

Purificazione della proteina di fusione GST-GFP mediante cromatografia di affinità

La possibilità di esprimere proteine ricombinanti come proteine di fusione con un *tag* consente di sfruttare le proprietà della sequenza *tag* per ottenere la purificazione della proteina mediante cromatografia di affinità. Uno dei *tag* proteici più utilizzati per questo scopo è la glutatione-S-trasferasi (GST), una proteina di 26 kDa che catalizza reazioni di detossificazione coniugando il glutatione ridotto (GSH) a composti xenobiotici. La GST ha elevata affinità per il GSH ed è possibile purificarla su una resina con GSH immobilizzato.

La proteina di fusione GST-GFP è espressa in *E. coli* utilizzando il plasmide pGEX-2T che contiene la sequenza codificante della GST di *Schistosoma japonicum*. L'espressione di GST-GFP è posta sotto il controllo del promotore *tac*, inducibile con IPTG. Le cellule vengono cresciute a 37°C in terreno LB + ampicillina a OD₆₀₀ 0.6-0.8 e indotte con IPTG 0.1 mM per 4 ore.

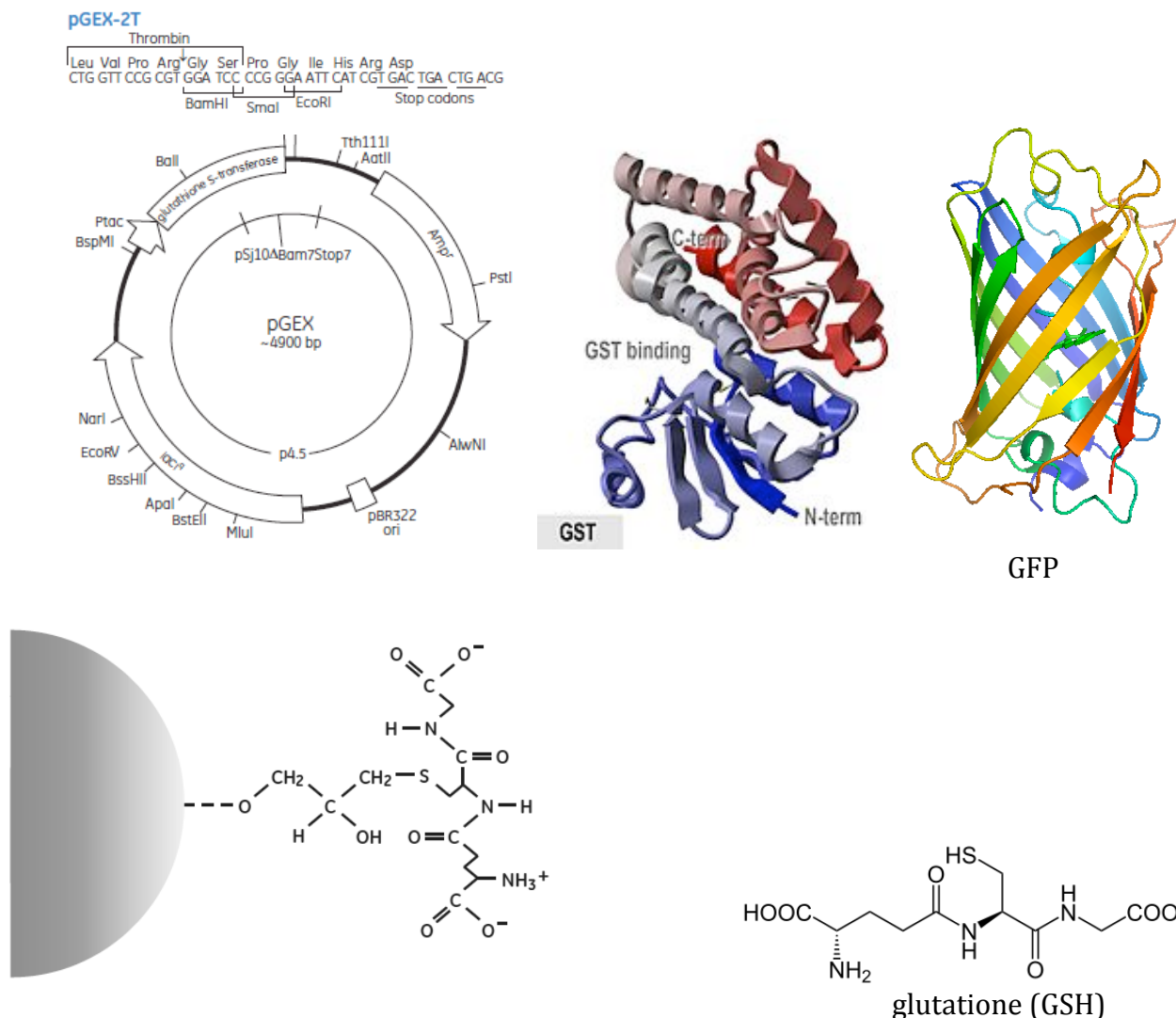


Fig 5.2. Terminal structure of Glutathione Sepharose. Glutathione is specifically and stably coupled to Sepharose by reaction of the SH-group with oxirane groups obtained by epoxy-activation of the Sepharose matrix. The structure of glutathione is complementary to the binding site of glutathione S-transferase.

Materiali

Sospensione di cellule batteriche in tampone di lisi (PBS)

