

INSTRUCCIONES DE USO DE LAS TIRAS DE CELLOGEL® PARA ELECTROFORESIS

CONSERVACION DE LAS TIRAS CELLOGEL®

Si las 25 tiras han de ser usadas en un breve plazo de tiempo (3 ó 4 días) el paquete abierto puede conservarse en posición vertical hasta que se han utilizado todas las tiras.

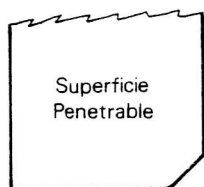
Si las 25 tiras son usadas en un plazo de tiempo mayor, conservarlas en un recipiente tapado conteniendo metanol 30-40 %.

No dejar secar al aire las tiras, porque las tiras secas pierden las dimensiones y características del gel.

Reconocimiento de la superficie penetrable por las proteínas

Sólo una superficie es penetrable por las proteínas y se reconoce fácilmente porque es más opaca después de secarse entre dos hojas de papel de filtro.

Las tiras tienen un vértice cortado. La superficie penetrable se reconoce poniendo la tira con el vértice cortado abajo y a la derecha.



ELECTROFORESIS EN CELLOGEL® DE LAS PROTEINAS SERICAS

Material

- Alimentador para electroforesis ATOM-501, ATOM-502, ó ATOM-503.
- Cubeta de electroforesis AC/5 ó S-60 A/N.
- Aplicador individual (MACRO, SEMI-MICRO) o múltiple SEMI-MICRO.
- Cellogel® 2,5 × 17, 5,7 × 14 ó 2,5 × 14 cm.

Reactivos

- Tampón nº 1 (Veronal sódico 0,04 M-Dietilbarbiturato sódico 8,24 gr./l.).
- Tampón nº 4 (Veronal sódico 10,30 gr. Veronal ácido 1,84 gr. + Trishidroximetilaminometano 7,20 gr./l.).
- Tampón Tris-Tricina.
- Colorante Negro Amido 10B (0,5 gr. en 45 ml. de metanol + 45 ml. de agua + 10 ml. de ácido acético).
- Colorante Rojo Ponceau S (0,5 gr. en 100 ml. de ácido tricloroacético 5 %).
- Decolorante Negro Amido 10B (47,5 ml. de metanol + 47,5 ml. de agua + 5 ml. de ácido acético).
- Decolorante Rojo Ponceau S (ácido acético 5 %).
- Solución transparentadora A y B (frasco A: 870 ml. de metanol + 30 ml. de ciclohexanona; frasco B: 100 ml. de ácido acético). Mezclar 9 partes de A con 1 de B.
- Solución disolvente (ácido acético 80 %).

Técnica

Conservar el Cellogel® en el mismo envase de origen, o en solución de metanol al 30-40 %.

- 1º Sumergir las tiras en el tampón durante 15 min. como mínimo. El tampón debe estar en exceso (aproximadamente 150 ml./3 tiras).
- 2º Absorber el exceso de tampón de las tiras entre 2 hojas de papel de filtro.
- 3º Constatar la cara absorbente de las tiras (superficie mate) mediante la esquina cortada; ésta debe quedar, con la tira hacia el operador, hacia la derecha y abajo.
- 4º Montar las tiras sobre el puente (cara absorbente hacia arriba).

5º Migraciones:

Macro-electroforesis: 65 min. a 200 V. con puente de 11 cm. aplicador MACRO y tampón nº 1. Efectuar una aplicación a 1 cm. del borde catódico. Cellogel 2,5 × 17 cm. (-)

Semi-micro-electroforesis: 35 min. a 200 V. con puente de 8,5 cm. o de tensión automática con tampón nº 1 o Tris-Tricina. O bien: 32 min. a 200 V. con puente de 8,5 cm. o de tensión automática con tampón nº 4. Cellogel® 2,5 × 17, 5,7 × 14 ó 2,5 × 14 cm.

Aplicador individual SEMI-MICRO, o múltiple SEMI-MICRO.

Utilizando aplicador múltiple SEMI-MICRO, éste debe apoyarse en la muesca que condiciona la aplicación más cercana al borde catódico.

6º Fin de migración: Desconectar el alimentador y las cubetas.

7º Coloración: Es muy importante poner la tira en contacto con la superficie de la solución colorante por su cara penetrable. Sumergirlas a continuación y dejarlas así durante 5 min. como mínimo.

8º Decoloración: Efectuar 3 ó 4 baños bajo agitación hasta obtener un fondo completamente blanco.

En el caso de que el colorante utilizado haya sido Negro Amido, puede decolorarse, deshidratarse y transparentarse simultáneamente tratando con la solución transparentadora A y B (preparada recientemente). En este caso, cuando el fondo quede completamente blanco, pueden ponerse ya las tiras sobre una placa de vidrio (eliminando las burbujas de aire con un rodillo) para completar el transparentado. (punto 9º C).

9º Transparentado:

- a) Deshidratar las tiras en un baño de metanol durante 1 min.
- b) Pasarlas a continuación a un baño de solución transparentadora A y B, recientemente preparado, durante 1-2 min. en agitación. Extenderlas sobre una placa de vidrio (cara absorbente en contacto con el cristal), eliminando las burbujas de aire con un rodillo.
- c) Calentar la placa en una estufa o lámpara de infrarrojos a una temperatura de 60-70 °C hasta que la transparencia sea completa (3 ó 4 min.) Dejar enfriar a temperatura ambiente (30 min.) antes de retirar las tiras en contacto con el papel de filtro.

Como alternativa a este punto 9º C el transparentado puede realizarse a la temperatura ambiente durante 1 hora.

10º Cuantificación:

- a) Lectura fotodensitométrica con DIGISCAN ATOM-428b, DIGISCAN ATOM-429, DIGISCAN ATOM-430, CELLOSYSTEM o CELLOPROFIL.
- b) Elución: Tras la completa decoloración de las tiras (no deben transparentarse) se cortan las diferentes fracciones y se colocan en tubos de ensayo en series de 5. Se añade solución disolvente (9 ml. para la albúmina y 3 ml. para cada globulina) hasta la perfecta disolución. Se leen con colorímetro a 620 nm. (Negro Amido) ó 520-530 nm. (Rojo Ponceau). En este último caso puede emplearse como disolvente ácido acético 80 %-acetona a partes iguales.

11º Conservación: Las tiras pueden conservarse transparentadas y secas en sobres de plástico o celofán.

LIPOPROTEINAS EN CELLOGEL®

Material

- Alimentador para electroforesis ATOM-501, ATOM-502 ó ATOM-503.
- Cubeta de electroforesis AC/5 ó S-60 A/N.