

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

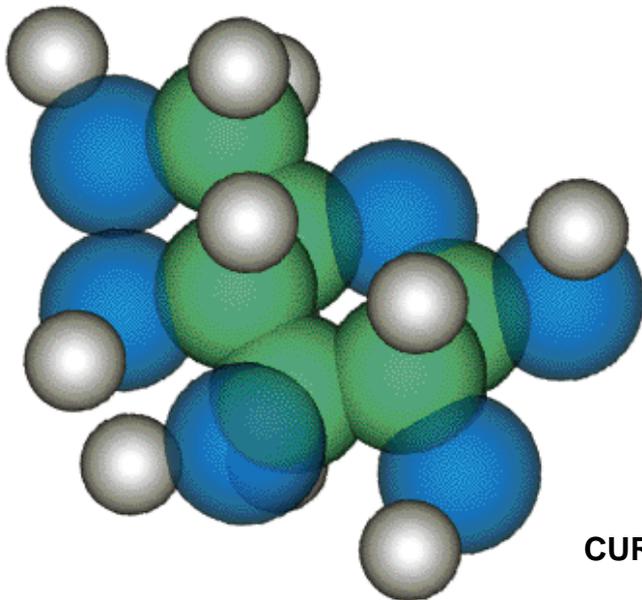
**FACULTAD DE MEDICINA**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

# **CUADERNO DE PRÁCTICAS**

## **BIOQUÍMICA HUMANA**

**Grado en Medicina**



**CURSO ACADÉMICO 2018/2019**

## **INDICE**

**PRÁCTICA #1: ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS PLASMÁTICAS**

**PRÁCTICA #2: DETERMINACION DE COLESTEROL TOTAL, COL-HDL, COL-LDL y TRIGLICERIDOS**

**PRÁCTICA #3: DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE GLUCOSA Y VALORACIÓN CLINICA**

**PRÁCTICA #4: CUANTIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE INMUNOTRANSFERENCIA (WESTERN BLOT)**

# **PRACTICA # ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS PLASMÁTICAS**

## **1.1. FUNDAMENTO**

La electroforesis es una técnica muy empleada para la separación de proteínas en función, entre otros factores, de su carga eléctrica. Las proteínas, moléculas anfóteras, adquieren en medio básico una carga global negativa que hace que migren del cátodo hacia el ánodo. En particular, la electroforesis sobre membranas de acetato de celulosa es la más empleada en los análisis rutinarios de proteínas en líquidos biológicos, como las realizadas con fines diagnósticos en sangre y orina. Sus ventajas principales son la reproducibilidad y la sencillez. Su resolución, sin embargo es menor que la obtenida con otras técnicas electroforéticas.

A partir del plasma sanguíneo se obtienen habitualmente 5 fracciones :

- Albúmina
- $\alpha_1$  globulinas
- $\alpha_2$  globulinas
- $\beta$  globulinas
- $\gamma$  globulinas

Una vez obtenida la separación de distintos tipos de fracciones proteicas, se mide la cantidad de colorante que se combina con cada una de ellas, una vez que se ha eliminado la coloración de fondo. En el aparato de medida (**densitómetro**) se hace pasar a través de la tira una radiación luminosa, cuya intensidad se mide en una fotocélula, después de atravesar la tira. La absorción de radiación es proporcional al grosor o densidad de las bandas y, por tanto, a la concentración de proteínas en plasma.

## **1.2. MATERIALES**

### ***Soporte***

Tiras de Acetato de celulosa (2,5 x 17 cm), que se conservan en disolución de metanol al 30% en agua desionizada.

### ***Reactivos***

- Tampón de electroforesis (Tris- hipurato, pH 8,8)
- Colorante Rojo Ponceau
- Decolorante (ácido acético 10%- etanol 45%)
- Transparentador (ac. acético 18%- etanol 82%). Preparar en el momento.

### ***Otros materiales***

- Fuente de alimentación
- Cubetas de electroforesis
- Aplicador semimicro
- Cubetas para baños
- Estufa
- Tijeras, placas de vidrio y papel de filtro

### 1.3. MÉTODO

1. a) Rellenar la cubeta con 100 ml de tampón de electroforesis (se puede utilizar el mismo tampón para 4 migraciones)
2. a) Preparar un baño con 100 mL de la disolución colorante (sirve para 10 tiras)
3. Preparar 3 baños con la disolución decolorante
4. Sacar la tira de acetato de celulosa de la disolución de metanol y absorber el exceso de metanol con un papel de filtro.
5. Sumergir la tira en el baño con tampón de electroforesis durante 10 min.
6. Absorber el exceso de tampón con papel de filtro y montar la tira en la cámara con la cara absorbente hacia arriba (esquina perforada hacia la derecha y hacia abajo) y situarla en la cubeta de electroforesis.
7. Aplicar la muestra con el semimicro aplicador. Para ello:
  - a) Tomar la muestra de suero
  - b) Aplicarla con cuidado sobre el borde catódico (negro)
  - c) Lavar el aplicador varias veces.
8. Cerrar la cubeta de electroforesis y conectarla al alimentador (negativo con negativo, positivo con positivo).  
Encender la fuente de alimentación y aplicar 210 voltios durante 50 min.

(DURANTE ESTOS 50 MIN, HACER LA REACCION DEL BIURET).

9. Desconectar las cubetas de la fuente de alimentación y desenchufar ésta.
10. Introducir la tira de acetato de celulosa en la disolución colorante por la cara absorbente y dejarla durante 3 min.
11. Decolorar la tira utilizando los 3 baños decolorantes.  
Sumergir la tira durante 3- 4 min en cada baño, agitando manualmente.
12. Introducir la tira en un baño con disolución transparentadora 90 segundos (nunca más de 2 min).
13. Colocar la tira sobre una placa de vidrio quitando las burbujas que queden entre ambas.
14. Introducir en una estufa a 60- 90 °C. Cuando la tira esté transparente, se esperan 5 min antes de sacarla.
15. Sacar de la estufa, dejar enfriar a temperatura ambiente y quitar el papel con una lanceta.
16. Leer las tiras en un densitómetro utilizando un filtro verde (530 nm).

# **ANÁLISIS CUANTITATIVO DE LAS PROTEÍNAS SÉRICAS POR LA REACCIÓN DEL BIURET**

## **1. INTRODUCCIÓN**

### **Proteínas plasmáticas.**

El plasma sanguíneo contiene en solución coloidal una gran cantidad de proteína, cuya concentración normal varía en función de la edad:

- |                               |                     |
|-------------------------------|---------------------|
| a) Recién nacidos.....        | 5,2 - 9,1 g/100 mL  |
| b) Niños mayores de 6 años... | 5, 6 - 8,5 g/100 mL |
| c) Adultos.....               | 6, 2 - 8,2 g/100 mL |

Dichas proteínas tienen diferente composición, presentándose en distintos estados de estabilidad e hidratación.

Las funciones generales de las proteínas del plasma se podrían resumir en cuatro puntos fundamentales;

- 1) Mantenimiento de la presión osmótica sanguínea.
- 2) Intervención en el equilibrio electrolítico.
- 3) Mantenimiento del pH.
- 4) Transporte de macromoléculas biológicas (ej. lípidos).
- 5) Función nutritiva o de recambio con proteínas tisulares.

Además de las funciones generales, citadas anteriormente, los diferentes tipos de proteínas plasmáticas, presentan funciones específicas, p. ej.:

- La albúmina actúa como reserva de aminoácidos, además de tener función transportadora y reguladora del volumen intravascular.
- Las lipoproteínas (VLDL, LDL, HDL) transportan lípidos.
- Las gammaglobulinas intervienen en procesos inmunitarios.
- Fibrinógeno, protrombina... intervienen en el proceso de coagulación sanguínea, etc...

### **Alteraciones de los valores normales de albúmina sérica.**

La albúmina constituye aproximadamente el 70% del total de proteínas plasmáticas, oscilando sus valores normales entre 4-5,2 g/100 mL de plasma. No se conocen casos de “hiperalbúminemia” siendo frecuente sin embargo las “hipoalbuminemias” (presentes en todos los tipos de disproteinemias) que aparecen en tres circunstancias patológicas fundamentales:

1. Pérdidas cuantiosas por hemorragias, albuminuria y catabolismo elevado.
2. Síntesis defectuosa debido a hepatopatías.
3. Por carencia de materiales plásticos: deficiencias alimentarias, trastornos de absorción intestinal. Las “analbuminemias” (ausencia casi total de albúmina) aparecen en los siguientes casos.
  - Síndrome nefróticos.
  - Insuficiencia hepática avanzada: Cirrosis, Necrosis, Hepatitis, Colelitiasis obstructiva...etc.

- Enteropatía exudativa: pérdida gastrointestinal de albúmina = enteritis, colitis, linfogranuloma. etc.

### **Métodos de valoración de proteínas.**

Existen diferentes métodos de valoración cuantitativa de proteínas: Análisis de nitrógeno por el método de Kjendahl; precipitación controlada, absorción de ultravioletas, métodos colorimétricos.. etc. Los más frecuentemente utilizados en la clínica son estos últimos, entre los que se encuentran el método del Biuret (GORNALL y cols. 1949) y el método de Lowry (LOWRY y cols, 1951), cuya sensibilidad en la valoración cuantitativa oscila entre 1 - 200 microgramos para el método de Lowry y 0,25-200 miligramos para el método del Biuret.

## **2. VALORACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES. METODO DEL BIURET**

### **Fundamento.**

La reacción del Biuret, es una reacción coloreada producida por compuestos químicos como el Biuret ( $\text{NH}_2\text{-CONH-CO-NH}_2$ ), etc, cuando son tratados con sales de cobre en medio alcalino (Rising y col, 1928).

