

## INMUNOELECTROFESIS

**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 completo	4-8°C
C Albúmina	4-8°C
D Anticuerpo para suero completo	4-8°C
E Anticuerpo para IgG	4-8°C
F Agarosa™ UltraSpec	4-8°C
G Tampón de electroforesis (concentrado 50x)	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.

#### 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 inmunolectroforesis para separar y caracterizar una mezcla de proteínas y examinar la especificidad de la interacción antígeno-anticuerpo.

### 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.

### 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 el Experimento:

- Leer atentamente la introducción y el protocolo. Utilizar esta información para formular una hipótesis para esta práctica.
- Predecir los resultados de la práctica.

Durante la práctica:

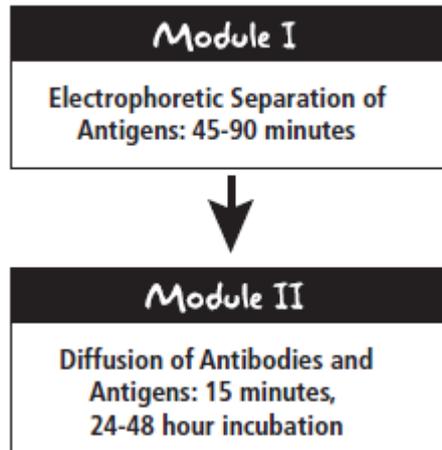
- Registrar las observaciones.

Después de la práctica:

- Interpretar los resultados: ¿los datos obtenidos respaldan o contradicen la hipótesis propuesta?
- Si se repite la práctica, ¿qué se puede cambiar? Revisar la hipótesis planteada para reflejar este cambio.

