

INMUNOBLOT para (Pgp) MDR1.

- 1.- Correr dos geles del 7.5 %, uno para teñir y otro para transferir al papel de nitrocelulosa.
- 2.- Medir el gel y cortar dos papeles de filtro y una membrana de nitrocelulosa a la misma medida del gel.
- 3.- Preparar buffer inmunoblot:
 - 3.03 g de Tris-Base.
 - 14.4g de Glicina.
 - 200 ml de metanol y llevar a 1000 ml con H₂O.
- 4.- Poner el gel en este buffer.
- 5.- Para preparar el sandwich, colocar sobre la parte negra del mismo:
 - ESPONJA MOJADA EN BUFFER
 - PAPEL DE FILTRO MOJADO EN BUFFER.
 - GEL MOJADO EN BUFFER.
 - MEMBRANA MOJADA EN BUFFER.
 - PAPEL DE FILTRO MOJADO EN BUFFER.
 - ESPONJA MOJADA EN BUFFER.
- 6.- Meter en la cubeta y llenar con buffer hasta mas de la mitad.
- 7.- Para hacer la transferencia poner la cubeta en hielo y en la nevera, poner la fuente a **100 V**, durante 2 h.
- 8.- Después de estas 2 h de transferencia desmontar el sistema y teñir el gel para comprobar que la transferencia ha sido efectiva.
- 9.- Lavar la membrana de Nitrocelulosa con buffer B2 (PHOSPHATE BUFFERED SALINE WITH TWEEN 20, pH 7.4, Cat. # P3563, 10 Packets, [SIGMA](#)) durante 15 min, 4 °C y en agitación.
- 10.- BLOQUEAR con BSA al 3% o con leche al 2% preparado al momento de usar en buffer 2. Puede quedarse toda la noche a 4 °C y en agitación.
- 11.- Lavar con B2 durante 15 min, en agitación y a 4 °C.
- 12.- Poner el primer anticuerpo 0.1 µg/ml en buffer B2, durante 1 h.
- 13.- Hacer 3 lavados con B2, uno durante 15 min, y los dos siguientes de 5 min, en agitación y a 4 °C.
- 14.- Poner el segundo anticuerpo diluido 1:500 en buffer B2, durante 1 h. (20 µl/20 ml de buffer 2).
- 15.- Lavar como en 13.-
- 16.- Revelar mediante el método de la fosfatasa alcalina: 1 ml de buffer (x25) + 24 ml de H₂O + 250 ml de AP. COLOR REAGENT A + 250 ml de AP. COLOR REAGENT B. A temp. ambiente.
Alkaline phosphatase conjugate substrate kit, Cat # 170-6432, [Biorad](#). El equivalente en Sigma: B6404
- 17.- Parar la reacción a los 10 min con 10 ml de H₂O y secar el papel de nitrocelulosa.

1^{er} anticuerpo: HistoCIS C219, FAX 33(1)69.85.73.65, España, Tel. 91-521 64 30, FAX 91-521 95 75

2^o anticuerpo: A3562, Sigma

Alkaline phosphatase conjugate substrate kit: B6404, Sigma, 100 ml

Last update, 2006/06/05