

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 a -20 °C
Muestra Control Negativo B	Congelador a -20 °C
Muestra Control Positivo C	Congelador a -20 °C
Muestra Suero Paciente 1 D	Congelador a -20 °C
Muestra Suero Paciente 2 E	Congelador a -20 °C
Muestra Suero Paciente 3 F	Congelador a -20 °C
Tampón de electroforesis Tris-Glicina-SDS (10X)	Temperatura ambiente
Colorante para proteínas FlashBlue™ (en polvo)	Temperatura ambiente
Solución tampón de carga para practicar	Temperatura ambiente
Pipetas de Transferencias	Temperatura ambiente
Microtubos de centrifuga	Temperatura ambiente

2.1. Material requerido y no suministrado

Aparato de electroforesis vertical

Fuente de alimentación de CC

Geles de poliacrilamida SDS al 12 % prefabricados (se recomiendan geles de 12 pocillos)

Micropipeta y puntas

Microondas o placa calefactora

Agua destilada o desionizada

Vasos de precipitados

Papel de aluminio o flotador de espuma para baño María

Vinagre blanco

Etanol (95 % o superior)

Matraz o vaso de precipitados de 750 ml o 1 l

Bandeja de plástico pequeña o navicilla de pesaje grande

Envoltura de plástico

Caja de luz blanca (recomendada)

Plataforma de balanceo (recomendada)

3. INTRODUCCIÓN

ANTECEDENTES

Las proteínas son un grupo diverso de moléculas grandes, o macromoléculas, que realizan muchas de las funciones esenciales en nuestras células. La primera observación de las proteínas se produjo en el siglo XVIII, cuando unos científicos determinaron que eran fundamentales para el mantenimiento de la estructura corporal. Desde entonces, se ha comprobado que las proteínas también desempeñan un papel en muchos procesos celulares, como la motilidad, el transporte y la comunicación. Se estima que en las células de los mamíferos se encuentran entre 2 y 4 millones de proteínas por micrómetro cúbico.

Las proteínas son polímeros compuestos por cientos o miles de moléculas orgánicas más pequeñas, conocidas por el nombre de aminoácidos. Los aminoácidos son moléculas simples que constan de un átomo de carbono central unido a cuatro grupos diferentes: un grupo amino, un grupo carboxilo, un átomo de hidrógeno y una cadena lateral única (Figura 1). El aminoácido más simple, la glicina, tiene un solo átomo de hidrógeno como cadena lateral, mientras que otros aminoácidos presentan cadenas laterales más complejas. Las propiedades químicas de las cadenas laterales determinan la polaridad de cada aminoácido y si este es ácido, básico o neutro.

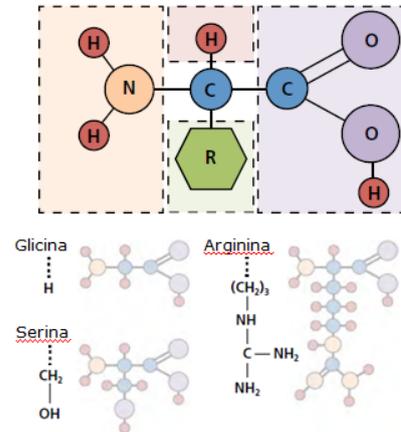


Figura 1. Estructura de los aminoácidos

Durante la síntesis de proteínas, una secuencia específica de aminoácidos se conecta para formar una cadena continua. Los aminoácidos adyacentes en la cadena están unidos entre sí mediante enlaces peptídicos. Estos fuertes enlaces covalentes unen el grupo carboxilo de un aminoácido con el grupo amino de un segundo aminoácido (Figura 2). Una cadena de aminoácidos unidos se conoce como polipéptido, y uno o más polipéptidos se combinan para formar una proteína. La secuencia de aminoácidos confiere a cada proteína propiedades específicas. Por ejemplo, el peso molecular y la carga de una proteína se basan en el número y tipo de aminoácidos, mientras que la forma está determinada por el orden de los aminoácidos. Esta configuración tridimensional, que incluye giros, pliegues e interacciones entre múltiples polipéptidos, es fundamental para la función proteica.

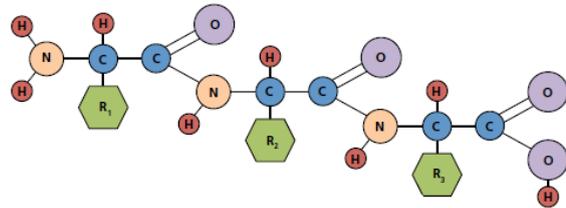


Figura 2. Polipéptido formado por la unión de tres aminoácidos

ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS

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

Para realizar la PAGE, se prepara un gel, se coloca en una cámara de electroforesis y se llena con solución tampón. A continuación, las muestras de proteína se cargan en pequeñas hendiduras, o pocillos, en la parte superior del gel.

