

Prácticas de Metodología

Y

Bioquímica estructural

2. Cromatografía de filtración molecular.

En este tipo de cromatografía los componentes de una muestra se **separan de acuerdo a su tamaño y forma molecular. La base de esta cromatografía es el reparto que sufren las moléculas entre un solvente y una fase estacionaria contenida en una matriz de porosidad definida.** La columna se prepara con partículas de una sustancia inerte que contienen poros pequeños. Al pasar una disolución con moléculas de distintas dimensiones a través de la columna, las moléculas con un tamaño mayor que el de los poros se moverán sólo en el espacio que queda entre las partículas, y, por tanto, no sufrirán retraso en su recorrido a través del material de la columna. Sin embargo, las moléculas con un tamaño menor que el de los poros difunden hacia el interior y el exterior de las partículas con una probabilidad que aumenta a medida que disminuye el tamaño molecular. Por lo tanto, **las moléculas son eluidas de la columna por orden de tamaños decrecientes.**

Para un determinado tipo de columna o matriz se puede calcular un **parámetro K_{av}** de elución de una determinada molécula. La representación gráfica de K_{av} con respecto al logaritmo del peso molecular da una línea recta. Este parámetro se define como:

$K_{av} = (V_e - V_o) / (V_t - V_o)$ donde,

V_e = volumen de disolvente necesario para eluir las moléculas de interés.

V_o = volumen vacío o volumen necesario para eluir una molécula que nunca entra en la fase estacionaria.

V_t = volumen total de columna.

Material de la práctica.

- Tampón PBS (0,1 M de tampón fosfato; 0,15 M de NaCl pH 7.2).
- Sephadex G-100.
- Azul dextrano (10 mg/ml). 2.106 Da
- Rojo fenol (10 mg/ml). 345 Da
- Lana de vidrio.
- Columnas de vidrio.

2.1.Preparación de la columna de Sephadex G-100.

Nombre comercial de una matriz comercial constituida por polímeros de dextrano entrecruzados por epíclorihidrina. El grado de entrecruzamiento va a determinar el tamaño poro y éste va a determinar el rango de fraccionamiento de tamaños moleculares. Esta resina permite separar proteínas globulares cuyo peso molecular esté entre 4.000 y 150.000 Da. **Esto último quiere decir que moléculas mayores de 150.000 Da serán incapaces de entrar en el poro de la matriz.**

Preparación de la columna en la práctica.

- Previamente, a 1,5 gramos de resina sephadex G-100 se le añaden 50ml de tampón PBS y se deja esponjar

72 horas. Paso realizado por los profesores de prácticas.

El esquema de la columna es:

Los pasos que se siguen para preparar la columna para la filtración molecular son:

- Se añaden a la columna, con la pinza cerrada, 25 ml de PBS y se hace una señal de la altura a la que llegan en la columna esos 25 ml. Esta marca será la altura hasta la que debe llegar la resina en la columna.
- Poner lana de vidrio en la parte de debajo de la columna, para que, al añadir la resina, esta última quede retenida por la lana.
- El sephadex suspendido en PBS se echa en la columna, al principio en grandes cantidades y después poco a poco con pipeta Pasteur, hasta que la resina llegue a la marca anteriormente mencionada. Hay que tener extremo cuidado de que la columna no pierda demasiado PBS y se seque, de modo que siempre tiene que haber algo de PBS por encima del frente de compactación de la resina. También hay que tener cuidado al echar la suspensión de la resina para que no se formen burbujas en la columna, ya que estas burbujas dificultarían la elución de la muestra a través de la columna.

Lo que sucede al echar la resina en suspensión y abrir la pinza es que el PBS pasa a través de la lana de vidrio y se pierde, mientras que la resina queda retenida por la lana y se va empaquetando poco a poco.

Terminado el empaquetamiento, siempre poniendo más PBS por encima del frente del empaquetamiento para que la resina no se seque, se añaden unos ml de PBS por encima de la marca que hicimos. Después se pone parafilm y se deja hasta el día siguiente.

