DETECCIÓN DE VIH POR WESTERN BLOT

6 grupos de estudiantes

1. OBJETIVO DEL EXPERIMENTO

El objetivo de este experimento es que los estudiantes entiendan los conceptos y metodología involucrados en la técnica de Western Blot. El experimento prueba la presencia de proteínas virales simuladas obtenidas a partir de cultivos de células infectadas con un hipotético suero de individuos seropositivos al VIH.

2. COMPONENTES para 6 grupos de estudiantes

COMPONENTES	CONSERVACIÓN
Muestras para electroforesis:	
A Control positivo	Nevera
B Control negativo	Nevera
C Paciente #1	Nevera
D Paciente #2	Nevera
E Paciente #3	Nevera
F Marcador estándar de peso molecular	Nevera
Componentes para electroforesis:	
Agarosa	Temperatura ambiente
Tampón Tris-Glicina-SDS 10x	Temperatura ambiente
Tampón en polvo Tris-Glicina 10x (solo para la preparación del gel)	Temperatura ambiente
Tampón de carga	
Pipeta de 1 ml	
Componentes para la transferencia y la tinción:	
6 Membranas de Western Blot (7 x 7 cm)	Temperatura ambiente
6 Papeles de filtro para la transferencia (7 x 7 cm)	Temperatura ambiente
FlashBlue Protein InstaStain® polvo	Temperatura ambiente

NOTA: ESTE EXPERIMENTO NO CONTIENE NINGUN MATERIAL PREPARADO A PARTIR DE FUENTES HUMANAS O DE VIRUS.

2.1 Material requerido y no suministrado

- Cubeta de electroforesis.
- Fuente de alimentación.
- Pipetas automáticas y puntas.
- Plataforma de agitación.
- Placa calefactora o microondas.
- Estufa de incubación (65ºC).
- Tubos de microcentrifuga.
- Cubeta de precipitación.
- Pipetas.
- Bandeja o recipiente que pueda contener una membrana de 7x7 cm y 100 ml de líquido.
- Guantes desechables.
- Envoltorio de plástico.
- Tijeras.
- Etanol 95 o 100%.
- Vinagre Blanco.
- Agua destilada.
- Regla métrica.
- Probetas.
- Toallas de papel.

3. INTRODUCCIÓN

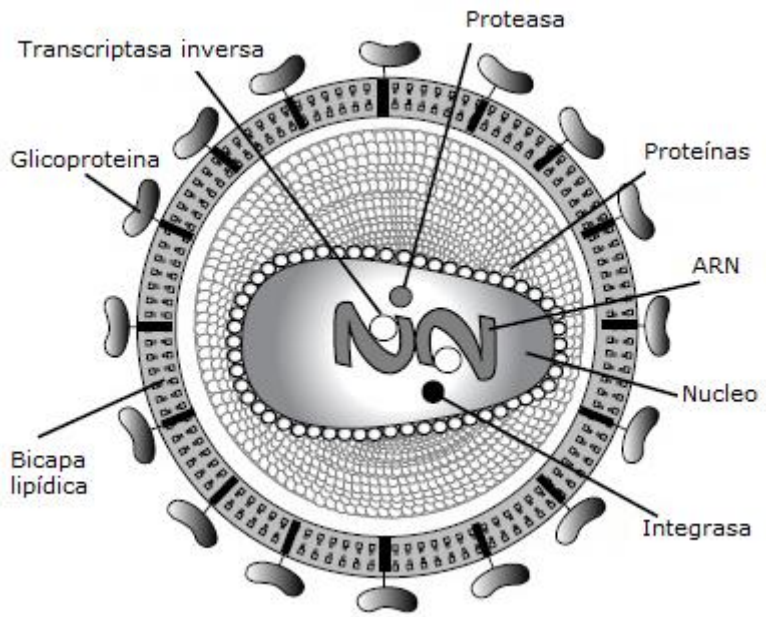
El Síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) es una enfermedad caracterizada por el deterioro progresivo del sistema inmune de un individuo. El deterioro inmunológico permite que los agentes infecciosos, como virus, bacterias, hongos y parásitos que invaden el cuerpo y se propaguen. Además, la incidencia de ciertos tipos de cáncer aumenta dramáticamente en estos pacientes debido a tener su sistema inmune comprometido. El SIDA es una seria amenaza para la salud humana y es un problema global. La investigación intensiva se está haciendo para avanzar en los métodos de detección, tratamiento clínico y la prevención.

El virus del VIH

El agente etiológico del SIDA es el virus inmunodeficiencia humano tipo 1 (VIH-1), un retrovirus. El VIH-1 contiene un genoma de ARN y una DNA-polimerasa ARN-dependiente denomina transcriptasa inversa. Los miembros de la familia de los retrovirus están involucrados en la patogénesis de ciertos tipos de leucemias y otros sarcomas en los seres humanos y animales. La estructura y el mecanismo de replicación del VIH son muy similares a otros retrovirus. El VIH es único en algunas de sus propiedades, ya que específicamente actúa sobre el sistema inmunológico, es muy inmunoevasivo, forma cantidades significativas de virus in vivo durante las etapas iniciales de la infección y pueden ser transmitidos durante la actividad sexual.