Finalmente, se aplica una corriente eléctrica a la caja de gel, impulsando las proteínas cargadas a través del gel hacia el electrodo positivo (Figura 3). El tamaño de poro en los geles de poliacrilamida se controla mediante la concentración del gel y el grado de

reticulación, lo que permite a los investigadores personalizar el gel para satisfacer las necesidades específicas del experimento. A medida que las proteínas migran, son forzadas a atravesar los poros del gel; Las proteínas más pequeñas se adaptan con mayor facilidad que las proteínas más grandes y migrarán más lejos en el mismo periodo de tiempo.

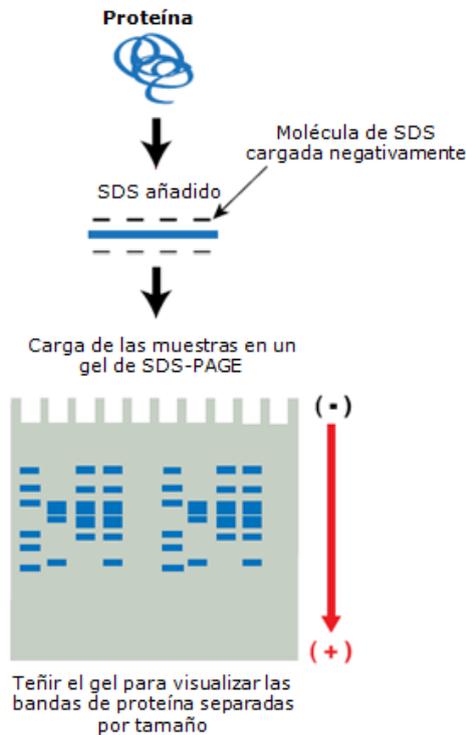


Figura 3. Descripción general de la SDS-PAGE

Desnaturalización de proteínas mediante electroforesis

Proteins produce a unique challenge for electrophoresis because they have complex shapes and different charges, which affect how they migrate through the gel. Structural differences can cause two proteins with similar molecular weights to migrate at different rates a complicated, spread-out protein will move slower through the gel than one with a compact shape. Similarly, positively and negatively charged proteins will migrate in different directions through the electric field in a gel. Scientists can solve these problems by using chemicals that denature the proteins, eliminating the complex structure, and neutralize the charge of the native protein.

Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) is a common detergent used to disrupt interactions between amino acids. The SDS molecule consists of a hydrocarbon chain bonded to a negatively charged sulfate group. When incubated with proteins and heated, SDS will unfold the protein's three-dimensional structure.

To break the stronger disulfide bonds in proteins researchers use reducing agents such as β -mercaptoethanol (β -ME) or Dithiothreitol (DTT). Although the amino acid composition and sequence stay the same, the protein will no longer have biological activity because the specific three-dimensional shape has changed. The prepared protein sample can then be separated on a polyacrylamide gel. This technique is commonly called SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-PAGE).

Detección de proteínas del VIH en muestras de pacientes

El síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) es una enfermedad viral potencialmente mortal causada por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). La infección por VIH suprime el sistema inmunitario del paciente al infectar y destruir las células T auxiliares productoras de anticuerpos. Debido a la falta de inmunovigilancia, los pacientes son extremadamente susceptibles a infecciones por virus, bacterias, hongos y parásitos. Una persona puede contraer el VIH a través de relaciones sexuales 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 y el tratamiento tempranos de los pacientes son esenciales para controlar su propagación y el sufrimiento causado por la enfermedad.

El VIH-1 es un retrovirus, lo que significa que posee un genoma de ARN y una ADN polimerasa dependiente de ARN, denominada transcriptasa inversa.

Esta proteína permite al virus 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 latente durante largos periodos, conocidos como la fase latente de la infección. Durante la producción viral activa, el ADN se transcribe en ARNm, que puede iniciar la producción de proteínas virales.

Las proteínas y el ARN se ensamblan en la superficie de la célula, formando una nueva partícula viral (Figura 4). Finalmente, el virus completo se desprende de la membrana celular y está listo para infectar linfocitos T sanos.

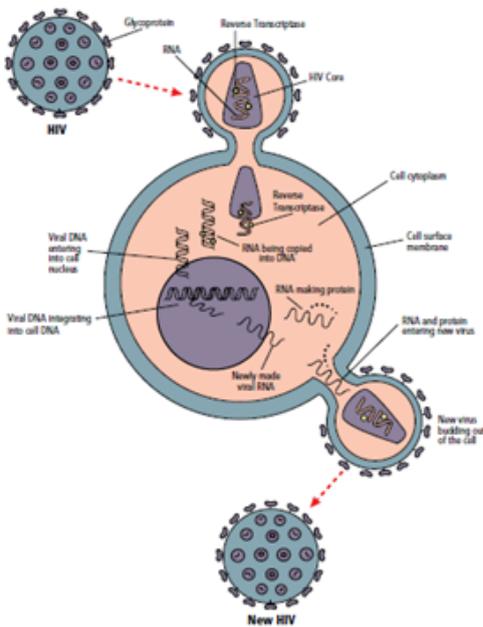


Figura 4. Célula del sistema inmunitario infectada por el virus HIV

Estructuralmente, el virus del VIH presenta una envoltura viral, compuesta por glicoproteínas y una membrana lipídica, y una cápside proteica que rodea dos copias del genoma de ARN (Figura 5). En total, el genoma del VIH codifica 19 proteínas

