

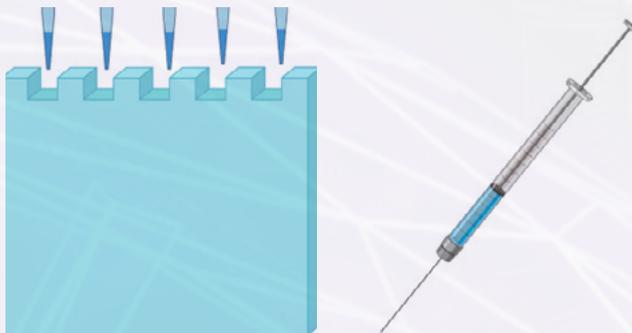
## CAPÍTULO 4

# ANÁLISIS DE EXTRACTO PROTEICO POR WESTERN BLOTTING

[1, 8, 10-14]

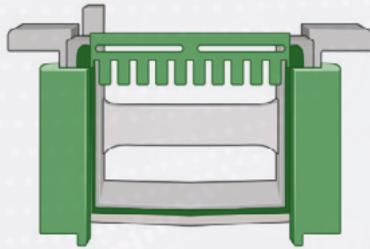
### 4.1. ELECTROFORESIS

1. Preparar los lisados celulares tras su cuantificación a la concentración de 15-35  $\mu\text{g}$ / muestra. En un volumen final de 20  $\mu\text{l}$  para geles de 10 pocillos o un volumen final de 10  $\mu\text{l}$  para geles de 15 pocillos.
2. Mezclar con el tampón de carga 5X (1.2.1, Tabla 3).
3. Calentar las muestras a 95°C, 5 min en el termobloque.
4. Dar un *spin* a las muestras para que baje todo el volumen que se ha evaporado por las paredes.
5. Cargar el volumen total de cada muestra en los pocillos en el orden correspondiente utilizando una jeringa *Hamilton*.

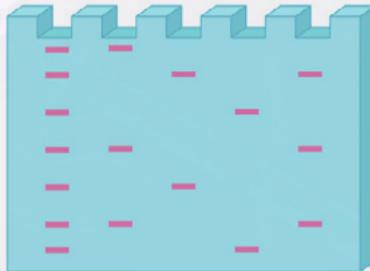


6. Someter las proteínas de cada muestra a una electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE, del inglés *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) del 4-12% (*Mini-Protean TGX*), 12% (*Mini-Protean TGX*), 4-20%

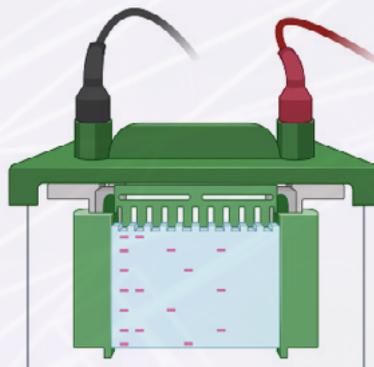
(*Criterion Gel TGX*) o 12% (*Criterion TGX*) en condiciones reductoras y desnaturizantes y así quedan separadas según su tamaño.



7. Para referenciar las masas moleculares de las proteínas del experimento se utiliza un marcador de peso molecular (*Precision Plus Protein™ Dual Color Standards Bio-Rad*) (*Bio-Rad 161-0374*).

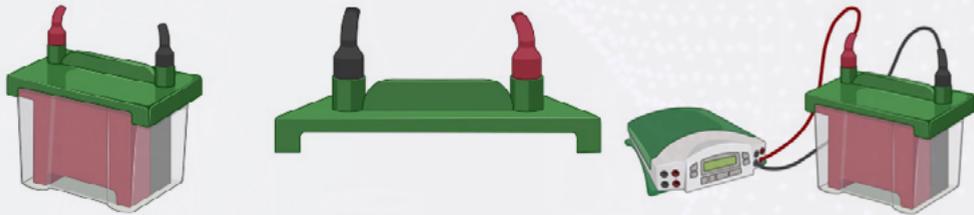


8. Realizar la electroforesis en un equipo de *Bio-Rad modelo Mini Protean Tetra System* o en un equipo de electroforesis *Bio-Rad Criterion Cell*, según el tamaño de gel utilizado, en presencia de tampón *Laemmli 1X* (1.2.2) durante un intervalo de tiempo comprendido entre 30 min y 1 hora, sometidas a un voltaje de 90 V (hasta que atraviesan el gel de apilamiento) y posteriormente se aumenta hasta los 120 V (gel de resolución). También puede realizarse a 100 V constante de principio a fin.