La partícula viral del VIH está rodeada de una bicapa lipídica derivada de la membrana celular del huésped. Las proteínas virales son identificadas por el prefijo GP (glicoproteína) o P (proteína) seguido de un número que indica el peso molecular aproximado, en kilodaltons. La bicapa lipídica contiene gp120 y gp41. Estas dos proteínas son productos proteolíticos de la precursora gp160. La gp41 ancla la gp120 en la bicapa. La proteína gp120 se utiliza habitualmente como un marcador de diagnóstico del VIH en el análisis de Western Blot. Más recientemente, también se han incluido otras glicoproteínas virales como marcadores para esta prueba. Debajo de la bicapa hay una cápside formada por p17 y p18. Dentro de esta cápside se encuentra el

núcleo del virus. Las paredes del núcleo están formadas por p24 y p25. Dentro del núcleo hay dos moléculas idénticas de ARN, de 9800 nucleótidos de longitud. Los puentes de hidrogeno que unen las dos moléculas de ARN se forman a partir de una molécula de tRNA celular. El ARN viral está recubierto por moléculas de p7 y p9 fuertemente unidas. El núcleo también contiene, aproximadamente, 50 moléculas de transcriptasa inversa.



Hay varias proteínas virales cuya función exacta no se comprende totalmente. El virus puede hacerse crecer en cultivos de tejidos para el diagnóstico y la investigación. Varias de las proteínas virales han sido clonadas y obtenidas en cantidades relativamente grandes.

Un individuo puede recibir un inoculo de VIH a través de una abrasión en la mucosa superficial (por ejemplo, de genitales y paredes del recto), una transfusión de sangre, o por inyección intravenosa con una aguja contaminada. Los virus o las células infectadas por virus se encuentran en los fluidos corporales, como el semen y la sangre. El objetivo más importante para el virus son las células hematopoyéticas, como los monocitos, mielocitos y linfocitos derivados de la médula ósea. La infección de las células efectoras del sistema inmunitario, tales como las células T y los macrófagos, tiene en última instancia consecuencias clínicas muy importantes. La gp120 se une a los receptores CD4 en la superficie de células T "helper" (TH). Estos receptores son glicoproteínas unidas a la membrana que participan en la activación de células T. En condiciones normales CD4 actúa como un receptor de membrana para el complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC II) uniéndose a moléculas que están presentes en la superficie de los macrófagos y otros tipos de células. Las células TH son necesarias para las respuestas inmunológicas del cuerpo en general. La bicapa lipídica de los virus se fusionan con la de las membranas de las células y la cápside de proteínas virales pasa al interior de la célula por endocitosis. Después, la presencia de receptores CD4 disminuye y las gp120 aparecen en la superficie de la célula T. A través de un mecanismo complejo, la transcriptasa inversa sintetiza una copia de ADN de doble cadena a partir del ARN genómico. La molécula de ARNt actúa como cebador de la síntesis de la primera cadena. La actividad ARNasa H de la transcriptasa inversa degrada la cadena de ARN de la doble cadena ARN-ADN y la enzima sintetiza una hebra de ADN

complementario. Las transcripciones inversas de ADN (ADN de doble cadena) migran hacia el núcleo de la célula donde se integran de forma covalente en el ADN genómico celular. La integración es catalizada en parte por las proteínas virales. La copia de ADN se integra mediante una vía específica, las secuencias de auto-conexión en ambos extremos se llaman repeticiones terminales largas (LTR). Estas secuencias también tienen funciones importantes en la transcripción viral. El ADN copiado e integrado se denomina material de ADN o provirus. El provirus entra en un período de latencia que puede durar varios años. El ADN proviral se replica junto con el ADN celular y puede ser heredada a través de muchas generaciones de células. El ADN proviral del VIH contiene los principales genes no transduccidos comunes a todos los retrovirus. Estos genes son gag, pol y env. VIH-1 también contiene cinco o seis genes más pequeños.

A diferencia de otras ADN polimerasas celulares, ADN polimerasa del VIH (transcriptasa inversa) tiene una alta tasa de errores. Estas frecuentes mutaciones cambian continuamente los epítopos de proteínas virales. Esto, se cree que es el principal mecanismo de immunoevasion del VIH. El gen gag se traduce en un polipéptido que se escinde por una proteasa viral en cuatro proteínas que forman las capas internas. La proteasa está codificada en el gen pol. El gen pol codifica la transcriptasa inversa y la integrasa, que es responsable de la incorporación genómico de la copia de ADN. El gen env codifica las glicoproteínas de superficie que las partículas virales adquieren a medida que infectan las células. La replicación viral es la causa de la destrucción de las células TH.

La técnica de ELISA es un importante método inmunoquímico utilizado para la detección de antígenos que se encuentran en niveles bajos. El ELISA se utiliza en la detección clínica del VIH en muestras de sangre. La técnica de ELISA para VIH detecta IgG circulantes del paciente dirigidos hacia los antígenos virales. Una reacción positiva en el ELISA requiere de otra prueba para su verificación definitiva, se realizaría mediante un Western Blot. El motivo para realizar esta prueba de verificación es que los anticuerpos pueden presentar a veces reacciones cruzadas.

Propiedades de las proteínas

La electroforesis en gel desnaturalizante SDS separa las proteínas en función de su tamaño. El SDS (dodecilsulfato de sodio) es un detergente que consiste en una cadena de hidrocarburo unida a un grupo sulfato altamente cargado negativamente. El SDS se une con fuerza a la mayoría de las proteínas y hace que la cadena se desenrolle en forma de varilla y tengan carga negativa neta. En ausencia de un agente desnaturalizante, como el 2-mercaptoetanol, los enlaces no covalentes se rompen en este proceso, aunque la composición de aminoácidos y la secuencia sigue siendo las mismas. Al perder la proteína su forma tridimensial también perderá su actividad biológica.

