

Purifikace His-Tag proteinu z *E.Coli*

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 Pufrem A nedřívě zespodu a poté shora. Připravenou smyčku připojit na injekční okruh.

Úprava vzorku

Pokud je použita dlouhodobá exprese při nižších teplotách, je bezpodmínečně nutné provést inkubaci lyzátu s DNazou. Mohlo by jinak dojít k ucpaní a zničení kolony.

- 1) Do zkumavky s buněčným lyzátem přidat imidazol do jeho výsledné koncentrace 30mM (12.25 mg imidazolu na 6 ml vzorku). Opatrně rozpustit a přefiltrovat přes stříkačkový filtr. Uchovávat v ledu.

Purifikace proteinu z lyzátu E.Coli

- 1) Naplnit smýčku upraveným vzorkem pomocí 6 ml stříkačky s jehlou. Pozor na vzduchové bubliny. Nechat stříkačku v podavači.
- 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) Sběr proteinu do zvolené zkumavky ukončit přepnutím na další zkumavku, viz krok 4.

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 smýčku, vyjmout 6 ml jehlu z podavače a obojí promýt vodou, ultračistou vodou a nechat vysušit na papírovém ručníku.

Chemikálie a roztoky

Pufř 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.

Pufř B

20mM Tris	0.242 g
150mM NaCl	0.877 g
10% (v/v) glycerol	20 ml
500mM imidazol	3.404 g

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

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.