### 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.

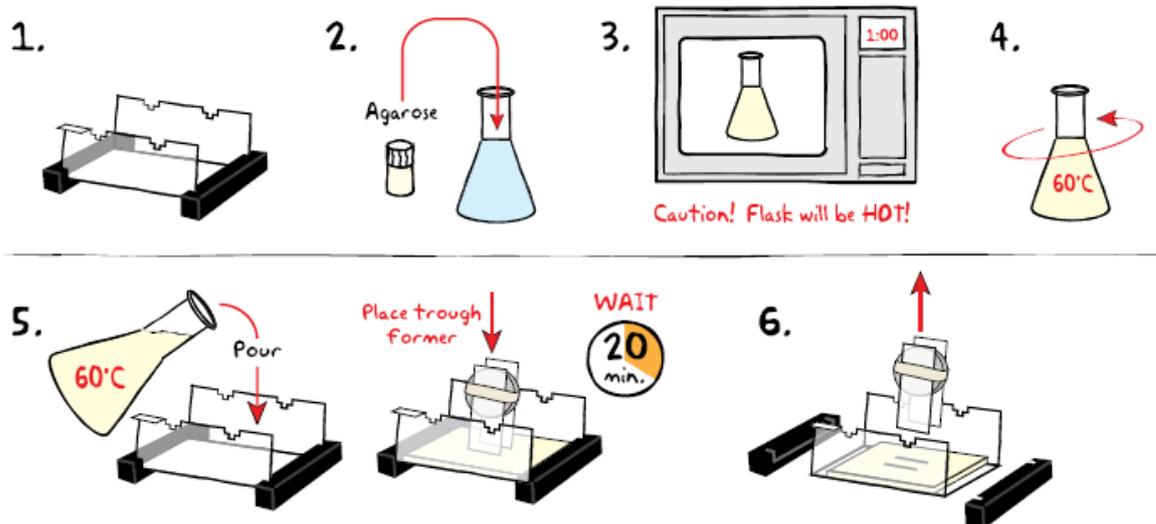


### Preparaciones previas

#### **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.

#### 4.1 Módulo I: Separación Electroforética de Antígenos



#### **Disolución del gel de agarosa**

**NOTA:** el profesor de prácticas puede preparar los geles antes de la clase.

1. PREPARAR la bandeja de moldeo del gel sellando los extremos de la bandeja con las tapas de goma de los extremos.

2. MEZCLAR 1,0 g de polvo de agarosa con 100 ml de tampón de electroforesis diluido en un vaso de precipitados o matraz.

**NOTA:** Toda la clase debe realizar un lote grande de agarosa y luego dividirse en geles individuales.

3. DISOLVER el polvo de agarosa hirviendo la solución. Utilizar el MICROONDAS para llevar la solución a temperatura alta durante 60 segundos. RETIRAR con cuidado el matraz del microondas y MEZCLAR haciendo girar el matraz. Continuar CALENTANDO la solución en ráfagas de 15 segundos hasta que la agarosa se disuelva por completo (la

solución debe ser transparente como el agua).

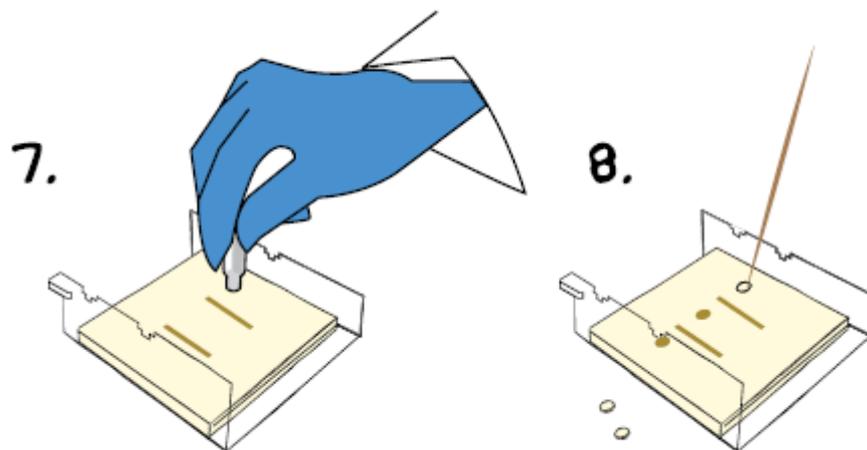
4. ENFRIAR la agarosa a 60°C con agitación cuidadosa para promover una disipación uniforme del calor.

5. VERTER la solución de agarosa enfriada en la bandeja de gelificación preparada (Tabla A). Antes de que la agarosa se solidifique, COLOCAR el formador de canales en el centro de la bandeja para formar simultáneamente los dos canales. El gel debe solidificarse completamente en 20 minutos. El gel se endurecerá y se volverá menos transparente a medida que se solidifique.

Table <b>A</b> Thin 1.0% UltraSpec-Agarose Gels	
Size of Gel Casting tray	Volume of molten agarose
7 x 7 cm	9 mL
7 x 14 cm	19 mL

**NOTA:** Asegurarse que el formador de canales esté paralelo a los lados de la bandeja de gel y perpendicular a las tapas de los extremos.

