ELISA CUANTITATIVO

REF.: ELISA3
6 grupos de estudiantes

1.OBJETIVO DEL EXPERIMENTO

El objetivo de esta práctica es realizar y dominar los conceptos experimentales y la metodología implicados en un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Este experimento ELISA está diseñado para detectar IgG circulantes diferentes dirigidas a dos antígenos diferentes. Las observaciones en esta práctica incluyen la especificidad de anticuerpos, el efecto de dilución sobre las reacciones de ELISA, el desarrollo del color y la cuantificación.

2. COMPONENTES para 6 grupos de estudiantes

COMPONENTES	Conservación
A Antígeno A.	nevera
B Antígeno B.	nevera
C Tampón de dilución	nevera
D Anticuerpo primario A	nevera
E Anticuerpo primarioB	nevera
F 10X Tampón de Lavado	nevera
G Anticuerpo secundario	nevera
H ABTS	nevera
I Solución STOP	nevera
Placas de microtitulación.	Tª ambiente
Pipetas de transferencia.	Tª ambiente
Tubos de microcentrífuga.	Tª ambiente
Tubos de plástico (15 ml y 50 ml).	Tª ambiente

NOTA: Tras la recepción, almacene los componentes perecederos (A-I) en la nevera.

NOTA: Ninguno de los componentes de este kit se ha preparado a partir de material humano.

NOTA: Todos los componentes de este kit están destinados a la investigación educativa. No pueden ser utilizados con fines de diagnóstico o médicos, ni pueden ser administrados o consumidos por seres humanos o animales.

2.1 Material requerido y no suministrado

- Agua destilada.
- Vasos de vidrio o matraces.
- Guantes desechables de laboratorio.
- Gafas protectoras.
- **Micropipetas automáticas (5-50 µl) y (100-1000 µl) puntas.**

3. INTRODUCCIÓN

Los **anticuerpos** son proteínas humanas y animales específicas que se producen por las células blancas de la sangre en respuesta a materiales extraños. Ejemplos de tales materiales extraños, conocidos como antígenos, incluyen agentes infecciosos y diversos materiales ambientales "no propios". Los **antígenos** biológicos son biomoléculas de elevado peso molecular, tales como proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos que pueden estar circulando libremente o como parte de un complejo, como parte de una cubierta de un virus o de la superficie celular bacteriana. Los anticuerpos son producidos en respuesta a antígenos. Se unen a los antígenos y juegan un papel significativo en la posterior eliminación de dichos materiales en circulación. Por ejemplo, la exposición a un agente infeccioso hace que el individuo inicie una respuesta inmune que finalmente resulta en moléculas de anticuerposen el plasma que se unen a diferentes proteínas virales (y/o diferentes áreas del mismo polipéptido).

Cuando un anticuerpo se une a un antígeno biológico específico, se pueden reconocer cargas químicas específicas, secuencias o elementos estructurales. Estas características de unión estructurales constituyen la huella digital específica para un antígeno. Cada molécula de anticuerpo puede unirse a dos moléculas de antígeno. Este reconocimiento y la unión es altamente específica y hace posible la diferenciación entre los dos virus circulantes que pueden estar muy estrechamente relacionados, como en el caso de dos cepas del mismo virus.

Cuando un antígeno y sus anticuerpos forman complejos insolubles, esta reacción de unión altamente específica es conocida como la **inmunoprecipitación**. La precipitación del complejo es el resultado de diversos anticuerpos policlonales que se unen a los antígenos para formar una red. En el ensayo de inmunoprecipitación tradicional, los anticuerpos se obtienen a partir del suero de un animal expuesto al antígeno específico. El suero, también conocida como plasma, se prepara por la eliminación de las células rojas de la sangre. Contiene las proteínas específicas, los anticuerpos, que actuan contra un antígeno particular "no propio" que se introduce en el animal, ya sea por diseño o por una infección. Los anticuerpos son purificados a partir de muestras de suero de los animales y se pueden utilizar para detectar antígenos particulares, tales como agentes infecciosos humanos.

Descripción de la prueba de detección inmunológica
Los enzimo-inmunoensayos (ELISA's) fueron desarrollados originalmente para la medición de anticuerpos. Estos inmunoensayos también se han adaptado con éxito para detectar muestras que contienen antígenos. El ELISA se realiza en placas de microtitulación que generalmente están hechas de poliestireno o cloruro de polivinilo. Las placas son algo transparente y contienen muchos pozos pequeños (pocillos), en los que se depositan las muestras líquidas.

Los científicos agregan las muestras de prueba y los controles a los pocillos de la placa de plástico, donde no se adhieren específicamente a los pocillos a través de interacciones hidrofóbicas y electrostáticas (Figura 1). Esto significa que cualquier proteína en la muestra, y no solo el objetivo deseado, puede adherirse al plástico. A continuación, el anticuerpo primario se agrega a los pozos y la mezcla se deja incubar por un corto tiempo. Este anticuerpo reconoce específicamente y se une a la molécula objetivo (Figura 1). Por lo tanto, si alguna proteína objetivo está presente en los pocillos de microtitulación, el anticuerpo primario lo reconocerá.

Después de un breve período de incubación, los pocillos se lavan para eliminar cualquier anticuerpo primario que no se haya unido al antígeno. Después del lavado, se agrega un anticuerpo secundario unido a HRP a los pocillos donde se reconoce y se une al anticuerpo primario (Figura 1). El exceso de anticuerpo secundario se elimina de los pocillos lavando varias veces con tampón. Sin embargo, si el anticuerpo secundario se ha unido al anticuerpo primario, permanecerá en el pozo.

