Preparación de geles de Acrilamida 12%

(Separación de proteinas 12- 60 kD)

Para 2 geles de 1.5mm

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | Gel Inferior (resolving) | Gel superior 5% (stacking) |
| H2O | 4.9mL | 4.1mL |
| 30% Acrilamida | 6mL | 1mL |
| 1.5 M Tris pH 8.8 | 3.8mL | 1MTrispH6.8 750 μL |
| 10%SDS | 150 μL | 60 μL |
| 10%Persulfato de NH4 | 100 μL | 60 μL |
| TEMED | 10 μL | 16 μL |
| Vol. final | 15 mL | 6 mL |

Para 2 geles de 0.75 mm

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | Gel Inferior (resolving) | Gel superior 5% (stacking) |
| H2O | 2.8 mL | 2.1 mL |
| 30% Acrilamida | 3.5 mL | 500 μL |
| 1.5 M Tris pH 8.8 | 2 mL | 1MTrispH6.8 380 μL |
| 10%SDS | 80 μL | 30 μL |
| 10%Persulfato de NH4 | 80 μL | 30 μL |
| TEMED | 15 μL | 8 μL |
| Vol. final | 10 mL | 3 mL |

\*TEMED acelera la polimerización catalizando la formación de radicales libres del persulfato. La polimerización es inhibida a bajo pH.

\*El persulfato de amonio provee los radicales libres para la polimerización de la poliacrilamida. Pequeñas cantidades deben ser preparadas al 10% con agua desionizada y almacenadas a 4C, ya que el persulfato de amonio se descompone lentamente.

Persulfato 10% (0.1g para 1mL)

**Buffers y soluciones**

**2X SDS Sample Buffer (Lisis)**

125mM Tris-HCL (pH 6.8)

4% (w/v) SDS (4mL de 10% SDS en 10mL)

10% glycerol (1mL /10mL

50 mM DTT\*

Inhibidor de proteasas. Inhibidor prot. Plantas sigma 10 μl / mL

Inhibidor de fosfatasas 1mL pl 100ml buffer

Usarlo 1x, 5ml de 2x SDS Sample buffer en 10 ml de agua desionizada y añadirle 250 μL de una sol. 1 M (0.308 g en 2 mL)

**1x SDS Loading Buffer**

50 mM Tris-HCL (pH 6.8)

2% (w/v) SDS

10% glycerol

50mM DTT\*

0.1% Azul de bromofenol (w/v)

\*Almacenar la solución a 4C sin DTT y añadrile DTT justo antes de usarla. De una solución stock 1 M.

**Buffer de electroforesís:**

25mM Tris base

192mM glicina

1% SDS

Para 1L agregar 3g Tris base, 14.4g glicina y 1g de SDS (almacenar a 4C).

\*Prepara un stock 5x diluir 15.1g de Tris base, 94g glicina en 900mL de agua desionizada.

**Buffer de transferencia**

25mM Tris base

192 mM glicina

20% methanol

Para 1L : 3g de Tris base, 14.4g de glicina y 200mL methanol.

Es imporntante que el buffer este a 4C.

**10x Tris Buffered Saline (TBS)**

Para 1L : 24.2g de Tris base, 80g NaCl; ajustar a pH 7.6 con HCI.

-Usar buffer de lavado a 1X:

**1X TBS- Tween -20**

Añadir 100 mL de 10X a 1 L y 1mL de Tween-20-

**Buffer de bloqueo**

1X TBS-Tween con 5% w/v de leche en polvo sin grasa, añadir 1.5g de leche en polvo para 30mL 1X TBS.Tween.

**Buffer para el anticuerpo primario y secundario**

1X TBS-Tween. Diluir 1: 1000, 10μL del anticuerpo primario en 10 mL de TBS-T.

Ver ficha técnca.

**Protocolo Western**

**Preparación de SDS- PAGE**

Ensamblar los moldes de vidrio correctamente, verificar que esten bien ajustados y evitar que salga la mezcla de poliacrilamida. Hacer la mezcla de acuardo al volumen requerido en un tubo de plástico o matraz yañadir los componente en el orden arriba mencionados, la polimerización iniciará tan pronto cuando se le añada el TEMED.

