

INMUNOELECTROFORESIS

10 grupos de estudiantes

1. OBJETIVO DEL EXPERIMENTO

En esta práctica, los estudiantes se introducen en el uso de la inmunolectroforesis para separar y caracterizar una mezcla de proteínas y examinar la especificidad de la interacción antígeno-anticuerpo.

2. COMPONENTES para 10 grupos de estudiantes

| COMPONENTES | Conservación |
|--|--------------|
| A IgG | 4-8°C |
| B Suero total | 4-8°C |
| C Albúmina | 4-8°C |
| D Anticuerpo para IgG | 4-8°C |
| E Anticuerpo para IgG | 4-8°C |
| F Agarosa™ UltraSpec | 4-8°C |
| G Tampón de electroforesis (concentrado 25x) | 4-8°C |
| Tubos Microtest | |
| Pipetas de 10 ml | |
| Papel de filtro | |
| Cortadores para pocillos ("well cutters") | |
| Placas de Petri (60 mm) | |

NOTA: Tras la recepción, almacenar los componentes a las temperaturas indicadas.

NOTA: Ninguno de los componentes de este kit se ha preparado a partir de material humano.

NOTA: Todos los componentes de este kit están destinados a la investigación educativa. No pueden ser utilizados con fines de diagnóstico o médicos, ni pueden ser administrados o consumidos por seres humanos o animales.

2.1 Material requerido y no suministrado

- Aparato de electroforesis horizontal
- Fuente de alimentación
- Micropipetas automáticas y puntas (5-50 µl)
- Baño de agua
- Portaobjetos para microscopio (1" x3")
- Agua destilada
- Vaso de precipitación de 400 a 600 ml
- Probeta graduado de 1000 ml
- Quemador Bunsen, Placa calefactora o Microondas
- Contenedor con tapa (lo suficientemente grande como para contener bandejas de electroforesis)

- Toallas de papel
- Envoltura o lámina de plástico (film transparente)
- Estufa de Incubación (37°C)

NOTA: Asegúrense que el material de vidrio esté limpio, seco y libre de residuos de jabón. Para mayor comodidad, se pueden comprar pipetas de transferencia desechables adicionales para los pasos de extracción y de lavado con líquidos.

3. INTRODUCCIÓN

Inmunolectroforesis

La **inmunolectroforesis** se utiliza en laboratorios clínicos y de investigación para separar e identificar proteínas en base a su comportamiento electroforético y a sus propiedades inmunológicas. Proteínas, tales como proteínas de suero de conejo, que son antígenos, cuando se inyectan en otro animal, como una cabra (el huésped), provocan la producción de anticuerpos en el huésped. La interacción entre el antígeno y su anticuerpo, que es también una proteína, es a la vez fuerte y altamente específica. Si se mezclan soluciones de antígeno y anticuerpo en diferentes proporciones, se encuentra que a una razón específica, conocida como **punto de equivalencia**, se maximiza la unión y se forma un precipitado de complejo antígeno-anticuerpo.

En el laboratorio clínico, la inmunolectroforesis se utiliza diagnósticamente. Se utiliza en el examen de ciertas anomalías del suero, especialmente aquellas que implican inmunoglobulinas, proteína de orina, líquido cefalorraquídeo, fluidos pleurales y otros fluidos corporales. En la investigación, este procedimiento puede usarse para monitorizar purificaciones de antígenos y/o anticuerpos, detectar impurezas, analizar antígenos solubles de tejidos vegetales y animales y extractos microbianos.

La **electroforesis en gel** es un método analítico ampliamente utilizado que separa las moléculas basadas en la carga, el tamaño y la forma. Es particularmente útil para determinar el tamaño de las biomoléculas. Las muestras de proteínas se cargan en pocillos hechos en el gel al solidificarse. El gel, que consta de poros microscópicos que actúan como un tamiz molecular, se coloca en una cámara que contiene una solución tampón y electrodos. La corriente se aplica desde una fuente de alimentación de corriente continua (DC). Dado que las biomoléculas se cargan, migrarán a través del gel.

