

<b>MEDIOS DE CULTIVO IN VITRO</b>
-----------------------------------

**Medio de Murashige & Skoog (1962) modificado**

<b>Componentes</b> (mg l <sup>-1</sup> )	<b>Callos</b>		<b>Suspensiones</b>
	<i>cv. Francés Precoz</i>	<i>cv. Green Globe</i>	<i>cv. Green Globe</i>
<b>Macronutrientes</b>			
KNO <sub>3</sub>	950	1900	1900
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	825	1650	1650
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370	370	370
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	170	170
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	440	440	440
<b>Micronutrientes</b>			
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2	6,2	6,2
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	22,3	22,3	22,3
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8,6	8,6	8,6
NaMoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,25	0,25	0,25
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,025	0,025	0,025
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,025	0,025	0,025
KI	0,83	0,83	0,83
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27,8	27,8	27,8
Na <sub>2</sub> EDTA	37,3	37,3	37,3
<b>Orgánicos</b>			
Tiamina.HCl	0,4	10	10
Piridoxina	0,5	1	1
Acido nicotínico	0,5	1	1
Mio-inositol	100	100	100
Sacarosa	30000	30000	30000
Agar	8000	8000	

## ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA

La electroforesis nativa se realizó conforme a la técnica de Davies (1964), la electroforesis desnaturante (SDS-PAGE) de acuerdo a la técnica descrita por Laemmli (1970) y la electroforesis nativa con urea con modificaciones de la técnica de Andrews (1983).

### *Geles de poliacrilamida*

	Nativa		SDS-PAGE		Urea-PAGE	
	5 (% T)	14 (% T)	5 % (%T)	14 (% T)	4,2 (% T)	12,5 (% T)
Acrilamida-bisacrilamida (30:0,8) [ml]	1,62	4,55	1,62	4,55		
Acrilamida-bisacrilamida (24:1) [ml]					1,68	5
Buffer Tris-HCl 1,5 M pH 8,8 [ml]		2,50		2,50		
Buffer Tris-HCL 0,5 M pH 6,8 [ml]	2,50		2,50			
Buffer Tris-HCl 0,3M pH 8,9, urea 4,5M c.s.p. [ml]						10
Buffer Tris-HCl 0,06 M pH 7,6 urea 4,5M c.s.p. [ml]					10	
SDS 10 % [μl]			200	200		
TEMED [μl]	5	5	5	5	5	5
Persulfato de amonio 1,5 % [μl]	500	500	500	500	250	250
Agua c.s.p. [ml]	10	10	10	10		

**Buffer de muestra**

	Nativa	SDS-PAGE	Urea-PAGE
SDS (g)		2	
$\beta$ -mercaptoetanol (ml)		5	10
Glicerol (ml)	5	8	25
Azul de bromofenol (mg)	5	5	4
Buffer Tris-HCl 65 mM pH 6,8 c.s.p. (ml)	100	100	
Buffer Tris-HCl 0,6 M, urea 8 M, pH 7,6 c.s.p. (ml)			50

**Buffer de corrida pH 8,3**

	Nativa	SDS-PAGE
Tris (g)	3	3
Glicina (g)	14,4	14,4
SDS (g)		1
Agua c.s.p. (l)	1	1

**Soluciones de colorante y decolorante**

	Colorante	Decolorante
Coomassie Brilliant Blue R-250 (mg)	100	
Metanol (ml)	25	25
Acido acético glacial (ml)	10	10
Agua destilada, c.s.p. (ml)	100	100

**Marcadores de Peso Molecular**

Proteínas	kDa Sigma (MW-SDS-70L)	kDa Bio-Rad (Low range)
Fosforilasa b		103
Albúmina bovina	66	77
Ovoalbúmina	45	50
Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	36	
Anhidrasa carbónica	29	34,3
Tripsinógeno	24	
Inhibidor de tripsina	20,1	28,8
Lisozima		20,7
$\alpha$ -Lactoalbúmina	14,2	