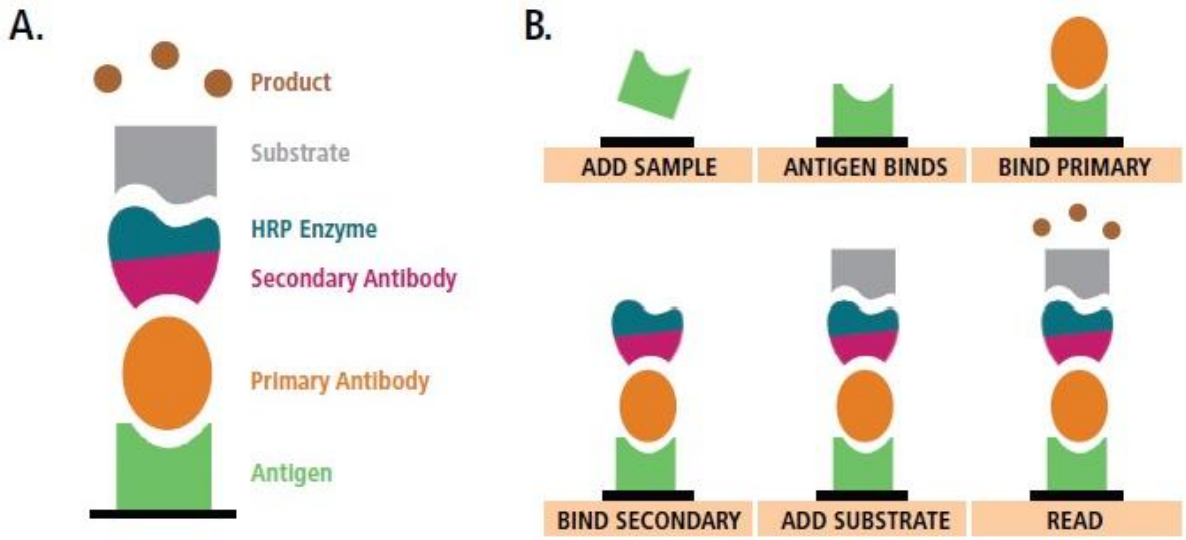


Figura 1

Finalmente, se agrega una solución de sustrato de ABTS y peróxido de hidrógeno a cada pozo. La enzima HRP ligada al anticuerpo secundario puede oxidar el ABTS en los pocillos donde está presente el complejo antígeno-anticuerpo, tornando la solución de sustrato transparente azul-verde.

Es importante destacar que la reacción enzima-sustrato solo puede ocurrir si cada paso del ELISA se realiza correctamente. Si la proteína objetivo no está presente en la solución de la muestra, o si la concentración es demasiado baja, los anticuerpos primarios y secundarios no tendrán nada con qué unirse y serán eliminados del pozo. Del mismo modo, incluso si el antígeno está presenteno se detectará si se utiliza el anticuerpo primario incorrecto. En cada uno de estos escenarios, no habrá enzima HRP disponible y el sustrato ABTS permanecerá incoloro.

Durante un ELISA cuantitativo, algunos de los pocillos contendrán soluciones donde ya se conoce la concentración del antígeno. **Estas muestras se crean comúnmente al diluir el antígeno para crear una curva estándar que contiene un amplio rango de concentraciones de antígeno. La intensidad del sustrato en las muestras desconocidas se puede comparar con la curva estándar para determinar una concentración de antígeno aproximada.**

En este experimento, se realizará un ELISA para examinar dos antígenos diferentes en muestras experimentales. El anticuerpo primario 1 solo detectará el antígeno A, mientras que el anticuerpo primario 2 es específico para el antígeno B. Ambos anticuerpos primarios pueden ser detectados por el mismo anticuerpo secundario. Se crearán curvas estándar para cada par de antígenos y anticuerpos para permitir una cuantificación precisa de las proteínas. Finalmente, se examinará la especificidad del ELISA intercambiando los pares antígeno-anticuerpo.

4. DESCRIPCIÓN DEL EXPERIMENTO

El objetivo de esta práctica es realizar y dominar los conceptos experimentales y la metodología implicados en un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Los estudiantes realizarán un ELISA para detectar la concentración de dos antígenos diferentes. Se creará una curva estándar para cada antígeno para permitir una cuantificación precisa en muestras desconocidas.

4.1 Precauciones

1. Se deben usarlos guantes y gafas de protección de forma rutinaria como buenas prácticas de laboratorio.

2. Deben tener mucho cuidado al trabajar con equipos que utilizancalor y/o fusión de los reactivos.

3. NO PIPETEAR LOS REACTIVOS CON LA BOCA- PIPETEARCON PERAS DE SUCCIÓN.

4. Lavarsebien siempre las manos con agua y jabón después de manipular reactivos o materiales biológicos del laboratorio.

5. Tener cuidado al usar cualquier equipo eléctrico en el laboratorio.

4.2 Requisitos de tiempo (aproximado) de los procedimientos de la práctica

Este experimento está destinado a ejecutarse en el transcurso de un único período de laboratorio y debe tomar aproximadamente 45-60 minutos. Si es necesario, el experimento se puede detener después del primer lavado. Indique a los estudiantes que agreguen tampón de lavado a cada pocillo de sus platos, cubran con cuidado con una envoltura de plástico o colóquelos en una bolsa de plástico para evitar la evaporación, y guarde las placas durante la noche a 4 ° C. No recomendamos almacenar las placas durante más de 24 horas antes de continuar con el experimento.

4.3 Preparaciones previas

Notas a los preparativos del profesor de la práctica

El tamaño de la clase, la duración de las clases de prácticas y la disponibilidad de los equipos son factores que deben ser considerados en la planificación e implementación de esta práctica con sus alumnos. Estas directrices pueden adaptarse para encajar en sus circunstancias específicas.

Preparation for:	What to do:	When:	Time Required:
Módulo I ELISA Cuantitativo	Divide microtiter plates	Before the class period	5 min.
	Prepare and Aliquot Reagents	Upto1weekbeforethelab	30 min.
	Prepare secondaryantibody	Same day as the lab	10 min.

