

## PURIFICACIÓN DE MEMBRANAS DE “ELECTROPLACA” DE *Torpedo marmorata*. (“Membranas CRUDAS”)

- 1.- Partimos de una muestra de tejido de electroplaca de 100-200 g.
- 2.- Descongelamos el tejido en el **tampón de extracción**:  
Tris.....1,21 g  
EDTA 100 mM.....50 ml  
Iodoacetamida (5 mM).....920 mg  
PMSF (0,5 mM).....87 mg (disuelto en 0.6 ml MetOH)  
Ajustar a pH=7,4; luego enrasar a 1 l.  
**NOTA:** El PMSF y la Iodoacetamida se añaden poco antes de que se vaya a utilizar el **tampón**. Bloquean grupos tioles de proteasas, inhibiéndolas.
- 3.- Descongelamos el tejido durante unos 5 min, el tampón debía estar a 4 °C.
- 4.- Trocear el tejido en fragmentos de 1 cm<sup>3</sup> y añadirlo a un Erlenmeyer junto con el doble de volumen de **tampón de extracción**, que el peso del tejido de que partimos. (Ej. 100 g tejido → 200 ml **tampón de extracción**).
- 5.- Homogeneizar el tejido con el Polytrón: sonda grande, **potencia 7**, **3** periodos de **90 s** cada uno, con intermedios de **30 s**.
- 6.- Centrifugar el homogenado resultante en un **rotor JA-14: 3.500 r.p.m., 10 min, 4 °C**.
- 7.- Filtrar el **sobrenadante** sobre otro matraz a través de **8** capas de gasa.
- 8.- Ultracentrifugar el líquido filtrado con un **rotor T-35: 30.000 r.p.m., 30 min, 4 °C**.
- 9.- Descartamos el sobrenadante y el “pellet” resultante se resuspende en otro matraz. Por cada 1g de placa se obtienen aprox. 1.5 mg proteína. Para purificar AcChoR diluir a **2 mg/ml** en tampón **DB-1** (ej 150 ml para 200 g. placa). Para hacer membranas alcalinas diluir a **10 mg/ml** en tampón es **Hepes 10 mM, NO<sub>3</sub>Na 100 mM; pH=7,4** y llevar a **0.6 mg/ml** en H<sub>2</sub>O. Homogeneizar en Polytrón 1 min potencia 3-4.  
Ej. 100 g placa---15 ml---10 mg/ml.

Hemos obtenido **MEMBRANAS CRUDAS**.

## SOLUBILIZACIÓN DE LAS MEMBRANAS CRUDAS Y PURIFICACIÓN DEL AcChoR (Columna de afinidad)

**DB-1.** Preparación de 4 l; pH=7,4 (sobra con 1 l.)

Tris . . . . . 4,84 g  
NaCl . . . . . 23,36 g  
EDTA (100 mM) . . . . 4 ml  
NaN<sub>3</sub> . . . . . 8 ml

**DB-2.** Preparación de 1 l (sobra con 300 ml)

Colato sódico 1% . . . . . 10 g  
DB-1 . . . . . hasta 1 l

**DB-3.** Preparación de 1 l (sobra con 200 ml)

Colato sódico 1% . . . . . 10 g  
Asolectina (?) 1mg/ml . . . . 1g  
DB-1 . . . . . hasta 1 l

**DB-4.** Preparación de 50 ml (preparar justo antes de su uso)

CINa . . . . . 292 mg  
Carbamilcolina . . . . . 91 mg  
DB-3 . . . . . hasta 50 ml

1.- Partimos de las “**membranas crudas**” procedentes de 200 g de tejido, llevadas a **150 ml** (aprox. **2 mg/ml**).

2.- Añadimos **7,5 ml** de colato sódico (20 %), hasta conseguir un **1 % final**. Agitamos suavemente durante **20 min**, 4 °C.

3.- Ultracentrifugar en un **rotor T-35: 30.000 r.p.m.**, **50 min**, 4 °C.

