

PURIFICACIÓN Y ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS BACTERIANAS

6 grupos de estudiantes

1. OBJETIVO DEL EXPERIMENTO

El objetivo de esta práctica es introducir a los estudiantes en el conocimiento de las técnicas para preparar lisados de proteínas bacterianas a partir de diferentes especies de bacterias y analizar su comportamiento mediante **ELECTROFORESIS DESNATURALIZANTE EN GEL DE POLIACRILAMIDA-SDS**, para identificar una proteína desconocida.

2. COMPONENTES para 6 grupos de estudiantes

COMPONENTES	CONSERVACIÓN
A Cultivo de <i>Escherichia coli</i>	Temperatura ambiente
B Cultivo de <i>Serratia marcescens</i>	Temperatura ambiente
C Cultivo de <i>Micrococcus luteus</i>	Temperatura ambiente
D Cultivo de <i>Bacillus subtilis</i>	Temperatura ambiente
E Tampón Tris-EDTA-glucosa (TEG)	Congelador
F Lisozima	Congelador
G Tampón preparación muestras proteínas	Congelador
H Muestra desconocida (lista para electroforesis)	Congelador
Tampón de electroforesis Tris-Glicina-SDS (10X)	Temperatura ambiente
Hojas de Protein InstaStain	Temperatura ambiente
Practice gel loading solution	Temperatura ambiente
Ready Pour Agar	Temperatura ambiente
Caldo Nutritivo	Temperatura ambiente
Microtubos con tapón de rosca	
Asas de siembras estériles	
Pipetas de 1 ml estériles	
Placas de Petri estériles 100 x 15 mm	

2.1 Material requerido y no suministrado

- Aparato de electroforesis vertical para proteínas.
- Fuente de energía para la electroforesis.
- 3 geles de poliacrilamidas-SDS 12%.
- Placa calefactora o microondas.
- Estufa de incubación y baño de agua.
- Micropipetas automáticas y puntas.
- Microtubos y tubos de 10 ml.
- Balanza.
- Bandejas para tinción.
- Agua destilada.
- Papel de aluminio.
- Transiluminador de luz blanca.
- Ácido acético glacial.
- Metanol.

3. INTRODUCCIÓN

PATRÓN DE IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS BACTERIANAS

Las bacterias han sido históricamente identificadas y clasificadas de acuerdo con los rasgos morfológicos como forma, tamaño, motilidad, tinción de Gram, y características de crecimiento macroscópicas. Sin embargo, características morfológicas similares son compartidos por muchas bacterias. La bioquímica, aspectos nutricionales y rasgos fisiológicos son muy importantes en la identificación y clasificación bacteriana.

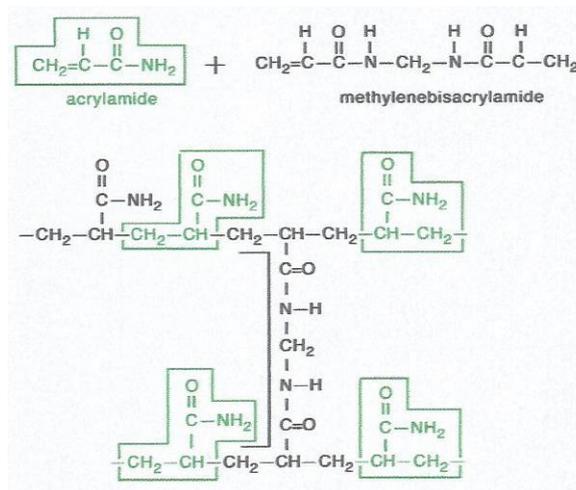
Estos rasgos incluyen requerimientos de oxígeno, la fermentación de glucosa, la respuesta del pH, capacidad de crecer en medios selectivos, capacidad de causar hemólisis, y la respuesta a los antibióticos. La descendencia evolutiva bacteriana y clasificación filogenética son determinadas por el estudio de ADN bacteriano, ARN y proteínas. El enfoque de las relaciones bacterianas mediante el uso de datos filogenético molecular es relativamente nuevo. El uso de firmas moleculares tales como RNA ribosomal es útil en la identificación de diferentes especies bacterianas.

