

Nov 07, 2024

🌐 Purificación de GFP en reacciones cell-free para actividad docente // GFP purification from cell-free reactions for educational purpose



DOI

<https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.6qpvr81nplmk/v1>

Severine Cazaux¹, Valentina Ferrando¹, Paola Larrauri¹, Quinn Matthews², Mohammad Simchi², Severino Jefferson Ribeiro Da Silva², Keith Pardee², Fernan Federici³

¹Pontificia Universidad Católica; ²University of Toronto; ³PUC ReClone

Laboratorio de Tecnolog...



Severine Cazaux

Pontificia Universidad Católica

Create & collaborate more with a free account

Edit and publish protocols, collaborate in communities, share insights through comments, and track progress with run records.

Create free account

OPEN  ACCESS



DOI: <https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.6qpvr81nplmk/v1>

Protocol Citation: Severine Cazaux, Valentina Ferrando, Paola Larrauri, Quinn Matthews, Mohammad Simchi, Severino Jefferson Ribeiro Da Silva, Keith Pardee, Fernan Federici 2024. Purificación de GFP en reacciones cell-free para actividad docente // GFP purification from cell-free reactions for educational purpose. **protocols.io**

<https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.6qpvr81nplmk/v1>

Manuscript citation:

This section will be updated when the manuscript is published (currently in writing stage).

License: This is an open access protocol distributed under the terms of the **Creative Commons Attribution License**, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited

Protocol status: Working

We use this protocol and it's working

Created: October 22, 2024

Last Modified: November 07, 2024

Protocol Integer ID: 110482

Keywords: gfp purification from cell, gfp purification, basics of protein purification, protein purification, proteína con materiales que, purification, protein of interest, traditional lab infrastructure, protein, free reactions for educational purpose este, una proteína, centrifugation step, gfp

Funders Acknowledgements:

Fondecyt Exploración ANID

Grant ID: 13220075

Instituto de Biología integrativa

Grant ID: iBio

IDRC

Grant ID: 109434

Abstract

Este protocolo describe una actividad educativa que tiene como fin explicar las bases de la purificación de proteína con materiales que pueden ser usados sin la infraestructura tradicional de un laboratorio. En pocas palabras, una proteína de interés (en este caso, 6xHis-sfGFP) se produce en extractos cell-free toda la noche. Al día siguiente, se purifica usando el kit NEBExpress Spin Columns y de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Todas las etapas de centrifugación (unión, lavado y elución) se realizan usando una centrífuga de mano fabricada con impresión 3D. La actividad dura dos horas.

This protocol describes an educational activity to explain the basics of protein purification with materials that can be used without traditional lab infrastructure. In few words, the protein of interest (in this case, 6xHis-sfGFP) is produced in cell-free lysates overnight. The day after, it is purified using NEBExpress Spin Columns and all the centrifugation steps (for binding, washing and elution) are performed using a 3D-printed hand-powered centrifuge. The activity lasts two hours.

Materials

Hardware:

- 3D-printed hand centrifuge
- 500 lb fishing line ([link](#))
- Neodymium magnets with ¼ inch diameter and 1/8 inch thickness ([link](#)).
- Blue LED Transilluminator

Wetware:

- 500uL cell-free reactions of the GFP to be purified

Solutions for purification (described in NEBExpress Ni Spin column kit NEB #S1427):

- Binding Buffer: 20 mM sodium phosphate, 300 mM NaCl, pH 7.4
- Wash Buffer: 20 mM sodium phosphate, 300 mM NaCl, 5 mM Imidazole, pH 7.4
- Elution Buffer: 20 mM sodium phosphate, 300 mM NaCl, 500 mM Imidazole, pH 7.4
- Spin columns from NEB loaded with Ni-NTA resin

Disposables:

- 2mL tubes for recollection of the fractions
- Pipette tips 1000uL and 200uL
- Parafilm + Scissors

Troubleshooting

Día 1 - Antes de la actividad // Day 1 - Before the activity

- 1 Agregar 20nM del plásmido de la sfGFP a 500uL de una reacción cell-free en un tubo de 5mL:
167 uL de lisados cell-free
133 uL de solución de suplementación
20nM de ADN
Completar hasta 500uL con agua libre de nucleasas

#####

Add 20nM of plasmid DNA sfGFP to a 500uL cell-free reaction in a 5mL centrifuge tube:
167 uL of cell-free lysate
133 uL of CFPS supplementation solutions
20nM of DNA
Top up to 500uL with nuclease-free water

- 2 Incubar toda la noche a 30°C y 80rpm (aguanta hasta 37°C y 220 rpm pero corre el riesgo de agregación de la proteína).

