

T
634.772
1201

ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL
INSTITUTO DE TECNOLOGIAS
PROGRAMA DE TECNOLOGIA EN ALIMENTOS



Informe de Prácticas Profesionales
Previo a la Obtención del Título de
Tecnóloga en Alimentos

Realizado en:

Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE)

AUTOR:

María José Molestina Jalil



AÑO LECTIVO
2002 - 2003
GUAYAQUIL - ECUADOR





**INSTITUTO DE TECNOLOGÍAS
PROGRAMA DE TECNOLOGÍA EN ALIMENTOS**



ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL

INSTITUTO DE TECNOLOGIAS

PROGRAMA DE TECNOLOGIA EN ALIMENTOS

INFORME DE PRACTICAS PROFESIONALES

Previo a la obtención del título de tecnóloga en Alimentos

Realizado en:

Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE)

Autor:

Maria José Molestina Jalil

Profesor guía: **Dra. Gloria Bajaña**

Profesor segunda Revisión: **MSc. Chanena Alvarado**

Año lectivo

2002 2003

Guayaquil - Ecuador



**INSTITUTO DE TECNOLOGÍAS
PROGRAMA DE TECNOLOGÍA EN ALIMENTOS**



Ing.
Claudia Icaza
Coordinadora de PROTAL
Ciudad.-

De mis consideraciones:

Mediante la presente le extiendo mi cordial saludo y a su vez poner a su disposición y conocimiento mi informe de practicas III (Profesionales) las mismas que realice en el centro de investigación biotecnológica del Ecuador (CIBE) en el laboratorio de Inmunoquímica, durante el tiempo comprendido del 14 de Marzo y el 14 de Junio del 2002.

El tema a desarrollar en esta practica fue "obtención de anticuerpos específicos de la *M. fijiensis*"

Esperando que este informe sea de su agrado, me suscribo a usted.

Atentamente,

María José Molestina Jalil
matricula 1998065



ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL

"Ciencia, Tecnología y Educación al servicio del País"

Guayaquil, 4 de julio del 2002

A QUIEN INTERESE:

Por medio de la presente certifico que la Srta. Maria José Molestina Jalil con número de matrícula 199806506, realizó prácticas en el laboratorio de Inmunoquímica del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE) en el periodo comprendido entre el 14 de marzo y el 14 de junio del 2002.

Dr. Rodolfo Maribona.

Director del CIBE



INSTITUTO DE TECNOLOGÍAS



PROGRAMA DE TECNOLOGÍA EN ALIMENTOS

EVALUACION DEL PRACTICANTE

NOMBRE DEL PRACTICANTE: María José Molestina Jalil

DENOMINACION DEL CARGO: Practicante - Area: Inmunquímica.

FECHA: 04-Julio-2002

A.- Asigne una calificación entre 1 al 10 en cada uno de los siguientes aspectos. Si alguno no es aplicable, por favor no lo califique.

1.- Interés en el trabajo	-----	9	-----
2.- Conocimientos	-----	7	-----
3.- Organización	-----	9	-----
4.- Habilidad para aprender	-----	9	-----
5.- Creatividad	-----	9	-----
6.- Puntualidad	-----	10	-----
7.- Cumplimiento de las normas de seguridad	-----	10	-----
8.- Cantidad de trabajo (rendimiento)	-----	9	-----
9.- Relaciones con el personal	-----	9	-----
10.- Habilidad para comunicarse	-----	9	-----
11.- Responsabilidad	-----	10	-----
12.- Trabaja bajo presión	-----		-----



B.- MARQUE CON UNA CRUZ

1.- Durante el desarrollo de la práctica el estudiante acogió favorablemente críticas y sugerencias.

Siempre A menudo Rara Vez ----- Nunca -----

2.- De los 30 días hábiles inasistió al trabajo?

0 - 10% ----- Más del 10% -----

3.- La jornada de trabajo semanal fue de:

5 días ----- 6 días -----

4.- El promedio de horas trabajadas por día fue:

Menos de 6 horas ----- 6 - 8 horas -----

C.-COMENTARIOS ADICIONALES:

D.- LLENADA POR: Blgo. Mauricio Sanchez

CARGO: Investigador - Inmunquímica FIRMA Y SELLO: [Firma]

NOMBRE DE LA EMPRESA: C.I.B.E. TELF. 2269610



Índice

Resumen -----	Pág. 1
Introducción -----	Pág. 2
Detalle del trabajo realizado -----	Pág. 3
Aspectos generales de la Empresa -----	Pág. 4 – 7
Diagrama de flujo -----	Pág. 8
Detalles del proceso -----	Pág. 9– 24
Conclusión -----	Pág. 25
Bibliografía -----	Pág. 26
Anexos -----	Pág. 27



RESUMEN

El presente informe de prácticas profesionales comprende primeramente la obtención del hongo *Mycosphaerella fijiensis*, que es cultivada en un medio líquido por 18 días, filtrada y preparada para los siguientes ensayos.

Luego de esto se procede a la obtención de anticuerpos del hongo por medio de la inoculación del inmunogeno (ver anexo 6) en conejos, para así luego medir la especificidad de los anticuerpos (ver anexo 6) obtenidos por medio del ensayo inmunológico tipo ELISA indirecto; la metodología seguida para el desarrollo del inmune-diagnóstico consistió en titular el suero de conejo inmunizado con extracto de *M. fijiensis*. Se utilizó como control el suero normal del animal.

Se utilizaron micro-placas ELISA recubiertas con tiras de poliestireno con extracto (antígeno) a una concentración de 20 µg/mL, luego como anticuerpo primario se empleó el suero de conejo, y el conjugado utilizado fue anticuerpo de cabra anti IgG de conejo-fosfatasa alcalina, el sustrato para revelar la presencia del complejo antígeno-anticuerpo fue paranitrofenil fosfato 1mg/mL, posteriormente se mide la absorbancia en el lector ELISA. Para ver los resultados.

INTRODUCCIÓN

El banano y el plátano ocupan la mayor parte de los cultivos agrícolas en el Ecuador, representado un 80% de la exportación.