A. PREPARATIVOS ANTES DELA PRÁCTICA

Placas de microtitulación

1. Como se muestra en la **figura2**, orientar las placas de microtitulación de modo que los números 1-12 estén en la parte superior y las letras A-H estén a la izquierda.

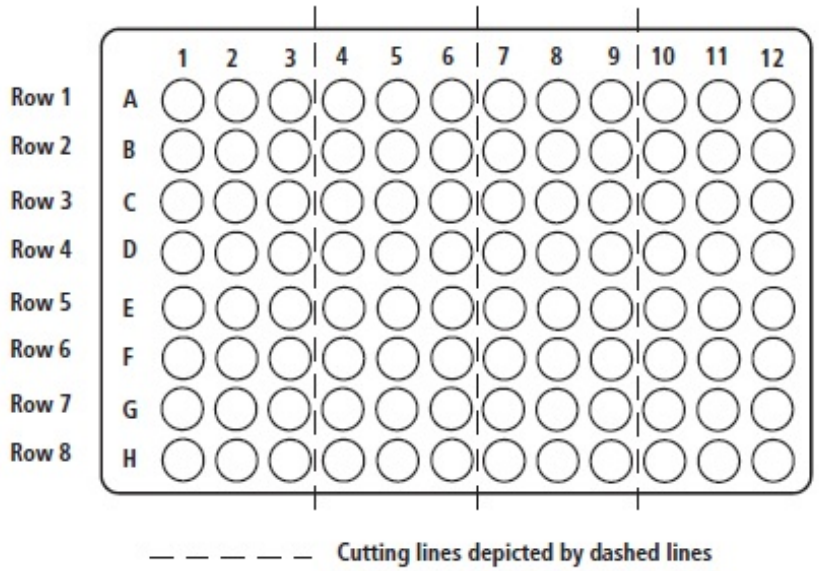


Figura 2

2. Cortar cada placa a lo largo de las líneas continuas como se muestra en la figura 3. Cada pieza contendrá 3 pocillos en un eje y 8 pocillos en el otro eje. Cada grupo de laboratorio recibirá dos piezas.

Preparación del antígeno

Los antígenosutilizados en esteexperimento se suministrancomoproteínasliofilizadas y debenrehidratarse antes de suuso. Sigalasinstrucciones a continuaciónparapreparar los Antígenos A y B comoreservas de 8 µg / ml. Se utilizaránparaque los estudiantescreencurvasestándar, asícomoparalasmuestrasdesconocidas.

1. Dispense 1,6 ml del tampón de dilución (componente C) en 10 tubos de microcentrífuga y etiquételoscomo**"tampón de dilución".** Reserve el tampón restante para la preparación de lasmuestras de antígeno.
2. Transfiera 5 ml de tampón de dilución (componente C) a untubocónico de 15 ml. **Etiquete el tubo "A1".**
3. Transfieraaproximadamente 0,5 ml del tampón de dilución del paso 2 al tubo del antígeno A (componente A). Pipetearhaciaarriba y haciaabajo o agitar en vórtexparamezclar.
4. Transfieratodo el contenido del Antígeno A reconstituido al tubo de 15 ml del paso 2. Mezclebien.

5. Dispense 180 µL de AntígenoAreconstituido en dieztubos de microcentrífuga s de 0,5 ml. **Etiquete los tuboscomo "A1".**Guarde el antígenoA restante paralasmuestrasdesconocidas.
6. Con untubocóniconuevo de 15 ml, repita los pasos 2-4 para Antigen B (Componente B).
7. Dispense 180 µL de Antígeno B reconstituido en dieztubos de microcentrífugade 0,5 ml. **Etiquete los tuboscomo "B1".**Guarde el antígeno B restante paralasmuestrasdesconocidas.

Preparación de lasmuestrasdesconocidas
1. Etiquete un tubo de 5 ml como **"Desc1"** y un segundo tubo como **"Desc2"** y prepare las muestras desconocidas utilizando el tampón de dilución y los antígenos rehidratados de la sección anterior.

Muestra	TampónDilución	Antigeno A	Antigeno B
Desconocida1	2600 µL	1300 µL	50 µL
Desconocida 2	3400 µL	20 µL	580 µL

2. Dispense 360 µL de Desc1 en diez tubos de microcentrífuga de 0.5 mL. Etiquete los tubos como **"Desc1".**
3. Dispense 360 µL de Desc2 en diez tubos de microcentrífuga de 0.5 mL. Etiquete los tubos como **"Desc2**".

Preparación Anticuerpos primarios
1. Transfiera 12 ml de tampón de dilución (componente C) a un tubo cónico de 15 ml. Etiquete el tubo **"AntiA".**
2. Retire con cuidado el tapón del vial del anticuerpo primario A (componente D) y transfiera aproximadamente0.5 ml del tampón de dilución del paso 1. Cierre el tapón y agite suavemente el vial de vidrio para mezclar.
3. Transfiera todo el contenido del anticuerpo primario reconstituido al tubo de 15 ml del paso 1. Mezcle bien.
4. Dispense 1.1 mL de Anticuerpo Primario A en 10 tubos de microcentrífuga. Etiquete los tubos como **"AbA" o "1ºA".**
5. Repita los pasos 1-3 para el Anticuerpo B (Componente E) usando un tubo cónico nuevo de 15 ml.
6. Dispense 1.1 ml de anticuerpo primario B en 10 tubos de microcentrífuga. Etiquete los tubos como **"AbB" o "1ºB".**

Preparación Tampón de Lavado 1X
1. Agregue el contenido del tampón de lavado 10x (componente F) a 540 ml de agua destilada. Mezclar bien.