Las células bacterianas, tales como *E.coli*, contienen aproximadamente 2.000 tipos diferentes de proteínas. La cantidad y tipos de proteínas dentro de la célula pueden variar dependiendo de las condiciones ambientales y fisiológicas. Mientras que muchas proteínas son físico-química y funcionalmente similares entre diferentes bacterias es poco probable que todas ellas compartan la misma distribución de pesos moleculares, formas, carga e inmunogenicidad. Además, las concentraciones relativas de las proteínas que son de otra manera similar en otras características pueden variar entre dos tipos diferentes de células y se pueden utilizar como un patrón de identificación.

ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA

La electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS es particularmente útil para analizar el perfil complejo creado por un lisado soluble de proteínas totales. El análisis de lisados de proteínas totales de bacterias por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS se hace con frecuencia para comprobar la expresión de las proteínas.

Los geles de poliacrilamida se forman mezclando el monómero, la acrilamida, el agente de reticulación, metilenoisacrilamida, y un generador de radicales libres, persulfato de amonio, en tampón acuoso. Se produce la polimerización libre de la acrilamida. Los polímeros de acrilamida están unidos entre sí como se muestra en la figura.



El tamaño de poro en los geles de poliacrilamida se controla por la concentración de gel y el grado de reticulación del polímero. La movilidad electroforética de las proteínas se ve afectada por la concentración de gel. Geles porcentuales más altos son más adecuados para la separación de polipéptidos más pequeños. Los geles de poliacrilamida también pueden ser preparados para tener un gradiente de concentraciones de gel. Típicamente, la parte superior del gel (más cercana a los pocillos de muestras) tiene una concentración de 5%, aumentando linealmente hasta el 20% en la parte inferior. Geles de gradiente pueden ser útiles en la separación de mezclas de proteínas que cubren una amplia gama de pesos moleculares. Los geles de concentración homogénea como los utilizados en este experimento son mejores para conseguir una separación de proteínas que se mueven en rangos pequeños en la diferencia de sus pesos moleculares.

Cabe señalar que la acrilamida es una neurotoxina y puede ser absorbida a través de la piel. Sin embargo, en la forma de poliacrilamida polimerizada no es tóxica. El proceso de polimerización es inhibida por el oxígeno. Por consiguiente, los geles de poliacrilamida se preparan con más frecuencia entre placas de vidrio separadas por tiras llamadas espaciadores. Como la mezcla de acrilamida líquido se vierte entre las placas, el aire es desplazado y el producto de polimerización se produce más rápidamente.

El DodecilSulfato de Sodio (SDS) es un detergente que consiste en una cadena de hidrocarburo unido a un grupo sulfato altamente cargado negativamente. Las proteínas que contienen varias cadenas de polipéptidos que se asocian sólo por fuerzas no covalentes se pueden disociar por el SDS en cadenas de polipéptidos desnaturalizados.

Durante la electroforesis, las proteínas migran a través del gel hacia el electrodo positivo a una velocidad que es inversamente proporcional a su peso molecular. En otras palabras, cuanto menor sea el polipéptido desnaturalizado, más rápido migrará. El peso molecular de un polipéptido desconocido se obtiene mediante la comparación de su posición después de la electroforesis con las posiciones de las proteínas desnaturalizadas estándar.

MUESTRAS BACTERIANAS

Escherichia coli y *Serratia marcescens* son bacilos gram negativos de la familia Enterobacterias. Los miembros de esta familia en general, pueden fermentar la glucosa y otros azúcares, y requieren medios mínimos que contienen sales y pequeñas cantidades de glucosa. Estas bacterias son anaerobias facultativas y no forman esporas. Varios miembros de *E.coli* se encuentran en el tracto intestinal de los animales. *S.marcescens* se encuentra en el suelo o el agua.

Micrococcus luteus es gram-positivos y es un miembro de la familia Micrococcaceae. El género *Staphylococcus* es un miembro de patógeno de esta familia. La familia se caracteriza por células de forma esférica que se dividen para formar racimos de uvas. No forman esporas. Los miembros del género *Micrococcus* son aerobios y son capaces de vivir bajo una amplia variedad de condiciones de suelo, polvo, agua de mar y los productos lácteos. *M.luteus* forma pigmentos amarillos.

Bacillus subtilis es un miembro de bacterias gram positivas, en forma de varilla de la familia Bacillaceae. Los miembros de esta familia son formadores de endosporas. *B.subtilis* se encuentra en el polvo y heno. Es un aerobio estricto. Esta bacteria produce la subtilina (antibiótico) y otra cepa, estrechamente relacionada, produce la bacitracina (antibiótico). Estos antibióticos son péptidos que interfieren con la síntesis de la pared celular de las bacterias gram positivas en su mayoría.