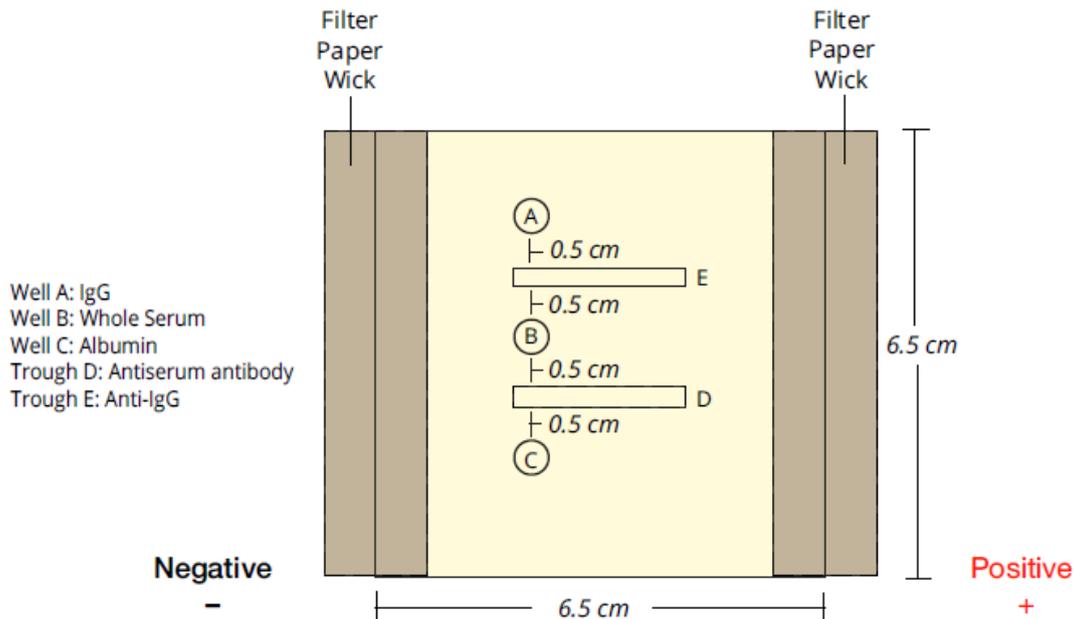
6. QUITAR las tapas de los extremos y el formador de canales. Se debe tener especial cuidado para evitar daños en el gel.



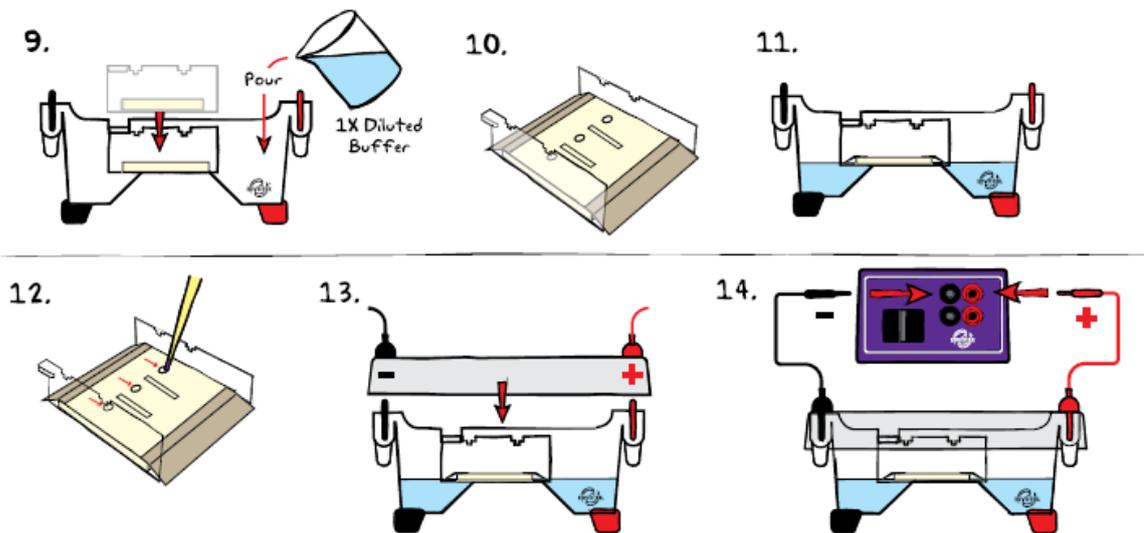
### Preparación del gel de agarosa

7. CORTAR los pozos A, B y C, como se indica en la Plantilla 1, usando un cortador de pozos. La distancia entre los canales y el borde de cada pocillo no debe ser superior a 0,5 cm.

8. RETIRAR con cuidado los tapones redondos de gel de agarosa con un palillo o una espátula.



**Template 1:**  
Template for Immunoelectrophoresis.  
(Drawn approx. to scale.)  
Filter paper wick instructions  
are on the next page.



### Correr el gel

9. TRANSFERIR el gel (todavía en la bandeja) a la cámara de electroforesis. VERTER el tampón de electroforesis diluido en los pocillos laterales del aparato, pero NO sumergir el gel.