4.- Durante este proceso debemos lavar la columna: **200 ml** de H<sub>2</sub>O, **200 ml** de **DB-1** y finalmente **200 ml** de **DB-2**. Poner dos llaves a la columna.

5.- Aplicar la muestra (**157,5 ml** aprox.), eluyendo a **1-1,5 ml/min**. Para determinar la velocidad ponemos una probeta de 5 ml en el colector de muestras.

6.- Lavar la columna con **75 ml** de **DB-3**.

7.- Eluir el AcChoR en **50 ml de DB-4**, recogiendo alícuotas de 2 ml (80 gotas del colector).

8.- Medir la absorbancia de las fracciones, juntando aquellas cuya **Abs > 0,5** o mayor que 1 si hay suficiente. Medir este volumen en una probeta y la Abs 280<sub>nm</sub> final. Se puede estimar la concentración final multiplicando la Abs final por **0,6**. Tomar una alícuota de **100 µl** para hacer un gel.

9.- Al volumen de liposomas que tengamos, de la composición que nos interese, le añadimos el volumen de colato 20% (3% final) y el volumen que corresponda de **AcChoR** para que esté la relación lípido-proteína como nos interese. Sustituir el receptor por **DB-3** cuando sea necesario. **Liposomas (10 mg)/ AcChoR (1 mg)**.

- 10.- Lavar la columna con 200 ml de H<sub>2</sub>O, luego con 100 ml de acetato amónico 10 mM; pH=4, dejándose en esta disolución para conservarlo.
- 11.- Dializar las muestras de fosfolípidos:AcChoR (10:1) durante 3 días, con 2 cambios diarios de líquido de contracorriente: Tris 10 mM, NaCl 100 mM; pH=7,4.
- 12.- Congelar en criotubos en N<sub>2</sub> hasta hacer FT-IR, DSC, etc.

## PREPARACIÓN DE “MEMBRANAS ALCALINAS”

- 1.- Partiendo de 100 g de electroplaca seguimos el protocolo de obtención de “membranas crudas” y llegando al punto 9.- resuspendemos los “pellet” en 15 ml de Hepes 10 mM, NO<sub>3</sub>Na 100 mM; pH=7,4 (ajustado con ácido nítrico). La concentración de proteínas debe ser de 10 mg/ml. Diluimos estas “membranas crudas” hasta una concentración final aprox. de proteína de 0,6 mg/ml con c.s.p. 250 ml de H<sub>2</sub>O.
- 2.- La disolución anterior se ajusta a pH=11 con NaOH 0.1 M, añadiendo gota a gota. Mantenemos esta disolución en agitación durante 3 h a temperatura ambiente. De esta forma se desprende la proteína de 43 KD de la membrana.
- 3.- Ultracentrifugar en un rotor T-35: 30.000 r.p.m., 30 min, 4 °C.
- 4.- Se descarta el sobrenadante y se lava cada pellet con 2 ml de Hepes 10 mM, NO<sub>3</sub>Na 100 mM; pH=7,4, eliminando la gelatina desprendida con una pipeta Pasteur. De esta forma eliminamos la proteína periférica que tiene un aspecto gelatinoso.
- 5.- El pellet resultante se resuspende en con Hepes 10 mM, NO<sub>3</sub>Na 100 mM para obtener una concentración final de proteína aprox. de 8-10 mg/ml. Partiendo de 100 g placa resuspender en 5 ml. Hacer Lowry y a partir de ahí ajustar el volumen para conseguir una concentración de 3-5 mg/ml.

