

## Rekombináns fehérje tisztítása E.coliból

IPTG: I6758 Sigma

Imidazol: I0125 Sigma

His-select Nickel Affinity Gel: P6611 Sigma

O/N kultúra:

10 ml-t, hosszú, hőlépezett kémcsőben, 20 ml-t, Erlenmeyer lombikban indítsunk. Fülke alatt, láng mellett kimérjük az LB-t, hozzáadjuk az antibiotikumot, majd elmegyünk a -70°C-os hűtőhöz. Ha van bunsen égő, használjuk. Glicerines stockot felolvasztani tilos! Ha felolvad, kuka! 10 µl-es pipettával megkarcoljuk a glicerines stock tetejét, majd a csövet azonnal visszatesszük a hűtőbe, a pipettát szuszpendáljuk az LB-ben, majd éjszakára 37°C 200 rpm.

Másnap reggelre opálos LB-t kell kapni. Ha az LB nem zavarosodott be akkor a colikkal lett valami!

O/N kultúrát 50-100x-ra kell hígítani (ha az O/N kultúra 10 ml volt, akkor azt 500 ml LB/antibiotikumba tegyük bele), mintát veszünk, megnézzük a fényelnyelést 600 nm-es hullámhosszon. Rázatus: 200 rpm, 37°C. A colik kb. 2 óra múlva nőnek fel az indukcióhoz, de a biztonság kedvéért 1 óra rázatus után is nézzük meg az OD-t

- O.D.600 = 0,5 nél kell indítani az IPTG indukciót

*Az indukció függ az expresszálni kívánt fehérjétől, plazmidtól, bac-típustól!!!*

*Nagy mennyiségű fehérje expresszálása előtt be kell lőni az optimális IPTG koncentrációt, hőmérsékletet (RT vagy 37°C) és időtartamot (1 órától 5 óráig, esetleg éjszakán át)*

37°C, 200 rpm, 5h, 1,25 mM IPTG

- sejtek összegyűjtése: 4000g 10' 4°C (nagy, 1L-es műanyag flakonban, amit előtte ki kell alkoholosítani)
- mosás: 40 ml hideg PBS, jól fel kell szuszpendálni és 50 ml-s Falconba tenni
- cf: 4000 g 10' 4°C (kis fugában)
- fu leszív, a bacikat -70°C-on hosszabb ideig is lehet tárolni

pufferek a tisztításhoz:

**LYSIS alap:**

- **50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>**
- **300 mM NaCl**

**pH: 8,00 + 0,1 % TritonX**

**frissen hozzáadni: 1 mM PMSF** (200 mM stock, in isopropanol, 4°C)

**1 mM ortofenantrolin**

**1 mM benzamid**

**Protease inhibitor coctail (100x)**

## WASH:

- lysis alap **W/O TritonX !!!**

+ **1 mM PMSF**

**1 mM ortofenantrolin**

**1 mM benzamid**

**Protease inhibitor coctail (100x)**

+ **20 mM imidazol** (1M stock, in dH<sub>2</sub>O, autoklávozás után sötétben, 4°C)

## ELUTION:

- lysis alap **W/O TritonX !!!**

+ **1 mM PMSF**

**1 mM ortofenantrolin**

**1 mM benzamid**

**Protease inhibitor coctail (100x)**

+ **300 mM imidazol**

## VÉGIG JÉGEN DOLGOZNI, VAGY 4°C-ON!!!!

- bakt olvasztása jégen (kb 15')
- szuszpendálás lysis pufferben (1-2 g bakt-hoz 5ml)
- szonikálás: 3 x 30'' 30'' szünetekkel
- cf: 20.000 g 30' 4°C

közben: a gyanta ekvilibrálása:

- 500 µl gyanta 5000 g 30''
- Fu eldob, gyantához 2 térfogat dH<sub>2</sub>O
- 5000 g 30''
- 5 térfogat lysis pufferrel (w/o TritonX ) átmosni

MINTAVÉTEL: a feltárás után

- a cf után a felülúszót áttenni egy 15 ml Falcon-ba és hozzáadom az 500 µl gyantát  
1h óvatos forgatás (4°C)

- a gyantát felviszem egy oszlopra,
- MINTAVÉTEL: ami átfolyik az oszlopon (ami nem kötődött a Ni-agához)

- mosás: 2 x 1 ml MINTAVÉTEL
- eluálás: 4 x 300 µl MINTAVÉTEL

SDS-gélelfo, gélfestés

Az eluátumokat -20°C on lehet tárolni

## **2x mintapuffer:**

- **90 mM Tris pH: 6,8**
- **20 % glicerol**
- **2 % SDS**
- **0,02 % bromfenolkék (11,439-1 Sigma)**

**frissen: 100 mM DTT**

Mintakészítés:

*Indukció ellenőrzés:*

- 600 µl minta a tenyészetből
- short cf.
- fu. leszív
- 50-50 µl 2x mintapufferben főzni 8-10'
- short cf.
- fu-ból 5-10-20 µl mintát géltre vinni

*frakciók ellenőrzése:*

- 30 µl + 30 µl 2x mintapuffer, felfőzés