**ניסוי תרביות PRO לבדיקת נוכחות פפטידים מופרשים**

1. גידול סטרטר 9313 ל-10 ימים. שמתי סטרטר ב- 25.11.2015

גידול סטרטר של 1A3 ל-48 שעות.

1. גידול 9313 לשלב mid phase log (כ-5 ימים) - שמתי סטרטר ב- 25.11.2015

גידול 1A3 (20 שעות) – 1 ליטר ב-proMM, סרכוז g 2500 10 דקות והרחפה ב- pro99

מדידת התרביות בפקס:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **1A3-1** | **9313-2** | **9313-1** |  |
|  |  |  | **נפח** |
| 1.95E+08 | 2.96E+07 | 4.29E+07 | **ריכוז** |

מיהול 9313 לריכוז של 1x107  ו- 1x106

ו-1A3 לריכוז של 5x106 ו- 5x107

**מבנה הניסוי:** (נפח כל בקבוק 1 ליטר)

1 2 3 4 5 6 6

Pro99

9313

1X107

9313

1X106

Co-culture

9313 1x107

+1A3 5X105

1A3

5X106

Co-culture

9313 1x107

+1A3 5X106

בקבוק 1 – 250 מ"ל 9313-1, 2.5 מ"ל1A3

בקבוק 2 – 250 מ"ל 9313-1, 25 מ"ל 1A3

בקבוק 3 – 25 מ"ל 1A3

בקבוק 4 – 250 מ"ל 9313-1

בקבוק 5 – 25 מ"ל 9313-1

**מהלך הניסוי:**

1. גידול למשך 20 שעות באור ממושך באינקובטור ((27 μEm−2 s−1)
2. העמדת הניסוי בשעה 11:00 (כך שהניסוי יסתיים למחרת ב-7:00 בבוקר).

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 6 | 5 | 4 | 3 | 2 | 1 | T |
| 11:00 | 11:30 | 11:20 | 11:15 | 11:10 | 11:00 | 0 |
| 13:55 | 13:55 | 13:50 | 13:50 | 13:45 | 13:45 | 4 |
| 23:30 | 23:30 | 23:30 | 23:20 | 23:20 | 23:14 | 12 |
| 7:15 | 7:15 | 7:10 | 7:10 | 7:00 | 7:00 למחרת | 20 |

1. לקיחת דוגמאות לפקס בזמן 0,3,12,20 שעות
2. סרכוז התרביות במהירות g5000 למשך 10 דקות. סרכוז במבחנות 250 מ"ל.
3. סרכוז נוסף לפלט במבחנות אפנדורף במהירות g10,000 למשך 10 דקות. 2 שטיפות עם PBS.
4. שמירת הפלט במבחנת 2 מ"ל במקפיא -80
5. פילטרציה של הנוזל על פילטר 0.22. לשמור את הנוזל (spent media =SM).
6. להוסיף לנוזל 1 ml TFA

**ריכוז החלבון על קולונות SPE**

1. שטיפת הקולונה:
2. 1 מ"ל 100% אצטוניטריל
3. 1 מ"ל 80% אצטוניטריל
4. מים+ TFA 0.1% - 3 שטיפות
5. להעביר את ה-SM בקולונה SPE מסוג X. להשתמש במזרק 60 מ"ל מחובר לקולונה. לאסוף במיכל איסוף ולשפוך.
6. שטיפות - במידה ולא כל הנוזל עובר (נתקע) – לשטוף עם 2 מ"ל חומצה אצטית 0.5%
7. אלוציה – 1 מ"ל 40% אצטוניטריל, 1 מ"ל 80% אצטוניטריל. מחלקים ל-2 מבחנות אפנדורף (1 מ"ל בכל מבחנה)
8. מייבשים ב-speedvac O.N.
9. שומרים פלט במקפיא -80.

**טיפול בפלט:**

1. להרחיף את הפלט ב- 1 מ"ל מי ים סטריליים.
2. להוסיף 5 מיקרוליטר EDTA (סטוק 500mM, ריכוז סופי 1mM) ו-10 מיקרוליטר PMSF (סטוק 100mM, ריכוז סופי 1mM).
3. סוניקציה 30 שניות X 3 פעמים. בקרח.
4. סרכוז במהירות g10,000 למשך 10 דקות
5. לקיחת הנוזל למבחנה חדשה.
6. קביעת ריכוז בננודרופ.
7. למהול את החלבון ב- 10 מ"ל מי ים + 50 מיקרוליטר EDTA (סטוק 500mM, ריכוז סופי 1mM) + ו-100 מיקרוליטר PMSF (סטוק 100mM, ריכוז סופי 1mM).
8. להוסיף 12 מיקרוליטר TFA (לריכוז סופי של 0.1%).
9. להמשיך בפרוטוקול **ריכוז החלבון על קולונות SPE**

**אנליזת בטכניון**

תרביות מס',2,4 נשלחו לטכניון פלט+SUP. תרבית 5 נשלח רק פלט.