2. Dispense 55 ml del Tampón de lavado diluido en un vaso pequeño para cada grupo. Etiquetar los vasos de precipitados "Tampón de lavado". Guarde el tampón de lavado restante para rehidratar el anticuerpo secundario.

B. PREPARATIVOS EL DÍA DELA PRÁCTICA

Dilución Anticuerpo Secundario
NOTA: debe usar el Tampón de Lavado Diluido para preparar el anticuerpo secundario.

1. Transfiera 19 ml de tampón de lavado diluido a un tubo cónico de 50 ml. Etiquete el tubo **"2 ° AB".**
2. Retire con cuidado el tapón del vial del anticuerpo secundario (componente G) y transfiera aproximadamente0.5 ml del tampón de lavado del tubo en el paso 1. Cierre el tapón y agite suavemente el vial de vidrio para mezclar.
3. Transfiera todo el contenido del anticuerpo secundario reconstituido al tubo de 50 ml del paso 1. Mezcle bien.
4. Etiquete 10 tubos de microcentrífuga**"2ºAB"** y dispense 1.9 ml por tubo.

Preparación del Substrato ABTS y Solución STOP
1. Dispense 1.9 mL de ABTS (Componente H) en 10 tubos de microcentrífuga. Etiquete los tubos como **"ABTS".**
2. Dispense 1.9 mL de Solución STOP (Componente I) en 10 tubos de microcentrífuga. Etiquete los tubos como **"Stop".**

NOTA: La solución de parada puede precipitar cuando se almacena a 4 ° C. Si se ve un precipitado, caliente suavemente la solución para volver a suspenderla antes de la alícuota.

C. REACTIVOS PARA LA PRÁCTICA
Cada grupo de prácticas debe recibir los siguientes componentes antes de iniciar el procedimiento experimental:

10 tubos vacíos de microcentrífuga de 0,5 ml
2 placas de microtitulación (pozo 3x8)
1 tubo de microcentrífuga que contiene 1,6 ml de tampón de dilución
1 tubo de microcentrífuga que contiene 180 µL de antígeno A (A1)
1 tubo de microcentrífuga que contiene 180 µL de antígeno B (B1)
1 tubo de microcentrífuga que contiene 360 µL de Desconocida 1 (Desc1)
1 tubo de microcentrífuga que contiene 360 µL de Desconocida 2 (DESc2)
1 tubo de microcentrífuga que contiene 1.1 ml de anticuerpo A (AbA)
1 tubo de microcentrífuga que contiene 1.1 ml de anticuerpo B (AbB)
1 tubo de microcentrífuga que contiene 1.9 ml de anticuerpo secundario (2°AB)
1 tubo de microcentrífuga que contiene 1.9 mL de sustrato (ABTS)
1 tubo demicrocentrífuga que contiene 1.9 ml de solución de STOP (STOP)
1 pipeta de transferencia
1 vaso que contiene 55 ml de tampón de lavado PBST 1X
Toallas de papel

4.5Evitar los errores más comunes
1. Los estudiantes han de tener **mucho cuidado** al transvasar soluciones dentro y fuera de los pocillos de la placa de microtitulación.

2. Usar solo pipetas limpiasycorrectamentemarcadasy evitar la contaminación de los pocillos adyacentes.

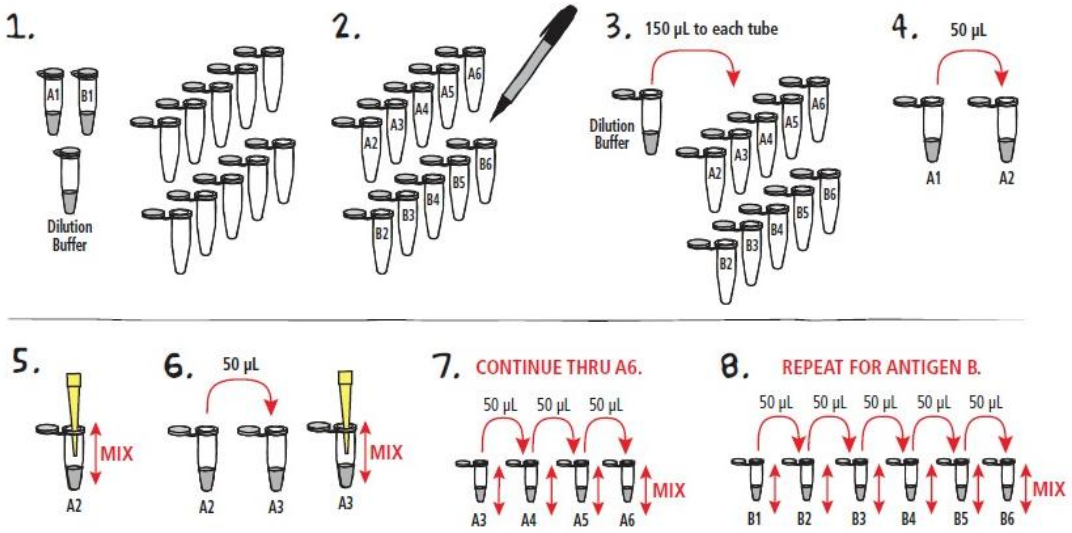
3. No intentar vaciar los pocillos de microtitulaciónagitando la placa. No funcionará yprovocará la contaminación de los pocillos adyacentes.