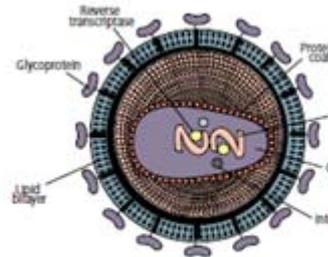
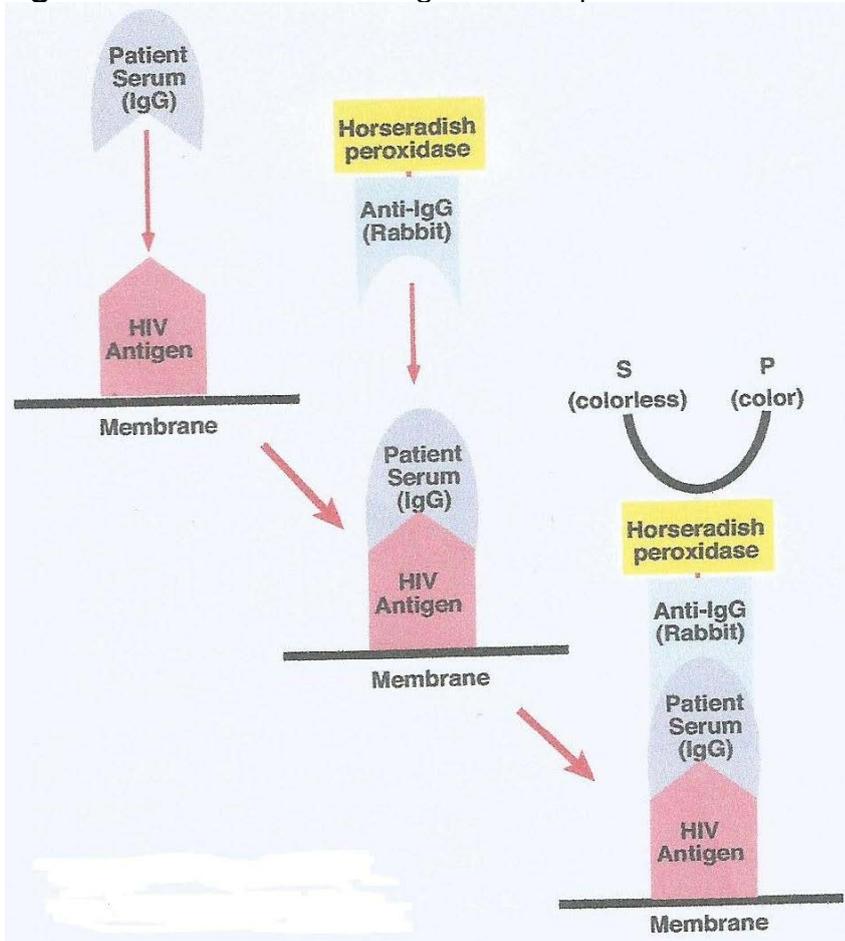


Figura 5. Estructura del virus

necesarias para la estructura, integración, replicación y alteración de la función de la célula huésped del virus.

Figura 6. Detección de antígenos HIV por Western blot



Las infecciones por VIH en pacientes pueden detectarse mediante múltiples métodos. La prueba inicial más común consiste en un inmunoensayo rápido que detecta la presencia de anticuerpos contra el VIH en suero o saliva. Un resultado positivo en la prueba rápida se confirma mediante una segunda prueba, que incluye la detección de ácidos nucleicos y proteínas virales, o la realización de una prueba Western blot para identificar anticuerpos séricos contra el VIH.

Las pruebas Western blot para el VIH son sensibles y económicas, lo que las convierte en uno de los métodos preferidos para confirmar el diagnóstico de VIH. A diferencia del inmunoensayo rápido, la prueba Western blot suele ser realizada por un técnico capacitado y

puede requerir varios días o semanas para obtener los resultados.

Durante la prueba Western blot para el VIH, las proteínas del VIH se separan en un gel SDS-PAGE y luego se transfieren a una membrana para su análisis. A continuación, la membrana se incuba con el suero del paciente, lo que permite que los anticuerpos presentes en la sangre se unan a las proteínas virales. Se lava el suero del paciente y se incuba la membrana con un segundo anticuerpo y un reactivo de detección (Figura 6).

El suero de pacientes infectados contiene anticuerpos contra múltiples proteínas del VIH, incluyendo proteínas de la envoltura, la cápside y las proteínas funcionales (Tabla 1).

