

Lab 8 - Purificação da proteína recombinante

Obtenção das bactérias recombinantes (este procedimento foi feito anteriormente à aula).

- 1.1. Inocular 500 mL de meio LB contendo 50 μ g/mL de canamicina com a *E. coli* portadora do plasmídeo de expressão pET-Rrp47 e incubar a 37°C com agitação até densidade ótica a 600nm (DO₆₀₀) de 0,6.
- 1.2. Adicionar IPTG para a concentração final de 0,5 mM e incubar por 3h 37°C com agitação.
- 1.3. Para cada grupo, centrifugar 10 mL da cultura induzida de bactérias, ressuspender as células coletadas em 1 mL de meio de cultura e transferi-las para um tubo de microcentrifuga de 2mL. Centrifugar de novo, remover sobrenadante e congelar as bactérias em freezer -80°C até o uso (item 2).

2. Purificação da proteína His-Rrp47 em condições desnaturantes – 14/06/2013.

- 2.1. Marque 7 tubos (tipo Eppendorf), conforme a tabela abaixo. Coloque 20 μ L de tampão de amostra em cada um, para usar nos passos indicados.

Marca no tubo	Descrição da amostra	Item do protocolo	Observações
L	Lisado de bactérias	2.2	
FT	<i>Flow-through</i>	2.6	
W1	Lavado 1	2.8	
W2	Lavado 2	2.9	
E1	Eluição 1	2.11	
E2	Eluição 2	2.12	
E3	Eluição 2	2.12	

- 2.2. Adicione ao “pellet” de bactérias 500 μ L de solução de lise. Agite com o auxílio do vórtex várias vezes, até que a suspensão fique translúcida. Incube no banho-maria fervente (~100°C) por 10 minutos. Antes de prosseguir, mostre o tubo para os professores ou monitores.
- 2.3. Centrifugue a 12.000 rpm por 10 min para retirar os debris celulares. Após a centrifugação, transfira o sobrenadante para outro tubo. Retire uma amostra de 20 μ L e transfira para o tubo marcado como L (lisado). Mantenha o tubo L em gelo e continue com o tubo contendo o restante do lisado de bactérias. Transferir o lisado para o tubo contendo 50 μ L de resina Ni-NTA.
- 2.5. Mantenha a temperatura ambiente, agitando delicadamente o tubo (sem vórtex) a cada 5 min, por 30 min. A proteína deve se ligar à resina neste passo.

Atenção: a partir do próximo passo, a resina deve sempre se manter no fundo do tubo. Ao retirar o sobrenadante, pipete devagar e com cuidado, para a resina não subir na ponteira. Caso isso aconteça, centrifugue novamente por 1 min.

- 2.6. Centrifugue a 12.000 rpm por 1 min para precipitar a resina. (Lembre-se de equilibrar a centrífuga). Separe uma alíquota de 20 μ L do sobrenadante, transferindo-a para o tubo FT (*flow-through*, ou seja, tudo que não ligou na resina), mantendo-o no gelo. Descarte o restante do sobrenadante, retirando-o cuidadosamente com a pipeta, mantendo a resina no fundo do tubo.

- 2.7. Adicione 250 µL do tampão de lavagem no tubo com a resina e agite delicadamente. Centrifugue a 12.000 rpm por 1 min.
- 2.8. Retire 20 µL do sobrenadante e coloque no tubo **W1** (lavado 1). Descarte o restante do sobrenadante, mantendo a resina no fundo do tubo.
- 2.9. Repita os passos 2.7 e 2.8: Adicione 250 µL do tampão de lavagem no tubo com a resina e agite delicadamente. Centrifugue por 1 min. Retire 20 µL do sobrenadante e coloque no tubo **W2** (lavado 2). Descarte o restante do sobrenadante, mantendo a resina no fundo do tubo.
- 2.10. Adicione 250 µL do tampão de eluição no tubo com a resina e agite delicadamente. Centrifugue a 12.000 rpm por 1 min.
- 2.11. Retire 25 µL do sobrenadante e coloque no tubo **E1** (eluição 1). Guarde o restante do sobrenadante em outro tubo e prossiga com a resina no fundo do tubo.
- 2.12. Repita os passos 2.10 e 2.11 duas vezes, originando os tubos **E2** e **E3**.
- 2.13. Incube todas as amostras por 5 min a 85°C. Guarde-as num saquinho tipo ZipLock, etiquete com o nome do grupo e entregue aos monitores ou professores. As amostras serão armazenadas a -20°C até a sua análise.

Soluções para a purificação da proteína:

Resina de Ni-NTA

Tampão de lise (pH=8,0)	Tampão de lavagem (pH=6,3)	Tampão de eluição (pH = 4,5)
100 mM NaH ₂ PO ₄	100 mM NaH ₂ PO ₄	100 mM NaH ₂ PO ₄
10 mM Tris-HCl	10 mM Tris-HCl	10 mM Tris-HCl
8 M ureia	8 M ureia	8 M ureia
Ajustar pH para 8,0	Ajustar pH para 6,3	Ajustar pH para 4,5