4. Lavar los pocillos con cuidado y lentamente, sin fuerza.

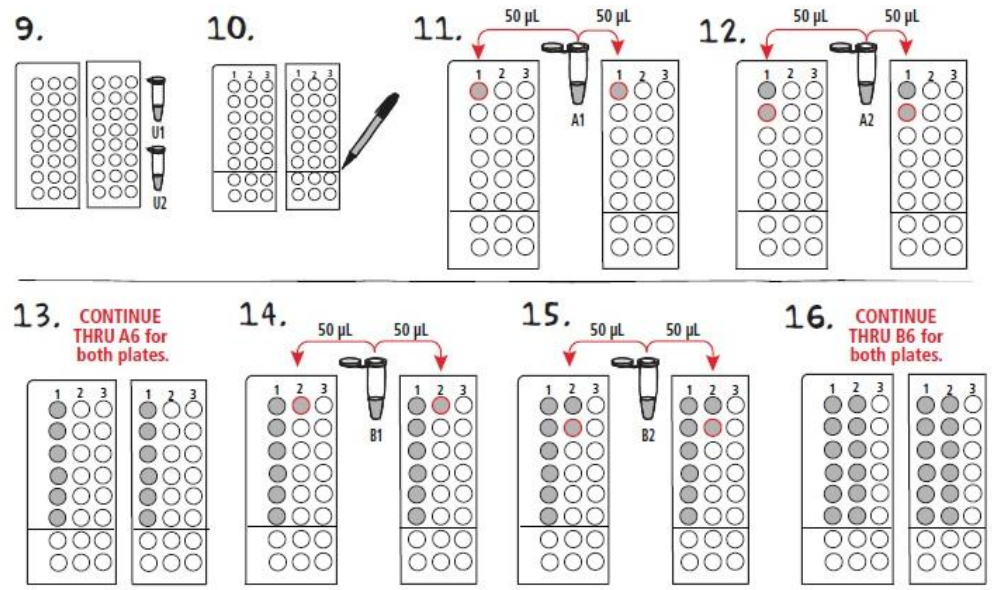
5. PRÁCTICA

MODULO 1. Análisis cuantitativo del ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA)

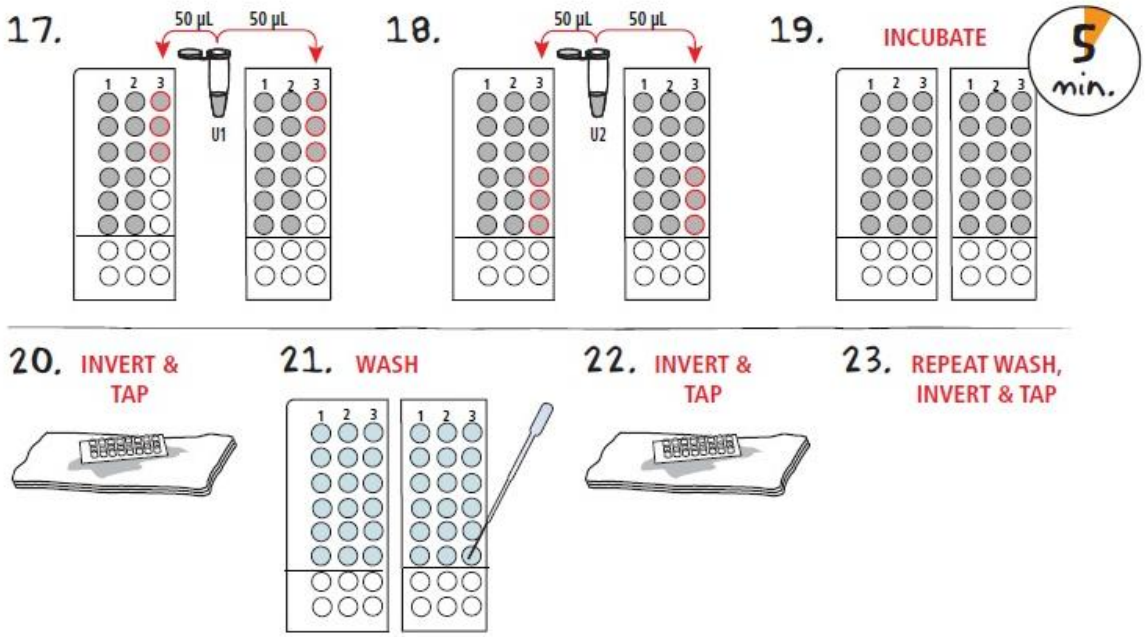
Diluciones de las proteínas estándar



1. PREPARAR los tubos de Antígeno A (A1) y Antígeno B (B1) concentrados, tubos vacíos de microcentrífugay un tubo de Tampón de Dilución.
2. ETIQUETE 5 tubos como A2-A6 para el Antígeno A, y un segundo conjunto de tubos como B2-B6 para el Antígeno B.
3. Usando una micropipeta, AGREGUE 150 µL de tampón de dilución a cada uno de los tubos de microcentrífuga etiquetados del paso 2.
4. TRANSFERIR 50 µL de antígeno del tubo A1 al tubo A2.
5. MEZCLAR completamente la muestra pipeteando arriba y abajo 5 veces.
6. Usando la misma punta de pipeta, TRANSFERIR 50 µL del tubo A2 al tubo A3 y mezclar como en el paso 5.
7. Continúe DILUYENDOen serie las muestras restantes a través del tubo A6.
8. REPITA los pasos 4-7 para crear diluciones en serie de Antígeno B.



9. OBTENGA dos placas ELISA de microtitulación y tubos de Desconocido 1 y Desconocido 2. Cada placa contiene 3 columnas y 8 filas de pocillos.
10. Con un marcador de punta fina, ETIQUETAR la columna izquierda de cada placa como "1", la columna central como "2" y la columna derecha como "3". Finalmente, DIBUJA una línea entre las filas 6 y 7 en ambas placas. Solo utilizará los pocillos en la sección superior de cada placa.
11. Con una punta de pipeta nueva, TRANSFERIR 50 µL del tubo A1 al pozo superior izquierdo de CADA placa (columna 1, fila 1).
12. Con una punta de pipeta nueva, TRANSFERIR 50 µL del tubo A2 al pozo directamente debajo de la muestra del paso 11 (columna 1, fila 2).
13. Continúe TRANSFERIR 50 µL de las muestras restantes de Antígeno A en los pocillos correspondientes de la columna 1 en ambas placas.
14. Con una punta de pipeta nueva, TRANSFERIR 50 µL del tubo B1 al pozo central superior de CADA placa (columna 2, fila 1).
15. Con una punta de pipeta nueva, TRANSFERIR 50 µL del tubo B2 al pozo directamente debajo de la muestra del paso 14 (columna 2, fila 2).
16. Continúe agregando 50 µL de las muestras restantes de Antígeno B en los pocillos correspondientes de la columna 2 en ambas placas.