Peso molecular	Nombre	Categoría	Descripción
72 kDa	P65	Enzima	Transcriptasa inversa
38 kDa	P41	Transmembrana	Proteína de la cubierta
20 kDa	P24	Estructural	Proteína de cápside
14 kDa	P18	Estructural	Proteína de matriz

Tabla 1. Proteínas del HIV analizadas por Western blot

Estos anticuerpos pueden aparecer dentro de los tres meses posteriores a la infección, lo que permite una detección temprana mediante la prueba Western blot del VIH. Un resultado negativo de la prueba Western blot no mostrará ninguna banda, mientras que los resultados positivos pueden variar según el proveedor de la prueba. Normalmente, un diagnóstico positivo requiere la detección de al menos una proteína de la envoltura y una de la cápside, aunque la mayoría de los pacientes positivos mostrarán bandas adicionales. Además, es posible que los resultados revelen una o más bandas sin cumplir los criterios requeridos para una prueba positiva; en estos casos, se considera que el paciente es "indeterminado" y requerirá pruebas adicionales para confirmar la infección por VIH. El requisito de múltiples bandas ayuda a prevenir el diagnóstico erróneo de pacientes infectados con otros virus que ocasionalmente se detectan mediante la prueba Western blot.

Este experimento replica el cribado clínico para detectar anticuerpos contra el VIH en una muestra de sangre de un paciente. Las muestras simuladas de pacientes se han preteñido con colorantes, lo que las hace visibles durante la electroforesis. Estas proteínas se mezclan con un tampón de muestra que contiene SDS, DTT, glicerol y un colorante de rastreo. Este colorante migrará por delante de las proteínas más pequeñas en estas muestras, donde sirve como marcador para mostrar la distancia recorrida por el gel. Dado que las proteínas están premarcadas, no es necesario realizar un análisis Western blot; en su lugar, las bandas de proteína del VIH serán visibles en cada muestra a medida que se procesan los geles.

Los estudiantes también teñirán sus geles con una tinción de proteínas rápida y fácil de usar en el aula para una mayor resolución. Posteriormente, analizarán sus resultados y proporcionarán un diagnóstico de VIH o recomendarán pruebas adicionales para cada paciente.

Este experimento replica la práctica clínica para detectar anticuerpos del VIH en una muestra de sangre del paciente. Las muestras de pacientes –muestras simuladas- han sido teñidas previamente con colorantes, 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 por lo que sirve como marcador para mostrar la distancia recorrida por las proteínas en 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

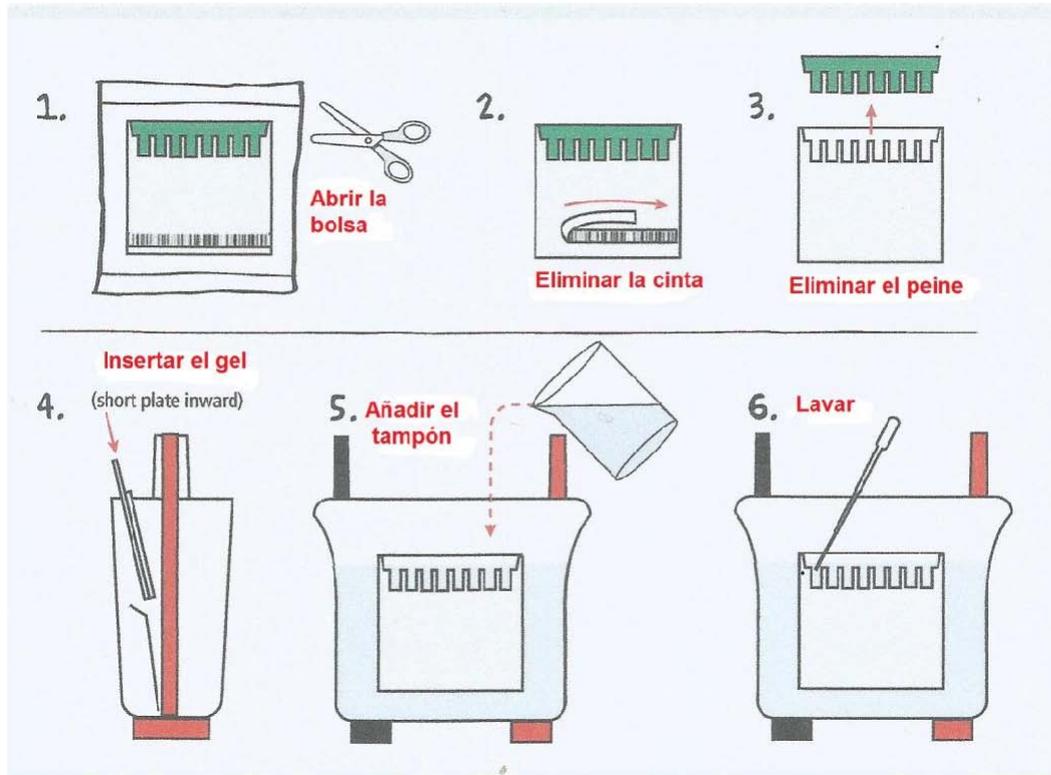
1. Llevar gafas y guantes de laboratorio mientras se trabaja.
2. **NO PIPETEAR CON LA BOCA**, utilizar los dispositivos adecuados.
3. Extremar las precauciones cuando se trabajan con equipos que utilizan conjuntamente calor y mezcla de reactivos.
4. Lavarse las manos con jabón y agua después de haber 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.**



5. MÓDULO I

5.1 Preparación de los geles para la electroforesis

NOTA: Aunque el diseño de los geles de poliacrilamida prefabricados y las cámaras de proteínas varía ligeramente, el procedimiento de uso es similar.



