

# PRUEBA DE HEMOLISIS DE ERITROCITOS HUMANOS

**Germán Alberto Téllez Ramírez, Lily Johanna Toro, Diana Carolina Henao, Juan David Rivera, Jhon Carlos Castaño Osorio**

## 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.

**Citation:** Germán Alberto Téllez Ramírez, Lily Johanna Toro, Diana Carolina Henao, Juan David Rivera, Jhon Carlos Castaño Osorio PRUEBA DE HEMOLISIS DE ERITROCITOS HUMANOS. **protocols.io**  
dx.doi.org/10.17504/protocols.io.jh9cj96

**Published:** 20 Oct 2017

## 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.

## Before start

### ***Preparar solución de lavado:***

Buffer PBS 1X: 130 mM NaCl, 3 mM KCl, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 1,5mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 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.**

## Materials

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

## Protocol

### Preparación de solución madre de Eritrocitos

#### Step 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.

#### 📌 NOTES

**Grupo de Inmunología Molecular Universidad del Quindío** 22 Aug 2017

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

### Preparación de solución de trabajo de Eritrocitos

## Step 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)

### Step 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

### Step 4.

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

### Step 5.

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

### Step 6.

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

## 📌 NOTES

**Grupo de Inmunología Molecular Universidad del Quindío 20 Oct 2017**

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

##### Step 7.

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

#### Lectura de absorbancia

##### Step 8.

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

#### Análisis de resultados

##### Step 9.

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](#) 

## Warnings

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