

Oct 20, 2017

Version 1

PRUEBA DE HEMOLISIS DE ERITROCITOS HUMANOS V.1

DOI

<https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.jh9cj96>

Germán Iberto Téllez Ramírez¹, Lily Johanna Toro², Diana Carolina Henao¹, Juan David Rivera¹, Jhon Carlos Castaño Osorio¹

¹Centro de investigaciones biomédicas. Universidad del Quindío;

²Centro de Investigaciones Biomédicas - Universidad del Quindío

Grupo de inmunología m...



Grupo De Inmunología Molecular GYMOL Universidad Del Quindio

Centro de Investigaciones Biomédicas - Universidad del Quind...

Create & collaborate more with a free account

Edit and publish protocols, collaborate in communities, share insights through comments, and track progress with run records.

Create free account

OPEN  ACCESS



DOI: <https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.jh9cj96>

Protocol Citation: Germán Iberto Téllez Ramírez, Lily Johanna Toro, Diana Carolina Henao, Juan David Rivera, Jhon Carlos Castaño Osorio 2017. PRUEBA DE HEMOLISIS DE ERITROCITOS HUMANOS. **protocols.io**

<https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.jh9cj96>

Manuscript citation:

Shin SY, Kang JH, Hahm KS. Structure-antibacterial, antitumor and hemolytic activity relationships of cecropin A-magainin 2 and cecropin A-melittin hybrid peptides. J Pept Res. 1999 Jan;53(1):82-90.

License: This is an open access protocol distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](#), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited

Protocol status: Working

Created: August 22, 2017

Last Modified: March 23, 2018

Protocol Integer ID: 7457

Keywords: hemólisis, eritrocitos humanos, moléculas o sustancias activas

Abstract

Esta prueba evalúa la actividad hemolítica de péptidos o moléculas sobre eritrocitos humanos como criterio de selectividad ante las células eucariotas.









La realización de este protocolo fue posible gracias al apoyo del departamento administrativo de ciencia tecnología e innovación, Colciencias a través del proyecto 111356933173 convocatoria569-2012.

Guidelines

Este procedimiento consta de la extracción de la sangre, lavado y dilución de eritrocitos y finalmente de la preparación de la muestra que se va a poner en contacto con los eritrocitos para evaluar su actividad hemolítica. El tiempo estimado es de 4 a 5 horas contabilizando desde el momento en el que se extraen los eritrocitos hasta el momento en el que se lee la placa en el espectrofotómetro por turbidez.


Materials

MATERIALS

-  Incubator - Light, humidity and temperature controlled
-  syringes, 20ml
-  1.5 mL Eppendorf tubes
-  P1000 micropipet and Tips
-  96-well microtiter plates polypropilene greiner bio-one Catalog #650201
-  BD Vacutainer E.D.T.A Tubes Becton Dickinson (BD) Catalog #367861
-  Centrifuge Thermo Fisher Scientific Catalog #Heraeus Megafuge 11R
-  Spectrophotometer EPOCH Biotek

Troubleshooting

Safety warnings

 Maneje todas las normas de bioseguridad a tener en cuenta para el manejo de materiales y reactivos de laboratorios de biología molecular.

Before start

Preparar solución de lavado:

Buffer PBS 1X: 130 mM NaCl, 3 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄ y 1,5mM KH₂PO₄ pH 7,4.

Se puede utilizar como solución alternativa: 150mMKCl, 5mM Tris-HCl, pH 7.4

Solución de control hemolisis: Tritón X100 solución al 1% o al 0,1%.

Blanco del ensayo: Utilizar solución de lavado o diluyente de la muestra.

Preparar las muestras a evaluar.

Preparación de solución madre de Eritrocitos

- 1 Tomar 2 ml de sangre heparinizada y centrifugar a 800 gravedades durante 10 minutos a temperatura ambiente.
Se retira el sobrenadante y el pellet (eritrocitos), se lava con solución de lavado (solución normotónica) tres veces por centrifugación a 800 g durante 10 minutos cada vez.

Finalmente los eritrocitos se resuspenden, en el mismo volumen inicial de sangre utilizando solución de lavado.

Note

Utilizar una solución de lavado normotónica con el fin de evitar hemolisis

Preparación de solución de trabajo de Eritrocitos

- 2 Preparar una dilución con la solución madre de eritrocitos a una relación 1:250 con PBS 1X e incube la solución de trabajo por 15 minutos a 37°C.

Preparación de las moléculas a evaluar (muestras)

- 3
Generalmente a partir de una solución madre de la muestra de 1 mg/mL a 5 mg/mL (depende de la muestra), preparar una dilución 10 veces mas concentrado (10X) con respecto a la concentración final que se evaluara por cada tratamiento y luego realizar diluciones seriadas proporción 1:1 partiendo de la muestra mas concentrada hasta llegar a la mas diluida que se requiera.

Por ejemplo: si se quiere evaluar un péptido a una concentración máxima de 250 µg/mL hasta n µg/mL según diluciones seriadas (ver tabla de distribución de muestras). Se debe preparar una solución a 10X (2500 µg/mL); si la solución madre esta a 5000 µg/mL y se quieren preparar 50 µL a 2500 µg/mL, se deben tomar 25 µL de solución 10X con 25 µL de PBS 1X (tubo 1) y realizar diluciones seriadas 1:1 de 25 µL de péptido tubo 1 más 25 µL de diluyente y así sucesivamente hasta completar la cantidad de concentraciones a evaluar por ejemplo: 1250 µg/mL, 625 µg/mL, 312,5 µg/mL, etc.

Controles



- Control positivo: adicionar 10uL de solución de 0,1% v/v de tritón X 100 a las celdas de control positivo, para una concentración final de 0,01%
Control negativo: adicionar 10uL de diluyente (PBS 1X) en las celdas de control negativo.

Preparación de placa con muestras

- Adicionar 10uL por triplicado de cada concentración de la muestra a 10X en cada pozo de una microplaca de 96 pozos, según corresponda.

Tratamiento de eritrocitos para evaluar hemolisis

- En cada uno de los pozos de la microplaca del paso 5 adicionar 90ul de solución de trabajo de eritrocitos e incubar la placa durante 2 horas a 37 °C

Note

Adicionar los eritrocitos en cada pozo en dirección de menor concentración a mayor concentración para reutilizar puntas y evitar contaminación cruzada.

Preparación de las muestras antes de leer

- Centrifugar la placa a 800 g durante 5 minutos, extraer el sobrenadante cuidadosamente (aprox. 80 μ L/pozo) y transferir a otra microplaca

Lectura de absorbancia

- Leer absorbancias de sobrenadantes del paso anterior en espectrofotómetro a 540 nm

Análisis de resultados

- Calcular mediana del blanco (absorbancia diluyente) y restar (delta) a todos los valores de absorbancia en cada uno de los pozos de la placa, sacar la mediana de cada uno de estos valores por cada tratamiento o concentración evaluada. Después de la resta, utilizar como referente la mediana del control de 100% de hemólisis o control positivo, para calcular el porcentaje de hemólisis en cada uno de los pozos, multiplicando el delta de la absorbancia de cada uno de los pozos por 100% y dividiendo el resultado entre la mediana de la absorbancia del control positivo de hemólisis.

Dataset

Plantilla hemólisis

NAME

https://drive.google.com/file/d/0B6V_ooAEAQZQTVRHbjRPcUZfc2c/view

LINK