

Glycopeptidolipid Extraction

20190527 Quan HL

➤ Materials

- 7H9 broth (BD, 271310)
- Shaking incubator (37 °C, 150 rpm)
- Centrifuge (331호)
- Water sonication (320호)
- 유리 petri dish
- CHCl₃(chloroform) (amresco, 67-66-3)
- CH₃OH (methanol) (Merck)
- 0.2M NaOH (in CH₃OH)
- Acetic acid (J.T. Baker, 9508)

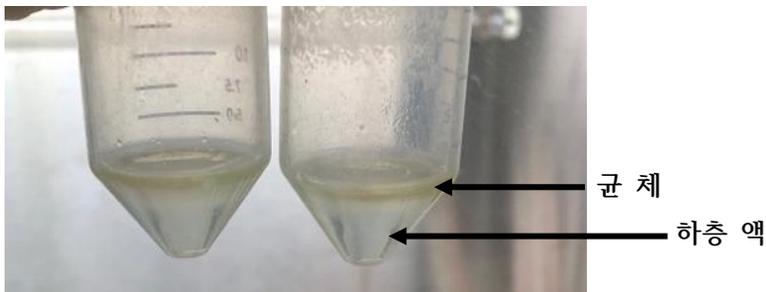
➤ Process

Step 1: Mycobacteria culture

- 7H9 broth 5 ml 에 *M. abscessus* 배양 후 100 ml 의 7H9 broth 에 접종하여 OD 0.5~0.8 까지 배양 함 (37 °C, 150 rpm)

Step 2: GPL Extraction

- 배양 한 균을 먼저 정량 한 50 ml tube 에 넣어 원심분리 (4,000 rpm, 15 min, RT)
- 상층 액을 버리고 pellet 무게를 정량 하여 1 g 당 10 ml 의 CHCl₃/CH₃OH (2:1)을 첨가하여 풀어 줌
- sonication (1 분 sonication 후 10 초 정지) 30 분간 진행 후 4 °C 에서 overnight 함
- 원심분리 (4,000 rpm, 15 min, 4 °C) 후 하층 액을 취하여 새 50 ml tube 에 옮김 (위에 떠 있는 균 체는 suction)



- 동량의 CHCl₃/CH₃OH/H₂O (4:2:1)을 첨가하여 centrifugation (3,000 rpm, 10 min, 4 °C)
- 하층 액을 취한 후 동량의 0.2M NaOH (in CH₃OH)를 첨가하여 37 °C 에서 45 분간 incubation
- Acetic acid (원액) 를 몇 방울 (2~3 방울) 떨어뜨려 중화

- 유리 petri dish 에 부어서 air dry 하여 solvent 를 제거
- $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (4:2:1)에 녹인 후 centrifugation (3,000 rpm, 10 min, 4 °C)하여 하층 액을 취함
- 유리 petri dish 무게를 측정 후 위 액체를 부어서 air dry 함



- 유리 petri dish 를 포함 한 무게를 측정 후 GPL 의 무게를 계산하여 $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (2:1)에 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 로 녹임.