Las proteínas que han perdido su patrón de plegado especifico y su actividad biológica pero mantienen intactas sus cadenas de polipéptidos se llaman desnaturalizadas. Las proteínas que contienen varias cadenas de polipéptidos que tienen enlaces no covalentes serán disociadas por el SDS en cadenas polipeptídicas separadas, desnaturalizadas. Las proteínas pueden contener enlaces cruzados covalentes conocidos como uniones o puentes de disulfuro. Estos puentes están formados entre dos residuos de aminoácidos de cisteína que pueden estar localizados en la misma o en diferentes cadenas de polipéptidos. El tratamiento de proteínas a 100°C durante 3 minutos en presencia de altas concentraciones de agentes reductores, como el 2-mercaptoetanol,

romperá los enlaces disulfuro. Esto permite al SDS disociar completamente y desnaturalizar la proteína.

Durante la electroforesis, las proteínas desnaturalizados con SDS migran a través del gel hacia el electrodo positivo a una velocidad que es inversamente proporcional a su peso molecular. Es decir, cuanto menor es la proteína, más rápido migra en el gel. El peso molecular de una proteína desconocida se obtiene al comparar su posición con respecto a la de las proteínas estándar desnaturalizadas con SDS después de realizar la electroforesis.

Análisis por Western Blot

El análisis por Western Blot implica la transferencia directa de bandas de proteínas a partir de un gel de agarosa o de poliacrilamida a una membrana de nailon cargada, para su análisis posterior. Después de la electroforesis, el gel se retira de la cubeta y la membrana de nailon se coloca directamente sobre el gel (las membranas de nailon son mucho más fuertes y flexibles que los geles y puede someterse a muchas manipulaciones sin desgarrarse.) Las bandas de proteínas se transfieren a la superficie de la membrana de nailon y se adsorben sobre la membrana por enlaces hidrófobos. Esta transferencia se logra por electroforesis en cámaras especialmente diseñadas, por flujo capilar o por la aplicación de vacío.

La proteína total transferida se puede visualizar con la tinción de la membrana con tintes de proteínas. La visualización de una proteína específica dentro de una mezcla de proteínas se detecta normalmente por métodos inmunoquímicos. Pero una proteína no puede ser detectada por tinción cuando su cantidad es demasiado baja o si queda encubierta por el resto de las bandas de la mezcla de proteínas.

Para la detección inmunológica de la proteína específica, se coloca una membrana sin teñir en un tampón de bloqueo, que contiene detergente y proteína que se unen a todos los sitios no ocupados sobre la membrana de nailon. La membrana se incuba después en un tampón que contiene anticuerpos a una (o más) de las proteínas buscadas.

El anticuerpo se une a la proteína adsorbida (antígeno) y los lavados posteriores eliminan los anticuerpos no unidos. Un anticuerpo secundario que esta covalentemente ligado a un enzima, como fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano picante, se utiliza para la detección. Las condiciones para unir el enzima y el anticuerpo secundario no afecta la especificidad de unión con el antígeno, la afinidad del anticuerpo, o la actividad catalítica de la enzima.

La membrana se incuba a continuación en una solución de anticuerpo secundario, en donde se unirá selectivamente al complejo antígeno-anticuerpo primario. Después de este tratamiento, la membrana se lava para eliminar el complejo anticuerpo secundario-enzima no unido y se incubara en una solución que contiene un sustrato de fosfatasa o peroxidasa. Los productos obtenidos de la reacción enzimática son productos cromogénicos fácilmente visibles sobre la membrana de nailon.

En esta práctica, los estudiantes utilizarán un análisis por Western Blot modificado para detectar una proteína específica.

4. PREPARACIÓN DE LA PRÁCTICA

El objetivo de este experimento es entender los conceptos y metodología involucrados en la técnica de Western Blot. El experimento prueba la presencia de proteínas virales simuladas obtenidas a partir de cultivos de células infectadas con un hipotético suero de individuos seropositivos al VIH.

NOTA: ESTE EXPERIMENTO NO CONTIENE NINGUN MATERIAL PREPARADO A PARTIR DE FUENTES HUMANAS O DE VIRUS.

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/o 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. Tenga cuidado al usar cualquier equipo eléctrico en el laboratorio.

4.2 Preparaciones previas

A. PREPARACIÓN DE LAS MEMBRANAS

En cualquier momento antes de la práctica en el laboratorio (necesario primer día).

1. Use guantes de laboratorio. Con los guantes puestos, lávese las manos y séqueselas. Los polvos de los guantes pueden interferir con el procedimiento.
2. Mantenga las membranas cubiertas por las hojas protectoras y asegúrese de que las hojas protectoras y la membrana están alineadas. Mantener la membrana cubierta de este modo durante todos los pasos siguientes.
3. Si usted está trabajando con geles más pequeños de 7 x 7 cm, se deberá adaptar el tamaño de las membranas, papel de filtro para la transferencia y toallas de papel al tamaño exacto de su gel para asegurar una óptima transferencia.

B. PREPARACIÓN DE TAMPONES

El día de la práctica.

Tampón para la preparación del gel (Tampón Tris-glicina)

Solo se utiliza para la preparación de gel.

1. Añadir el polvo del tampón Tris-glicina a un matraz o vaso (500ml tamaño o más grande).

2. Añadir 300 ml de agua destilada al polvo del tampón Tris-glicina. Remover y mantener la agitación hasta disolver completamente polvo del tampón Tris-glicina (utilizar una plataforma de agitación si dispone de una). Este es el **Tampón 1x de Tris-glicina**, listo para su uso en la preparación del gel(es).

Tampón de transferencia

(Necesario el primer día).