En la inmunolectroforesis, las proteínas se separan por primera vez mediante electroforesis en gel de agarosa horizontal sobre la base de sus diferentes relaciones de carga a masa. El gel con las proteínas separadas (antígenos) se retira entonces del campo eléctrico y los anticuerpos para las proteínas se introducen en canales estrechos paralelos a los antígenos separados. Se produce la difusión de ambos anticuerpos antigénicos y, en un locus particular, se alcanza el punto de equivalencia que da como resultado la precipitación.

El propósito de este experimento es demostrar el uso de inmunolectroforesis para separar y caracterizar una mezcla de proteínas de suero, así como para examinar la especificidad de la interacción antígeno-anticuerpo.

4. DESCRIPCIÓN DEL EXPERIMENTO

En esta práctica, los estudiantes se introducen en el uso de la inmunoelectroforesis para separar y caracterizar una mezcla de proteínas y examinar la especificidad de la interacción antígeno-anticuerpo.

4.1 Precauciones

1. Se deben usar los guantes y gafas de protección de forma rutinaria como buenas prácticas de laboratorio durante todo el procedimiento.
2. Deben tener mucho cuidado al trabajar con equipos que utilizan calor y/o fusión de los reactivos.
3. NO PIPETEAR LOS REACTIVOS CON LA BOCA - PIPETEAR CON PERAS DE SUCCIÓN.
4. Lavarse bien siempre las manos con agua y jabón después de manipular reactivos o materiales biológicos del laboratorio.
5. Tener cuidado al usar cualquier equipo eléctrico en el laboratorio.
6. La agarosa en ebullición puede salpicar y causar quemaduras graves. Al calentar la agarosa, debe usar siempre gafas de seguridad y guantes protectores de calor.
7. Antes de encender la fuente de alimentación, asegurarse que la cámara de electroforesis tiene el nivel de tampón correcto y que la superficie de trabajo esté seca.

4.2 Requisitos de tiempo (aproximado) de los procedimientos de la práctica

El horario de realización de la práctica dictará cuando se deben realizar los geles. Dado que los geles son muy finos, la solidificación requiere aproximadamente 10 minutos. Los geles no deben retirarse de las bandejas de gel.

4.3 Preparaciones previas

Notas a los preparativos del profesor de la práctica

El tamaño de la clase, la duración de las clases de prácticas y la disponibilidad de los equipos son factores que deben ser considerados en la planificación e implementación de esta práctica con sus alumnos. Estas directrices pueden adaptarse para encajar en sus circunstancias específicas.

Registro de las actividades de laboratorio

Los científicos documentan todo lo que ocurre durante un experimento, incluyendo condiciones experimentales, pensamientos y observaciones durante la realización del experimento y, por supuesto, cualquier información recopilada. Hoy, los estudiantes documentarán su práctica en una libreta de laboratorio o en una hoja de trabajo separada.

Los alumnos deben registrar en su libreta de prácticas las actividades indicadas a continuación.

Antes de iniciar la práctica:

- Escribir una hipótesis que refleje la práctica.
- Predecir los resultados experimentales.

Durante la práctica:

- Registrar (dibujar) sus observaciones, o fotografiar los resultados.

Al finalizar la práctica:

- Formular una explicación de los resultados.

- Determinar lo que podría cambiar en la práctica si la repites.
- Escribir una hipótesis que refleje este cambio.

Instrucciones generales

A. PREPARATIVOS ANTES DE LA PRÁCTICA

PREPARACIÓN DEL TAMPÓN DE ELECTROFORESIS

1. Preparar el tampón de electroforesis diluyendo todo el contenido (40 ml) de la botella que contiene tampón concentrado (componente G) en 960 ml de agua destilada para obtener un total de 1000 ml de tampón a la concentración de trabajo.

Este tampón se utilizará para preparar la agarosa así como para la electroforesis.

