



**Institut de Neuropatologia  
Hospital Universitari de Bellvitge**

**Departament de Patologia i Terapèutica Experimental  
Universitat de Barcelona**

# **Vías de señalización en enfermedades priónicas**

**Agustín Rodríguez Fernández  
2007**

## 9- Materiales y métodos



## Western blot

- Homogeneizar 0'1 g de tejido de corteza frontal en un homogeneizador de cristal con 10 volúmenes (w/v) de tampón de lisis (PBS pH 7.5, 0'5% de NP-40, 0'5% de ácido desoxicólico, 0'1 mM de PMSF, 10 µg/ml de aprotinina, 10 µg/ml de leupeptina, 10 µg/ml de pepstatina y 1 mM de ortovanadato sódico).
- Centrifugar a 3.500 g 5 min.
- Calcular la concentración de proteína de los homogeneizados totales con el kit *BCA protein assay* de Pierce.
- Mezclar 30 µg de proteína con tampón de carga (125 mM de Tris pH 6.8, 20% de glicerol, 10% de β-mercaptoetanol, 4% SDS y 0'002% de azul de bromofenol).
- Hacer un SDS-PAGE y cargar la proteína utilizando un sistema miniprotean de Bio-Rad con marcadores de pesos moleculares.
- Las proteínas son transferidas luego a membranas de nitrocelulosa usando un sistema de transferencia electroforética Semi-dry de Bio-Rad.
- Las membranas son lavadas con TBST (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 140 mM NaCl y 0'1% de tween-20).
- El bloqueo de las uniones inespecíficas se realiza incubando las membranas con TBST más un 5% de leche desnatada durante 30 min.
- Las membranas se incuban luego con el anticuerpo primario a 4°C O/N.
- Los anticuerpos secundarios se incuban a una dilución de 1:1000 en TBST con un 5% de leche desnatada durante 1 h.
- Las membranas se levantan luego con TBST y se revelan con el sistema de revelado ECL de Amersham tras una exposición de films autoradiográficos a 4°C.
- El anticuerpo anti-β-actina se utiliza como control de carga de proteína.

## Western blot del "Neuroprión tissue bank"

### Preparación de la muestra

1. Homogeneizado total cerebral (corteza frontal):
  - Pesar 50 mg de sustancia gris
  - Añadir 9 volúmenes de tampón de lisis 100 mM Tris (LB100) pH 6.9.
    - 1) Añadir 200  $\mu$ l de LB100 pH 6.9 y homogeneizar con un homogeneizador manual.
    - 2) Añadir el resto de tampón LB100 pH 6.9 hasta llegar a 9 volúmenes y acabar de homogeneizar.
  
2. Digestión con PK (proteínasa K)
  - Coger 20  $\mu$ l de homogeneizado total (equivalente a 2 mg de tejido) y añadir 2  $\mu$ l de PK (100  $\mu$ g/ml); mezclar con vórtex e incubar 1h a 37°C. Después añadir 2,4  $\mu$ l de PMSF, mezclar con vórtex y añadir 24,4  $\mu$ l de tampón de muestras 2x y hervir 8 minutos.

**Nota:** Las muestras tendrán cantidades variables de PrP<sup>res</sup>. Después del primer experimento, con el objetivo de ajustar la intensidad de señal entre las muestras, se debe utilizar tampón de muestras 1x para diluir las muestras dependiendo del contenido en PrP<sup>res</sup>.

Lysis Buffer con 100 mM Tris (LB100) pH 6,9 (guardar a 4°C si se prepara una cantidad grande y hacer alicuotas a -20°C).

- 100 mM Tris pH 6,9
- 100 mM NaCl
- 10 mM EDTA
- 0.5% Nonidet P-40
- 0.5% sodium deoxycholate

**Nota:** Debido a que el pH de los tampones con Tris cambia significativamente dependiendo de la temperatura del tampón, el tampón de lisis debe estar ajustado a pH 6.9 a 37°C.

### Electroforesis

1. Cargar 10  $\mu$ l de cada muestra en un gel de 12 pocillos al 13% de acrilamida, con 1 mm de grosor y 6,5 cm de longitud.

2. Correr el gel a 120 Voltios constantes hasta que el frente llegue al resolving. Después correr el gel a 180 Voltios constantes hasta que el frente llegue al final del gel.
3. Transferencia: transferir los geles a membranas PVDF ó nitrocelulosa en un aparato de transferencia semi-dry.

#### Bloqueo de la membrana

1. Bloquear las membranas con TBST-leche al 10% durante 1h a 37°C en agitación.
2. Limpiar las membranas con TBST 1x unos cuantos segundos 4-5 veces.