1. **ABRA** la bolsa que contiene el casete de gel. Retire el casete y colóquelo sobre la mesa de trabajo con la placa frontal más corta hacia arriba.

2. Los geles pueden tener una pegatina o cinta adhesiva en la parte inferior de la placa frontal. **RETIRE** la cinta adhesiva (si la hay) para exponer la parte inferior del gel.

3. **RETIRE** con cuidado el peine tirando suavemente hacia arriba. Tire del peine hacia arriba para evitar dañar los pocillos del gel.

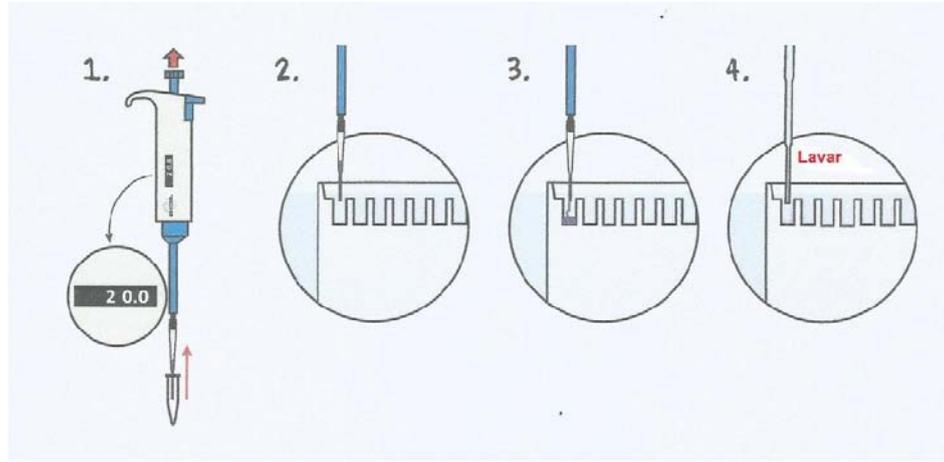
4. **INSERTE** el gel en la cámara de electroforesis. Oriente el gel según las instrucciones del fabricante. **NOTA:** En las cámaras de electroforesis verticales EDVOTEK®, la placa corta debe estar orientada hacia el centro del aparato.

5. **AÑADA** el tampón de electroforesis diluido a la cámara. El tampón debe cubrir la parte superior de la placa más corta. 6. **ENJUAGUE** cada pocillo vertiendo el tampón de electroforesis en ellos con una pipeta de transferencia. Con la pipeta de transferencia, enderece cuidadosamente cualquier pocillo que se haya deformado al retirar el peine o enjuagar.

El gel ya está listo para la carga de gel de práctica.

5.2 Práctica de carga de los geles para la electroforesis

1. **COLOQUE** una punta nueva en la micropipeta. **EXTRAIGA** 20 μL de la solución de carga de gel de práctica.
2. **COLOQUE** la parte inferior de la punta de la pipeta debajo de la superficie del tampón del electrodo, directamente sobre un pocillo de muestra. La punta debe estar en ángulo



apuntando hacia el pocillo. La punta debe estar parcialmente contra la placa posterior del casete de gel, pero la abertura de la punta debe estar sobre el pocillo de muestra. No intente atascar la punta de la pipeta entre las placas del casete de gel.

3. **EXPULSE** toda la muestra presionando firmemente el émbolo de la pipeta automática.

No suelte el émbolo antes de que se haya expulsado toda la muestra. Una liberación prematura del émbolo provocará que el tampón se mezcle con la muestra en la punta de la micropipeta. Suelte el émbolo de la pipeta después de que se haya administrado la muestra y la punta de la pipeta esté fuera del tampón.

4. **EXTRAIGA** la solución de carga de gel de práctica de los pocillos de muestra. **LENE** una pipeta de transferencia con solución tampón y vierta un chorro en los pocillos de muestra. Esto desplazará la solución de carga del gel de práctica, que se diluirá en la solución tampón y no interferirá con el experimento. **NOTA:** La solución de carga del gel de práctica debe retirarse de los pocillos de muestra antes de cargar la muestra.

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

6. MÓDULO II: ELECTROFORESIS SDS-PAGE CON MUESTRAS DE PROTEÍNAS

Desnaturalización de las proteínas

NOTA: Si su instructor de laboratorio ya calentó las muestras de proteína, proceda a cargar el gel.

1. Con una placa calefactora o un microondas, **caliente** un vaso de precipitados con agua hasta que hierva.



2. **Cubra** con papel aluminio y **retire** con cuidado del fuego.