#####

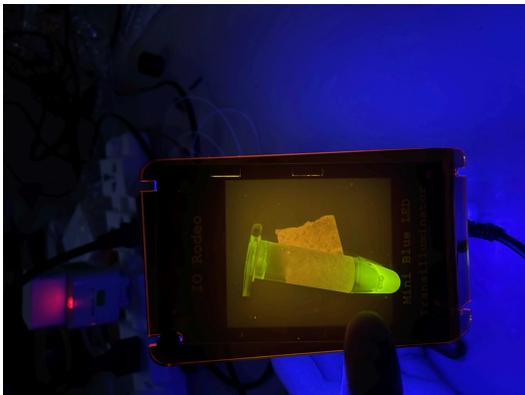
Incubate overnight at 30°C and 80 rpm (it can handle up to 37°C and 220rpm but with higher risk of protein aggregation).

Día 2 - El día de la actividad // Day 2 - The day of the activity

- 3 Verifique la fluorescencia de la reacción cell-free en el transiluminador.

####

Check the fluorescence of the cell-free reaction in the blue led transilluminator



- 4 Prepare las columnas de nickel del kit. Para eso, remueva el tapón abajo de la columna, suelte la tapa y colóquela en un tubo de recolección de 2mL. En esta etapa, la columna se encuentra llena de buffer de almacenamiento.

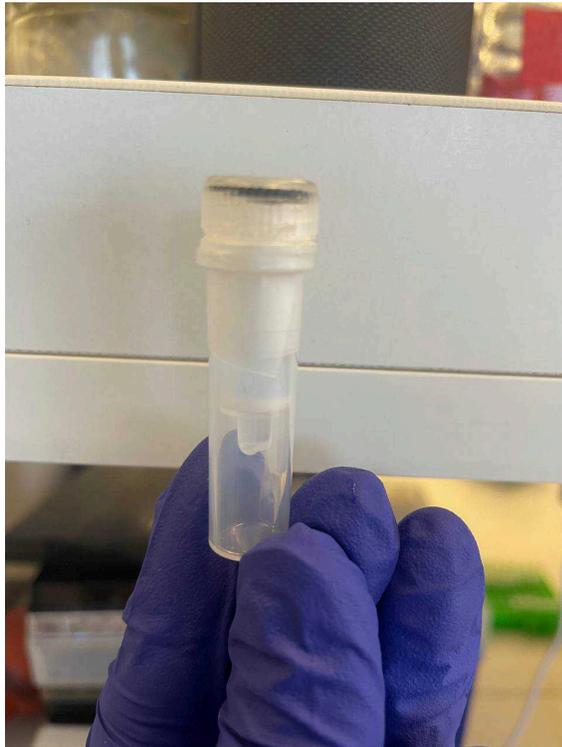
####

Get the Ni Spin columns ready to use. To do that, remove the bottom tab, loosen the cap of the column and place it into a 2mL collection tube. At this point, the column is filled with storage buffer.

- 5 Sellar la interfaz entre el tubo de recolección y la columna con parafilm para evitar la expulsión de gotas fuera del sistema durante la centrifugación.

####

Seal the joint between the collection tube and the column with parafilm to avoid the liquid to pour out during centrifugation.



- 6 La centrífuga se tiene que usar equilibrada, es decir que en todo momento, los lados opuestos deben tener la misma masa. Por lo tanto, se recomienda usar una segunda



columna como contrapeso, incluso si no tiene proteína (se puede llenar con agua para equiparar el peso de la otra columna).