10. COLOCAR suavemente las mechas de papel de filtro sobre los extremos del gel. (Deben superponerse unos 3 a 4 mm). PERMITIR que las mechas se saturan con el tampón de electroforesis.

11. PRESIONAR ligeramente sobre las mechas para asegurar un buen contacto entre el gel y el tampón de electroforesis. Las mechas deben estar sumergidas en el tampón. Si es necesario, agregar más tampón, pero NO cubrir el gel con tampón.

12. PIPETEAR 20  $\mu$ L de las muestras A, B y C en los pocillos como se indica en la Tabla 1a. CAMBIAR las puntas de pipeta entre muestras. Si es necesario, consultar la Figura 1

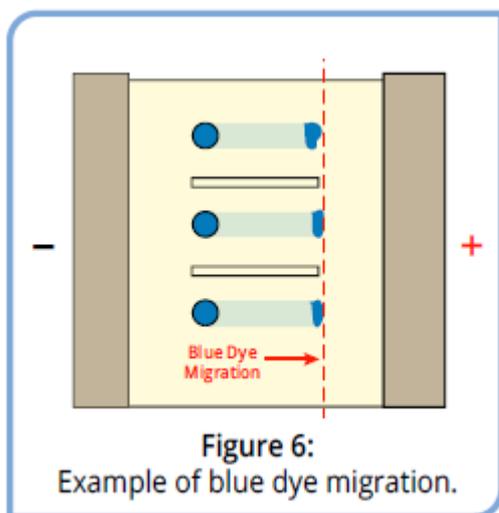
para ver un diagrama de carga de muestras adecuado.

Table 1a: Well Loading	
Well A	IgG
Well B	Whole Serum
Well C	Albumin

13. COLOCAR la cubierta de seguridad en la unidad.

14. CONECTAR los cables a la fuente de alimentación con el cable negro en la entrada negra (negativa) y el cable rojo en la entrada roja (positiva). ENCENDER y configurar la fuente de alimentación. Consultar la Tabla B para conocer el voltaje recomendado. Cuando la corriente fluye correctamente, se deben formar burbujas en los electrodos.

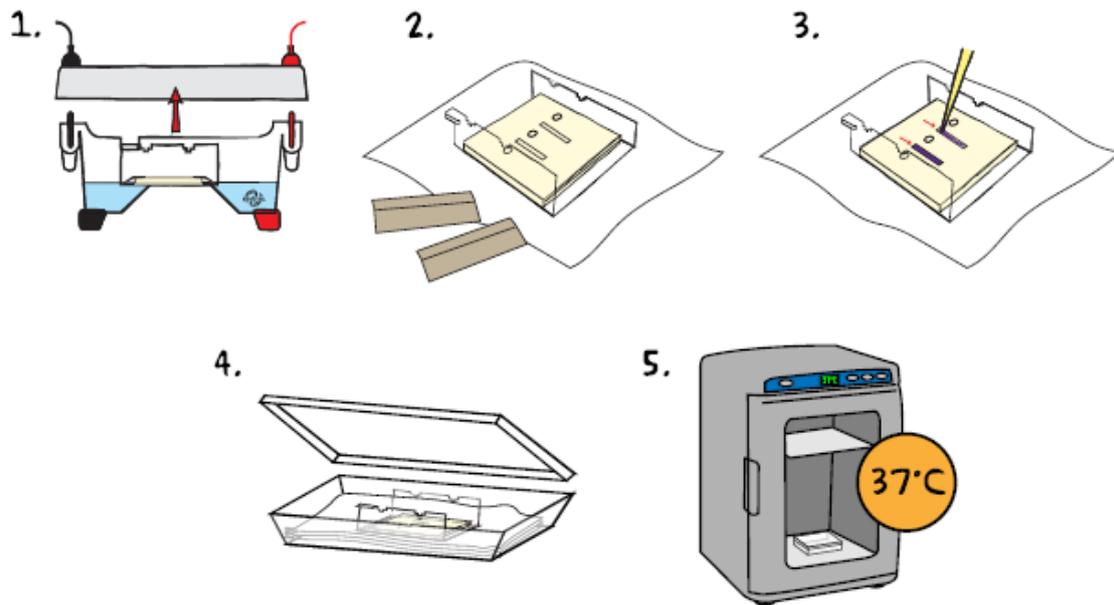
15. EJECUTAR la electroforesis hasta que el tinte azul haya migrado a los extremos de los canales (consultar la Figura 6). El tiempo exacto requerido depende del voltaje (ver la Tabla B).



