**Datum: 11.09.2012 Otto-v.-Guericke-Universität Magdeburg**

**Bearbeiter: Robert Heyer Bioprozeßtechnik**

**Aktualisiert: 25.01.2019 - RH Universitätsplatz 2**

**Verantwortlicher: Dr. Dirk Benndorf Gebäude 28 Datum:**

**Arbeitsbereich: Labor 218/219 39106 Magdeburg Unterschrift:**

**Version: 8**

**Arbeitsanweisung: 2.3. Phenolextraktion mit Kugelmühle**

#### *Basiert auf Heyer & Kohrs et al. 2012*

**Anwendung:** Mechanischer Aufschluss von Zellen mittels Kugelmühle und zeitgleicher Phenolextraktion der Proteinfraktion.

**Änderungen in dieser Version**:

V7: Highlight gefährliche Stoffe, Anpassung Bestellnummer Reagenzien, Anpassung FASTPREP-Protokoll

V8: Verkürzte Option ohne Aceton und Ethanol Waschschritte

#### Verwendete Chemikalien:

|  |  |
| --- | --- |
| Reagenzien Firma/Bestellnummer | |
| Phenol (Giftschrank)  Betriebsanweisung beachten  Ammonium acetate  Silica beads  Succrose/ Saccharose  Urea / Harnstoff    Thiourea / Thioharnstoff (Giftschrank) Betriebsanweisung beachten  DTT    Methanol (Gefahrstoffabzug)  Betriebsanweisung beachten  Aceton  Ethanol | Phenol, #8.22296.1000, Merck (Darmstadt, Deutschland), M= 94,11 g/mol)  Ammonium acetate, Carl Roth (Karlsruhe Deutschland), #7869.1, M =77,08 g/mol)  0.5mm Zirconia/ Silica Beads, Carl Roth #N030.1  Sucrose, #1.07687.1000 Merck (Darmstadt, Deutschland), M = 342.29 g/mol)  Urea, AppliChem (Darmstadt, Deutschland) A1049.1000  Thiourea, Carl Roth, #HN37.3  1,4-Dithiothreitol (DTT) Applichem #A2948,0025  Methanol, ≥ 99,9%, Fisher Scientific A456-212  Acetone, ≥ 99%., VWR International (Darmstadt, Deutschland), #20066.321  Ethanol absolute, VWR International (Darmstadt), #20821.330E |

**Herstellung der Lösungen:**

Phenollösung: 10 g Phenol einwiegen

(**Gefäß wiegen -> im Abzug einfüllen, Gefäß verschließen, abwiegen)**

1 mL Milli-Q

(Lagerung bei Raumtemperatur im Abzug!)

0,1 M Ammoniumacetat in Methanol: 0,7708 g Ammoniumacetat einwiegen

Auffüllen auf 100 mL mit Methanol (Abzug)

(Lagerung bei -20 °C)

2 M Sucrose/Saccharose-Lösung: 68,46 g Sucrose einwiegen

Auffüllen auf 100 mL mit Milli-Q

(Lagerung bei 4 °C)

1 M Sucrose/Saccharose-Lösung: 34,23 g Sucrose einwiegen

Auffüllen auf 100 mL mit Milli-Q

(Lagerung bei 4 °C)

Harnstoffpuffer I: 8,41 g Harnstoff einwiegen

(enthält Harnstoff und Thioharnstoff) 3,04 g Thioharnstoff einwiegen

0,2 g DTT (0,01 g/mL)

Auffüllen auf 20 mL mit Milli-Q,

Lagerung bei 4°C

**Hinweis:**

Bei der Handhabung mit Phenol ist besondere Vorsicht geboten. Kontaminiertes Material ist in den vorgesehenen Gefahrgutbehälter zu entsorgen, Flüssigabfall darf nicht in den Ausguss gelanden.

Shieldskin-Handschuhe bei jedem Schritt mit Phenol verwenden.

Bei flüssigem aber schwer pipettierbarem Materiel kann eine angeschnittene Pipettenspitze (100- 1000 µL) benutzt werden.

Vor Verwendung von Sucroselösung prüfen, ob Kontamination mit Mikroorganismen vorliegt (Flockenbildung), in diesem Fall Lösung entsorgen.

4 °C kalter Harnstoffpuffer neigt bei langer Standzeit zur Kristallisation, vor Gebrauch rühren.

Alle Inkubationszeiten bei -20 °C können über Nacht verlängert und als Pausenpunkt genutzt werden (im Laborbuch vermerken)

\* Nach Publikation Heyer & Schallert 2019 (MPA) gibt es vereinfachtes Protokoll für Phenolextraktion, welches bei Bedarf auch genutzt werden kann. Im Wesentlichen werden dafür die letzten Waschschritte mit Aceton und Ethanol weggelassen.

