

Purifikace His-Tag proteinu z *Sf9* mikrosomů

Příprava systému ÄKTApurifier	1
Úprava vzorku	2
Purifikace proteinu.....	2
Promytí systému ÄKTApurifier	2
Chemikálie a roztoky	3
Poznámky	4

Příprava systému ÄKTApurifier

- 1) Zkontrolovat, zda je chladicí skříň v provozu.
- 2) Zapnout přístroj ÄKTApurifier. Po ukončení diagnostiky (cca 2 minuty) zapnout počítač a přihlásit se. Po chvíli se zkalibruje kolektor frakcí a bude na něm svítit zelená kontrolka (nikoliv blikat).
- 3) Doplnit 20% ethanol, do další lahve přichystat ultračistou vodu a připravit Pufry A a Pufry B.
- 4) Připojit 1 ml HisTrap kolonu na své místo.
- 5) Spustit program Unicorn a přihlásit se do něj. V okně „System Control“ po chvíli (cca 2 minuty) zkontrolovat připravenost systému („Informational: Instruments are ready“). Pokud tomu tak není a objeví se chybová hláška, je třeba vypnout a opět zapnout počítač (nikoliv restartovat) a znovu spustit program Unicorn.
- 6) Do kolektoru frakcí vložit zkumavky do pozice J10, J11 a J12. Hadičky A1 a B1 ponechat ve 20% ethanolu.
- 7) V okně „Main Menu“ spustit metodu „HisTrap 01 wash start“. Systém bude vždy po cca 10 minutách automaticky hlásit, kdy se mají hadičky A1 a B1 přehodit do lahve s ultračistou vodou a s Pufry A a B. Po ukončení metody je systém připraven k purifikaci proteinu. Celá metoda trvá cca 40 minut.
- 8) Promýt injekční okruh pomocí 6 ml stříkačky s jehlou naplněnou Pufrem A
- 9) Zkompletovat zásobní smyčku proteinu („superloop“). Promýt ji 2× 10 ml Pufry A nedřívě zespodu a poté shora. Připravenou smyčku připojit na injekční okruh.

Úprava vzorku

- 1) Do zkumavky se solubilizovanými mikrosomy přidat imidazol do jeho výsledné koncentrace 30mM (12.25 µg imidazolu na 6 ml vzorku). Opatrně rozpustit. Uchovávat v ledu.

Purifikace proteinu

- 1) Naplnit smyčku upraveným vzorkem pomocí 6 ml stříkačky s jehlou. Pozor na vzduchové bubliny. Nechat stříkačku v podavači.
- 2) Do kolektorů frakcí vložit čisté zkumavky do pozic A1-A5.
- 3) V okně „Main Menu“ vybrat metodu „HisTrap 02 sf9 purifikace“ a spustit ji.
- 4) V okně „System Control“ nastavit množství vzorku + 1 ml (pro 6 ml vzorku je hodnota 7 ml), vybrat si název výsledného souboru a metodu spustit tlačítkem „Start“. Systém bude automaticky nanášet vzorek na kolonu a odebírat jednotlivé frakce do zkumavek v kolektoru.
- 5) Purifikovaný protein se nachází ve frakci A4. Ze zkumavky odebrat 2× 3 µl, 1× 8 µl a 1× 30 µl pro kontrolu purifikace (1× SDS-PAGE, 1× WB, 1× stanovení množství bílkoviny a 1× stanovení aktivity).
- 6) Zkumavku s čistým proteinem popsat, překrýt parafilmem a uchovávat při -20 °C.

Promytí systému ÄKTApurifier

- 1) V okně „Main Menu“ vybrat metodu „HisTrap 03 wash end“. Hadičky A1 a B1 nechat v pufrch A a B. Systém bude vždy po cca 10 minutách automaticky hlásit, kdy se mají hadičky A1 a B1 přehodit do lahve s ultračistou vodou a do 20% ethanolu. Po ukončení metody je systém vyčištěn. Celá metoda trvá cca 40 minut
- 2) Vypnout počítač a poté vypnout systém ÄKTApurifier.
- 3) Odpojit smyčku, vyjmout 6 ml jehlu z podavače a obojí promýt vodou, ultračistou vodou a nechat vysušit na papírovém ručníku.

Chemikálie a roztoky

Pufr A – promývací

25mM Tris	1.51 g
150mM NaCl	4.38 g
30mM imidazol	1.02 g
20% glycerol (v/v)	100 ml
Detergent	Dle zjištěné koncentrace

Rozpustit ve 350 ml ultračisté vody, upravit pH na 7.4 pomocí HCl. Doplnit do 500 ml.

Pufr B – elučň

25mM Tris	1.51 g
150mM NaCl	4.38 g
500mM imidazol	17.02 g
20% glycerol (v/v)	100 ml
Detergent	Dle zjištěné koncentrace

Rozpustit ve 350 ml ultračisté vody, upravit pH na 7.4 pomocí HCl. Doplnit do 500 ml.

20% ethanol

40 ml čistého ethanolu smíchat se 160 ml ultračisté vody.

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.