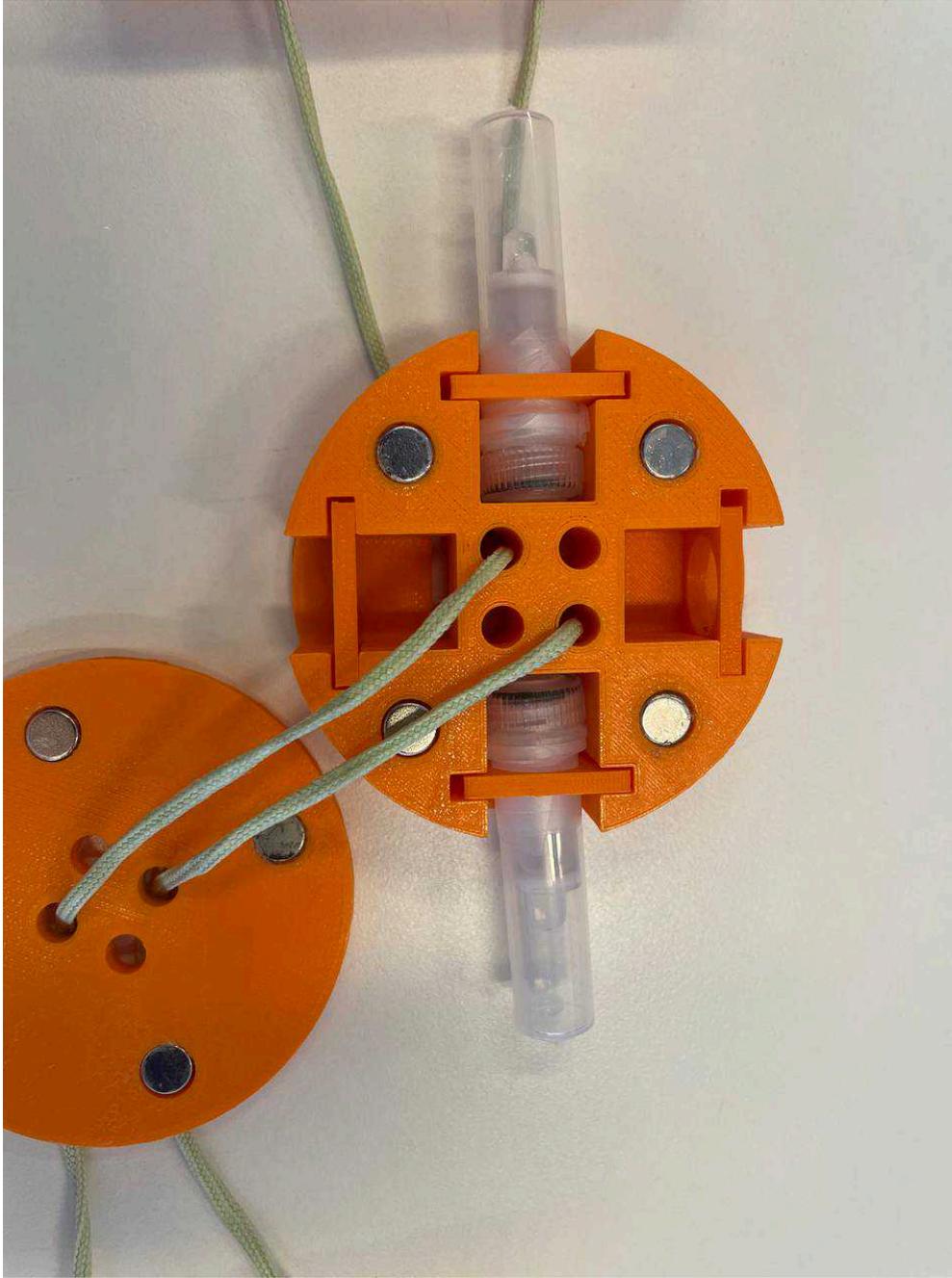
####

The centrifuge must always be used equilibrated, which means that opposing sides should have the same weight. Therefore, make sure to work with two spin columns even if the second one has no protein (you can fill it with water to match the content of the other column).

- 7 Colocar las dos columnas en lados opuestos de la centrifuga, con el tubo de recolección orientada hacia afuera de la centrifuga y la tapa orientada hacia adentro, como se muestra abajo.

####

Place the two columns in opposing sides of the centrifuge, with the collection tube pointing toward the outside and the cap toward the center of the centrifuge.



- 8 Centrifugar. Para eso, enrollar la cuerda lo más posible y luego estirla rápidamente para iniciar la centrifugación. Verifique el progreso cada 10s deteniendo la centrifuga en su estado sobreenrollado para que sea fácil seguir centrifugando. Una vez que todo el líquido ha bajado en el tubo de recolección, detener la centrifugación.

