

*Proyecto II:*  
*“Laboratorio OATec SRL”*

Jurado a cargo:  
Giuliana Esposito

## *Introducción*



## *Introducción*

¿Qué podemos determinar en un análisis de sangre?

Algunos ejemplos:

- ✓ Hemograma completo
- ✓ Perfil de lipoproteínas
- ✓ Coagulación
- ✓ Hepatograma completo
- ✓ Medición de glucosa en sangre
- ✓ Detección de hormonas
- ✓ Detección de anticuerpos
- ✓ **Proteínas totales**

## *Introducción*

El examen de proteína total mide la cantidad total de dos clases de proteínas encontradas en la porción líquida de la sangre (suero): **albúmina y globulina**.

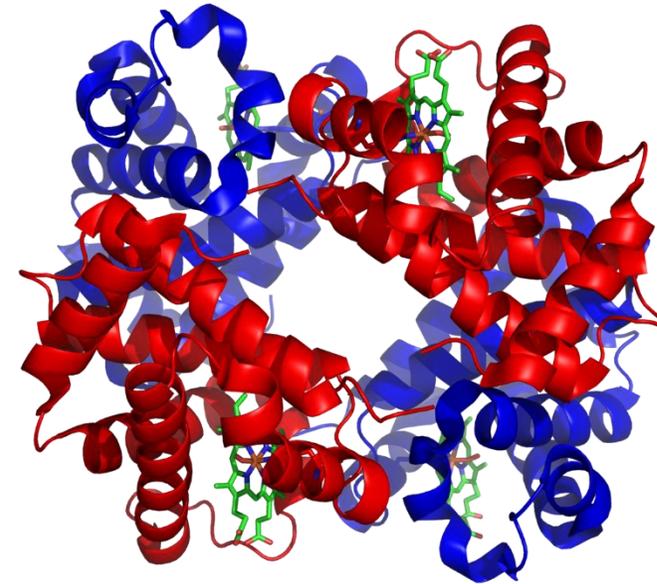
- La albúmina ayuda a impedir que se escape líquido de los vasos sanguíneos. También transporta químicos a través de su sangre.
- Las globulinas son una parte importante del sistema inmunitario.

Es importante tener un valor correcto de proteínas totales en sangre, para evitar posibles patologías y/o emergencias médicas.

## *Introducción*



ALBÚMINA



GLOBULINA

## *Introducción*

- Se toma la muestra.
- Se centrifuga para obtener el suero.
- Se realizan diluciones de ese suero.
- Se añade el reactivo correspondiente.
- Se revela el resultado por espectrofotometría.
- Se obtiene la concentración por comparación con un sistema calibrado.

## *¿Cuál es la tarea?*

Obtener la concentración de proteínas totales a partir de una muestra procesada de hígado vacuno, por el método de Bradford basado en espectrofotometría y por la construcción de una curva de calibración.

Parte I: construir la curva de calibración en un Excel a partir de muestras de concentración conocidas (albúmina).

Parte II: realizar diluciones seriadas de la muestra incógnita.

Parte III: realizar el ensayo de Bradford a las muestras incógnitas.

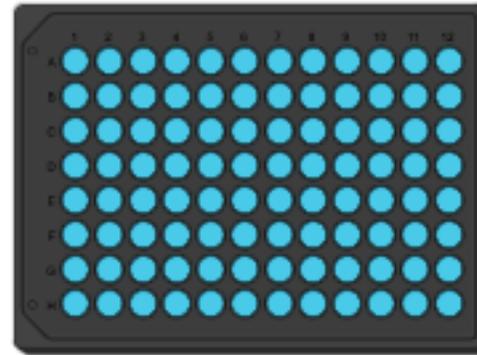
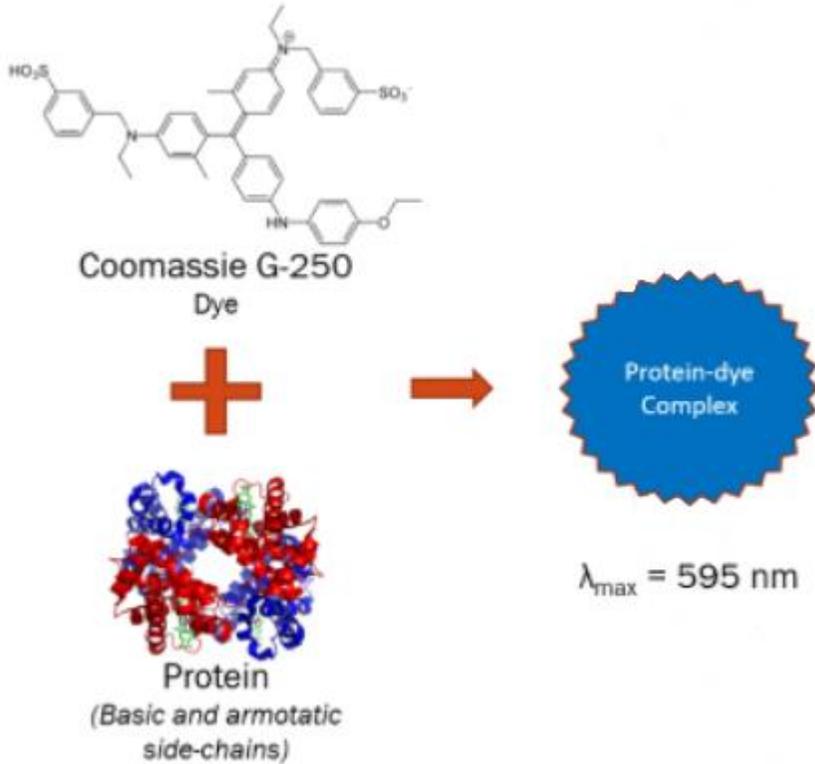
Parte IV: calcular la concentración de proteínas totales en la muestra incógnita inicial.

