



Kit de Tinción con Plata para Proteínas

El kit de tinción con plata permite la detección y cuantificación de proteínas en geles de poliacrilamida, con una sensibilidad de 2-5 ng. El Kit provee la cantidad de reactivos suficientes para teñir 25 geles de 8x10 cm o 12 geles de 20x20 cm.

Contenido:

Solución A de fijación 2,5 x	500 mL	Solución E de revelado 2,5 x	500 mL
Solución B de fijación y revelado 25 x	50 mL	Solución F de detención 25 x	50 mL
Solución C de lavado 25 x	50 mL	Solución G de secado 2,5 x	500 mL
Solución D de tinción 25 x	50 mL	Metodología de uso	1

El procedimiento a realizar, una vez concluida la corrida electroforética, consta de cinco pasos: *Fijación, Lavado, Tinción, Revelado y Detención*, detallados a continuación:

Fijación:

- 1- Preparar la **Solución de Fijación** por mezcla y dilución simultánea, 1:2.5 de la **Solución A de Fijación 2.5x**, y 1:25 de la **Solución B de Fijación y Revelado 25x**, en agua destilada.
- 2- Sumergir el gel en esta solución diluida e incubar durante 10 min. con agitación leve.

Lavado:

- 1- Lavar el gel dos veces con agua destilada, durante 5 min. con agitación leve.
- 2- Sumergir el gel durante un minuto en una dilución 1:25 de la **Solución C de Lavado 25x**.
- 3- Lavar el gel dos veces con agua destilada, durante 20 seg. con agitación leve.

Tinción:

- 1- Preparar una dilución 1:25 de la **Solución D de Tinción 25x** en agua destilada.
- 2- Sumergir el gel en esta solución diluida e incubar durante 10 min. con agitación leve.
- 3- Realizar dos lavados muy breves del gel con agua destilada.

Revelado:

- 1- Preparar la **Solución de Revelado** por mezcla y dilución simultánea, 1:25 de la **Solución B de Fijación y Revelado 25x**, y 1:2.5 de la **Solución E de Revelado 2.5x**, en agua destilada.
- 2- Lavar brevemente el gel con un pequeño volumen de la **Solución de Revelado**.
- 3- Sumergir el gel en esta solución e incubarlo, con agitación leve, hasta que la intensidad de las bandas sea adecuada (5 minutos aproximadamente).

Detención:

- 1- Detener el revelado añadiendo a la **Solución de Revelado** 1/25 V de la **Solución F de Detención 25x** (2 ml por cada 50 ml de **Solución de Revelado** usada en el paso anterior).
- 2- Lavar el gel con agua destilada durante 10 min., agitando suavemente.
- 3- Sumergir el gel durante 10 min. en una dilución 1:2.5 de la **Solución G de Secado 2.5x**.
- 4- Conservar el gel en esta solución o secarlo a temperatura ambiente, entre dos membranas húmedas de diálisis o celofán húmedo, sobre una placa de vidrio.



Notas:

- El volumen de solución requerido en cada paso depende del tamaño del gel y del recipiente. Normalmente son suficientes 50 ml para un gel de 8x10 cm, y 100 ml para un gel de 20x20 cm.
- Todos estos pasos pueden realizarse en un mismo recipiente, teniendo la precaución de lavarlo exhaustivamente una vez concluida la técnica. También puede usarse un recipiente exclusivamente para la tinción.
- El gel no debe ser tocado, ni con guantes, porque se mancha. En caso de requerir su manipulación, hacerlo con Parafilm.
- Para detectar proteínas de bajo peso molecular, se recomienda realizar la tinción inmediatamente después de la corrida electroforética. Estas se pierden cuando se deja fijando toda la noche.
- No es recomendable excederse en el Revelado, pues éste continúa un poco aún después de añadir la **Solución F de Detención**.
- El gel puede conservarse en la solución diluida de secado, en un envase sellado.
- Para tener un registro permanente, secar el gel una vez concluida la técnica.

Problemas más frecuentes y recomendaciones para solucionarlos:

Problema técnico	Probable causa	Recomendaciones
Gel blanco	Agua con iones, principalmente cloruro	Usar agua destilada o desionizada de mejor calidad Lavar bien el recipiente que se está usando
	pH muy bajo de la Solución de Detención por defecto de la E o exceso de la F	Revisar la dilución de las soluciones E y F
Gel sin bandas	a) Si no se ven las bandas del marcador: Muy poca cantidad de Proteína .	Aplicar mayor cantidad de Proteína en las muestras o un mayor volumen de éstas
	b) Si se ven las bandas del marcador: Solución de Tinción y/o Revelado mal preparadas	Revisar la dilución de las soluciones D, B y E
	Solución de Revelado fría	Calentar la solución a 25°C aproximadamente
	Gel sobreteñido	Solución de Tinción y/o Revelado mal preparadas
Gel sobreteñido	El Revelado no se detiene porque la Solución de Detención tiene un pH muy alto por exceso de la E o defecto de la F	Revisar la dilución de las soluciones E y F
	Exceso de plata en el recipiente	Lavar bien el recipiente que se está usando Es importante el lavado entre Tinción y Revelado. Si no es suficiente, repetirlo.