## PREPARAR VESÍCULAS PARA STOPPED-FLOW.

1. Partiendo de vesículas a una concentración de 3-5 mg/ml, añadir PTSA a una relación de 0.13 ml PTSA (32 mM PTSA: 0.0195 g/ml de agua)/ 1 ml vesícula.
2. Hacer 2 ciclos de congelación rápida/descongelación lenta. En un tubo cónico “corning” de polipropileno (opaco) de 50 ml se deposita 2-3 ml de vesículas y se sumerge sobre N<sub>2</sub> líquido en un Deward, dando vueltas constantemente para que se forme una película.
3. Una vez descongelado se resuspende con Politrón 1 mim, a potencia 4-5.
4. Pasar por columna Sepharosa 6 MB. La columna habrá sido lavada con 100 ml de H<sub>2</sub>O y 100 ml de Hepes 10 mM, nitrato 100 mM; pH=7.4. Lavar luego la columna con 100 ml de H<sub>2</sub>O y otros 100 ml H<sub>2</sub>O, Azida 0.02 % hasta el próximo uso.

## ACTIVACIÓN DE LA COLUMNA DE SEPHAROSE 6MB USADA PARA SEPARAR EL PTSA QUE QUEDA FUERA DE LAS VESICULAS CARGADAS DE ESTAS.

1. Se utiliza una columna de Econo Bio-Rad de 1.5 x 27 cm.
2. El gel (Pharmacia) puede utilizarse muchas veces. Comercialmente está activado con CNBr y cada vez que pasemos una alícuota de vesículas cargadas es recomendable neutralizar estos grupos para lo cual se desempaqueta el gel en un vaso de precipitado y se incuba con 500 ml de buffer Tris 1 M, pH=8, durante una noche. Evitar cualquier agitación magnética brusca.
3. Lavar el gel con 100-200 ml H<sub>2</sub>O sobre un embudo de placa filtrante, evitando siempre que el gel se seque.
4. Ya en la nevera, empaquetar el gel en la columna y pasar 100-200 ml H<sub>2</sub>O.
5. Equilibrar con el buffer en que se encuentran las membranas cargadas o con un buffer de conservación (Ej. Hepes 10 mM, NO<sub>3</sub>Na 100 mM, azida 0.02 %, pH=7.4)

## (\*) PREPARACIÓN DE LOS LIPOSOMAS PARA RECONSTITUIR EL AcChoR

### ALGUNAS MUESTRAS QUE SE HAN PREPARADO...

1)	DMPA <sub>d</sub> +PC+Cho	+ AcChoR	[(25:50:25)] <sub>10</sub>	:	AcChoR <sub>1</sub>
2)	DMPA <sub>d</sub> +PC+Cho		(25:50:25)		
3)	DMPA <sub>d</sub> +PC	+ AcChoR	[(25:75)] <sub>10</sub>	:	AcChoR <sub>1</sub>
4)	DMPA <sub>d</sub> +PC		(25:75)		
5)	DMPG <sub>d</sub> +PC+Cho	+ AcChoR	[(25:50:25)] <sub>10</sub>	:	AcChoR <sub>1</sub>
6)	DMPG <sub>d</sub> +PC+Cho		(25:50:25)		
7)	PA+PC+Cho	+ AcChoR	[(25:50:25)] <sub>10</sub>	:	AcChoR <sub>1</sub>
8)	PG+PC+Cho	+ AcChoR	[(25:50:25)] <sub>10</sub>	:	AcChoR <sub>1</sub>

Teniendo en cuenta los pesos moleculares de cada fosfolípido:

PCh= 760	Cho= 386.4	DMPG <sub>d</sub> = 807.4
PGh= 771	DMPA <sub>d</sub> = 668.2	DMPG= 668.8
PAh= 695.9	DMPG <sub>d</sub> = 743.3	

Las cantidades en mg que es necesario mezclar:

Matriz	Fosfolípidos (mg)				
DMPA <sub>d</sub> +PC+Cho	DMPA <sub>d</sub> =	5.23	PC =	11.89	Cho = 3.02
DMPA <sub>d</sub> +PC	DMPA <sub>d</sub> =	6.61	PC =	13.89	
DMPG <sub>d</sub> +PC+Cho	DMPG <sub>d</sub> =	5.61	PC =	11.47	Cho = 2.91
PA+PC+Cho	PA =	2.67	PC =	5.84	Cho = 1.48
PG+PC+Cho	PG =	2.88	PC =	5.68	Cho = 1.44

1.- Resuspender los lípidos en Cl<sub>3</sub>CH.