####

Centrifuge. To do that, coil the fishing line as much as possible then stretch it to start centrifuging. Check the progress every 10s by stopping the centrifuge in a super-coiled configuration so that it is easier to start again. Once all the liquid has gone through the resin and reached the bottom of the collection tube, stop centrifuging.



9 Manteniendo la cuerda enrollada, abrir la centrifuga y remover las columnas.

####

Still in a coiled configuration, open the centrifuge and remove the columns.

10 Sacar el parafilm y la tapa. Colocar la columna en un nuevo tubo de recolección.

####

Remove the parafilm and the cap. Place the columns in a new collection tube.

11 Agregar 250uL de Binding Solution. Colocar de nuevo la tapa y sellar con un nuevo parafilm el espacio entre el tubo de recolección y la columna.

####

Add 250 uL of Binding Solution. Place the cap back with new parafilm between the collection tube and the column.

12 Repetir las etapas 7-10.

####

Repeat the steps 7-10.

13 Agregar 500uL de GFP en reacción cell-free. Colocar de nuevo la tapa y sellar con un nuevo parafilm el espacio entre el tubo de recolección y la columna.

####

Add 500uL of the cell-free reaction containing the GFP. Place the cap back with new parafilm between the collection tube and the column.

14 Repetir las etapas 7-9.

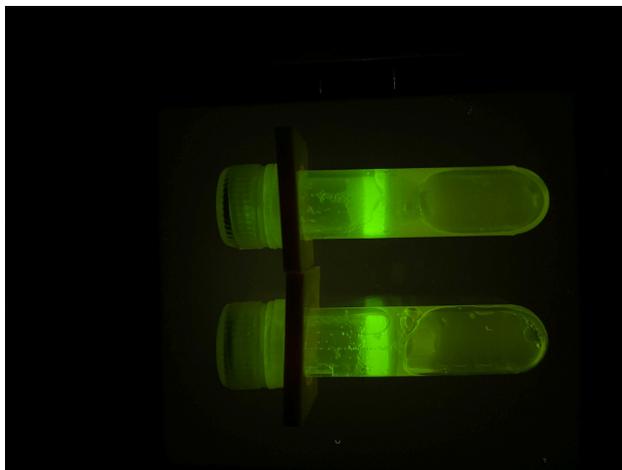
####

Repeat the step 7-9.

15 Mirar las columnas en el transiluminador. La resina debería estar ahora cargada con GFP, lo que significa que la cola de histidina se ha unido al nickel de la resina.

####

Look at the column in the transilluminator. The resin is now loaded with GFP, which means the 6x-His tag has bound to the Ni²⁺ in the resin.



16 Sacar el parafilm y la tapa. Colocar la columna en un nuevo tubo de recolección.

####

Remove the parafilm and the cap. Place the columns in a new collection tube.

- 17 Nota: Las etapas 18-21 son opcionales para un propósito educativo. Si llega a faltar tiempo, puede perfectamente saltar a la etapa 22.

####

Note: Steps 18-21 are optional for educational purposes. If time lacks these steps can perfectly be skipped.

- 18 Agregar 250uL de Solución de Lavado. Colocar de nuevo la tapa y sellar con un nuevo parafilm el espacio entre el tubo de recolección y la columna. *

####

Add 250uL of Washing Solution. Place the cap back with new parafilm between the collection tube and the column.

- 19 Repetir las etapas 7-9. *

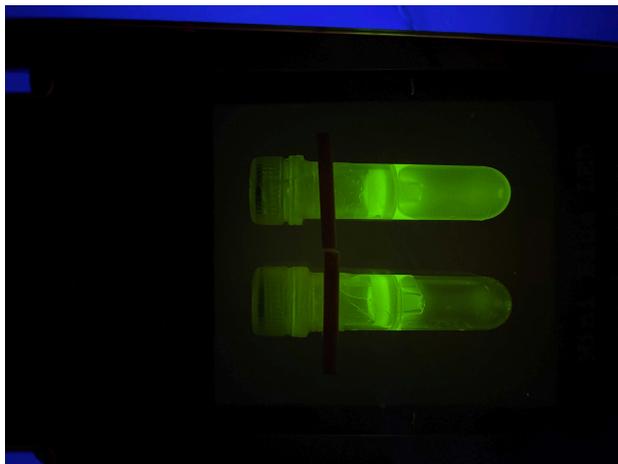
####

Repeat the steps 7-9.

