

ÚLOHA č. 1

Extrakce proteinů z tkáňových kultur pro detekci pomocí SDS-PAGE/Western blot

Buněčná kultura:

- **Linie myších Leydigových buněk TM3** - konfluentní buněčná kultura na 35 mm Petriho miskách (před zahájením experimentu a před zahájením extrakce proteinů provést mikroskopickou kontrolu buněk, zaznamenat změny v konfluenci, morfologii)

Chemikálie:

- **Lyzační pufr** (modifikováno podle Wisniewski et al. 2009, Nature Methods 6(5)): Tris 20 mM-SDS 4%-DTT 1 mM, pH 7.6, s přidavkem inhibitorů fosfatáz a proteáz (1X PHOS-Stop, 1X cOmplete MINI Protease Inhibitor Cocktail, výrobce Roche)

Příprava lyzačního pufru:

	<u>Recept pro 10 mL:</u>
- 1M roztok Tris báze (6.057 g/50 mL, pH upraveno 7.6, skladováno při laboratorní teplotě)	-> 200 uL
- 1M DTT (154.25 mg/mL, skladováno při -20C)	-> 10 uL
- 20%SDS (20 g/100 mL, skladováno při laboratorní teplotě)	-> 2 mL
- 1X PHOS-Stop (skladováno při 4C)	-> 1 tableta
- 1X cOmplete MINI Protease Inhibitor Cocktail (skladováno při 4C)	-> 1 tableta
-	

Doplnit destilovanou vodou na 10 mL, důkladně rozpustit tablety, promíchat

Poznámka: pokud možné, připravit lyzační pufr čerstvý, případné zbytky pro další použití skladovat při -20C. Uchovejte alikvot lyzačního pufru společně se vzorky pro pozdější ředění kalibračních roztoků pro kolorimetrické stanovení koncentrace proteinů.

- **PBS** (phosphate-buffered saline, NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 8.1 mM, KH₂PO₄ 1.5 mM, pH 7.2-7.4), chlazený

Pomůcky:

- automatické pipety (2-20 uL, 20-200 uL, 100-1000uL)
- 10 mL pipeta, pipetovač
- škrabka na buňky, oplachovací kádinka s vodou, papírové ubrousky
- odpadní kádinka
- značené 1.5-2.0 mL mikrozkušavky, krabička na vzorky
- ultrazvukový homogenizátor (Bandelin Sonopuls Mini20), krabice s ledem, stříčka s destilovanou vodou
- vortex, minicentrifuga

Postup:

1. Buňky pěstované na 35 mm Petriho miskách, případně exponované podle požadavků.

Poznámka: Při extrakci konfluentní buněčné kultury lze počítat s výtěžkem extrakce zpravidla v rozmezí 30-60 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, tzn. z 35 mm misky o obsahu 9 cm^2 lze získat cca 270-540 μg proteinů

2. Po ukončení expozice / experimentálního zásahu: vylít/odsát kultivační médium, opláchnout buňky 3x2 mL chlazeného PBS

(odpadní médium je nutné dekontaminovat pomocí savo, v případě, že buňky byly exponovány toxickým chemickým látkám, je nutné médium zlikvidovat jako nebezpečný odpad)

3. Naklonit misku a pomocí papírového ubrousku v rohu misky odsát zbytky PBS (nedotýkat se ubrouskem dna misky s kulturou buněk!)

4. Napipetovat 150 μL lyzačního pufru do středu misky (před přidáním pufru krátce zvortexovat a zkontrolovat, zda nedošlo k jeho vysrážení)

Poznámka: Při použití misek nebo mikrotitračních desek jiného formátu aplikovat lyzační pufr v objemu 10-15 μL na 1 cm^2 plochy misky / jamky mikrotitrační desky.

5. Pomocí suché a čisté škrabky rozetřít lyzační pufr po celé ploše dna misky, seškrábnout buňky (každé místo několikrát) a přenést lyzát do popsané mikrozkušavky. Mikrozkušavku umístit na led / do chladicího stojánku (případně zamrazit, pokud následující kroky nebudou prováděny v těsné návaznosti)

6. Buněčné lyzáty homogenizovat pomocí ultrazvukového homogenizátoru s ponornou sondou. Opláchnout sondu MilliQ vodou, otřít papírovým ubrouskem, ponořit hrot sondy do lyzátu, těsně nade dno mikrozkušavky. Zahájit sonikaci, během ní by se hrot sondy neměl přímo dotýkat dna zkušavky (pohlcuje ultrazvukové vlny a sonikace bude méně účinná), ale ani se přibližovat příliš k hladině vzorku (dojde k napěnění vzorku a opět ke snížení účinnosti sonikace).

Poznámka: Optimální parametry sonikace (síla, doba trvání sonikace, délka pulzů) budou záviset na typu homogenizátoru, typu sondy a objemu vzorku. Sonikace by měla být dostatečně účinná, aby došlo k rozrušení molekul DNA, které jsou zodpovědné za vysokou viskozitu vzorku. Dobře homogenizovaný vzorek je možné bez potíží pipetovat pomocí mikropipety (nedochází k ucpávání špičky). Na druhou stranu, během sonikace by nemělo docházet k extrémnímu přehřívání vzorku (může způsobovat degradaci některých proteinů). V případě přílišného zahřívání je možné sonikaci provést v několika krocích, mezi kterými je možné vzorky zchladit na ledu.

7. Odstranit buněčný debris centrifugací při 15 000 x G (10 min, 4C)

8. Supernatanty s vyextrahovanými proteiny před skladováním alikvotovat do mikrozkušavek pro minimalizaci počtu rozmrazení-zamražení při opakovaném používání vzorků (zamražení-rozmražení způsobuje degradaci proteinů)

9. Vzorky skladovat zamražené (-20C, dlouhodobě -80C)