2.- Evaporar el Cl<sub>3</sub>CH en speed-vac y liofilizar las muestras 2 h.

3.- Añadir 400 ml de CHAPS (20 %) por cada 20 mg de lípidos y agitar en el vortex hasta que el lípido se despegue del tubo. A continuación añadir 1,6 ml de Tris 10 mM, NaCl 100 mM; pH=7,4.

4.- Sonicar en baño con H<sub>2</sub>O caliente hasta que la muestra quede transparente.

5.- Dializar las muestras de fosfolípidos:AcChoR (10:1) durante 3 días, con 2 cambios diarios de líquido de contracorriente: Tris 10 mM, NaCl 100 mM; pH=7,4.

**PROTOCOLO PARA “PINCHAR” A PARTIR DE UNA MISMA MUESTRA EN D<sub>2</sub>O (CARBONILO Y AMIDA I)[ventanas: F<sub>2</sub>Ca] Y EN H<sub>2</sub>O (METILOS, METILENOS Y FOSFATOS) [ventanas: SZn].**

- 1.- Descongelar las muestras a 4°C.
- 2.- Ultracentrifugar en un rotor TFT-70: 55.000 r.p.m., 30 min, 4 °C.
- 3.- Resuspender el “pellet” en 40 ml de buffer INTRA, pH=7 y pinchar 20 ml. Sobre el resto se hace el intercambio de H<sub>2</sub>O a D<sub>2</sub>O. Hacer una serie de **desnaturalización térmica**.
- 4.- Intercambio de H<sub>2</sub>O a D<sub>2</sub>O: sobre la muestra restante en 3.- añadir 1,5 ml de buffer INTRA, pD=7,4.
- 5.- Ultracentrifugar en un rotor TFT-70: 70.000 r.p.m., 50 min, 4 °C.
- 6.- El nuevo “pellet” resultante se resuspende en 20 ml de buffer INTRA, pD=7,4 y se pincha en FT-IR, haciendo una serie de **desnaturalización térmica**.

<b>TAMPONES NECESARIOS PARA PURIFICAR MEMBRANAS CRUDAS.</b>	<b>TAMPONES NECESARIOS PARA SOLUBILIZAR Y PURIFICAR AcChoR.</b>
1. Tampón de extracción (1l) Tris → 1.21 g EDTA(100 mM) → 50 ml *Iodoacetamida → 920 mg *PMSF → 87 mg en 600 ml de CH <sub>3</sub> OH; ajustar a pH=7 y enrasar a 1l. *Añadir en el momento de uso.	1. <b>DB-1</b> (4l) pH=7.4 Tris → 8.84 g NaCl → 23.36 g EDTA(100 mM) → 4 ml NaN <sub>3</sub> (10%) → 8 ml Ajustar a pH=7,4 y enrasar a 4l.
2. Tampón de resuspensión (200 ml) Hepes 10 mM → 0.520 g ClNa 100 mM → 1.168 g Ajustar a pH=7 y enrasar a 200 ml.	2. <b>DB-2</b> (1l) Colato Na(1%) → 10 g DB-1 hasta 1l
3. Stock EDTA 100 mM: EDTA → 5.844 g, añadir NaOH para disolver y enrasar a 200 ml.	3. <b>DB-3</b> (1l) Colato Na(1%) → 10 g Asolectina(1mg/ml) → 1 g DB-1 hasta 1l
	4. <b>DB-4</b> (50 ml) Carbamilcolina → 91 mg NaCl → 292 mg DB-3 hasta 50 ml

