

INŻYNIERIA BIAŁEK TERAPEUTYCZNYCH – ĆWICZENIE I

Izolacja białek z materiału in vitro

WSTĘP: W przypadku wielu badań laboratoryjnych w celu oznaczenia aktywności inżynierijnie modyfikowanych białek terapeutycznych wymagany jest rozdział mieszaniny wszystkich białek wyizolowanych z komórek na frakcje cytozolowe oraz jądrowe. Jedną z możliwości otrzymania pożądanego efektu jest wykorzystanie komercyjnie dostępnych gotowych zestawów ze zoptymalizowanymi odczynnikami i procedurami dostarczonymi przez producenta.

Wykorzystywane bufony i odczynniki:

CEB-A – bufor stosowany w celu zawieszenia komórek

CEB-B – bufor lizujący błonę komórkową (izolacja frakcji cytozolowej)

NEB – bufor lizujący błonę jądrową

DTT – Ditiotretitol

INHIBITORY PROTEAZ

CEB-A mix (5 prób) – CEB-A 1 ml + INHIBITORY PROTEAZ 2 μ l + DTT 1 μ l

NEB mix (5 prób) – NEB 0.5 ml + INHIBITORY PROTEAZ 1 μ l + DTT 0.5 μ l

WYKONANIE:

1. Podczas przeprowadzania izolacji wszystkie odczynniki należy utrzymywać w niskiej temperaturze (inkubacja na lodzie)
2. Hodowlę komórek przepłukać ok. 3 ml roztworu PBS
3. Na powierzchnię komórek nanieść 0.55 ml roztworu trypsyny w celu odklejenia komórek od powierzchni naczynia hodowlanego
4. Po zaobserwowaniu odklejania się komórek dodać 1.1 ml medium hodowlanego (DMEM)

5. Otrzymaną zawiesinę przenieść do czterech probówek typu Eppendorf (po 0.4 ml zawiesiny w każdej probówce) – po jednej probówce na zespół
6. Odwirować zawiesinę komórkową - 10min; 800g/2500rpm
7. Po odwirowaniu usunąć supernatant, dodać po 0.2 ml roztworu CEB-A mix, wymieszać 15 sekund i inkubować 10min na lodzie
8. Do zawiesiny komórkowej dodać 11 µl roztworu CEB-B; wymieszać przez 15 sekund i inkubować na lodzie 1min
9. Odwirować zawiesinę komórkową - 10 min; 16 000g
10. Po odwirowaniu supernatant przenieść do czystej probówki – FRAKCJA CYTOZOLOWA
11. Do pozostałego osadu dodać po 100 µl roztworu NEB-mix, wymieszać 15 sekund i inkubować 40 min na lodzie, mieszając co 10 minut
12. Odwirować zawiesinę komórkową - 20 min; 16 000g
13. Po odwirowaniu supernatant przenieść do czystej probówki – FRAKCJA JĄDROWA