

PREPARATION DE PROTEINES PAR LA TECHNIQUE "FRENCH PRESS"

PRINCIPE

L'avantage de la préparation de protéines par disruption de levures par application de pression à la French Press est qu'il n'y a pas besoin de faire de sphéroplastés.

MATERIEL

- Tubes Falcon 50 ml stériles et centrifugeuses pour tubes Falcon
- Robinet, le cylindre et le socle se trouvent en chambre froide du 2^{ème} étage (voir P. Béguin). **NE PAS OUBLIER DE SE RESERVER SUR LE CARNET.**
- Grand bol de 10 à 30 ml de suspension

PROTOCOLE DE PREPARATION DES CELLULES

- Ensemencer la souche de levure dans du milieu YPglu et incuber à 30°C avec agitation pendant la nuit. La DO de la culture n'importe pas sur la qualité de la lyse.
- Centrifuger la culture à 4°C pendant 5 min à 5 000 t/min dans des tubes Falcon.
- Peser le culot.
- Effectuer 1 lavage en resuspendant le culot à la pipette dans 20 ml d'eau.
- Centrifuger à 4°C pendant 5 min à 5 000 t/min. Le culot peut être congelé à -80°C.
- Resuspendre le culot dans le tampon choisi (+ inhibiteurs de protéases si nécessaire) (soit pour un poids humide de 2 g., resuspendre dans 10 ml de tampon).

PROTOCOLE DE DISRUPTION DES CELLULES

- Vérifier l'état de la bille du robinet.
- Enfoncer le piston dans le cylindre par en haut (sens de l'écriture) jusqu'au cran marqué. Poser le montage à l'envers (piston en bas) sur le trépied de plus grand écartement.
- Verser la suspension. Poser le socle au dessus et visser le robinet mais sans serrer.
- Remonter le piston doucement jusqu'à ce qu'une goutte de la suspension apparaisse au niveau du verseur. Visser le robinet mais sans serrer.
- Vérifier que l'appareil est en position down. Prendre le montage (piston, cylindre, socle) et le poser précautionneusement sur l'appareil en l'inversant (piston en haut et sens de l'écriture sur le cylindre). Bien le caler. Vérifier que le piston est perpendiculaire à la barre de l'appareil.
- Avant d'allumer l'appareil, vérifier que le bouton de droite de la pression est fermé. Allumer l'appareil, tourner la manette sur medium, monter la pression en tournant le bouton de la pression. Passer la manette à high pour atteindre 1250 sur le cadran (20 000 psi) doucement car il y a de l'inertie entre notre action sur le bouton et l'aiguille sur le cadran (NE PAS DEPASSER 1250 !)
- A 20 000 psi stabilisés : ouvrir doucement le robinet et récupérer l'homogénat goutte à goutte. Contrôler le débit en ouvrant ou fermant le robinet afin d'avoir toujours du goutte à goutte. On peut récupérer l'homogénat dans un Falcon posé dans un bécher contenant de la glace. Suivre la montée du montage.
- Lorsque vous avez terminé, mettre la manette sur down. Laisser descendre le montage et le démonter sur le trépied. Refaire un passage si ce sont des levures alors que pour les bactéries un passage suffit.

- Laver abondamment à l'eau puis rincer avec de l'eau distillée et bien déboucher les divers trous du socle.
- Centrifuger l'homogénat à 4°C pendant 30 min à 27 000 g.