Por esto La Escuela Superior Politécnica del litoral (ESPOL) junto con el Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE) se dedican a intensificar la investigación biotecnológica que permita mantener el liderazgo del Ecuador en exportación mundial del banano.

Los cultivos de Musáceas son afectados por diversas enfermedades y plagas que disminuyen sensiblemente su rendimiento y calidad del fruto. Entre los problemas fitopatológicos mas importantes causados por hongos ascomicetos, esta una enfermedad foliar ocasionada por el hongo *Mycosphaerella fijiensis* llamada Sigatoka negra. Esta afecta fuertemente el sector bananero causando pérdidas del 30 al 50% del rendimiento de la fruta, por maduración precoz del fruto y reducción de la capacidad fotosintética de la planta debido al rápido deterioro foliar.

Por esta razón el CIBE generó un proyecto que busca establecer las condiciones técnicas para la obtención de anticuerpos específicos contra *M. fijiensis*. Hongo causante de la sigatoka negra, de esta forma desarrollar un método inmunoquímico de detección temprana del hongo en plantas de banano.

DETALLE DE TRABAJO REALIZADO

Las prácticas profesionales las llevé a cabo en el Laboratorio de inmunoquímica del CIBE, que centra sus estudios en los mecanismos moleculares de defensa de las plantas, tomando como modelo el banano por medio de la bioquímica de las proteínas.

Dentro del Laboratorio se me asignó colaborar con el Biólogo. Mauricio Sánchez en el desarrollo del proyecto que consistió básicamente en la estandarización del ensayo inmunoenzimático ELISA indirecto, para titulación de sueros de conejo.

Objetivos planteados para el desarrollo del proyecto:

- Investigación bibliográfica sobre temas que abarca el proyecto.
- Presentación de informes quincenales al jefe de área.
- Establecer una metodología de inmunización de conejos, así como de ELISA indirecto.
- Obtención de proteínas del hongo, para ser usadas como antígenos en la producción de los anticuerpos.
- Obtención de anticuerpo contra *M. fijiensis*.

Mis objetivos durante la práctica:

- Revisión bibliográfica
- Familiarización en manejo de equipos y técnicas de laboratorio.
- Asistir en la investigación

El horario de labores fue de lunes a viernes de 8:30 a.m. a 4:30 p.m.



ASPECTOS GENERALES DE LA EMPRESA

Antecedentes Históricos

Por iniciativa de la ESPOL, atendiendo una convocatoria de la Unión de Universidades Flamencas, fue presentado un proyecto en el cual se concebía la ejecución de 6 actividades denominadas componentes. Entre estos componentes, el número 3, abordaba la investigación en biotecnología; con un mandato inicial de hacer investigación para la resistencia genética de Musa para el control de la Sigatoka negra, con el fin de lograr una agricultura ambientalmente sustentable.

En el desarrollo de éste proyecto, que fue financiado por el fondo Belga y una contrapartida de la ESPOL, el componente 3 ejecutó un curso de diplomado en biotecnología, y 4 cursos de postgrado. De los estudiantes fueron seleccionados 3 candidatos a cursos "sandwich" de PhD en las universidades belgas de Gante y Lovaina. Esta actividad avanzó en paralelo con la adaptación y construcción de los laboratorios e instalaciones para entrenar especialistas capaces de ejecutar los objetivos de investigación del proyecto.

La integración del sector productivo en las estrategias y ejecución de las actividades de investigación, logró desde el mismo inicio del proyecto, una excelente comunicación y participación, definiendo los programas de investigación coparticipada.

Adicionalmente, se han conseguido recursos para reforzar el desarrollo de los proyectos de investigación y capacitación. Se siguen generando propuestas para la formación de recursos humanos de cuarto nivel, así como para la investigación, en la óptica de convertir a este centro en una entidad auto sustentable para la investigación, la enseñanza y la extensión participativa.

En el breve plazo de 1 año, con un staff de 21 colaboradores, en pleno desempeño de las investigaciones, con la presencia de las máximas autoridades de la ESPOL, representantes de los productores y de la contraparte belga, fue inaugurado el 17 de



Enero del 2001, como el "Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador" de la Escuela Superior Politécnica del Litoral.

Localización

El CIBE tiene sus instalaciones en el Campus Gustavo Galindo Km. 30.5 vía perimetral en la planta alta del bloque N° 47. El centro lo dirige el Dr. Rodolfo H. Maribona.



Objetivo

Hacer investigación biotecnológica para el mejoramiento genético de plantas, los agentes causales de enfermedades y su interacción con las plantas huéspedes, las tecnologías de producción con el uso de microorganismos benéficos y las oportunidades de tecnologías para incorporar valor agregado a las cosechas partiendo del primero y gran mandato Musa resistente a sigatoca negra en un ambiente sustentable.



INSTITUTO DE TECNOLOGÍAS PROGRAMA DE TECNOLOGÍA EN ALIMENTOS



Misión

Formar líderes capaces de convertir la biotecnología en una herramienta indispensable para el desarrollo social y económico del país.

Visión

El futuro del Ecuador es un futuro de conocimiento, conservación y uso de sus grandes recursos genéticos para el bienestar de la especie humana.