- 20 Mirar las columnas en el transiluminador. La proteína debería estar unida todavía a la resina, con pérdidas minimales en la fracción que cae en el tubo de recolección. *

####

Look at the column in the transilluminator. The protein should still be bound to the resin with no or minimal loss in the flow-through.





21 Sacar el parafilm y la tapa. Colocar la columna en un nuevo tubo de recolección.

####

Remove the parafilm and the cap. Place the columns in a new collection tube.

22 Agregar 150uL de Solución de Elución.

####

Add 150 uL of Elution solution.

23 Repetir las etapas 7-9.

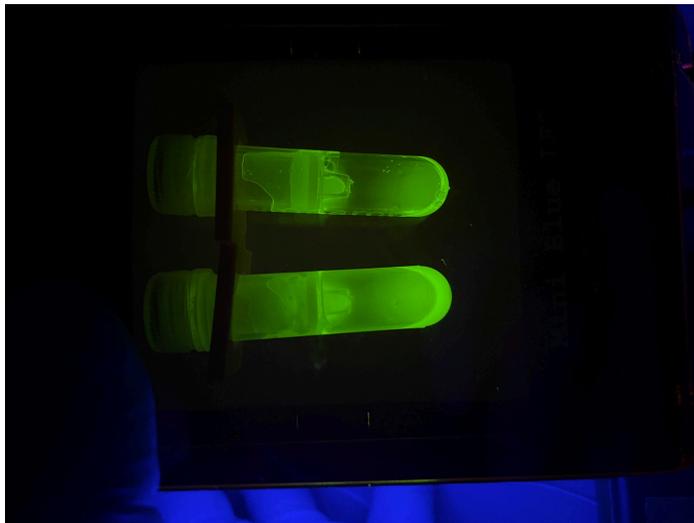
####

Repeat the steps 7-9.

- 24 Mirar las columnas en un transiluminador. La alta concentración de imidazol durante la etapa de elución debería haber desplazado por competición la proteína, la cual debería haber caído en el tubo de recolección. La resina debería verse translúcida. Si restos significativos de fluorescencia se observan en la resina, se puede realizar una segunda etapa de elución.

####

Look at the column in the transilluminator. The high concentration of imidazole during the elution step should have detached the protein from the resin, which should now be located at the bottom of the collection tube. The resin should look transparent. If relevant amounts of fluorescence are observed in the resin, a second step of elution can be performed.

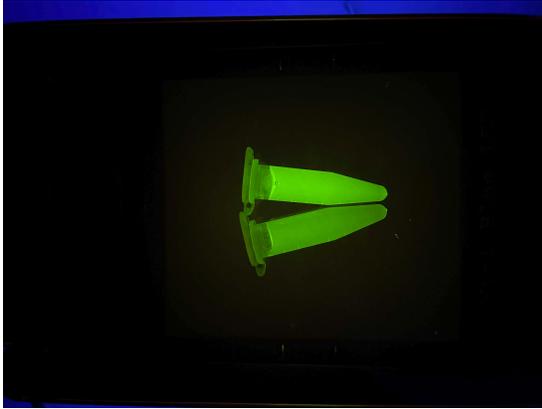


- 25 Opcional: Puede transferir el contenido del tubo de recolección en un nuevo tubo de centrifuga para mayor claridad. Acaba de purificar GFP!

####

Optional: You can transfer the flow-through to a new centrifuge tube for higher clarity. You have purified GFP!





Instrucciones para el ensamblaje de la centrífuga // Instructions for building the 3D-printed, hand-powered centrifuge

26 Imprimir los archivos.stl con filamento PLA:

####

Print the .stl files attached using PLA filament:

 2023_11_20_3DFuge_body.stl 95KB

 2023_11_20_3DFuge_top.stl 73KB

 2023_11_20_3DFuge_handle.stl 26KB

27 Pegar los imanes en los hoyos tanto en la tapa como en el cuerpo de la centrífuga. Usar una cola fuerte ya que la fuerza magnética puede ser más poderosa que el pegamento. OJO: Cuiden la polaridad de los imanes! Cualquier error puede impedir el correcto cierre de la centrífuga.



####

Glue the magnets in the holes in both the tap and the body of centrifuge (8 magnets x centrifuge). Make sure to use a strong glue as the magnetic force can be more powerful than the glue.

