

Protocolos

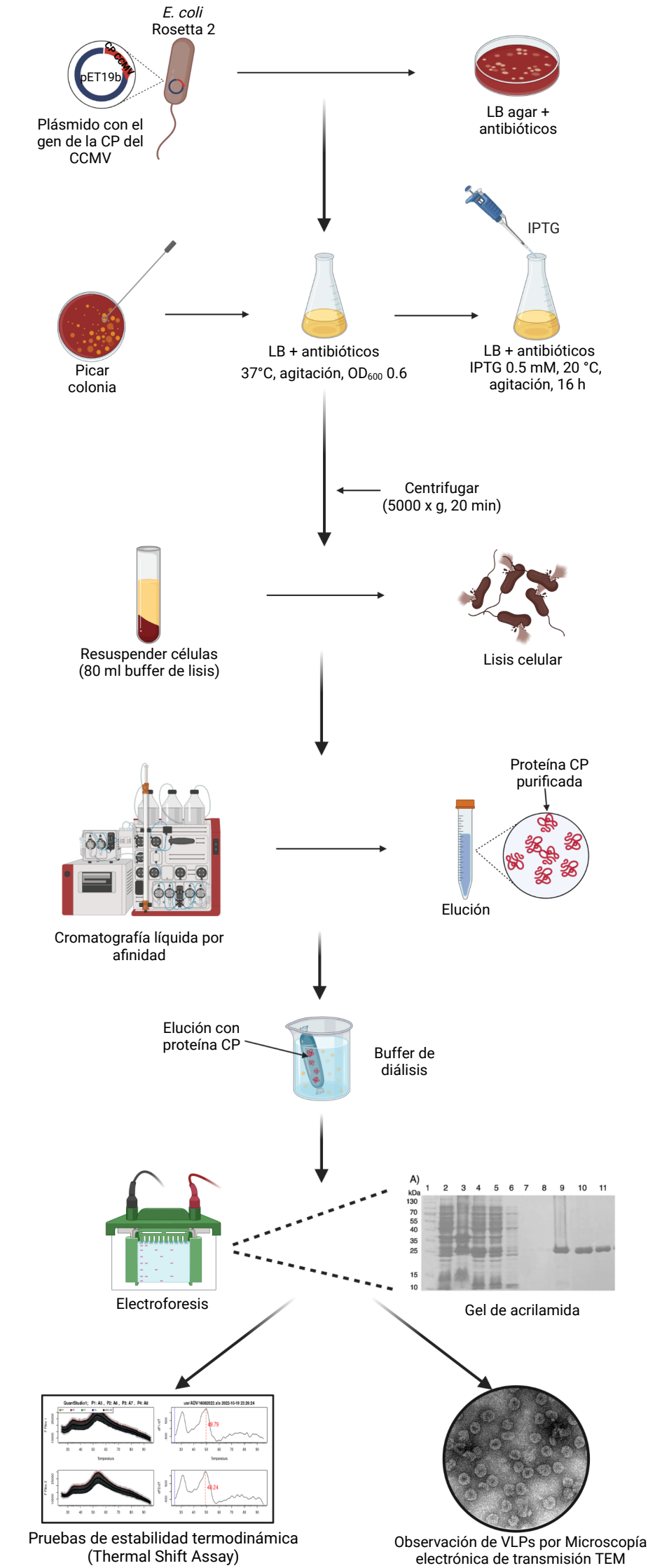
Expresión y Purificación de la Proteína de la Cápside del Cowpea Chlorotic Mottle Virus

Díaz-Valle Armando y Carrillo-Tripp Mauricio
Laboratorio de la Diversidad Biomolecular, CINVESTAV Unidad Monterrey, N.L., México

Las proteínas de la cápside (CPs) de virus poseen un gran potencial en el área biotecnológica y de ciencias de la salud, además de ser un gran modelo para el estudio de las interacciones proteína-proteína. Sin embargo, la obtención de CPs de forma pura y soluble suele ser un reto importante.

