

## Extracción de proteínas de un homogenado celular.

---

1. Para membrana plasmática purificada de células CHrB30, que están contenidas en un volumen de 500  $\mu$ l de Hepes 10 mM, sacarosa 250 mM, pH 7.4; se toman 20  $\mu$ l y se diluyen 5 veces.
2. Lavamos en un Eppendorf con 100:200  $\mu$ l: $\mu$ l de ClCH<sub>3</sub>:Met. Agitamos en el vortex y eliminamos la presión abriendo el Eppendorf. Hemos de ver como la proteína precipita.
3. Añadimos 200  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O, agitamos vigorosamente en el vortex y centrifugamos a 14.000 r.p.m., 4 °C, 10 min. Eliminamos la mayor parte de la fase superior con una pipeta Pasteur. Añadimos 200  $\mu$ l de MetOH y de nuevo centrifugamos a 14.000 r.p.m., 4 °C, 10 min.
5. Tranvasamos con ayuda de una pipeta Pasteur el máximo volumen posible (sin “romper” el pellet de proteína) a un tubo de vidrio. Este contendrá los lípidos extraídos de la muestra biológica con la que estamos trabajando.
6. Añadimos 500  $\mu$ l de MetOH y de nuevo centrifugamos a 14.000 r.p.m., 4 °C, 10 min.
7. Repetimos el punto 5.
8. Llegados a este punto tendremos de cada muestra un Eppendorf con la proteína precipitada (en unos 30  $\mu$ l de MetOH) y un tubo con aprox. 1.5 ml (lípidos). La proteína la secamos totalmente en el “speedbac” y el lípido lo secamos con N<sub>2</sub>.
9. El pellet de proteína lo disolvemos en 100  $\mu$ l de SDS 1% y lo dejamos a RT hasta el día siguiente, en que la proteína estará disuelta, para entonces medir [prot] por método BCA. El lípido lo guardamos seco a - 20 °C.

## Precipitación de proteínas con TCA

---

Para llevar a cabo una electroforesis SDS-PAGE o una valoración de proteína en una muestra biológica, por ejem. un homogenado de células, debemos evitar la interferencia de los lípidos. Por ello, se puede precipitar la proteína.

- Supongamos que se parte de 1 ml de células, homogenadas con un buffer hipotónico y un volumen de 20 ml.
  - Tomamos alícuotas de 5, 10, 20 y 40  $\mu$ l del homogenado y añadimos H<sub>2</sub>O hasta 200  $\mu$ l, o sea, 195, 190, 180 y 160  $\mu$ l.
  - Añadimos 20  $\mu$ l de 0.15% (w/v) deoxycholate y agitamos en vortex. Esperamos 10 min a temp. ambiente.
  - Añadimos 20  $\mu$ l de TCA 72% (w/v) y agitamos en vortex. Esperamos 5 min a temp. ambiente.
  - Centrifugamos en una centrifuga eppendorf durante 8 min al máximo de r.p.m. Deben aparecer pequeños pellets blancos.
  - Si queremos hacer un gel añadiremos a estos pellets buffer sample y si queremos valorar proteína podemos disolverlos en 1% SDS.
-