**Durchführung:**

**Kugelmühle**

* Einwiegen von 1 g Silika-Perlen in ein 2 mL Reaktionsgefäß
* Einwiegen von 400 mg Probenmaterial/Zugabe von 400 µL Probenvolumen
* Zugabe von 400 µL 2 M Sucroselösung
* Zugabe von 700 µL Phenol
* Beladen der Kugelmühle mit 5 Reaktionsgefäßen pro Probe (eine Trommel)
* Aufschluss bei 30 Hertz für 10 min
* Zentrifugieren der Reaktionsgefäße zum Sedimentieren der Perlen und Ausbilden der Phasen (10 min, 10.000xg, RT )
* Abnehmen der oberen Phenolphasen der 5 Gefäße einer Probe, Zusammenführen in 15 mL Reaktionsgefäß
* Zugabe gleiche Menge 1 M Sucroselösung
* Schütteln (10 min, 60- 120 rpm, RT)
* Zentrifugieren (10 min, RT, 10.000xg)
* Abnehmen der oberen Phenolphase, Überführen in ein neues 15 mL Reaktionsgefäß
* Zugabe (4v/v) von eiskaltem Ammoniumacetat in Methanol
* Inkubation für 20 min bei –20 °C, Zentrifugieren (10 min, 10.000 g, 4 °C), Überstand dekantieren
* Zugabe (4v/v) von eiskaltem Ammoniumacetat in Methanol
* Inkubation für 20 min bei –20 °C, Zentrifugieren (10 min, 10.000 g, 4 °C), Überstand dekantieren
* weiter bei Pellet trocknen

***Nur bei besonderem Grund nötig***

* *Zugabe (3v/v) eiskaltes 80%-iges Aceton*
* *Inkubation für 15 min bei –20 °C, Zentrifugieren (10 min, 10.000 g, 4 °C), Überstand verwerfen*
* *Zugabe (3v/v) eiskaltes 70%-iges Ethanol*
* *Inkubation für 15 min bei –20 °C, Zentrifugieren (10 min, 10.000 g, 4 °C), Überstand verwerfen*
* *Zugabe (3v/v) eiskaltes 80%-iges Aceton*
* *Inkubation für 15 min bei –20 °C, Zentrifugieren (10 min, 10.000 g, 4 °C), Überstand verwerfen*
* *Zugabe (3v/v) eiskaltes 70%-iges Ethanol*
* *Inkubation für 15 min bei –20 °C, Zentrifugieren (10 min, 10.000 g, 4 °C), Überstand verwerfen*
* Pellet trocknen
* Zugabe 2 mL Harnstoffpuffer (zum Lösen des Pellets schütteln, wenn nötig auch über Nacht)
* Zugabe 1g Silika-Perlen
* Schütteln in der Kugelmühle (3min, 1.800 U/min)
* Zentrifugieren (5min, 10.000xg, 4°C)
* Übertragen des Überstandes in ein 2ml Eppendorf-Reaktionsgefäß

Langzeitlagerung der Proben bei -20 °C.

Wenn nach dem Zentrifugieren kein sauberes Pellet vorliegt (flockige Phase über dem Pellet), muss der flüssige Überstand darüber abgenommen werden und solange Ammoniumacetat in Methanol zugegeben werden (mit Inkubation und Zentrifugation wie zuvor), bis sich ein Pellet abtrennen lässt. Überstand verwerfen.

**FASTPREP**

* Einwiegen von 5 g Silika-Perlen in ein 50 mL Reaktionsgefäß
* Einwiegen von 2 g Probenmaterial/Zugabe von 2 mL Probenvolumen
* Zugabe von 2 mL 2 M Sucroselösung
* Zugabe von 3,5 mL Phenol
* Festes Verschließen der Proberöhrchen (ev. Abdichten mit Parafilm)
* Beladen der FASTPREP (gleichmäßig)
* Aufschluss bei 1.800 U/min für 5 min
* Zentrifugieren der Reaktionsgefäße zum Sedimentieren der Perlen und Ausbilden der Phasen (10 min, 10.000g, RT)
* Abnehmen der oberen Phenolphase, in neues 50 mL Reaktionsgefäß überführen
* Zugabe gleicher Menge 1 M Sucroselösung
* Schütteln in der FASTPREP (5min, 1.800U/min)
* Zentrifugieren (10 min, RT, 10.000xg)
* Abnehmen der oberen Phenolphase, überführen in ein neues 50 mL Reaktionsgefäß
* Zugabe (4v/v) von eiskaltem Ammoniumacetat in Methanol
* Inkubation für 20 min bei –20 °C,
* Zentrifugieren (10 min, 10.000xg, 4 °C)
* Überstand vorsichtig dekantieren
* Zugabe (4v/v) von eiskaltem Ammoniumacetat in Methanol
* Inkubation für 20 min bei –20 °C,
* Zentrifugieren (10 min, 10.000xg, 4 °C)
* Überstand vorsichtig dekantieren
* Pellet trocknen lassen
* Aufnahme in 1 ml Harnstoffpuffer I
* Zugabe 1g Silika-Perlen
* Schütteln in der FASTPREP (3min, 1.800 U/min)
* Zentrifugieren (5min, 10.000xg, 4°C)
* Übertragen des Überstandes in ein 2ml Eppendorf-Reaktionsgefäß

Langzeitlagerung bei -20°C in beschrifteten Boxen

**Abkürzungen:**

VE Vollentsalztes Wasser

M Molarität

DTT Dithiothreitol

RT Raumtemperatur