PREPARACIÓN DEL GEL DE AGAROSA

2. Preparar la solución de gel de agarosa de la siguiente forma:

- a. Añadir el contenido completo del frasco Agarosa UltraSpec™ a 100 ml de tampón de electroforesis diluido en un vaso de 400 a 600 ml. Con un rotulador/marcador, marcar el nivel superior del tampón en el exterior del vaso.
- b. Calentar la mezcla para disolver el polvo de agarosa. La solución final debe ser clara y transparente (como el agua), sin partículas no disueltas.

Método de la microonda:

- Cubra el frasco con una envoltura de plástico para minimizar la evaporación.
- Calentar la mezcla durante 1 minuto.
- Agitar la mezcla y calentarla en intervalos de 25 segundos hasta que toda la agarosa esté completamente disuelta.

Método de placa calefactora o quemador:

- Cubra el frasco con papel aluminio para evitar el exceso de evaporación.
- Calentar la mezcla hasta que llegue al punto de ebullición sobre la placa calefactora/quemador agitándola ocasionalmente. Calentar hasta que la agarosa esté completamente disuelta.

- c. Enfriar la agarosa a 60°C en un baño de agua. Si se ha producido evaporación, añadir suficiente agua destilada para llevar el volumen hasta el volumen original tal como se marca en el vaso de precipitados.
- d. Mantenga la agarosa a 60°C hasta que realicen los geles.

3. Antes de verter la solución de gel en la bandeja de formación de geles, construir un molde para los canales del gel utilizando dos portaobjetos de microscopio y la mitad inferior de una pequeña placa de petri (60 mm).

- Colocar un portaobjetos de microscopio en la base de la parte inferior de una placa de Petri (vea la **Figura 1**).
- Colocar el segundo portaobjetos del microscopio en el lado opuesto de la placa de petri emparejado con el primer portaobjetos. Desde la vista lateral, los portaobjetos deben estar emparejados y paralelos. El molde debe ser capaz de mantenerse en pie sin ayuda cuando se coloca sobre una superficie.

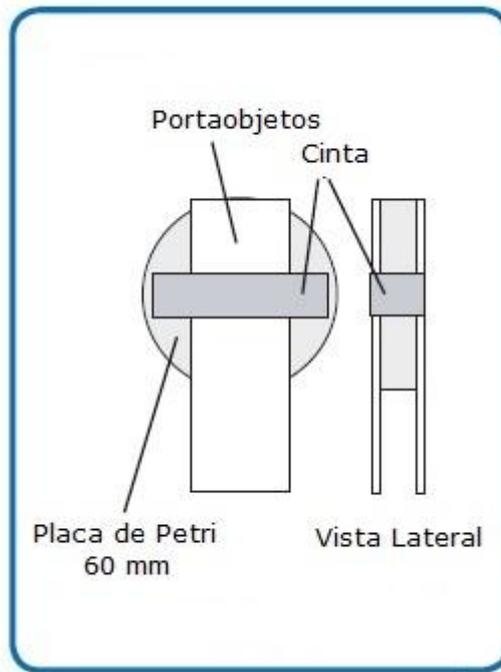


Figura 1

4. Para bandejas de gel aproximadamente 7 cm x 7 cm (bandejas EDVOTEK®)

- Pipetear 9 ml de agarosa fundida en la bandeja de gel.
- Separar la agarosa con la pipeta para asegurar una cobertura uniforme y completa.
- Antes de que la agarosa fundida se solidifique, coloque el molde en el centro de la bandeja para formar simultáneamente los canales. Vea la plantilla de la **Figura 2**.

Para bandejas de gel aproximadamente 7 cm x 14 cm (EDVOTEK® M12).

- Pipetear 19 ml de agarosa fundida en la bandeja de gel.
- Extender la agarosa y colocar el molde en el centro de la bandeja.

5. Alicuotar las muestras. Se han proporcionado suficientes tubos para las alícuotas de los cinco componentes para 10 grupos.

