

## CAPÍTULO 11

# ANÁLISIS PULSE-CHASE

### Día. Siembra celular

1. Sembrar células en placas de 6 pocillos (*130184, Biolite*) a la densidad adecuada. Dejar un pocillo más de control.

### Día 2. Marcaje con L-[<sup>14</sup>C]-Valina

2. Calcular el número de ml necesarios para el experimento. Usaremos 2  $\mu$ l de L-[<sup>14</sup>C]-Valina (*NEC291EU050UC, PerkinElmer*) por ml de medio + 0,5 ml de error de pipeteo [14].
3. Aspirar el medio de cada pocillo de la placa de 6, sembrada previamente el día 1.
4. Añadir 1 ml de la mezcla de medio + L-[<sup>14</sup>C]-Valina por pocillo. El/los pocillos control, sin L-[<sup>14</sup>C]-Valina, cambiarles el medio por 1 ml de medio fresco.
5. Dejar el cultivo en el incubador entre 18 y 24 horas con la L-[<sup>14</sup>C]-Valina.
6. Guardar la bandeja donde hemos trabajado en el lugar acondicionado para ello. Las puntas de pipeta utilizadas durante el experimento son introducidas en un vaso, se lavan bien bajo el grifo dejando correr el agua. Las puntas y el papel de filtro sobre el que hemos trabajado se tiran al cubo de residuos tóxicos.
7. Limpiar la campana y pasar un trozo de papel de filtro empapado con agua destilada por toda la superficie de la campana utilizada y lo guardamos en un vial de centelleo rotulado como "Frotis 1<sup>er</sup> día" y lo metemos en la caja. Tiramos los guantes en el cubo de residuos.
8. Anotar la cantidad de L-[<sup>14</sup>C]-Valina utilizada.

### Día 3. Pre-chase

9. Eliminar el medio con el isótopo radiactivo que no hayan incorporado las células. El medio con L-[<sup>14</sup>C]-Valina se recoge en el bote de residuos con P1000.
10. Añadimos entre 500  $\mu$ l y 1 ml de PBS/pocillo. Repetir hasta tres veces. El PBS recogido lo vamos tirando en el bote de residuos y las puntas utilizadas en el vaso.

11. Añadir 1 ml de medio fresco que contiene L-Valina (*V0513, Sigma*) (10 mM y peso molecular 1.171,5 g/mol).
12. Incubar placas de cultivo 1 hora.

### Chase

13. Durante la hora del *pre-chase*, preparar los distintos tratamientos que vayamos a realizar en nuestro experimento, utilizando el medio con L-Valina.
14. Recoger el *pre-chase* en el bote de residuos.
15. Lavar 2 veces con PBS, recogiendo en el bote de residuos también.
16. Añadir los tratamientos y llevamos la bandeja con las placas a incubar a 37 °C durante el tiempo que dure nuestro experimento. En el caso del tratamiento con EBSS hay que añadir BSA al 0,1%.
17. Tirar los tubos de los tratamientos y del medio con L-Valina y sacamos el vaso con las puntas y el bote de residuos. Procedemos como el primer día, abrimos el grifo, dejamos que corra bien de agua y eliminamos el contenido del bote. Lo lavamos bien con mucha agua, así como las puntas y el vaso. Tirar las puntas al cubo de residuos y secamos el vaso y el bote y los guardamos en su sitio. Vamos a dejar el papel de filtro hasta que acabemos el experimento.
18. Rotular 3 juegos de eppendorfs por cada condición, tendremos tres fracciones: la fracción celular (Rc) adherida a la placa, la fracción suspendida (Rs) en el medio y la fracción precipitada (Rp) obtenida a partir de la fracción suspendida. Cada fracción será de un color, y con números, cada pocillo será un número.
19. Tras finalizar nuestro tratamiento recoger el contenido de cada pocillo en un eppendorf rotulado como Rp.
20. Añadiremos 100 µl/eppendorf de ácido tricloroacético (TCA) al 100%. Poner los eppendorfs en un rotor, dejamos agitándose durante toda la noche, a 4 °C.
21. Congelar las placas a -80 °C o podemos continuar trabajando con ellas.
22. Guardar toda la tapa con su caja, quitamos el papel de filtro de la campana, limpiamos como normalmente y pasamos por encima un trozo de papel de filtro empapado con agua destilada y lo guardamos en un vial de centelleo rotulado como "Frotis 2º día" y lo metemos en la caja con el otro.

### Día 4. Final Chase

23. Coger las placas del congelador a -80 °C y las ponemos en una caja con hielo para mantener la temperatura.
24. Añadir 1 ml/pocillo de TCA 10% frío, y dejamos las placas a 4 °C, 15 y 30 min.
25. Retirar el TCA al 10% y lo reemplazamos por 500 µl/pocillo de NaOH 0,2 M, e incubar en la estufa, a 37 °C, durante 1 hora.
26. Recoger los eppendorfs Rp, y los centrifugamos a 4.000 xg, 20 min, 4 °C.

27. Recoger el sobrenadante en los eppendorfs rotulados como Rs.
28. El pellet que queda en los eppendorfs Rp, lo resuspendemos con 500  $\mu$ l/eppendorf de NaOH 0,2 M. Vorteamos hasta que todo esté bien disuelto.
29. Cuando haya pasado la hora, cogemos las placas, resuspendemos muy bien el contenido de los pocillos y recogemos todo el volumen que haya en los eppendorfs rotulados como Rc.

NOTA: Las muestras en los eppendorfs pueden quedarse a T<sup>a</sup> ambiente hasta su análisis. Podemos dejar rotulados los tubos de centelleo de la misma manera que los eppendorfs.

#### Último día. Medida (Ponerse en contacto con el servicio de Badajoz)

NOTA: Este día se llevarán las muestras en los eppendorfs, en unas gradillas con tapas, para evitar escapes de las muestras. También se llevarán los tubos de centelleo rotulados, así como los dos tubos con los frotis. Además, habrá que llevar todo lo necesario para la manipulación de estas, P200, puntas amarillas, dispensadores automáticos y varias jeringuillas, guantes...

30. Añadir entre 50 y 100  $\mu$ l de cada muestra a su correspondiente tubo de centelleo y 1 ml de líquido de centelleo (*Optihise hisafe 1200.437 RRS 314*). Se mezcla y se espera 2 horas antes de medir la degradación en un contador  $\beta$  de centelleo.

$$\% \text{ Degradación } h^{-1} = \frac{R_s}{R_s + R_c + R_p}$$