Incidencias.

- Rotura de una pipeta Pasteur. Fragmento de unos 4 ó 5 cm que quedó incluido en la resina, por debajo de la mitad de la columna.
- A la altura de ese fragmento de la pipeta hay unas burbujas no demasiado grandes y no en demasiada cantidad.
- En la parte superior de la columna se observan algunas burbujas pero muy separadas y pequeñas. Creemos que no estaban en un número suficiente ni tenían un tamaño suficiente para que la separación de proteínas se viera muy perturbada.
- Suciedades y partículas, (pelillos o fibras), podrían haber entrado en la columna por falta de limpieza en el material del que disponíamos.

2.2. Equilibrado de la columna.

Después del empaquetamiento tenemos que equilibrar la columna.

Procedimiento.

- Abrimos la llave para que salga el PBS sobrante hasta que queden 1 ó 2 mm por encima del frente de la resina.
- Se procede a la colocación en la superficie de la resina de 200 l de una mezcla con 40 gr de azul dextrano, cuyo peso molecular es 2 millones g/mol, y 20 gr de rojo fenol, cuyo peso molecular es de 345 g/mol.
- Se abre la pinza para que entre la muestra en la resina pero teniendo cuidado de que no se seque la resina, puesto que al eluir la muestra estamos eluyendo también el PBS. Tenemos que añadir PBS para que la resina no se seque, pero esperando a que hallan entrado los colorantes. Esta adición de PBS se debe realizar poco a poco, pues si echamos mucho PBS o lo echamos a destiempo podemos diluir la muestra de colorantes, de modo que no entre todo a la vez en la resina y, como consecuencia, la elución no sería

correcta.

- Una vez que se abre la pinza y la muestra ha entrado en la resina comenzamos a recoger fracciones de 1,5 ml en tubos de ensayo hasta que salga la fracción con más cantidad de rojo fenol.
- Después se cuenta el número de fracciones hasta que salga el azul, que debería salir en una sola fracción (que fue lo que nos pasó), y se multiplica ese número de fracción por 1,5, obteniéndose así el volumen de elución del azul dextrano, que tomaremos como el volumen inicial, V_o , el que nos marcará el volumen a partir del cual podremos obtener proteínas al eluir la muestra problema.
- La misma operación se hace con el rojo fenol, con la única diferencia de que el rojo se recoge en un volumen de elución mucho mayor que el del azul, puesto que al ser el rojo una molécula mucho menor pasa por la columna más despacio. Al multiplicar por 1,5 el número de la fracción con más cantidad de rojo fenol tenemos el volumen de elución del rojo, que nos dice el volumen total, V_t , que nos marcará el volumen hasta el que las proteínas problema pueden eluir, por encima del cual no deberían eluir proteínas.

Los colorantes nos sirven para delimitar el intervalo de volúmenes entre los que deben eluir nuestras proteínas, puesto que sus pesos moleculares se encuentran entre los del azul y los del rojo, y la columna separa las proteínas en función de su peso molecular.

Aunque cogimos 2 ml por encima y por debajo de esos V_o y V_t para estar seguros de que recogemos las proteínas, esto no debería ser necesario si la elución es correcta.

Resultados del equilibrado de la columna.

$V_eA = V_o = 6 \times 1,5 \text{ ml} = 9 \text{ ml}$, pues recogimos el azul en la fracción 6.

$V_bR = V_t = 16 \times 1,5 \text{ ml} = 24 \text{ ml}$, pues recogimos el rojo en la fracción 16.

Según estos datos tendremos que recoger **15+2+2 ml** de nuestra muestra para recoger las proteínas.

2.3.Separación de proteínas.

Procedimiento.

