

SIMULACIÓN DETECCIÓN VIH POR ELECTROFORESIS VERTICAL DE PROTEÍNAS

6 grupos de estudiantes
Ref.ELECPROT4

1. OBJETIVO DEL EXPERIMENTO

El objetivo de este experimento es aprender el uso de la **ELECTROFORESIS DESNATURALIZANTE EN GEL DE POLIACRILAMIDA-SDS** para identificar proteínas del VIH en muestras simuladas de pacientes. Los resultados obtenidos son utilizados para diagnosticar una infección de VIH.

2. COMPONENTES para 6 grupos de estudiantes

COMPONENTES	CONSERVACIÓN
Marcador de Proteínas estándar A	Congelador
Muestra Control Positivo B	Congelador
Muestra Control Negativo C	Congelador
Muestra Suero Paciente 1 D	Congelador
Muestra Suero Paciente 2 E	Congelador
Muestra Suero Paciente 3 F	Congelador
Tampón de electroforesis Tris-Glicina-SDS (10X)	Temperatura ambiente
Hojas de Protein InstaStain	Temperatura ambiente
Tampón de carga para practicar	Temperatura ambiente
Pipetas de Transferencias	Temperatura ambiente
Microtubos de centrifuga	Temperatura ambiente

2.1 Material requerido y no suministrado

- **3 geles de poliacrilamidas-SDS 12%.**
- Aparato de electroforesis vertical para proteínas.
- Fuente de energía para la electroforesis.
- Placa calefactora.
- Micropipetas automáticas y puntas.
- Balanza.
- Agua destilada.
- Papel de aluminio.
- Vasos.
- Transiluminador de luz blanca (recomendado).

Para la tinción con InstaStain (opcional)

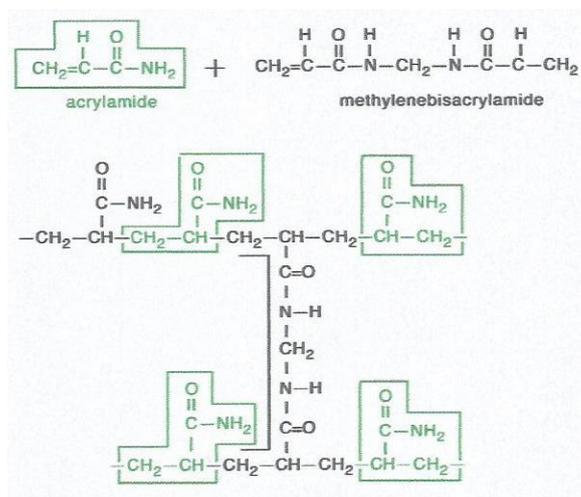
- Ácido acético glacial (30 ml).
- Metanol (150 ml).
- Plástico para envolver.
- Espátulas.
- Bandeja de tinción de vidrio.

3. INTRODUCCIÓN

ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS

Para analizar las proteínas, los investigadores a menudo hacen uso de una técnica llamada electroforesis en gel de poliacrilamida, o PAGE. Este es un método simple pero poderoso que proporciona información sobre la expresión y la pureza de una molécula, junto con su peso molecular. La técnica PAGE utiliza polímeros de acrilamida y bis-acrilamida para crear un gel con una red de poros y canales microscópicos.

