

ELISA CUANTITATIVO

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 1.	nevera
B Antígeno 2.	nevera
C Anticuerpo primario 1 (Ab1).	nevera
D Anticuerpo primario 2 (Ab2).	nevera
E Anticuerpo secundario (2ºAb).	nevera
F Gelatina (agente de bloqueo).	nevera
G Peróxido de hidrógeno, estabilizado.	nevera
H Tampón fosfato salino concentrado (PBS).	nevera
I Ácido aminosalicílico (Peróxido de co-sustrato).	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.
- Horno de incubación (para temperaturas de 37°C).
- Guantes desechables de laboratorio.
- Gafas protectoras.
- Micropipetas automáticas (0-50 µl) y puntas (recomendado).

NOTA: Asegúrese que el material de vidrio esté limpio, seco y libre de residuos de jabón. Para mayor comodidad, se pueden comprar pipetas de transferencia desechables adicionales para los pasos de extracción y de lavado con líquidos.

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 anticuerpos en 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 actúan 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. En primer lugar, los antígenos se añaden en los pocillos donde algunos permanecen adsorbidos por asociación hidrófoba a las paredes, después de lavar el exceso de antígenos. Los antígenos pueden ser todo el agente infeccioso (como un virus), las proteínas específicas, o una mezcla de los dos. No hay ninguna especificidad involucrada en el proceso de adsorción a pesar de algunas sustancias pueden exhibir una baja unión a las paredes. En ciertos casos, los antígenos pueden ser unidos covalentemente al plástico usando luz UV. Después de lavar el material no adsorbido, los sitios no ocupados en las paredes de los pocillos de plástico se bloquean con gelatina, proteínas de la leche o albúmina de suero bovino.

En esta práctica, las muestras positivas tendrán anticuerpos que se unirán a los antígenos preadsorbidos en los pocillos. Si el anticuerpo primario se ha mantenido en un pocillo, a continuación, el anticuerpo secundario se unirá a él y también permanecer unido después del lavado. Estos anticuerpos secundarios son por lo general de conejos o cabras inmunizadas con fracciones de IgG "no propios". Los segundos anticuerpos son IgG purificadas y unidas covalentemente que presentan peroxidasa de rábano picante. Esta modificación no afecta significativamente la especificidad y afinidad de la unión con el anticuerpo o la actividad enzimática de la peroxidasa.

Después del lavado, se añade una solución que contiene peróxido de hidrógeno y ácido aminosalicílico a cada pocillo. La peroxidasa posee una alta actividad catalítica y puede ser superior a las tasas de rotación de 10^6 por segundo. En consecuencia, amplificación de una muestra positiva puede ocurrir en varios órdenes de magnitud. Muchos co-sustratos con hidrógeno pueden ser utilizados por la peroxidasa. Estos co-sustratos incluyen o-diansidine, aminoantipirina, ácido aminosalicílico y numerosos compuestos fenólicos que desarrollan color tras la oxidación.

La solución de sustrato añadida es casi incolora. La peroxidasa convierte el peróxido en $H_2O + O_2$ mediante el salicilato como donador de hidrógeno. El salicilato oxidado es de color marrón y se puede observar fácilmente en los pocillos positivos (en la **figura 1** se puede observar la variación del color).



Figura 1

La **figura 2** ilustra el ensayo de ELISA. Debe tenerse en cuenta que las preparaciones de anticuerpos policlonales frente a un antígeno dado pueden tener afinidades de unión variable debido a diferencias en las respuestas inmunológicas entre animales. Diferentes inmunizaciones con el mismo antígeno en el mismo animal también puede producir afinidades de unión variables. El uso de anticuerpos monoclonales dirigidos contra un único epítipo elimina esta variabilidad. Un Western blot de las muestras positivas se puede utilizar para confirmar la presencia y el tamaño de los anticuerpos.

Esta práctica de ELISA está diseñada para detectar dos moléculas de IgG circulantes diferentes dirigidas a dos antígenos distintos. Las observaciones en este experimento incluyen la especificidad de los anticuerpos, el efecto de dilución sobre las reacciones de ELISA, el desarrollo del color y la cuantificación.