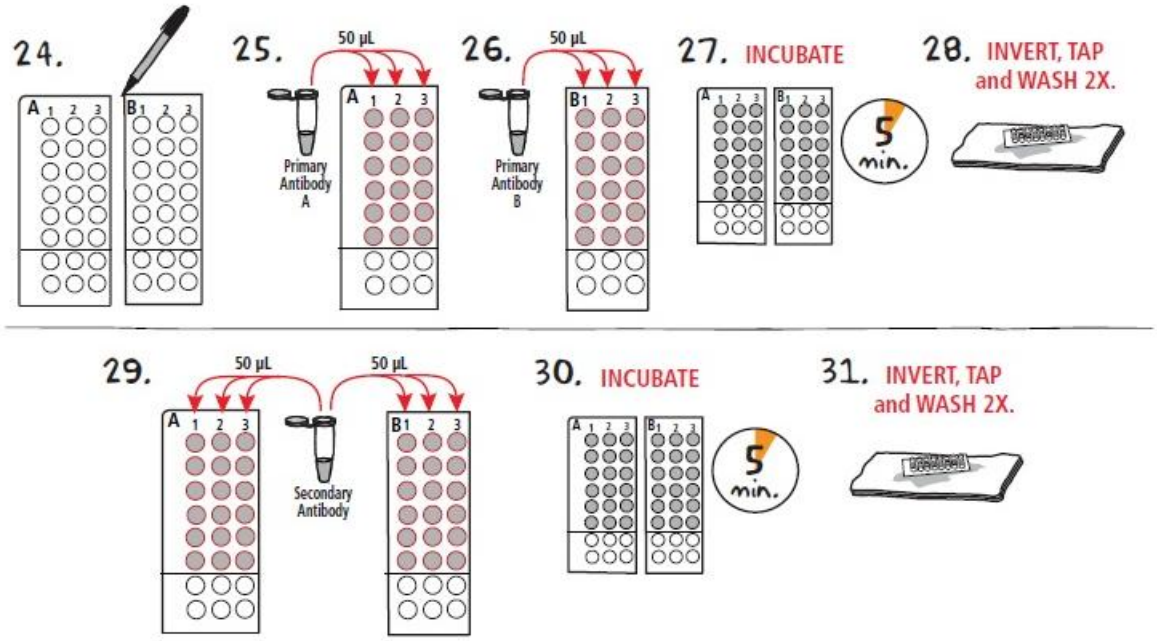
17. Con una punta de pipeta nueva, TRANSFERIR 50 µL del tubo Desc1 a los tres pocillos superiores de la columna derecha de CADA placa (columna 3, filas 1-3).
18. Con una punta de pipeta nueva, TRANSFERIR 50 µL del tubo Desc2 a los siguientes tres pocillos de la columna derecha de CADA placa (columna 3, filas 4-6).
19. INCUBAR ambas placas durante 5 minutos a temperatura ambiente.

ELIMINACIÓN DE MUESTRAS Y LAVADO DE LOS POCILLOS

20. INVERTIR las placas sobre el fregadero o una pila de toallas de papel para retirar las muestras. Tape suavemente las placas 4-5 veces sobre una toalla de papel nueva. DESECHE las toallas de papel mojadas.
21. Usando una pipeta de transferencia, AGREGAR el tampón de lavado para llenar cada pocillo, teniendo cuidado de no llenar en exceso.

NOTA: Para minimizar la contaminación cruzada, es importante que evite derramar el tampón en los pocillos vecinos.

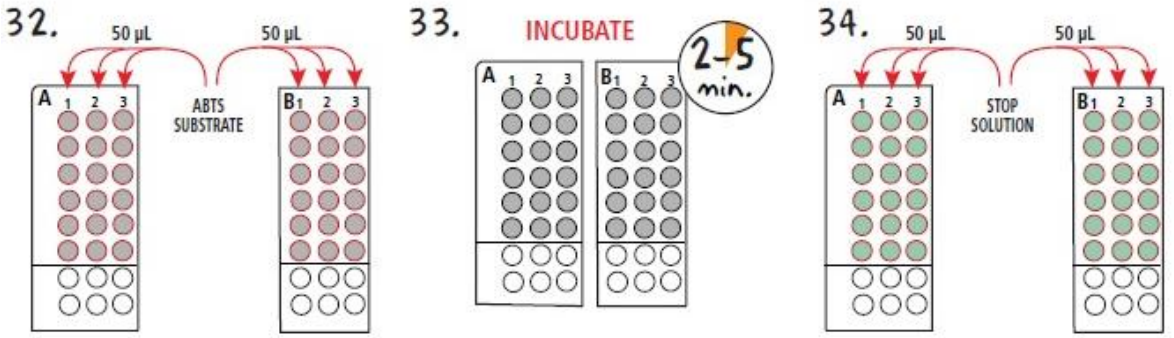
22. REPITA el paso 20 para RETIRAR el tampón de lavado.
23. Usando la misma pipeta de transferencia, REPITA el lavado por segunda vez. INVERTIR las tiras sobre toallas de papel frescas y TAP.



