

# Técnicas de laboratorio

Gema García Guirado  
Biomedicina  
Universidad Francisco de Vitoria  
gema2002@hotmail.es



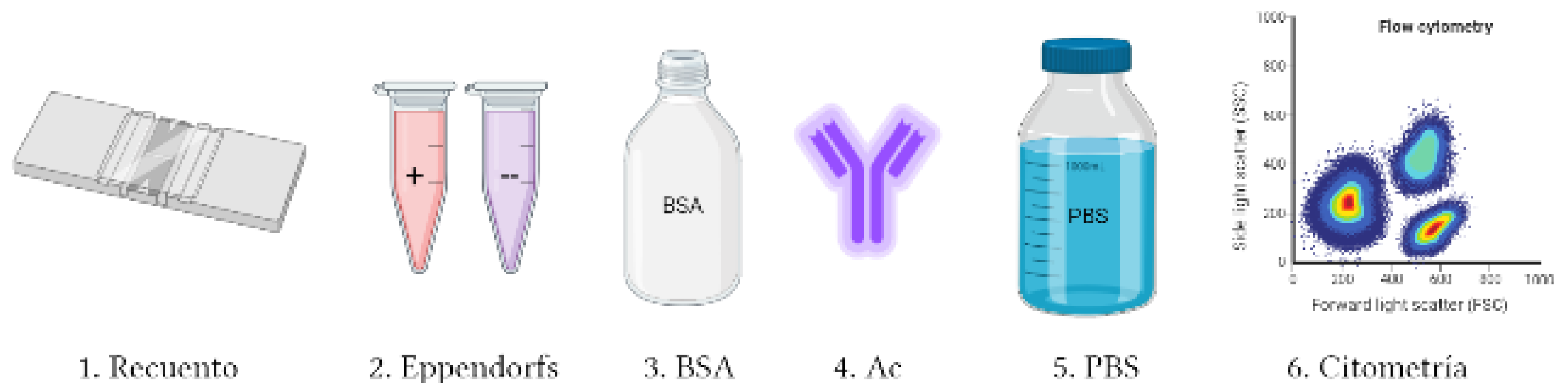
## CITOMETRÍA DE FLUJO

Técnica de inmunofluorescencia para el estudio de poblaciones celulares en sangre periférica. La suspensión celular forma gotas microscópicas y es atravesada por un rayo láser. Se emite fluorescencia detectada por sensores específicos que cuantifican las poblaciones de estudio. También se basa en propiedades diferenciales como el tamaño o la complejidad. Imágenes de dos parámetros (Dot-Plot) o un parámetro (histograma).

**Materiales:** Ac, PBS, 2% BSA, tubos de citometría, centrífuga, cámara Neubauer.

### Protocolo:

1. Contar nº células con cámara Neubauer. Media entre cuadrantes y multiplicación por la dilución.
2. Preparar un eppendorf positivo y otro negativo. Centrifugar para descartar el sobrenadante.
3. Bloquear con BSA para evitar uniones inespecíficas.
4. Centrifugar y descartar BSA. Añadir Ac en oscuridad.
5. Lavar con PBS y centrifugar.
6. Transferir a tubos de citometría.