ORGANIGRAMA

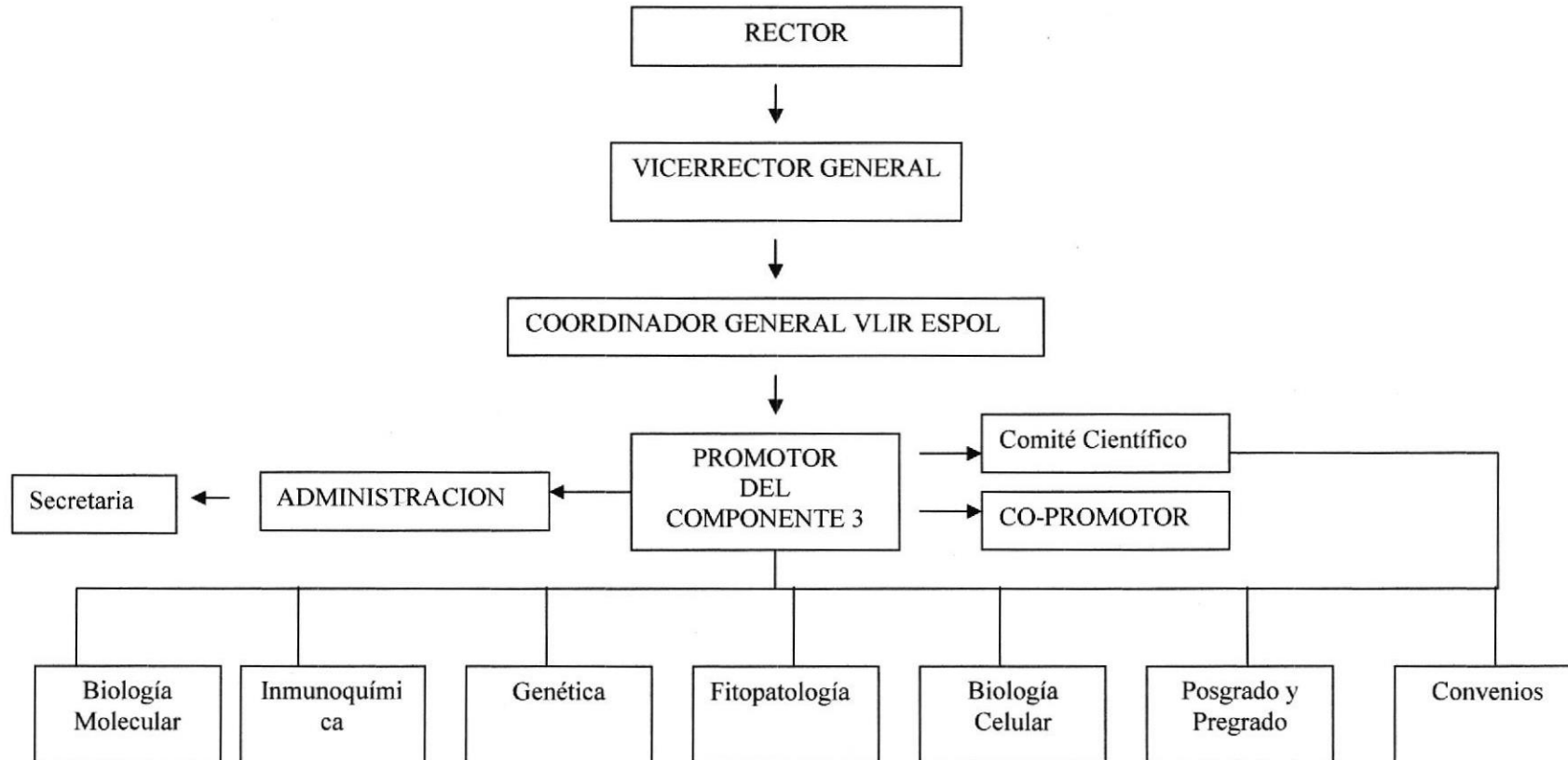
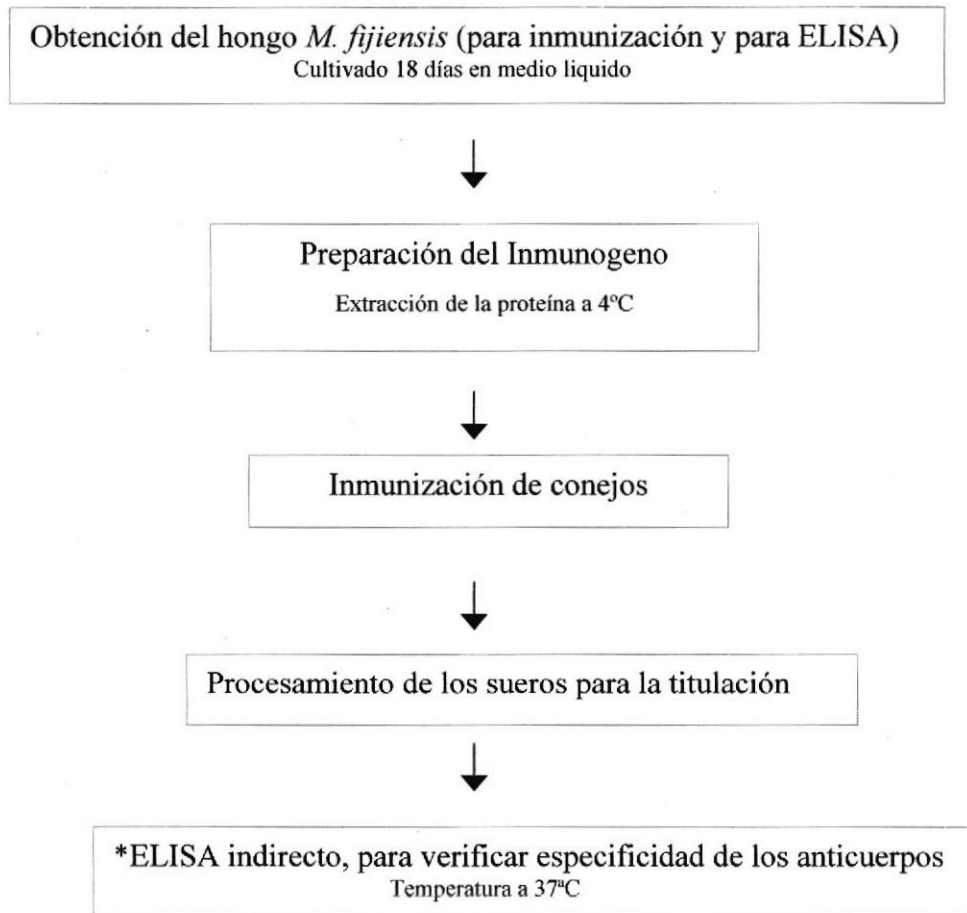


DIAGRAMA DE FLUJO

El proyecto se divide en tres fases:

1. Obtención del hongo *M. fijiensis* de una planta enferma.
2. Inmunización de los conejos para obtener el anticuerpo específico
3. Ensayo de ELISA indirecto.