- Después de recoger el rojo, hay que lavar con PBS la columna para eliminar el resto de rojo y limpiar la columna. La teoría decía que teníamos que lavar con 20 ml de PBS, pero no lo hicimos así, simplemente lavamos con lo que íbamos echando para eluir el rojo y luego añadimos sólo algunos ml de PBS (por indicación del profesor).
- La metodología para la separación de proteínas es la misma que para el equilibrado. Dejamos eluir el PBS que quedaba después del equilibrado hasta que queden 1 ó 2 mm por encima del frente de la resina. Después aplicamos 200 l de la muestra problema con proteínas. Abrimos la pinza y dejamos que entre la muestra en la resina sin que esta última se seque y sin echar demasiado PBS que diluya mucho la muestra.
- De esta muestra hay que recoger fracciones de 1 ml en tubos ependorf, estos últimos debidamente marcados con su número de fracción y pareja de prácticas. La columna separará las proteínas en función de su tamaño, de modo que las de mayor tamaño eluirán antes y estarán en las primeras fracciones, y las menores estarán en las últimas. Esto último siempre dentro del intervalo V_o-V_t .

Según los volúmenes calculados en el equilibrado nosotros teníamos que recoger la primera fracción 7 ml después de aplicar la muestra en la columna, con lo que recogimos 19 fracciones de 1 ml en el intervalo de volúmenes 7-26 ml.

Una vez que recogimos estas 19 fracciones, los ependorf se colocaron en una gradilla y se llevaron las fracciones al frigorífico. El dejar las proteínas a 4°C se realiza para evitar que las proteínas se desnaturalicen y pierdan su actividad, ya que la filtración molecular separa las proteínas en su estado nativo. El que las

proteínas estén en su estado nativo y que conserven su funcionalidad nos sirve para poder identificar en las fracciones determinadas actividades enzimáticas.

Valores de Kav					
A	0	F6	0,2	F12	0,67
F3	0	F7	0,33	F13	0,733
F4	0,066	F10	0,53	F14	0,8
F5	0,133	F11	0,6	R	1

Incidencias.

- Quedo algo de rojo fenol entre la lana de vidrio y eluyó junto con las primeras fracciones de la muestra. Como consecuencia de esto en las dos primeras fracciones recogidas había algo de rojo, pero este colorante al no tener naturaleza proteica no interfiere o falsea los datos de la absorbancia obtenida en la prueba de Bradford.
- La elución del rojo y del azul se hizo bien, pero el rojo al llegar a la altura del trozo de Pasteur rota difundió un poco y no iba tan junto o compacto que al principio, en cambio el azul no sufrió ninguna difusión. No sabemos si la punta pudo influir negativamente en la separación de las proteínas por la columna de resina.

2.4.Regeneración de columna.

Paso realizado por los profesores, consistente en vaciar la columna con ayuda de PBS, para que la resina no se seque, para ser reutilizada. Después se quita la lana de vidrio y se lava la columna.

3.Determinación de proteínas y actividades enzimáticas.

3.1. Método de Bradford.

Este es uno de los métodos con mayor sensibilidad para la determinación de proteínas.

Una de las cuestiones que se nos pedían para este punto es la de encontrar el fundamento de este método, pero a pesar de disponer del artículo original de Bradford y del libro de instrucciones del reactivo de Bradford comercializado por Bio-Rad, nos ha sido imposible saber cuál es el tipo de interacción que le permite al azul brillante de Coomassie unirse a las proteínas, lo cual sí se sabe en los otros métodos de este tipo conocidos (Lowry, Biuret). Está claro que al unirse a la proteína, este reactivo, sufre un cambio en su máximo de absorbancia que es el que medimos con el espectrofotómetro, y que es proporcional, por tanto, a la cantidad de proteína. Así, cuánto más proteína halla en la disolución más cambio en la absorbancia habrá, es decir, más absorción habrá en el nuevo máximo que es 595 nm. El cambio es de 465 a 595 nm.

Según lo encontrado en la bibliografía utilizada, podemos decir de este método que:

- Es un ensayo de unión proteína colorante basado en el diferencial cambio de color de un colorante en respuesta a varias concentraciones de proteína. Este es un método de determinación de proteínas que implica la unión de Azul Brillante de Coomassie G-250 con las proteínas. Esta unión del colorante con las proteínas provoca un cambio en el máximo de absorción del colorante desde 465 a 595 nm. Por lo tanto, se basa en la observación de que el Azul Brillante de Coomassie G-250 existe en dos formas con colores diferentes, rojo y azul. La forma roja se convierte en azul cuando se une el colorante a la proteína.
- El complejo colorante-proteína tiene un alto coeficiente de extinción lo cual es imprescindible aumentar la sensibilidad en la medición de proteínas.