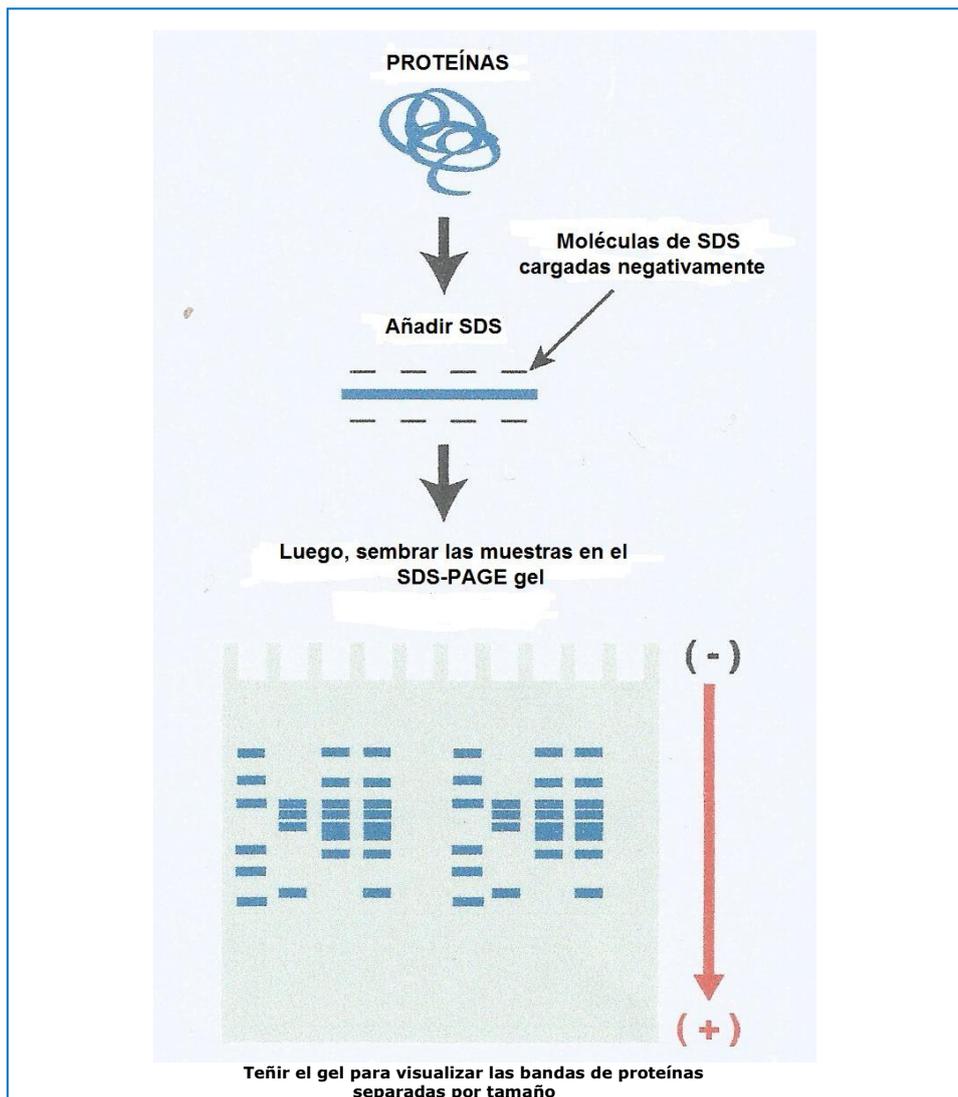
Los geles de poliacrilamida se forman mezclando el monómero, la acrilamida, el agente de reticulación, metileno-bisacrilamida, y un generador de radicales libres, persulfato de amonio, en tampón acuoso. La polimerización libre de la acrilamida se produce. Los polímeros de acrilamida están unidos entre 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 (en virtud de los pocillos de muestras) tiene una concentración de 5%, aumentando linealmente hasta el 20% en la parte inferior. Los 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 prepararon con más frecuencia entre las placas de vidrio separadas por tiras llamadas espaciadores. Como la mezcla de acrilamida líquida se vierte entre las placas, el aire es desplazado y el producto de polimerización se produce más rápidamente.

ESQUEMA DE LA ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS SDS-PAGE



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.

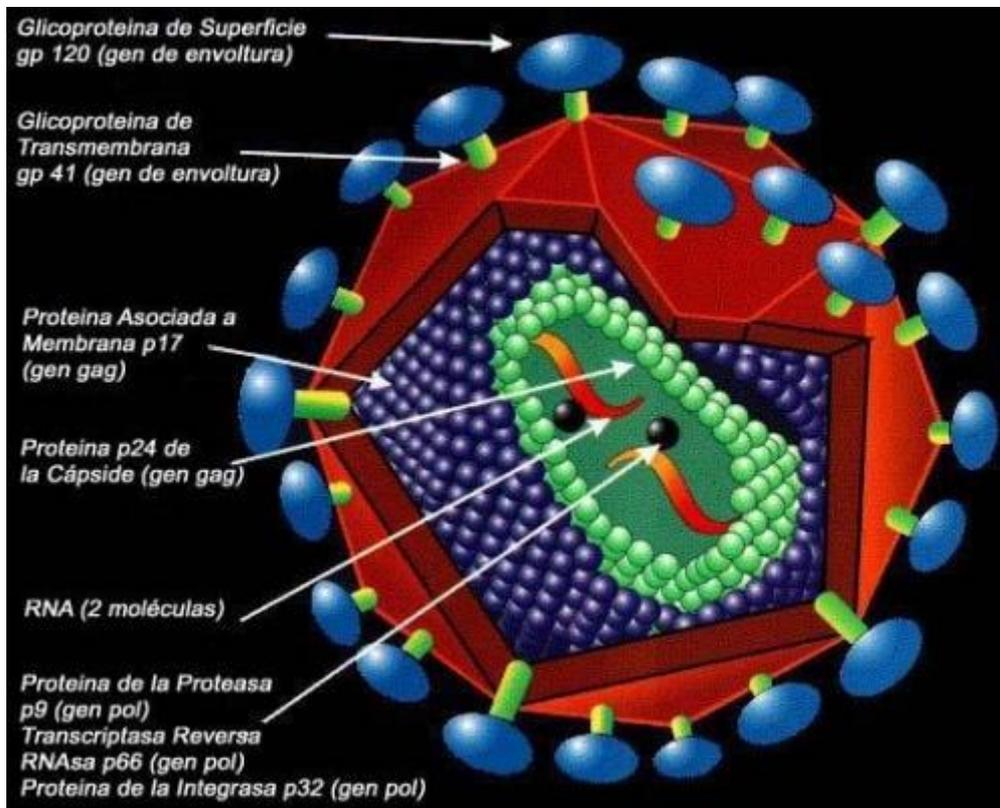
Durante la electroforesis, las proteínas migran a través del gel hacia el electrodo positivo a una velocidad que es inversamente proporcional a su peso molecular. En otras palabras, cuanto menor sea el polipéptido desnaturalizado, más rápido migrará. El peso molecular de un polipéptido desconocido se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