Diagrama de flujo



DETALLE DEL PROCESO

Actualmente las estrategias para manejo de la sigatoka negra son: el control químico y la selección de plantas resistentes. La metodología basada en técnicas de inmunodiagnóstico, como por ejemplo la técnica ELISA con la cual es posible detectar y cuantificar el patógeno presente en las hojas de banano, constituye una alternativa promisoría para el desarrollo de un método de diagnóstico de *M. fijiensis* en la etapa pre-sintomática y de esta forma realizar un control más efectivo de la sigatoka. Esto implicaría un ahorro substancial en: los costos de producción de la fruta, tratamiento oportuno de la enfermedad y reducción de la contaminación ambiental.

El uso de anticuerpos como método de inmuno-diagnóstico o para investigaciones biológicas en la identificación de antígenos es una herramienta indispensable en inmunquímica. Su importancia radica en su especificidad, sensibilidad y relativa facilidad de obtención. Los anticuerpos han sido utilizados por ejemplo para la identificación de multitud de antígenos infecciosos de plantas y animales. Pruebas inmunquímicas también se han desarrollado para la cuantificación de antígenos importantes en la bacteriología vegetal.

La presente investigación tiene como objeto la obtención de anticuerpos específicos contra *M. fijiensis* cuya especificidad será medida mediante ELISA indirecto.

La técnica de Elisa es un procedimiento de ensayo inmunoenzimático cuyo nombre resulta de la asociación de las iniciales de su denominación inglesa (enzyme linked immuno sorbent assay). Como todo ensayo inmunoenzimático, la prueba recurre al empleo de inmunógenos, ó anticuerpos marcados con una enzima, para revelar el reactivo complementario a nivel de distintos fluidos biológicos.

Fue concebida independientemente en 1971 en Suecia y Holanda, siendo aplicada posteriormente a la revelación y a la cuantificación de los más diversos tipos de sustancias presentes en líquidos orgánicos (antígenos, anticuerpos, hormonas, fármacos, etc.).

De modo general, el procedimiento del ELISA empieza, primeramente con la fijación del componente inmunológico (antígeno Ag) a un soporte sólido que son los pocillos de la placa, esta unión se realiza con facilidad a la superficie de los pocillos de plástico tratados, ya que tienen gran afinidad con las proteínas.

Poniendo luego el anticuerpo correspondiente a ese antígeno, formando así un complejo inmunológico, que luego es enfrentado a moléculas capaces de reconocer al anticuerpo empleado (anticuerpo anti-primario) que es marcado con una enzima ejemplo: peroxidasa alcalina, finalmente un sustrato de la enzima marcadora es agregado, Se deja reaccionar y se lee la densidad óptica (D.O) mediante espectrofotometría.

Para este procedimiento se describe el uso de el tipo de **ELISA indirecto** que consiste en colocar la muestra en las placas ELISA; así como también los controles positivos y negativos, el sistema de detección emplea dos anticuerpos uno primario contra el antígeno, y uno secundario marcado contra el primario. La detección tiene mayor sensibilidad por presentar una amplificación de señal debida a la unión de dos o mas anticuerpos con cada primario secundarios por cada primario. Este es el ensayo más popular pues permite cuantificar una gran cantidad de antígenos.

OBTENCIÓN DEL HONGO

Fundamento.-

Extracción del hongo *M. fijiensis*, y su preparación para su utilización en posteriores ensayos.

Procedimiento.-

1. El hongo es cultivado por 18 días en medio líquido, (patata-V8)
2. se filtra.
3. Se lava con PBS 3 veces centrifugando por 5 minutos (') a 5000 revoluciones por minuto (rpm).
4. secar el hongo por 24 horas en incubadora a 26°C.(ver anexo 1)

Equipos y materiales.-

- Pipetas
- Tubos eppendorff
- Beakers esterilizados
- Incubadora
- Papel de filtro.
- Centrifuga A14 (Anexo #2)





INSTITUTO DE TECNOLOGÍAS PROGRAMA DE TECNOLOGÍA EN ALIMENTOS



Reactivos.-

Preparación del PBS (buffer de fosfato salino)

Disolver:

- 8gr. De cloruro de sodio ClNa
- 0.2gr. de cloruro de potasio KCl
- 1.44gr. de fosfato de sodio di-básico Na_2HPO_4
- 0.24gr. e fosfato de potasio monobásico KH_2PO_4
- 800 ml de agua destilada.

Ajustar el pH a 7.2 – 7.4 y completar el litro.

Autoclavar y guardar a 4°C.



PREPARACIÓN DEL INMÚNOGENO

Fundamento.-

Mediante el uso de buffer de extracción, obtenemos las proteínas (toxinas) presentes en el medio.

Procedimiento.-

1. El hongo obtenido como se explica en el paso anterior se tritura en un mortero con ayuda del nitrógeno líquido.
2. Resuspender el polvo obtenido en buffer de extracción alcalino Tris- Base, relación 1:3.
3. Incubar la muestra por 1 hora a 4°C, entonces centrifugar a 14.000 rpm por 10' manteniendo la misma temperatura.
4. nos quedamos con la parte líquida y se desecha el pellet. (en el líquido están las proteínas solubilizadas).
5. precipitar el sobrenadante que es el que contiene la proteína soluble con Sulfato de Amonio $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ al 80%. Incubar por una hora a 4°C.
6. Centrifugar como antes.
7. Resuspender el pellet en buffer de extracción alcalino Tris-Base. Conservar a 4°C.
8. determinación de concentración de proteína en la muestra por el método estándar de Bradford.(anexo#3)

Equipos y materiales.-

- Mortero
- Tubos eppendorff
- Refrigeradora graduada a 4°C.