- La unión colorante–proteína es un proceso muy rápido (2min) y el complejo permanece estable durante un tiempo relativamente largo, una hora. Haciendo de este un proceso muy rápido, y que no requiere un tiempo crítico para el ensayo.
- Se pueden utilizar un gran número de muestras (muy reproducible) y es adaptable a la automatización.
- Es un ensayo que elimina casi todos los problemas que había anteriormente con es tipo de ensayos.
- Las interferencias o no existen o son mínimas por cationes tanto sodio como potasio y carbohidratos como la sacarosa. Otras sustancias que interfieren en el ensayo son los agentes fuertemente alcalinos (cuestión fácilmente solventable con la utilización de tampones). Los únicos componentes encontrados que dan una excesiva interferencia en el color del ensayo, son grandes cantidades de detergentes como el SDS, Triton X–100, etc.
- Preparación del colorante. Azul Brillante de Coomasie G–250 (100mg) es disuelto en 50 ml de etanol 95%. A esta disolución se le añade 100ml de ácido fosfórico 85% p/v. La solución resultante se diluye llevándola hasta un litro de volumen final. La concentración en la disolución final es 0,01% p/v de azul, 4,7% p/v de etanol y 8,5 % p/v de ácido fosfórico.
- Una dificultad observada en la realización del ensayo es la tendencia del complejo colorante–proteína a unirse a las cubetas. Esto resulta en una cubeta coloreada de azul: la cantidad de unión es poco importante en lo que se refiere al resultado del ensayo. Se suele lavar el tubo o cubeta con agua destilada entre medidas de diferentes muestras. Este azul se puede quitar y las cubetas se reutilizan sin problemas.
- La sensibilidad del ensayo depende de la naturaleza de la proteína, y en muestras complejas (aunque no es nuestro caso), en las cuales las proteínas se diferencian ampliamente en su respuesta al ensayo, puede ser difícilmente cuantificable. Sin embargo, recientes modificaciones en el ensayo han mejorado su eficacia en estas aplicaciones. Se aplica una cierta cantidad de SDS, el cual por si mismo causa una falta de desarrollo de color, es añadido a la muestra o al colorante. El SDS iguala la reactividad de las distintas proteínas, así que el ensayo puede ser utilizado para mezclas de proteínas. Esta igualdad produce tanto una disminución de la reactividad de proteínas con alta respuesta, como la albúmina, como un incremento en la reactividad en las proteínas con baja respuesta.
- Aplicaciones: Cromatografía, electroforesis, soluciones de proteínas complejas, química clínica, adaptable a la automatización.

Material de la práctica.

- Reactivo de Bradford
- PBS
- Albúmina bovina.
- Fracciones de proteína.
- Espectrofotómetro.
- Tubos de espectrofotómetro.

Procedimiento.

- Preparar las muestras que tenemos que medir para la determinación de proteínas. Tenemos que tomar alícuotas de 500 l de cada fracción.(5).
- Añadir a esas alícuotas 3,5 ml de PBS.
- Añadir 1ml de reactivo de Bradford. (6). Después de esto tenemos en cada tubo 5 ml. Esto último es importante, ya que todos los tubos deben tener la misma concentración para que la medida de la concentración de proteína sea correcta.
- Después ésta disolución se mezcla bien en el vortex.
- Preparar una curva patrón en la que conocemos las cantidades de proteína que ponemos y medimos su absorbancia. Esta nos servirá para extrapolar, a partir de la curva, los valores de concentración de proteína en las fracciones, sabiendo sus valores de absorbancia. La curva se prepara a partir de una disolución stock que tiene 100 gr/ml, de modo que preparamos seis tubos con cantidades crecientes de albúmina(unos sin

nada que utilizaremos como nuestro cero), y los llevamos a 4 ml con PBS y después les añadimos 1 ml de reactivo Bradford.

