Pufr B

20mM Tris 0.242 g

150mM NaCl 0.877 g

10% (v/v) glycerol 20 ml

30mM imidazol 3.404 g

Doplnit ultračistou vodou do 100 ml. Upravit pH na 7.4 pomocí HCl. Uchovávat v lednici.

TEV pufr

20mM Tris 0.121 g

150mM NaCl 0.438 g

10% (v/v) glycerol 10 ml

Doplnit ultračistou vodou do 50 ml. Upravit pH na 7.4 pomocí HCl. Přefiltrovat stříkačkovým filtrem a uchovávat v lednici.

Poznámky



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Publikace je spolufinancovaná Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky. Registrační číslo projektu: CZ.1.07/2.3.00/20.0235, název projektu: TEAB.