1. En 350 ml de agua destilada, añadir 50 ml de **Tampón 10x de Tris-glicina-SDS**.

2. Añadir 100 ml de 95-100% de **Etanol**. Mezclar. Mantenga el tampón bien tapado a temperatura ambiente hasta su uso.

Tampón de electroforesis (Tampón Tris-glicina-SDS)

1. Añadir 1 parte de **Tampón 10x EDVOTEK® Tris-glicina-SDS** a 9 partes de agua destilada.

2. Hacer suficiente **Tampón de electroforesis 1x** para todas las unidades de electroforesis utilizadas.

C. PREPARACIÓN DE MUESTRAS DE PROTEÍNA LIOFILIZADAS

El día de la práctica (necesario el primer día).

1. Añadir 130 µl de agua destilada a cada tubo (A-E). Se incuban las muestras a temperatura ambiente durante 5 minutos. Agitar con vórtex o mezclar vigorosamente.

2. Calentar un vaso con agua, cubierto con papel de aluminio, hasta que hierva. Retirarlo de la fuente de calor.

3. Asegúrese de que los tubos de muestra (de A a E) están tapados herméticamente y bien marcados. Empujado a través de la lámina los tubos, de forma que la parte inferior de los tubos quede sumergido en el agua durante 5 minutos. Los tubos deben mantenerse suspendido en el agua por el papel de aluminio.

NOTA: No debe poner en el agua caliente el marcador estándar de peso molecular (componente F).

4. Retire las muestras del agua, y golpe el tubo sobre la poyata o de un pulso breve con la microcentrífuga para depositar la totalidad del líquido de la muestra en el fondo del tubo.

5. Alicuotar 20 µl de cada muestra (A-E) y el marcador estándar para cada grupo de prácticas. Haga que los estudiantes carguen las muestras en el gel mientras están todavía calientes para evitar la agregación.

NOTA: Cualquier resto de las muestras reconstituidas no utilizado se debe almacenar a -20°C. Si posteriormente necesita volver a utilizar estos restos de muestras, repita los pasos 2 a 4.

D. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE TINCIÓN
Varios días antes de la práctica o el mismo día de la práctica (necesario el segundo día).

1. Preparar la Solución de Tinción, añadir 400 ml de **vinagre blanco*** y 200 ml de **etanol.** Mezclar bien. Etiquetar como "**Solución de Tinción/Destinción**". Mantenerlo bien tapado a temperatura ambiente hasta su uso.

*El vinagre blanco se utiliza para cocinar o limpiar y es fácil de encontrar, es similar al ácido acético con concentración 5-8 % y pH 2.6.

2. Añadir 100 ml de Solución de Tinción/Destinción al bote de FlashBlue Protein Stain. Agitar para mezclar. Añadir a un nuevo vaso o botella y añadir 80 ml adicionales de Solución de Tinción. Agitar para mezclar bien.

3. Conservar ambas soluciones a temperatura ambiente hasta que se necesiten.

4. Alicuotar 60 ml de Solución de Tinción/Destinción y 30 ml de Solución FlashBlue a cada grupo.

4.4 Errores más comunes

Los problemas potenciales que pueden aparecer es posible evitarlos siguiendo las sugerencias y recordatorios que figuran a continuación:

- Para asegurarse que las bandas de proteínas están bien definidas, asegúrese de que la formulación del gel es correcta y que la electroforesis se llevó a cabo durante el tiempo óptimo recomendado.

- Diluir el tampón concentrado correctamente para la preparación del gel y del tampón de electroforesis (utilizado en la cubeta). Recordar que sin tampón en el gel, no habrá la movilidad de la proteína. Utilice agua destilada para preparar tampones. No utilice agua del grifo.

- Para obtener resultados óptimos, utilice tampón de electroforesis y solución de tinción nuevos y preparados de acuerdo con las instrucciones.

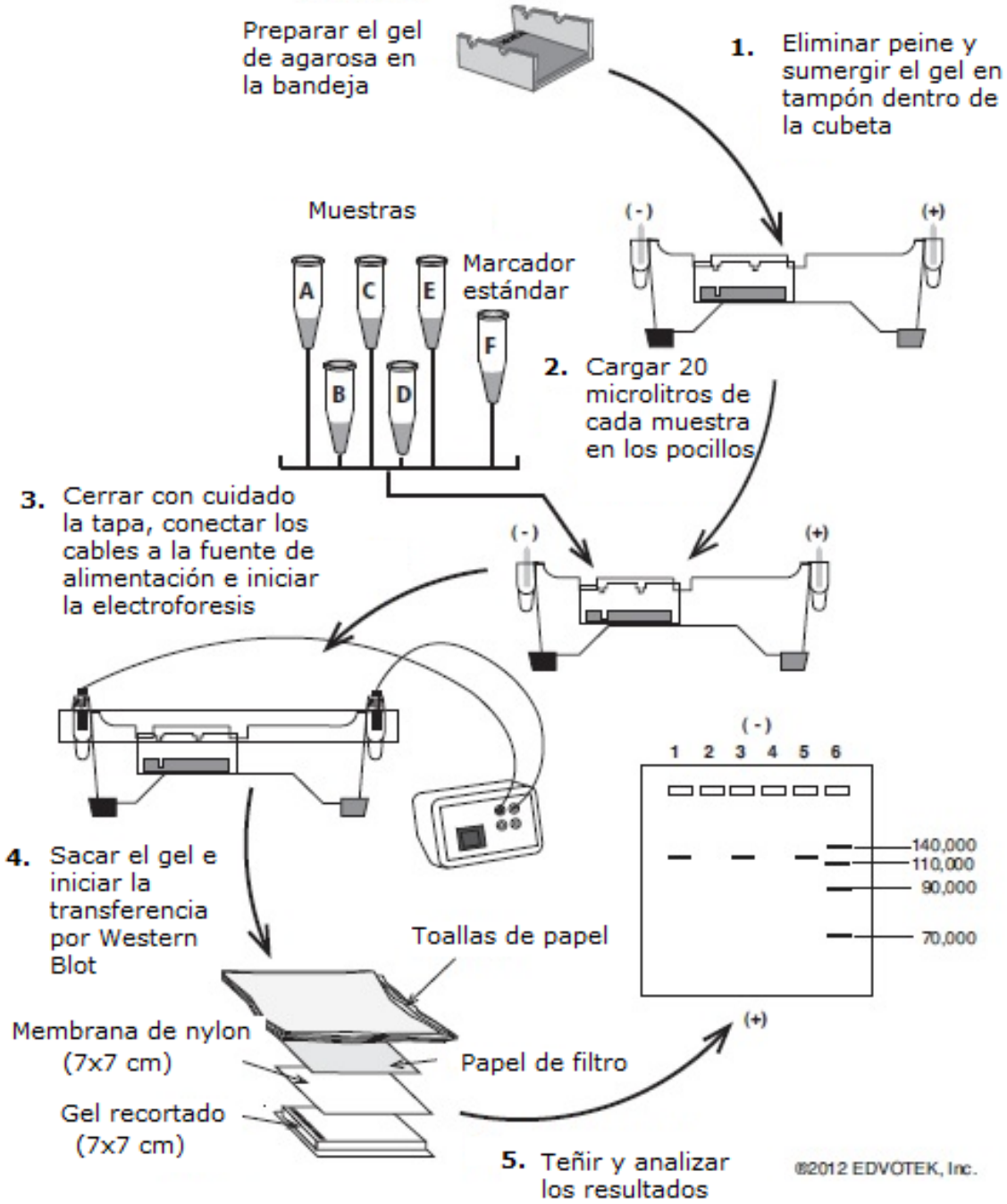
- Antes de realizar la carga de las muestras en el gel, practicar la carga para evitar la dilución de las muestras con tampón durante la carga.