- Centrifuga
 - Pipetas
- Reactivos:
- Nitrógeno líquido.
 - Buffer de extracción.
 - Sulfato de amonio al 80%. (anexo 4)

Preparación de Reactivos.-

Buffer alcalino Tri-Base:

1. mezclar:

- 10mM EDTA ver (anexo 5 y 6)
- 0.2% ácido ascórbico.
- 150mM ClNa.
- 150mM PMSF
- 150 mM mercaptoetanol.

2. en un litro de agua destilada, ajustar pH 7.5.

3. almacenar a 4°C, en un lugar sin luz; el color es cristalino, cuando se empiece a tornar amarillento hay que reemplazarlo.

Cálculos y ejemplos.-

Ecuación para calcular los gramos necesarios para precipitar proteínas en una muestra.

Hacer una solución al x%:

- Existen dos formas de calcular los gramos que vamos a utilizar para precipitar proteínas; la primera es utilizando un cuadro de la bibliografía del libro "Protein Techniques" Pág. 658. ver (anexo4) y otra es utilizando la siguiente ecuación:



INSTITUTO DE TECNOLOGÍAS

PROGRAMA DE TECNOLOGÍA EN ALIMENTOS



$$G/l = \frac{515 (X_f - X_o)}{100 - 0.27X_f}$$

siendo: X_f = porcentaje al que se quiere llegar.

X_o = porcentaje inicial.

Ejemplo:

Saber cuantos gramos voy a utilizar para tener una concentración del 80% de Sulfato de amonio.

$$G = \frac{515 (80 - 0)}{100 - 0.27 (80)} = 525.5 \text{ gr. De sulfato en 1 litro de muestra.}$$



INMUNIZACIÓN DE LOS CONEJOS

Fundamento.-

Obtener antisuero contra *M. fijiensis*,

Preparación de los animales.-

Se trabajo con conejos de raza Neozelandeses aproximadamente de 2 Kg. De peso, su alimentación consistió en un balanceado comercial (NUTRIL: proteína 18%, grasa 6%, fibra 13%, humedad 12%).

Los animales fueron sometidos a cuarentena dos meses antes de la inmunización. Luego de esto se llevo a cabo el siguiente esquema:

Procedimiento.-

Día	Actividad	Volumen
0	Sangrado, para suero pre-inmune	2 ml.
0	Inmunización primaria ,Im*, sc*	0.5 ml Ag + ACF*
7	Sangrado	2 ml.
14	Inmunización de refuerzo, Im – sc	0.5 ml. Ag + AIF*
21	Sangrado para la titulacion de suero.	2 ml.
28	Reinmunización opcional. Im - sc	0.5 ml. Ag + ACF

* Im = vía intramuscular

*Sc = vía subcutánea

*ACF = Adyuvante de Freund completo.

*AIF = Adyuvante de Freund incompleto.

Procedimiento del sangrado.-

1. Rasurar la superficie de la oreja, dejando al descubierto la vena marginal.
2. Untar con vaselina el área de la oreja donde se realizara el corte, para ayudar a que la sangre gotee fácilmente.
3. cortar la vena con bisturí estéril. Hacer el corte superficialmente.
4. colectar la sangre en tubo estéril hasta volumen deseado (2 ml).
5. detener el sangrado haciendo presión en el corte con algodón.

Equipos y materiales:

- Jeringas estériles.
- Rasuradota
- Vaselina
- Bisturí estéril
- Guantes estériles
- Tubo estéril
- Algodón
- Alcohol
- Pipetas



Reactivos:

- ACF Adyuvante de Freund completo, que contiene bacterias muertas de *Mycobacterium tuberculosis* en aceite de parafina que actúa como un activador del sistema inmune en el cuerpo del animal (se consigue comercialmente).
- AIF adyuvante de Freund incompleto, contiene solamente el aceite de parafina.

PROCESAMIENTO DEL SUERO

Fundamento.-

Obtener el suero de la sangre que es donde se encuentran contenidos los anticuerpos.

Procedimiento.-

1. Dejar coagular la sangre a 37°C en la incubadora por una hora.
2. Centrifugar a 5000 rpm por 10' a 4 °C.
3. colectar el sobrenadante (suero) y almacenarlo a -20°C. se lo almacena en alícuotas de 500 µl.

Equipos y materiales.-

- Incubadora
- Centrifuga
- Tubos eppendorff
- Micro pipetas
- Congelador a -20°C.

ELISA INDIRECTO

Fundamento.-

Por medio de este método se estudia la especificidad del anticuerpo de las muestras obtenidas, al comprobar la unión anticuerpo-antígeno.