La reacción fue primeramente observada por WIEDEMANN en 1848. Sin embargo, fue SCHIFF, a finales de siglo pasado, el pionero en el estudio del mecanismo químico de dichas reacciones.

El descubrimiento por RITTHAUSEN en 1873, de que las proteínas y péptidos adoptaban un comportamiento similar al del Biuret, al ser tratadas con los mismos reactivos, tuvo su aplicación práctica con el desarrollo posterior de un método sensible para la determinación cuantitativa de proteínas.

Este método, se fundamenta en la capacidad que presentan los “enlaces peptídicos” (...-CO-NH-...) de las proteínas y de los péptidos, para formar complejos con el ión  $\text{Cu}^{++}$ , en medio alcalino, de color rosa-violeta. La intensidad de la coloración es proporcional al número de enlaces peptídicos, y por tanto a la cantidad de proteína presente en la muestra analizada.

### **Reactivos y Materiales.**

#### **A) Reactivos**

- Albúmina sérica (1%).
- Sulfato de cobre:  $\text{SO}_4 \text{Cu} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ .
- Hidróxido sódico al 10%. NaOH (0.2 N).
- Tartrato Sódico-Potásico:  $\text{Na K C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$

El tartrato sódico-potásico, se emplea como agente estabilizador, ya que disminuye la cantidad de álcali necesaria para evitar la formación de precipitado de hidróxido cúprico. (SHAFFER y col 1933).

#### **B) Preparación del reactivo del Biuret**

1) 1,5 g de sulfato de cobre y 6 g de tartrato sódico-potásico, se llevan a un matraz aforado de vidrio de 1000 mL de volumen.

2) Se añaden 500 mL de agua destilada y se agita hasta su disolución total.

3) A continuación, se añaden 300 mL de la disolución de hidróxido sódico al 10%, previamente enfriada. Después de agitar se enrasa a 1000 mL con agua destilada.

### **C) Material necesario por alumno**

6 tubos de ensayo.

1 frasco con solución estándar de albúmina al 1%

1 frasco con reactivo de Biuret.

Pipetas automáticas

### **Método (Recta de calibrado).**

Consiste en medir la Densidad óptica (Absorbancia) de una serie de patrones de albúmina de concentración conocida.

Posteriormente, representamos gráficamente los valores experimentales de absorbancias en ordenadas frente a las concentraciones conocidas de albúmina, con lo que obtenemos una línea recta.

Mediremos, además, la absorbancia de la muestra problema y al aplicarla sobre la curva estándar conoceremos, mediante el cálculo apropiado, su concentración proteica.

Tanto los puntos de la curva, como la muestra problema (suero bovino) se pipetearán según el siguiente protocolo:

<b>TUBO</b>	<b>ALB. 1%</b>	<b>SUERO</b>	<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>BIURET</b>	<b>D.O. (550 nm)</b>	<b>CANTIDAD DE ALBÚMINA</b>
<b>B</b>	-	-	1,0 mL	4 mL		-
<b>1</b>	0,2 mL	-	0,8 mL	4 mL		2 mg
<b>2</b>	0,4 mL	-	0,6 mL	4 mL		4 mg
<b>3</b>	0,8 mL	-	0,2 mL	4 mL		8 mg
<b>4</b>	1,0 mL	-	-	4 mL		10 mg
<b>5</b>	-	0,1 mL	0,9 mL	4 mL		?

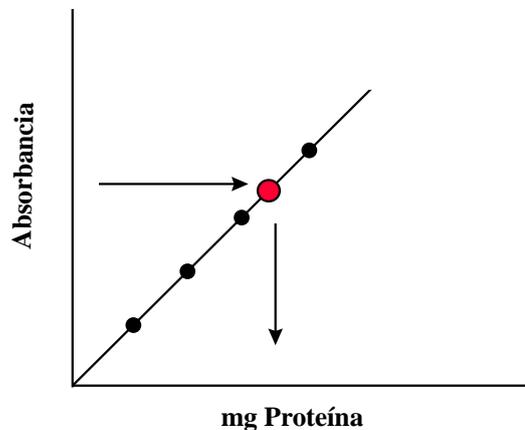
En primer lugar se pipetea la albúmina y el suero en los tubos correspondientes. A continuación se añade el agua destilada a cada tubo. Y por último se pipetea el reactivo de Biuret.

Se agitan los tubos y se lee la absorbancia en fotolorímetro a una longitud de onda de 550 nm.

Los valores obtenidos los apuntará cada alumno en la columna correspondiente.

### **Resultados y cálculos.**

Sobre papel milimetrado representamos la curva estándar. En ordenadas los valores obtenidos de densidad óptica (Absorbancia) y en abscisas los valores de concentración de proteína en mg. Determinaremos la concentración total de proteínas en el suero problema interpolando en la recta el valor de absorbancia del problema.



Cada alumno hará la transformación en gramos de proteína por 100 mL de suero.

## **BIBLIOGRAFÍA**

1. Balcells, A. y cols. "Patología General" Ed. Marín. 1974
2. Balcells, A. "La clínica y el laboratorio". Ed. Marín. 1974
3. Gornall, A.G. y cols. J. Biol. Chemistry. 177 : 751. 1949
4. Lowry, O.H. y cols. J. Biological Chemistry. 193: 265. 1951
5. Plummer, D.T. "Introducción a la bioquímica práctica". pg. : 136. Ed: Mc Graw-Hill Latinoamericana. 1981
6. Rendina, G. "Técnicas de bioquímica aplicada". Pg. : 60. Ed. Interamericana. 1974
7. Rising, M.M., Johnson, C.A. J. Biological Chemistry 80 : 709. 1928
8. Ríthausen, H. J. Prakt. Chem. VII, 351, 1873
9. Shaffer y Somogyi. J. Biological Chemistry. 100 : 695. 1933
10. Tamarit, J. y Delso, J.L. "Prácticas de Bioquímica y Fisiología", pag. 51. Ed. Marban. 1977
11. Wiedemann, G. Ann. Chem. LVIII, 323, 1848.

## **CUESTIONES**

1. En el método de Biuret. ¿Por qué hay más color en los tubos en los que es mayor la concentración de proteínas?
2. En el método de Biuret. ¿Por qué se lee la absorbancia a una longitud de onda concreta (550 nm)?

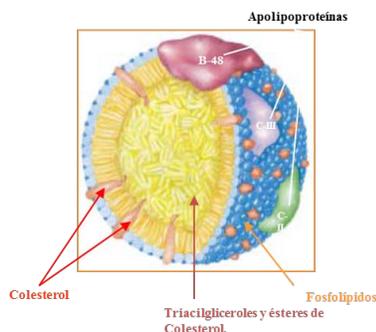


## PRACTICA:

### DETERMINACION DE COLESTEROL TOTAL, COL-HDL, COL-LDL y TRIGLICERIDOS

#### Introducción

Los lípidos son un grupo de compuestos químicamente diverso que desempeñan funciones biológicas muy variadas. Los lípidos en el organismo provienen tanto de la síntesis “de novo” como de la dieta. Al ser compuestos apolares (insolubles en agua) necesitan un sistema de transporte para su distribución por el organismo. Para poder circular en el plasma, se unen a proteínas específicas (Apolipoproteínas) formando estructuras complejas, que se denominan lipoproteínas (Lps). Las Lps son estructuras esféricas cuyo núcleo central, hidrofóbico, contiene el colesterol esterificado y los triacilgliceroles (triglicéridos; TG) y está rodeado por una capa hidrofílica externa compuesta de fosfoacilgliceroles, proteínas y colesterol libre.



Existen diversos tipos de Lps. Las principales Lps del plasma son: Quilomicrones (QM), lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), lipoproteínas de densidad intermedia (IDL) lipoproteínas de baja densidad (LDL) y lipoproteínas de alta densidad (HDL).

CLASE	COMPOSICIÓN		DIAMETRO (nm)	ORIGEN Y FUNCIÓN
	% LÍPIDOS	% PROTEÍNAS		
QM	85 % TG 7% PL 2% COL 2% EST. COL.	0.5-2%	Hasta 500	Transporte de TG de la dieta.
VLDL	55% TG 18% PL 7% COL 12% EST. COL	8%	28-70	Transporte de TG sintetizados en el hígado.
IDL	23% TG 19% PL 9% COL 29% EST. COL	19%	25-27	Formados por la digestión parcial de VLDL. Precusores de LDL.
LDL	6% TG 8% PL 22% COL 42% EST. COL	22%	20-25	Formados por digestión de IDL. Transporte de colesterol a los tejidos periféricos.
HDL	3-5% TG 5-25% PL 3-33% COL 13-17% EST. COL	40-56%	8-11	Transporte reverso del colesterol. Intercambio de apolipoproteínas y ésteres de colesterol con QM y VLDL.

Una concentración elevada de QM y/o VLDL por encima de valores normales, se asocia a una elevación en la concentración de triacilgliceroles. Un aumento de LDL caracteriza a la hipercolesterolemia familiar.

Cualquier alteración en los niveles normales de lípidos plasmáticos (fundamentalmente colesterol y triglicéridos) se conocen como **DISLIPEMIAS**. Son una serie de diversas condiciones patológicas cuyo único elemento común es una alteración del metabolismo de los lípidos, con su consecuente alteración de las concentraciones de lípidos y lipoproteínas en la sangre.

Se clasifican según su etiología en dos grandes grupos:

1. **HIPOLIPIDEMIAS:** Raras y de origen genético
2. **HIPERLIPIDEMIAS:** Muy comunes en la población general y consideradas como un factor de riesgo para enfermedades cardiovasculares. A su vez las hiperlipidemias se clasifican en:

a. **Hiperlipidemias primarias:** se deben a una alteración primaria del metabolismo de las Lps, es decir a una alteración relacionada intrínsecamente con las rutas del metabolismo lipoproteico. Son de origen genético. Muchas veces en las primarias no llegamos a conocer el defecto genético responsable pero estos pacientes presentan rasgos (entre ellos el tipo de herencia) que permiten efectuar una orientación diagnóstica.