- Para evitar la pérdida de las bandas de proteínas en el tampón, asegúrese de que el gel se orienta correctamente para que las muestras no corran por el gel en la dirección equivocada durante la electroforesis.

- El marcador estándar utilizado en esta práctica es un colorante que no se transferirá a la membrana. Debe marcarse sobre la membrana antes de realizar la transferencia.

5. PRÁCTICA

Descripción general de la práctica



5.1 Electroforesis en gel de agarosa

NOTA: Cuando se prepara el gel de agarosa al 2,5% de proteína, asegúrese de usar el 1x tampón Tris-glicina preparada por el profesor (**NO UTILIZAR el Tampón 1x Tris-glicina-SDS como tampón en la realización del gel**).

A. PREPARACIÓN DEL GEL DE AGAROSA AL 2,5%.

1. Determinar el volumen de agarosa requerido para su gel de agarosa al 2,5% en **Tampón 1x Tris-glicina**. Consulte la Tabla A para determinar volumen que necesita.

Tabla A: gel de agarosa 2.5%			
Tamaño del gel	Peso agarosa +	Volumen Tampón 1X Tris-Glicina	= Volumen Total
7 x 7 cm	0.6 gr	29.4 ml	30 ml
14 x 7 cm	1.2 gr	58.8 ml	60 ml

2. Añadir la cantidad requerida de agarosa en polvo al volumen de **Tampón 1x Tris-glicina**. Agitar para dispersar grumos.

3. Con un marcador, indican el nivel del volumen de solución en el matraz.

4. Calentar la mezcla para disolver el polvo de agarosa. La solución final debe quedar clara (como el agua), sin ninguna partícula sin disolver presentes.

a. Método de microondas:
- Cubrir el matraz sin apretar con una envoltura de plástico para minimizar la evaporación. No cubra herméticamente.
- Se calienta la mezcla durante 1 minuto.
- Agitar la mezcla y calentar en intervalos de 25 segundos hasta que toda la agarosa se disuelva por completo.

b. Método de la placa calefactora:
- Cubrir el matraz con papel de aluminio para minimizar la evaporación.
- Se calienta la mezcla a punto de ebullición con agitación ocasional. Hervir hasta que la agarosa se disuelva completamente.

5. Enfriar la agarosa a 55 ° C con agitación para facilitar una disipación uniforme del calor. Si se ha producido una evaporación elevada, añadir agua destilada caliente para llevar el volumen de la solución hasta el volumen original marcado en el matraz.

Después de que la solución de agarosa se ha enfriado a 55 ° C:

6. Sellar los extremos de la bandeja del gel con topes de goma o cinta.

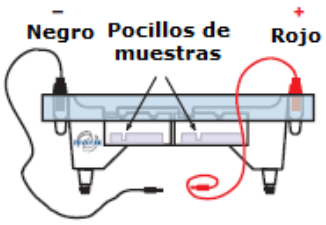
ATENCIÓN: fundir la agarosa en polvo a temperaturas demasiado altas o sin agitación dará lugar a una solución de agarosa quemada.

7. Verter la solución de agarosa enfriada en la bandeja. Asegurarse que la bandeja del gel de agarosa se encuentra sobre una superficie plana. Colocar el peine(s) en las ranuras correspondientes.

8. Deje que el gel se solidifique. Estará listo para la electroforesis en aproximadamente 20 minutos.

B. PREPARACIÓN DE LA CUBETA DE ELECTROFORESIS

1. Retire el peine(s) y los topes o cintas. Coloque la bandeja de gel en la cubeta de electroforesis con los pozos más próximos al electrodo negativo.



2. Cubra el gel preparado con Tampón de electroforesis 1x Tris-glicina-SDS. Consulte la Tabla B para determinar el volumen de tampón necesario.