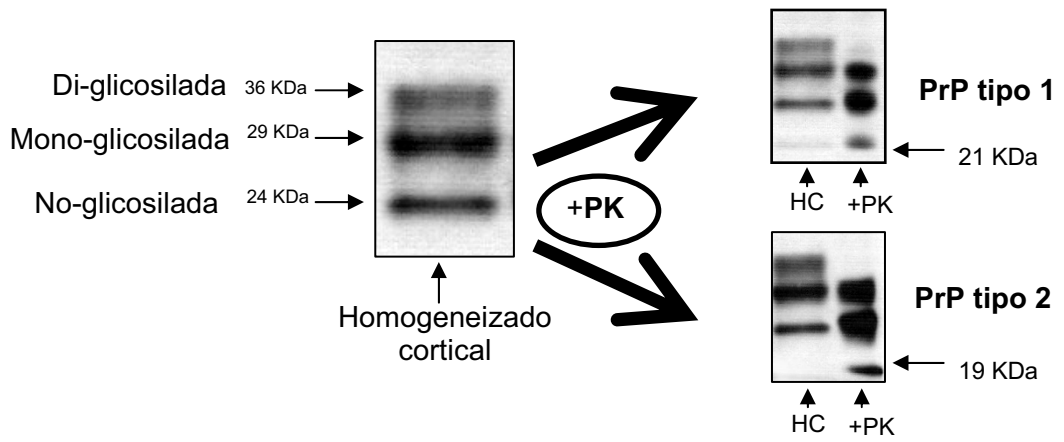
#### Anticuerpo primario y secundario

1. El anticuerpo primario anti-PrP clon 3F4 se incuba a 1:500 O/N a 4°C en agitación.
2. Lavar con TBST 4 veces durante 10 minutos en agitación.
3. El anticuerpo secundario anti-mouse se incuba 1h a temperatura ambiente.
4. Lavar con TBST 4 veces durante 10 min en agitación.