Volts	Recommended Times	
	Minimum	Maximum
150	15 min.	30 min.
125	30 min.	45 min.
75	35 min.	70 min.

**NOTA:** Las muestras contienen tinte que migrará a diferentes velocidades. Se debe detener la electroforesis cuando el primer tinte llegue justo después del final de los canales. No se debe permitir que las muestras migren fuera del extremo del gel.

## 4.2 Módulo II: Difusión de Anticuerpos y Antígenos



1. Después de completar la electroforesis, APAGAR la alimentación, desconectar la fuente de alimentación, DESCONECTAR los cables y retirar la cubierta.
2. DESECHAR las mechas de papel de filtro y RETIRAR la bandeja de gel del aparato. COLOCAR la bandeja en una superficie nivelada.
3. PIPETEAR 50  $\mu$ L de cada anticuerpo en el canal apropiado (consultar la Tabla 1b). Utilizar la punta de la pipeta para DISTRIBUIR con cuidado la solución de anticuerpos a lo largo de toda la cubeta. CAMBIAR las puntas de pipeta entre muestras.

Trough D	Antiserum antibody
Trough E	Anti-IgG

4. COLOCAR la bandeja en una cámara de humidificación cerrada que contenga toallas de papel humedecidas.
5. DEJAR que la difusión se lleve a cabo 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 incubadora a 37 °C o permanecer a temperatura ambiente.

## 5. PREGUNTAS DE LA PRÁCTICA

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?
6. ¿Cómo se usa la inmunoelectroforesis en un entorno clínico?

## 6. GUÍA DEL PROFESOR

### DESCRIPCIÓN GENERAL DE LA PREPARACIÓN PRELABORATORIO DEL PROFESOR:

Esta sección describe las preparaciones previas recomendadas y el tiempo aproximado requerido para completar cada actividad previa.

Preparation For:	What to do:	When:	Time Required:
<b>Module I: Electrophoretic Separation of Antigens</b>	Prepare electrophoresis buffer.	Up to one week before performing the experiment.	30 min.
	Prepare gels.	On the day of the lab.	30 min.
	Cut filter paper wicks.	Anytime before performing the experiment.	15 min.
	Aliquot protein samples.	Anytime before performing the experiment.	15 min.
<b>Module II: Diffusion of Antibodies and Antigens</b>	Aliquot antibody samples.	Anytime before performing the experiment.	15 min.

Red = Prepare immediately before module.
  Yellow = Prepare shortly before module.
  Green = Flexible / prepare up to a week before the module.

Rojo = Preparar inmediatamente antes del módulo

Amarillo = Preparar poco antes del módulo.

Verde = Flexible / preparar hasta una semana antes del módulo

### Preparaciones previas al laboratorio

#### 6.1 Módulo I: Separación Electroforética de Antígenos

#### Preparación de tampón de electroforesis diluido

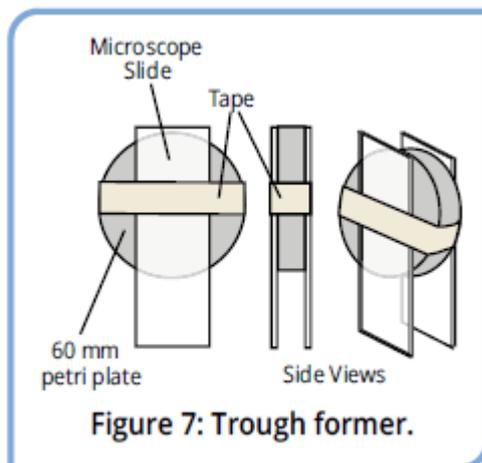
Según el tamaño de la clase y la cantidad de geles que se necesiten realizar, preparar el tampón de electroforesis 1x como se muestra en la Tabla 2. Este tampón se utilizará para la preparación del gel de agarosa y el tampón de la cámara de electroforesis.