Tabla B: Tampón de electrooforesis 1x Tris-Glicina-SDS

EDVOTEK Model #	Tampón Concentrado (10x)	+ Agua Destilada	= Volumen Total
M6+	30 ml	270 ml	300 ml
M12	40 ml	360 ml	400 ml
M36	100 ml	900 ml	1000 ml

C. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS DE PROTEÍNAS

Las muestras para electroforesis se envían en forma de polvo liofilizado (muestras liofilizadas).

- Si las muestras A-E ya se han rehidratado y calentado por el profesor del laboratorio, continuar el procedimiento con la electroforesis en gel de agarosa como se describe en el apartado D.
- Si las muestras A-E no se han rehidratado y calentado por el profesor del laboratorio, siga el procedimiento de calentamiento (Pasos 1-2) para calentar las muestras.

1. Calentar un vaso de agua, cubierto con papel de aluminio, hasta que hierva. Retirarlo de la fuente de calor.

2. Asegúrese de que los tubos de muestra A a E se han rehidratado y están bien tapados y marcados claramente. La parte inferior de los tubos debe ser empujada a

través del papel de aluminio y sumergida en el agua hirviendo durante 5 minutos. Los tubos deben mantenerse suspendidos por el papel de aluminio.

3. Proceder a cargar el gel mientras que las muestras están todavía calientes.

NOTA: Al finalizar la carga de las muestras para la electroforesis, el resto de las muestras de proteínas no usado se debe congelar. Para volver a utilizar las muestras en otro momento, sáquelas del congelador y siga los pasos 1-3 descritos arriba.

D. CARGA DE LAS MUESTRAS DE PROTEÍNA

NOTA: Este kit contiene un gel de prácticas. Si no está familiarizado con la electroforesis en gel, se sugiere que practique la carga de las muestra en los pocillos antes de realizar la práctica real.

NOTA: Cambiar las puntas de pipetas entre cada carga. Asegúrese de que los pocillos estén libres de solución de carga. Use guantes y gafas de seguridad.

Cargar 20 µl de cada una de las muestras de proteína de la manera siguiente (en gel de 7 x 7 cm):

Pocillo	Tubo	Muestra de proteína
1	A	Control positivo
2	B	Control negativo
3	C	Paciente 1
4	D	Paciente 2
5	E	Paciente 3
6	F	Marcador estándar

E. ELECTROFORESIS EN GEL

1. Después de que las muestras se carguen, encaje con cuidado la tapa hasta el fondo permitiendo el acceso a los terminales de los electrodos.

2. Inserte la clavija del cable negro en la entrada negra de la fuente de alimentación (entrada negativa). Inserte la clavija del cable rojo a la entrada roja de la fuente de alimentación (entrada positiva).

3. Establecer la alimentación eléctrica en el voltaje requerido y ejecutar la electroforesis durante el período de tiempo determinado por el profesor (tabla C). Para saber si el flujo corriente es correcto, debería ver las burbujas que se forman en los electrodos.

4. Proceder a electroforesis hasta que el colorante azul del tampón de carga se ha desplazado al menos 4–4,5 cm de los pocillos. Proceder a iniciar la técnica de Western Blot.

Tabla C: Voltajes y Tiempo		
Voltios	Mínimo	Máximo
150	20	45
125	25	55
100	30	60

5.2 Análisis por Western Blot

Usar guantes. No toque la membrana de nailon con las manos sin proteger.
Use guantes de laboratorio. Con los guantes puestos, lávese las manos y séqueselas. Los polvos de los guantes pueden interferir con el procedimiento

1. Coloque un envoltorio de plástico en su mesa de trabajo. Asegúrese de que esté liso y plano. El papel de filtro, gel, membrana y toallas de papel se preparan para hacer el sándwich secante.

2. Usando los guantes, retire con cuidado las hojas protectoras (blancas) de la membrana de Western Blot. Usando pinzas, transferir la membrana a una bandeja de plástico.

3. Pre-hidratar la membrana (7 x 7 cm) por inmersión en aproximadamente 20 ml de 95-100% de metanol durante 10 segundos. Recoger y guardar el metanol una vez utilizado para volver su reutilización.

4. Inmediatamente, sumergir la membrana en agua destilada durante aproximadamente 5 minutos para eliminar el metanol.

5. Desechar el agua y sumergir la membrana en tampón de transferencia diluido. Deje la membrana sumergida hasta que la necesite para el gel, por lo menos 10 minutos.

6. Retire el gel de la bandeja y sumerja el gel en una bandeja separada que contenga el tampón de transferencia. Dejar en remojo de 10 a 15 minutos.

7. Saturar 1 pieza de 7 x 7 cm de papel de filtro con el tampón de transferencia. Colocar el papel de filtro en la envoltura de plástico.

8. Usando guantes, retirar con cuidado el gel del tampón de transferencia y colocar boca abajo sobre el papel de filtro. Pasar una regla (o cualquier otro objeto apropiado) sobre la superficie para eliminar las burbujas de aire que puedan estar atrapadas bajo el gel.

9. Pipetear 1-2 ml de tampón de transferencia sobre la parte superior del gel y colocar la membrana Western Blot sobre el gel.

NOTA: Si la membrana parece tener una superficie lisa en un lado y una superficie rugosa en el otro lado, asegurarse de que la rugosa está en contacto directo con el gel. Pasar una regla (o cualquier otro objeto apropiado) sobre la superficie para eliminar las burbujas de aire.

10. Use un lápiz para trazar ligeramente la ubicación de cada una de las bandas del carril 6. Al lado de cada marca, indicar el color de la banda respectiva. (B1= azul 1, B2= azul 2, P= púrpura y R= rojo).

