

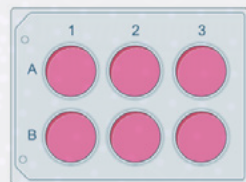
CAPÍTULO 3

EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS

3.1. LISADO A PARTIR DE CULTIVOS CELULARES

Día 1. Siembra celular

1. Sembrar en placas de 6 pocillos (*130184, Biolite*), usando 2 o 3 pocillos por condición dependiendo de la línea celular.



Día 2. Tratamiento

2. Tras 24 horas, retirar el medio de los pocillos. Añadir los tratamientos correspondientes a cada uno de los pocillos a concentración y tiempo indicados.
3. Retirar el medio con el tratamiento que contiene cada pocillo donde están sembradas las células y trasvasar con pipeta de p1000 a tubo de centrifugación de 15 ml (*Corning 430791*).
4. Lavar cada pocillo con PBS 1X (**1.1.2, Tabla 1**) y trasvasar el PBS al tubo de 15 ml correspondiente previamente rotulado con los tratamientos.
5. Añadir 300 μ l de tripsina para despegar las células. Dejar actuar unos min.
6. Coger un ml de medio de cada tubo de 15 ml para recoger las células con tripsina de cada pocillo. Pasar cada tubo al hielo, una vez recogida las células.
7. Centrifugar a 2.500 rpm, 7 min, 4 °C.
8. Eliminar el sobrenadante y resuspender el pellet en 1 ml de PBS 1X frío para retirar restos de medio y tripsina. Transvasar a tubo de microcentrifugación de 1,5 ml.
9. Centrifugar a 6.500 rpm, 4 min a 4 °C. Se retira el PBS 1X.
10. Congelar el pellet de las células a -80 °C o continuamos con el protocolo.
Procedemos al lisado con NP40 al 0,5% (**1.4.1, Tabla 12**).
11. Resuspender el pellet en el tampón de lisis correspondiente normalmente con 50 μ l de NP40 al 0,5%.

NOTA: Esta cantidad es variable atendiendo al volumen celular, pero es una buena aproximación.

12. Incubar 10-15 min en hielo.
13. Centrifugar a 13.000 rpm, 15 min, 4 °C.
14. Trasvasar el sobrenadante a un nuevo tubo de microcentrifugación de 1,5 ml previamente rotulado (línea celular, fecha y tratamiento). Proceder a la determinación de la concentración proteica mediante el reactivo ácido bicinchonínico (BCA) (*Sigma B9643*).
15. Seguir protocolo de *Western blotting*.

3.2. AISLAMIENTO DE PROTEÍNAS: FRACCIÓN SOLUBLE E INSOLUBLE

Tras realizar los pasos del 1-9 del apartado anterior (3.1). Procedemos al lisado con diferentes tampones de lisis para obtener un extracto proteico de la fracción soluble e insoluble.

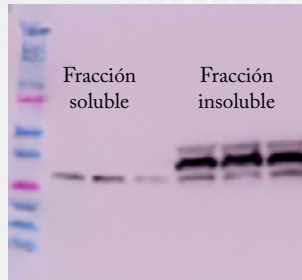


1. Resuspender el pellet en 100 μ l del primer tampón de lisis Tritón X-100 (1.4.5, Tabla 16).
2. Incubar las muestras 10-15 min en hielo.
3. Centrifugar a 17.000 xg, 10 min a 4 °C.
4. Trasladar el sobrenadante a un tubo de microcentrifugación de 1,5 ml nuevo y previamente rotulado con el nombre de la muestra y lo llamamos parte soluble.
5. Lavar el pellet con PBS. Centrifugar. Retirar PBS.

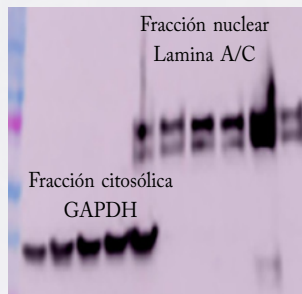


6. Añadir el segundo tampón de lisis SDS 2% (1.4.6, Tabla 17). Realizar sonicación de la muestra durante unos seg. A este mismo tubo lo rotulamos con el nombre de la muestra y parte insoluble.

7. Proceder a la determinación de la concentración proteica mediante el reactivo ácido bicinchonínico (BCA) (*Sigma B9643*) de las dos fracciones.
8. Seguir protocolo de *Western blotting*.



3.3. AISLAMIENTO DE PROTEÍNAS: FRACCIÓN NUCLEAR Y CITOSÓLICA



Día 1. Siembra celular

1. Sembrar en placas de 6 pocillos (*130184, Biolite*), usando 2 o 3 pocillos por condición dependiendo de la línea celular.