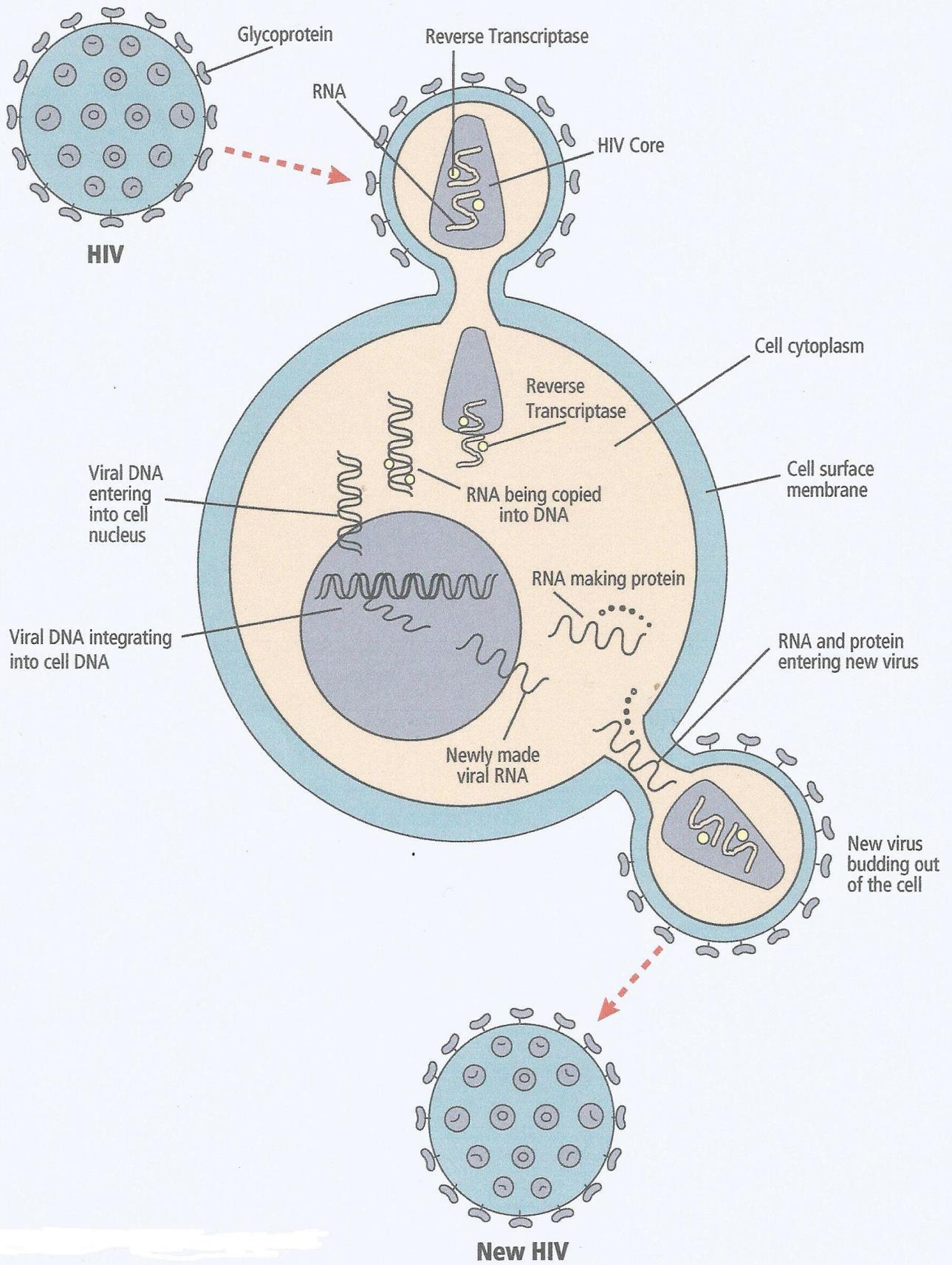
DETECCIÓN DE PROTEÍNAS DEL VIH EN MUESTRAS DE PACIENTES

El síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) es una enfermedad viral que amenaza la vida y que es causada por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH). La infección por VIH suprime el sistema inmune de un paciente infectando destruyendo las células T auxiliares productoras de anticuerpos. Debido a la falta de inmunovigilancia, los pacientes son extremadamente susceptibles a las infecciones por virus, bacterias, hongos y parásitos. Una persona puede contraer el VIH a través de un contacto sexual sin protección, una transfusión de sangre o una inyección intravenosa con una aguja contaminada.