Las paredes celulares de las bacterias gram negativas consisten en una membrana lipídica externa que contiene glicolípidos y lipopolisacáridos que se proyectan en el

medio ambiente externo. Debajo de la membrana externa tienen una malla rígida de peptidoglicano. Debajo de esta capa de peptidoglicano está el espacio periplásmico que contiene proteínas. El otro lado de este espacio está delimitado por la membrana citoplasmática. El peptidoglicano comprende 5-15% de los componentes de la pared celular en peso. Las paredes celulares de las bacterias gram positivas tienden a ser mucho más gruesa. No poseen una membrana externa y son estructuralmente más simple. El peptidoglicano puede ser 20-80% de los componentes de la pared celular. Las muchas capas de peptidoglicano en las bacterias gram positivas forman una red relativamente homogénea.

Debido a la membrana externa y sus proyecciones moleculares de las bacterias gram negativas son mucho menos susceptibles a la actividad de los lisozimas que las bacterias gram positivas. El lisozima hidroliza los enlaces glucosídicos entre la N-acetilglucosamina y residuos de ácido N-acetilmurámico en el peptidoglicano. El aumento de viscosidad se debe a la liberación de ADN de alto peso molecular y otras biomoléculas celulares. Estos efectos no se observan fácilmente después del tratamiento de lisozima a bacterias gram negativas. Por el contrario, la adición de un detergente tal como SDS a una suspensión de células gram negativas produce la lisis celular, evidenciándose por el aumento de la viscosidad.

4. DESCRIPCIÓN DEL EXPERIMENTO

En esta práctica, diferentes especies de bacterias se cultivarán en placas de agar con nutrientes. Las células se recolectan y se rompen bajo condiciones de desnaturalización para obtener un lisado de proteína cruda total. La electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS es capaz de resolver cientos de componentes desnaturalizados de las proteínas en base de sus tamaños. Las bacterias utilizadas en este laboratorio presentan perfiles electroforéticos de proteínas característicos. Los patrones de proteínas de un lisado de proteína desconocida se comparan en paralelo con el de las muestras conocidas preparados por los procedimientos descritos a continuación. Después de la electroforesis las proteínas se visualizarán como manchas y se podrá determinar si la proteína desconocida se corresponde con una de las muestras que se ha preparado.

ORGANIZACIÓN DE ESTE KIT

Este kit contiene reactivos para 6 grupos de estudiantes compartiendo 3 geles de poliacrilamida (2 grupos por gel) y lleva suficiente tampón de electroforesis para 3 aparatos de electroforesis vertical.

Los geles de poliacrilamida no están incorporados, usted puede realizar sus propios geles de poliacrilamida, o bien, comprar nuestros geles preparados.

El experimento se divide en 3 partes:

- 1) Separación de las proteínas en los geles de poliacrilamida.
- 2) Tinción del gel para la detección de las bandas de proteínas.
- 3) Identificación de las proteínas de cada extracto.

TIEMPO APROXIMADO PARA LAS PREPARACIONES PREVIAS Y PROCESOS DEL EXPERIMENTO

1. Las preparaciones previas pueden realizarse en 20 minutos el día de la práctica.
2. Los estudiantes pueden requerir 15 minutos para preparar las muestras y la carga en el gel de poliacrilamida. La práctica de la siembra del gel puede llevar otros 15 minutos adicionales. Este kit contiene **Practice gel loading solution** para que los estudiantes que no están familiarizados con la electroforesis vertical puedan ensayar la siembra del gel.

3. La electroforesis tiene una duración de 1h o 1h 30' dependiendo del voltaje

4.1 Precauciones

1. Aunque estas bacterias no son patogénicas, algunos individuos pueden ser susceptibles de infección bacteriana. Llevar gafas y guantes de laboratorio mientras se trabaja.

2. **NO PIPETEAR CON LA BOCA**, utilizar los dispositivos adecuados.

3. Extremar las precauciones cuando se trabajan con equipos que utilizan conjuntamente calor y mezcla de reactivos.

4. Lavarse las manos con jabón y agua después de haber trabajado en el laboratorio o utilizado reactivos o materiales biológicos.