<i>Volume of 50X Buffer</i>	<i>Volume of Distilled Water Needed</i>	<i>Final Volume of 1X Buffer</i>
20 mL	980 mL	1 L
40 mL	1,960 mL	2L
60 mL	2940 mL	3L

### Preparación de canales para las mechas

Antes de correr los geles de agarosa, se deben construir un formador de canales. Para cada formador de canal, necesitará dos portaobjetos de microscopio, la mitad inferior de una placa petri pequeña (60 mm) y cinta adhesiva.

1. Pegar con cinta adhesiva un portaobjetos de microscopio en la parte inferior de la placa de Petri (consultar la Figura 7).



2. Pegar con cinta adhesiva el segundo portaobjetos del microscopio al lado opuesto de la placa de Petri para que quede nivelado con el primer portaobjetos. Desde la vista lateral, los portaobjetos deben estar colocados de forma uniforme y paralelos. El formador de canal debe poder permanecer de pie sin apoyo cuando se coloca sobre una encimera.

### Preparación de geles de agarosa

Cada grupo requiere de 1 gel de agarosa fino de 7 x 7 cm (9 ml de agarosa fundida por grupo). Se puede elegir que los estudiantes hagan su propio lote de agarosa para moldear en gel (preparación individual, usando las instrucciones de la página 4) o se puede preparar la agarosa para toda la clase usando las instrucciones a continuación.

#### Preparación de geles de agarosa para toda la clase (1,0 %)

1. Utilizar un matraz de 250 ml para preparar el tampón de gel diluido.
2. Verter 1,0 gramo de UltraSpec-Agarose™ en 100 ml de tampón de electroforesis diluido. Agitar para dispersar los grumos.
3. Con un rotulador, indicar el nivel de volumen de la solución en el exterior del matraz.
4. Calentar la solución de agarosa en el microondas o en una placa calefactora para disolverla completamente.
5. Enfriar la agarosa a 60°C en un baño de agua. Si se ha producido evaporación, agregar suficiente agua destilada para llevar el volumen del matraz al volumen original, como está marcado en el matraz.
6. Mantener la agarosa a 60°C hasta el momento de verter los geles. Cada grupo requerirá 9 ml de agarosa fundida.

**PARA EL MÓDULO I**, cada grupo de estudiantes debe recibir:

- Tampón de electroforesis diluido
- 9 ml de agarosa fundida
- Formador de canal
- 2 mechas de papel filtro

- 25  $\mu\text{L}$  de los componentes A, B y C

### **Materiales adicionales**

- Preparar las mechas de electroforesis cortando papel de filtro en tiras de aproximadamente 7 cm x 3 cm. Los extremos de las mechas deben ser lo suficientemente largos para extenderse dentro del tampón de electroforesis en la cámara (consultar la Plantilla 1 en la página 6).

- Si se utiliza una unidad M12 (con capacidad para dos geles de 7 x 7 cm o un gel de 7 x 14 cm), se recomienda utilizar una bandeja de fundición de gel de 7 x 14 cm. Si solo tiene bandejas de fundición de gel de 7 x 7 cm, usar una pipeta de transferencia para humedecer el área entre los dos geles y cortar una tercera mecha para conectar los geles. Se debe asegurar que la mecha esté empapada con tampón pero que los geles no estén sumergidos.

- Alícuotas de 25  $\mu\text{L}$  de los componentes A, B y C por gel. (Se proporcionan suficientes tubos para alicuotar todos los componentes para 10 grupos).