El SIDA es una amenaza global para la salud humana, y la detección temprana y el cuidado de los pacientes es esencial para controlar la propagación y el sufrimiento de la enfermedad.

El VIH-1 es un retrovirus, lo que significa que tiene un genoma de ARN y una ADN-polimerasa dependiente de ARN denominada transcriptasa inversa. La proteína transcriptasa inversa permite al virus para crear una plantilla de ADN que se integrará en el genoma del paciente. Una vez insertado en el genoma de la célula huésped, el ADN viral puede permanecer inactivo durante largos períodos de tiempo, lo que se conoce como etapa latente de la infección. Durante la producción viral activa, el ADN se transcribirá en ARNm, que puede iniciar la producción de proteínas virales. Las proteínas y los ARN se ensamblan en la superficie de la célula, formando una nueva partícula de virus. Finalmente, el virus completo sale de la membrana celular y está listo para infectar a las células T sanas.

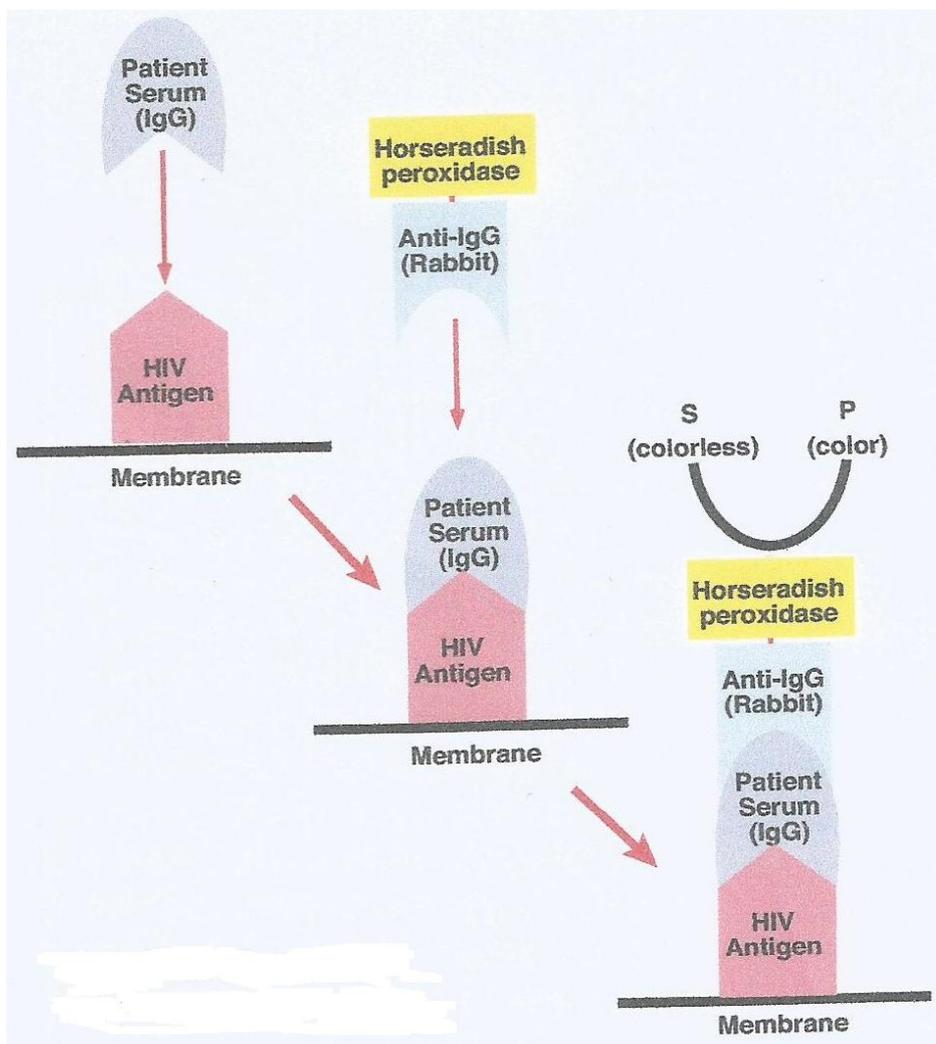




Estructuralmente, el virus VIH presenta una envoltura viral, compuesta de glicoproteínas y una membrana lipídica, y una cápside proteínica que rodea dos copias del genoma de ARN. En total, el genoma del VIH codifica para 19 proteínas necesarias para la estructura del virus, la integración, la replicación y la interrupción de la función de la célula huésped.