## 4.2. TRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS

9. Transferir las proteínas a una membrana de polivinilo difluoruro (*Immun blot PVDF Membrane*) (*Bio-Rad 162-0177*), activar la membrana incubándola durante 1 min en metanol, 1 min en agua destilada y finalmente hay que embeberla en el tampón de transferencia CAPS 1X (1.2.4, **Tabla 4**) o tampón Tris Glicina Metanol (1.2.5, **Tabla 5**) durante al menos 5 min.
10. Para la transferencia en húmedo usamos el equipo de transferencia (*Mini Trans Blot electrophoretic Transfer Cell Bio-Rad*) para geles de 10 y 15 pocillos. Para geles de 18 pocillos hemos utilizado el sistema de transferencia en húmedo (*Criterion Blotter*).



NOTA: Preparar para la transferencia de cada gel, dos papeles *Whatman (Extra Thick Blot PAPER Bio-Rad)*, el uso de dos esponjillas y una membrana de PVDF. Todo deberá estar equilibrado en su tampón de transferencia antes de proceder a realizar el proceso de transferencia. Estas piezas deben estar embebidas durante al menos 10 min en tampón de transferencia.

12. Nombrar en la esquina derecha la membrana que vamos a utilizar. Activar la membrana de PVDF, y posteriormente introducirla en el tampón que vamos a utilizar para realizar esta transferencia junto con los papeles *Whatman* y las esponjillas.
13. Prepara el montaje para llevar a cabo la transferencia. Se realizará en un soporte de plexiglás que se introducirá en el sistema de transferencia correspondiente según el tamaño del gel. Se introduce un imán, un bloque de hielo y se enrasa la cubeta con el tampón de transferencia CAPS 1X (1.2.4, **Tabla 4**), se colocan los electrodos y todo el dispositivo al completo se introduce en el frigorífico para comenzar la transferencia.
14. Aplicar una tensión de 100 V para obtener un amperaje de partida de 0,25 A y migrar durante 1-1,5 hora en agitación continua y refrigeración, en el caso de los geles de 10-15 pocillos (*Mini Protean-TGX*).

NOTA: Aplicar una tensión de 75 V y migrar durante 45 min en agitación continua y refrigeración en el caso de los geles de 18 pocillos (*Criterion TGX*). El tampón que utilizamos en la transferencia de geles de 18 pocillos es el tampón Tris Glicina Metanol (1.2.5, **Tabla 5**).

15. Finalizada la transferencia, el gel se tiñe con el colorante azul brillante de *Coomassie (Bio-Rad 161-0436)* (1.2.8) y la membrana con rojo *Ponceau (Sigma P7170)* (1.2.9), con objeto de verificar la correcta transferencia de las proteínas y además sirve como control interno de carga.

### 4.3. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS

16. Incubar la membrana durante 1 hora a T<sup>a</sup> ambiente y en agitación con una solución de bloqueo consistente en 10% de leche desnatada en polvo disuelto en tampón salino *Tris Tween* (TTBS del inglés *Tween tris buffer saline*) (1.2.7, Tabla 6).
17. Realizar tres lavados de 5 min con el tampón TTBS 1X.
18. Incubar la membrana con el anticuerpo primario de interés (puede estar diluido en una solución de BSA al 5% o leche desnatada al 10% en TTBS 1X dependiendo de la casa comercial y el anticuerpo) en agitación durante una hora a T<sup>a</sup> ambiente o toda la noche a 4°C.
19. Retirar la solución del anticuerpo primario.
20. Realizar tres lavados de 5 min cada uno con tampón TTBS 1X.
21. Incubar la membrana durante una hora a T<sup>a</sup> ambiente en agitación, con el anticuerpo secundario específico conjugado con peroxidasa de rábano picante, HRP (del inglés, *horseradish peroxidase*).
22. Lavar de nuevo las membranas dos veces durante 5 min en TTBS 1X.

NOTA: El anticuerpo secundario se diluye de 1:5.000 a 1:10.000 en 10% de leche desnatada en una solución de TTBS. La elección del anticuerpo secundario entre monoclonal o policlonal depende siempre del anticuerpo primario.

### 4.4. REVELADO

23. Exponer la membrana 5 min a una solución de ECL (del inglés, *Enhance chemiluminescent by luminol*) (32106, Pierce).
24. Realizar el revelado en *Amersham Imager 600*.



#### 4.5. BORRADO DE MEMBRANAS

25. Lavar la membrana en TTBS 1X para retirar el ECL.
26. Incubar la membrana 5-15 min a 37 °C en agitación con la solución de borrado *Stripping Buffer* o con el siguiente reactivo (1.2.10).
27. Realizar dos lavados con TTBS 1X durante 5 min.
28. Bloquear la membrana en agitación en TTBS 10% de leche, 1 hora a T<sup>a</sup> ambiente.
29. Lavar con TTBS 1X.

NOTA: Finalmente la membrana estará lista para ser reutilizada (al menos en dos o tres ocasiones más). Hay que tener en cuenta que antes del primer borrado, hay que incubar la membrana con los anticuerpos fosforilados de interés. Después se puede proceder al borrado de la membrana e incubar con los anticuerpos totales, específicos de los anticuerpos fosforilados.