5. Extremar las precauciones al utilizar equipos de laboratorios eléctricos.

6. La acrilamida no polimerizada es una neurotoxina y debería ser manipulada con mucho cuidado en una cabina adecuada.

7. La acrilamida polimerizada, como pueden ser los geles preparados, son seguros pero deben ser manipulados con guantes.



4.2 Preparaciones Previas

PREPARACIÓN DE LAS PLACAS DE AGAR

Unos días antes de la práctica.

Es aconsejable la participación de los estudiantes si es posible. Los estudiantes pueden prepararse las placas de agar en el primer día del laboratorio. Sin embargo, las placas deben de dejarse solidificar durante una hora antes de la siembra.

1. **ROMPER** en pequeños pedazos el agar sólido ReadyPour Agar mediante vigorosa agitación y exprimiendo el bote de plástico.

2. **AFLOJAR pero NO ELIMINAR** el tapón del ReadyPour Agar. Esto permite al vapor escapar durante el calentamiento. **PRECAUCIÓN:** Un fallo en aflojar el tapón, previo al calentamiento, puede causar la rotura o explosión del bote.

3. **Calentar** con un microondas el ReadyPour Agar hasta fundir el agar. Cuidadosamente sacar el bote del microondas y **AGITAR suavemente**. Continuar calentando a intervalos de 30 segundos hasta que el agar está completamente disuelto (la solución ámbar debería estar transparente y libre de pequeñas partículas).

NOTA: Tener mucho cuidado y asegurarse que el agar hirviendo no sale fuera del bote. Parada de calentar si empieza a borbotear en exceso.

4. **ENFRIAR** el bote ReadyPour Agar a 55°C con mucho cuidado. Para evitar que se enfríe en exceso y no de tiempo de preparar todas las placas, se recomienda colocar el envase de ReadyPour Agar en un baño a 55-60°C si es posible.

5. Mientras el medio se está enfriando, **ETIQUETAR** la 12 placas de petri con rotulador permanente:

- 3 placas A-*Escherichia coli*.**
- 3 placas B-*Serratia marcescens*.**
- 3 placas C-*Micrococcus luteus*.**
- 3 placas D-*Bacillus subtilis*.**

6. Cuando el Ready Pour Agar se encuentre a 55°C añadir 12 ml de medio a cada placa utilizando una pipeta estéril de 10 ml.

7. Permitir que el medio solidifique en las placas.

8. Tapar las placas y conservarlas en la nevera a 4°C en posición invertida. Las placas deberían utilizarse antes de una semana.

PREPARACIÓN DE LOS CULTIVOS BACTERIANOS

1^{er} DÍA DE LA PRÁCTICA. Una hora antes de la práctica.

Si los estudiantes no preparan las placas, la duración del primer día puede ser de entre 30-60 minutos.

1. Con una pipeta estéril de 1 ml diferente para cada cultivo, añadir 1 ml de caldo nutritivo a los cultivos inclinados A-D. Espere durante 5 a 10 minutos antes de continuar con el paso 2.

2. Utilizando un asa estéril introducirla en el tubo A y frotar toda la superficie sumergida del agar inclinado de modo que las células se liberan en el líquido. Cerrar el vial y mezclar suavemente.

3. Utilizando un asa estéril nueva, repita el paso 2 para cada uno de los otros cultivos B-D usando cada vez una asa nueva para cada cultivo.

Asignación recomendada de grupos y placas:

- Grupos 1, 3 y 5: 2 placas y cultivos A y B**
- Grupos 2, 4 y 6: 2 placas y cultivos C y D**

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA DESCONOCIDA (H)

2º DÍA DE LA PRÁCTICA.

No se requiere esterilidad para la preparación del lisado. El volumen de las muestras generadas por los estudiantes será probablemente mucho mayor que los volúmenes necesarios para la electroforesis. Estas muestras se pueden almacenar a largo plazo en el congelador. También se pueden comprar o preparar más geles y realizar varios experimentos de electroforesis de proteínas.

1. Añadir 130 µl de agua destilada al tubo que contiene la muestra desconocida (H) y dejar que la muestra se hidrate durante varios minutos. Utilizar un agitador vórtex o mezclar enérgicamente.

2. Poner a calentar un vaso de agua, tapado con papel de aluminio, lleva a ebullición.

3. Utilizar los microtubos con tapón a rosca, asegurarse que están bien tapados y marcarlos. La parte inferior de los microtubos deben ser empujados a través del papel de aluminio y dejar en inmersión en el **agua hirviendo durante 5 minutos**. Los microtubos se deberían mantener suspendidos por el papel de aluminio. También se puede utilizar algún sistema existente en el laboratorio para mantener flotando las muestras.

