

Probengenerierung für Analyse im Phospho- oder Ac-Scan bei Cell Signalling

(„Sample Preparation Protocols for PTMScan“ sind von der Homepage von CS downloadbar)

Der Gesamtproteingehalt des benötigten Zelllysates hängt von den gewünschten Scans ab und sollte mit Cell Signalling besprochen werden.

Beispiel für die Proteinausbeute anhand von Lysaten von kultivierten HeLa-Zellen:

Aussaat je Messwert im Versuch: 5 Stück 145mm Schalen mit $0,63 \times 10^6$ Zellen/Schale, Kultivierung für 3 Tage. Nach dieser Wachstumsdauer beträgt die Zellzahl pro 145 mm Schale ca. 9×10^6 Zellen. Der Zellrasen ist dabei zu ca. 85 % geschlossen und sehr gut für eine IL1a Stimulation geeignet.

Ernte der Zellen:

Schalen 2x mit je 15 ml eiskaltem PBS ($\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -frei) waschen und Zellen in 3 ml PBS/Schale auf Eis scrapen, so daß ein Volumen an Zellsuspension von ca. 15 ml erhalten wird.

Wichtig: Von dieser Suspension entnimmt man Aliquots für einen eigenen Screen (in unserem Falle für Westernblot und RT-qPCR) ab. Es wurden 1 ml für Westernblot (entspricht ca. einer 100mm Schale) und 0,5 ml (entspricht ca. einer 60mm Schale) entnommen, pelletiert bei 500 x g für 5 min, dekantiert und das Pellet über N2 eingefroren und bis zur Aufarbeitung bei -80°C gelagert.

Erst nach Vorliegen von positiven Ergebnissen des eigenen Screens der entnommenen Aliquots wird die Harnstofflyse durchgeführt.

Harnstofflyse:

Zellpellets (aus -80°C) werden in je 10ml des frisch angesetzten Urea-Puffers lysiert:

- 10ml Urea-Lysepuffer zugeben, intensiv vortexen
- Sonifizieren (Branson Sonifier): 4 x 30 sec (output 1 / konstant / 1 min Pause)
- Lysat auf 2 ml Eppendorfgefäße verteilen
- Zentrifugieren: 15 min, 4°C , 20 000 x g
- Überstände der Eppendorfgefäße abnehmen und in 15 ml Blue Cap sammeln.
- Proteinbestimmung mittels Bradford

Die Lysate sollen vor dem erneuten Einfrieren und Lagern bei -80°C bis zum Versand einen Proteingehalt kleiner 4mg/ml haben. Deshalb je nach gemessenem Proteingehalt die Lysate verdünnen.

Lysate über flüssigen N2 in gut verschlossenen 15 ml Blue Caps einfrieren und bei -80°C bis zum Versand an Cell Signalling lagern.

Wichtig: Die Deckel der Blue Caps sollen gut mit Parafilm mittels Umwicklung abgedichtet werden.

Kalkulation von Zellzahl und zu erwartendem Proteingehalt nach Harnstofflyse bei HeLa-Zellen:

Pro Messwert wurden 5 x 145 mm Schalen mit ca. 9×10^6 HeLa-Zellen/145mm Schale eingesetzt, also liegt die Gesamtzellzahl für die Harnstofflyse bei ca. $4,5 \times 10^7$ Zellen.

Folgender Proteingehalt wurde nach Harnstofflyse gemessen: ca. 17,5 mg Gesamtprotein nach Bradford-Messung stammend von ca. $4,5 \times 10^7$ Zellen.

D.h. 1×10^7 HeLa-Zellen bringen nach Harnstofflyse ca. 3,9 mg Protein.

Diese Kalkulation kann bei anderen Zelltypen anders ausfallen und sollte nur als Anhalt dienen.

Der PTMScan® Urea Lysis Buffer enthält folgende Reagenzien:

20 mM HEPES (pH 8.0)

9.0 M urea

1 mM sodium orthovanadate (aktiviert)

2.5 mM sodium pyrophosphate

1 mM β -glycerol-phosphate.

Puffer wird frisch angesetzt; Kalkulation für 50 ml:

5.0 mL of 200 mM HEPES, pH 8.0

27.0 gm urea**

0.5 mL of 100 mM sodium orthovanadate, (aktiviert nach Protokoll CS)

2.0 ml sodium pyrophosphate (25X stock entspricht 1.1 g in 40 ml)

50 μ l β -glycerol-phosphate (1000X stock entspricht 2.2 g in 10 ml)

MilliQ-Wasser ad 50 ml

Der Puffer wird beim Lösen des Harnstoffes sehr kalt, so daß der Harnstoff sich nicht restlos löst. Deshalb zum Lösen des Harnstoffes das 50ml Blue Cap bis zum kompletten Lösen des Harnstoffes im Wasserbad bei 37° C erwärmen.

Anmerkung:

Urea muß Pierce Sequanal grade (catalog #29700) sein.

Die anderen Reagenzien können von Sigma oder anderen qualitativ hochwertigen Lieferanten sein.

Protokoll für die Aktivierung des sodium orthovanadates siehe PTMScan Protokoll von Cell Signalling.

Einzelheiten zu Pufferlösungen und Tipps bitte dem Cell Signalling Protokoll entnehmen.

Wenn das Harnstofflysat in der Kälte auf Eis ausfällt, kurz erwärmen, bis wieder klare Lösung.