- Es muy importante añadir el Bradford a la vez en todos los tubos, tanto en los tubos de la curva patrón como en los de las fracciones. Así todos los tubos se disparan a la vez y la medición de la absorbancia es fiable y correcta. Este hecho es una consecuencia de la cinética característica de esta reacción, ya que cuanto más tiempo transcurre más intenso es el color de la disolución. Por eso, se preparan todos los tubos y después se añade a todos los tubos el reactivo.
- Medir los valores de absorbancia de los distintos tubos.
- Representar con los datos de D.O.: **1. D.O. frente nº fracción; 2. D.O. frente [prot]; 3. [prot] frente nº fracción.**

Resultados del patrón obtenidos a partir de la mesa 3C.

Tubo	Concentración Albúmina	ABS595
1	0	0
2	20 g/ml, 200 l de stock	0,336
3	40 g/ml, 400 l de stock	0,542
4	60 g/ml, 600 l de stock	0,662
5	80 g/ml, 800 l de stock	0,701
6	100 g/ml, 1000 l de stock	1,02

Resultados de absorbancia de las muestras.

Tubo	Absorbancia	Tubo	Absorbancia
1	-0,123	11	0,370
2	-0,212	12	0,313
3	0,783	13	0,272
4	-0,192	14	0,178
5	-0,182	15	-0,014
6	-0,197	16	-0,062
7	0,82	17	-0,125
8	-0,011	18	-0,158
9	0,074	19	-0,183
10	0,280		

Incidencias.

- Problemas con los espectrofotómetros, pues algunos no funcionaban (incomprensiblemente) y otros daban medidas extrañas e ilógicas. Además de la falta de aparatos disponibles. Al final medimos en uno que medía perfectamente, aparentemente.
- Fallo al preparar las muestras de las fracciones 4,5, y 6. Este fallo nos impidió ver si tenían proteína esas fracciones y complicó mucho la realización del cuaderno. Deducimos que debían tener proteínas a partir de la gráfica D.O. frente al número de fracción, pues estas fracciones quedaban dentro del primer pico que aparecía en esta gráfica. Después comprobamos que si tenían proteínas al correr el gel de acrilamida.
- Entendimos mal la aclaración del profesor, en la que decía que había que diluir 1/10 las muestras de la curva patrón si la segunda (la primera después del blanco) daba un valor de absorbancia de 1,3 o 1,4, aproximadamente. Pero nosotros al entender mal, diluimos las muestras patrón, 1/10, al obtener en la

tercera muestra 1,2. Después de esta dilución, las medidas resultaron totalmente incoherentes. Por la falta de tiempo y por los nervios, no fuimos capaces de resolver este problema y decidimos tomar, como nuestra, la recta patrón de la mesa 3C, y medir con su mismo aparato y con el mismo tubo.

3.2. Determinación de la actividad catalasa.

Un método rápido para la determinación de la proteína catalasa es la observación de su actividad por la formación de burbujas en una solución que contiene H₂O₂.

Procedimiento.

- Preparar un tubo con 1 ml de una solución constituida por 1 ml de PBS + 10% de H₂O₂.
- Añadir 100 l de las fracciones que, después de la realización del método de Bradford, sepamos que contienen un alto contenido en proteínas.
- Aquellas fracciones que contengan catalasa producirán un burbujeo instantáneo en la solución.

Resultados de la prueba de la catalasa.

Tubo	Actividad Catalasa	Tubo	Actividad catalasa
Muestra	+ + + + + + + + +	10	–
3	+ + + + + + + +	11	–
4	+ + + + + +	12	–
5	+ + + +	13	–
6	+ +	14	–
7	+		

Según los resultados obtenidos en la prueba tenemos que la catalasa se encuentra en las primeras fracciones sobre todo en la 3 y en la 4 que se corresponde con el mililitro 9 y 10. Esto nos dice que la catalasa es una proteína de gran peso molecular al eluir pronto en la columna. Con la columna separamos las proteínas en fracciones según su peso y después con experimentos como este y como el siguiente de la lisozima, identificamos la presencia de determinadas proteínas en esas fracciones.