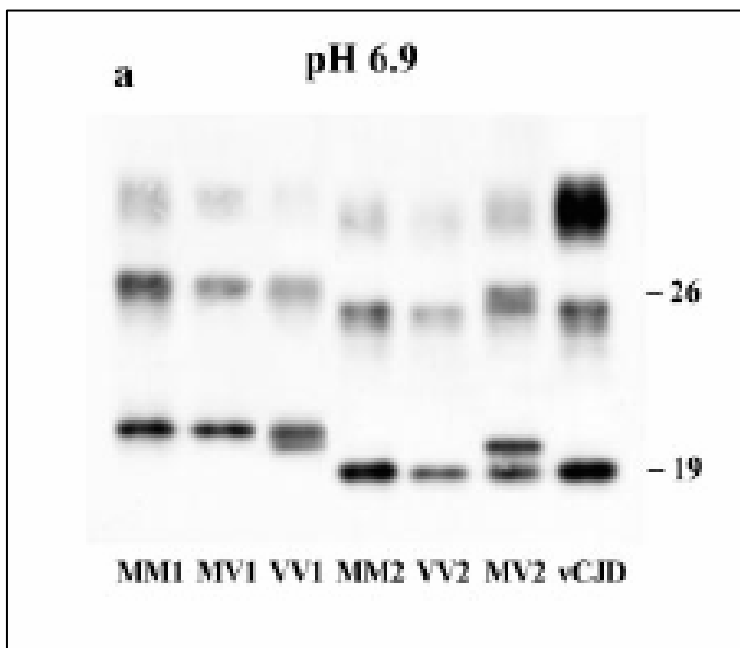
#### Detección

1. Revelar con el kit ECL de Amersham de acuerdo con las instrucciones del kit.

### Interpretación de las bandas

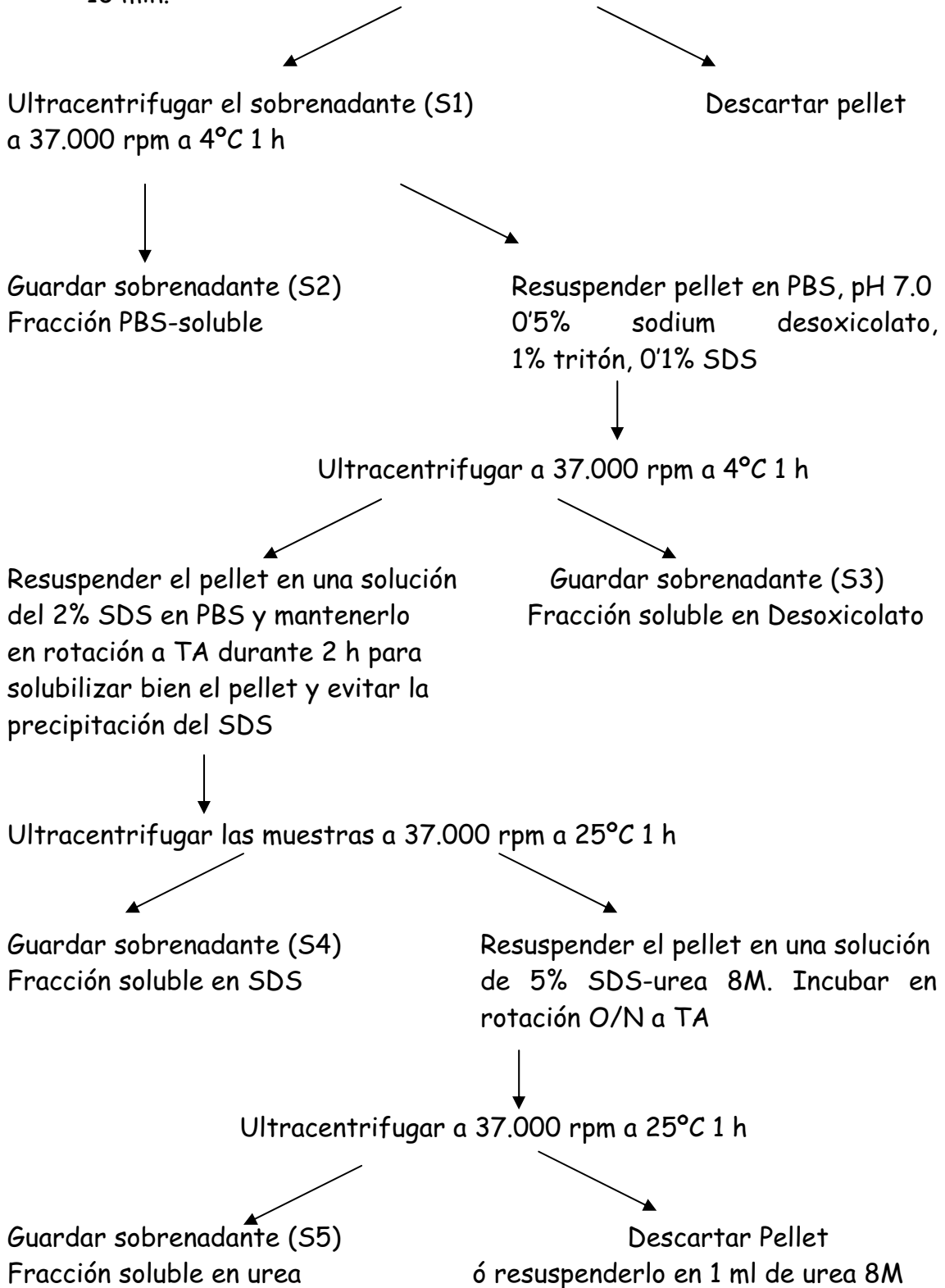


Perfiles de PrP<sup>res</sup> según el tipo de PrP y el genotipo en el codón 129 (según Parchi P y col., 1999).



### Solubilidad de proteínas (aislamiento de agregados proteicos)

- Procesamiento de la muestra (1 g) en 5 ml de tampón que contiene: PBS, pH 7.0 + inhibidores de proteasas).
- Centrifugar el homogeneizado total a 5.000 rpm a 4°C durante 10 min.