Las principales dislipidemias de causa genética son la Hipercolesterolemia Familiar, la Dislipidemia Familiar Combinada, la Hipercolesterolemia Poligénica, la Disbetalipoproteinemia, las Hipertrigliceridemias Familiares y el déficit de HDL. Su prevalencia a nivel poblacional es alrededor del 4 %, lo que sube a 30-40% en población portadora de cardiopatía coronaria.

b. **Hiperlipidemias secundarias:** consecuencia de otras patologías y/o factores ambientales. Las principales patologías causantes de hiperlipidemias secundarias son la obesidad, la Diabetes Mellitus, el hipotiroidismo, la colestasia, la insuficiencia renal y el síndrome nefrótico. En cuanto a los factores ambientales, los principales son cambios cuali y cuantitativos de la dieta y algunas drogas.

Sin embargo, puede ser que un mismo paciente tenga una causa primaria y secundaria de dislipemia. Esto sucede cuando la dislipemia persiste después de haber corregido la causa secundaria.

## **DIAGNOSTICO CLINICO**

Se basa en las alteraciones de los niveles séricos, de las lipoproteínas y de sus lípidos y/o de la presencia de depósitos de ellos en la piel y tendones. La determinación cuantitativa de las lipoproteínas es compleja, de tal manera que el diagnóstico se hace con la evaluación de sus lípidos componentes.

Lípidos Séricos:

- 1) **Test de quilomicrones:** El suero obtenido en condiciones de ayuno de 12 horas, se deja reposar durante 24 horas a 4º C. Cuando existen quilomicrones aparece un sobrenadante cremoso en su superficie. En condiciones normales este test es negativo.
- 2) **Colesterol total:** Su determinación refleja el contenido de colesterol de todas las fracciones lipoproteicas.
- 3) **Triacilgliceroles:** Refleja el contenido de triacilgliceroles de todas las fracciones lipoproteicas.

4) Colesterol de HDL: La precipitación química de las VLDL, IDL y LDL y la ulterior determinación del colesterol en el sobrenadante, permite cuantificar el colesterol de esta fracción.

5) Relación Colesterol total/Colesterol HDL (C-total/C-HDL): Utilizando la medición del colesterol total y la del colesterol de HDL, se puede estimar esta relación cuyo valor deseable como índice de riesgo cardiovascular debe ser menor de 4,5.

6) Determinación semicuantitativa de Colesterol de LDL y de VLDL: Se estima el colesterol de LDL, utilizando la fórmula de Friedewald.

$$C\text{-LDL} = C\text{Total} - (C\text{-HDL} + \text{Triacilglicerol}/5)$$

Todo ello expresado en mg/dl y siempre que los niveles de triglicéridos sean menores de 400 mg/dl. El C-LDL es considerado el mejor indicador clínico de riesgo cardiovascular.

Los valores de referencia son:

Magnitud	Referencia (mg/dl)
CT	< 200
Co-HDL	≥ 40 hombres ≥ 60 mujeres
Co-LDL	< 100 (100 – 129)
TG	< 150

### **SUPUESTO EXPERIMENTAL:**

Un trabajador de una empresa multinacional sin ningún síntoma patológico destacable acude a hacerse un chequeo rutinario. Durante la entrevista refiere al facultativo que debido a su tipo de trabajo hace una vida muy sedentaria y ha aumentado de peso en los últimos años. Por otro lado, su alimentación es rica en hidratos de carbono y lípidos. En cuanto a sus antecedentes familiares, su padre y su abuelo sufrieron enfermedades cardiovasculares.

1. Determinar en el suero del paciente los niveles de TG, colesterol total, colesterol HDL, LDL.
2. ¿Qué conclusiones se pueden sacar a la vista de los resultados?

### **PARTE EXPERIMENTAL: DETERMINACIÓN DEL PERFIL LIPÍDICO**

Un perfil lipídico, también denominado lipidograma y perfil de riesgo coronario, es un grupo de pruebas o exámenes diagnósticos de laboratorio clínico, solicitadas generalmente de manera conjunta, para determinar el estado del metabolismo de los lípidos corporales, comúnmente en suero sanguíneo.

Entre otros parámetros que se pueden determinar están: colesterol total, colesterol transportado por las HDL (lipoproteínas de alta densidad), colesterol transportado por las LDL (lipoproteínas de baja densidad), triglicéridos y otras apoproteínas particulares.

Altos niveles de colesterol se asocian al riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares, sobre todo si está unido a LDL (también conocido como “colesterol malo”). En contraposición, la fracción de colesterol unido a las HDL se le conoce como “colesterol bueno”, porque estas lipoproteínas

son las encargadas de transportarlo al hígado donde es metabolizado y, posteriormente, es excretado por vía biliar y no está asociado con riesgo de enfermedad.

## 1. DETERMINACIÓN DE COLESTEROL TOTAL, COLESTEROL-HDL Y COLESTEROL-LDL

### 1.1. SEPARACIÓN DE LAS FRACCIONES HDL Y LDL

Para determinar el colesterol presente en las fracciones HDL y LDL, primero es necesaria una separación selectiva de las lipoproteínas correspondientes con agentes de precipitación (ácido fosfotúngstico y magnesio) que precipitan las LDL y VLDL, mientras que las HDL permanecen en solución (figura 1).