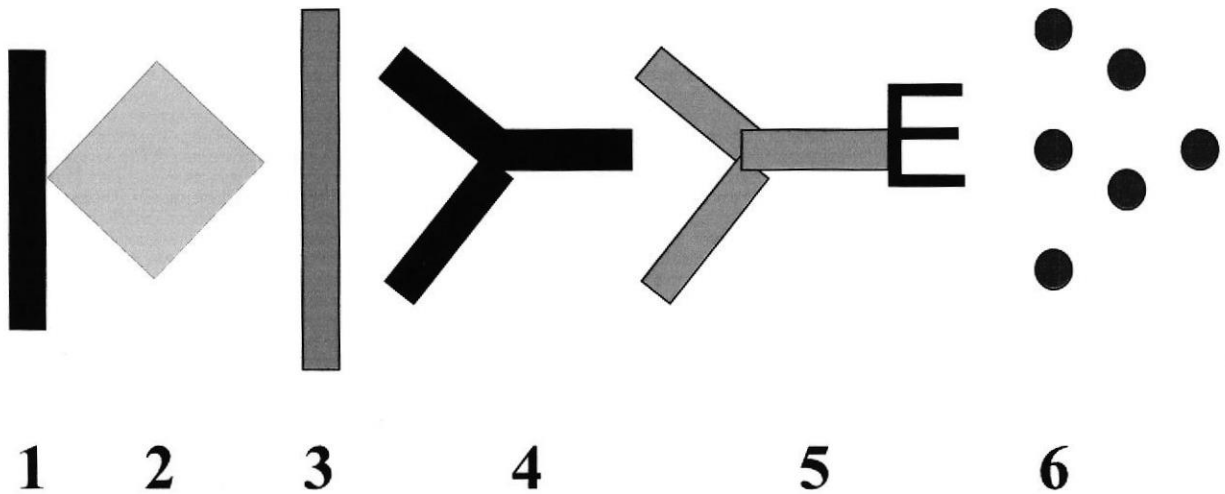
Procedimiento.-

1. Diluir el antígeno a una concentración final de 20 $\mu\text{g/ml}$. En PBS recubrir las tiras de microELISA con 100 μL del antígeno diluido.
2. Incubar 2 horas a 37°C o toda la noche a 4°C.
3. Remover la solución de antígeno y entonces lavar 4 veces con PBS + Tween 20 al 0.05% (PBS-T).
4. Bloquear los pocillos añadiendo 300 μL c/pocillo de BSA al 3% y dejar incubar 1 h a 37°C.
5. Lavar nuevamente con PBS-T 6 veces.
6. Hacer diluciones:
1:250 1:500 1:1000 1:2000 1:4000 1:8000 1:16.000, del suero Pre-
Inmune e inmune (el primero como control negativo). Adicionar 100 μL
por pocillo de c/dilución, incubar 2 horas a 37°C, utilizar PBS-T como
blanco.
7. Lavar con PBS-T 8 veces.
8. adicionar 100 μL de conjugado: anticuerpo de cabra anti IgG de conejo –
fosfatasa alcalina (Cappel) diluido 1/4000 en PBS-T, BSA 3% por 2 h a 37°C.
9. Lavar con PBS-T 10 veces.
10. finalmente agregar 100 μL del sustrato en cada pocillo, Incubar 10 min. A
temperatura ambiente y añadir 50- 100 μL de hidróxido de sodio NaOH 3Mol/L

para parar la reacción. La reacción positiva se torna amarillo brillante.

11. Leer absorbancia (D.O.) en un lector calorimétrico de microplacas contra aire a una absorbancia (λ) de 405 nm.

ESQUEMA DEL ENSAYO ELISA INDIRECTO



1. Tira plástica de 8 pocillos.
2. Recubrimiento: Extracto de *M. fijiensis*.
3. Bloqueo con BSA.
4. Antisuero a titular.
5. Conjugado anti-IgG de conejo- fosfatasa alcalina.
6. Sustrato: para nitrofenil fosfato.

Materiales y equipos.-

- Guantes estériles
- Micro-pipetas
- Tiras de microELISA de poliestireno marca: Maxi Sorp, Num.
- Piseta
- Beaker estériles
- Lector de ELISA. (marca:tecan)



Reactivos.-

- PBS (ver pag. 8).
- Tween 20 al 0.05%

- BSA al 3%. Producto comercial marca sigma

Ingredientes del BSA:

nitrogeno 15.9%

Suero bovino 4%

Ácido graso 0.02%

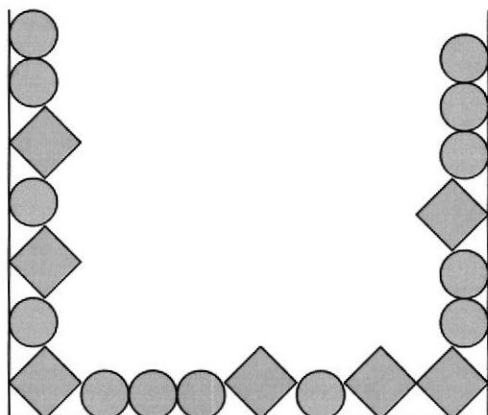
pH 7 ajustado con NaCl 0.15M

fundamento:

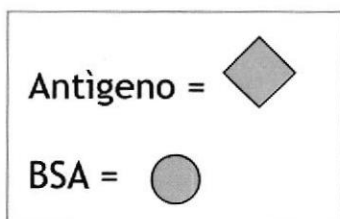
el BSA se pega a los espacios vacíos del pocillo y de esa forma se evitan uniones inespecíficas (falsos positivos).

Almacenamiento: de 2 a 8°C.

Grafico:



← Acción del BSA



- Conjugado: anticuerpo de cabra anti- IgG de conejo con enzima Fosfatasa alcalina; se utiliza este tipo de enzima para muestras de origen vegetal.

Marca comercial: Cappel

- Sustrato utilizado: P-nitrofenil fosfato.

Forma de presentación: pastillas con una concentración de 5mg/ml

Marca comercial: sigma

Ingredientes del sustrato: disolver a una concentración de 1mg/ml

En buffer dietanolamina 10 mMol/l

0.5 mMol/l cloruro de Magnesio MgCl₂

ajustar pH a 9.5

Cálculos y Ejemplos:

Ejemplo:

Dilución del hongo

Llevar la concentración conocida del hongo que en este caso es 1.4 mg/ml a 20μL /ml

1. Utilizamos factor de conversión:

$$1.4\text{mg} \times \frac{1000\mu\text{L}}{1\text{mg}} = 1.400 \mu\text{L de concentración}$$

1mg

2. Aplicando una regla de 3 inversa obtenemos:

$$1 = x = 70 \text{ veces que tengo que diluir el concentrado}$$

14.000 20μg para llegar a la concentración deseada

1000/70 = 14 μL concentrado lo llevo a 1000 μL ósea agregar a 986 μL PBS para completar.