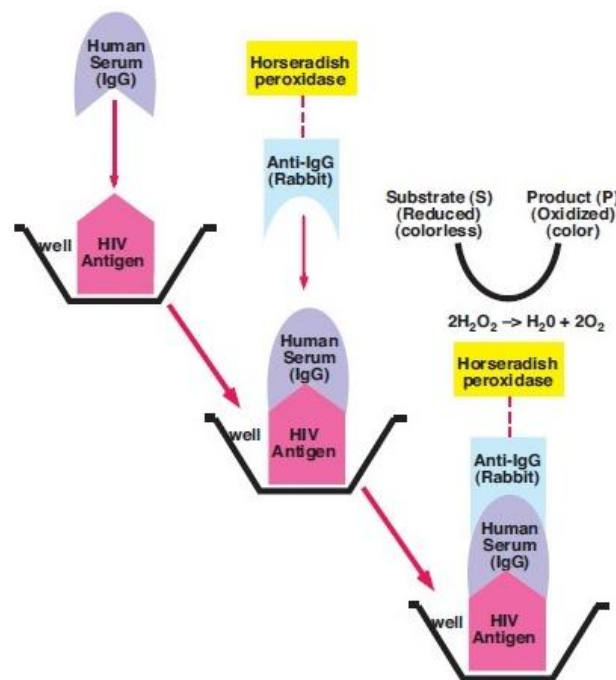


Figura 2

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). 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.

4.1 Precauciones

1. Se deben usar los guantes y gafas de protección de forma rutinaria como buenas prácticas de laboratorio.
2. Deben tener mucho cuidado al trabajar con equipos que utilizan calor y/o fusión de los reactivos.

3. NO PIPETEAR LOS REACTIVOS CON LA BOCA - PIPETEAR CON PERAS DE SUCCIÓN.
4. Lavarse bien 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

- La preparación de los productos biológicos y reactivos previa a la práctica dura aproximadamente entre 1 y 1,5 horas.
- Se requieren aproximadamente 2 horas para completar la práctica, existen puntos de parada opcionales a lo largo de la misma.

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.

Registro de las actividades de laboratorio

Los alumnos deben registrar en su libreta de prácticas las actividades indicadas a continuación.

Antes de iniciar la práctica:

- Escribir una hipótesis que refleje la práctica.
- Predecir los resultados experimentales.

Durante la práctica:

- Registrar (dibujar) sus observaciones, o fotografiar los resultados.

Al finalizar la práctica:

- Formular una explicación de los resultados.
- Determinar lo que podría cambiar en la práctica si la repites.
- Escribir una hipótesis que refleje este cambio.

Instrucciones generales

1. Ajustar la temperatura del horno de incubación a 37°C antes de iniciar la práctica.
2. Colocar la placa de microtitulación como se muestra en la **figura 3**. Marcar la placa con sus iniciales o número de grupo de laboratorio con cuidado de no estropearla.

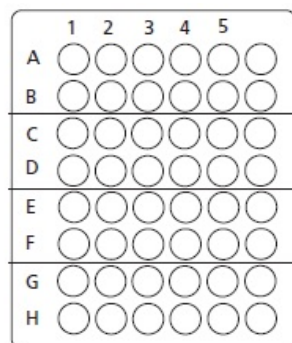


Figura 3

3. Con un rotulador/marcador permanente, etiquetar las columnas 1-5 en la parte superior y las filas A-H por el lado.
4. Como se muestra en la **figura 3**, dibujar líneas a través de la placa entre las filas B y C, las filas D y E, y las filas F y G. Esto creará cuatro secciones en la placa.
5. Marcar 4 pipetas grandes de transferencia de la siguiente manera, son utilizadas para la adición de reactivos a los pocillos:
 - **PBS**, para el tampón fosfato salino.
 - **Ag1**, para Antígeno 1.
 - **Ag2**, para Antígeno 2.
 - **Bloqueo**, para el agente de bloqueo.
6. Marcar 2 pipetas pequeñas de transferencia como **Ag1** y **Ag2**. Estas son utilizadas para eliminar el líquido de los pocillos.
7. Proceder a la dilución de los anticuerpos primarios 1 y 2 como se indica en los apartados 5.A y 5.B.

Precaución

Para evitar la contaminación cruzada y resultados falsos, utilizar la pipeta de transferencia debidamente etiquetados en los trasvases de líquidos y los lavados, tal y como se describe en los procedimientos experimentales.