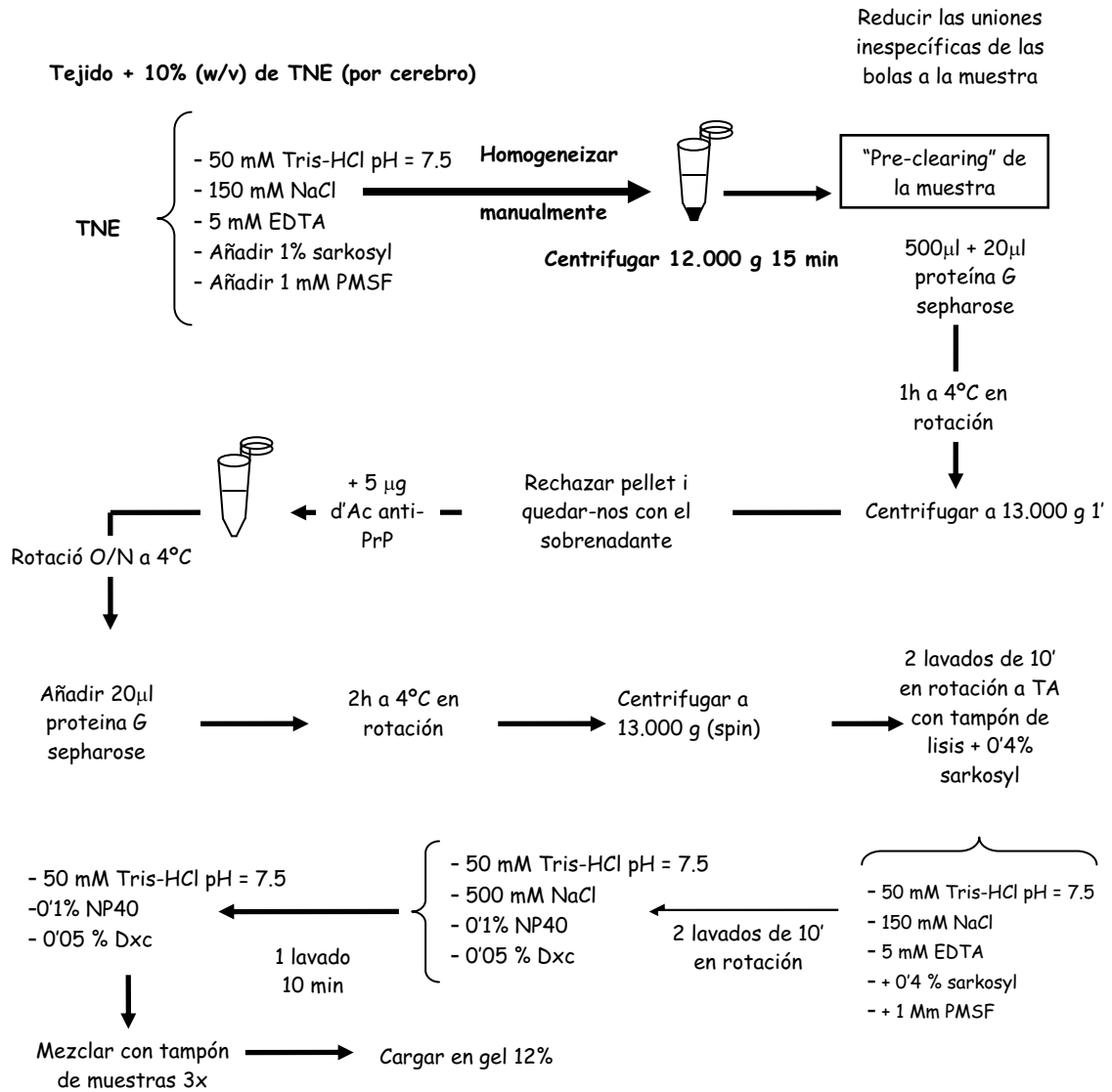
### Inmunoprecipitación de PLC $\beta_1$

- Procesar 0'1 g de tejido con tampón de IP (PBS + inhibidores de proteasas).
- Sonicar la muestra procesada.
- Centrifugar a 4°C las muestras (controles y ECJ) a 1.000 g (o más) durante 10 min.
- Recoger el sobrenadante y descartar el pellet (restos celulares no proteicos).
- Coger 20  $\mu$ l de "G-sepharose beads" (bolas) a 4°C con 1 pipeta con la punta recortada. Coger una cantidad de bolas determinada en función del número de muestras.
- Hacer el bloqueo de las bolas G con glicerol cogiendo el mismo volumen de glicerol al 10% para bloquear durante 2h en rotación a 4°C.
- Centrifugar las bolas + glicerol a 12.000 rpm (spin). Se rechaza el sobrenadante y el pellet se resuspende con el mismo volumen anterior (40  $\mu$ l: 20  $\mu$ l bolas + 20  $\mu$ l glicerol 10%) con tampón de IP.
- Repetir el paso anterior 2 veces para lavar bien las bolas de los restos de glicerol.
- Mezclar 100  $\mu$ l de muestra con 40  $\mu$ l de bolas+tampón de IP para hacer el pre-lavado de la muestra durante 1 h a 4°C en rotación.
- Centrifugar a 12.000 rpm (spin) y rechazar las bolas sucias. El sobrenadante (muestra limpia) se mezcla con 5  $\mu$ g del Ac de la inmunoprecipitación (anti-PLC $\beta_1$  mouse) y se incuba O/N en rotación.
- El día siguiente se incuban 100  $\mu$ l de muestra limpia con bolas bloqueadas 2h a 4°C.
- Se añaden 20  $\mu$ l de bolas (40  $\mu$ l totales) en los tubos de Ac + 100  $\mu$ l de muestra limpia.
- Después de 2h en rotación se recogen las bolas por spin a 12.000 rpm.
- Se hacen 3 lavados con el tampón de IP.
- Se resuspenden las bolas en SB 2x 1:1 en volumen (en el caso de trueblot con 50mM de DTT para reducir las IgG). Se mezcla bien con la punta de la pipeta y se incuba a 96°C 2 minutos.
- Se hace un vórtex, se hierve 2 minutos más y se centrifuga 2 minutos a 12.000 rpm.
- El sobrenadante se carga en el gel de SDS-PAGE juntamente con las fracciones de bolas + muestra, bolas + Ac (bolas limpias + 3  $\mu$ g d'Ac), Ac de IP (control negativo del Mouse trueblot), bolas+tampón y un homogeneizado total de la muestra.