4. Pasar alícuotas de 20 µl de muestra a cada grupo de estudiantes. Haga que los estudiantes carguen la muestra en el gel de poliacrilamida cuando todavía esté caliente para evitar la agregación.

5. Guarde el volumen de muestra reconstituida no utilizado a -20°C y repita los pasos 3 y 4 al volver a utilizar las muestras en un momento posterior.

LISOZIMA

2º DÍA DE LA PRÁCTICA. Una hora antes de la práctica.

1. Transferir 10 ml de tampón TEG frío (E) a un vaso de precipitados limpio, frasco o tubo de ensayo.
2. Añadir todo el contenido del tubo F (lisozima) al tampón TEG. Mezclar.
3. Mantener la solución de enzima en hielo.
4. Preparar alícuotas de 1,5 ml para cada grupo.
5. Equilibrar un baño a 37°C.

PREPARACIÓN DEL TAMPÓN DE ELECTROFORESIS

1. Preparar el tampón de electroforesis añadiendo y mezclando 1 parte de tampón 10x Tris-Glicina-SDS concentrado a 9 partes de agua destilada.

LA CUBETA DE ELECTROFORESIS VERTICAL DE EDVOTEK NECESITA UNOS 580-600 ml.

PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE TINCIÓN Y DE DECOLORACIÓN

1. Solución de tinción con Protein InstaStain®.
Preparar una solución stock de metanol y ácido acético glacial mediante la combinación de 180 ml de metanol, 140 ml de agua destilada y 40 ml de ácido acético glacial.
2. Solución de decoloración.
Utilice la solución stock de metanol, ácido acético glacial y agua destilada (paso 1) para decolorar el gel.

5. PRÁCTICA

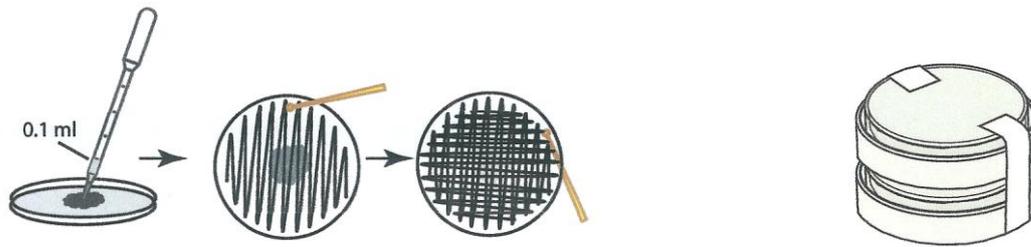
PREPARACIONES DE LOS LISADOS BACTERIANOS

A) Crecimiento de los cultivos celulares. 1^{er} Día.

1. Obtener dos placas de agar nutriente con diferentes designaciones de letras escritas en la parte inferior. El profesor determinará qué placas corresponde a cada grupo. Ponga el número del grupo de prácticas junto a la letra en cada placa. Cada placa se inoculará con una suspensión líquida de las células correspondientes de uno de los cuatro tubos inclinados bacterianos identificadas en el paso 4.

CAMBIAR DE PUNTA ENTRE CADA PLACA DE INOCULACIÓN

2. Con una pipeta estéril coger 0,1 ml de suspensión celular desde el vial de cultivo bacteriano que le corresponde a una de sus placas. Depositar el líquido del agar en el centro de la superficie de la placa correspondiente.
3. Usando un asa estéril extender el líquido de manera uniforme sobre toda la superficie de la placa de agar. Gire la placa de ida y vuelta para obtener una cobertura completa. No aplique demasiada presión de lo contrario el agar puede ser dañado. Trate de mantener la placa parcialmente cubierta mientras realiza la difusión o trabaje junto a una llama. Cubrir la placa después de la difusión.



4. Con una pipeta estéril coger 0,1 ml de suspensión celular desde el vial de cultivo bacteriano que le corresponde a su segunda placa. Depositar el líquido del agar en el centro de la superficie de la placa correspondiente.

