

PURIFICACIÓN DE SNAP-25

1. Transformación.

- 1.1. Transformar células BL21-CP con la construcción SNAP-25-pGEX-KG, según el protocolo de transformación de células BL21-CP.
- 1.2. Usar placas Amp+Cloranfenicol.

2. Preinóculo.

- 2.1. Inocular, con un palillo estéril, una colonia en 100 ml de LB y añadir:
100 µl de Amp (50mg/ml), 100 µl de Glu (40%) y 400 µl de Cloranfenicol (34mg/ml etanol)
- 2.2. Crecer ON a 37°C y 200 rpm.

3. Inóculo.

- 3.1. Inocular 1L de 2xYT con los 100 ml del preinóculo (incluir el palillo) y añadir:
1ml de Amp (50mg/ml), 1ml de Glu (40%) y 4ml de Cloranfenicol (34mg/ml)
- 3.2. Crecer hasta fase semilogarítmica (D.O.=0.6-0.8) a 37°C y 200 rpm (1h y 45 min. aprox.) Coger 1ml para gel, centrifugar y resuspender el pellet en 40 µl de Buffer de disgregación.
- 3.3. Añadir 1 ml de IPTG (1mM) para inducir la expresión de VAMP-2B.
- 3.4. Crecer durante 5h a 30°C y 200 rpm.
- 3.5. Coger 1ml para gel, centrifugar y resuspender el pellet en 80 µl de Buffer de disgregación. Centrifugar en rotor JA-10 durante 15 min a 6000 rpm y 4°C.
NOTA: En este paso se pueden congelar las células y seguir al día siguiente.

4. Sonicación.

- 4.1. Lavar el pellet con NaCl 1%.
- 4.2. Añadir PBS: 50 ml/L de cultivo.
- 4.3. Añadir lisozima, PMSF, iodoacetamida, EDTA y DTT, para 50 ml de tampón:
Lisozima: 1 ml de stock 20 mg/ml (concentración final: 0.4 mg/ml de tampón).
PMSF: 1 ml de stock 100 mM (concentración final: 2 mM).
Iodoacetamida: 2.5 ml de stock 100 mM (concentración final: 5 mM).
EDTA: 2.5 ml de stock 100 mM (concentración final: 5 mM).
DTT: 2.5 ml de stock 100 mM (concentración final: 5 mM).
Resuspender y repartir en dos tubos de T-35 (25 ml/tubo aprox.).
- 4.4. Sonicar 6 x 45" en hielo, Pw=3 a 7 (3, 4, 5, 6, 7 y 7). No hacer burbujas.
- 4.5. Añadir PMSF y iodoacetamida (igual que en 4.3).
- 4.6. Añadir tritón: 3 ml de 20% (concentración final: 1%)
- 4.7. Centrifugar 30 min. a 70.000 g y 4°C (24.000 rpm en T-35). Coger el sobrenadante.
Durante este tiempo, lavar la agarosa (Ni-NTA Agarose, de Quiagen):
- 4.8. Coger 4 ml de resina / L de cultivo en un tubo corning de 15 ml y centrifugar 1 min a 2000 rpm en centrífuga de mesa de Amparo.
- 4.9. Lavarla tres veces con Buffer de purificación (2 ml/ml de resina) centrifugando 1 min a 2000 rpm en centrífuga de mesa de Amparo.
- 4.10. Quitar el sobrenadante de la resina y repartirla en 2 tubos corning de 15 ml / L de cultivo.
- 4.11. Añadir el sobrenadante de proteína solubilizada (paso 4.7) a la resina. Mezclar en noria, a 4°C y ON.

5. Purificación.

- 5.1. Pasar la agarosa a una columna y eluir el "Run Trough".
- 5.2. Lavar la columna con abundante Buffer de purificación hasta D.O. < 0.01.

5.3. Cortar con trombina:

Pasar la agarosa a un eppendorf de 2 ml. Cada eppendorf contiene 1.5 ml de agarosa + 0.4 ml de buffer de lavado + 25 µl de trombina. Cortar 5 horas a temperatura ambiente o O.N. a 4°C.

5.4. Desactivar la trombina con PMSF 2 mM.

5.5. Centrifugar 1 min. a 14000 rpm.

5.6. Añadir 200 µl de buffer de purificación a cada eppendorf con agarosa. Dar vórtex, centrifugar 5 min. a 14000 rpm. y unir los sobrenadantes.

5.7. Repetir dos veces más el paso anterior, unir los sobrenadantes y congelar la proteína.

Hemos recogido así, 1 ml de SNAP-25 en cada eppendorf, es decir 1 ml / 500ml de cultivo, o lo que es lo mismo, 2 ml / L de cultivo.

6. Medir concentración.

Hacer una dilución 1:2 y 1:10 de la proteína purificada, para medir la concentración.

Medir la concentración por RCDC-Protein Assay (Bio-Rad) y/o por el método BCA (Pierce), en el segundo caso, después de extraer el DTT mediante columna HiTrap Desalting (Pharmacia) o mediante diálisis.

Rendimiento= de 10-15 mg de SNAP-25 por litro de cultivo.

TAMPONES UTILIZADOS

(Purificación de SNAP-25)

Buffer de Disgregación:

Para hacer 10 ml:

- Agua destilada..... : 4.3 ml
- Tris 50 mM pH 6.8..... : 1 ml de stock 0.5 M
- Glicerol 10%..... : 2 ml de stock 50%
- SDS 2%..... : 2 ml de stock 10%
- β -mercaptoetanol 1%..... : 0.1 ml
- Azul de bromofenol 0.05%..... : 0.5 ml de stock 1%
- EDTA 1 mM..... : 0.1 ml de stock 100 mM

PBS:

Para hacer 500 ml al 10x:

- NaCl..... : 40 g
- KCl..... : 1 g
- Na_2HPO_4 : 7.2 g
- KH_2PO_4 : 1.2 g

Ajustar pH a 7.4 con HCl.
Autoclavar 15 min. a 121°C

Buffer de purificación:

Para hacer 400 ml al 5x:

- Hepes 20 mM..... : 10.41 g
- NaCl 100 mM..... : 11.69 g
- Octil Glucósido (O.G.) 0.5%..... : 10 g

añadir antes de usar (para 100 ml):

- DTT 5 mM..... : 5 ml de stock 100 mM