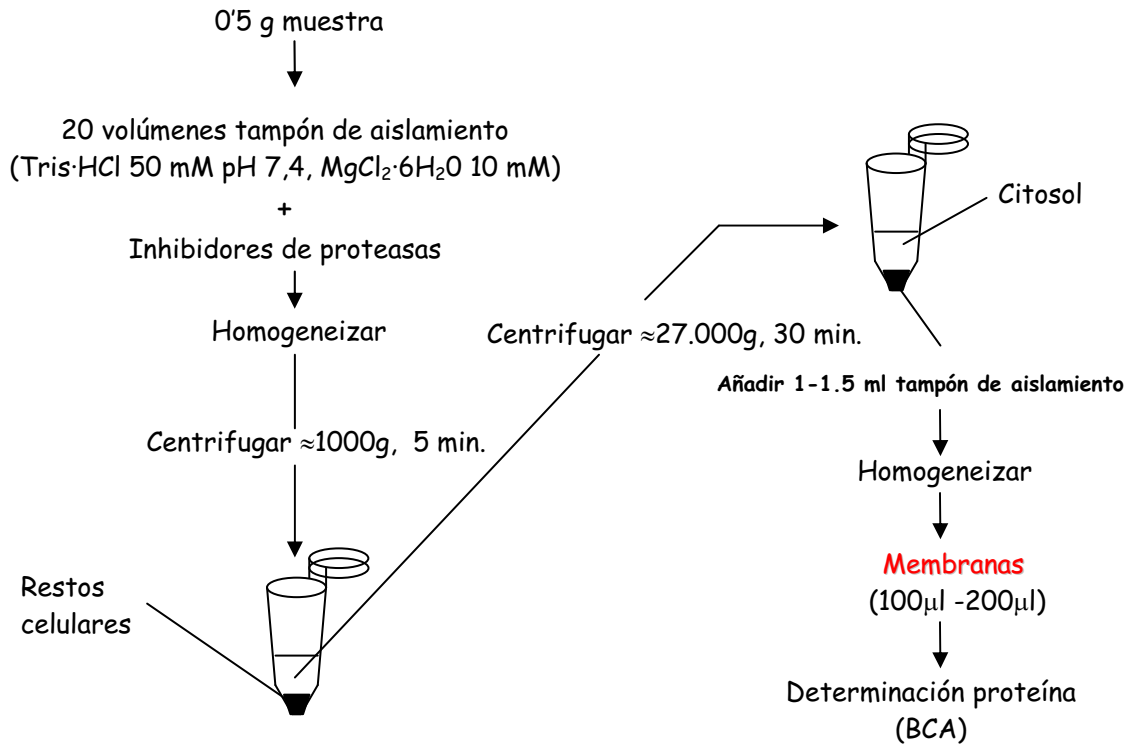
### **Mouse TrueBlot**

- IgG TrueBlot detecta preferentemente las formas no-reducidas de las IgG y no detecta las formas reducidas de las IgG desnaturalizadas por SDS (de 55 kDa y 23 kDa).
- Tampón A (25 mM Tris-HCl, pH 7.3, 0'15 M NaCl, 0'1% tween 20)
  - Bloquear con el tamón A con el 5% de leche desnatada.
  - Anticuerpo diluido en tampón A con el 2% de leche desnatada.

## Inmunoprecipitación de PrP



### Aislamiento de membranas celulares



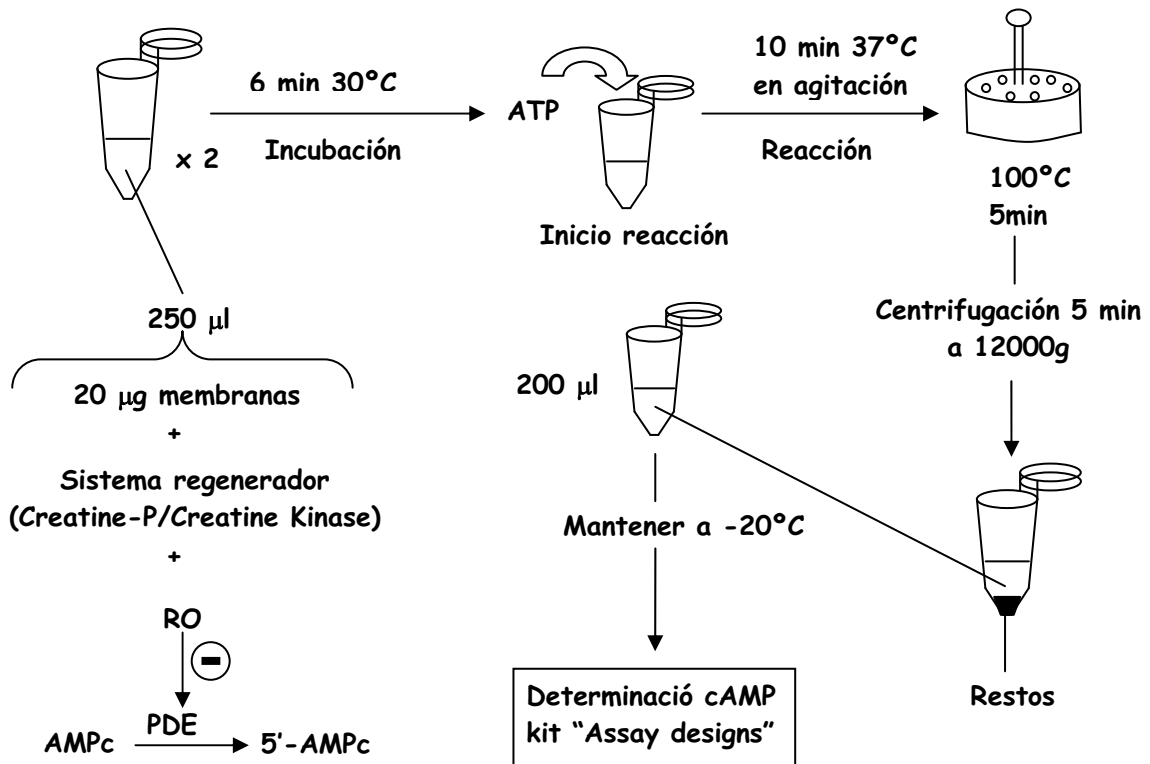
#### Tampón aislamiento de membranas celulares