Día 2. Tratamientos

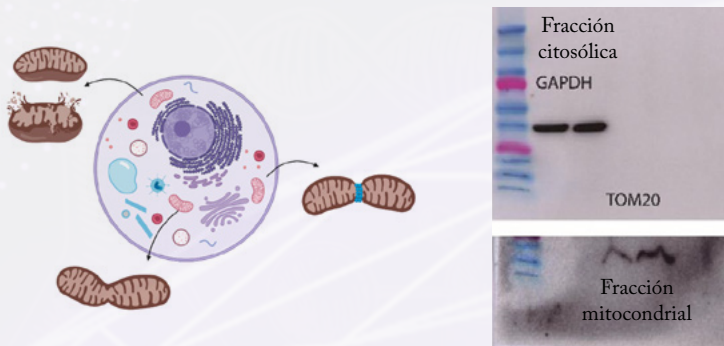
2. Añadir los diferentes tratamientos a cada pocillo correspondiente.
3. Retirar el medio, una vez finalizados los tiempos de tratamiento.
4. Realizar un lavado con PBS 1X, lo aspiramos.
5. Añadir tripsina para despegar las células. Recoger las células con medio.
6. Centrifugar a 1.800 rpm, 3 min, a T^a ambiente. Desechar el sobrenadante. Añadir PBS 1X.
7. Centrifugar las células a 1.800 rpm, 1 min, 25 °C, para eliminar posibles restos de medio de cultivo y tripsina. Aspirar el PBS 1X con cuidado.

8. Adicionar 100 μ l del tampón citosólico (1.4.8, **Tabla 19**). Resuspender con cuidado y se pasa a un nuevo tubo de 0,5 ml (previamente rotulado como núcleo).
9. Centrifugar a 2.200 rpm, 5 min (meter estos tubos en recolectores de 1,5 ml).
10. En el sobrenadante tenemos el contenido citosólico (pasar a otro tubo rotulado como citosol).
11. En el pellet se encuentra el contenido del núcleo. Añadir 50 μ l de tampón citosólico por la pared.
12. Centrifugar a 2.200 rpm, 1 min para eliminar restos de proteínas citosólicas.
13. Eliminar el sobrenadante con aspirador sin apurar y el resto con pipeta.
14. Resuspender el pellet con 50 μ l de tampón nuclear (1.4.7, **Tabla 18**) y centrifugar a 1.200 rpm, 12 min. Nos quedamos con el sobrenadante (fracción nuclear).
15. Proceder a la determinación de la concentración proteica nuclear y citosólica mediante el reactivo BCA.

3.4. AISLAMIENTO DE PROTEÍNAS: FRACCIÓN MITOCONDRIAL Y CITOSÓLICA

Protocolo A: *Mitochondria Isolation kit for Cultured Cells (89874, ThermoFisher)* (OPCIÓN A) [3]

NOTA: Inmediatamente antes de usar, el reactivo A y reactivo B se complementaron con cóctel inhibidor de proteasa 10X (*Sigma-Aldrich, P2714*), ortovanadato de sodio al 0,5 M al 20% (*S6508, Sigma*) y fluoruro de sodio al 0,1 M al 1% (*131675, Panreac*). Las mitocondrias aisladas se lisaron en CHAPS al 2% (*C3023, Sigma*). Las extracciones citosólicas y mitocondriales se analizaron mediante transferencia *Western blotting*.



1. Partiendo de células recogidas después de los tratamientos. Centrifugar la suspensión celular ~ 850 xg, 2 min. Necesitamos 2×10^7 células.
2. Retirar el sobrenadante.
3. Añadir 800 μ l del reactivo A.
4. Vortex e incubar en hielo 2 min. No exceder los 2 min de incubación.
5. Añadir 10 μ l del reactivo B.

6. Vortex a máxima velocidad durante 5 seg.
7. Incubar en hielo durante 5 min. Vortex a máxima velocidad cada min.
8. Añadir 800 µl del reactivo C. Invertir el tubo para mezclar, no vortear.
9. Centrifugar a 700 xg, 10 min, 4 °C.
10. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo de 2,0 ml.
11. Centrifugar a 12.000 xg, 15 min, 4 °C.

NOTA: Para obtener una fracción más purificada de mitocondrias, con una reducción > 50% de las sustancias lisosomales y peroxisomales, centrifugar a 3.000 xg, 15 min.