A. PREPARATIVOS ANTES DE LA PRÁCTICA

Placas de microtitulación

1. Como se muestra en la **figura 4**, 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.

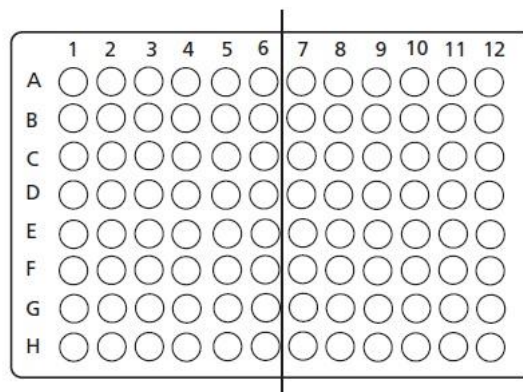


Figura 4

2. Cortar cada placa a lo largo de las líneas continuas como se muestra en la figura. Cada pieza será de 6 pocillos en un eje (de 1 a 6 y de 7 a 12) y 8 pocillos en el otro eje (de A a H). Cada grupo de prácticas recibirá una sola pieza que contiene 48 pocillos.

B. PREPARATIVOS EN EL DÍA DE LA PRÁCTICA

Preparación de Tampón fosfato salino (PBS)

1. Añadir todo el tampón fosfato salino concentrado (componente H) a 360 ml de agua destilada. Mezclar.

2. Marcar este tampón fosfato salino diluido como "PBS".
3. Dispensar 50 ml en pequeños vasos para cada uno de los 6 grupos de prácticas.

NOTAS: La solución tampón fosfato salino puede precipitar o cristalizar. Calentar el tampón en un baño de agua a 37°C antes de usar y comprobar que no hay ningún precipitado.

Antígenos 1 y 2

1. Marcar 6 tubos "Ag1" y "Ag2" y dispensar 1,5 ml de antígeno 1 (componente A) en los tubos marcados como "Ag1" y 1,5 ml de antígeno 2 (componente B) en los tubos marcados como "Ag2".
2. Distribuir un tubo de "Ag1" y otro de "Ag2" a cada grupo de prácticas.

Agente de bloqueo

1. Si el agente de bloqueo ha gelificado, colocar la botella en un baño de agua o en un horno 37°C para fundir la gelatina.
2. Marcar 6 tubos de ensayo de mayor tamaño como "bloqueo" y dispensar 3,0 ml de la gelatina del Agente de bloqueo (componente F) en los tubos.
3. Distribuir un tubo de agente de bloqueo por grupo.

NOTAS: El tampón de bloqueo puede precipitar durante su almacenamiento. Calentar a 37°C durante 5-10 minutos o hasta que el precipitado se haya disuelto.

Anticuerpos primarios 1 y 2 (1:400)

1. Añadir 0,3 ml de PBS diluido al Anticuerpo primario 1 (componente C). Mezclar bien y transferir el contenido completo a un tubo más grande que contenga 5,7 ml de PBS diluido. Esto es el Anticuerpo primario 1 (1: 400). Dispensar 0,5 ml Anticuerpo primario 1 diluido (componente C) en 6 tubos marcados "Ab1-1".
2. Distribuir un tubo de "Ab1-1" por grupo.
3. Añadir 0,3 ml de PBS diluido al Anticuerpo primario 2 (componente D). Mezclar bien y transferir el contenido completo a un tubo más grande que contenga 5,7 ml de PBS diluido. Esto es el Anticuerpo primario 2 (1:400). Dispensar 0,5 ml Anticuerpo primario 2 diluido (componente D) en 6 tubos marcados "Ab2-1".
4. Distribuir un tubo de "Ab2-1" por grupo.

NOTA: Los volúmenes de las muestras de anticuerpos primarios 1 y 2 y el anticuerpo secundario son muy pequeñas, los tubos deben ser centrifugados para recoger las muestras en la parte inferior de los tubos antes de de diluirlas.

Preparación de anticuerpo secundario

1. Añadir 0,3 ml diluidos PBS al tubo que contiene Anticuerpo secundario (componente E). Añadir 18 ml de PBS diluido en los 50 ml tubo cónico que se suministra en el kit y transferir todo el contenido del tubo E al tubo cónico con PBS. Tapar el tubo y mezclar bien. Dispensar 3,0 ml de Anticuerpo secundario diluido en 6 tubos marcados como "2°Ab".
2. Distribuir un tubo de "2°Ab" por grupo.

