

PURIFICACIÓN DE MEMBRANA PLASMÁTICA MDR1 Y CONTROL.

Referencias:

- 1.- Muller M, Meijer C, Zaman GJ, Borst P, Scheper RJ, Mulder NH, de Vries EG, Jansen PL. Overexpression of the gene encoding the multidrug resistance-associated protein results in increased ATP-dependent glutathione S-conjugate transport. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 **91**(26):13033-7.
- 2.- Renes J, de Vries EG, Nienhuis EF, Jansen PL, Muller M. ATP- and glutathione-dependent transport of chemotherapeutic drugs by the multidrug resistance protein MRP1. *Br J Pharmacol*. 1999 **126**(3):681-8.

Protocolo:

1.- Partimos por ej. de células CHrB30 crecidas hasta confluencia en 8 placas. Eliminamos el medio en que han crecido con una pipeta y las lavamos con 10 ml de PBS. Hay que tener en cuenta que se hallan adheridas a las placas.

PBS: NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10.1 mM, KH₂PO₄ 1.8 mM, pH 7.4

Tripsinizamos con 6 ml para separar las células de la placa durante unos 30 min. Empezamos a trabajar a 4 °C (hielo). Mezclamos todas las células de las 8 placas en un tubo de unos 50 ml.

2.- Peleteamos las células CHrB30 centrifugando a 180xg (1700 rpm en Beckman), 10 min, 4 °C y las lavamos de nuevo con unos 10 ml de PBS, ahora ya en un tubo de 15 ml. Para generar este pellet volvemos a centrifugar a 180xg (1700 rpm en Beckman), 10 min, 4 °C.

3.- Resuspendemos los pellets en **BUFFER HIPOTONICO (LISIS CELULAR)**: 1 mM Hepes; pH 7.0, 1 mM MgCl₂ (preparamos un stock de 1 M de MgCl₂). El volumen final será de 40 ml. Además, añadimos 100 U de Benzonasa, una DNAasa (Benzonase, grede II, protease free, Merck). Añadimos in "coctel" de INHIBIDORES DE PROTEASAS a 1 mg/ml final (Aprotinin, PMSF, Pepstatin A, Leupeptina).

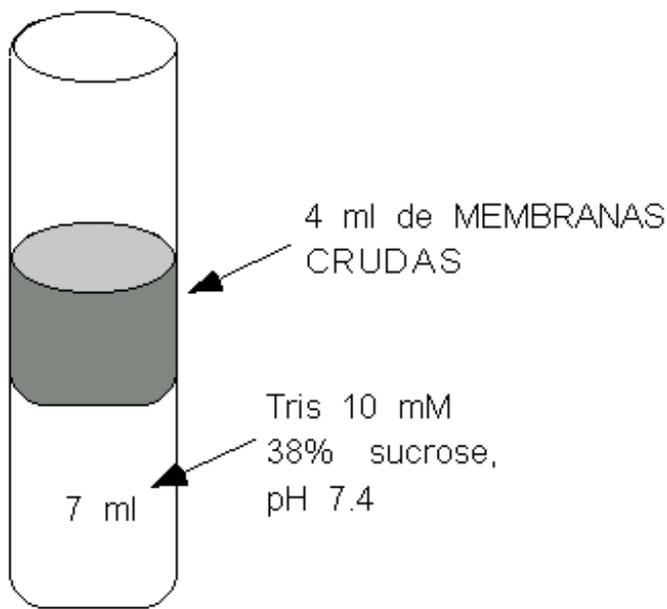
Agitamos la mezcla durante 3 h, en hielo (4 °C).

4.- Pasadas estas 3 h debemos tomar 2 alícuotas de 200 µl para medir prot., etc. en cels. Enteras y con el resto centrifugar este lisado celular a 500-1000xg, 10 min, 4 °C. Descartamos el "pellet" que debe contener nucleos, RE, etc y con el sobrenadante ultracentrifugamos.

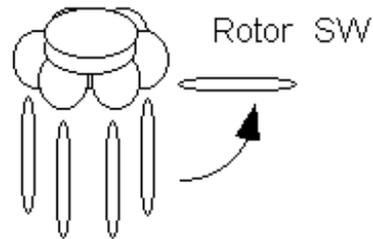
5.- Ultracentrifugacion del lisado celular (membranas) a 100.000xg, 30 min, 4 °C. En rotor angular Ti 45 Beckman son 29300 rpm.

$$g = 1.12 \times 103.8 \times (\text{RPM})^2 / 10^6$$

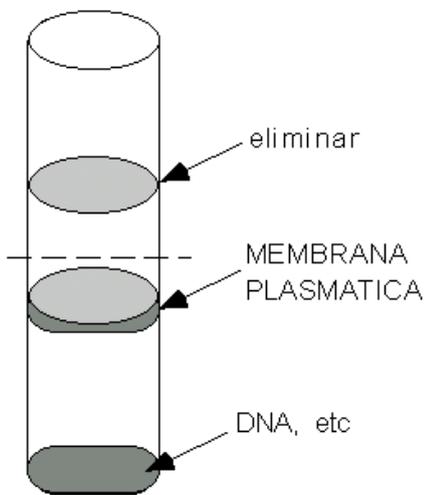
6.- El pellet resultante (MEMBRANAS CRUDAS) se resuspende en **BUFFER ISOTONICO**: 10 mM Hepes; pH 7.5, 250 mM sucrose. Se homogeniza este pellet con 15 golpes de potter a 4 °C.



Tris 10 mM
38% sucrose,
pH 7.4



280.000 x g, 1 h, 4°C
(Beckman, 38.000 r.p.m.)



7.- Recogemos con una pipeta Pasteur la interfase (**MEMBRANA PLASMÁTICA**) y la diluimos en 20 ml de 10 mM HEPES; pH 7.5, 250 mM sucrose.

8.- Centrifugamos estas MEMBRANAS PLASMÁTICAS en rotor angular a 100.000xg, 30 min, 4 °C. En rotor angular Ti 45 Beckman son 29300 rpm.

9.- El pellet resultante se resuspende en 500 μ l de 10 mM HEPES; pH 7.5, 250 mM sucrose, y se da 20 golpes de potter.

10.- Se hacen alícuotas de 50 μ l para hacer los distintos ensayos: [prot], [PLs], ATPase activity, etc. Se congelan en N₂ líquido y se almacenan a -80 ° C.