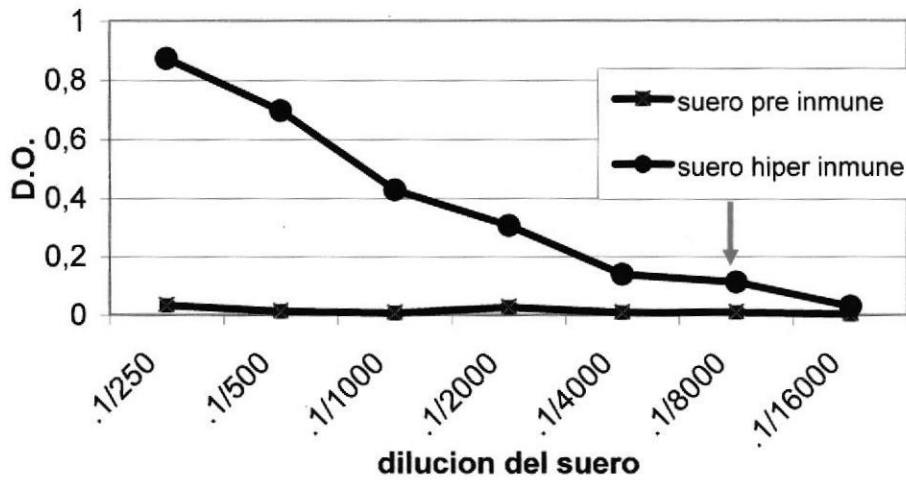
Dilución 1:400

Aplicar regla de 3 a la inversa:

$$\frac{1}{4000} = \frac{x}{7000} = 1.75\mu\text{L del conjugado se completan con } 6.998\mu\text{L de PBS-T, BSA } 3\%.$$

Resultados

Título de conejo inmunizado con M. Fijensis



El título encontrado fue de 1/8000.



CONCLUSIÓN

- La metodología utilizada en el presente reporte permitió detectar la presencia de anticuerpos específicos para micelios del hongo causante de la Sigatoka Negra. Estos resultados serán corroborados, utilizando otros aislados fúngicos a fin de determinar la mono especificidad de los sueros inmunes.
- La dilución de 1/8000 es la dilución efectiva y apta donde aun existe unión entre antígeno-anticuerpo por lo tanto en los siguientes ensayos no será necesario hacer nuevas las diluciones, permitiendo ahorrar reactivos y muestra.
- Hay que destacar La Importancia de métodos de inmuno- diagnostico, ya que el área de sus aplicaciones se ha expandido en forma sostenida, siendo utilizada en la medición de hormonas, inmunoglobulinas, antígenos y anticuerpos en infecciones bacterianas, parasitarias o virosicas.
- esta investigación es un instrumento el cual también puede ser utilizado para detectar organismos patógenos en la industria alimentaría, Siguiendo la metodología antes propuesta.
- Finalmente es necesario resaltar la labor del laboratorio de Inmunoquímica ya que se enfoca a trabajar con proteínas, tomando en cuenta sus infinitos usos y aplicaciones dentro del campo de Medicina, Agricultura y Alimentos.

RECOMENDACIONES

- En el ensayo ELISA indirecto es recomendable utilizar la enzima fosfatasa alcalina en lugar de la peroxidasa, ya que por su naturaleza vegetal, nos puede dar falsos positivos.



INSTITUTO DE TECNOLOGÍAS PROGRAMA DE TECNOLOGÍA EN ALIMENTOS



- Es necesario que los investigadores y científicos con el apoyo permanente de los productores bananeros y líderes gremiales puedan mantener una comunicación beneficiosa para mejorar la producción agrícola, acorde a los requerimientos de calidad que demanda el mercado internacional.



BIBLIOGRAFÍA

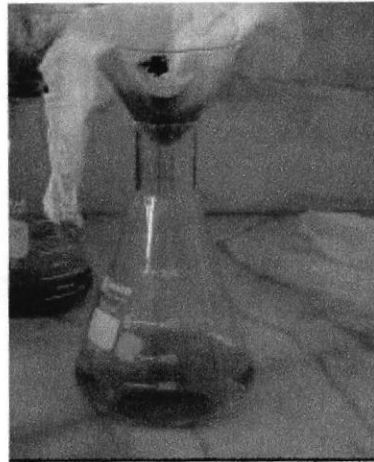
- Harlow, E., and Lane, D. 1988. Antibodies: A laboratory manual (Plainview NY: CSHL Press). 726pp.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Watson, J. D. 1994. Biología Molecular de la Célula. Traducción: Mercé Durfort i Coll. Barcelona-España. Ed. Omega S.A. pp 186-188
- Publicaciones del CIBE
- Robinson, J. C. 1996. Bananas and plantains (Cambridge: CAB International
- www.labgeminis.com

ANEXO 1

Fotos de obtención del hongo



Hongo en medio líquido



filtración



Micelios del hongo, que se ponen a secar.

ANEXO 2

CENTRIFUGA A14

Especificaciones del Equipo:

Marca: JOUAN S. A.

Modelo: A14

Serie: 30005789

Catalogo # 11174614

Hecho en: Francia

Energía con la que trabaja: 120 + 0- 10% volt AS 250 watts, 60 Hz.

Velocidad máxima: 14.000 rpm.

Chamber Diam: 188 mm.

Densidad máxima: 1.2

Log. Máximo: 0.025Kg a 14.000 rpm.

Manual de manejo

1. conectar el aparato
2. abrir con el botón que dice OPEN.
3. cargar la centrifuga, tomando en cuenta que se deben de colocar los tubos, balanceando el peso.

Como se ve en el grafico:



4. cerrar.
5. graduar la velocidad y el tiempo.
6. Start.

ANEXO 3

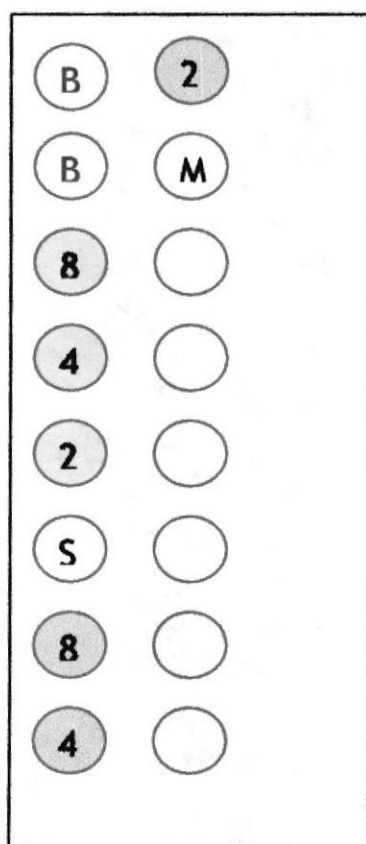
Método Macrométrico o estándar Bradford

Objetivo.-

Se lo aplica para conocer la concentración de la muestra en mg por ml. En este caso se desea saber la cantidad de antígeno presente.