Preparación de sustrato de peroxidasa, durante la práctica

Preparar 15-30 minutos antes de la última incubación:

1. Dispensar 16 ml de tampón fosfato salino diluido (PBS) en el segundo tubo de 50 ml proporcionado.
2. Añadir la totalidad del ácido aminosalicílico (componente I) a los 16 ml de PBS. Tapar y mezclar cuidadosamente por agitación y/o vórtex. Es normal que quede algo de material no disuelto.
3. A continuación, añadir 1,8 ml de peróxido de hidrógeno (componente G). Tapar y mezclar.
4. Dispensar 2,5 ml del sustrato de peroxidasa a cada grupo.
5. Mantener a oscuras en la nevera hasta su uso.

NOTA: El sustrato se prepara para el enzima peroxidasa, que se une al conjugado de peroxidasa anti-IgG (Anticuerpo secundario). Preparar el sustrato 15-30 minutos antes de que los estudiantes lo necesiten utilizar en la práctica (última incubación).

C. REACTIVOS PARA LA PRÁCTICA

Componente		Marcados	Volumen para cada grupo
A	Antígeno 1	Ag1	1,5 ml
B	Antígeno 2	Ag2	1,5 ml
C+PBS	Anticuerpo 1 (dilución 1:400)	Ab1-1	0,5 ml
D+PBS	Anticuerpo 2 (dilución 1:400)	Ab2-1	0,5 ml
E+PBS	Anticuerpo Secundario	2°Ab	3,0 ml
G+I+PBS	Sustrato de enzima peroxidasa	Sustrato	2,5 ml
H+dH ₂ O	Tampón fosfato salino	PBS	50 ml
F	Gelatina	Agente de bloqueo	3,0 ml

NOTA: Los componentes A, B, C, D, E y F pueden ser dispensados antes del día de la práctica y almacenarlos en la nevera.

4.4 Material que debe recibir cada grupo

Cada grupo de prácticas debe recibir los siguientes componentes antes de iniciar el procedimiento experimental:

- 1 media placa de microtitulación.
- 1 tubo marcado "**Ag1**".
- 1 tubo marcado "**Ag2**".
- 1 tubo marcado "**bloqueo**".
- 1 tubo marcado "**Ab1-1**".
- 1 tubo marcado "**Ab2-1**".
- 1 tubo marcado "**2°Ab**".
- 1 micropipeta automática con puntas (opcional).
- 11 pipetas de transferencia (grandes).
- 11 pipetas de transferencia (pequeñas).
- 1 vaso con "**PBS**".
- 1 vaso de precipitación vacío marcado "**residuos**".
- 1 tubo marcado "**Sustrato**" (justo antes de la última incubación).
- 8 tubos de microcentrífuga.

4.5 Evitar 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 limpias y correctamente marcadas y evitar la contaminación de los pocillos adyacentes.
3. No intentar vaciar los pocillos de microtitulación por agitando la placa. No funcionará y provocará la contaminación de los pocillos adyacentes.
4. Lavar los pocillos con cuidado y lentamente, sin fuerza.

5. PRÁCTICA

Análisis cuantitativo del ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA)

Dilución de los anticuerpos primarios 1 y 2

NOTA: Si usa una micropipeta para la dilución de los anticuerpos, diluir 1:4 la solución de anticuerpo (1:400) mediante la mezcla de 110 µl de la solución de anticuerpo (1:400) con 330 µl de PBS. Continuar diluyendo el anticuerpo 4 veces, hasta 1:102.400.

A. ANTICUERPO PRIMARIO 1

1. Marcar cuatro tubos de la siguiente manera:

- "**Ab1-2**". Esta es su dilución 1: 1600.
- "**Ab1-3**". Esta es su dilución 1: 6400.
- "**Ab1-4**". Esta es su dilución 1: 25.600.
- "**Ab1-5**". Esta es su dilución 1: 102.400

2. Añadir 6 gotas (330 µl) de PBS a cada tubo.

3. El profesor de prácticas ha de proporcionar el tubo "Ab1-1". Esta es la dilución 1:400 de anticuerpo primario 1.

4. Utilizar una punta de pipeta nueva o una nueva pipeta de transferencia grande para agregar 2 gotas (110 µl) de "Ab1-1" del anticuerpo primario al tubo marcado "Ab1-2". Pipetear la solución de arriba abajo para mezclarla, tapar el tubo y mezclar bien por inversión.