## ISOELECTROENFOQUE

### **Solución de poliacrilamida al 10 %**

Acrilamida-Bisacrilamida (25%T, 3%C) [ml]	2
Glicerol (25% p/v) [ml]	2
Anfolitos (Pharmalyte 3-10 o 4-6,5) [ml]	0,5
Agua [ml]	5,5

A la solución desgasificada se le adicionaron los siguientes reactivos para iniciar la polimerización

TEMED [ $\mu$ l]	3
Persulfato de amonio al 10% p/v [ $\mu$ l]	60

### **Solución fijadora**

Acido sulfosalicílico [g]	4
Metanol [ml]	30
Acido tricloroacético [g]	12,5
Agua c.s.p. [ml]	100

### **Solución colorante**

Acido acético glacial [ml]	10
Etanol [ml]	27
Coomassie Brilliant Blue R-250 [mg]	40
CuSO <sub>4</sub> [mg]	500
Agua c.s.p. [ml]	100

### **Solución decolorante I**

Ácido acético glacial [ml]	7
Etanol [ml]	12
CuSO <sub>4</sub> [mg]	500
Agua c.s.p. [ml]	100

### **Solución decolorante II**

Acido acético glacial [ml]	7
Etanol [ml]	12
Agua c.s.p. [ml]	100

**Marcadores de pI (Pharmacia)**

<b>Proteínas</b>	<b>pI 3,5-9,3</b> (Broad pI Kit)
Amiloglucosidasa	3,50
Inhibidor de tripsina	4,55
$\beta$ -lactoglobulina A	5,20
Anhidrasa carbónica B (bovina)	5,85
Anhidrasa carbónica B (humana)	6,55
Mioglobina (banda ácida)	6,85
Mioglobina (banda básica)	7,35
Lentil lectina (ácida)	8,15
Lentil lectina (media)	8,45
Lentil lectina (básica)	8,65
Tripsinógeno	9,30

**ZIMOGRAMA****Solución fijadora y decolorante**

Acido acético glacial [ml]	10
Metanol [ml]	45
Agua c.s.p. [ml]	100

**Solución colorante**

Coomassie Brilliant Blue R-250 [mg]	250
Solución fijadora c.s.p. [ml]	100

**DETECCIÓN INMUNOLÓGICA****Inmunoelectroforesis****Buffer veronal sódico 50 mM, pH 8,6**

9 g veronal sódico / 6,5 ml HCl 1 N / agua destilada c.s.p. 1 litro.

**Colorante**

0,5 g Amido Schwartz / 45 ml alcohol metílico / 10 ml ácido acético / 45 ml agua destilada.

**Decolorante**

450 ml alcohol metílico / 100 ml ácido acético / 450 ml agua destilada.

**ELISA indirecto****Buffer carbonato-bicarbonato 50 mM pH 9,6**

1,58 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> / 2,9g NaHCO<sub>3</sub> / agua bidestilada c.s.p. 1 litro.

**Substrato**

Ortofenilendiamina (OPD) 1 mg/ml en buffer fosfato-citrato 0,1 M, pH 5 / H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 vol) 0,025 % v/v.

**Buffer citrato-fosfato de sodio pH 5, 100 mM**

19,2 g ácido cítrico / 28,4 g POHNa<sub>2</sub> / agua destilada c.s.p. 100 ml.

**Electrotransferencia y Western blotting****PBS**

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM / KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,8 mM / NaCl 137 mM / ClK 2,7 mM (pH 7-7,4)

**Buffer de transferencia**

Tris base 25 mM / glicina 192 mM / metanol 20 % (v/v). pH: 8,1-8,4

**Ponceau S**

0,1 g Ponceau S / 5 ml ácido acético glacial / 95 ml agua bidestilada.

**Buffer de lavado (PBST)**

100 ml PBS / 300 µl Tween 20.

**Buffer de bloqueo**

100 ml PBS / 100 µl Tween 20 / 3 g leche descremada.