

RECONSTITUCIÓN CON BIO-BEADS.

EXPLICACIÓN Y PROTOCOLOS:

Mi material de partida es membrana plasmática de células CH^FB30 y la extracción de Pgp implica usar DDM. Es decir, similar al sistema de kcsa. Después de hacer una cromatografía de intercambio aniónico dispongo de 10 alícuotas de 2 ml cada una, y necesito concentrar a un volumen de 1 ml.

En este punto disponía de 1 ml de micelas mixtas Pgp/1%DDM/0.4% asolectine lipids.

En este momento debes hacer una medida de la concentración de proteína en este 1 ml de muestra. Kit de BIORAD  con las siguientes referencias:

- solution A = [500-0113](#)
- solution B = [500-0114](#)
- solution S = [500-0115](#)

EL PROTOCOLO PARA MEDIR [prot] es :

Alicuotas de 2 μ l de protein + 18 μ l H₂O
3 μ l de protein + 17 μ l H₂O
4 μ l de protein + 16 μ l H₂O

momentos antes de su uso preparo la mezcla de 20 μ l de solución S + 1 ml de solución A y añado a cada uno de estos 3 tubos 100 μ l. Mezclo y añado 800 μ l de solución B y mezclo bien. Espero 15 min y leo ABS a 750 nm. Resultó que tenía una concentración de proteína de 0.443 mg/ml. En 20 min se lleva a cabo la medida con este kit.

El siguiente paso es disponer de LIPIDOS para hacer la reconstitución. Lo normal es disponer de « stocks » preparados con antelación. Básicamente resuspender las cantidades adecuadas de cada tipo de lípido según las proporciones molares que necesitemos en Cl₃CH/MetOH, según el tipo de lípido y secarlos con N₂. Almacenando a -20 °C hasta su uso.

En mi caso resuspendí 10 mg de lípido (PC:PE, 9:1 molar ratio) en 1 ml de buffer: 150 mM NaCl, 15 mM Tris-CIH, pH 7.4 ; 1 mM EDTA, 1 mM benzamidine.

Agito vigorosamente con vortex y congelo en N₂ y descongelo a 37 °C 4 veces. Tengo vesículas multilamelares, MLV's. Con ellas preparo LUV's, aunque con un « struder » diferente al nuestro, que permite usar un volumen de 1 ml y no usa gas para hacer pasar los lípidos a través del filtro. En el nuestro usamos un volumen minimo de 8-9 ml.

Ahora viene el truco de emplear decil-maltosido (DM), [peso molecular 482.6 de CalBiochem], en vez de dodecil-maltosido (DDM) para saturar estos LUV's.

En mi caso hice una reconstitución de Pgp en (PC:PE, 9:1 molar ratio), la relación en **PESO** entre proteína y lípido es 1 : 10, lo que en términos molares equivale aprox. A 1 : 1800, para un peso molecular de Pgp de 170 KDa.

Qué concentración de DM satura mis LUV's de PC:PE ?

Tengo 1 ml de LUV's a 1 mg/100 μ l, tomo 200 μ l, o sea, 2 mg de lípido y deseo tener una concentración de 2 mg/ml de LUV's saturados [micelas mixtas lípido/DM para entendernos], calculo dicha concentración con la siguiente formula:

$$[\text{DM}]_{\text{sat}} = 1.8 [\text{lípido}] + 1.49$$
$$[\text{DM}]_{\text{sat}} = 1.8 [2 \text{ mg/ml}] + 1.49$$

$$[\text{DM}]_{\text{sat}} = 5.1 \text{ mM}$$

Preparo 100 μl de DM 200 mM y de estos añado 24 μl a un volumen final de 1 ml para conseguir 5.1 mM de DM final.

Paso a paso ...

200 μl de LUV's
775 μl de buffer [en mi caso: 150 mM NaCl, 15 mM Tris-ClH, pH 7.4 ; 1 mM EDTA, 1 mM benzamidine]

8 μl DM 200 mM
8 μl DM 200 mM
8 μl DM 200 mM

Es importante que este DM se añada en tres tiempos espaciados 5 min, por supuesto con agitación constante.

En este punto disponemos de dos componentes para nuestra reconstitucion:

- 1) micelas mixtas de PC:PE/5.1 mM DM
- 2) Pgp 0.443 mg/ml, con 1% DDM, 0.4 % asolectine lipids

El tercer componente son los BIO-BEADS que sustituyen al proceso de diálisis que tradicionalmente usamos nosotros. Bio-Beads SM-2 Adsorbent N° Cat [152-3920](#) BIORAD.