Colocar la mezcla dentro de los vidrios con una pipeta Pasteur o con jeringa dejando un espacio para el stacking gel, cubrir con un poco de etanol la parte de arriba del gel y así evitar la formación de burbujas en la superficie.

Después de la polimerización (30 min) lavar con agua destilada y secar la superficie del gel inferior con papel filtro.

Colocar la mezcla del staking gel sobre el gel inferior ya polimerizado e insertar inmediatamente el peine cuidando que no se formen burbujas entre los dientes. Antes de usar los peines lavarlos con agua destilada y luego con etanol.

**Preparación de las muestras de proteina y cargado en el gel.**

Preparar las muestras en el volumen adecuado de 1X SDS loading buffer y calentarlas a 100 C por 5 min e introducirlas en hielo.

Después de que haya polimerizado el gel, empezar a ensamblar la camara de electroforesis junto con los geles, poner un poco de buffer de electroforesis en medio de los dos vidrios que contienen los geles hasta el borde y retirar cuidadosamente el peine, lavar rapidamente los pozos con buffer de trasnferencia y quitar cualquier resto de poliacrilamida y si es necesario enderesar los pozos con una punta de micropipeta.

Cargar hasta 15 μL de cada muestra en el orden predeterminado, cargar el mismo volumen de 1X SDS loading buffer en los pozos que no serán usados.

Correr el gel por 10 min a 20 mA para concentrar y acomodar las proteinas que estan en el stacking gel hasta que entren al gel separador y luego correr a 40mA (15V) hasta que el azul de bromofenol salga del gel.

Retirar los geles, con una espatula retirar uno de los vidrios, cortar el stacking gel y colocar un papel sobre él para separarlo, separar los bordes con la misma espatula.

**Transferencia**

\*Enfriar el buffer de trasnferencia junto con 1L de agua dd.

Para membranas de PVDF

Sumergir la membrana en methanol 100% entre 30-60 seg, colocarla en agua desionizada hasta que este completamente hidrofilica .

Ensamblar el arreglo de esponjas y papel filtro para la transferencia, la parte negra del blot hacia abajo (negativa) colocar en el siguiente orden: esponja, papeles filtro (2), gel (el frente del gel hacia abajo), membrane, papeles filtro y esponja.

Transferir según las indicaciones camara usada, aprox 100 V por 1 hora.

Cámara trasf. Húmeda.

Preparar el buffer del bloqueo, que cubra la membrane, 15 mL de buffer por membrana.

Retirar el blot de transferencia, en el orden: quitar la esponja de la parte del electrodo positivo, papel filtro, levantar desde el papel filtro inferior quedandose con el gel y la membrana, recortar la membrana del tamaño del gel y marcar los pozos del gel en la membrana con lápiz, hacer una pequeña muesca en la esquina inferior del lado donde se cargo el peso molecular.

Después de la transferencia lavar la membrana de PVDF con metanol por 30seg y luego con agua por 15 seg.

Incubar a la membrana con el buffer de bloqueo, aprox 15 mL, por 1 hr a temperatura ambiente con agitación suave.

Decandar el buffer del bloqueo y lavar 3 veces por 5 min con 15 mL de TBS-T.

Incubar con el anticuerpo primario en apropiada dilución, en agitación toda la noche a 4C, 0 2hrs a temperatura ambiente.

Lavar 3 veces por 5 min con TBS-T

Incubar con el anticuerpo secundario HRP-conjugated (1:3000) por una hora..

Lavar 3 veces por 5 min con TBD-T.

**Detección de proteinas**

Secar el exceso de TBS- T.

Incubar la membrana con los reactivos del kit de detección de quimiolumiscencia

(0.5mL + 0.5 mL) mezclarlos en un tubo falcon de 15mL .Colocar un plástico y luego la membrana.

Dejar caer sobre la membrana 1 mL de los dos reactivos ya mezclados.

Incubar por 3 min.

Secar el exceso de la reacción y colocar la membrana sobre el plástico del casstte y después exponer al film por 1 – 5min.

Revelar

Normalizar con otro anticuerpo.