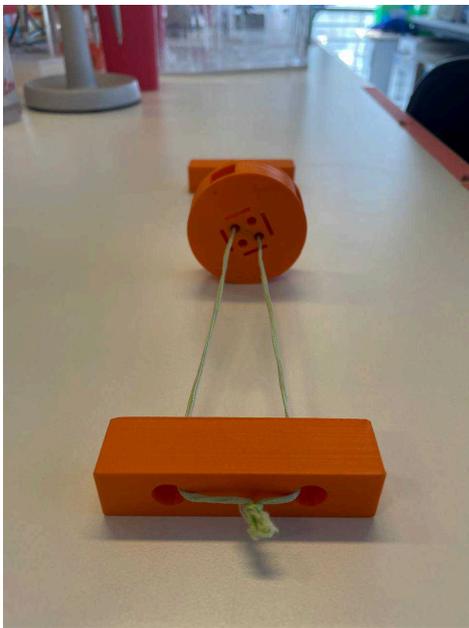
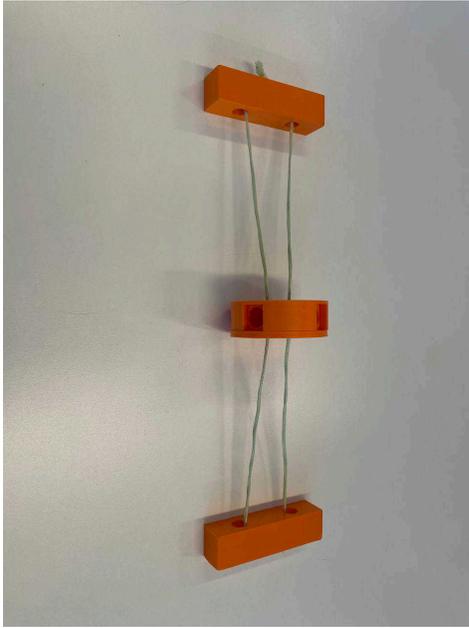
Mind the polarity of the magnets! Any mistake can prevent the correct assembly of the centrifuge.