Identificación:

- A- *Escherichia coli*.**
- B- *Serratia marcescens*.**
- C- *Micrococcus luteus*.**
- D- *Bacillus subtilis*.**

5. Agrupar todas las placas de un grupo y unir las con cinta adhesiva. Las placas se deben dejar en posición vertical para permitir que la suspensión de células sea absorbida por el agar.

6. Una vez que la suspensión es absorbida en el agar, los alumnos o el profesor colocarán las placas en posición **invertida** (el agar en la parte superior) a 37°C en una estufa de incubación "overnight" (15-20h).

Si las células no han sido absorbidas en el medio, es mejor incubar las placas en su posición normal. Las placas se incuban en posición invertida para prevenir la condensación de la tapa, que podría gotear sobre el cultivo y puede interferir con los resultados experimentales.

B) Preparación de los lisados bacterianos. 2º Día.

Todas las placas deben tener una masa confluyente (césped) de células, no colonias. Estos céspedes bacterianos pueden tener grumos y agregados mientras que otros pueden tener zonas más claras rodeadas de crecimiento más pesado. Extender el período de incubación si el crecimiento suficiente no es evidente.

Micrococcus luteus puede crecer más lentamente que las otras bacterias.

Si el crecimiento no es evidente, continuar la incubación hasta obtener césped de células visible.

1. Etiquetar 2 tubos de ensayo de 10 ml con las letras correspondientes a sus placas y su número de grupo. Etiquetar 2 tubos de microcentrífuga con tapón de rosca con las letras correspondientes a sus placas y número de grupo. Determine el peso vacío al miligramo más cercano (0,001 g).

2. Añadir 4 ml de Tris-EDTA-glucosa (TEG) a cada placa. Se puede volver a centrifugar brevemente para recoger las gotas y recoger con micropipeta, sin tocar el pellet.

3. Usando un asa estéril para cada placa, raspar las células de la superficie del agar mediante extensión de ida y vuelta.

4. Incline la placa ligeramente. Usando una pipeta de 5 ml con un dispositivo de succión, pipetear las células hacia arriba y hacia abajo para romper los grumos grandes. Expulsar el líquido contra la superficie de agar para lavar las células residuales. Utilice una pipeta diferente para cada placa.

5. Transferir todas las células resuspendidas (2,5 hasta 3,5 ml) de cada una de las placas al tubo de ensayo de 10 ml correspondiente. Mezclar el tubo con un agitador vórtex o con otro mecanismo de agitación, para romper la mayoría de los agregados de células restantes.

6. Mezclar las células para obtener una suspensión uniforme. Utilizando pipetas nuevas con un dispositivo de succión, transferir 1 ml de las células a los tubos de microcentrífuga con tapón de rosca correspondientes. Tapar cada uno de los tubos.

7. Coloque los tubos de centrifuga en una microcentrifuga y centrifugue durante 5 minutos a máxima velocidad.

8. Eliminar el sobrenadante y quedarse con el pellet celular.

9. Invertir los microtubos y secar el líquido residual en un papel.

10. Determinar el peso de los pellets celulares.

NOTA: La masa húmeda de los pellet celulares puede variar entre las diferentes bacterias. Se recomienda que los sedimentos celulares sean comparables en peso para asegurar una intensidad constante de las bandas de proteínas en los resultados finales. Masa húmeda sugerida es de entre 0,020 y 0,025 gramos.

11. Resuspender los sedimentos celulares con el tampón Tris-EDTA-glucosa (TEG) (componente E), aproximadamente 100 mg de células/ml. El volumen de tampón para añadir (en ml) viene dado por la masa celular (en gramos) multiplicada por 10. Por ejemplo, si el sedimento celular tenía una masa de 0,025 g (25 mg), a continuación, se debe añadir 0,25 ml de tampón al microtubo.

Es necesario resuspender el precipitado mediante agitación vigorosa o con una micropipeta aspirando arriba-abajo.

12. Añadir una décima parte del volumen de solución de lisozima a las resuspensiones de células (por ejemplo, 25 μ l a 0,25 ml). Mezclar con un agitador vortex. Incubar en un baño a 37°C durante 30 minutos.

13. Añadir 3 veces el volumen de Tampón de Muestra de Proteína (G) (contiene SDS y 2 β -mercaptoetanol) a las suspensiones de células (por ejemplo, 0,75 ml de tampón a 0,25 ml de células).

14. Apriete los tapones de rosca de los microtubos. Colocar sus tubos de muestra en un baño de agua hirviendo durante 10 minutos.