## *Método de Bradford*

- Existen distintos métodos que permiten medir el contenido de proteínas de una muestra. Una de las formas es a través de un método colorimétrico que aporta sensibilidad al ensayo.
- El reactivo utilizado en los ensayos se une a las proteínas en sus residuos aromáticos. El resultado de estas reacciones es el cambio de color en la solución (**en nuestro caso: azul**), que es medido con un espectrofotómetro a la longitud de onda del colorante (**en nuestro caso: 595 nm**)
- Para determinar la concentración de proteínas totales de una muestra, se construye una curva de calibración con concentraciones conocidas de una proteína estándar (en general BSA) respecto a las absorbancias de la misma; donde se interpolan luego las absorbancias de las muestras incógnitas calculando las concentraciones según lo expresa la ley de Lambert – Beer:

$$A = \epsilon \cdot c \cdot l$$

# Método de Bradford



Created with BioRender.com



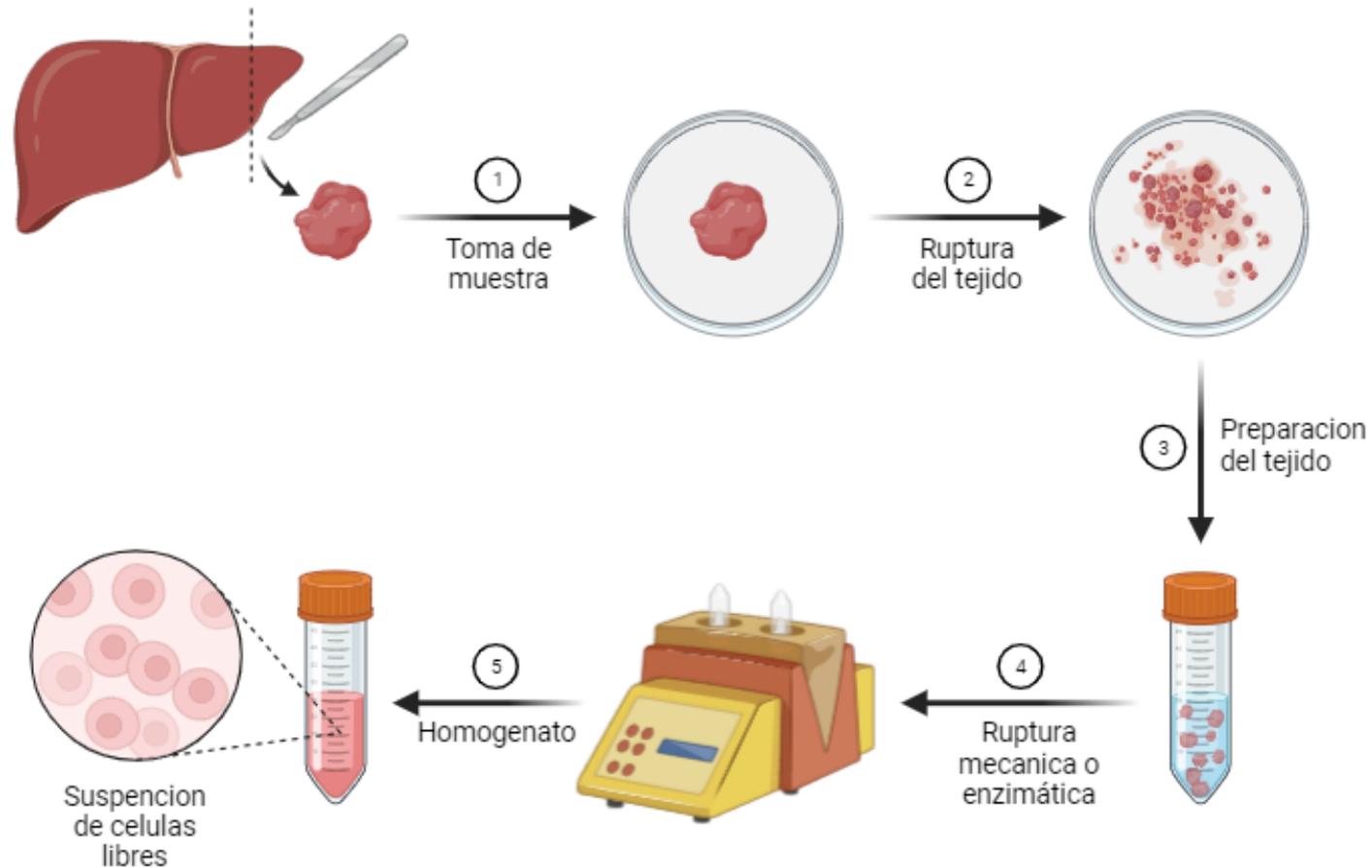
**Parte I:**

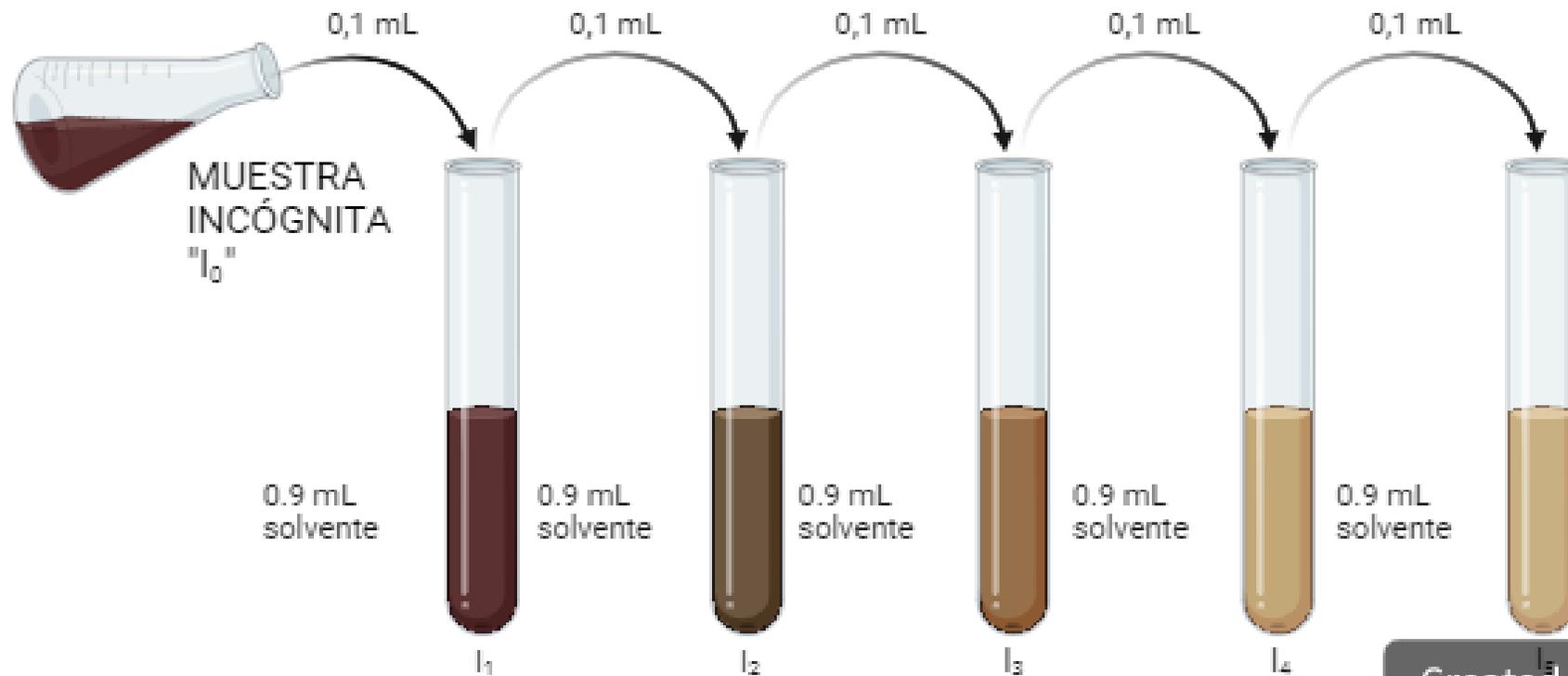
*construir la curva de calibración en un Excel a partir de muestras de concentración conocidas (albúmina).*

