

ELECTROPHORESIS

Cellogel® – Acetato de Celulosa

Cuantificación Densitométrica

FUNDAMENTO DEL METODO

La electroforesis en tiras de acetato de celulosa permite separar las proteínas del suero o las variantes de la hemoglobina en función de su carga eléctrica. En un medio alcalino la mayor parte de las proteínas tienen carga negativa y, cuando son sometidas a un campo eléctrico, migran hacia el ánodo con una velocidad que es proporcional a su carga neta. Una vez finalizada la electroforesis, las proteínas se identifican por tinción y pueden cuantificarse por densitometría.

TIRAS

01A07-100	4x25	Tiras de acetato de celulosa 2,5 x 14 cm.
01A37-100	4x25	Tiras de acetato de celulosa 5,7 x 14 cm.
01A12-100	4x25	Tiras de acetato de celulosa 2,5 x 17 cm.
01A22-100	4x25	Tiras de acetato de celulosa 4 x 17 cm.
01C03-100	4x25	Tiras de acetato de celulosa 5,7 x 17 cm.
01E13-10	1x10	Tiras de acetato de celulosa 17 x 17 cm.
01C02-100	4x25	Tiras de acetato de celulosa 5 x 24 cm.

El líquido conservante es Tóxico: no inhalar y evitar el contacto con la piel y los ojos.

REACTIVOS Y PREPARACIÓN

02C02-6	Tampón Tris-Tricina. 6x200 mL. Tris 0,4 mol/L, tricina 0,12 mol/L, pH 11,0. Diluir con agua destilada en la proporción 1+4.
02C13-2X-6	Tampón Tris Ippurato pH 8.8. 6x100 ml. Diluir con agua destilada en la proporción 1+9.
02A01-10	Tampón para hemoglobina en polvo. 10 sobres (Para su uso disolver cada sobre en 1500 ml de agua destilada)
03C01-SB	Colorante Negro Amido. 1000 mL. Negro Amido 10B 5 g/L, metanol 45%, ácido acético 10%. Tóxico, Corrosivo y Inflamable: no inhalar, evitar el contacto con la piel y los ojos y mantener alejado de fuentes de ignición.
03C02-S1L	Colorante Rojo Ponceau. 1000 mL. Rojo Ponceau S 5 g/L, ácido tricloroacético 50 g/L. Irritante: evitar contacto con la piel y los ojos.
Preparar	Decolorante Negro Amido. (Preparar 475 ml de agua destilada + 475 ml metanol + 50 ml Acido acético glacial).
04A02-10X	Decolorante Rojo Ponceau. 1x1000 mL. Acido acético 50%. Diluir el contenido del frasco hasta 10 L con agua destilada. Corrosivo: evitar contacto con la piel y los ojos.
06A06 - S1	Transparentador. Transparentador listo para usar. Irritante: evitar contacto con la piel y los ojos.

CONSERVACIÓN

Conservar las tiras y los reactivos a temperatura ambiente (15-30°C). Una vez abierta la bolsa, las tiras se conservan durante 4 días si se mantienen en posición vertical con el líquido conservante. Si se desea almacenar las tiras durante períodos más prolongados, conservarlas en un recipiente cerrado y sumergirlas en metanol al 30 %.

REACTIVOS AUXILIARES

- Suero fisiológico (electroforesis de hemoglobinas).
- Cloroformo (electroforesis de hemoglobinas).
- Metanol absoluto (grado analítico).
- Se recomienda el uso de controles. Solicite información a su distribuidor.

MATERIAL

13A34	Agitador rotatorio
10A08/B	Fuente de alimentación. Tensión estabilizada entre 30-300 VDC.
11A11-CE	Cámara de migración. Tapa con interruptor de seguridad, juego de cables y tres puentes (8,5 x 6,0 cm) con tensores.
12A05	Kit de aplicadores. 1 Placa porta-muestras, 1 porta-aplicadores y 1 juego de aplicadores de 4 unidades (semi-micro).
12A08/8P2	Kit de aplicadores. 1 Placa porta-muestras, 1 porta-aplicadores y 1 juego de aplicadores de 8 unidades (micro).
18A18/1	Densitómetro software Glob AI Scan.

MATERIAL ADICIONAL

- Centrífuga para 3000 r.p.m.
- Rodillo y placas de vidrio.
- Placa calefactora, estufa o equivalente.

MUESTRAS

Electroforesis de proteínas: Suero. Estable 8 días a 2-10°C. Usar directamente.

