

PURIFICACION DE KCSA

(Modificado de Splitt, H et al. 2000)

1. Transformación.

- 1.1. Transformar células M15(Prep4) con la construcción KcsA-pQE30 n°2.
- 1.2. Usar placas Amp+Kan.

2. Preinóculo.

- 2.1. Inocular una colonia en 100ml de LB y añadir 100 ml de:
Amp (50mg/ml), Kan (25mg/ml) y Glu (40%)
- 2.2. Crecer ON a 37°C y 200 rpm.

3. Inóculo.

- 3.1. Inocular 1L de 2xYT con los 100ml del preinóculo y añadir 1ml de:
Amp (50mg/ml), Kan (25mg/ml) y Glu (40%)
 - 3.2. Crecer hasta fase semilogarítmica (D.O.= 0.6-0.8) a 30°C y 200 rpm. (aprox. 1h y 45 min.).
 - 3.3. Añadir 500 ml IPTG (IM) para inducir la expresión de KcsA.
 - 3.4. Crecer durante 2h a 30°C y 200 rpm.
 - 3.5. 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 50 ml/L de cultivo (10ml/g de células aprox.) de tampón de resuspensión.
- 4.3. Añadir lisozima y PMSF, para 50 ml de tampón:
Lisozima: 1 ml de 20 mg/ml (concentración final: 0.4 mg/ml de tampón)
PMSF: 375 µl de 100 mM (concentración final : 0.75 mM)
Resuspender y repartir en dos tubos de T-35 (25 ml/tubo).
- 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 (0.75 mM).
- 4.6. Centrifugar 1h a 100.000 g y 20°C (35.000 rpm en T-35). Coger el pellet.
- 4.7. Añadir 20 ml/L de cultivo de tampón de solubilización (10 ml/tubo) y PMSF (0.75 mM).
Resuspender con politrón (fuerza 3) durante 30 seg seguido de 30 seg en hielo, 4 veces cada tubo.
- 4.8. Centrifugar 1h a 100.000 g y 20°C (35.000 rpm en T-35), coger el sobrenadante.

Durante esta hora lavar la resina (Ni-NTA Agarose, de Quiagen):
 - 4.9. 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.
 - 4.10. Lavarla dos veces con tampón de solubilización (sin PMSF) (2 ml/ml de resina) centrifugando 1 min a 2000 rpm en centrífuga de mesa de Amparo.
- 4.11. Quitar el sobrenadante de la resina y repartirla en 2 tubos corning de 15 ml / L de cultivo.
- 4.12. Añadir el sobrenadante de proteína solubilizada (paso 4.8) a la resina. Mezclar en noria, a temp. amb. y ON.

NOTA: Todos los pasos posteriores se realizan a temperatura ambiente.

5. Purificación.

- 5.1. Pasar la mezcla de la resina con la proteína a una columna (Bio-Rad) (2 columnas / L de cultivo). Dejar eluir el “Run Trough”.
- 5.2. Preparar 250ml de tampón de lavado (sin PMSF) y lavar la resina rellenando 4 veces las columnas.
- 5.3. Medir absorbancia a 280. Si Abs > 0.01 seguir lavando; si Abs ≤ 0.01 eluir la proteína.
- 5.4. Para eluir la proteína:
 1. Cada columna tiene 1ml de agarosa. Dejar bajar el buffer de lavado hasta la marca de 1.4 ml.
 2. Con una micropipeta P1000, pasar la agarosa de cada columna a un eppendorf de 2 ml (un eppendorf por cada columna).
 3. Añadir 200 µl de tampón de lavado por las paredes de la columna, recoger el resto de agarosa y añadirlo al eppendorf anterior.
 4. Centrifugar 10 seg a 3000 rpm. en microfuga y tirar el sobrenadante.
 5. Añadir 400 µl de tampón de elución (con 600 mM de imidazol) a cada eppendorf, dar vortex y mezclar en noria 15 min. Centrifugar 1 min a 14000 rpm en microfuga y recoger el sobrenadante (que debe llevar KcsA) en un eppendorf nuevo, de 1.5 ml.
 6. Añadir 200 µl de tampón de elución a cada eppendorf, dar vortex y mezclar en noria 30 min. Centrifugar 1 min a 14000 rpm en microfuga y añadir el sobrenadante a su correspondiente eppendorf.
 7. Añadir 200 µl de tampón de elución a cada eppendorf y repetir el proceso mezclando 1 hora.