Procedimiento.-

1. Diluir el Bradford 1:4, es decir por cada parte de Bradford hay 4 partes de agua destilada.
2. Diluir 2, 4, y 8 veces las muestras. (la muestra de proteínas y un estándar en este caso es la inmunoglobulina de plasma bovina la cual tiene una concentración de 1.41 mg/ml.
3. adicionar 30 μ L de cada dilución en los pocillos de la placa de ELISA. (ver grafico).
4. adicionar 200 μ L de Bradford, incubar 10 minutos.
5. se coloca la placa en el lector ELISA y se programa la absorbancia a 595nm.



→ PLACAS ELISA

B = Blanco
8(amarillo) = inmunoglobulina 8 veces diluida
4(amarillo) = inmunoglobulina 4 veces diluida
2(amarillo) = inmunoglobulina 2 veces diluida
S = inmunoglobulina (estándar)
8(melón) = hongo 8 veces diluido
4 (melón) = hongo 4 veces diluido
2 (melón) =hongo 2 veces diluido
M = muestra inicial del hongo.

Appendix II

PROTEIN TECHNIQUES

- Ammonium Sulfate Saturation Tables* 658
Proteins Used as Molecular Weight Standards 659
Amino Acids 660
Genetic Code 662
Mitochondrial Genetic Code 663
Amino Acid and Codon Usage 664
Log Odds Matrix for Relationships between Protein Sequences (MDM₇₈) 666
Accepted Amino Acid Substitutions 667
Common Protein Sequence Motifs 668
David's Life Chart II 669
Protein Quantitation—Bradford 670
Protein Quantitation—Bradford Spot Test 671
Protein Quantitation—Coomassie Spot Test 672
Protein Quantitation—UV Detection 673
Protein Quantitation—Bicinchoninic Acid 674
Protein Quantitation—Lowry 675
Proteases 676
Protease Inhibitors 677
Preparing Dialysis Tubing 678
TCA Precipitation—Filtration 678
TCA Precipitation—Spotting 679
Chromogenic Substrates Yielding Water-Soluble Products 680
Chromogenic Substrates Yielding Water-Insoluble Products 681



Ammonium Sulfate Saturation Tables

Starting concentration	Final concentration													
	10%	20%	25%	30%	35%	40%	45%	50%	55%	60%	65%	70%	75%	80%
0%	56	114	144	176	209	243	277	313	351	390	430	472	516	561
10%	—	57	86	118	150	183	216	251	288	326	365	406	449	494
20%		—	29	59	91	123	155	189	225	262	300	340	382	424
25%			—	30	61	93	125	158	193	230	267	307	348	390
30%				—	30	62	94	127	162	198	235	273	314	356
35%					—	31	63	94	129	164	200	238	278	319
40%						—	31	63	97	132	168	205	245	285
45%							—	32	65	99	134	171	210	250
50%								—	33	66	101	137	176	214
55%									—	33	67	103	141	179
60%										—	34	69	105	143

Values given are the number of grams to be added to 1 liter of solution to change the ammonium sulfate concentration from the starting concentration to final concentration. All values are adjusted for changes in volume at room temperature. The saturation of ammonium sulfate does not vary significantly between 4°C and 25°C, so the values given here can normally be used at both temperatures. Saturated ammonium sulfate is 4.1 M at 25°C (add 761 grams to 1 liter of distilled H₂O).

ANEXO 5

Preparar Soluciones

Ejemplo:

Preparar una solución 150 μ m (mili molar) de ClNa (100ml)

1. en el envase del reactivo ver el peso molecular que en este caso del cloruro de sodio el μ m = 58.3 /mol.
2. transformo 150 μ m a Moles

$$1000\mu\text{m} \times \frac{1 \text{ mol}}{150\mu\text{m}} = 0.15\text{m}$$

3. $0.15\text{m} \times \frac{58.3 \text{ g/mol}}{1 \text{ mol}} = 8.7 \text{ g en } 1000\text{ml}$

4. $\frac{8.7 \text{ g}}{x} \times \frac{1000\text{ml}}{100\text{ml}} = 0.87 \text{ g en } 100 \text{ ml}$

Función de los reactivos o componentes del reactivo:



ANEXO 6

Función de algunos compuestos:

EDTA.-

Agente quelante muy útil, que protege las enzimas de inactivación por metales pesados algunas veces presentes en reactivos y de la proteólisis por las metaloproteasas.

Ácido ascórbico y Cl Na.-

Permite la solubilidad de las proteínas.

PMSF.-

Fluoruro fenilmetil sulfonyl, inhibe proteasas.

Mercaptoetanol.-

Evita reacción de oxidación.

Conceptos.-

Antígeno o inmunogeno.- molécula compleja generalmente proteína o carbohidrato capaz de estimular (de parte del mecanismo de defensa) una respuesta inmunitaria.

Anticuerpo.-inmonoglobulinas (Ig). Que se producen como respuesta a un material extraño presente en el organismo. La función del anticuerpo es unirse al antígeno pero no necesariamente lo destruye, mas bien lo etiqueta para su destrucción.

La manera como reconoce el anticuerpo al antígeno es por su secuencia de aminoácidos a.a)

Mecanismo de defensa.- producción de anticuerpos específicos que ayudan a destruir el antígeno.

Memoria inmunitaria.- capacidad de algunos animales complejos de reaccionar de manera mas eficaz la segunda ocasión que moléculas extrañas invaden el cuerpo.

ESPO
1999