En el Laboratorio de la Diversidad Biomolecular se ha optimizado un proceso para la obtención de la CP del *Cowpea Chlorotic Mottle Virus* (CCMV) a través de expresión heteróloga en células de *Escherichia coli* de forma pura, soluble y funcionalmente activa con la capacidad de formar partículas tipo virus (VLPs) *in vitro*.

Procedimiento:



Transformación de células competentes.

- Transformar células de *E. coli* Rosetta 2 (DE3)pLysS con el plásmido conteniendo al gen de la CP.
- Sembrar células transformadas en placas con medio LB agar suplementado con antibióticos (ampicilina 100 mg/ml y cloranfenicol 34 mg/ml).
- Crecer a 37 °C toda la noche.

Cultivo celular y expresión de la CP del CCMV.

- Preparar un pre-inoculo celular seleccionando una colonia de las células transformadas, crecer en 25 ml de medio LB con antibióticos en agitación constante a 37 °C por 16 h.
- Crecer cultivo celular sembrando el pre-inóculo en 1 L de medio LB con antibióticos, incubar en agitación constante a 37 °C hasta alcanzar una OD₆₀₀ de 0.6.
- Inducir la expresión de la CP CCMV agregando IPTG (isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido) para una concentración final de 0.5 mM, incubar en agitación constante a 20 °C por 16 h.
- Colectar células por centrifugación a 5,000 x g por 20 minutos a 4 °C.
- Desechar el sobrenadante.
- Usar células inmediatamente o guardar a -80°C.

Lisis celular y clarificación.

- Resuspender células en 80 ml de buffer de lisis por cada litro de cultivo.
- Añadir lisozima a concentración final de 1 mg/ml, incubar a 4 °C en agitación suave por 1 h.
- Sonicar la muestra 10 minutos totales con pulsos de actividad de 20 segundos on/off, intensidad 70%. Agregar PMSF (Phenylmethylsulfonyl fluoride) a concentración final de 1 mM justo antes de sonicar.
- Centrifugar a 13,000 x g por 30 minutos a 4°C.
- Recuperar sobrenadante con la proteína.
- Filtrar sobrenadante (0.45 μm) y recuperar el clarificado.

Purificación por cromatografía líquida por afinidad a cobalto.

- Columna HisTrap™ 1 ml.
- Equilibrar columna con 15 volúmenes de buffer de lisis.
- Cargar clarificado filtrado en la columna.
- Lavar columna con 20 volúmenes de buffer de lavado.
- Eluir proteína con buffer de lisis.
- Colectar eluido con proteína purificada.
- Lavar columna con 15 volúmenes de buffer de elución.

Diálisis.

- Eliminar exceso de imidazol y ajustar pH con buffer de diálisis. Hacer tres recambios de 1 L de buffer y guardar proteína a 4°C hasta su uso.

Análisis de la purificación.

- Medir concentración, electroforesis en gel SDS-acrilamida, Western blot.

Pruebas de actividad biológica.

- Inducir ensamblado de partículas tipo virus (VLPs), ensayos de estabilidad termodinámica (Thermal Shift Assay, TSA), microscopía electrónica de transmisión (TEM).

Buffers:

Buffer de Lisis:
100 mM Tris -HCl
500 mM NaCl
10 mM MgCl
pH 6.0

Buffer de Lavado:
100 mM Tris -HCl
500 mM NaCl
10 mM MgCl
35 mM Imidazol
pH 7.3

Buffer de Elución:
100 mM Tris -HCl
500 mM NaCl
10 mM MgCl
500 mM Imidazol
pH 8.0

Buffer de Diálisis:
100 mM Tris -HCl
500 mM NaCl
10 mM MgCl
pH 7.4



Recomendaciones:

- Siempre mantener la muestra en hielo o trabajar en cuarto frío.
- Medir concentración de proteína inmediatamente después de terminar la purificación.

- Ajustar la concentración de proteína a 0.2 mg/ml - 0.4 mg/ml para evitar precipitación de la misma.
- Dializar después de ajustar la concentración de la proteína al rango recomendado.