3.3. Determinación de la presencia de lisozima.

Un método rápido para la determinación de la actividad lisozima es la medida de la disminución de turbidez de una suspensión de pared bacteriana al agregar dicha proteína. Al incubar la suspensión con lisozima la pared celular se hidroliza originando fragmentos pequeños, reduciéndose la dispersión de la luz lo que se manifiesta en **una reducción de la absorbancia a la longitud de onda de 450 nm.** Así, **la actividad enzimática será, por lo tanto, proporcional a la disminución en absorbancia.**

En nuestro caso concreto se va a analizar la presencia de esta enzima en las mismas fracciones en las que realizamos el ensayo de la catalasa.

Procedimiento.

- Colocar 100 l de la fracción sobre un tubo que contenga 5 ml de suspensión de pared bacteriana, mezclar e incubar a temperatura ambiente durante 15 min.
- Como tubo blanco tomamos uno solamente con la suspensión que nos dará el máximo de absorbancia. Para el ajuste a 0 del densiómetro o espectrofotómetro se utilizará el tubo en el que se colocaron 100 l de la muestra inicial, que lógicamente tendrá un máximo de actividad lisozima (sí es que esta proteína existiera en la muestra).

- Medir DO450.

La suspensión de pared bacteriana se prepara a partir de la pared del microorganismo *Micrococcus lysodeikticus* (preparado comercial). 20 mg de este preparado se mezclan con 100 ml de tampón fosfato (100 mM; pH 6.2). (A nosotros se nos dio la suspensión ya preparada).

Los resultados de este ensayo.

Tubo	Absorbancia	Actividad	Tubo	Absorbancia	Actividad
Muestra	0,00	100%	Blanco	0,38	0%
3	0,38	0%	10	0,285	25%
4	0,378	0,52%	11	0,28	26,3%
5	0,373	1,8%	12	0,242	36,3%
6	0,375	1,3%	13	0,28	26,3%
7	0,377	0,78%	14	0,307	19,21%

Para calcular la actividad de cada fracción tenemos que utilizar una regla de tres inversa.

Se puede ver como en este caso la actividad lisozima se encuentra en las fracciones 10, 11, 12, 13, 14 que se corresponden con los mililitros 16, 17, 18, 19, 20. Esta es, por tanto, una proteína de menor tamaño que la catalasa. El hecho de identificar en estos dos grupos de fracciones dos proteínas, mediante los ensayos de actividad, no quiere decir que no pueda haber más proteínas en esas fracciones, pues al separar las proteínas en función del peso molecular, puede haber en esas fracciones otras proteínas a parte de las ya mencionadas, con pesos parecidos. Los dos grupos de fracciones se corresponden, como ya vimos, con dos picos en la gráfica de D.O. frente a número de fracción, que son las fracciones donde hay mayor concentración de proteínas y con las que tenemos que trabajar para ver cuántas y cuáles son las proteínas presentes en ellas.

6.Detección inmunológica de proteínas.

En ocasiones, cuando la cantidad de **material biológico disponible es pequeña**, muchos de los métodos químicos habituales para la identificación de moléculas fracasan. Los **procedimientos inmunológicos** dan solución a estas dificultades, pues **posibilitan la determinación de cantidades pequeñas de proteínas en mezclas complejas**. En esta práctica se trata de ilustrar la utilización de anticuerpos específicos para la identificación de proteínas de interés, previamente transferidas a una membrana de nitrocelulosa.

Material de la práctica.

- PBS
- Anticuerpo anti-albúmina (conejo).
- Leche en polvo.
- Anticuerpo anti-IgGs de conejo (cabra) unido a peroxidasa.
- 4-cloro-naftol.
- Agua oxigenada.
- Metanol.
- Detergente Tween-20.
- Bolsa de plástico.
- Selladora de plástico.