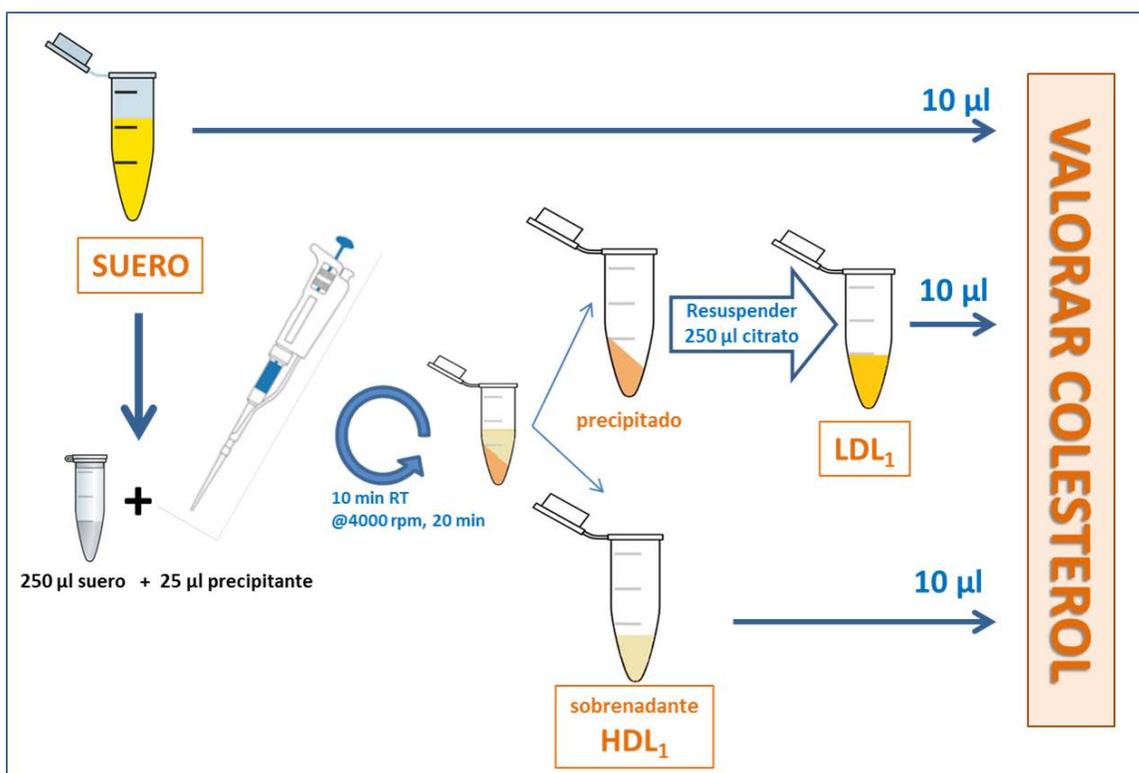


Figura 1: Esquema de precipitación y separación de fracciones

#### Procedimiento:

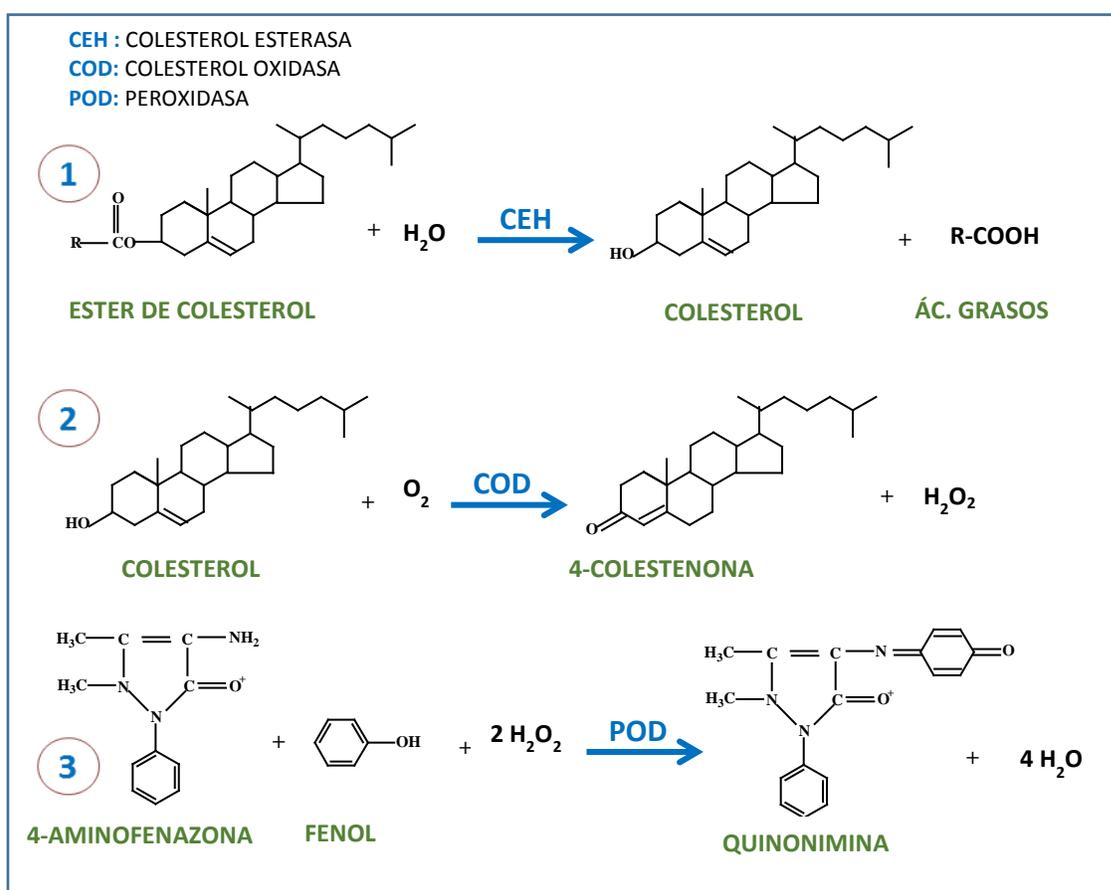
- 1) Pipetear en un eppendorf limpio y marcado como **LDL<sub>1</sub>**:
  - 250 µl de suero humano
  - 25 µl de agente precipitante
- 2) Mezclar y dejar reposar 10 minutos a temperatura ambiente
- 3) Centrifugar a 4000 rpm durante 20 minutos
- 4) Separar el sobrenadante resultante en otro tubo marcado como **HDL<sub>1</sub>**
- 5) El precipitado que queda en el tubo LDL<sub>1</sub>, se resuspende con la pipeta, en 250 µl de tampón citrato.

## 1.2. DETERMINACIÓN DE COLESTEROL TOTAL Y SUS FRACCIONES

Para la cuantificación del colesterol se utiliza un kit comercial que incluye las enzimas y los sustratos necesarios para las reacciones que permite la valoración colorimétrica del contenido de colesterol (*Spinreact*).

El fundamento del ensayo es la acción combinada de tres enzimas para dar un producto final coloreado, con absorbancia máxima a 505 nm. La relación absorbancia/concentración es lineal hasta concentraciones de colesterol de 750 mg/100 mL.

Las reacciones que se producen son las siguientes:



- 1) Una colesterol ester hidrolasa (CEH) hidroliza los ésteres de colesterol a colesterol y ácidos grasos libres.
- 2) Una colesterol oxidasa (COD) oxida todo el colesterol a colestenoa y peróxido de hidrógeno
- 3) El peróxido de hidrógeno es sustrato de una peroxidasa (POD) que junto con 4-aminofenazona da lugar a la formación de una quinona roja. La cantidad de esta quinona (505 nm) es proporcional a la concentración de colesterol de la muestra.

### Procedimiento:

En este punto se valorarán 3 muestras distintas:

- Colesterol total (muestra de suero original)
- Colesterol-HDL (sobrenadante del paso previo) (HDL<sub>1</sub>)
- Colesterol-LDL (precipitado resuspendido del paso previo) (LDL<sub>1</sub>)

Proceder como sigue:

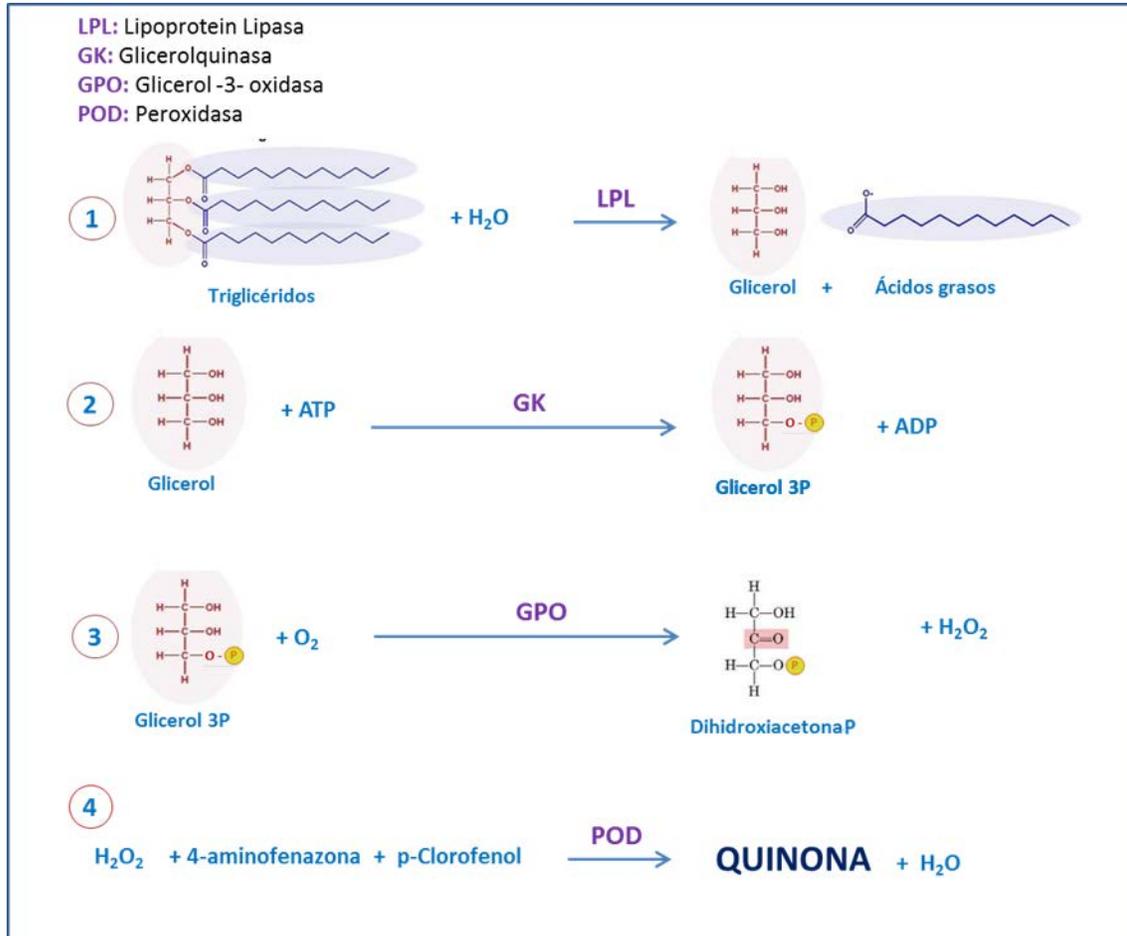
- 1) Preparar una serie de 5 tubos (rotular según el tipo de muestra) según el esquema:

TIPO DE MUESTRA	H <sub>2</sub> O Milli Ro	Estándar de colesterol	Suero total	HDL <sub>1</sub> (Sobrenadante)	LDL <sub>1</sub> (Precipitado disuelto)	Reactivo de trabajo-COL
Blanco	10 µl	--	--	--	--	1 ml
Estándar	--	10 µl	--	--	--	1 ml
Suero total	--	--	10 µl	--	--	1 ml
Sobrenadante (HDL)	--	--	--	10 µl	--	1ml
Precipitado disuelto (LDL)	--	--	--	--	10 µl	1ml

- 2) Mezclar e incubar 5 minutos a 37°C
- 3) Leer la absorbancia a 505 nm frente al blanco (el color es estable durante 30 minutos) en cubetas de espectrofotómetro.
- 4) Calcular la concentración de colesterol en mmol/l (PM = 384.6 g/mol), sabiendo que la concentración del estándar de colesterol es 200 mg/dl)

## 2. DETERMINACIÓN DE TRIACILGLICEROLES

Al igual que en el caso del colesterol, también se usa un kit comercial (*Spinreact*) que contiene los enzimas y sustratos necesarios para cuantificar colorimétricamente la cantidad de triacilgliceroles en la muestra:



- 1) Una lipasa hidroliza los TG generando glicerol y ácidos grasos libres.
- 2) El glicerol formado es sustrato de una glicerol quinasa que en presencia de ATP lo fosforila a glicerol-3-fosfato
- 3) El glicerol-3-P es oxidado a dihidroxiacetona-3-P por una glicerol 3-fosfato oxidasa, generándose también peróxido de hidrógeno
- 4) El peróxido de hidrógeno es el sustrato de una peroxidasa, que en presencia de p-clorofenol y 4-aminofenazona forman una QUINONA roja cuantificable a 505 nm. Esta quinona formada es proporcional a la concentración de TG presente en la muestra.

**Procedimiento:**

1. Preparar 3 tubos (rotular según el tipo de muestra) según el esquema:

TIPO DE MUESTRA	H <sub>2</sub> O Milli Ro	Estándar de TG	Suero	Reactivo de trabajo-TG
Blanco	10 µl	--	--	1 ml
Patrón	--	10 µl	--	1 ml
Muestra	--	--	10 µl	1 ml

2. Mezclar e incubar a 37°C durante 5 minutos
3. Leer la absorbancia a 505 nm frente al blanco en cubetas de espectrofotómetro.
4. Calcular la concentración de TG en mmol/l (PM medio = 885 g/mol), sabiendo que la concentración del estándar de triglicéridos es 200 mg/dl)



# PRÁCTICA: DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE GLUCOSA Y VALORACIÓN CLÍNICA

## 1. SIGNIFICADO CLÍNICO

La glucosa es la mayor fuente de energía para las células del organismo. El nivel de glucosa es la cantidad de glucosa (azúcar) que contiene la sangre, también se denomina glucosa en suero ó glucemia y se mide en milimoles por litro (mmol/L) o en miligramos por decilitro (mg/dL).