Las infecciones por VIH en pacientes pueden detectarse por múltiples métodos. La prueba inicial más común implica un **inmunoensayo rápido** que detecta la presencia de anticuerpos del VIH en el suero o la saliva. Un resultado positivo en la prueba rápida se confirma con una segunda prueba, que incluye la detección de ácidos nucleicos y proteínas virales, o realizar una transferencia Western para identificar los anticuerpos séricos del VIH. **Las transferencias Western blot del VIH son sensibles y de bajo costo, convirtiéndolos en uno de los métodos preferidos para confirmar un diagnóstico de VIH.** A diferencia del inmunoensayo rápido, el western blot normalmente lo realiza un técnico capacitado y puede requerir algunos días o semanas para obtener resultados.

Durante la transferencia western del VIH, las proteínas del VIH se separan en un gel SDS-PAGE y luego se transfieren a una membrana para el análisis. A continuación, la membrana se incuba con el suero del paciente, lo que permite que cualquier anticuerpo en la sangre se una a las proteínas virales. El suero del paciente se elimina por lavado y la membrana se incuba con un segundo anticuerpo y reactivo de detección.



Detección por Western Blot de los antígenos del VIH

El suero de pacientes infectados contendrá anticuerpos contra múltiples proteínas del VIH, incluyendo la cápside, y proteínas funcionales.

Tamaño Proteína	Nombre Proteína	Categoría	Descripción
72.000 Daltons	P65	Enzima	Transcriptasa Inversa
38.000 Daltons	P41	Transmembrana	Proteína de la envoltura
20.000 Daltons	P24	Estructural	Proteína de la cápside
14.000 Daltons	P18	Estructutral	Proteína de la Matriz

Estos anticuerpos pueden aparecer dentro de los tres meses después de la infección, lo que permite la detección temprana en el western blot del VIH. Un resultado negativo para la prueba de western blot mostrará cero bandas, mientras que los resultados positivos pueden variar según el proveedor de la prueba. Típicamente, un diagnóstico positivo requiere la detección de al menos una envoltura y una proteína de cápside, aunque la mayoría de los pacientes positivos mostrarán bandas adicionales. Además, es posible que los resultados revelen una o más bandas sin alcanzar los criterios requeridos para una prueba positiva; en estos casos, se dice que el paciente es "indeterminado" y requerirá pruebas adicionales para confirmar la infección por el VIH. El requerimiento de múltiples bandas ayuda a prevenir el diagnóstico erróneo de pacientes infectados con otros virus que ocasionalmente se detectan mediante la transferencia Western.

Este experimento replica la práctica clínica para detectar anticuerpos del VIH en una muestra de sangre del paciente. Las muestras de pacientes simulados han sido teñidas previamente con tintes, haciéndolos visibles durante la electroforesis. Estas proteínas se mezclan con un tampón de muestra que contiene SDS, DTT, glicerol y un colorante de seguimiento. El colorante de seguimiento migrará antes que las proteínas más pequeñas en estas muestras, donde sirve como marcador para mostrar qué tan lejos se ha movido el gel. Dado que las proteínas están marcadas previamente, no es necesario realizar un análisis de transferencia Western blot; en cambio, las bandas de proteína del VIH serán visibles en cada muestra una vez el gel haya corrido. Esto permite el análisis de cada muestra de paciente inmediatamente después de retirar el gel de la cámara de electroforesis. Luego, los estudiantes proporcionarán un diagnóstico de VIH o recomendaciones adicionales para cada paciente.

4. DESCRIPCIÓN DEL EXPERIMENTO

El objetivo de este experimento es aprender el uso de la **ELECTROFORESIS DESNATURALIZANTE EN GEL DE POLIACRILAMIDA-SDS** para identificar proteínas del VIH en muestras simuladas de pacientes. Los resultados obtenidos son utilizados para diagnosticar una infección de VIH.

4.1 Precauciones

1. 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

Las preparaciones previas puede realizarlas el profesor o los estudiantes.

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.

A cada grupo se le proporcionará un gel de poliacrilamida o se puede compartir geles si hay suficientes carriles. Al compartir, el grupo 1 cargará los carriles 1-6 y el grupo 2 cargará los carriles 7-12. Si es necesario, es posible omitir la muestra B, el control negativo, para permitir que dos grupos compartan un gel de 10 pocillos.

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 las siguientes partes:

- 1) Preparación de los geles de poliacrilamida para la electroforesis. Práctica de la siembra.
- 2) Desarrollo de la electroforesis SDS-PAGE con las muestras de proteínas.
- 3) Tinción del gel con el InstaStain (Opcional).

