

VII. Purificación de la proteína verde fluorescente (GFP) por IMAC-Ni

a) Antecedentes

En esta técnica se describe cómo purificar una proteína en una columna de IMAC-Ni y una columna de filtración en gel, utilizando a la proteína verde fluorescente (GFP) expresada a partir del plásmido pCRIb. La proteína tiene un tracto de histidinas en su extremo N-terminal, lo cual permite su purificación por IMAC. GFP (debido a su fluorescencia intrínseca) es una excelente proteína para aprender el protocolo de purificación por filtración en gel.

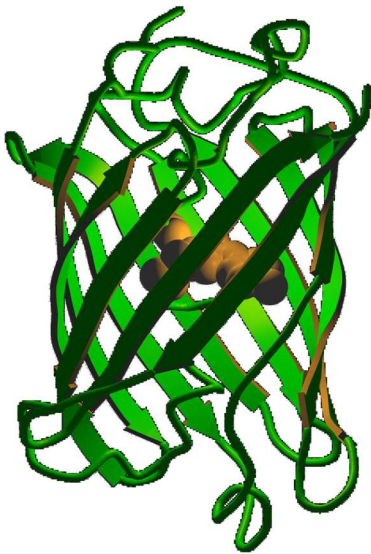


Fig. 22. Estructura en tres dimensiones de la proteína verde fluorescente (GFP) producida por la medusa *Aequorea victoria*. Esta proteína emite fluorescencia de forma intrínseca por un cromóforo que se forma al enlazar 3 aminoácidos.

b) Protocolo

Pasos previos:

Transformar el plásmido pCRIb (con resistencia a kanamicina). Inocular medio LB con antibiótico. El cultivo es crecido a 37 °C hasta llegar a una OD₆₀₀ de 0.6 a 0.8 y se induce con 0.5 M de IPTG.

Purificación

1. El cultivo celular inducido es centrifugado a 5000 rpm (rotor JA-10) por 12 minutos.
2. El pellet es resuspendido en 40 ml de buffer de lisis (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 200 mM NaCl). Posteriormente a la muestra resuspendida se le agrega 0.1 mg / ml de lisozima y se deja incubando por 30 minutos con agitación continua.
3. Al momento de sonicar agregar PMSF a 1 mM final
4. La bacteria es lisada por sonicación (6 ciclos) y se centrifuga a 15000rpm (rotor Ja-20) por 30 minutos at 4 °C.
5. El sobrenadante es filtrado con un tamaño de poro de 0.45 µm y posteriormente pasado por una columna de 1 ml Ni-Sepharose FF, la columna previamente es equilibrada con el buffer de lisis conteniendo 5 mM de imidazol (el proveniente de 1 litro de medio inducido en cada columna).
6. Se hacen 3 lavados con 15 ml de buffer de lisis con 5 mM Imidazol, 15 ml de buffer de lisis con 20 mM imidazol y 15 ml de buffer de lisis con 40 mM imidazol.

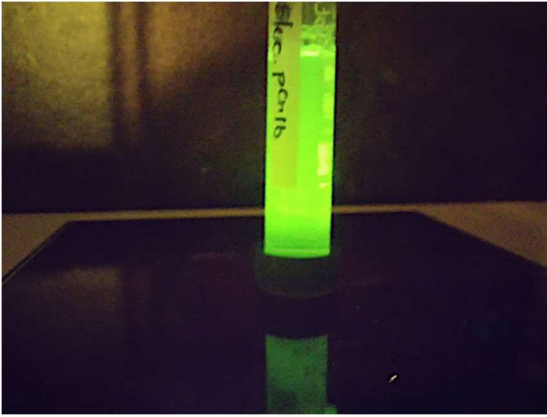


Fig. 23. GFP purificada a partir de vector pCri.

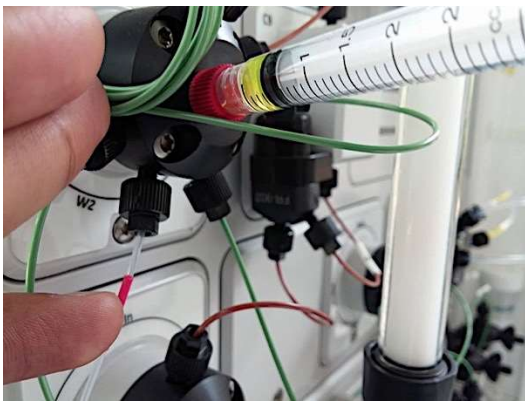


Fig. 24. Inyección de GFP en un sistema ÄKTA-FLPC.

Elución

7. La GFP es eluída con 5 ml de buffer de lisis con 500 mM imidazol.

Diálisis

8. La elución es dializada en 1 L de buffer: 20 mM Tris pH 8.0, 100 mM NaCl, 2 mM EDTA y 5 mM DTT.

2do paso de purificación

9. Realizar una filtración en gel en una Sephadex 200 o Sephadex 75.

Buffer de filtración en gel: 20mM Tris pH8.0, 100 mM NaCl, 2 mM EDTA y 5 mM DTT.