Con antelación hemos « lavado » estos BIO-BEADS comerciales para poder usarlos y los tenemos almacenados a 4 °C

PROTOCOLO PARA « LAVAR » LOS BIO-BEADS COMERCIALES DE BIORAD:

- A.1.** Tomo 10 ml de bio-beads secos (conste que es polvillo, no te despiste lo del volumen) y los lavo en un tubo Falcon con 40 ml de H₂O, esto drante unos 10 min. Cuando deje de agitar van a sedimentar y entoces elimino este H₂O con una pipeta.
- A.2.** Ahora « lavo » con 40 ml de 1:1 H₂O:MetOH durante 5 min. Es decir, el mismo proceso pero cambio la mezcla de lavado.
- A.3.** « Lavo » con 40 ml de MetOH durante 5 min.
- A.4.** « Lavo » con 40 ml de 1:1 H₂O:MetOH durante 5 min.
- A.5.** Lavo con 40 ml de H₂O durante 5 min y este proceso A.5. lo repito 2 veces mas.

Finalmente dispongo de BIO-BEADS « húmedos » aunque con la pipeta he retirado el máximo de agua posible. Si tengo que hacer en este instante mi reconstitución deberé pesar las alícuotas de biobeads necesarias, si no es el caso, añado 10-15 ml de H₂O y los guardo en la nevera. Este punto DEBE QUEDAR CLARO ... para reconstituir uso los bio-beads habiendo eliminado al máximo el agua con la pipeta y para almacenarlos en la nevera los añado mas agua.

En este momento disponemos de los 3 componentes:

- 1) micelas mixtas de PC:PE/5.1 mM DM
- 2) Pgp 0.443 mg/ml, con 1% DDM, 0.4 % asolectine lipids

3) Bio-beads « bien lavaditos ».

Cuantos mg de Bio-Beads poner para reconstituir y como ponerlos ?

A modo de ejemplo te indico las cantidades que yo use en mi experimento con Pgp:

100 µg Pgp / 1 g lipidos [1 : 10 en peso]

y añadido SECUENCIALMENTE 6 x 20 mg = 120 mg

Me explico :

- 1.- Mezclo Pgp/lípido, en tu caso kcsa/asolectina en las concentraciones que hayas calculado para la relación lípido/proteína que desees estudiar.
- 2.- Mantengo 20 min en hielo esta mezcla.
- 3.- Saco esta mezcla de hielo a tem ambiente y la mantengo 20 min en un agitador orbital.
- 4.- Han pasado 40 min desde el inicio del proceso. Añado mi primera alícuota de 20 mg de Bio-Beads, y de nuevo coloco el eppendorf en agitación orbital durante otros 20 min.
- 5.- A intervalos de 20 min voy añadiendo las 5 alícuotas que me restan de bio-beads.
- 6.- Deben haber transcurrido $20 + 20 + (6 \times 20) = 160$ min

HE RECONSTITUIDO Pgp !!!

Para comprobarlo, en mi caso, tomo una alícuota de 15 µl de estos proteoliposomas y hago un gradiente de sacarosa, del que luego tomare fracciones y mediré en ellas radioactividad y haré el gel SDS-PAGE, pudiendo observar que las fracciones con mas radioactividad (^3H de los lípidos).

Para hacer geles SDS-PAGE y medir proteína, eventualmente puedes hacer este protocolo para PRECIPITAR PROTEÍNA:

- 1.- Hasta 200 µl de muestra del tipo prot./lípido, es decir si tomo una alícuota de 100 µl C 100 µl mas de agua.
- 2.- Añado 20 µl de 0.15 % (w/v) de deoxycholate e incubo 10 min a temp ambiente.
- 3.- Añado 20 µl de TriCloroAcetico 72 % (w/v) e incubo 10 min a tem ambiente.
- 4.- Centrifugo 8 min, 14000 rpm 5en la centrifuga eppendorf a temp ambi.
- 5.- Retiro el sobrenadante con mucho cuidado y una jeringa de insulina.
- 6.- Puedo ver un pequeño « pellet » blanco. Si necesito hacer geles le pongo buffer sample, si quiero medir proteína resuspendo este pellet en 10-30 µl de 10% SDS, por ejemplo.

Last update, 2006/06/05