

CAPÍTULO 14

ANÁLISIS: *FILTER TRAP*

Realizar el lisado celular o de tejido siguiendo protocolo (1.4.7 y 1.4.8) para dos fracciones [7]:

– Fracción SOLUBLE:

1. Lisar las muestras con el volumen que corresponda de NP40 0,5 x.
2. Incubar 10-15 minutos en hielo.
3. Centrifugar a 13.000 rpm entre 15-60 minutos.
4. Recoger el sobrenadante en eppendorfs rotulados como normalmente, añadiendo “Soluble”.

– Fracción INSOLUBLE:

1. Resuspender el pellet, que normalmente se desecharía, con un volumen adecuado de SB1x.
2. Sonicar.
3. Calentar 10 minutos en el termobloque y dar un spin. Mantener en el mismo eppendorf previamente rotulado añadiendo “Insoluble” a la información del mismo.

Para realizar el *Filter Tap* necesitamos [16]:

– Aparato



– Membranas de nitrocelulosa de 12 × 9 cm

- TBS $\left\{ \begin{array}{l} - \text{Tris } 4,84 \text{ g} \\ - \text{NaCl } 58,48 \text{ g} \\ - \text{ddH}_2\text{O } 2 \text{ L} \end{array} \right\}$ Frío. Ajustar pH a 7,5 con HCl
 - TBS + SDS 2%
 - TBS + SDS 0,1%
- TTBS $\left\{ \begin{array}{l} - \text{TBS } 1 \text{ L} \\ - \text{Tween } 20 \text{ } 0,5 \text{ mL} \end{array} \right\}$

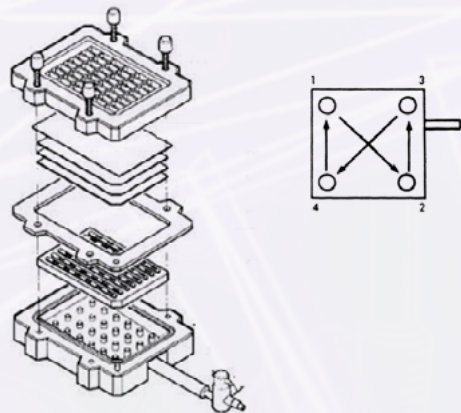
- 3 papeles de filtro propios del aparato
- Reservorios de multicanal
- Pipeta multicanal
- Puntas
- Bomba de vacío
- Muestras

5. Preparar las muestras con TBS + SDS 2%, a distintas concentraciones, una en la misma concentración a la que vamos a realizar la técnica de *Western blotting* de la parte soluble (por ejemplo 20 μg de proteína), una en una concentración intermedia (12 μg de proteína) y otra a una concentración inferior (4 μg de proteína).

NOTA: El volumen final de cada muestra es 200 μL .

Para comenzar:

6. Embeber los 3 papeles de filtro y la membrana, previamente rotulada, en TBS + SDS 2%.
7. Conectamos el aparato con la bomba de vacío y abrimos el mismo para luego montarlo de la siguiente manera:
 - Base del aparato
 - Placa de soporte
 - Borde sellador de plástico
 - 3 papeles de filtro
 - Membrana
 - Tapa del aparato



NOTA: Debemos asegurarnos que no haya burbujas en los papeles de filtro ni en la membrana. Cuando todo está colocado todo se cierra la tapa así, para asegurarnos de que se aplica la misma cantidad de presión a toda la superficie:

8. Encender la bomba de vacío y aplicamos vacío (posición 1).

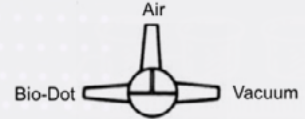
POSICIONES DE LA VÁLVULA DE LA BOMBA DE VACÍO



Posición 1



Posición 2



Posición 3

NOTA: Nos aseguramos de que está bien cerrado, volviendo a apretar los tornillos como antes.

9. Ponemos la bomba en “aire” (posición 2) y añadir 100 μL /pocillo de TBS + SDS 2% para rehidratar la membrana después de aplicar el vacío. Así evitamos problemas posteriores.
10. Cuando todos los pocillos tengan 100 μL , ponemos la bomba en vacío suave (posición 3) y esperamos a que todo el volumen desaparezca, atravesase la membrana.
11. Volver a la posición 2 y apagar la bomba.

NOTA: En esta posición somos nosotros quienes regulamos el vacío poniendo un dedo sobre el puerto de la válvula que está expuesto al aire.

12. Añadir entre 50 y 500 μL de muestra, lo óptimo es añadir un volumen 200 μL , por pocillo. Si tenemos pocillos sin muestra, debemos añadirles 200 μL de TBS + SDS 2% para asegurarnos de que se aplica un correcto vacío en todos los pocillos.
13. Encender la bomba de vacío y aplicamos la posición 3 hasta la desaparición de todo el volumen de todos los pocillos.
14. Poner posición 2, añadir 200 μL /pocillo de TBS + SDS 0,1% para lavar los pocillos y volvemos a la posición 3.
15. Al finalizar, mantener la bomba encendida y proceder a aflojar los tornillos de las 4 esquinas para quitar la tapa.
16. Apagamos la bomba y sacar la membrana.
17. Bloquear la membrana con leche al 10% preparada en TBS, durante 30 min.-1 hora.
18. Seguir protocolo de *Western blotting*.