15. Permita que los microtubos se enfríen. Centrifugar a máxima velocidad durante 5 minutos en una microcentrífuga.

16. Transferir la mayor parte del sobrenadante a un tubo fresco para su almacenamiento. **Este es tu lisado de proteínas.** Los pellets pueden no ser claramente visibles en los tubos que fueron centrifugados

Las muestras de proteína cruda podrán mantenerse refrigerados durante una semana. Para un almacenamiento más prolongado, las muestras deben ser congeladas, pero deberán ser hervidas de nuevo después de la descongelación.

El rendimiento de los lisados de proteínas puede variar entre los grupos de estudiantes y depende en gran medida de lo bien que se lleva a cabo la preparación de los lisados bacterianos.

Desnaturalización de las proteínas

Las muestras son proteínas desnaturalizadas que tienden a formar agregados moleculares y partículas insolubles. El calentamiento produce la rotura de los agregados de las proteínas desnaturalizadas.

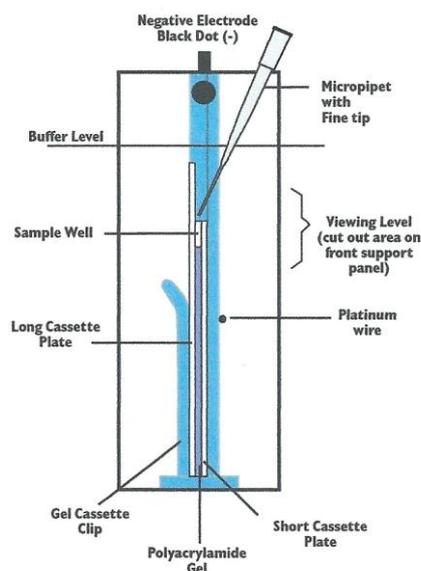
- Si la muestra desconocida (componente H) ya se ha rehidratado y calentado por el profesor de prácticas, proceder a la desnaturalización de los lisados proteicos tal y como se indica en los pasos 1 y 2.
- Si la muestra desconocida (componente H) **NO** ha sido rehidratada y calentada por el profesor de prácticas, proceder a la desnaturalización de la muestra H, junto con los lisados de proteínas tal y como se indica en los pasos 1 y 2.

1. Poner a calentar un vaso de agua, tapado con papel de aluminio, llevar a ebullición.
2. Asegurarse que los microtubos con las diferentes muestras de lisados de proteínas están bien tapados, utilizar los microtubos con tapón a rosca y marcarlos. La parte inferior de los microtubos deben ser empujados a través del papel de aluminio y dejar en inmersión en **agua hirviendo durante 5 minutos**. Los microtubos se deberían mantener suspendidos por el papel de aluminio. También se puede utilizar para esto cualquier sistema existente en el laboratorio para mantener flotando las muestras.
3. Proceder a cargar las muestras mientras todavía están calientes.

Una vez han se han sembrado o cargado las muestras para la electroforesis, volver a congelar las muestras de proteínas no utilizadas. Cuando se vuelvan a utilizar para otra electroforesis, se deben repetir los pasos 1 al 3.

Preparación del gel de poliacrilamida

1. Abra la bolsa que contiene el casete de gel con unas tijeras. Retire el casete y colóquelo sobre la mesa de trabajo con la parte delantera hacia arriba.
2. Algunas casetes tendrán cinta en la parte inferior de la placa frontal. Quitar toda la cinta para exponer la parte inferior del gel para permitir el contacto eléctrico.
3. Quite el peine mediante la colocación de sus pulgares en las marcas y empujando (presionando) hacia arriba, con cuidado y lentamente.
4. Inserte el gel casete en la cámara de electroforesis.



5. Coloque el casete de gel en la unidad de electroforesis en la orientación adecuada. Las muestras de proteínas no se separarán en geles que no están orientados correctamente. Siga las instrucciones que acompañan al aparato específico.
6. Añadir el tampón de electroforesis 1x dentro de la cámara. Los pozos de la muestra y la placa posterior de la casete de gel deben ser sumergidas bajo el buffer.
7. Enjuague cada pocillo con tampón de electroforesis utilizando una pipeta de transferencia.
8. El gel está listo ahora para la práctica de carga y/o muestras de gel. Practicar la carga, se puede hacer mediante el microtubo suministrado "Practice Gel Loading Solution".

