

Solubilizace Sf9 mikrosomů

Screening detergentů.....	1
Solubilizace většího množství Sf9 mikrosomů	2
Chemikálie a roztoky.....	3
Poznámky.....	4

Screening detergentů

- 1) Připravit zásobní roztoky detergentů (viz chemikálie a roztoky).
- 2) Mikrosomy nechat plynule rozmrazit v ledu. Poté smíchat v 1 mikrozkušavce.
- 3) Odebrat 4× 1 µl a 1× 5 µl mikrosomů do čistých mikrozkušavek. K prvním 4 přidat 5 µl solubilizačního pufru. Budou sloužit pro stanovení účinnosti solubilizace (4× WB, 1× stanovení aktivity).
- 4) Připravit 3 koncentrace detergentů se solubilizačním pufrem do mikrozkušavek dle tabulky:

Pufř	0.1%	0.5%	1.0%
5% detergent	6 µl	30 µl	60 µl
Solubilizační	244 µl	220 µl	190 µl

- 5) Do každé mikrozkušavky přidat 50 µl mikrosomů a jemně promíchat. Uchovávat na ledu.
- 6) Připravit rotátor do chladicího boxu a nastavit rychlost otáčení na 4. Mikrozkušavky s mikrosomy vložit do rotátoru a nechat solubilizovat 45 minut.
- 7) Předchladit ultracentrifugu Sorvall WX s rotorem T-8100 na 4 °C.
- 8) Solubilizované mikrosomy přepipetovat do ultracentrifugačních zkumavek, ty zavřít víčky a pevně zašroubovat.
- 9) Centrifugovat na 36200 rpm (odpovídá 105000 g max) při 4 °C po dobu 1 hodiny.
- 10) Připravit 2 mikrozkušavky pro každý vzorek.
- 11) Supernatant (tekutá část) přenést do mikrozkušavek a ty vložit do ledu.
- 12) Z každé mikrozkušavky odebrat 1× 6 µl do čisté mikrozkušavky. Budou sloužit pro stanovení účinnosti solubilizace (1× WB). Vše uchovávat při -20 °C.

Solubilizace většího množství Sf9 mikrosomů

- 1) Připravit solubilizační pufr se zjištěnou optimální koncentrací detergentu. Pozor na správnou koncentraci (mikrosomy a solubilizační pufr = 6 ml).
- 2) 1 ml mikrosomů nechat plynule rozmrazit v ledu. Poté smíchat v 1 mikrozkumavce.
- 3) Odebrat 3× 1 µl a 1× 5 µl čistých mikrosomů do mikrozkumavek. K prvním 3 přidat 5 µl solubilizačního pufru. Budou sloužit pro stanovení průběhu solubilizace (1× SDS-PAGE, 1× WB, 1× stanovení koncentrace bílkoviny, 1× stanovení aktivity).
- 4) Do 50 ml kádinky napipetovat 1 ml mikrosomů a 5 ml solubilizačního pufru s detergentem. Uchovávat v ledu.
- 5) Připravit 400 ml kádinku na magnetickou míchačku. Kádinku s mikrosomy a míchátkem přetáhnout parafilmem a vložit do velké kádinky. Obložit ledem a vytvořit ledovou lázeň. Malou kádinku zatížit, nastavit rychlost otáčení na 1/4 a nechat solubilizovat 45 minut.
- 6) Předchladit ultracentrifugu Sorvall WX s rotorem T-8100 na 4 °C.
- 7) Solubilizované mikrosomy přepipetovat do ultracentrifugačních zkumavek. Zkontrolovat hladinu kvůli vyvážení a případně ji upravit. Poté zavřít víčky a pevně zašroubovat.
- 8) Centrifugovat na 41800 rpm (odpovídá 105000 g avg) při 4 °C po dobu 1 hodiny.
- 9) Připravit 4 mikrozkumavky a větší zkumavku na supernatant.
- 10) Supernatant (tekutá část) přenést do větší zkumavky a z ní odebrat 3× 6 µl a 1× 30 µl do mikrozkumavek. Budou sloužit pro stanovení průběhu solubilizace (1× SDS-PAGE, 1× WB, 1× stanovení koncentrace bílkoviny, 1× stanovení aktivity). Vše uchovávat při -20 °C.

Objemy mikrosomů a solubilizačního pufru jsou standardně v poměru 1:5. V případě solubilizace velkých objemů mikrosomů (3 ml a více), lze použít poměr 1:4 (pozor na dodržení koncentrace detergentu). Centrifugace poté probíhá v rotoru T-875 při 37500 rpm (odpovídá 105000 g avg).

Chemikálie a roztoky

Solubilizační pufr

25mM Tris	151.43 mg
150mM NaCl	438.3 mg
20% glycerol (v/v)	10 ml

Rozpustit ve 35 ml ultračisté vody. Upravit pH na 7.4 pomocí HCl. Doplnit do 50 ml ultračistou vodou. Uchovávat v lednici.

5% zásobní roztoky detergentů

ASB 14-4	5 mg
C12E1	5.73 μ l
C12E8	5 mg
DDM	5 mg
Digitonin	5 mg
CHAPS	5 mg
Igepal CA-630	4.72 μ l
OG	5 mg
Saponin	5 mg
Triton X-100	4.70 μ l

Ke každému detergentu přidat 100 μ l solubilizačního pufru a důkladně protřepat do úplného rozpuštění/rozmíchání detergentu.

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.