12. Transferir el sobrenadante (fracción citosólica) a un nuevo tubo.
13. El pellet contiene las mitocondrias aisladas.
14. Añadir 500 µl del Reactivo C al pellet.
15. Centrifugar a 12.000 xg, 5 min.
16. Eliminar el sobrenadante. Mantener el pellet en hielo. La congelación y descongelación pueden comprometer la integridad de las mitocondrias. Seguir protocolo de *Western blotting*.

Protocolo B

1. Sembrar 1 placa de 6 pocillos (130184, *Biolite*) por condición.
2. Recoger las células tras el tratamiento con medio nuevo.
3. Centrifugar la suspensión celular 2.500 rpm, 7 min, 4 °C.
4. Retirar el sobrenadante.
5. Resuspender el pellet en 1 ml de PBS 1X y pasar tubo de 1,5 ml.
6. Centrifugar 6.500 rpm, 4 min, 4 °C.
7. Tirar sobrenadante y trabajamos con los pellets.

Composición de <i>Lisis Buffer</i>	Adición extemporánea*	Composición <i>Sample Buffer 4X</i>
25 mM Tris pH 8 (102215153, <i>Sigma</i>)	0,05% Digitonina (D-141, <i>Sigma</i>)	Tris 200 mM pH 6,8 (102215153, <i>Sigma</i>)
250 mM Sucrose o sacarosa (141621, <i>Sacarosa Panreac</i>)	1 mM DTT (43816, <i>Sigma</i>)	Glicerol 40% (211339, <i>Panreac</i>)
EDTA 1 mM (131026, <i>Panreac</i>)	0,1 Mm PMSF (P-7626, <i>Sigma</i>)	SDS 8% (161-0301, <i>Bio-Rad</i>)

8. Añadir 80-150 µl del *lisis buffer* y resuspender con diez pipetazos.

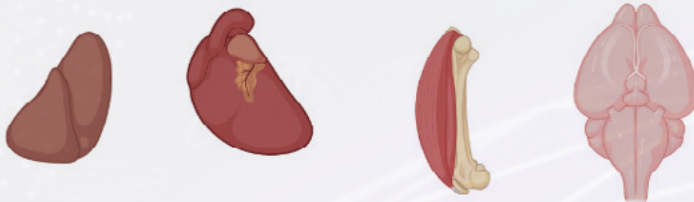
NOTA: este paso debe ser rápido, intentando no sobrepasar 30 segundos.

9. Centrifugar 13.000 rpm, 3 min, 4 °C.
10. Recoger sobrenadante en otro tubo de 1,5 ml sin tocar el pellet, llegando a dejar 10 µl del mismo.
11. Añadir 33 µl de *Sample Buffer 4X*.
12. Quitar los 10 µl que dejamos de margen en el pellet.
13. Resuspender en 150 µl de *Sample Buffer 1X*.
14. Calentar 95 °C 5 min.
15. Guardar ambas partes a -20 °C o cuantificar con el método BCA.
16. Seguir con el protocolo de *Western blotting*.

NOTA: *Adición de: 1 µg/ml Leupeptina. 1 µg/ml Pepstatina. 1 µg/ml Aprotinina. 1 µg/ml Benzamida. El PMSF se diluye en 1 ml de etanol absoluto filtrado. Si hay problemas con el método, probar modificando la concentración de digitonina.

3.5. AISLAMIENTO DE PROTEÍNAS PARTIR DE TEJIDOS

1. Depositar las muestras congeladas en nitrógeno líquido.
2. Inmediatamente antes de que se descongelen. Trocear un fragmento del tejido a analizar de aproximadamente 10 mg en una placa de petri sobre hielo.



3. Introducir un fragmento de tejido en los tubos de centrifugación "*Hard tissue homogenizing CK28-R*" (*Precllys Lysing Kit, KT03961-1-007.2*). Todo se hará en condiciones de refrigeración.



4. Añadir a este tubo 500 μ l del tampón de lisis Tritón X-100 (1.4.4, **Tabla 15**) o tampón RIPA (1.4.3, **Tabla 14**) dependiendo del tejido u órgano a lisar.
5. Introducir los tubos en el sistema de lisis y homogenización (*Precellys 24. Bertin Technologies*).



6. Programar un ciclo de 2.850 xg 23 s, seguido de reposo 20 s y finalmente 2.850 xg 23 seg. [5, 6].
7. Dejar reposar las muestras en hielo durante 30-60 min.
8. Centrifugamos de forma habitual a 13.000 rpm, 15 min, 4 °C.
9. Descartar el pellet y nos quedamos con el sobrenadante donde se encuentran las proteínas a analizar.
10. Proceder a la determinación de la concentración proteica mediante el reactivo BCA.
11. Seguir con el protocolo de *Western blotting*.