5. Utilizar la misma pipeta de transferencia grande para agregar 2 gotas de "Ab1-2" al tubo marcado "Ab1-3". Pipetear la solución de arriba abajo para mezclarla, tapar el tubo y mezclar bien por inversión.

6. Utilizar la misma pipeta de transferencia grande para agregar 2 gotas de "Ab1-3" al tubo marcado "Ab1-4". Pipetear la solución de arriba abajo para mezclarla, tapar el tubo y mezclar bien por inversión.

7. Utilizar la misma pipeta de transferencia grande para agregar 2 gotas de "Ab1-4" al tubo marcado "Ab1-5". Pipetear la solución de arriba abajo para mezclarla, tapar el tubo y mezclar bien por inversión.

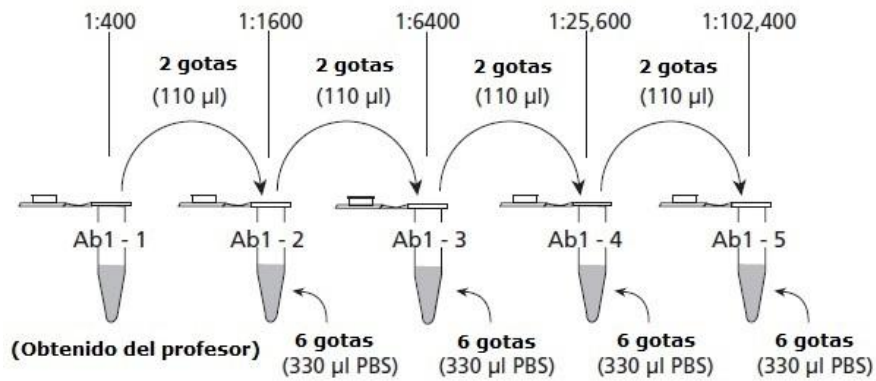


Figura 5

NOTA: Mantenga los anticuerpos primarios 1 y 2 y sus diluciones en la nevera hasta que se necesite.

B. ANTICUERPO PRIMARIO 2

1. Marcar cuatro tubos de la siguiente manera:

- "**Ab2-2**". Esta es su dilución 1: 1600.
- "**Ab2-3**". Esta es su dilución 1: 6400.
- "**Ab2-4**". Esta es su dilución 1: 25.600.
- "**Ab2-5**". Esta es su dilución 1: 102.400.

2. Añadir 6 gotas (330 l) de PBS a cada tubo.

3. El profesor de prácticas ha de proporcionar el tubo "Ab2-1". Esta es la dilución 1:400 del anticuerpo primario 2.

4. Utilizar una punta de pipeta nueva o una nueva pipeta de transferencia grande para agregar 2 gotas (110 µl) de "Ab2-1" Anticuerpo primario al tubo marcado "Ab2-2". Pipetear la solución de arriba abajo para mezclarla, tapar el tubo y mezclar bien por inversión.

5. Utilizar la misma pipeta de transferencia grande para agregar 2 gotas de "Ab2-2" al tubo marcada "Ab2-3". Pipetear la solución de arriba abajo para mezclarla, tapar el tubo y mezclar bien por inversión.

6. Utilizar la misma pipeta de transferencia grande para agregar 2 gotas de "Ab2-3" al tubo marcado "Ab2-4". Pipetear la solución de arriba abajo para mezclarla, tapar el tubo y mezclar bien por inversión.

7. Utilizar la misma pipeta de transferencia grande para agregar 2 gotas de "Ab2-4" al tubo marcado "Ab2-5". Pipetear la solución de arriba abajo para mezclarla, tapar el tubo y mezclar bien por inversión.

