

## **Formación de liposomas Gigantes**

La formación de vesículas lipídicas se realiza con asolectina. También funciona para algunas mezclas de lípidos, sobre todo las ácidas (con DMPA por ejemplo)

Se suspenden los lípidos con cloroformo, se mezclan y se secan, para luego resuspender en buffer a una concentración de 10-100 mg/ml. Se sonicán a transparencia (unilamelares) con sonda Artek 300. En este último caso, en tres sesiones de tres minutos cada una. Mantener la muestra a 4°C.

Eliminar el titanio desprendido por la sonda mediante centrifugación a baja velocidad (centrífuga de mesa, 3500 r.p.m., 10 min.)

Diluir 10 veces esta suspensión con tampón Hepes/Tris 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7.4 (quedando a una concentración final de 10 mg/ml). Solubilizar con Chaps al 1%.

La formación de vesículas se realiza mediante diálisis del detergente a 4°C. Se realizan 8 cambios de tampón Hepes/Tris 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7.4 cada 12 horas

Esta preparación se fracciona en alícuotas de 850 ul y se almacena a -80°C hasta su uso. Estas alícuotas están a 13 mM de fosfolípidos y 10 mg/ml de lípidos totales.

Alternativamente se puede hacer como se hacen las vesículas para la reconstitución con receptor.

## **Formación de liposomas Gigantes**

Alícuotas de 100 ug de la proteína a incorporar ( en nuestro caso AcChR, purificado y reconstituido o bien en forma de membranas alcalinas) se mezclan con fracciones de 1.7 ml de la suspensión de los lípidos descritos en en apartado anterior.

La mezcla proteína/vesícula lipídica se ultracentrifuga durante 30 minutos, a 50.000 r.p.m. (250.000 g) en un rotor Kontron TFT-70

El sedimento se resuspende en 75 ul de tampón Hepes/Tris 4mM, 5% (v/v) etilen-glicol. Esta resuspensión se realiza forzando la muestra a través de la aguja de una jeringuilla hasta obtener una muestra aparentemente homogénea. La jeringuilla a utilizar es del tipo insulina con aguja LUER de 0.8mmX25 mm.

La mezcla resultante se deposita en gotas de 20ul en un vidrio portaobjetos que se somete a un proceso de deshidratación parcial en un desecador de CaCl<sub>2</sub>, durante 3 horas a 4°C. Cuando el CaCl<sub>2</sub> se ha utilizado varias veces, es conveniente secarlo en la estufa a 100°C.

Las muestras se rehidratan mediante la adición de 20 ul de NaCl 50mM sobre cada gota deshidratada. La formación de los liposomas gigantes tras hidratar la muestra se sigue a microscopía óptica en un microscopio de inversión, con un objetivo de 20 aumentos.

Las muestras permanecen hidratándose toda la noche, a 4°C, en una placa de Petri con papel de filtro humedecido en su fondo.

Los liposomas gigantes que se van a utilizar para registros electrofisiológicos se recogen en tampón Hepes/Tris 4mM, NaCl 50 mM, CaCl<sub>2</sub> 0.1mM, pH 7.4.