

Extraction de protéines de levures en conditions natives

Matériel et Solutions:

Lysis buffer 2x	(10mL)
40mM Tris pH8	400 µl de 1M
300mM NaCl	600 µl de 5M
H2O	9ml

Autoclaver, garder RT

Lysis buffer 1x (préparé fraîche avant utilisation) (1ml par extrait)

Lysis buffer 1x	500 µl de 2x
0,1% Triton X-100	10ul de 10% (faire frais 10µl dans 90 µl H2O chauffée)
1mM PMSF	5 µl de 0,2M
Cocktail inhibiteurs1x	1 µl de 1000x
H2O	342 µl

PI 7x

1 pilule dans 1,5ml

Méthode :

1. Inoculer 40ml de milieu avec la souche de levure désirée.
2. Lorsque la DO600= 0,6-0,8, récolter les cellules en centrifugant 6000rpm, 3min à 4°C.
3. Laver 2x le culot avec 20ml H2O stérile.
4. (facultatif) Laver 1x avec 10ml de glycérol 25% stérile froid et congeler le culot à -80.
5. Resuspendre le culot dans 250 µl Lysis Buffer 1X.
6. Ajout 300ul de billes de verre.
7. Vortex 15x30sec en alternant 30sec sur glace.
8. Transférer le liquide dans un eppendorf froid.
9. Laver 2x les billes avec 250 µl de buffer 1X en vortexant brièvement. Ajouter les lavages dans l'eppendorf de l'étape précédente.
10. Centrifuger le tube contenant l'extrait protéique 15min à 13000rpm à 4°C.
11. Transférer le surnageant (500-600 µl) dans un nouveau tube.
12. Ajouter environ 75µl de glycerol 80% froid pour une concentration finale de 10%.
13. Conserver l'extrait à -20°C