Hemos recogido así, 800 µl de KcsA en cada eppendorf, es decir 800 µl / 500ml de cultivo, o lo que es lo mismo, 1.6 µl / L de cultivo.

6. Medir concentración.

Medir la concentración con patrón de BSA en una electroforesis y/o por DC-Protein Assay (Bio-Rad), en este segundo caso, después de extraer el imidazol con una columna HiTrap Desalting (Pharmacia).

Método por gel de BSA:

- Hacer BSA patrón: Mezclar 50 µl de BSA (2 mg/ml) + 50 µl de buffer sample de KcsA.
 - Cargar 5 calles del gel con 2, 4, 6, 8 y 10 µl del BSA patrón.
 - Cargar 5 o 10 µl de la muestra de KcsA.
 - Correr la electroforesis (a 100 y 180 mV), teñir un mínimo de 2 horas, aconsejable O.N.
 - Desteñir, escanear y analizar las bandas por densitometría (programa 1-D Manager 2.0).
- Se halla la concentración de la proteína por un análisis densitométrico de las bandas.

Método por DC-Protein Assay (Bio-Rad):

Seguir el protocolo detallado para esta técnica.

Rendimiento= de 2 a 4 mg de KcsA por litro de cultivo.

7. Reconstituir y congelar.

Reconstituir en vesículas lipídicas a una relación L/P = 500 (relación molar).

Utilizar el método de reconstitución por Sephadex G-50 fino.

Centrifugar para concentrar la proteína en 1 ml y congelar en N₂ líquido en alícuotas de 100 µl.

Protocolo de reconstitución por Sephadex G-50 fino:

- Mezclar KcsA purificada en DDM 1 mM con el lípido a una relación L/P = 500 (relación molar) durante 1h, en noria a temperatura ambiente.
- Pasar a una columna de Sephadex G50 fino (15 a 20 ml de lecho), previamente empaquetada y equilibrada con tampón de reconstitución.
- Recoger 15 alícuotas de 1 ml. KcsA reconstituída sale en las alícuotas 8, 9 y 10.

NOTA: En este paso se puede congelar la proteína.

- Juntar las alícuotas 7 a 12 y centrifugar 30 min. a 4°C y 55000 rpm en T-70, en tubos de 8 ml (tapón negro).
- Resuspender en 1 ml de tampón de reconstitución, repartir en alícuotas de 100 µl y congelar en N₂ líquido.

TAMPONES UTILIZADOS

Tampón de resuspensión:

Para hacer 250 ml al 2x:

- Hepes 20 mM, pH 7.5..... : 2.6 g.
- Sacarosa 0.45 M..... : 77 g.
- EDTA 8 mM..... : 40 ml de stock 100 mM (pH 8).

añadir antes de usar (para 50 ml):

- PMSF 0.75 mM : 375 ml de stock 100 mM.
- Lisozima 0.4 mg/ml..... : 1 ml de stock a 20 mg/ml.

Tampón de solubilización:

Para hacer 250 ml:

- Hepes 20 mM, pH 7.5..... : 1.3 g.
- KCl 100 mM..... : 1.85 g.
- Imidazol 10 mM..... : 0.37 g.
- Dodecilmaltosido 10 mM..... : 1.275 g.

Añadir antes de usar (para 20 ml):

- PMSF 0.75 mM..... : 150 ml de stock 100 mM.

Tampón de lavado:

Para hacer 250 ml al 10x:

- Hepes 20 mM, pH 7.5..... : 13 g.
- KCl 100 mM..... : 18.5 g.
- Imidazol 10 mM..... : 3.7 g.
- Dodecilmaltosido 1 mM..... : 1.275 g.

Tampón de elución:

Para hacer 20 ml:

- Imidazol 600 mM..... : pesar 888 mg.

- Añadir 20 ml de tampón de lavado.

Tampón de reconstitución:

Para hacer 1 L a 10x:

- Hepes 10 mM, pH 7..... : 23.83 g.

- KCl 100 mM..... : 74.56 g.

NOTA: De Hepes, usar el ácido, no la sal de sodio. Ajustar el pH con KOH, no con NaOH.