		<u>1 L</u>	
Tris·HCl (Mr: 121.1)	50 mM	6,055 g	pH 7,4
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O (Mr: 203.3)	10 mM	2,033 g	

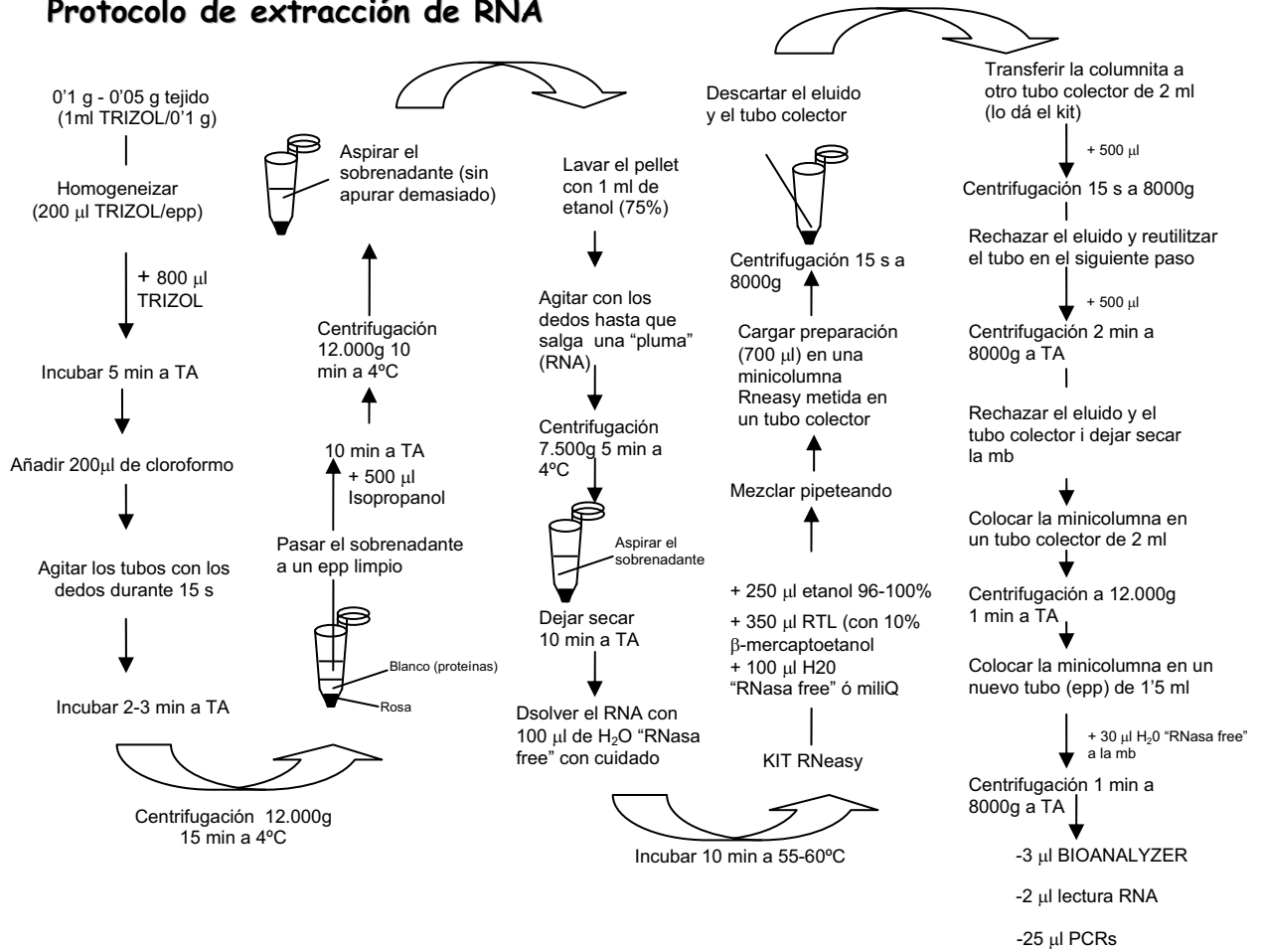
y añadir extemporáneamente por ml de tampón

- Bacitracina---- 10 µl de stock 10 mg/ml
- PMSF---- 1 µl de stock 0,1 M (p.ej. 0,0174 g /1 ml Etanol absoluto.)