Colonna cromatografica con 4 ml resina GSH-Sepharose

Tampone di legame: PBS (potassio fosfato 20 mM pH 7.4, NaCl 150 mM)

Tampone di eluizione: Tris-HCl 50 mM pH 8 contenente GSH 10 mM

Procedura

Le cellule (circa 0.5 ml *pellet*) sono risospese in 10 ml di tampone di lisi.

Lisare le cellule mediante sonicazione (9 cicli da 30 sec alternati a 30 sec in ghiaccio).

Centrifugare il lisato a 9000 rpm per 15 min.

Durante la centrifugata, equilibrare la resina con il tampone di legame (15 ml): con la pipetta far scorrere il tampone sulle pareti della colonna in modo da evitare il più possibile di muovere la resina. Lasciare circa 1-2 mm di tampone al di sopra della resina e chiudere la colonna.

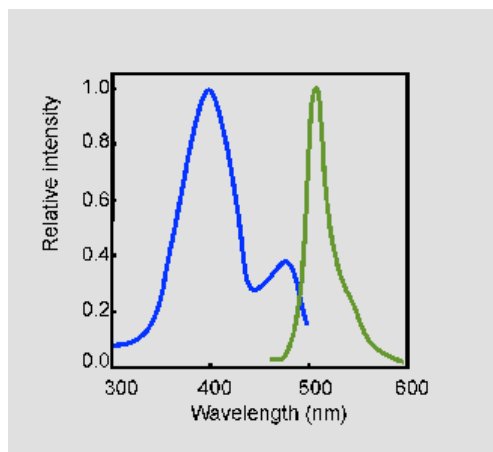
Prelevare il supernatante della centrifugata (lisato batterico) e passarlo sulla resina.

Mandare a secco la resina e immediatamente lavare con tampone di legame (15 ml) per rimuovere contaminanti legati debolmente.

Mandare a secco la resina ed eluire la proteina con tampone di eluizione (8 ml) raccogliendo i primi 2 ml in una provetta e i successivi 4 ml in una seconda provetta.

La presenza della proteina di fusione GST-GFP è indicata dal colore verde delle frazioni, dovuto al cromoforo della GFP. La fluorescenza della proteina di fusione GST-GFP può essere osservata con un transilluminatore UV.

Spettro di fluorescenza della GFP



Spettro di eccitazione (blu) e spettro di emissione (verde)