11. Saturar 1 trozo de papel de filtro con tampón de transferencia y cubrir la membrana con el papel de filtro húmedo. Pasar una regla (o cualquier otro objeto apropiado) sobre la superficie para eliminar las burbujas de aire.

12. Añadir la segunda pieza de papel de filtro seco en la parte superior de la pila. Eliminar las burbujas de aire.

13. Uniformemente colocar una pila de toallas de papel (7 x 7 cm) con un espesor de 4 a 6 cm en la parte superior de la pila.

14. Colocar una bandeja de plástico o placa en la parte superior de la pila. Coloque un vaso de precipitados de peso ligero (tamaño 400 ml) en la parte superior. **Deje que la proteína de transferencia actúe durante un mínimo de 4 horas o durante toda la noche.**

PROCESAMIENTO Y TINCIÓN DE LA MEMBRANA BLOT

NOTA: Las áreas de la membrana tocadas por manos sin guantes dejarán residuos de aceites y proteínas que no permitirán la unión de otras proteínas durante la transferencia. Muchos guantes contienen polvo que aumentará el fondo en la membrana. Póngase los guantes y lavase las manos con ellos puestos con agua del grifo para eliminar cualquier residuo de polvo.

RECUERDE: La prueba de diagnóstico Western Blot del VIH/SIDA establece la presencia de la proteína de la cubierta viral gp120 por la interacción de anticuerpos y también confirma el tamaño de la banda de proteína a ser 120.000 daltons ± 10%. En este experimento, **no se utiliza** material derivado de personas o virus VIH/SIDA.

1. Retire la bandeja, toallas de papel y papel de filtro cocados sobre la membrana. Deje la membrana en su sitio sobre el gel.

2. Utilizando un lápiz, trazar el contorno de cada pocillo ligeramente y el número que le corresponde de acuerdo con la secuencia de carga (recuerde que el gel está al revés).

3. Con unas pinzas, retirar la membrana del gel y colocarlo en una hoja limpia de papel de filtro. El lado que estaba en contacto con el gel debe estar hacia arriba.

4. Con un lápiz, en una de las esquinas inferiores escribir "D" (delante). En la otra esquina, escriba su número de grupo o iniciales. Colocar la membrana en un horno de incubación a 65 ° durante 10 minutos, para fijar las muestras.

PUNTO DE PARADA OPCIONAL: Después que la membrana se ha fijado, se puede guardar durante varios días antes de su tinción.

Tinción de la Membrana

1. Coloque la membrana en un recipiente poco profundo con la parte frontal etiquetada hacia arriba.

2. Añadir 30 ml de la Solución FlashBlue. La membrana debe estar completamente cubierta por el líquido.

3. Incubar la membrana durante 5 minutos a temperatura ambiente. Agitar ocasionalmente.

4. Eliminar la Solución FlashBlue.

5. Lavar la membrana llenando parcialmente el recipiente con agua destilada y balanceando suavemente la membrana hacia adelante y hacia atrás varias veces. Eliminar el agua utilizada y repetir este proceso 1 o 2 veces más con agua destilada nueva.

6. Añadir 30 ml Solución Tinción/Destinción a la membrana.

7. Deje la membrana en remojo en el líquido durante 15 minutos con agitación ocasional. Si se desea más contraste entre las bandas y el background, eliminar la Solución de Tinción/Destinción y añadir otros 30 ml adicionales. Incubar otros 15 minutos a temperatura ambiente hasta que la apariencia mejore.

8. Retirar la membrana de la solución y dejarla sobre un trozo de papel de filtro.

9. Comparar las tres muestras de pacientes con los controles positivos y negativos.

Estimación del peso molecular de la proteína viral simulada gp120

1. Medir la distancia de cada banda del marcador estándar y de las muestras virales positivas sobre la membrana. Cada medición debe ser desde la base del pocillo hasta la base de cada banda.

   Los tamaños de los marcadores estándar son (en Daltons):

Azul 1	140000
Azul 2	110000
Purpura	90000
Rojo	70000

2. Utilizando un papel de gráfico semilogaritmico registrar la distancia recorrida por cada banda en el eje x y su peso molecular en el eje y.

3. Determinar el peso molecular de la proteína viral por extrapolación con la curva estándar.

6. RESULTADOS DEL EXPERIMENTO

Las muestras que contienen la proteína del VIH simulado y el control positivo deben mostrar una banda de proteína de 120000 daltons. Las pacientes 1 y 3 muestran las bandas de 120000 daltons, lo cual significa que estos pacientes están infectados por el VIH. El control negativo y el paciente 2 no deben tener ninguna banda visible.

El esquema de la figura 2 muestra las posiciones relativas de las bandas de proteína, pero no está dibujada a escala. El peso molecular de la glicoproteína viral para el control positivo y los pacientes positivos se puede extrapolar a partir de la curva estándar. Los estudiantes deben trazar la distancia, en milímetros, recorrida por cada una de las proteínas estándar en el eje X y los pesos moleculares respectivos en el eje Y en un papel semi-logarítmico.