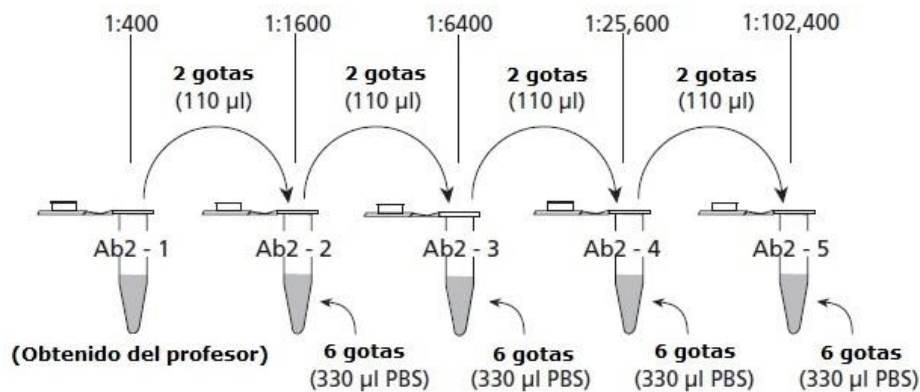


Figura 6

NOTA: Mantenga los anticuerpos primarios 1 y 2 y sus diluciones en la nevera hasta que se necesiten.

El ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)

1. Orientar la placa de microtitulación de manera que los pozos marcados como columnas 1-5 estén en el eje horizontal y los pocillos marcados como filas A-H estén en el eje vertical (como se muestra en la **figura 7**).

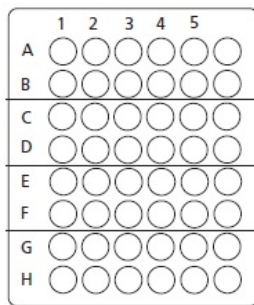


Figura 7

2. Leer todas las instrucciones y estudiar la **figura 7** antes de empezar a añadir los antígenos a los pocillos. Consultar la **figura 7** a menudo durante el procedimiento experimental para no cometer errores.

A. AÑADIR LOS ANTÍGENOS

3. Usar la pipeta de transferencia grande marcada correctamente o una punta de pipeta nueva para cada reactivo, añadir los reactivos a los pocillos como se describe a continuación.

- Añadir 50 µl ó 1 gota de antígeno 1 a los pocillos 1 a 5 en las filas A, B, C y D.
- Añadir 50 µl ó 1 gota de antígeno 2 a los pocillos 1 a 5 en las filas E, F, G y H.

4. Incubar la placa a temperatura ambiente durante 5 minutos.

NOTA: Ninguno de los pocillos en la columna 6 se utilizará en esta práctica.

B. DESECHAR EL LÍQUIDO RESIDUAL DE ANTÍGENOS

En los pasos que siguen, utilizar las pipetas de transferencia pequeñas debidamente marcadas para eliminar el líquido de los pocillos. Es importante seguir las instrucciones con cuidado para evitar la contaminación cruzada de los pocillos. Guardar las pipetas para los pasos posteriores.

5. Usar la pipeta de transferencia pequeña marcada "Ag1", eliminar el líquido de los pocillos en las filas A-D.

6. Usar la pipeta de transferencia pequeña marcada "Ag 2", eliminar el líquido de los pocillos en filas E-H.

C. LAVADO CON PBS Y ELIMINACIÓN DEL PBS

7. Usar la pipeta de transferencia grande marcada "PBS" para añadir tampón fosfato salino a los pocillos 1-5 en todas las filas. Llenar cada pocillo hasta estar casi lleno. Si se utiliza una micropipeta automática, añadir 200 µl de PBS a cada uno de los pocillos.

8. Retirar el PBS de los pocillos utilizando los mismos procedimientos descritos en los pasos 5 y 6.

D. AÑADIR EL AGENTE DE BLOQUEO

NOTA: Utilizar la pipeta de transferencia marcada correctamente para el transvase de líquidos y lavados para evitar la contaminación cruzada y falsos resultados.

9. Usar una punta de pipeta nueva o una pipeta de transferencia grande marcada "bloqueo", añadir 50 µl ó 1 gota de agente de bloqueo a cada uno de los pocillos de las columnas 1 a 5 en todas las filas (excluir pocillos de la columna 6).