6. Preparar una cámara de humidificación/incubación de la siguiente manera:

- Colocar en la parte inferior de un recipiente de plástico toallas de papel.
- Agregar agua destilada para saturar las toallas, pero no se debe permitir que el exceso de agua se acumule en el recipiente.
- Cubrir con una tapa, envoltura de plástico (film transparente) o papel de aluminio.

7. Preparar las mechas de electroforesis cortando el papel de filtro en tiras de aproximadamente 7 x 3 cm. Los extremos de las mechas deben ser lo suficientemente largos para extenderse dentro del tampón de electroforesis en la cámara (ver **Figura 2**).

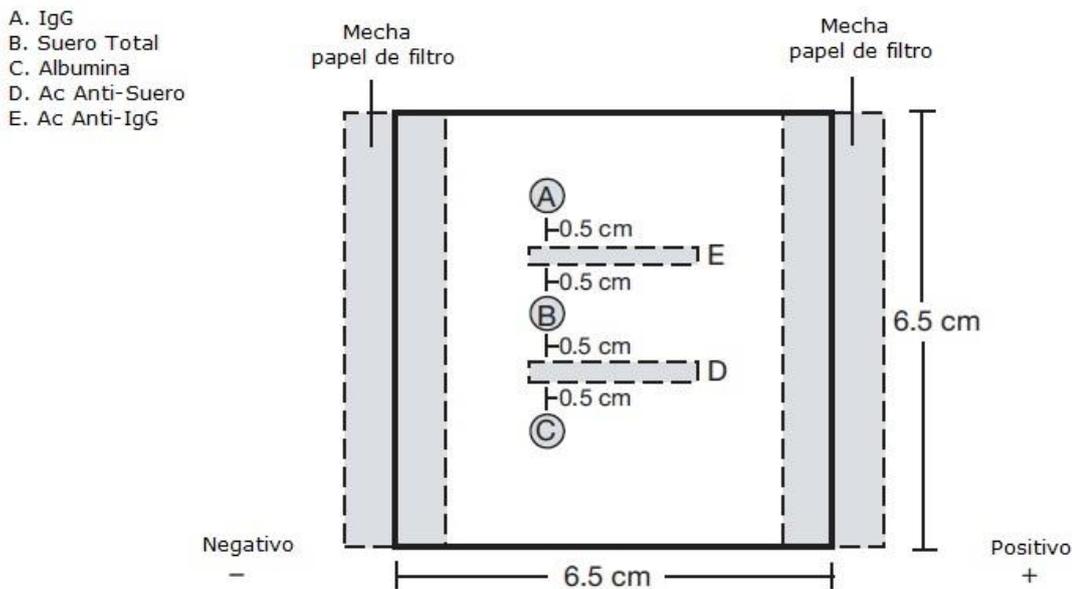


Figura 2: Plantilla para la Inmunolectroforesis.

4.4 Material que debe recibir cada grupo

Cada grupo de prácticas debe recibir los siguientes componentes antes de iniciar el procedimiento experimental:

- Unidad de electroforesis
- Tampón de electroforesis
- Gel de agarosa
- Muestra de albúmina
- Muestra de IgG
- Muestra de suero total
- Muestra anti-suero
- Muestra Anti-IgG
- Cortador de pocillos
- Mechales de papel de filtro

4.5 Evitar los errores más comunes

1. Seguir las instrucciones cuidadosamente cuando prepare geles. Asegurarse que la agarosa esté completamente disuelta.
2. Los geles se deben preparar el día de la práctica. Los geles se solidificarán rápidamente porque son muy delgados.
3. El espaciado de los pocillos y canales es crítico para el éxito de la práctica.
4. Hacer pozos limpios y limpios con los cortadores de pocillos.
5. No sumergir el gel en tampón de electroforesis cuando se realice la electroforesis. Utilizar las mechas para establecer el contacto entre el gel y el tampón.
6. No añadir anticuerpos a los canales hasta después de la separación electroforética de las proteínas.
7. Cuando se añada el anticuerpo a los canales, esparcir lenta y cuidadosamente la solución sobre toda el área de la cubeta.