### 6.2 Módulo II: Difusión de anticuerpos y antígenos

#### **Preparación de una cámara de humidificación**

1. Cubrir el fondo de un recipiente de plástico con toallas de papel.
2. Agregar agua destilada para saturar las toallas, pero no permitir que el exceso de agua se acumule en el recipiente.
3. Cubrir con una tapa, envoltura de plástico o papel de aluminio.

**PARA EL MÓDULO II**, cada grupo de estudiantes debe recibir:

- 55  $\mu\text{L}$  de Componentes D y E
- Cámara de humidificación
- Toallas de papel
- Agua destilada

### **Materiales adicionales**

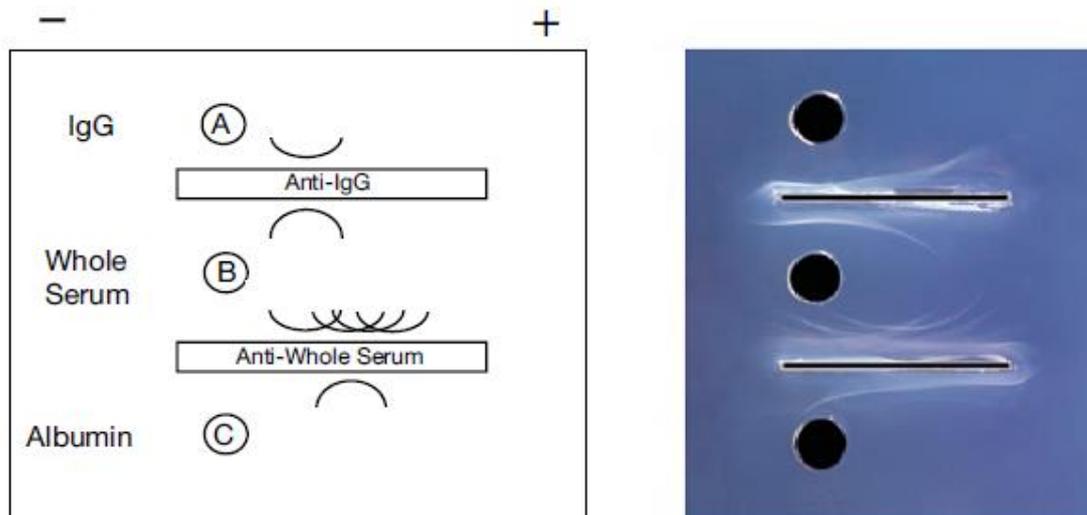
- Alícuotas de 55  $\mu\text{L}$  de los componentes D y E por grupo. (Se proporcionan suficientes tubos para alicuotar todos los componentes para 10 grupos).

## 7. EVITAR ERRORES COMUNES

1. Seguir las instrucciones cuidadosamente cuando se preparen geles. Asegurarse que la agarosa esté completamente disuelta.
2. Los geles se deben realizar el día de la práctica. Se solidificarán rápidamente porque son muy delgados.
3. El espaciado de los pozos y canales es fundamental para el éxito del experimento.
4. Hacer los pocillos con cuidado y limpios con los cortadores de pocillos.
5. No sumergir el gel en el tampón de electroforesis cuando corra el gel. Usar las mechas para hacer contacto entre el gel y el tampón.
6. No agregar anticuerpos a los canales hasta después de la separación electroforética de las proteínas.
7. Al agregar el anticuerpo a las cubetas, extender la solución lenta y cuidadosamente por toda el área de la cubeta.
8. La colocación de la cámara de humidificación en una estufa de incubación a 37°C acelerará la formación de arcos de precipitación.

## 8. RESULTADOS Y PREGUNTAS DE LA PRÁCTICA

7. Observar la formación de arcos de precipitado blanco en el gel.
8. 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.
9. 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.



Results may vary somewhat from those depicted in the above schematic.  
Drawing not depicted to scale.

### Esquema del resultado obtenido.

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