

Culture et purification TEV

1. Culture

- Electrotransformation BL21(DE3) avec plasmide pTEV
- Etalement sur boîte LB agar + Kan 30 µg/ml
- Quelques colonies prélevées pour ensemercer préculture de 100 ml de LB + kanamycine 30 µg/ml
- Culture de 3 x 1 litre de LB Kan 30 µg/mlensemencée avec la préculture pour avoir DO initiale de 0.1
- Culture à 37°C pendant environ 2h puis à 16°C jusqu'à DO de 0.5 et ajouter 1 mM IPTG final
- Induction pendant 4h à 16°C
- Centrifugation et lavage culots avec tampon A¹⁾

Il est important :

- que la boîte de transformation soit récente (2 jours max.)
- de prendre plusieurs colonies pour préculture
- d'avoir 100 ml de préculture pour ne pas avoir une préculture trop dense

2. Purification

2.1 Extraction (Jour 1)

- Culots 3 l + 60 ml tampon A + 2 mM β-ME + 0.1 % Triton X-100 + PIC + benzonase.
- Sonication 2 minutes totales
- Centrifugation 30 min 15,000 rpm à 4°C

2.2 Ni-Sepharose High-Trap 5 ml (Jour1)

- Colonne équilibrée tampon A
- Charge surnageant
- Voie A1 : tampon A (step lavage)
- Voie B1 : A + 60 mM imidazole (step lavage)
- Voie A2 : tampon A + 50 mM EDTA (step élution)

Analyse sur gel 15 % (TEV migre à environ 30 kDa) Peu de contaminants sortent avec la TEV mais pas de deuxième étape de purif car la TEV est fragile

2.3 Dialyse (Jour 1)

- Dialyse de la TEV contre 500 ml de 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.1 % Triton de 2-3 h
- Dialyse O.N. 4°C contre 500 ml de 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.1 % Triton, 50 % glycérol

2.4 Dosage et aliquots (Jour 2)

- Dosage Bradford du dialysat TEV
- Pas de concentration nécessaire mais dilution possible
- Aliquots de TEV de 1 ml à 1 mg/ml dans Eppendorf sur la glace et stockage le plus rapidement possible à -80°C pour ne pas perdre l'activité enzymatique.

1)

20 mM HEPES-NaOH pH 8.2, 1 M KCl, 30 mM imidazole

From:

<https://bsi.inscog.eu/> - **BSI wiki**

Permanent link:

https://bsi.inscog.eu/doku.php?id=purification:tev:b_protocol&rev=1468424989

Last update: **2023/11/01 20:17**