PREPARACIÓN DEL TAMPÓN DE ELECTROFORESIS

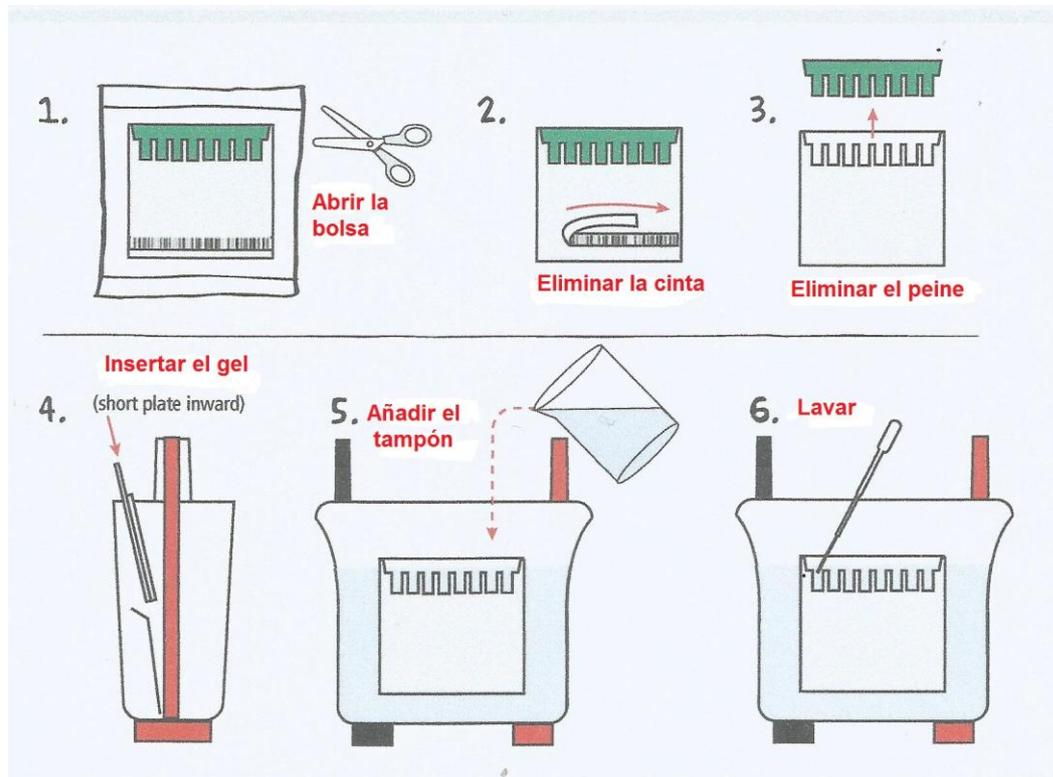
Preparar el Tampón de electroforesis 1X, añadir 1 parte del **Tampón de electroforesis Tris-Glicina-SDS (10X) concentrado** a 9 partes de agua destilada.

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS DE PROTEÍNAS

Añadir **160 µl de agua destilada a todos los microtubos (A a F)** y permitir que el material se rehidrate durante varios minutos. Vortex o mezclar vigorosamente. Las proteínas resuspendidas pueden mantenerse a temperatura ambiente para su uso inmediato o congeladas hasta su uso.

5. PRÁCTICA

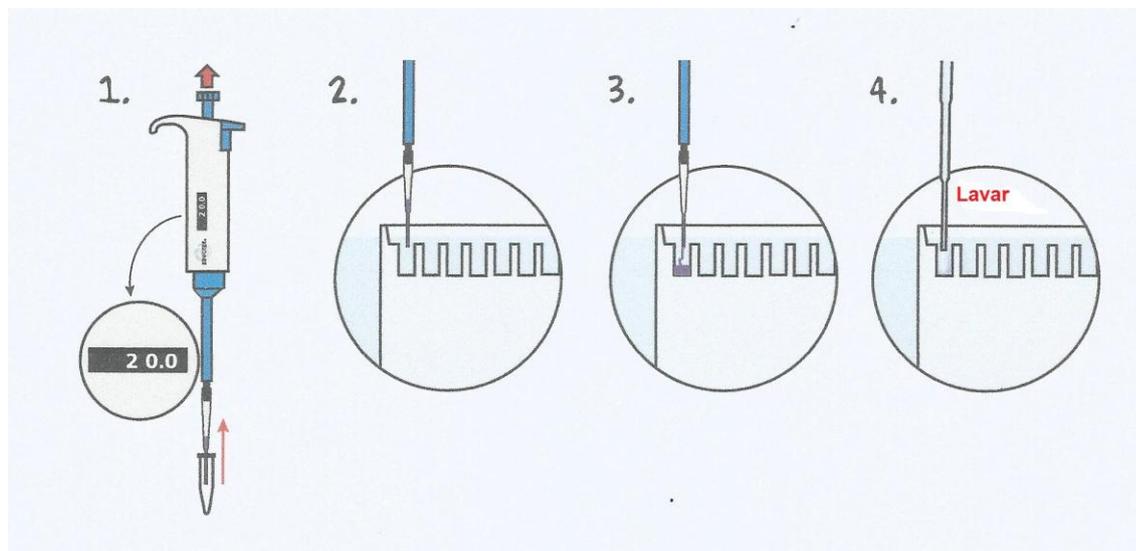
1) Preparación de los geles para la electroforesis