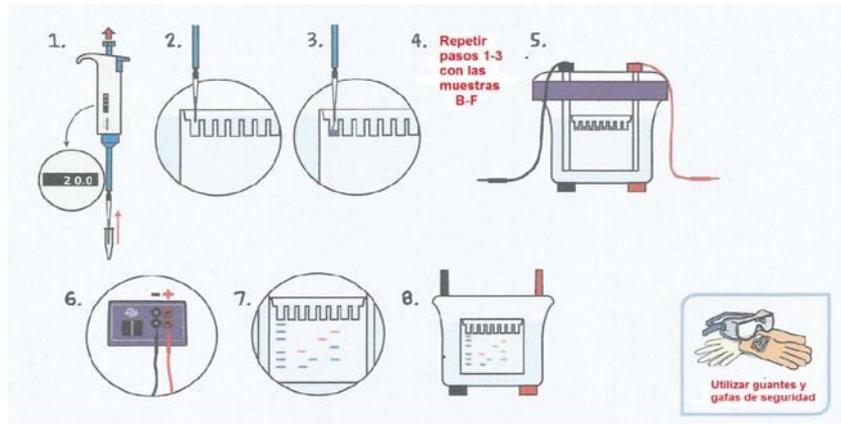
3. Tape bien los tubos de muestra. **Empuje** los tubos a través del papel aluminio para que se suspendan en el agua hirviendo.

4. **Incube** las muestras durante 5 minutos.

5. Inmediatamente, proceda a **cargar** el gel. (Para la carga, las muestras se pueden dividir en alícuotas en tubos de microcentrifuga individuales o colocar en una estación de pipeteo del aula para que los estudiantes las compartan). Use guantes y gafas de seguridad.

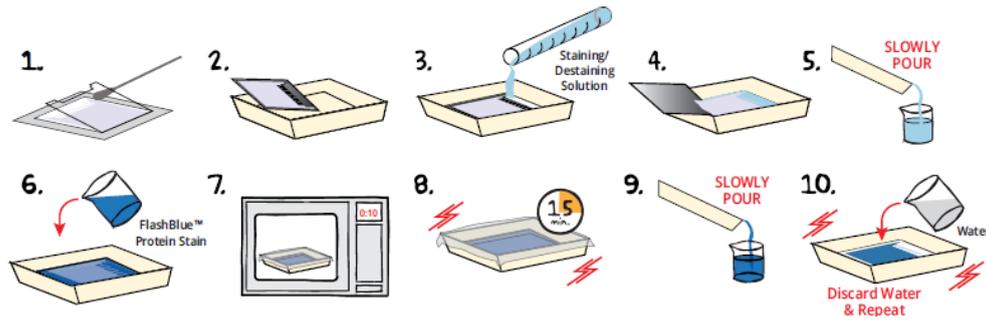
¡Las muestras deben hervirse en tubos de microcentrifuga con tapa de rosca!

Carga de las muestras



1. Con una punta de pipeta nueva, **ASPIRE** 20 µL del Marcador de Proteína Estándar (A).
2. **COLOQUE** la punta de la pipeta debajo del tampón y directamente sobre el pocillo de muestra, apoyándola suavemente contra la placa posterior del casete de gel.
3. **DISPENSE** lentamente la muestra presionando el émbolo.
4. **REPITA** los pasos 1 a 3 con las muestras de proteína B a F, cambiando la punta entre cada nueva muestra.
5. Una vez cargadas todas las muestras, **COLOQUE** con cuidado la tapa sobre los terminales de los electrodos y **CONECTE** los cables eléctricos a la fuente de alimentación.
6. **AJUSTE** el voltaje de la fuente de alimentación y **REALICE** la electroforesis (Consulte la Tabla A para obtener información sobre tiempo y voltaje). Deje que las proteínas se separen en el gel durante el tiempo recomendado o hasta que el colorante de seguimiento alcance el fondo del gel.
7. **APAGUE** la fuente de alimentación y **RETIRE** la tapa con cuidado. Ahora se puede retirar el gel de la cámara y teñirlo.

7. MODULO III: Tinción de gel con el colorante de proteínas FlashBlue™



1. Después de la electroforesis, coloque el casete boca abajo y **RETIRE** la placa frontal colocando una espátula fina o un destornillador en el borde lateral y separándola con cuidado de la placa posterior, que es más grande. En la mayoría de los casos, el gel permanecerá en la placa posterior. Si se desprende parcialmente con la placa frontal, déjelo caer sobre ella. Manipúlelo con mucho cuidado, ya que los geles finos son extremadamente frágiles.

2. **TRANSFIERA** el gel de la placa posterior a una bandeja limpia.

3. **AÑADA** un volumen suficiente (aproximadamente 50-75 ml) de la solución de tinción/destinción a la bandeja para **CUBRIR** el gel y la placa posterior.