### Ensayo de acumulación de cAMP



**Protocolo de extracción de RNA**



### Procesamiento de muestras pequeñas de cerebro

Fijación de la biopsia en PFA al 4 % en tampón fosfato 0.4 M a pH 7.4.....24 h

Fijador: Paraformaldehido (Panreac 141451).....40 g  
Tampón fosfato 0.4 M pH 7.4.....250 ml

{ Di-Potasio hidrogenofosfato (Merck 5101).....55.7 g  
Dihidrogenofosfato de sodio (Merck 6346).....12.5 g  
Agua destilada.....Enrasar a 1000 ml y buscar pH 7.4  
Agua destilada..... $\cong$ 750 ml

-Calentar primero el agua con el tampon fosfato aproximadamente a 70°C y despues añadir los 40 g de PFA y disolver en agitación continua hasta obtener una mezcla transparente (si no fuera así añadir algunas lentejas de NaOH). Cuando esté disuelto enrasar hasta 1.000 ml, filtrar y guardar en nevera.

-Lavar en agua corriente hasta eliminar el fijador.

-Incluir los bloques en Sacarosa (Panreac 131621) al 30% en PBS 1x hasta que estos queden en el fondo del bote a 4°C (suelen ser 48 h).

-Inclusión en Parafina: Alcohol de 70°.....3 h  
Alcohol de 96°.....hasta el dia siguiente  
Alcohol de 100°.....3 h  
Xilol.....2 h  
Parafina I.....hasta el dia siguiente  
Parafina II.....2 h

Hacer los bloques en el dispensador de parafina.

-Cortes de parafina en el micrótopo y montados en portas con poly-L-lisina al 50% (Sigma P.8920) aproximadamente de 5  $\mu$ m cada corte.

### Inmunohistoquímica

-Dejar secar los cortes a temperatura ambiente toda la noche o preferiblemente en estufa a 57° C para facilitar la adhesión de los cortes en el porta y drenar restos de parafina.

-Desparafinizar:

Xilol.....	10 min
Xilol.....	10 min
Xilol.....	10 min
Alcohol 100°.....	5 min
Alcohol 100°.....	5 min
Alcohol 100°.....	5 min
Alcohol 96°.....	5 min
Alcohol 96°.....	5 min
Alcohol 96°.....	5 min
Alcohol 70°.....	5 min
Agua destilada.....	2x5 min

-Desenmascaramiento del antígeno con Antigen retrieval (Dako cód. S2031) o bien con tampón citrato 10 mM a pH 6.0.

-Tampón Citrato 10 mM pH 6.0: Acido cítrico.....1.9 g  
Citrato sódico.....12.05 g  
Agua destilada.....Hasta 500 ml

-Ajustar el pH con ácido cítrico al 3% o NaOH 1M y conservar en nevera

-Lavados con PBS 3 x 5 min.

-Bloqueo de la actividad de la peroxidasa endógena al 1% en PBS 1x 15 min ó al 3% en PBS1X/MetOH 70/30 v/v 15 min.

-Lavados con PBS 3 x 5 min.

-Bloqueo de las uniones inespecíficas con suero normal goat (Vector S1000) al 10% en PBS 1x + tritón X-100 (Sigma X-100) 0.2% + gelatina (Merck) 0.2% + azida (Sigma S-2002) 0.2% un mínimo de 2 horas.

-Incubar con la dilución específica de cada anticuerpo primario diluido en suero normal goat al 3% en PBS1x + tritón 0.2% + gelatina 0.2% + azida 0.2% a 4°C O/N.



-Atemperar las muestras 30 min.

-Lavados de PBS 3 x 5 min.

-Incubar con el anticuerpo secundario prediluido multi-link (dos gotas por preparación es suficiente si se usa el sistema de Coverplate®) a TA 20 min.

-Lavados en PBS 3 x 5 min.

-Incubar con estreptavidina peroxidasa super-sensitive prediluida label a TA 20 min.

-Lavados con PBS 3 x 5 min.

-Revelado en DAB:

{	DAB (Sigma D.5637).....	25 mg
	PBS 1x.....	200 ml
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> al 33% (Prolabo 23 613.297).....	50 µl

-Filtrar la solución antes de usar 5 min.