## Preparación de la columna de afinidad para purificar el AcChoR.

### **1.- Preparación de la bromoacetilcolina.**

- 1.1.- El bromuro de colina (0,1 moles = 18,4 g) se disgrega en un mortero y se coloca en un vaso de fondo estrecho para facilitar la agitación de la mosca.
- 1.2.- El bromuro de acetilo (0,1 moles,  $d=2,32$  g/ml)(24,2 g en 10,43 ml) se coloca sobre una bureta y se deja caer gota a gota sobre la colina, agitando suavemente en una operación que debe durar unos 40 min.
- 1.3.- La mezcla viscosa se coloca en una mezcla de hielo con agitación durante 75 min.
- 1.4.- Añadir 50 ml de etanol absoluto para permitir la cristalización de la bromoacetilcolina.
- 1.5.- Transferir a un embudo con placa filtrante y seguir lavando con etanol hasta que aparezca un color amarillo.
- 1.6.- Secar en el mismo embudo con vacío, tapando la boca del embudo.
- 1.7.- Cristalizar con 400 ml de isopropanol (no se hace normalmente). Y guardar en recipiente con desecante y en frío.

### **2.- Determinación de -SH.**

- 2.1.- Preparar solución stock de DTNB 10 mM (39.6 mg de  $H_2O$ ). Cubrir con papel de plata. Guardar congelado a  $-20$  °C.
- 2.2.- Añadir 330 ml del stock de DTNB 10 mM a 10 ml de Tris 100 mM; pH=8. Cubrir con papel de plata.
- 2.3.- En un tubo de ensayo añadir 1 ml de la solución anterior (2.3.-) y 50 ml del gel derivatizado. Aparece un color amarillo debido a la reacción del DTNB con los grupos -SH que debe desaparecer tras la reacción de estos con la bromoacetilcolina.

### **3.- Preparación de la columna Affi-Gel 10.**

- 3.1.- En un matraz, lavar 25 ml de Affigel 10 con 200 ml de  $H_2O$ , para eliminar el conservante. Usar un embudo de placa filtrante.
- 3.2.- Equilibrar con 50 ml de Hepes 20 mM; pH=7,4. Medir -SH.
- 3.3.- Añadir 50 ml de Hepes 20 mM, Cistamina 54 mM; pH=7,4. Dejar reaccionar durante 1 h en un vaso de precipitado.
- 3.4.- Eliminar el tampón con el embudo de placa filtrante. Lavar con 200 ml de  $H_2O$  y medir -SH.
- 3.5.- Lavar con 100 ml de Tris 0,1 M; pH=8. Mantener en el matraz durante 20 min.

- 3.6.- Añadir 25 ml de Tris 100 mM, 100 mM DTT, pH=8, manteniéndolo durante 20 min.
- 3.7.- Al medir -SH debe aparecer el color amarillo. Lavar con 100 ml de H<sub>2</sub>O y volver a medir -SH.
- 3.8.-** Añadir 50 ml de fosfato sódico 50 mM, NaCl 100 mM; pH=7 [NaCl → 2.3376; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> → 39 ml; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> → 61 ml, c.s.p. 400 ml de H<sub>2</sub>O] y dejar equilibrar.
- 3.9.- Añadir 300 mg de bromoacetilcolina y agitar inmediatamente. Dejar reaccionar durante 20 min con agitación ocasional. Medir -SH y si no se ha perdido totalmente el color amarillo añadir más bromoacetilcolina.
- 3.10.- Añadir 50 mg de iodoacetamida y medir de nuevo -SH.
- 3.11.- Lavar la columna con 100-200 ml de H<sub>2</sub>O.
- 3.12.- Empaquetar en una columna Econo Bio-Rad 1.5 x 20 cm. Almacenar la columna hasta su uso en Acetato amónico 0,1 M, pH=4.

#### **4.- Preparación de la columna Affi-Gel 401.**

- 4.1.- En un matraz, lavar 25 ml de Affigel 401 con 200 ml de H<sub>2</sub>O, para eliminar el conservante.
- 4.2.- Lavar con 100 ml de Tris 0,1 M; pH=8.
- 4.3.- Añadir 50 ml de Tris 100 mM, 20 mM DTT, pH=8, manteniéndolo durante 20 min.
- 4.4.- Lavar con 100-200 ml de H<sub>2</sub>O para eliminar el DTT. Medir -SH.