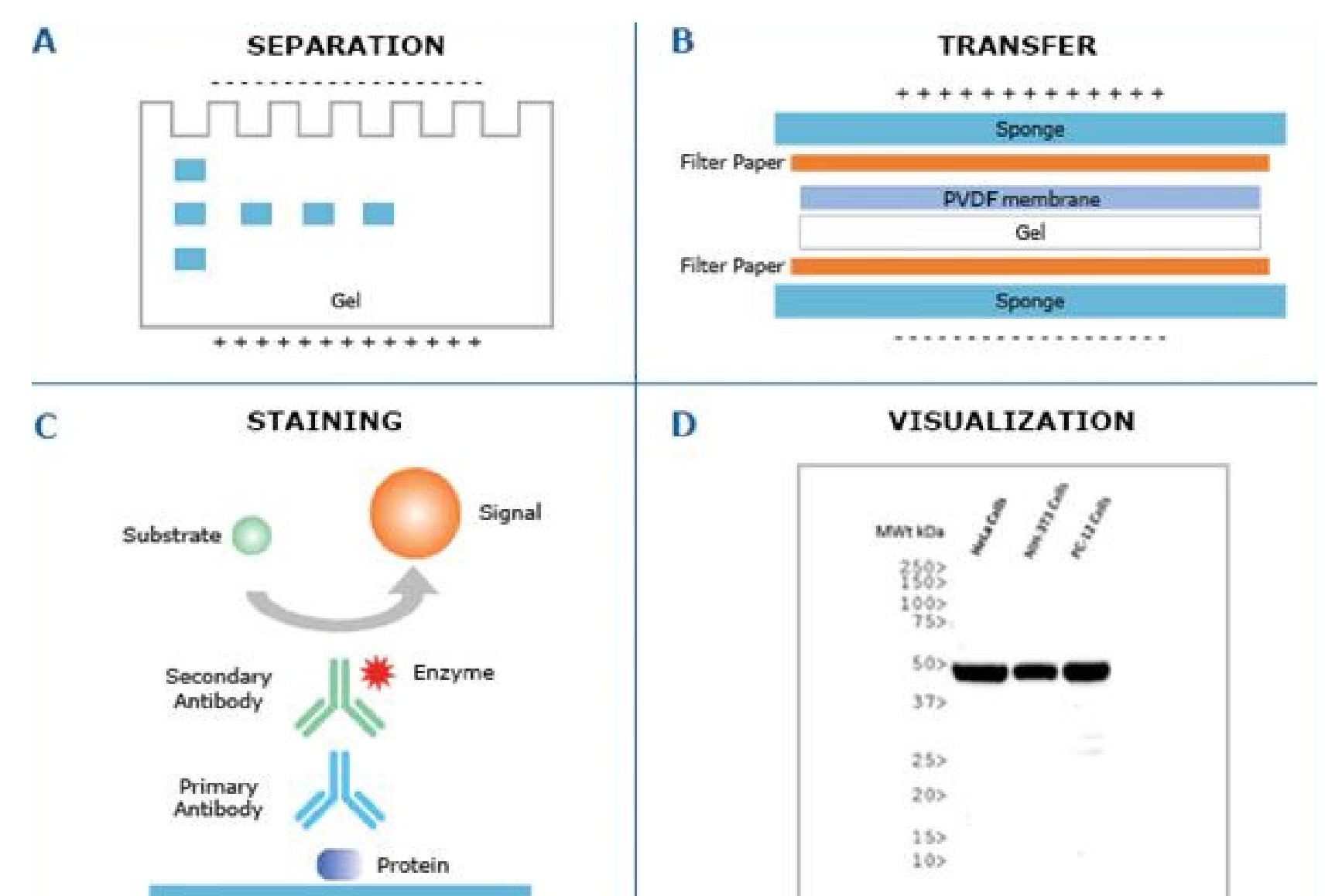
## WESTERN-BLOT

Técnica analítica para el estudio de una sola proteína dentro de una muestra biológica. Un Ac se une a un epítipo único de la proteína de interés. Se pueden estimar el tamaño y las modificaciones postraduccionales, además de la comparación semi-cuantitativa de los niveles de proteína. Depende de la carga neta, la forma y el tamaño.

**Materiales:** buffer lisis, inhibidor proteasa, termo-bloque, acrilamida, TEMED, PSA, SDS 20%, TrisHCl pH=8,8, TrisHCl pH=6,8, marcador de peso molecular, Laemmli 4x, cubetas, buffer de electroforesis, membrana PVDF, papel de filtro en buffer de transferencia, BSA o leche, Ac 1º y 2º, TTBS.

### Protocolo:

1. Lisis celular: buffer de lisis, hielo, centrifugación, Laemmli, hervido.
2. Electroforesis: gel separador y concentrador.
3. Transferencia a la membrana: buffer de transferencia, TTBS.
4. Bloqueo: leche o BSA, incubación a Tª ambiente.
5. Hibridación: Ac 1º a Tª ambiente.
6. Lavar: TTBS.
7. Hibridación: Ac 2º a Tª ambiente.
8. Lavar: TTBS.
9. Detección: quimioluminiscencia. Ac 2º conjugado con peroxidasa.



## ELISA

Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas que permite medir Ag y Ac, por lo que es sensible y cuantitativa. Es una reacción colorimétrica Ag-Ac, uno inmovilizado en la fase sólida y otro en solución. Directo, indirecto, tipo sándwich o competitivo.

**Materiales:** microcentrífuga, lector de placas, micropipetas, agitador horizontal, kit comercial ELISA.

### Protocolo:

1. Estándar, control y muestras en pocillos, junto con el conjugado.
2. Incubación: agitador horizontal.
3. Lavar: TTBS para eliminar excesos que no han interactuado.
4. Añadir sustrato e incubar en oscuridad.
5. Frenar reacción: solución Stop en cada pocillo.
6. Absorbancia.