ADICION DE ANTICUERPOS PRIMARIOS Y SECUNDARIOS

24. Usando un marcador de punta fina, ETIQUETAR una placa con "A" y la otra con "B".
25. Usando una nueva punta de micropipeta, AGREGA 50 µL de Anticuerpo Primario A (AbA) a cada pocillo de muestra en la placa A.
26. Usando una nueva punta de micropipeta, AGREGUE 50 µL de Anticuerpo Primario B (AbB) a cada pocillo de muestra en la placa B.
27. INCUBAR durante 5 minutos a temperatura ambiente.
28. INVERTIR sobre toallas de papel y TAP. LAVAR los pocillos dos veces como en los pasos 20-23.
29. Usando una nueva punta de micropipeta, AGREGUE 50 µL del Anticuerpo Secundario (2°AB) a cada pocillo de muestra en AMBAS placas.
30. INCUBAR durante 5 minutos a temperatura ambiente.
31. INVERTIR sobre toallas de papel y TAP. LAVAR los pozos dos veces como en los pasos 20-23.

ADICION DE SUSTRATO



32. Usando una nueva punta de micropipeta, AGREGUE 50 µL de sustrato ABTS a cada pocillo de muestra en AMBAS placas.
33. INCUBA la placa durante 2 a 5 minutos a temperatura ambiente, o hasta que el color ya no cambie en los pocillos con las concentraciones más altas de antígeno.
NOTA: Es importante que no se permita que la reacción continúe durante más de 10 minutos, ya que la reacción enzimática puede saturarse en las concentraciones más altas de sustrato.
34. Usando una nueva punta de micropipeta, AGREGUE 50 µL de Solución STOP a cada pocillo de muestra en AMBAS placas. Suavemente toque las placas para MEZCLAR.
35. DOCUMENTAR los resultados utilizando una cámara digital para tomar una foto. La colocación de las placas en una hoja de papel blanca o en una caja de luz blanca puede aumentar el contraste entre los pocillos.
36. PROCEDA inmediatamente al Módulo II: Análisis de ELISA cuantitativo.

MODULO II-A. Análisis del ELISA cuantitativo

1. OBSERVE el color de las reacciones en sus curvas estándar en ambas placas. Debe haber un sustrato verde fuerte en los pocillos más concentrados que se desvanecen gradualmente en los pozos que recibieron muestras más diluidas (a medida que baja una columna).

2. CONFIRMAR que los anticuerpos solo pudieron detectar sus antígenos específicos - El anticuerpo A solo debe detectar el antígeno A - examinando la columna 2 en la placa A y la columna 1 en la placa B.

3. Comparar visualmente las intensidad de color de las diferentes diluciones con las desconocidas, ESTIMAR la concentración de Antígenos A y B en las dos muestras Desconocidas. Registre sus resultados.

Tabla :Concentraciones y diluciones de lascurvasestándar

	Antígeno A Curvaestándar		Antígen B Curvaestándar	
	Dilución	Concentración	Dilución	Concentración
Línea 1	1:1	8 µg/mL	1:1	8 µg/mL
Línea 2	1:4		1:4	
Línea 3	1:16		1:16	
Línea 4	1:64		1:64	
Línea 5	1:256		1:256	
Línea 6	1:1024		1:1024	

MODULO II-B. Análisis cuantitativo

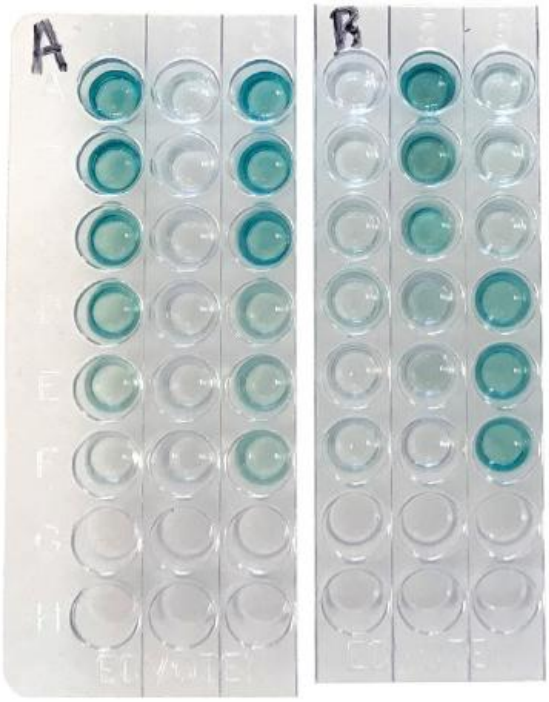
Para una determinación exacta ver el apéndice 1.

La intensidad del color de cada pocillo se puede determinar utilizando densitometría, que es una medida cuantitativa de la absorción de luz. En este ELISA, la concentración inicial de antígeno determina cuántas moléculas de ABTS se oxidan. El ATBS oxidado hace que la solución sea verde, lo que conduce a una mayor absorción de la luz. Por lo tanto, al medir la intensidad del color de la muestra en los pocillos de la curva estándar de concentración conocida, podemos establecer una relación entre la concentración de antígeno y la absorción de luz. Esta relación se describe por la ecuación de la curva estándar. Usando la ecuación podemos estimar la concentración original de antígeno en la muestra desconocida.

6. RESULTADOS

Un ELISA representativo se puede ver a continuación. La intensidad de las reacciones variará ligeramente debido a las diferencias en los tiempos de incubación y la temperatura de los reactivos, pero los resultados deberían ser similares.

Las muestras desconocidas deben compararse con las curvas estándar para determinar la concentración de antígeno en cada muestra.



7. Apéndice 1

1. Calculate the mean gray value and the protein concentration for the standard curve wells of each antigen.
   a. **SAVE** the digital image of your results as a JPEG on the computer.
   b. **OPEN** the ImageJ program on your computer.
   c. Go to **File > Open** and open your image.
   d. Go to **Image > Type > 32 bit**.
   e. Go to **Edit > Invert**.
   f. Go to **Analyze > Set Measurements** and select "mean gray value".