10. Incubar la placa durante 10 minutos a 37 ° C.

11. Usar una pipeta de transferencia pequeña marcada "Ag1", eliminar el líquido de los pocillos 1-5 en las filas A-D.

12. Usar una pipeta de transferencia pequeña marcada "Ag2", eliminar el líquido de los pocillos 1-5 en filas E-H.

E. LAVADO CON PBS Y DESECHAR EL LÍQUIDO DEL AGENTE DE BLOQUEO

13. Usar una pipeta de transferencia grande marcada "PBS" para añadir tampón fosfato salino a todos los pocillos. Llenar cada pocillo hasta estar casi lleno. Si utiliza una micropipeta, añadir 200 µl de PBS a cada uno de los pocillos.

14. Eliminar el PBS de los pocillos utilizando los mismos procedimientos descritos en los pasos 11 y 12, se pueden tirar las pipetas pequeñas al acabar.

NOTA: Utilizar la pipeta de transferencia marcada correctamente para el transvase de líquidos y lavados para evitar la contaminación cruzada y falsos resultados.

PUNTO DE PARADA OPCIONAL

La práctica se puede parar después de la adición de PBS (paso 13) y continuar la práctica al día siguiente. Cubrir las placas de microtitulación con parafilm o papel plástico y guardar en la nevera durante la noche.

F. AÑADIR LOS ANTICUERPOS PRIMARIOS 1 Y 2 (PREPARADOS EN LOS APARTADOS 5.A Y 5.B).

NOTA: Para añadir el anticuerpo primario, utilizar la misma pipeta para pasar de la concentración más baja a la más alta. Usar una pipeta de transferencia nueva o una punta de pipeta nueva al añadir el Anticuerpo 1, el Anticuerpo 2 y el PBS.

1. Marcar 3 pipetas de transferencia grandes como "PBS", "Ab1", y "Ab2".

Utilizar una punta de pipeta nueva o una pipeta de transferencia grande debidamente etiquetadas para añadir el PBS y cada anticuerpo.

2. Añadir 50 µl ó 1 gota de "PBS" a los pocillos de las filas C y E.

3. Añadir 50 µl ó 1 gota de "Ab1-5" en los pocillos A5, B5 y F5.

4. Añadir 50 µl ó 1 gota de "Ab1-4" en los pocillos A4, B4 y F4.

5. Añadir 50 µl ó 1 gota de "Ab1-3" en los pocillos A3, B3 y F3.

6. Añadir 50 µl ó 1 gota de "Ab1-2" en los pocillos A2, B2 y F2.

7. Añadir 50 µl ó 1 gota de "Ab1-1" en los pocillos A1, B1 y F1.

8. Añadir 50 µl ó 1 gota de "Ab2-5" en los pocillos D5, G5 y H5.

9. Añadir 50 µl ó 1 gota de "Ab2-4" en los pozos D4, G4 y H4.

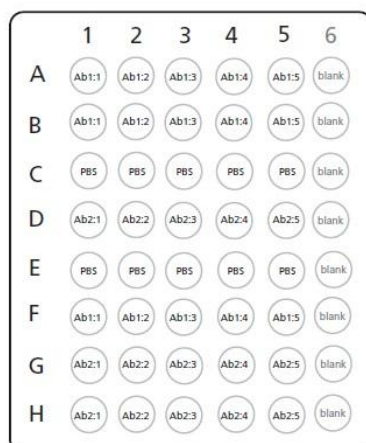
10. Añadir 50 µl ó 1 gota de "Ab2-3" en los pocillos D3, G3 y H3.

11. Añadir 50 µl ó 1 gota de "Ab2-2" en los pocillos D2, G2 y H2.

12. Añadir 50 µl ó 1 gota de "Ab2-1" en los pocillos D1, G1 y H1.

13. Incubar la placa a 37°C durante 30 minutos.

Figura 8



NOTA: Utilizar la pipeta de transferencia marcada correctamente para el trasvase de líquidos y los lavados para evitar la contaminación cruzada y falsos resultados.

G. DESECHAR EL LÍQUIDO RESIDUAL DE LOS ANTICUERPOS

14. Marcar 4 pipetas de transferencia pequeñas como "AB", "CD", "EF" y "GH".

15. Comenzando con el anticuerpo más diluido (columna 5) de las filas A y B, utilizar la pipeta marcada como "AB" para retirar el líquido de los pocillos, desplazándose de derecha a izquierda (es decir, retirar el líquido por este orden A5, B5, A4, B4, A3, B3, A2, B2, A1 y B1).