6.1. Incubación con anticuerpos.

- **Bloquear** con PBS + 0,5% Tween 20 + 5% **leche en polvo**. Añadir 10 ml de esta solución de bloqueo. Esto sirve para evitar las uniones inespecíficas del anticuerpo, puesto que la membrana tiene mucha afinidad por las proteínas y los anticuerpos son proteínas. Al saturar la membrana con las proteínas de la leche, nos aseguramos que el anticuerpo se una a su proteína específica. Este bloqueo se realiza en unas bolsas que nos hacemos con un plástico (con doble capa) al que, después de colocar el filtro entre sus capas se termosellan tres lados de la bolsa. Después de añadir la solución se sella el último lado de la bolsa. Incubar de 30 min a 12 horas a temperatura ambiente, nosotros lo dejamos de un día de prácticas para otro.
- Añadir (10 l) 10ml de disolución 1/1000 del **primer anticuerpo (anti-albúmina de conejo)**, (podemos hacerlo en la misma bolsa). El anticuerpo está disuelto en solución de bloqueo. Incubar durante 1 hora a temperatura ambiente.
- **Lavar 3 veces durante 5 min** cada una con solución de lavado (0.5% Tween 20 en PBS).
- En el paso del primero al segundo lavado, se cambiará de bolsa. **Es importante que durante el proceso el filtro no se seque.**
- Añadir (10 l) 10ml de una disolución 1/1000 del **segundo anticuerpo**, anti-IgGs de conejo (de cabra) unido a peroxidasa. El anticuerpo disuelto en la solución de bloqueo. Incubar de nuevo 1 h a temperatura ambiente.
- **Lavar 3 veces 5 minutos** con la solución de lavado.
- **1 lavado sólo con PBS de 5 minutos.**

6.2. Revelado de anticuerpos unidos a peroxidasa.

El segundo anticuerpo presenta la **enzima peroxidasa** unida, siendo **esta actividad enzimática la que se va a utilizar para detectar la unión antígeno-anticuerpo**. La solución de revelado contiene el compuesto 4-cloro-naftol que al actuar sobre él la peroxidasa va a dar lugar a un producto insoluble de color azul-violeta.

- Preparar la solución de revelado que contiene:
 - 20 mg de 4-cloronaftol.
 - 8 ml de metanol.
 - 32 ml de PBS.
 - 20 l de H₂O₂ (30%).

Es importante que los componentes se vayan añadiendo en el orden indicado, debido a que el 4-cloronaftol es insoluble en agua y debe solubilizarse inicialmente en metanol.

- Añadir la solución de revelado sobre la cubeta, en la que tenemos el filtro.
- Esperar hasta que aparezca la coloración, este proceso puede ser instantáneo o requerir de 15-30 min, dependiendo de la cantidad de antígeno unido al filtro.
- Cuando se considere que ha aparecido coloración suficiente, parar la reacción sumergiendo el filtro en agua destilada.

Resultado de la transferencia después de la inmunodetección.

7. Conclusiones.

- Gráficas y resultados de los apartados 2 y 3.

Antes de empezar a sacar conclusiones sobre estos resultados, tenemos que recalcar que, debido al fallo cometido en la preparación de las muestras, para el Bradford, de las fracciones 3, 4, 5, y a que la recta patrón no era nuestra, todas nuestras conclusiones están condicionadas a ese fallo. Tuvimos que revisar las gráficas de otras parejas para imaginarnos como sería la nuestra. Debido a esto no estamos muy seguros de algunos de

nuestros resultados y conclusiones.

Los apuntes que hacemos aquí son:

- Las fracciones características del primer pico son: 3, 4, 5, 6, 7. Dentro de estas las que tienen mayor concentración son: .

Se va echando resina resuspendida en PBS, y con la llave abierta sale el PBS y se espera a que la resina se empaque, pues la lana de vidrio impide que salga.

Patrón

Muestra

F3

F5

F12

•