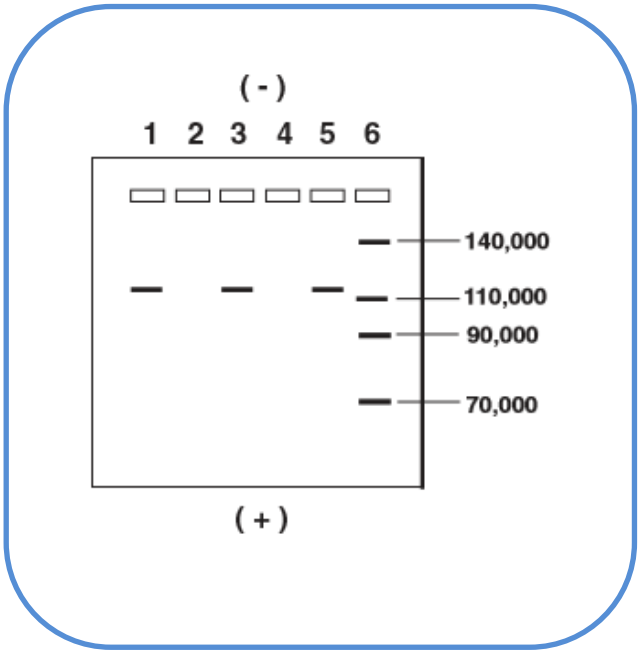


Figura 2

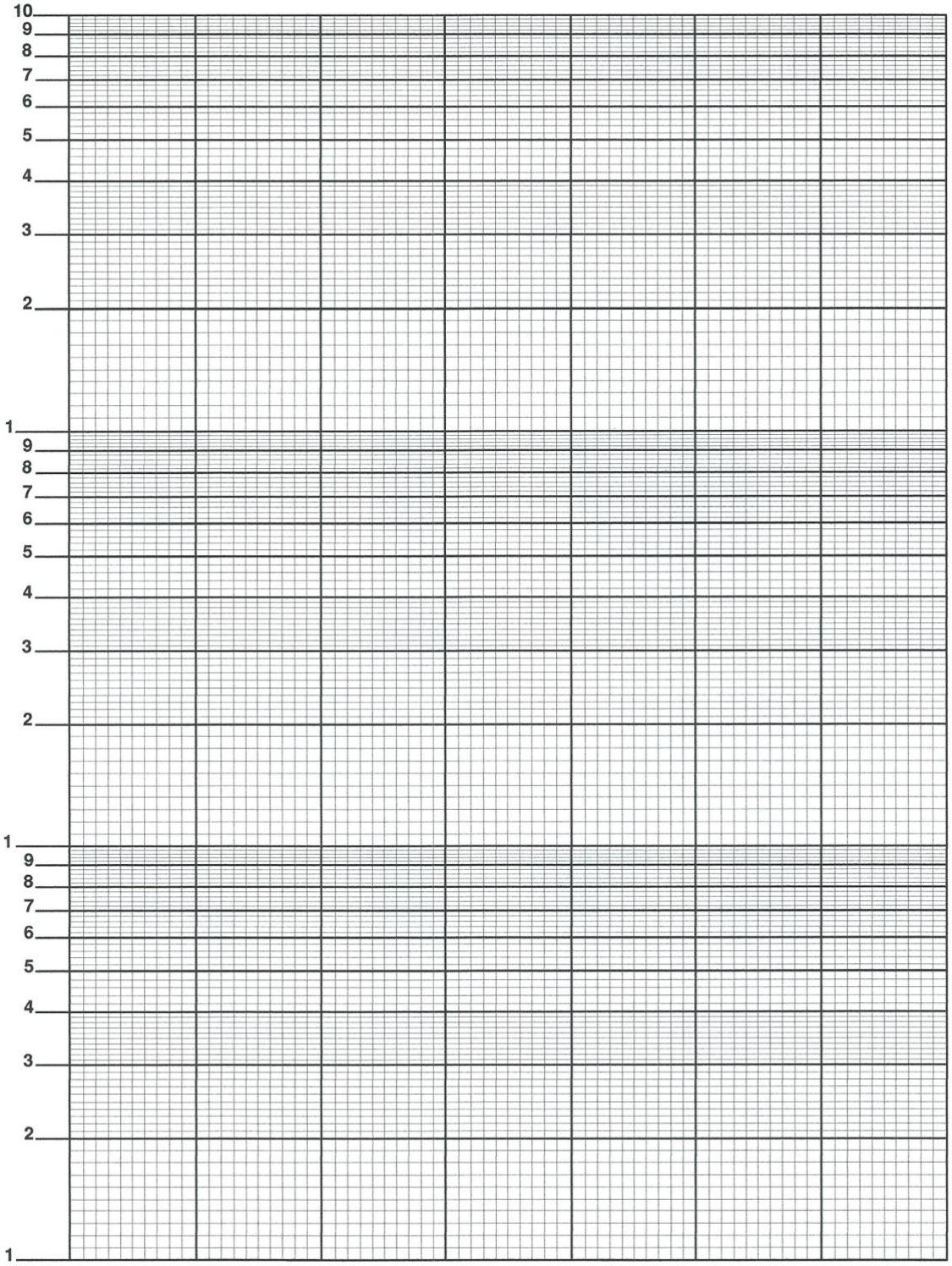
Carril	Muestra		Peso molecular (daltons)	Resultado
1	A	Control positivo	120.000	
2	B	Control negativo		
3	C	Paciente #1	120.000	positivo
4	D	Paciente #2		negativo
5	E	Paciente #3	120.000	positivo
6	F	Marcador estándar		
		B-1 (azul 1)	140.000	
		B-2 (azul 2)	110.000	
		P (púrpura)	90.000	
		R (Rojo)	70.000	

7. PREGUNTAS SOBRE EL EXPERIMENTO

1. ¿Por qué las proteínas separadas por electroforesis se transfirieren a una membrana para su detección?

2. ¿Los geles con una mayor o menor concentración de agarosa favorecen la transferencia a la membrana? ¿Un mayor o menor peso molecular de las proteínas favorece una mejor transferencia a la membrana?

3. ¿Cuál es el propósito de los controles negativos y positivos? ¿Cuál es la diferencia entre un Westhern Blot, un Northern Blot y un Southern Blot


10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
9
8
7
6
5
4
3
2
1
9
8
7
6
5
4
3
2
1