NOTE:
Detailed download instructions for ImageJ can be found at: http://rsb.info.nih.gov/ij/download.html

NOTE: In digital images each pixel has a luminance – or light intensity – value which ranges from black (zero intensity) to white (full intensity). In Image J this value is called gray value. The mean gray value is calculated by adding all the gray values in a selection and then dividing by the total number of pixels.

   g. **CHOOSE** the round selection tool and draw a circle around the first well.
   h. Go to **Analyze > Measure**. A new window titled results should appear. **RECORD** the results for "mean gray value" in your lab notebook or in the table below.
   i. Click back to the digital image of your results and use the mouse or arrow keys to **MOVE** the circle to next well. **REPEAT** step h for all remaining wells on both plates.
   j. **COMPLETE** Tables 1 and 2 (at right) using the mean gray values and the antigen concentrations from Table 3 on page 22.

OPTIONAL: If a spectrophotometer is available, the absorbance of ABTS can be measured at 420 nm. Transfer the samples to the appropriate plate or cuvette and measure the absorbance of the standard curve and Unknown samples. The standard curve can then be used to accurately measure the concentration of antigens in the Unknown samples.

Table 1: Calculations for the Standard Curve of Antigen A

Well	Dilution	Mean Gray Value	Antigen A Concentration
1	1:1		8 µg/mL
2	1:4		
3	1:16		
4	1:64		
5	1:256		
6	1:1024		

Table 2: Calculations for the Standard Curve of Antigen B

Well	Dilution	Mean Gray Value	Antigen B Concentration
1	1:1		8 µg/mL
2	1:4		
3	1:16		
4	1:64		
5	1:256		
6	1:1024		

2. Create a standard curve.
   a. **PLOT** the antigen concentration (x axis) against the mean gray value (y axis) for each standard concentration for Antigen A.
   b. **DRAW** a best-fit curve through the points in the graph (for best results we suggest using graphing software). Record the equation for your curve for use later.
   c. **REPEAT** Steps 2a and 2b for Antigen B.

NOTE: The best-fit line may not pass through every data point.

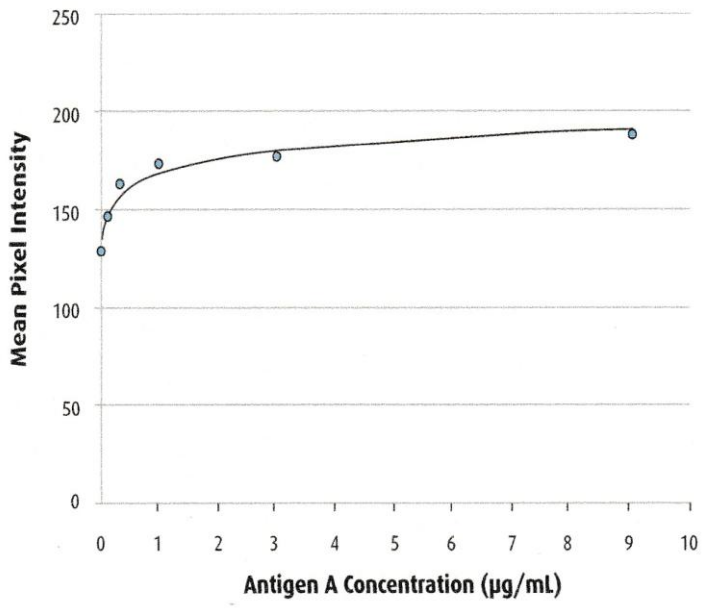


Figure 3: Plotting a Standard Curve.

3. Determine the concentration of target protein in the unknown samples.
   a. Find the mean gray values of the sample in the unknown wells as in step 1.
   b. Determine the average gray value for each unknown sample.
   c. From the Y-axis of the standard curve graph, extend a horizontal line from this absorbance value to the standard curve. At the point of intersection extend a vertical line to the X-axis and read the corresponding concentration. Alternatively use the equation of the best-fit curve to solve for x given the y value (see Figure 4). You will have to do this twice for each unknown - once for antigen A and again for antigen B.

Based on your calculations, what is the concentration of each antigen in the unknown samples?

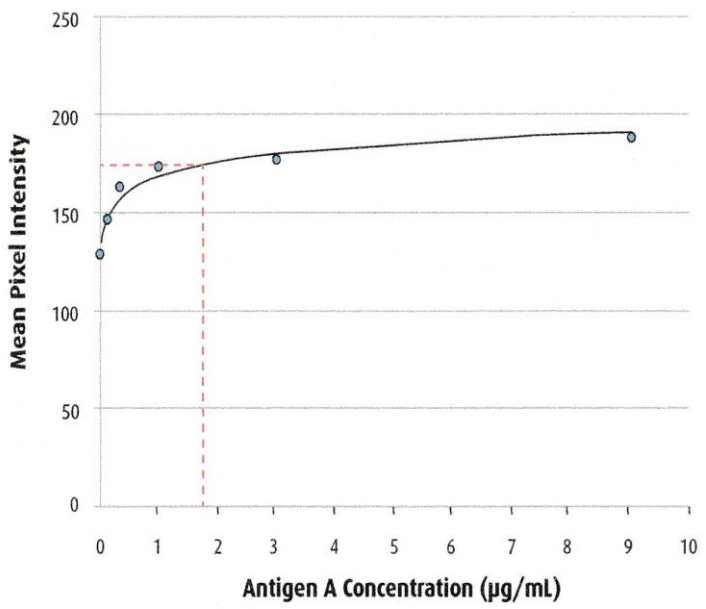


Figure 4: Determining a Protein Concentration.