En condiciones fisiológicas, la concentración de glucosa plasmática no debe sobrepasar los 11 mmol/L, incluso tras la ingesta de grandes cantidades de hidratos de carbono. Tras la ingesta de alimentos, la absorción intestinal de carbohidratos hace que las concentraciones de glucosa en sangre aumenten con rapidez y ello estimula la secreción pancreática de insulina. Gracias a la actividad hormonal, los adipocitos, las células musculares y los hepatocitos captan la glucosa sanguínea. La insulina controla el consumo y la movilización de compuestos energéticos en el estado postprandial, gracias a sus diversos efectos sobre las células sensibles a la hormona. Su efecto central es permitir la entrada de glucosa a las células, en particular del hígado, tejido graso y músculo, para su utilización ya sea en la vía oxidativa, en la cual da lugar a energía, agua y dióxido de carbono, o no oxidativa, en la que la glucosa es almacenada como glucógeno hepático o muscular.

Se considera que hay una intolerancia a la glucosa cuando se sobrepasa esta concentración en condiciones postprandiales, e hiperglucemia basal si la concentración de glucosa en ayunas está por encima de los valores normales. Si la alteración es grave, se excretan cantidades elevadas de glucosa por la orina ya que se sobrepasa la capacidad de los túmulos renales para reabsorberla. Esto lleva unido una sintomatología característica de polidipsia, polifagia y poliuria. En una fase más avanzada, si el control no es adecuado pueden aparecer micro y macroangiopatías. Este síndrome es definido como DIABETES y es el más común de los desordenes metabólicos, afectando al 5-10% de la población en las países occidentales.

La diabetes mellitus es un desorden metabólico crónico, caracterizado por niveles persistentemente elevados de glucosa en sangre, como consecuencia de una alteración en la secreción y/o acción de la insulina, que afecta además al metabolismo del resto de los hidratos de carbono, lípidos y proteínas. Hasta el momento se han postulado varias clasificaciones de la diabetes, la última de las cuales fue emitida por un comité de expertos internacionales, reunidos por la Asociación Americana de Diabetes (ADA), cuyos miembros clasificaron la enfermedad con base en la etiología de la misma.

Las normas de la ADA y de la organización mundial de la Salud (OMS) recomendaron las siguientes categorías de diabetes:

- Diabetes tipo 1
- Diabetes tipo 2
- Diabetes mellitus gestacional (DMG)
- Otros tipos de diabetes

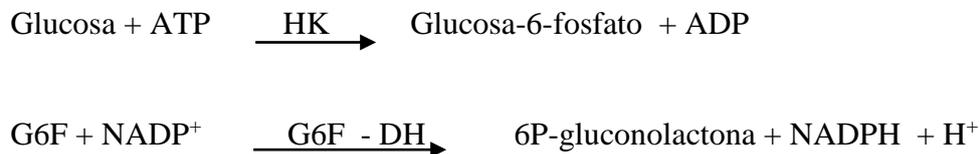
Si bien existen varios tipos de diabetes, la gran mayoría de casos corresponde a dos clases principales; la diabetes mellitus tipo 1 y la tipo 2. En la primera, el evento patogénico más relevante es la destrucción masiva de las células  $\beta$  del páncreas, de manera que la secreción de insulina es nula o insignificante. En la diabetes tipo 2, la deficiencia hormonal no es tan marcada y el trastorno principal es la resistencia de los tejidos periféricos a la acción de la hormona.

La prueba bioquímica característica para el diagnostico de la diabetes es la determinación de glucosa en sangre. Se determina en condiciones basales o tras la sobrecarga oral. La determinación de los niveles de glucosa en ayunas se considera de valor diagnóstico, y como ya se ha indicado, niveles por encima de 11mmol/L son indicativos de diabetes tipo 1.

La determinación de glucosa tras sobrecarga oral sirve para evaluar la tolerancia a la glucosa en aquellas personas que tienen niveles basales intermedios entre los fisiológicos y diabéticos. Para ello se administra al paciente 75 gr de glucosa por vía oral y se determinan los niveles de glucosa en sangre a diferentes tiempos. En un individuo normal se debe alcanzar el máximo entre 30 y 60 minutos; a partir de este momento se produce un descenso gradual de forma que a los 120 minutos se regresa a valores basales. En los casos de disminución de tolerancia a la glucosa, estos valores están elevados aunque no existe una frontera bien definida entre la respuesta fisiológica y la alterada. En general se considera que la concentración de glucosa a los 120 minutos es el valor con mayor capacidad discriminante, lo que permite clasificar como diabéticos a aquellos sujetos con valores mayores de 11 mmol/L y con disminución de tolerancia a la glucosa, los que tienen valores entre , 7.8 y 11,1mmol/L

## **2. DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE GLUCOSA POR EL MÉTODO ENZIMÁTICO DE LA HEXOQUINASA**

La Hexoquinasa (HK) cataliza la fosforilación de la glucosa por ATP a glucosa-6-fosfato (G6F). La glucosa-6-fosfato originada es oxidada a 6P-gluconolactona en presencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6F-DH) con reducción paralela de NAD a NADH:



El aumento en la concentración de NADH en el medio es proporcional a la concentración de glucosa presente en la muestra ensayada.

### **REACTIVOS**

<b>R 1</b> Tampón	Tris pH 7,5	4 mmol/L
	ATP	2,1 mmol/L
	Mg <sup>2+</sup>	0,8 mmol/L
<b>R 2</b> Enzimas	NADP <sup>+</sup>	2 mmol/L
	Hexoquinasa (HK)	1000 U/L
	Glucosa-6-fosfato (G6F-DH)	1000 U/L

### **PREPARACIÓN DE REACTIVO ENZIMÁTICO**

Se disuelve el contenido de un vial de R 2 en un frasco de R 1. Se tapa el vial y se mezcla suavemente hasta disolver su contenido.

### **PROTOCOLO**

A partir de la disolución estándar de glucosa (100 mg/dl), se preparan las siguientes disoluciones para la curva patrón de glucosa:

Solución estándar **A** (100 mg/dl)

Solución **B** (40 mg/dl).....500 µl de solución **A** + 750 µl de H<sub>2</sub>O

Solución **C** (20 mg/dl).....500 µl de solución **B** + 500 µl de H<sub>2</sub>O

Solución **D** (10 mg/dl).....500 µl de solución **C** + 500 µl de H<sub>2</sub>O

<b>Tubo</b>	<b>Glucosa (100 µl)</b>	<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>Reactivo Enzimático</b>	<b>Absorbancia (340 nm)</b>
Blanco	-----	100 µl	1 ml	
1	<b>Sol. D</b> (100 µl)	-----	1 ml	
2	<b>Sol. C</b> (100 µl)	-----	1 ml	
3	<b>Sol B</b> (100 µl)	-----	1 ml	
4	<b>Muestra 1</b> <b>0 min</b> (10 µl)	90 µl	1 ml	
5	<b>Muestra 2</b> <b>30 min</b> (10 µl)	90 µl	1 ml	
6	<b>Muestra 3</b> <b>60 min</b> (10 µl)	90 µl	1 ml	
7	<b>Muestra 4</b> <b>120 min</b> (10 µl)	90 µl	1 ml	

### PROCEDIMIENTO

- Pipetear en cada uno de los tubos las cantidades indicadas y agitar en vortex
- Incubar a 37°C en baño termostático durante 5 minutos.
- Parar la reacción añadiendo a todos los tubos 1 ml de NaCl 0.9 %
- Ajustar el espectrofotómetro a cero con el blanco y leer las absorbancias a 340 nm

### CUESTIONES

- Representar la curva de calibrado poniendo en ordenadas absorbancias y en abcisas concentración de las soluciones de glucosa.
- Interpolan los valores de absorbancia de las muestras problema para determinar su concentración.
- Expresar los resultados en mg de glucosa /dl y en mmoles de glucosa /L
- Representar los valores de glucosa frente al tiempo e interpretar los resultados de la curva obtenida.