**Seguir en 3.8.-**



## ELECTROFORESIS SDS-PAGE.

- 1.- Limpiar los cristales con jabón y enjuagarlos con abundante agua destilada. Después limpiarlos con metanol para deslipidizarlos.
- 2.- Colocar entre ambos cristales el separador del grosor indicado. Fijar los cristales procurando que queden a la misma altura con el fin de que el gel no se salga. Para ello se utiliza el soporte de las placas donde posteriormente se polimerizará el gel.
- 3.- En el soporte para las placas se colocan las gomas inferiores. Se prepara el gel separador. Sin perder tiempo se añade dicho gel entre las placas hasta una altura aproximada de 1 cm del final del cristal pequeño. Después de añadir el gel se pone agua destilada sobre la superficie.
- 4.- Conservar una pipeta Pasteur llena de gel para saber cuando polimeriza. debe tardar unos 20 min.
- 5.- Completa la polimerización del gel separador se elimina el agua con ayuda de papel secante. Se adiciona el gel concentrador, preparado momentos antes, hasta llenar totalmente el espacio entre los dos cristales. Rápidamente se incluye el peine con cuidado de que no se formen burbujas. Se polimeriza en unos 10 min.
- 6.- Sacar el peine con cuidado de no romper el gel. Añadir el **tampón de electroforesis** en las calles del gel concentrador.
- 7.- Montar el gel en la cámara de electroforesis:
  - Acoplar el gel al electrodo y cargar la muestra con ayuda de un jeringa Hamilton: **5 o más** mg en **10** ml por cada calle. Pinchar patrón. Caben unos 30  $\mu$ l en cada calle. Pinchar unos 20-30  $\mu$ g de proteína por calle.
  - Poner el tampón de electroforesis en la cámara interna del electrodo hasta cubrir el gel por completo y el resto depositarlo en la cubeta de electroforesis.
  - Conectar los electrodos rojo y negro con su propio color a la fuente de alimentación. El voltaje para el **gel concentrador** está entre **75-80 mV** y para el **gel separador** entre **175-180 mV**, hasta que el frente de azul de bromofenol llega al final del gel.
- 8.- Se desmonta el gel y se separa de las placas ayudándose de agua destilada.
- 9.- Teñir y desteñir el gel.

## REACTIVOS NECESARIOS PARA UNA ELECTROFORESIS SDS-PAGE. MINI-PROTEAN II.

Tampón de muestra:

H <sub>2</sub> O destilada	4 ml
Tris 0,5 M; pH=6,8	1 ml
Glicerol 50 %	0,8 ml
SDS 10 %	1,6 ml
2-Mercaptoetanol	0,4 ml
Azul de bromofenol 0,05 %	0,2 ml

Tampón de electroforesis (500 ml):

Tris	7,5 g
Glicina	36 g
SDS	2,5 g
H <sub>2</sub> O	c.s.p. 500 ml

Gel SEPARADOR:

% para <b>10 ml</b>	<b>12 %</b>	<b>*9 %</b>	<b>7,5 %</b>	<b>5 %</b>
H <sub>2</sub> O	3,35 ml	4,35 ml	4,85 ml	5,65 ml
Tris 1,5 mM; pH=8,8	2,50 ml	2,50 ml	2,5ml	2,5 ml
SDS 10 %	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml
Acril:bis	4 ml	3 ml	2,5 ml	1,7 ml
DESGASIFICAR				
PSA (persulfato)	65 µl	65 µl	65 µl	65 µl
TEMED	7 µl	7 µl	7 µl	7 µl

Gel CONCENTRADOR:

para <b>5 ml</b>	<b>4 %</b>
H <sub>2</sub> O	3,05 ml
Tris 0,5 mM; pH=6,8	1,25 ml
SDS 10 %	50 ml
Acril:bis	0,65 ml
DESGASIFICAR	
PSA	35 µl
TEMED	7 µl