

SNAP-25

PURIFICACIÓN

1. Agarosa necesaria: 1000 ml cultivo \longrightarrow 0.5 ml resina. Lavarla con HBS (20 mM Hepes, 100 mM NaCl) + 0.05 % O.G. + 5 mM DTT.
2. Unir el sobrenadante de la sonicación a la agarosa o/n a 4°C, 95 rpm.
3. Centrifugar a 2000 rpm durante 5 min. El sobrenadante es el RT, del cual se coge una alícuota. El pellet se lava con 20 mM Hepes + 100mM NaCl + 0.05 % O.G. + 5 mM DTT, hasta $OD_{280} = 0.01$. Coger alícuotas de lavados y correr gel antes de cortar.
4. Corte con trombina: por cada 500 μ l de resina, añadir 475 μ l de buffer de lavado + 25 u trombina. Dejar cortando 2 h. Tomar alícuotas.
5. Desactivar la trombina con [PMSF]_F = 2 mM.
6. Centrifugar 5 min a 2000 rpm.
7. Lavar los pocillos con 500 μ l de tampón por cada 700 μ l que se añadieran con la trombina. Volver a centrifugar y unir los sobrenadantes.
8. Filtrar la proteína y coger alícuotas para gel y BCA.
9. Al pellet se le añade glutatión (igual cantidad que había de resina). Agitar bien y dejar 10 min. Centrifugar a 2000 rpm durante 5 min. Alícuota del sobrenadante.
10. Dializar en eppendorfs perforados y tapados con membrana de diálisis 48 horas, cambiando el buffer: 20mM Hepes, 100mM NaCl, 0.05 OG, a las 24 horas.