4. **RETIRE** con cuidado la placa posterior de la bandeja, dejando solo el gel en la bandeja que contiene la solución de tinción/destinción. Las bandas serán más fáciles de ver una vez retirado el casete. **OBSERVE** el gel y tome una foto o dibuje el patrón de bandas en su cuaderno antes de continuar. NOTA: Si el gel se pega a la placa, retírelo suavemente con los dedos enguantados.

5. **DESECHE** la solución de tinción/destinción. Vierta lentamente para conservar el gel en el recipiente.

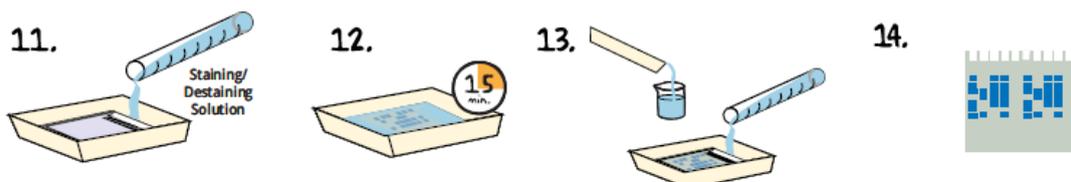
6. **AGREGUE** 30 ml de la tinción de proteínas FlashBlue™ preparada.

7. (OPCIONAL) **CUBRA** el recipiente con film transparente y **CALIENTE** en el microondas durante 10 segundos, para calentar suavemente la solución.

8. **INCUBE** durante 15 minutos a temperatura ambiente, **AGITANDO** ocasionalmente.

9. **DESECHE** la solución de tinción de proteínas FlashBlue™. Vierta lentamente para conservar el gel en el recipiente.

10. **LAVE** el gel llenando parcialmente el recipiente con agua y moviéndolo suavemente varias veces. **DESECHE** el agua usada y **REPITA** la operación con agua limpia.



11. **AÑADA** 30 ml de solución de tinción/destinción al gel.

12. **INCUBE** durante 15 minutos a temperatura ambiente. **EXAMINE** el gel.

13. (OPCIONAL) **DESECHE** la solución de tinción/destinción usada y **AÑADA** 30 ml adicionales de solución de tinción/destinción. **INCUBE** durante 15-60 minutos a temperatura ambiente hasta que mejore la apariencia y el contraste de las bandas de proteína con el fondo.

14. Después de la tinción, las bandas de proteína aparecerán de color azul medio a oscuro sobre un fondo claro. Se puede utilizar una caja de luz blanca para visualizar mejor las bandas de proteína. **OBSERVE** el número de bandas en los controles positivo y negativo, así como en los tres pacientes. **ESTIME** el tamaño de cada banda utilizando los marcadores estándar*. Finalmente, **DETERMINE** el diagnóstico para cada uno de los tres pacientes. Si el resultado no es concluyente, puede recomendar una nueva prueba. *Para obtener estimaciones de tamaño más precisas, mida las distancias de migración y gráficas en un gráfico semilogarítmico (consulte el Apéndice A).

Almacenamiento del gel

El gel puede dejarse en agua desionizada durante varias horas sin perder sensibilidad ni intensidad de banda. Este paso debe realizarse una vez obtenido el fondo deseado y las bandas de proteína teñidas. Escurra la solución decolorante del paso 12 (o 13) y añada suficiente agua desionizada para cubrir el gel.

Para un almacenamiento permanente, el gel puede secarse entre dos hojas de celofán (papel film) estiradas en un bastidor de bordado. Deje secar el gel al aire durante varios días hasta que adquiera una textura fina. Corte el papel film sobrante que rodea el gel seco. Coloque el gel seco durante la noche entre dos libros pesados para evitar que se doble. Péguelo con cinta adhesiva a un libro de laboratorio.

8. PREGUNTAS

1. Describe la electroforesis de proteínas. ¿Por qué fue necesario hervir las proteínas en presencia de SDS antes de cargarlas en el gel?

2. ¿Cómo funciona la prueba Western blot para el VIH?

3. ¿Cuáles son las ventajas de la prueba Western blot para detectar enfermedades como el VIH? ¿Se te ocurren posibles desventajas?

4. ¿Por qué los médicos requieren múltiples bandas positivas en una prueba Western blot antes de determinar que un paciente está infectado con el VIH?

9. GUÍA DEL PROFESOR

Organización e implementación del experimento

Antes de comenzar este experimento, revise cuidadosamente la lista de componentes y requisitos para asegurarse de contar con todos los componentes y el equipo necesarios.

Este experimento requiere tres geles de poliacrilamida al 12% que compartirán los 6 grupos de estudiantes. Cada grupo necesita 6 pocillos de muestra. Si es necesario, se puede omitir la muestra B (control negativo) para que dos grupos compartan un gel de 10 pocillos.

