

Össz hiszton preparálás borjú timuszból

Szám:

Dátum:

I. Pufferek, oldatok

<i>A. Sejtmag-mosó NaCl oldat</i>	1000 ml	2000 ml
0.14 M NaCl	8.18 g	16.36 g
<i>B. Kromatin-mosó Tris oldat</i>	1000 ml	2000 ml
10 mM Tris-HCl, pH 8	1.21 g	2.42 g
<i>C. DNS-kicsapó sósav oldat</i>	1000 ml	2000 ml
0.2 N HCl	20 ml (37%-os)	40 ml (37%-os)
<i>D. Hiszton-kicsapó oldat</i>	Aceton	
<i>E. Rekonsztrukciós oldat</i>	500 ml	1000 ml
50 mM Hepes-KOH, pH 7.6	5.96 g	11.92 g
50 mM KCl	1.86 g	3.73 g
1 mM EDTA	1 ml (0.5 M törzs)	2 ml (0.5 M törzs)
2 mM β -mercaptoethanol	70 μ l	140 μ l

II. Lépések

1. Borjú timusz hűtése jégen, max. 24 órán át. _____
- Hosszabb tárolás -20°C -on.
2. Felhasznált timusz tömege (tip 50 g): _____
3. Timuszt apró darabokra felaprítani, majd 5 ml/g-szövet *Sejtmagmosó NaCl oldatban* reszusupendálni. Felhasznált oldat térfogata (tip 250 ml): _____
4. Homogenizálás. Jégen, Cole-Parmer késes homogenizátorral. _____
5. Centrifugálás, 6000 rpm, 10 min, 2°C . _____
6. Pellet reszusupendálása 5 ml/g-szövet *Sejtmagmosó NaCl oldatban*. _____

Szükség esetén homogenizálás.

7. 5-6. lépések megismétlése 5-ször. _____

8. Pellet reszuszpendálása 5 ml/g-szövet *Kromatin-mosó Tris oldatban*. _____

Szükség esetén homogenizálás.

9. Centrifugálás, 6000 rpm, 10 min, 2 °C. _____

10. 8-9. lépések megismétlése egyszer _____

11. Pellet reszuszpendálása 0.5 ml/g-szövet *DNS-kicsapó sósav oldatban*. _____

Homogenizálás, keverés 10 percig (rotorack) 4 °C-on.

12. Centrifugálás, 6000 rpm, 10 min, 2 °C. _____

13. Szupernatánt gyűjteni mérőhengerben (100 ml-es). _____

14. 11-13. lépések ismétlése 2-szer. Szupernatánt gyűjteni. _____

Szükség esetén az összegyűjtött szupernatánt centrifugálással tisztítani.

15. Az összegyűjtött szupernatánshoz hatszoros térfogatú *Hiszton-kicsapó oldatot hozzáadni*. _____

Összegyűjtött szupernatáns térfogata:

Hozzáadott acetón térfogata:

16. Inkubálás jégen 1 órán át. _____

17. Centrifugálás, 6000 rpm, 10 min, 2 °C. _____

18. Pellet reszuszpendálása *Hiszton-kicsapó oldatban* (4:1 oldat:pellet arány) _____

19. 17-18. lépés ismétlése 2-szer. _____

20. Az utolsó acetonos pelletet *Rekonstrukciós oldatban* feloldani. _____

A fehérje koncentráció kb. 1 mg/ml legyen.