

PURIFICACIÓN DE Pgp A PARTIR DE MEMBRANA PLASMÁTICA.

Sharom-FJ et al. *Biochem. J.* (1995) **308**: 381-390

1. Resuspender la membrana plasmática obtenida de todas las células cultivadas hasta confluencia de 8 placas, en el **BUFFER DE SOLUBILIZACIÓN A**:

50 mM Tris-ClH, pH 7.5

25 mM CHAPS, 150 mM ClNH₄, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.02 % NaN₃, hasta llegar a una concentración de proteína de 10 mg/ml, e incubar 30 min, 4 °C y con agitación.

2. Centrifugar a 164.000 x g , 15 min, 4 °C, en rotor angular Ti 45, 38.000 rpm.

3. Resuspender el pellet en **BUFFER DE SOLUBILIZACIÓN B**:

50 mM Tris-ClH, pH 7.5

8 mM CHAPS, 20% glycerol (v/v), 150 mM ClNH₄, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.02 % NaN₃,

hasta llegar a una concentración de proteína de 0,5 mg/ml, e incubar 30 min, 4 °C y con agitación.

4. De Nuevo centrifugar a 164.000 x g , 15 min, 4 °C, en rotor angular Ti 45, 38.000 rpm.
5. Recoger el sobrenadante S₂, que contiene Pgp parcialmente purificada.
6. La purificación de Pgp hasta el 90-95 % se consigue en la siguiente etapa utilizando una cromatografía de afinidad a lectina de lenteja-sepharosa 4B (Pharmacia).
7. Se parte de S₂, extracto en CHAPS, con una concentración aproximada de proteína de 0.25 mg/ml.
8. Previamente se equilibra la columna con unos 4 ml de lecho con buffer de solubilizacion B.
9. Se deposita S₂ sobre el lecho y se mantiene un flujo constante de 0.4 ml/min. Se trabaja a 4 °C
10. Se lava la columna con 20 ml de buffer de solubilizacion B, manteniendo un flujo similar.
11. Las proteínas unidas a la columna (entre ellas Pgp) se eluyen con 0.5 M de α -metilmanosido, en buffer de solubilizacion B, usando unos 5 ml.
12. Se recogen fracciones de 0.5 ml y se mide en ellas tanto la ABS_{280nm} como la actividad ATPasa. Se juntan todas las fracciones con actividad ATPasa.
13. Se repite este proceso en una segunda columna de lectina de lenteja-sepharosa 4B (Pharmacia) "distinta", recogiendo finalmente unos 4-5 ml;
14. Se mide la concentración de proteína, para en un paso siguiente reconstituir en la matriz lipídica de composición deseada.