Cuando inserte el gel en la cámara de electroforesis oriente el gel de acuerdo las instrucciones del fabricante.

El gel ahora está listo para la práctica de siembra con el tampón de cargar para practicar o para la siembra de las muestras de proteínas

2) Práctica de siembra



1. Utilizando una micropipeta con una punta fina, medir 20 μ l del Practice gel loading solution.
2. COLOQUE la punta de la pipeta bajo el tampón y directamente sobre el pocillo de muestra, apoyándose suavemente contra la placa posterior del casete de gel.
3. Lentamente libere la muestra presionando el émbolo y luego retire la punta de la pipeta. Continúe practicando con pozos adicionales hasta que se sienta cómodo.
4. Lave o elimine la solución del gel de práctica de los pocillos antes de cargar las muestras de proteína. Usando una pipeta de transferencia, suavemente con una corriente de tampón de electroforesis en los pocillos para desplazar la solución de práctica.

3) Desarrollo de la electroforesis SDS-PAGE con las muestras de proteínas

3.1 Preparación de las muestras

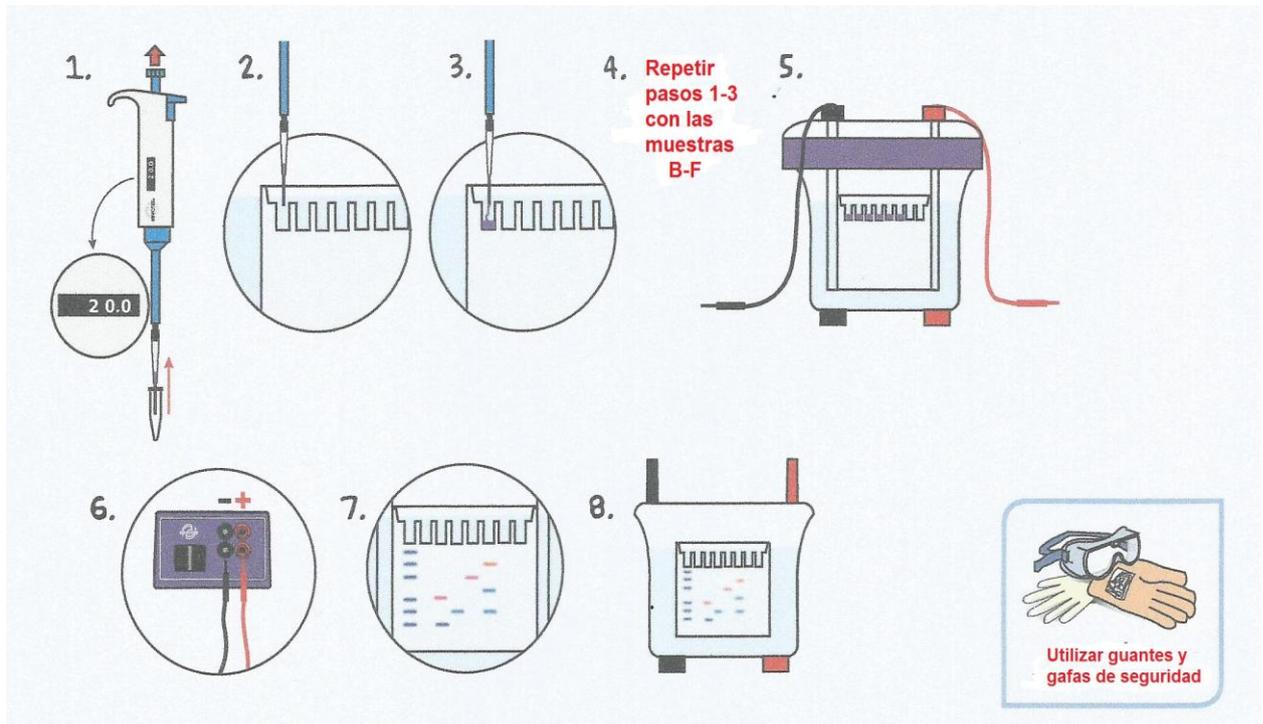
Las muestras de proteínas son enviadas liofilizadas y deben ser rehidratadas. Las muestras son proteínas desnaturadas que tienden a formar agregados moleculares y partículas insolubles. El calentamiento produce la rotura de los agregados metaestables de las proteínas desnaturadas.