Siembra o carga de las muestras de proteínas

- 2 grupos de estudiantes compartirán un mismo gel.
- Cambiar de punta cada vez que se siembra una muestra de proteína.
- Las proteínas deberían ser sembradas en el siguiente orden:

GRUPO A

Pocillo 1	20 microlitros tubo H	Muestra desconocida
Pocillo 2	15 microlitros tubo A	<i>E.coli</i>
Pocillo 3	15 microlitros tubo B	<i>S.marascens</i>
Pocillo 4	15 microlitros tubo C	<i>M.luteus</i>
Pocillo 5	15 microlitros tubo D	<i>B.subtilis</i>

GRUPO B

Pocillo 6	20 microlitros tubo H	Muestra desconocida
Pocillo 7	15 microlitros tubo A	<i>E.coli</i>
Pocillo 8	15 microlitros tubo B	<i>S.marascens</i>
Pocillo 9	15 microlitros tubo C	<i>M.luteus</i>
Pocillo 10	15 microlitros tubo D	<i>B.subtilis</i>

Correr el gel

Configurar la fuente de energía al voltaje deseado y correr el gel. **Se recomiendan 125 voltios durante 60-75 minutos.**

Tinción del gel con Protein InstaStain

Los geles de poliacrilamida pueden ser teñidos de una forma muy fácil con las hojas de Protein InstaStain. La tinción es rápida, sensible y los geles están listos para su visualización en 1-3 horas.

Los geles de poliacrilamida son muy finos y frágiles. Tener cuidado al manipular el gel para evitar que se rompa.

1. Añadir aproximadamente 100 ml de Solución de fijación en una pequeña bandeja.

Solución de fijación:

50 ml metanol; 10 ml ácido acético glacial; 40 ml agua destilada.

2. Transferir la placa posterior del casete con el gel en la bandeja de la solución de fijación. Humedecerse los **dedos protegidos con guantes** con solución fijadora y suavemente empujar el gel de la placa posterior y retire la placa, dejando el gel sumergido en la solución fijadora.

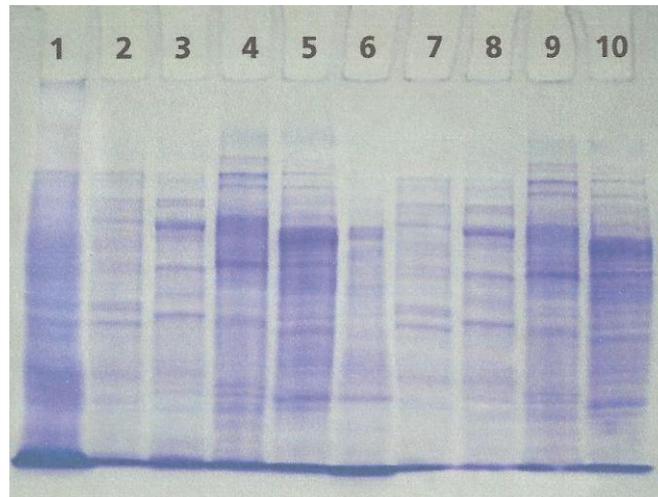
3. Flotar suavemente una hoja de Protein InstaStain con la cara azul en el líquido. Retirar la hoja de Protein InstaStain después de 30 minutos.

4. Cubrir la bandeja de tinción para prevenir la evaporación.
5. Suavemente agitar en algún dispositivo de laboratorio durante 1-3 horas o toda la noche.
6. Después de la tinción, las bandas de proteínas aparecerán de un color azul medio a oscuro.

El gel se puede desteñir si el "background" es demasiado oscuro mediante varios lavados con solución fijadora nueva.

6. RESULTADOS

Todos los lisados proteicos presentarán diferentes bandas espaciadas. El peso molecular de las diferentes proteínas varía en un rango que va de los 14.000 hasta los 95.000 daltons.



Las muestras de los pocillos 2-5 pertenecen a una dilución de los lisados del 25%, mientras que las muestras de los pocillos 7-10 es una dilución al 50%.

La proteína desconocida H es un lisado proteico de *E.coli*

Pocillo 1 y 6:	Muestra desconocida H.
Pocillo 2 y 7:	<i>E.Coli</i> .
Pocillo 3 y 8:	<i>S.marcescens</i> .
Pocillo 4 y 9:	<i>M.luteus</i> .
Pocillo 5 y 10:	<i>B.subtilus</i> .