

PURIFICACIÓN DE SYNT-1A

1. Transformación.

- 1.1. Transformar células BL21-CP con la construcción VAMP-1B-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 y EDTA, para 50 ml de tampón:
Lisozima: 1 ml de 20 mg/ml (concentración final: 0.4 mg/ml de tampón).
PMSF: 1 ml de 100 mM (concentración final: 2 mM).
Iodoacetamida: 2.5 ml de 100 mM (concentración final: 5 mM).
EDTA: 2.5 ml de 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 pellet.

5. Solubilización.

- 5.1. Lavar el pellet resuspendiéndolo en 5 ml de buffer de resuspensión (Tris 50 mM, NaCl 100 mM, EDTA 10 mM y tritón 1%, pH = 8) con politrón.
- 5.2. Centrifugar 10 min. en T-35 a 22000 rpm y coger el pellet.
- 5.3. Repetir otra vez los puntos 5.1 y 5.2.
- 5.4. Resuspender en 5 ml de buffer de solubilización (Tris 50 mM, NaCl 100 mM, EDTA 10 mM y sarkosyl 1%, pH = 8) con politrón. Dejar en noria, O.N. a 4°C.
- 5.5. Centrifugar 10 min. en T-35 a 20000 rpm y coger el sobrenadante.
- 5.6. Añadir al sobrenadante 45 ml de buffer de purificación (Hepes 10 mM, O.G. 0.6%), para diluirlo 10 veces y llevarlo a 0.1% sarkosyl.
Lavar la agarosa (Ni-NTA Agarose, de Quiagen):
- 5.7. Coger 3 ml de agarosa / L de cultivo en un tubo corning de 15 ml y centrifugar 1 min a 2000 rpm en centrífuga de mesa de Amparo.
- 5.8. Lavarla tres veces con buffer de purificación (2 ml/ml de agarosa) centrifugando 1 min a 2000 rpm en centrífuga de mesa de Amparo.
- 5.9. Quitar el sobrenadante de la agarosa y repartirla en 2 tubos corning de 15 ml / L de cultivo.
- 5.10. Añadir la agarosa al sobrenadante de proteína solubilizada (paso 5.6), 1.5 ml de agarosa por cada 50 ml de sobrenadante. Mezclar en noria, a 4°C y ON.

6. Purificación.

- 6.1. Pasar la agarosa a una columna y eluir el “Run Trough”.
- 6.2. Lavar la columna con abundante buffer de purificación hasta D.O. < 0.01.
- 6.3. 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.
- 6.4. Desactivar la trombina con PMSF 2 mM.
- 6.5. Centrifugar 1 min. a 14000 rpm.
- 6.6. Añadir 200 µl de buffer de purificación a cada eppendorf con agarosa. Dar vórtex, centrifugar 5 min. a 14000 rpm. y unir los sobrenadantes.
- 6.7. Repetir dos veces más el paso anterior, unir los sobrenadantes y congelar la proteína.

Hemos recogido así, 1 ml de Sintaxina–1A en cada eppendorf, es decir 1 ml / 500ml de cultivo, o lo que es lo mismo, 2 ml / L de cultivo.

7. 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).

Rendimiento= de 6 mg de Sintaxina por litro de cultivo, aprox.

TAMPONES UTILIZADOS

Purificación de Sintaxina-1A)

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%
- -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

-

Buffer de resuspensión:

Para hacer 100 ml:

- Tris 50 mM : 0.6 g
- NaCl 100 mM : 0.58 g
- EDTA 10 mM : 10 ml de stock 100 mM
- Tritón 1% : 1 ml

Ajustar pH a 8.

-

Buffer de solubilización:

Para hacer 100 ml:

- Tris 50 mM : 0.6 g
- NaCl 100 mM : 0.58 g
- EDTA 10 mM : 10 ml de stock 100 mM
- Sarkosyl 1% : 1 g

Ajustar el pH a 8.

-

Buffer de purificación:

Para hacer 200 ml al 10x:

- Hepes 10 mM : 5.21 g
- O.G. 0.6% : 12 g

Ajustar el pH a 7.