

## Detergent-insolubility assay (Rafts)

---

La idea del experimento es comprobar si hay fracciones lípido-proteína en sistemas naturales o artificiales, que resultan insolubles en TX-100. Trabajando con células enteras tendremos el problema de la presencia del ADN y su difícil manejo. Por ello, tanto para pgp como para nAcChR podemos hacer preparaciones de membrana plasmática y membranas crudas, y trabajar con ellas. Adicionalmente podremos usar proteoliposomas.

En mis ensayos con membrana plasmática con y sin pgp (K562 xt y Adr<sup>+</sup>) he trabajado con 4 mM PLs.

**TRABAJO a 4 °C, siempre !!!!.** Sobre la muestra de membrana se añade, en un eppendorf, 1 ml de Hepes 25 mM, 150 NaCl, **1% (v/v) TX-100**; pH 7.5. Se mantiene en agitador orbital 30 min.

Centrifugar a 14.000 rpm, 10 min. Deben verse pequeños pellets.

Retirar con una micropipeta el sobrenadante en otro eppendorf. Para hacer geles o medir proteína será necesario precipitar con TCA la proteína.

En la fracción insoluble debemos estudiar la presencia de la proteína de nuestro interés con gel y blot. Sobre la composición de la fracción lipídica será necesario hacer TLC.

Es posible solubilizar tanto la fracción insoluble como los precipitados de TCA con una buffer del tipo Tris-ClH 50 mM, 5 mM EDTA, 1 % SDS, pH 8.0 Debe dejarse durante una noche, por ejemplo.

---

Last update, 2006-02-08