# **PRACTICA # : CUANTIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE INMUNOTRANSFERENCIA (WESTERN BLOT)**

Una de las técnicas más utilizadas para identificar y cuantificar los niveles de una proteína determinada en una mezcla biológica compleja, es la llamada "inmunotransferencia" o "transferencia" Western (Western blotting). Dicha técnica combina el poder de resolución de la electroforesis en gel con la especificidad de un determinado anticuerpo y la sensibilidad de un ensayo enzimático. La técnica puede dividirse en tres etapas:

## **1.- Electroforesis y transferencia de las proteínas:**

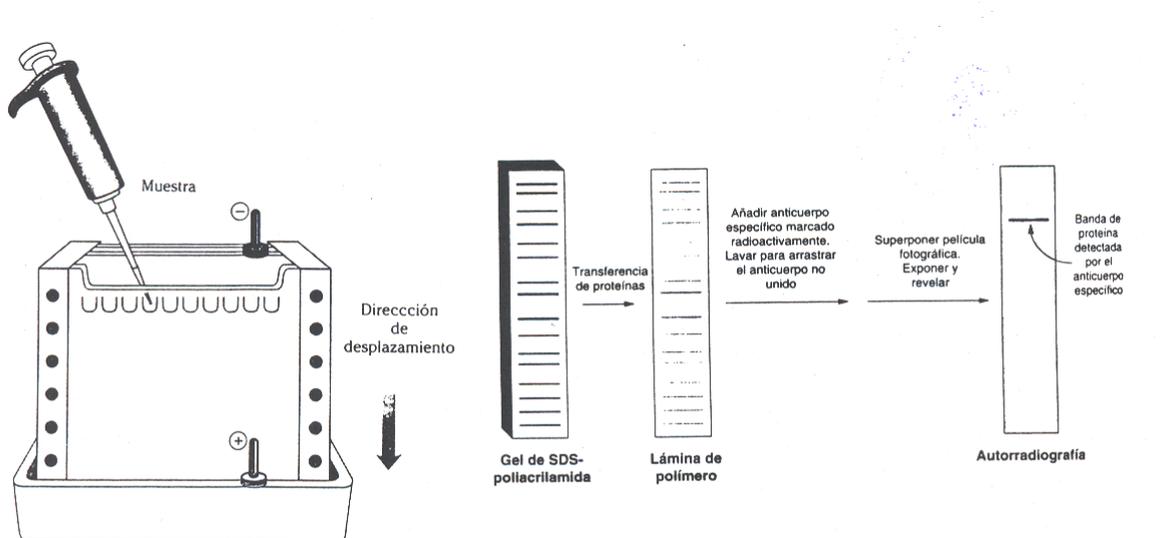
La muestra biológica se somete a electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE), separándose así las distintas proteínas que componen dicha muestra. Las proteínas se transfieren a continuación a una membrana de PVDF, a la que quedan unidas irreversiblemente la mayoría de las proteínas y donde son más accesibles al anticuerpo específico que se utilizará en la etapa siguiente.

## **2.- Unión de la proteína al anticuerpo:**

La membrana se incuba en una solución del anticuerpo específico para la proteína de interés. Este anticuerpo se unirá sólo a esta proteína, que estará localizada en una zona determinada de la membrana de PVDF.

## **3.- Detección del complejo proteína-anticuerpo:**

El complejo proteína-anticuerpo puede detectarse si el anticuerpo ha sido previamente marcado con un isótopo radiactivo, lo que dará lugar a una banda oscura en una película de rayos X puesta en contacto con la membrana, o bien incubando la membrana con un segundo anticuerpo específico para el primero. Este segundo anticuerpo puede estar unido a un isótopo radiactivo, como veíamos para el primer anticuerpo, o a un enzima que catalice la formación de un compuesto coloreado o una reacción de emisión de luz.



## PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

### 1. Electroforesis y transferencia de proteínas

#### PASO 1: PREPARAR EL GEL DE POLIACRILAMIDA

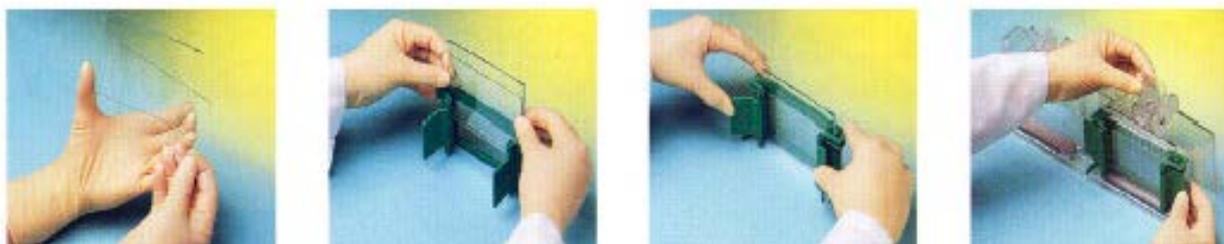
La electroforesis de proteínas se lleva a cabo normalmente en geles de poliacrilamida. La poliacrilamida actúa como una criba molecular, retrasando el desplazamiento de las proteínas de una forma aproximadamente proporcional a su masa molecular. Escogiendo distintas concentraciones de acrilamida y metilbisacrilamida (reactivo que establece enlaces cruzados entre las moléculas de acrilamida) pueden conseguirse tamaños de poro controlados.

La electroforesis se lleva a cabo en condiciones desnaturizantes, añadiendo a la mezcla de proteínas dodecilsulfato sódico (SDS), detergente aniónico que rompe interacciones no covalentes entre proteínas, y  $\beta$  mercaptoetanol o ditiotreitól (DTT) para reducir los puentes disulfuro. Los aniones SDS se unen a la proteína desnaturizada (1 SDS por cada 2 aminoácidos) dando un complejo SDS-proteína con una gran carga negativa. Esto enmascara la carga intrínseca de la proteína. Se altera además la conformación nativa de las proteínas adoptando casi todas las proteínas una conformación similar. Por lo tanto, la electroforesis en presencia de SDS separa las proteínas casi exclusivamente en función de su masa molecular (tamaño y no de su carga), de forma que los péptidos pequeños se desplazan hacia el ánodo más rápidamente que los de mayor tamaño.

En esta práctica se realizará una electroforesis a pH discontinuo que permite una mejor resolución de las bandas. Esta técnica precisa de un sistema de varios tampones y dos geles diferentes: el "gel separador" de poro pequeño en el que tiene lugar la separación de las proteínas de la mezcla y el "gel concentrador", de poro más grande en el que las proteínas de la muestra se concentran en bandas estrechas antes de penetrar en el gel separador.

#### **Preparar los cristales**

Colocar los cristales en el soporte de polimerización según el dibujo:



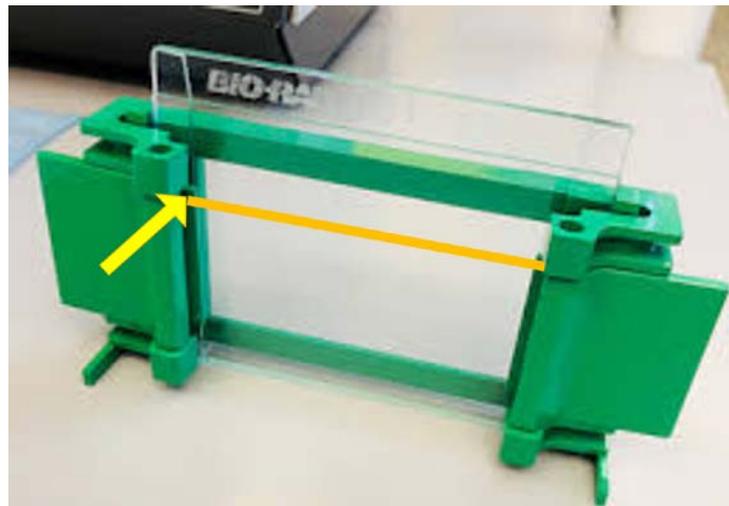
**Soluciones empleadas (USAR GUANTES. La acrilamida es NEUROTÓXICA, en estado líquido, al contacto con la piel):**

- **Solución A:** acrilamida al 30 % (p/v) y bisacrilamida al 0.8 % (p/v) en agua destilada
- **Solución B:** Tris 1.0 M, pH 8.8.
- **Solución C:** Tris 1.0 M, pH 6.8
- **Persulfato amónico (APS):** 15 mg/ml en agua destilada. Se prepara en el momento y es un agente generador de radicales libres
- **Tetrametiletilendiamina (TEMED):** catalizador de la reacción de polimerización

(1º) Gel	Cantidades para 1 gel							Vol. total
	Sol. A	Tris pH 8.8	Tris pH 6.8	SDS 10%	H <sub>2</sub> O	TEMED 5%	APS	
<b>Separador (10%)</b>	2664 $\mu$ l	3000 $\mu$ l	---	80 $\mu$ l	1896 $\mu$ l	120 $\mu$ l	240 $\mu$ l	8 ml

- En un tubo, mezclar todos los ingredientes SALVO EL TEMED Y EL APS (disparan la reacción de polimerización en minutos. Sólo se añaden cuando se tenga todo listo para preparar los geles). Mezclar

- Se aplican la solución del gel separador entre los dos cristales hasta 2-3 mm por debajo de la pieza verde del soporte



- Inmediatamente después se añade isopropanol para conseguir un frente "liso".
- Se deja polimerizar en un sitio cálido
- Una vez polimerizado el gel, se lava el isopropanol con agua destilada.

	Cantidades para 1 gel							
(2º) Gel	Sol. A	Tris pH 8.8	Tris pH 6.8	SDS 10%	H <sub>2</sub> O	TEMED 5%	APS	Vol. total
<b>Concentrante (4%)</b>	<b>530 µl</b>	---	<b>460 µl</b>	<b>40 µl</b>	<b>2610 µl</b>	<b>240 µl</b>	<b>120 µl</b>	<b>4 ml</b>

- En un tubo, mezclar todos los ingredientes SALVO EL TEMED Y EL APS (disparan la reacción de polimerización en minutos. Sólo se añaden cuando se tenga todo listo para preparar los geles). Mezclar
- Añadir la mezcla poco a poco evitando las burbujas hasta que rebose por el borde superior
- Se introduce el peine entre los dos cristales para formar los pocillos donde se depositarán, posteriormente, las muestras.
- Se deja polimerizar.
- Se saca el peine con cuidado de no introducir burbujas de aire dentro de los pocillos y se monta el sistema de electroforesis en la cubeta.