- La colocación de la cámara de humidificación/incubación en una estufa de incubación a 37°C acelerará la formación de arcos de precipitación.

5. PRÁCTICA

SEPARACIÓN ELECTROFORÉTICA DE ANTÍGENOS

- Realizar los pocillos en la posición que se indica en la **Figura 2** usando el cortador de pocillos. La distancia entre los canales y el borde de cada pocillo no debe ser superior a 0,5 cm.

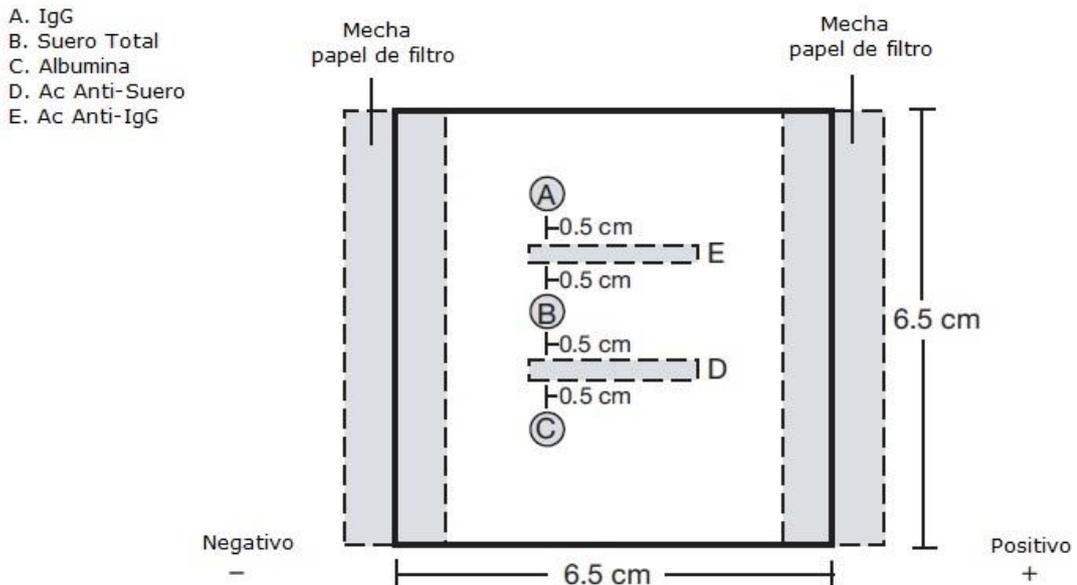


Figura 2: Plantilla para la Inmunoelectroforesis.

- Retirar los tapones de gel de agarosa con un palillo de dientes o una espátula.
- Transferir la bandeja que contiene el gel al aparato de electroforesis.
- Colocar suavemente las mechas de papel de filtro sobre los extremos del gel (deben superponerse unos 3 a 4 mm) y dejar que se saturan con tampón de electroforesis.
- Las mechas deben sumergirse en el tampón. Presionar ligeramente las mechas para asegurar un buen contacto entre el gel y el tampón de electroforesis.
Si es necesario, agregar más tampón, pero no cubrir el gel con tampón.
- Cargue 20 µl de cada antígeno (A, B y C) en los pocillos como se indica en el diagrama. Cambiar las puntas de las pipetas entre las muestras.
- Con cuidado, encajar la tapa del aparato de electroforesis, insertar los cables en la fuente de alimentación con el cable negro en la entrada negra (negativa) y el cable rojo en la entrada roja (positiva).
- Ajustar y encender la fuente de alimentación para la tensión requerida (50V a 125V). Cuando la corriente fluye correctamente, deben formarse burbujas en los electrodos.

9. Ejecutar la electroforesis hasta que el colorante azul ha migrado a los extremos de los canales. El tiempo exacto requerido depende del voltaje (ver Directrices de tiempo y voltaje en la **Tabla 1**).