<b>ABSORBANCIA (590/450)</b>	<b>µg/ml de BSA</b>
<b>0,825</b>	<b>0</b>
<b>1,379</b>	<b>1</b>
<b>1,517</b>	<b>1,5</b>
<b>1,713</b>	<b>2</b>
<b>1,990</b>	<b>2,5</b>
<b>2,222</b>	<b>3</b>
<b>2,411</b>	<b>3,5</b>
<b>2,706</b>	<b>4</b>

**Parte II:**

*realizar diluciones seriadas de la muestra incógnita.*



*Parte II:**realizar diluciones seriadas de la muestra incógnita.*

*Parte II:*

*realizar diluciones seriadas de la muestra incógnita.*

Muestra	I <sub>1</sub>	I <sub>2</sub>	I <sub>3</sub>	I <sub>4</sub>	I <sub>5</sub>
Dilución final					
Dilución parcial	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2
μl I <sub>0</sub> (incógnita)					
μl I <sub>1</sub>					
μl I <sub>2</sub>					
μl I <sub>3</sub>					
μl I <sub>4</sub>					
μl I <sub>5</sub>					
μl solvente					
Volumen total (μl)	100	100	100	100	100

*Parte III:*

*realizar el ensayo de Bradford a las muestras incógnitas*

**IMPORTANTE:**

**LAS DILUCIONES MOSTRADAS EN LA TABLA SE REALIZARÁN DIRECTAMENTE EN LA PLACA, PRIMERO COLOCANDO EL VOLUMEN DE SOLVENTE Y LUEGO AGREGANDO EL VOLUMEN DE MUESTRA CORRESPONDIENTE.**

- 2) Agregar 100  $\mu\text{L}$  de reactivo de Bradford a cada pocillo (well) de la microplaca de 96 donde se cuantifique una muestra (en total 5 pocillos)
- 3) Mezclar bien el reactivo de Bradford antes de pipetear. El reactivo debe estar a temperatura ambiente.
- 5) Incubar a temperatura ambiente por 10 minutos y medir la absorbancia a 590 y 490 nm en el lector de microplacas.

**En todos los casos:**

- ✓ **homogeneizar con la micropipeta tanto antes de tomar como al sembrar en el pocillo.**
- ✓ **cambiar la punta de tip al agregar cada muestra.**

### *Parte IV:*

*calcular la concentración de proteínas totales en la muestra incógnita inicial.*

**¡IMPORTANTE!**

Teniendo en cuenta:

1. El valor de absorbancia seleccionado, según las limitaciones de la Ley de Lambert-Beer.
2. Los factores de dilución.

Calcular la concentración de proteína en  $\mu\text{g/ml}$  **en la muestra incógnita  $I_0$**  mediante la ecuación obtenida en la curva de calibración.

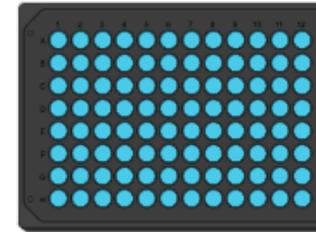
## *Materiales*



**Reactivo de  
Bradford**



**Guantes**



**Microplaca**



**Solvente**



**Micropipeta  
y tips**



**Laptop**



**Muestra  
incógnita**



**Descarte**



**Rotulador**

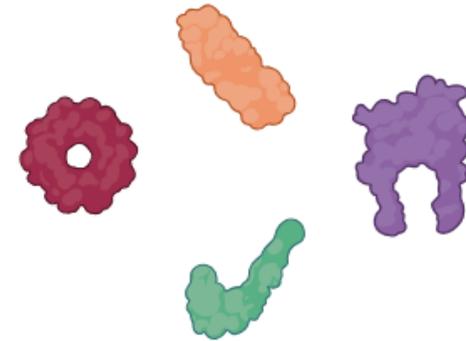
## *Puntaje*

- Parte 1 (curva): **Hasta 2 puntos.**
- Parte 2 (diluciones): **Hasta 2 puntos.**
- Parte 3 (Bradford): **Hasta 2 puntos.**
- Parte 4 (cálculo): **Hasta 3 puntos.**
- Orden en la mesada de trabajo: **1 punto.**

## *Tiempo de desarrollo de la experiencia*

- Parte 1 (curva): **20 minutos**
- Parte 2 (diluciones): **30 minutos**
- Parte 3 (Bradford): **25 minutos**
- Parte 4 (cálculo): **15 minutos**

Tiempo Total: **90 minutos**



**¡ Proteínas están ahí,  
y las vamos a encontrar !**