

## Fosforilación con SRC (Tyr-kinase)

- 1.- Tampón de reacción: Hepes 20 mM, Cl<sub>2</sub>Mg 20 mM, pH 7.4.  
(Tampón stock x5: Hepes 100 mM, Cl<sub>2</sub>Mg 100 mM, pH 7.4)
- 2.- DTT 0.8 mM.  
(Disolución stock 10 mM)
- 3.- ATP 0.2 mM.  
(Disolución stock 2.5 mM)
- 4.- Tyr-quinase comercial (SRC) 1.5 µl por cada 25 µl de vol.reac.
- 5.- nAcChR 0.928 µg/µl (3.65 µM: MW 254 KDa)  
(4.64 µg nAcChR)

## Protocolo

Nombre de cada tubo de ensayo							
	No nAcChR 180 '	NAcChR 180 '	15 '	30 '	60 '	180 '	BoNT E (c+) 180 '
Tampón 5X	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
H <sub>2</sub> O destil.	14.5 µl	11 µl	9.5 µl	9.5 µl	9.5 µl	9.5 µl	10.5 µl
DTT 10 mM	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
ATP 2.5 mM	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
nAcChR	----	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	4 µl
Enzima SRC	1.5 µl	----	1.5 µl	1.5 µl	1.5 µl	1.5 µl	1.5 µl
Vol. final	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl

- Pipetear los volúmenes adecuados en tubos de 7.5x90 mm
- Incubar a 30 °C durante los tiempos adecuados, con una suave agitación.  
Baño de H<sub>2</sub>O.
- Parar la reacción con buffer electroforesis (b. Sample): 50 µl.
- Dejar 2 h a 4 °C.
- Desnaturalizar a 80 °C, 20 '
- Realizar la electroforesis y el inmunoblot.