TABLA 1

| Guía de tiempo y voltaje | | |
|---------------------------------|---------------------------|---------------|
| Voltios | Tiempo recomendado | |
| | Mínimo | Máximo |
| 50 | 60 min | 2,0 horas |
| 70 | 40 min | 1,5 horas |
| 125 | 30 min | 45 min |

NOTA: Las muestras contienen colorante que migrará a diferentes velocidades. Terminar la electroforesis cuando el primer colorante llega justo después del final de las depresiones. No se debe permitir que las muestras migren hasta el extremo del gel.

10. Una vez completada la electroforesis, desconectar la alimentación, desenchufar la fuente de alimentación, desconectar los cables y retirar la cubierta.
11. Desechar las mechas de papel de filtro y retirar la bandeja de gel del aparato. Colocar la bandeja sobre una superficie nivelada y proceder con los pasos para realizar la difusión.

NOTA: No añada las muestras de anticuerpos en los pocillos hasta después de la separación electroforética.

DIFUSIÓN DE ANTICUERPOS Y ANTIGENOS

12. Añadir 50 µl de cada anticuerpo a el canal correspondiente (ver **Figura 2**). Utilizar la punta de la pipeta para esparcir cuidadosamente la solución de anticuerpo a lo largo de toda la longitud del canal.
13. Colocar la bandeja en una cámara de humidificación/incubación cerrada que contenga toallas de papel humedecidas.
14. Permitir que la difusión tenga lugar durante un período de 24 a 48 horas, o hasta que se formen precipitados visibles en el gel. La cámara se puede colocar en una estufa de incubación a 37°C o permanecer a temperatura ambiente.

6. RESULTADOS Y PREGUNTAS DE LA PRÁCTICA

6.1 Resultados

1. Observar la formación de arcos de precipitado blanco en el gel.
2. Identificar el número de proteínas en el suero entero a partir del número de arcos de precipitado. Se pueden esperar **de cuatro a seis arcos**, correspondientes a varias albúminas encontradas en el suero total.
3. Identificar albúmina e IgG en el suero total de conejo en comparación con la albúmina pura y los segmentos puros anti-IgG. El arco de precipitado más destacado corresponde al complejo formado por la reacción del anti-IgG con IgG pura.

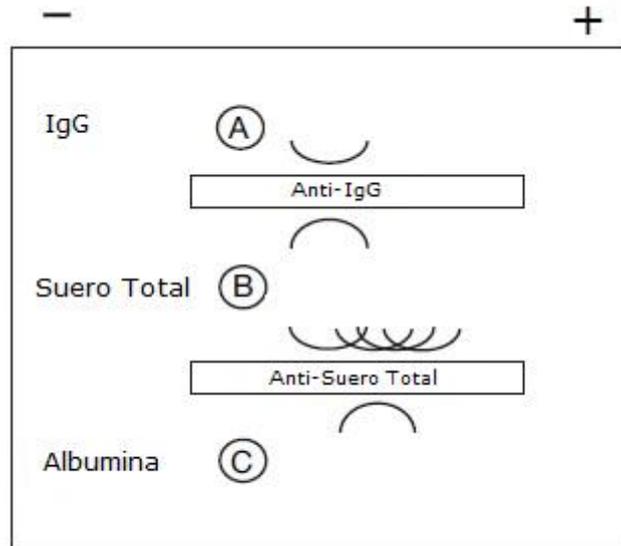


Figura 3: Esquema del resultado obtenido.

NOTA: Los resultados obtenidos por los alumnos pueden variar de los representados en el esquema de la **Figura 3**. El esquema representado no está dibujado a escala real.

6.2 Preguntas

Responder a las siguientes preguntas en la libreta de prácticas:

1. ¿Por qué se añade un colorante azul a las soluciones de proteínas para la electroforesis?
2. ¿Por qué los precipitados forman arcos?
3. ¿En qué se diferencia el ensayo de inmunodifusión del ensayo de inmunoelectroforesis?
4. ¿Cuántos arcos se observaron en la muestra de suero total? ¿Qué representa cada arco?
5. ¿Qué resultados se pueden esperar si el gel se tiñe con un colorante para proteínas?