-Lavar en agua corriente 5 min.

-Lavar en agua destilada 5 min.

-Contrastar con HX de Harris diluida (opcional) 1 min.

-Lavar con agua corriente, deshidratar, aclarar y montar en DPX.

NOTA: Opcionalmente se puede suprimir el paso del bloqueo con suero normal goat y aplicar directamente el anticuerpo primario diluido en antibody diluent (Dako S2022) a la concentración ideal de cada primario a 4°C O/N.

### Hematoxilina de Harris

{	Solución A:	hematoxilina (CI 75290).....	8 g
		Alcohol de 96°.....	80 ml

Dejar madurar la solución A durante un mínimo de 15 días.

Solución B:	Alumbre de potásico.....	160 g
	Agua destilada.....	1.600 ml

-Preparar la solución B: agitar 1 hora y añadir solución A, poner con calor hasta que hierva. Apartar y echar 4 g de óxido amarillo de mercurio (*Merck 4461*) y volver a calentar durante 15 min.

-Dejar reposar durante 48 horas y filtrar. Añadir de 20 a 40 ml de ácido acético.

PBS 10 x

-Fosfato potásico $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ( <i>Merck 1.04873</i> ).....	13'61 g
-Fosfato monosódico $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ( <i>Merck 1.06586</i> ).....	56'56 g
-Cloruro sódico $\text{NaCl}$ .....	450 g

-Añadir 5 litros de agua destilada y se obtiene una solución de PBS 100 mM.  
Se conserva a temperatura ambiente

## TacMan PCR

### Síntesis de cDNA

- Por cada 100  $\mu$ l de reacción de transcripción reversa, se mezclan 2  $\mu$ g de RNA humano con 2.5  $\mu$ M de hexámeros aleatórios, 1x tampón TaqMan RT (5.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 500  $\mu$ M de cada dATP, dTTP, dCTP and dGTP, 0.4 U/ $\mu$ l RNase inhibitor and 1.25 U/ $\mu$ l de MultiScribe transcriptasa reversa de Applied biosystems, Barcelona, España).
- Las reacciones son cargadas a 25°C durante 10 min para maximizar la unión entre primer y RNA.
- Se incuba 30 min a 48°C.
- Se incuba 5 min a 95°C para desactivar la transcriptasa reversa.
- Se realizan reacciones paralelas para cada muestra de RNA en ausencia de transcriptasa reversa MultiScribe para estimar la contaminación de DNA genómico.

### PCR TaqMan

- Los ensayos de PCR TaqMan se realizan por duplicado en las muestras de cDNA en placas de 96 pocillos utilizando el sistema de secuencia de detección ABI Prism 7700 (Applied biosystems).
- Las placas se tapan utilizando tapas ópticas.
- El ABI Prism 7700 mide la acumulación de fluorescencia del producto de PCR por ciclos de monitorización continua umbral (Ct), que es un valor arbitrario asignado manualmente a un nivel por encima de la línea basal pero en la fase exponencial de la PCR donde no hay componentes limitantes del ratio. El valor Ct establece el punto en el que la amplificación de la muestra cruza el umbral. Por cada 20  $\mu$ l de reacción TaqMan, 9  $\mu$ l de cDNA (diluido 1/50, que corresponde aproximadamente al cDNA de 4 ng de RNA) se mezcla con 1  $\mu$ l de 20x ensayo de expresión génica y 10  $\mu$ l de master mix de PCR TaqMan universal (Applied biosystems).
- Se realizan ensayos paralelos para cada muestra para la normalización (p.ej.  $\beta$ -actina).
- Las condiciones de reacción son las siguientes: 50 °C durante 2 min, 95 °C durante 10 min y 40 ciclos de 95 °C durante 15 s y 60 °C durante 1 min.
- Finalmente, todos los datos de la PCR TaqMan son captados por el programa detector de secuencia (SDS version 1.9, Applied Biosystems).

### Densitometría y procesamiento estadístico de los datos

Los niveles de proteína son determinados mediante la densitometría de las bandas usando el programa Total Laboratory v2.01. Este programa detecta las bandas obtenidas por WB y da valores individuales que dependen de la cuantificación de luz de la correspondiente banda. Las medidas son expresadas con unidades arbitrarias. Los resultados están normalizados por  $\beta$ -actina. Los datos numéricos obtenidos a partir de los ECJ y los controles son comparados luego y analizados estadísticamente utilizando el programa STATGRAPHICS plus 5.0 por los tests estadísticos ANOVA y LSD. Los asteriscos indican los siguientes valores de P: (\*)  $< 0.05$  (95% de nivel de confianza); (\*\*)  $P < 0.01$  (99% de nivel de confianza); y (\*\*\*)  $P < 0.001$  (99.9% de nivel de confianza; 0.1% de riesgo de considerar un par de muestras diferentes significativamente cuando la diferencia real es igual a 0).