16. Repetir el procedimiento con las otras filas (C-H) usando las pipetas de transferencia marcadas correctamente.

H. LAVADO CON PBS Y DESECHAR EL PBS

17. Usar una pipeta de transferencia grande marcada como "PBS" para añadir el tampón fosfato salino en todos los pocillos. Llenar cada pocillo hasta estar casi lleno. Si se utiliza una micropipeta automática, añadir 200 μ l de PBS a cada uno de los pocillos.

18. Retirar el PBS de los pocillos utilizando los mismos procedimientos descritos en los apartados 5.C y 5.E. Desechar las pipetas de transferencia.

I. AÑADIR ANTICUERPO SECUNDARIO

19. Utilizar una punta de pipeta nueva o una pipeta de transferencia grande para añadir 50 μ l ó 1 gota del anticuerpo secundario en cada uno de los pocillos de las filas A-H (en todos los pocillos utilizados, en total 40).

20. Incubar la placa a 37°C durante 15 minutos.

J. DESECHAR EL LÍQUIDO RESIDUAL DE LOS ANTICUERPOS SECUNDARIOS

21. Marcar 4 pipetas de transferencia pequeñas como "AB", "CD", "EF", y "GH".

22. Comenzando con el anticuerpo más diluido (columna 5) de las filas A y B, utilizar la pipeta marcada como "AB" para retirar el líquido de los pocillos, desplazándose de derecha a izquierda (es decir, retirar el líquido por este orden A5, B5, A4, B4, A3, B3, A2, B2, A1 y B1).

23. Repetir el procedimiento con las otras filas (C-H) usando las pipetas de transferencia marcadas correctamente.

K. LAVADO CON PBS Y DESECHAR EL PBS

24. Usar una pipeta de transferencia grande marcada como "PBS" para añadir el tampón fosfato salino en todos los pocillos. Llenar cada pocillo hasta estar casi lleno. Si se utiliza una micropipeta automática, añadir 200 μ l de PBS a cada uno de los pocillos.

25. Eliminar el PBS de los pocillos utilizando los mismos procedimientos descritos en los pasos 22 y 23.

L. AÑADIR EL SUSTRATO

26. Comenzar por la columna 5 y moviéndose hacia la izquierda (utilizar una punta de pipeta nueva o una pipeta de transferencia grande nueva para añadir 50 μ l ó 1 gota de sustrato en los 40 pocillos (excluir los pocillos de la columna 6).

27. Incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos.

28. Periódicamente, observar la placa para ver el cambio de color.

29. Si no ha cambiado completamente de color no después de 5 minutos, incubar durante un período de tiempo más largo.

6. RESULTADOS Y PREGUNTAS DE LA PRÁCTICA

6.1 Resultados

La **figura 9** representa en un esquema idealizado los resultados esperados. Los resultados reales pueden variar.

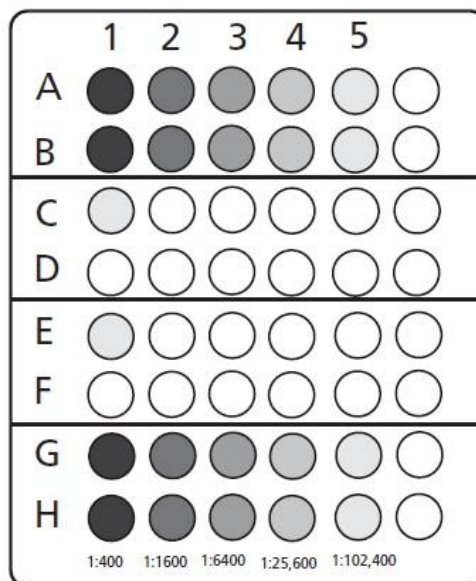


Figura 9

6.2 Preguntas

Responder a las siguientes preguntas en la libreta de prácticas:

- 1. ¿A qué responden los anticuerpos?**
- 2. ¿Puede un anticuerpo actuar como un antígeno?**
- 3. Describir las reacciones antígeno-anticuerpo de un ensayo ELISA.**
- 4. ¿Siempre se visualiza con la aparición de un color marrón el resultado positivo en el ensayo ELISA?**