- Si las muestras de proteínas (tubos A a E) no han sido calentados por el profesor, realizar el calentamiento de las muestras.



1. Poner a calentar un vaso de agua, tapado con papel de aluminio, llevar a ebullición.
2. Asegurarse que los microtubos 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 estar inmersos en **agua hirviendo durante 5 minutos**. Los microtubos se deberían mantener suspendidos por el papel de aluminio. Se puede también utilizar para ello si se dispone algún sistema de laboratorio para hacer flotar las muestras.
3. Proceder con la electroforesis de proteínas. *Las proteínas no utilizadas se pueden conservar a -20°C y cuando se vayan a utilizar se han de repetir los pasos 1 a 2.*

3.2 Siembra de las muestras



1. Pida a los estudiantes cargar las muestras en el gel de poliacrilamida, **mientras que las muestras están todavía calientes para evitar la agregación. El volumen de muestra a cargar es de 20 µl.**
2. COLOQUE la punta de la pipeta bajo el tampón y directamente sobre el pocillo de muestra, apoyándose suavemente contra la placa posterior del casete de gel.
3. Lentamente libere la muestra presionando el émbolo y luego retire la punta de la pipeta.
4. Repetir los pasos 1-3 con las muestras B-F, cambiando de punta con cada muestra.
5. Una vez las muestras han sido sembradas, cuidadosamente colocar la cubierta en los electrodos.
6. Conecte los electrodos a la fuente de energía.
7. Configure el voltaje de la fuente de energía y desarrolle la electroforesis. Permitir que el colorante de carga llega hasta el final del gel. **Se recomiendan 125 voltios durante 60-75 minutos.**
8. Una vez finalizada la electroforesis apagar la fuente de energía y cuidadosamente sacar el gel de la cámara para su análisis. El gel puede ser sacado del casete utilizando una espátula. Tener cuidado porque los geles son muy finos y frágiles.

En esta dirección puede ver un video de la práctica
<http://www.edvotek.com/Resources>

TINCIÓN OPCIONAL: Aunque las muestras de proteínas se proporcionan en un formato preteñido, es posible aumentar la intensidad de las bandas mediante el uso de tarjetas Protein InstaStain®. La tinción es rápida y sensible, y los geles están listos para su visualización en tan solo 1-3 horas. Ver apéndice A para el protocolo de tinción completo.

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.

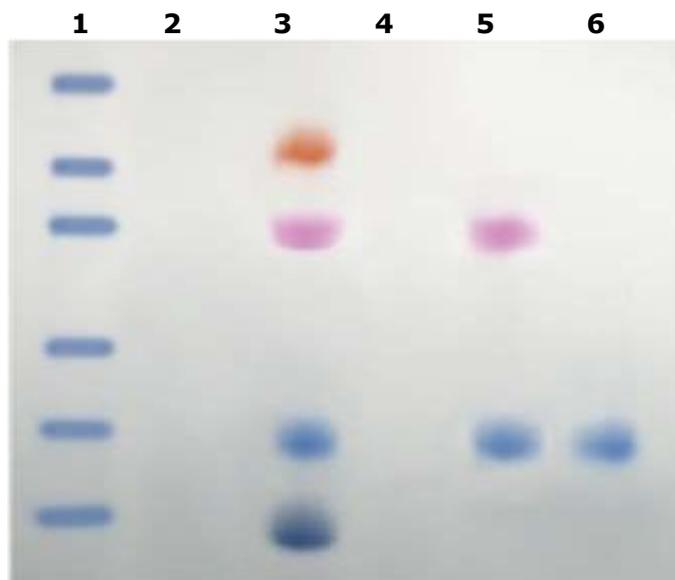
5. Suavemente agitar en algún dispositivo de laboratorio durante 1-3 horas o toda la noche.

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

Los patrones de bandas esperadas se muestran a continuación en relación con el marcador de proteínas estándar. Los resultados reales pueden diferir ligeramente debido a las variaciones en la calidad o composición del gel, o debido a las fluctuaciones en la forma en que se procesan las muestras en el gel.



Pesos moleculares marcador estándar: 94 Kd; 67 Kd; 38 Kd; 30 Kd; 20 Kd y 14 Kd.

Pocillo	Muestra	Número/ tamaño banda	Diagnóstico
1	Marcador proteínas estándar		
2	Control negativo	0 bandas	VIH negativo
3	Control positivo	4 bandas (72, 38, 20 y 14 Kd)	VIH positivo
4	Paciente 1	0 bandas	VIH negativo
5	Paciente 2	2 bandas (38 y 20 Kd)	VIH positivo
6	Paciente 3	1 banda (20 Kd)	Debe ser retestado