#### Armado de la cámara de electroforesis

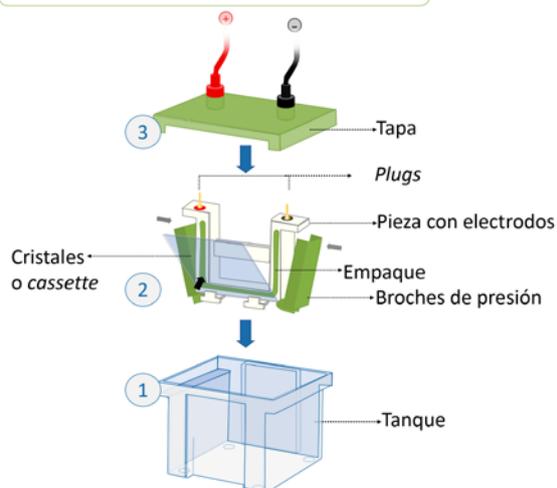
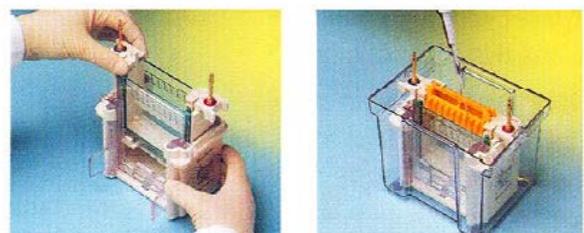


Imagen: Alberto Checa

Cámara interna



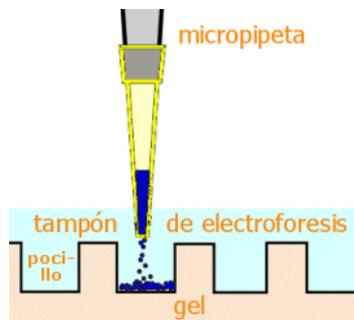
## PASO 2: PREPARAR LAS MUESTRAS

Las muestras se diluyen 3:1 en un tampón de aplicación (TAMPÓN DE APLICACIÓN 3X) que contiene glicerol o sacarosa para aumentar la densidad de la disolución e impedir que éstas se mezclen con el tampón de electroforesis. El tampón contiene también un colorante, azul de bromofenol, que permite visualizar el frente del gel y seguir el desarrollo de la electroforesis. Una vez diluidas las muestras se calientan a 90°C, 5 min. y se aplican en muescas (pocillos) preformados en la parte superior del gel concentrante.

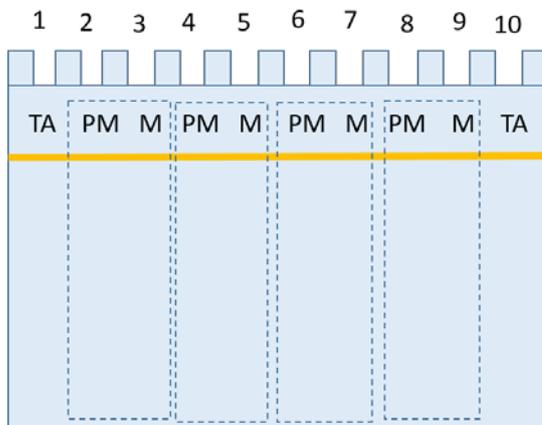
Previamente, ha sido necesario medir la cantidad de proteínas que contiene nuestra muestra, de manera que hemos ajustado nuestro extracto para que se carguen 20 µg de proteínas totales.

- MUESTRA: 160 µl de muestra + 80 µl de tampón 3X. → Para 6 aplicaciones
- PATRÓN PESOS MOLECULARES (P): 30 µl de patrón + 90 µl de tampón de aplicación 1X

→ Se cargan 20 µl de cada uno por pocillo. Se usan puntas especiales para cargar geles.



→ Seguir el siguiente esquema de carga para los dos geles:



**TA:** Tampón de aplicación 1X  
**PM:** Patrón de pesos moleculares  
**M:** Muestra

## PASO 3: CORRER LA ELECTROFORESIS

Se programa la fuente de alimentación a 25 mA por gel. Como son dos geles, se programará a 50 mA. Se deja correr 45 minutos, más o menos, o hasta que el frente de azul de bromofenol salga del gel.

## PASO 4 : PREPARAR LA TRANSFERENCIA

Una vez separadas las proteínas por sus distintas masas moleculares, se transfieren a una membrana de PVDF. Las proteínas están unidas al detergente SDS y por lo tanto cargadas negativamente. Al aplicar un campo eléctrico perpendicular al plano del gel migrarán hacia el polo positivo, donde está la membrana. La membrana de PVDF, colocada entre el gel y el polo positivo, retendrá las proteínas manteniendo la resolución por peso molecular obtenida en la electroforesis.

## → USAR SIEMPRE GANTES

1. cortar la membrana de PVDF en un rectángulo de 8.5x5.5 cm
2. cortar el papel de filtro Whatman 3MM en rectángulos de 10x7 cm
3. sumergir la membrana de PVDF durante 5 segundos en metanol al 100%
4. lavar la membrana de PVDF con agua destilada (1 minuto, mas o menos)
5. equilibrar la membrana de PVDF 15 minutos en tampón de transferencia
6. equilibrar el papel de filtro y las esponjas también durante 15 minutos en buffer de transferencia.
7. tras la electroforesis, sacar el gel y preparar el *sándwich*:

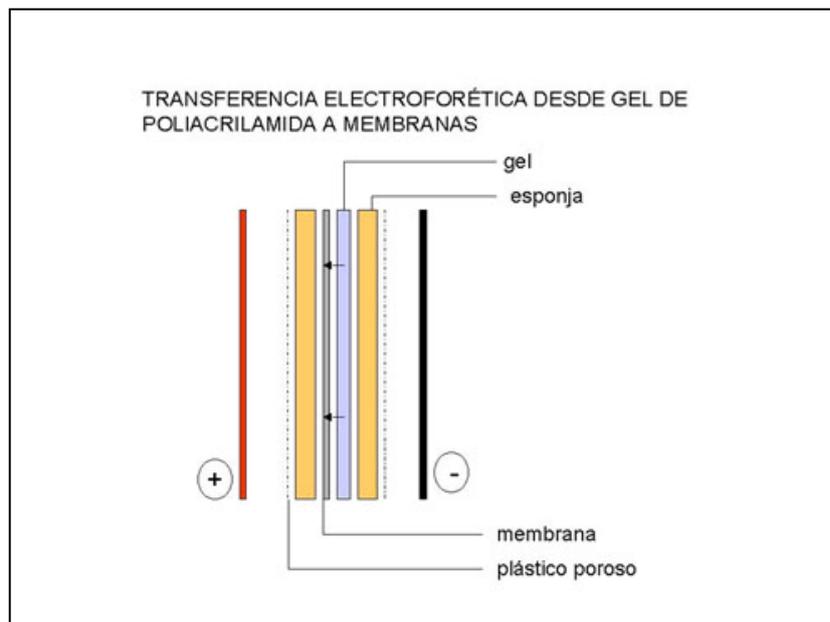
sobre la parte negra:

- esponja
- papel de filtro
- gel
- membrana
- papel de filtro
- esponja

**PASAR EL RODILLO PARA ELIMINAR LAS  
POSIBLES BURBUJAS**

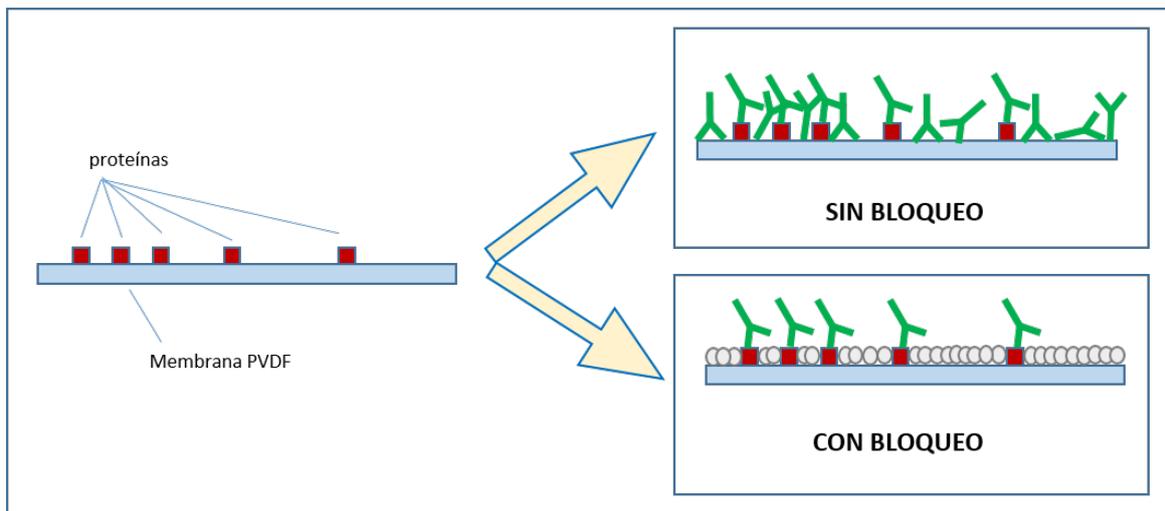
8. Colocar en la cubeta de transferencia y conectar la fuente de alimentación. 2 opciones:
  - a) 2 horas a 125 V ó
  - b) 20 horas a 30 V

## → MANTENER SIEMPRE EN FRIO (4°C)



## PASO 5: BLOQUEAR LA MEMBRANA

La membrana de PVDF se caracteriza por tener una elevada avidéz por las proteínas. Esta propiedad es de la que nos aprovechamos para que las proteínas queden retenidas en dicho soporte. Pero previamente a exponer estas proteínas, ya separadas según su peso molecular, a una solución que contenga un anticuerpo específico, es necesario este paso previo de bloqueo de la membrana. La razón es que los anticuerpos también son proteínas, y si los huecos que quedan entre las proteínas transferidas no son ocupados, los anticuerpos quedarían unidos de manera inespecífica. Por lo tanto, usaremos una solución de leche en polvo disuelta en tampón, ya que la leche es una sustancia muy rica en albúmina, una proteína que "rellenará" los huecos que han quedado en la membrana.



