

## Ensayo de actividad ATPasa Pgp.

Ensayo de actividad ATPasa: Callaghan R, Berridge G, Ferry DR, Higgins CF. The functional purification of P-glycoprotein is dependent on maintenance of a lipid-protein interface. *Biochim Biophys Acta* (1997) 1328(2):109-24.

Cuantificación de Pi: Chifflet S, Torriglia A, Chiesa R, Tolosa S. A method for the determination of inorganic phosphate in the presence of labile organic phosphate and high concentrations of protein: application to lens ATPases. *Anal Biochem* (1988) 168(1):1-4.

### CUANTIFICACION Pi

	Blanco	S <sub>5</sub> 2.85 nmol	S <sub>10</sub> 3.7 nmol	S <sub>15</sub> 5.55 nmol	S <sub>20</sub> 7.4 nmol	S <sub>30</sub> 11.1 nmol	S <sub>40</sub> 14.8 nmol	S <sub>50</sub> 18.5 nmol
Pi 370 μM	---	5 μl	10 μl	15 μl	20 μl	30 μl	40 μl	50 μl
H <sub>2</sub> O MQ	143 μl	138 μl	133 μl	128 μl	123 μl	113 μl	103 μl	93 μl
SOLUCION A	143 μl							
	Mezclar con vortex							
SOLUCION BC	286 μl							
	Mezclar con vortex e incubar a RT durante 5 min.							
SOLUCION E	428 μl							
	Mezclar con vortex e incubar a RT durante 20 min.							
	Leer ABS a 850 nm							

Notas: **DISOLUCION A:** SDS al 12 % (99.9 % pureza, Sigma L-4509)

**DISOLUCION B:** ácido ascórbico al 6 % en 1 N HCl, preparado en el momento.

**DISOLUCION C:** molibdato amonico al 1 %

**DISOLUCION D:** molibdato amonico al 1 % en SDS al 12 % (99.9 % pureza, Sigma L-4509)

**DISOLUCION E:** citrato sodico al 2%, metaarseniato sodico al 2%, acido acetico al 2%.

**DISOLUCION BC (poca proteina) o BD (mucha proteina):** se prepara justo antes de ser usada y debe tener en el inicio color amarillo y no azul.

Standart Pi: PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>K, m.w.= 136.09 / 37 mM Pi , 100 ml = 0.1147 g

0.685 g de PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>K en 100 ml de H<sub>2</sub>O, se hace una disolución 1:100 y se usa como standart

**DISOLUCION A:** 3 g de SDS 99.9 % puro 25 ml de H<sub>2</sub>O

**DISOLUCION B:** 180 mg de Vit. C 3 ml de HCl 1N.

**DISOLUCION C:** 25 mg de molibdato amonico 2.5 ml de H<sub>2</sub>O

MDR1 samples							CONTROL samples						
	Sample	Verapamil 10 μM	VO <sub>4</sub> <sup>-3</sup> 10 μM	CHAPS 4 mM	ATP 2 mM	buffer		Sample	Verapamil 10 μM	VO <sub>4</sub> <sup>-3</sup> 10 μM	CHAPS 4 mM	ATP 2 mM	buffer
(1) BASAL	5 μl	----	----	----	5 μl	133 μl	(2) BASAL	5 μl	----	----	----	5 μl	133 μl
(3) Verap 10 μM	5 μl	5 μl	----	----	5 μl	128 μl	(4) Verap 10 μM	5 μl	5 μl	----	----	5 μl	128 μl
(5) VO <sub>4</sub> <sup>-3</sup> .10 μM	5 μl	----	5 μl	----	5 μl	128 μl	(6) VO <sub>4</sub> <sup>-3</sup> .10 μM	5 μl	----	5 μl	----	5 μl	128 μl
(7) BASAL +	5 μl	----	----	6 μl	5 μl	127 μl	(8) BASAL +	5 μl	----	----	6 μl	5 μl	127 μl

CHAPS 4 mM							CHAPS 4 mM						1
(9) Verap 10 $\mu$ M + CHAPS 4 mM	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l	----	6 $\mu$ l	5 $\mu$ l	122 $\mu$ l	(10) Verap 10 $\mu$ M + CHAPS 4 mM	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l	----	6 $\mu$ l	5 $\mu$ l	122 $\mu$ l
(11) VO <sub>4</sub> <sup>-3</sup> .10 $\mu$ M + CHAPS 4 mM	5 $\mu$ l	----	5 $\mu$ l	6 $\mu$ l	5 $\mu$ l	122 $\mu$ l	(12) VO <sub>4</sub> <sup>-3</sup> .10 $\mu$ M + CHAPS 4 mM	5 $\mu$ l	----	5 $\mu$ l	6 $\mu$ l	5 $\mu$ l	122 $\mu$ l
(0) SIN MEMBRANAS	----	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l	6 $\mu$ l	5 $\mu$ l	122 $\mu$ l							

### ACTIVIDAD ATPasa

1.- Incubar durante 20 (60) min a 37 °C la mezcla: 5  $\mu$  l (2-3  $\mu$  g prot. Memb.) + 2 mM ATP + buffer (150 mM NH<sub>4</sub>Cl, 50 mM Tris pH 7.4; 5 mM SO<sub>4</sub>Mg, 0.02 % NaN<sub>3</sub>).

2.- Parar la reacción añadiendo 143  $\mu$  l de **DISOLUCIÓN A**: SDS al 12 % (99.9 % pureza, Sigma L-4509)

---

Stock VO<sub>4</sub><sup>-3</sup> = 10 mM, C<sub>f</sub> = 10  $\mu$  M; Stock Varapamil = 10 mM, C<sub>f</sub> = 10  $\mu$  M; Stock CHAPS = 100 mM, C<sub>f</sub> = 4 mM

---

VO<sub>4</sub><sup>-3</sup> en 5  $\mu$  l / 143  $\mu$  l = 28.6 veces dilución / 10  $\mu$  M x 28.6 = 0.286 mM / Stock 10 mM a 0.286 mM  $\approx$  35 veces /

Tomar 10  $\mu$  l de Stock 10 mM + 340  $\mu$  l de H<sub>2</sub>O  $\equiv$  **Stock 0.286 mM**

verapamil 5  $\mu$  l / 143  $\mu$  l = 28.6 veces dilución / 10  $\mu$  M x 28.6 = 0.286 mM / Stock 10 mM a 0.286 mM  $\approx$  35 veces /

Tomar 10  $\mu$  l de Stock 10 mM + 340  $\mu$  l de H<sub>2</sub>O  $\equiv$  **Stock 0.286 mM**

CHAPS en 6  $\mu$  l / 143  $\mu$  l = 23.8 veces dilución / 4 mM x 23.8 = 95.33 mM / Stock 100 mM a 95.33 mM  $\approx$  1.049 veces /

Tomar 100  $\mu$  l de Stock 100 mM + 5  $\mu$  l de H<sub>2</sub>O  $\equiv$  **Stock 95.33 mM**

ATP en 5  $\mu$  l / 143  $\mu$  l = 28.6 veces dilución / 2 mM x 28.6 = 57.2 mM / Stock 200 mM a 57.2 mM  $\approx$  3.5 veces /

Tomar 50  $\mu$  l de Stock 200 mM + 125  $\mu$  l de H<sub>2</sub>O  $\equiv$  **Stock 57.2 mM**