Preparación para	Qué hacer	En qué momento	Tiempo estimado
<u>MÓDULO I</u>	Preparar el tampón de electroforesis diluido	Hasta un día antes de realizar el experimento.	15 minutos
	Rehidratar y alicuotar las muestras de proteína.	Hasta un día antes de realizar el experimento y almacenado a -20° C	15 minutos
<u>MÓDULO II</u>	Preparar los baños de agua para poder desnaturalizar las proteínas.	Hasta un día antes de realizar el experimento.	15 minutos
	Desnaturalizar las proteínas (opcional)	No más de 10 minutos antes de realizar el experimento.	10 minutos
<u>MÓDULO III</u>	Preparar soluciones de tinción	En cualquier momento antes de realizar el experimento	10 minutos

Preparaciones Previas

PREPARACIÓN DE MUESTRAS DE PROTEÍNA

1. Añada 160 μ L de agua destilada o desionizada a cada tubo (A-F) y deje que las muestras se hidraten durante varios minutos.

Agite vigorosamente el tubo con vórtex o con un agitador. Las proteínas resuspendidas pueden conservarse a temperatura ambiente para su uso inmediato o congelarse hasta su uso.

2. Las muestras de proteína deben calentarse en sus tubos de microcentrífuga con tapa de rosca originales de 1,5 ml antes de su uso. Este paso puede ser realizado por los instructores de laboratorio inmediatamente antes de la práctica de laboratorio o por los estudiantes durante la misma.

3. Etiquete seis (6) tubos de microcentrífuga con tapa a presión para cada muestra de proteína (A-F).

4. Después de hervir, alícuota 25 μ L de cada muestra en los tubos correspondientes. Las proteínas deben dividirse en alícuotas y luego los estudiantes deben cargarlas lo más rápido posible una vez calentadas.

PREPARACIÓN DEL TAMPÓN DE ELECTROFORESIS

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

El volumen aproximado de tampón de electroforesis 1x necesario para las unidades de electroforesis vertical de proteínas EDVOTEK se indica en la Tabla B. El tampón debe cubrir apenas la placa posterior del casete de gel.

TIEMPO Y VOLTAJE DE LA ELECTROFORESIS

El tiempo requerido determinará el voltaje y el tiempo que tardarán las muestras en separarse por electroforesis. Los tiempos aproximados recomendados se indican en la Tabla A.

Analice el gel hasta que el colorante de rastreo azul de bromofenol esté cerca del borde inferior del gel.

PREPARACIÓN DE LOS GELES DE TINCIÓN

1. Prepare una solución madre de vinagre blanco y etanol* combinando 400 ml de vinagre blanco con 200 ml de etanol. Mezcle suavemente. Etiquete como "Solución de tinción/destinción".

2. Añada 125 ml de la solución de tinción/destinción a un matraz o vaso de precipitados de 250 ml. Añada todo el contenido del polvo de tinción de proteínas FlashBlue™ y remueva o agite brevemente para mezclar. El polvo residual se puede enjuagar del tubo con 1 ml adicional de solución de tinción/destinción.

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

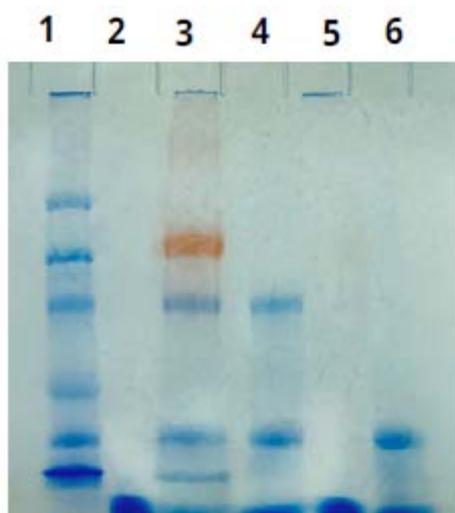
4. Dos grupos de estudiantes compartirán: 30 ml de tinción de proteínas FlashBlue™, 140 ml de solución de tinción/destinción, agua, una bandeja de tinción y film transparente.

**El vinagre blanco, a veces llamado vinagre destilado o vinagre de alcohol, es un vinagre fácil de encontrar para cocinar y limpiar, con una concentración de ácido acético de entre el 5 % y el 8 % y un pH de aproximadamente 2,6. El etanol es un producto de laboratorio común, disponible en diversas concentraciones. Nuestro tinte de proteínas FlashBlue™ está diseñado*

para funcionar con una amplia gama de vinagres blancos. Sin embargo, recomendamos usar etanol al 95 % o superior.

10. RESULTADOS EXPERIMENTALES Y ANÁLISIS

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



Peso molecular del marcador estándar de proteínas utilizado
94 kDa
67kDa
38kDa
30kDa
20kDa
14kDa

POCILLO	MUESTRA	NÚMERO Y TAMAÑO DE BANDAS	DIAGNOSTICO
1	Marcador de peso molecular	-----	
2	Control negativo	0 Bandas	HIV negativo
3	Control positivo	4 Bandas (72, 38, 20 y 14 kDa)	HIV positivo
4	Paciente 1	2 Bandas (38 y 20 kDa)	HIV positivo
5	Paciente 2	0 Bandas	HIV negativo
6	Paciente 3	1 Banda (20 kDa)	NO concluyente. Debe de ser analizado nuevamente por el médico