- Desmontar el *sándwich* y colocar la membrana en solución de bloqueo y dejarlo:
  - a) toda la noche a 4°C (nevera) ó
  - b) 90 minutos a 37°C

## 2. Unión de la proteína al anticuerpo

### PASO 6: ANTICUERPO PRIMARIO

Para poder interpretar posteriormente los resultados, es necesario usar un “control de carga”. En este caso, será una proteína ubicua en todas las células y que no cambia con el procedimiento experimental, que permanece constante: la proteína del citoesqueleto celular  **$\beta$ -actina**.

Nos servirá para hacer un análisis semicuantitativo de la cantidad de proteína presente en nuestra muestra. Es decir, que la cantidad de nuestra proteína de estudio (GAD65/67) será siempre en referencia a la cantidad de  $\beta$ -actina, nos servirá para “normalizar” los resultados.

De esta manera nos aseguramos que eliminamos la variabilidad de la señal que pueda deberse a:

- a. La cantidad de muestra cargada
  - b. La eficacia de la transferencia a la membrana
  - c. La detección de la señal a lo largo de la membrana (exposición al sustrato, fondo elevado de manera no uniforme, etc.)
- Preparar el anticuerpo en solución de bloqueo a la concentración requerida
 

Anticuerpo anti-GAD 65/67 1/2500	→	2 $\mu$ l de anticuerpo
		5 ml de solución de bloqueo
Anticuerpo anti- $\beta$ actina 1/2500	→	2 $\mu$ l de anticuerpo
		5 ml de solución de bloqueo
  - Añadir 5 ml por membrana (o proporcionalmente a la fracción de membrana) y sellar las bolsas.
  - Incubar:
    - a) **DOS** horas, en agitación y a temperatura ambiente ó
    - b) **Toda la NOCHE**, en agitación, a 4°C

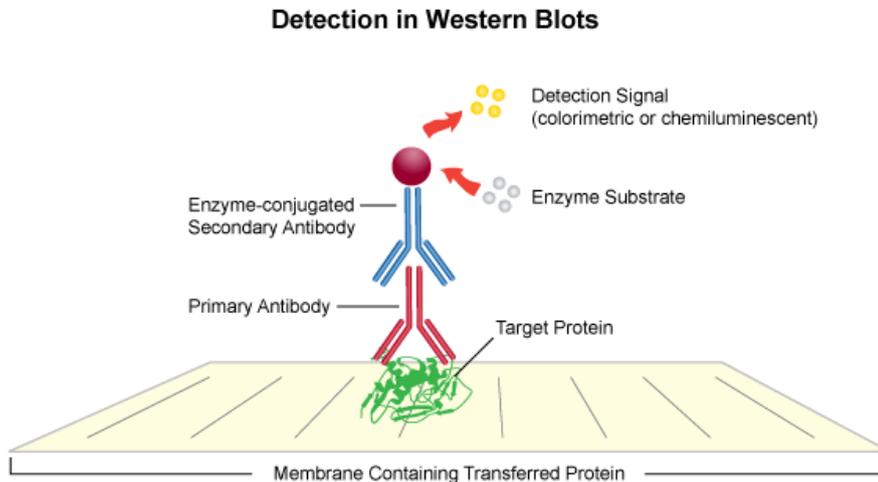
### **LAVADOS CON TWEEN 20 AL 0.1%**

Un primer lavado de 10 minutos. En agitación.

Dos lavados más de 5 minutos cada uno. En agitación.

## PASO 7: ANTICUERPO SECUNDARIO

El anticuerpo secundario se une al primario (específico para cada proteína) y se utiliza para proporcionar una mayor sensibilidad a través de la amplificación de la señal. Para ello, el anticuerpo secundario debe estar unido a un fluoróforo o a un enzima, que posteriormente se pueda detectar. Las enzimas que habitualmente se utilizan son la fosfatasa alcalina (FA) y la HRP (HorseRadish Peroxidase). Según el sustrato al que se expongan, generarán una señal colorimétrica (FA) o quimioluminiscente (HRP)



Los anticuerpos secundarios tienen especificidad por los anticuerpos de una especie determinada (ej anticuerpo anti-ratón, anticuerpo anti-conejo...). Es decir, que si usamos varios anticuerpos primarios generados en distintas especies, necesitaríamos un anticuerpo secundario distinto para cada uno.

La proteína A es una proteína bacteriana extraída de la pared celular de *Staphylococcus aureus*, que tiene una gran afinidad por la fracción Fc de los anticuerpos tipo IgG de varias especies animales. Esto favorece el uso exclusivo de un anticuerpo secundario para “revelar” varios anticuerpos primarios, generados en distintas especies.

- Preparar el anticuerpo, según el método de revelado posterior elegido, en solución de bloqueo a la concentración requerida

<b>FOSFATASA ALCALINA</b> (1/2500)		<b>HRP</b> (1/2500)	
Prot A-FA	2 µl	Prot A- HRP	2 µl
Sol. Bloqueo	5 ml	Sol. Bloqueo	5 ml

- Añadir 5 ml de dicha solución por membrana o, proporcionalmente, a cada fracción de membrana y sellar las bolsas.
- Dejar **UNA** hora, en agitación y a temperatura ambiente.

### **LAVADOS CON TWEEN 20 AL 0.05%**

Un primer lavado de 10 minutos. En agitación.  
Dos lavados más de 5 minutos cada uno. En agitación

## **3. Detección del complejo proteína-anticuerpo**

## PASO 8: REVELADO DE LA ACTIVIDAD

## FOSFATASA ALCALINA

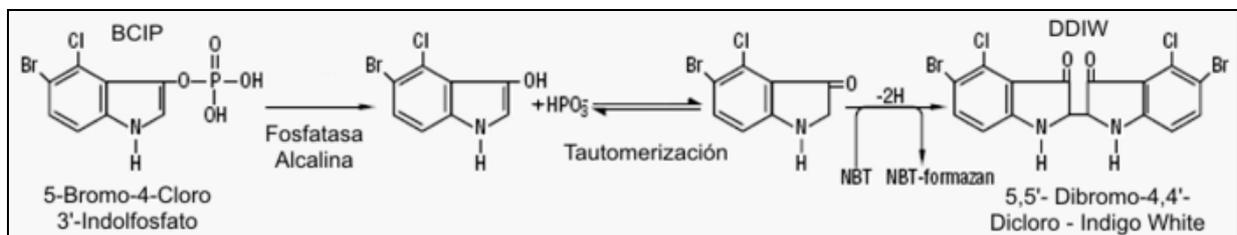
Preparar la solución de revelado:

- 100  $\mu$ l de NBT (nitro-blue tetrazolium) 30 mg/ml
- 100  $\mu$ l de BCIP (5-bromo-4-cloro-3'-Indolfosfato) 15 mg/ml
- 10 ml de tampón de revelado

- Por cada membrana (o proporcionalmente a cada fracción) se añaden 5 ml de solución de revelado y se sella la bolsa. La bolsa debe estar protegida de la luz mediante papel aluminio.
- Mantener en oscuridad a 37°C durante 20 minutos o hasta que aparezcan las bandas en la membrana.
- Para detener la reacción, lavar con agua destilada.

→ MANTENER SIEMPRE PROTEGIDA LA SOLUCIÓN DE REVELADO DE LA LUZ

\* Reacciones que originan el compuesto coloreado VIOLETA INSOLUBLE:

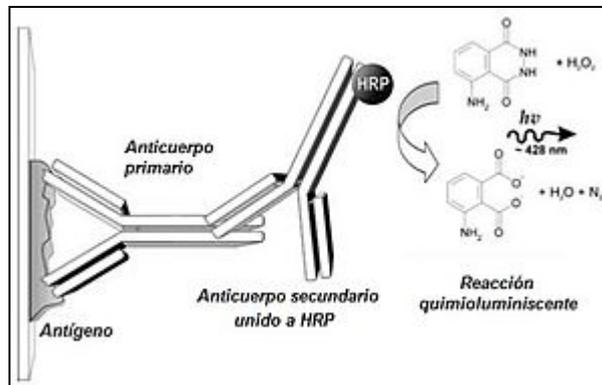


## HRP

➤ Preparar la solución de revelado:

- 2 ml de solución A del kit de revelado
- 2 ml de solución B del kit de revelado

- Por cada membrana (o proporcionalmente a cada fracción) se añaden 4 ml de solución de revelado y se sella la bolsa. La bolsa debe estar protegida de la luz.
- Mantener en oscuridad durante 5 minutos
- Eliminar el líquido de revelado de la bolsa y exponer la membrana a una película fotográfica, colocando ambas en un cassette de revelado. Exposición de 5 minutos
- Abrir el cassette y revelar la película en la máquina de revelado



→ MANTENER SIEMPRE PROTEGIDA LA SOLUCIÓN DE REVELADO DE LA LUZ. TRABAJAR EN CUARTO OSCURO

## **REACTIVOS**

- **Tampón de aplicación 3X**
  - o Tampón Tris–HCl 180 mM, pH 6.8
  - o Glicerol al 30 %
  - o Azul de bromofenol al 0.15 %
  - o SDS al 2%
  - o  $\beta$ -mercaptoetanol al 6%
  
- **Tampón de aplicación 1X**
  - o 1 partes de tampón 3X
  - o 2 parte de tampón Tris–HCl 180 mM, pH 6.8
  
- **Tampón de electroforesis**
  - o Tris 25 mM, pH 8.3
  - o Glicina 200 mM
  - o SDS al 10%.
  
- **Tampón de transferencia**
  - o Tris 25 mM, pH 8.3
  - o Glicina 192 mM
  - o Metanol al 20%
  
- **Solución de bloqueo**
  - o 5% leche en polvo desnatada
  - o TBS
  
- **TBS**
  - o Tris 25 mM, pH 7.4
  - o NaCl 137 mM
  - o Agua destilada
  
- **Tampón de revelado (Fosfatasa alcalina)**
  - o Tris 100 mM pH 9
  - o NaCl 100 mM
  - o MgSO<sub>4</sub> 5 mM