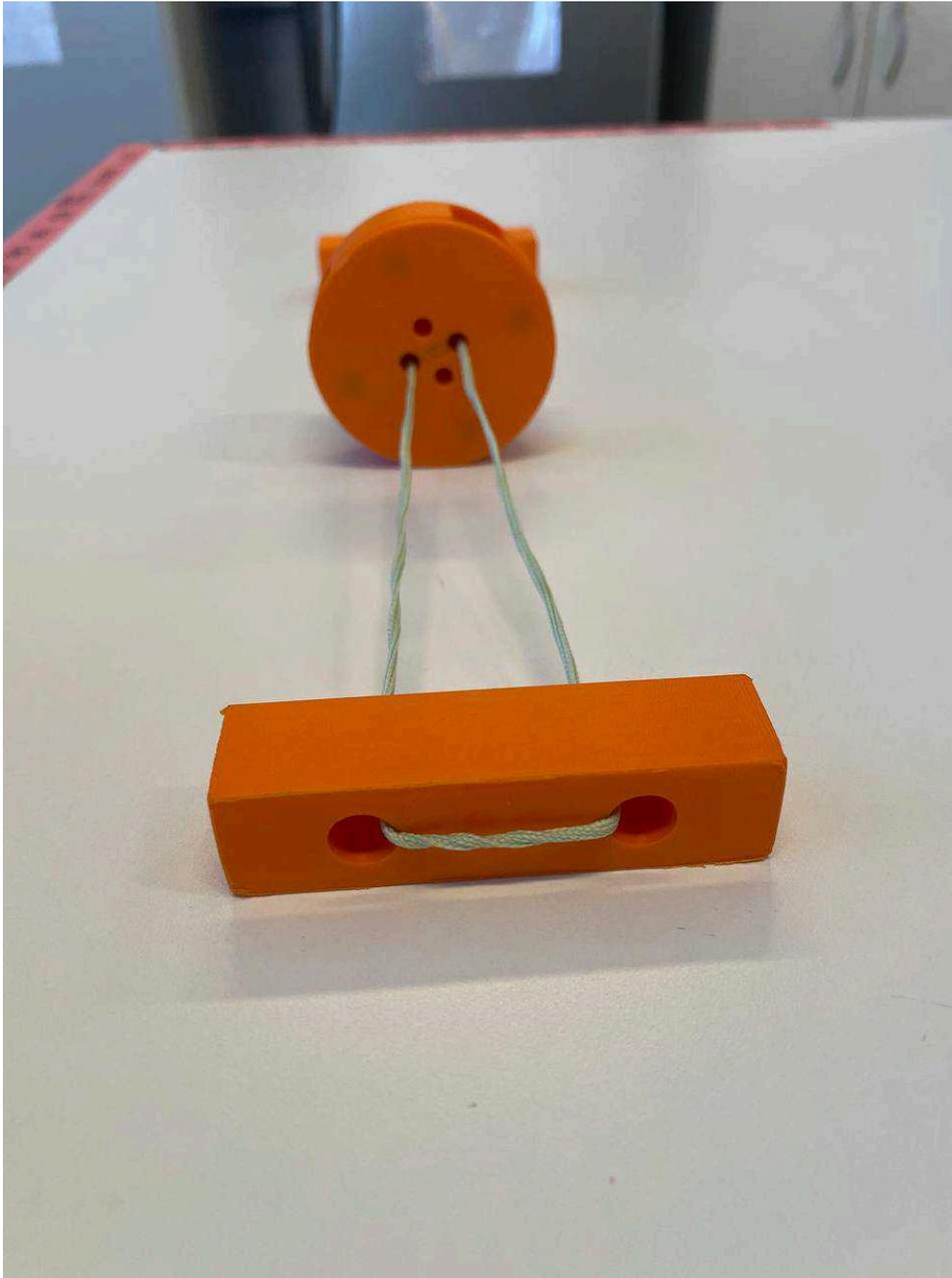


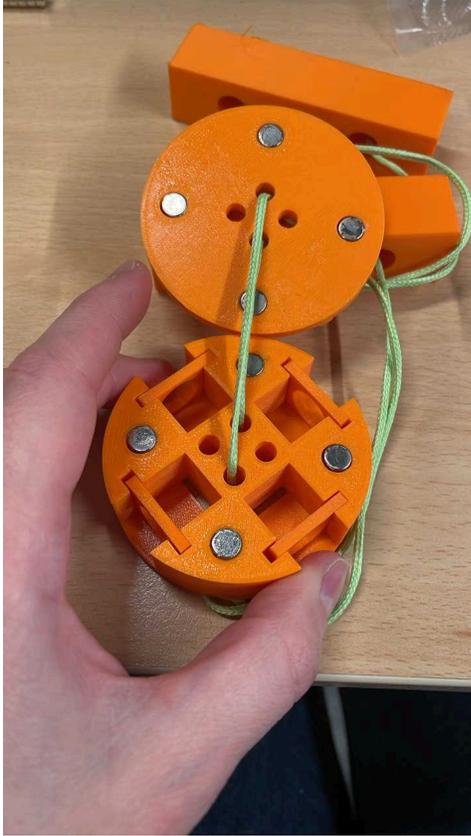
- 28 Insertar la cuerda a través de los orificios como se muestra a continuación. Amarrar con un nudo sólido ya que al operar la centrifuga se podría soltar la cuerda! (Nos ha pasado - dos veces en la misma actividad!).

####

Insert the fishing line through the holes of the centrifuge as follows. Use a solid knot: when operating the centrifuge, the knot could unfold/break! (It has happened to us - twice during the same activity!).







Protocol references

1. Byagathvalli G, Pomerantz A, Sinha S, Standeven J, Bhamla MS (2019) A 3D-printed hand-powered centrifuge for molecular biology. PLOS Biology 17(5): e3000251.
2. IO Rodeo LED Transilluminator
https://iorodeo.github.io/led_transilluminator_docs/?ref=blog.iorodeo.com
2. NEBExpress Ni Spin Columns (NEB #S1427):
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000251> <https://www.neb.com/en/protocols/2019/08/28/nebexpress-ni-spin-column-reaction-protocol-neb-s1427>

Acknowledgements

As part of this protocol we want to acknowledge specific contributions of the following authors:

Mohammad Simchi modified the 3D-fuge by replacing the nut-and-bolt closure with a magnetic closure.

Quinn Matthews adapted the 3D-printed centrifuge (3D-fuge) for cell-free protein purification and designed the initial purification protocol.

Severino Jefferson Ribeiro da Silva provided the 3D-fuge to Federici's lab through IDRC collaborative project.