Electroforesis de Hemoglobinas: Sangre fresca con anticoagulante (heparina, EDTA, ACD, etc.). Preparar el hemolizado como se describe a continuación:

1. Centrifugar la sangre durante 5 minutos a 3000 r.p.m. y eliminar el plasma por aspiración cuidadosa.
2. Lavar los hematíes 4 veces por resuspensión suave en 4-5 mL de Suero fisiológico, centrifugación a 3000 r.p.m. durante 5 minutos y aspiración cuidadosa del sobrenadante.
3. Hemolizar los hematíes mezclando vigorosamente en un tubo de vidrio:

Hematíes	1 volumen
Agua destilada	1,5 volúmenes
Cloroformo	0,5 volúmenes

4. Centrifugar a 3000 r.p.m. durante 20 minutos.
5. Determinar la concentración de hemoglobina y diluir con agua destilada para que la concentración de hemoglobina sea de 5 g/dL.

PROCEDIMIENTO

El procedimiento descrito es útil para la electroforesis de proteínas séricas y para la electroforesis de hemoglobinas, con las diferencias indicadas en las tablas:

	Proteínas séricas	Hemoglobinas
Tampón	Tampón Tris-Tricina Tampón Tris Ippurato	Tampón de Hemoglobina

1. Sacar las tiras de la bolsa y sumergirlas en el tampón correspondiente (50 mL/tira) durante 10-20 minutos.
2. Absorber el exceso de tampón interponiendo las tiras entre dos hojas de papel de filtro.
3. Tensar las tiras humedecidas uniformemente sobre el puente, procurando que la esquina de referencia (cortada) esté situada en el ángulo inferior derecho o en el superior izquierdo para asegurar que la cara absorbente (mate) quede situada hacia arriba.

4. Llenar con el tampón correspondiente ambos lados de la cámara de migración (unos 140 mL por compartimento) y colocar el puente en la cámara de migración.
5. Pipetear las muestras por orden numérico en los pocillos de la placa portamuestras: 20 µL para las separaciones micro y 30 µL para las semimicro.
6. Encajar el juego de aplicadores elegido en el porta-aplicadores y éste en las correspondientes muescas de la placa porta-muestras.
7. Pulsar hacia abajo la palanca varias veces al fondo de la línea de pocillos con el fin de transferir las muestras a las puntas de los aplicadores.
8. Situar el porta-aplicadores sobre el extremo catódico (-) del puente que sostiene la tira húmeda y uniformemente tensada.
9. Pulsar firmemente la palanca hacia abajo durante diez segundos hasta que las muestras se absorban por la tira y soltar la presión.
10. Desplazar de nuevo el porta-aplicadores a la placa, lavar de inmediato con solución salina y secar las puntas sobre papel de filtro.
11. Cubrir la cámara de migración con su tapa. Conectar la cámara de migración a la fuente de alimentación y ponerla en marcha ajustando el voltaje a 200 V. Mantener la electroforesis durante:

	Proteínas séricas	Hemoglobinas
Tiempo	25 minutos (micro) 35 minutos (semi-micro)	75 minutos (micro) 90 minutos (semi-micro)

12. Tras la migración, desconectar la fuente, retirar las tiras y sumergirlas en el colorante durante 10 minutos con las caras absorbentes hacia abajo y evitando su sobreposición. Agitar con suavidad a mano o con ayuda del agitador rotatorio.
13. Lavar las tiras con varios cambios del decolorante que corresponda, empleando el agitador. El líquido del último lavado debe ser incoloro y el fondo de las tiras completamente blanco.
14. Pasar las tiras a un baño de transparentador, mantenerlas en agitación durante 1 minuto. Extenderlas sobre una placa de vidrio (cara absorbente en contacto con el cristal), eliminando las burbujas de aire con un rodillo.
15. Calentar la placa en una estufa o lámpara de infrarrojos a una temperatura de 70-80°C, hasta que la transparencia sea completa (8-10 minutos). Dejar enfriar a temperatura ambiente durante un mínimo de 30 minutos, en contacto con papel de filtro, antes de retirar las tiras.
16. Efectuar la cuantificación densitométrica a 570 nm (Negro Amido) o a 525 nm (Rojo Ponceau) con un instrumento de integración automática.

VALORES DE REFERENCIA

En las figuras adjuntas se muestra el aspecto habitual de una electroforesis para una muestra normal.

Proteínas séricas		Hemoglobinas	
Albúmina	57-65%	HbA	96-99%
α ₁ -globulina	1,0-4,0%	HbF	≤ 1 %
α ₂ -globulina	6-10%	HbS	0 %
β-globulina	8-12%	HbC	0%
γ-globulina	12,5-19,5%	HbA ₂	≤ 3.5%

Estos valores se dan únicamente a título orientativo; es recomendable que cada laboratorio establezca sus propios intervalos de normalidad.