

## INTRODUCCIÓN AL ELISA

10 grupos de estudiantes

### 1. OBJETIVO DEL EXPERIMENTO

El objetivo de este experimento es aportar a los estudiantes el conocimiento y metodología de la técnica del ELISA

### 2. COMPONENTES para 10 grupos de estudiantes

COMPONENTES	CONSERVACIÓN
<b>A Antígenos (simulados)</b>	Nevera
<b>B Anticuerpo primario</b>	Nevera
<b>C Complejo Anti-IgG peroxidasa (Anticuerpo secundario)</b>	Nevera
<b>D Peróxido de Hidrógeno estabilizado (S1)</b>	Nevera
<b>E Peróxido Co-Substrato (S1)</b>	Nevera
<b>F Substrato ABTS (S2)</b>	Nevera
<b>G Tampón Fosfato salino concentrado</b>	Nevera
<b>Placas de Microtitulación</b>	Temperatura ambiente
<b>Pipetas pequeñas de transferencia</b>	Temperatura ambiente
<b>Microtubos 1.5 ml</b>	Temperatura ambiente
<b>Pipetas serológicas de 1ml</b>	Temperatura ambiente
<b>Tubos de 15 ml</b>	Temperatura ambiente

**ESTE EXPERIMENTO NO CONTIENE COMPONENTES PREPARADOS A PARTIR DE FUENTES HUMANAS**

#### 2.1 Material requerido y no suministrado

- Agua destilada
- Vasos.
- Estufa de cultivo 37°C.
- Micropipetas automáticas (5-50 µl) y puntas.
- Guantes.
- Gafas.

### 3. INTRODUCCIÓN

#### Principios de la técnica de ELISA

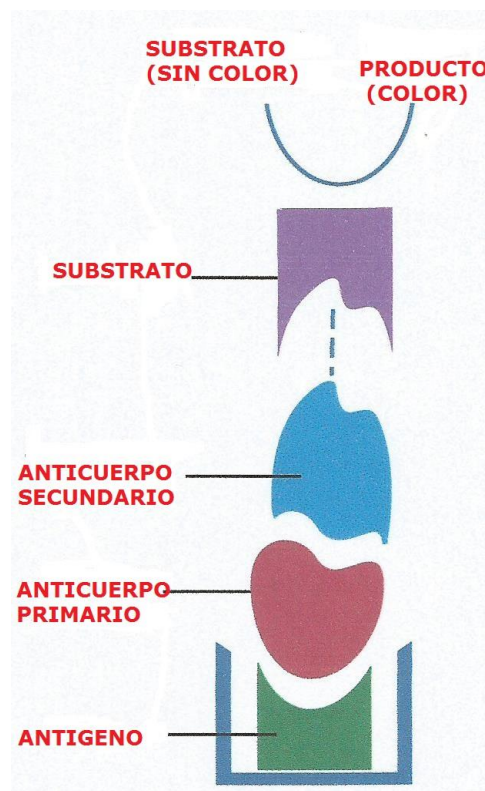
Durante una infección, un individuo presenta una respuesta de anticuerpos que eventualmente resulta en la producción de moléculas de IgG en el plasma que se unen a diversas partes del agente infeccioso. Si estos anticuerpos están presentes en la muestra, se unirán a los antígenos adsorbidos en los pocillos de una microplaca y permanecerán allí después del lavado, y serán detectados por la técnica de ELISA.

Todos los anticuerpos pertenecen a un grupo de proteínas séricas conocidas como globulinas. Cada anticuerpo se compone de una cadena de polipéptido pesada y ligera. En general, los anticuerpos se producen en respuesta a la presencia de una respuesta antigénica.

Los anticuerpos obtenidos a partir de animales, tales como conejos, en respuesta a un antígeno se conocen como anticuerpos policlonales. Los anticuerpos policlonales son heterogéneos en estructura y varían en su capacidad para unirse a antígenos. Los anticuerpos que tienen una alta afinidad por los antígenos no específicos pueden dar reacciones cruzadas no deseadas. Tales anticuerpos también pueden dar resultados falsos negativos. Por el contrario, los anticuerpos con constantes de unión débiles pueden no ser tan sensibles.

Los test de **ELISA** (acrónimo del inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*: 'ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas') fueron desarrollados originalmente para la medición de anticuerpos, pero también se han adaptado para detectar con éxito muestras que contienen antígenos. **Este experimento de ELISA ha sido diseñado para detectar un anticuerpo dirigido contra un antígeno.**

Los siguientes pasos son los pasos básicos de la reacción del ELISA:



## **PASO 1**

Los antígenos son añadidos a los pocillos donde algunos permanecen adsorbidos a los pocillos por enlaces hidrófobos después de los lavados. Los antígenos pueden ser lisados, una proteína específica o una mezcla de ambos. No hay especificidad involucrado con el proceso de adsorción a los pocillos, aunque algunas sustancias pueden exhibir una unión diferencial. En ciertos casos, los antígenos pueden unirse covalentemente al plástico usando luz UV.

## **PASO 2**

Los pocillos son lavados para eliminar los antígenos no unidos. Los lugares no ocupados de las paredes de los pocillos son bloqueados con proteínas como gelatina, o albúmina de suero bovino.

## **PASO 3**

Una solución que puede o no puede contener el anticuerpo primario se añade a los pocillos. Si está presente en la solución, el anticuerpo primario se unirá al antígeno adsorbido en el pozo y permanecerá después del lavado.

## **PASO 4**

Una solución que contiene el anticuerpo secundario se añade a continuación a los pocillos. Si el anticuerpo primario se ha mantenido unido bien, entonces el anticuerpo secundario se unirá a él y permanecerán unidos después del lavado. Los anticuerpos secundarios se purifican y se unen de forma covalente a las enzimas tales como peroxidasa. Este acoplamiento no afecta significativamente a la especificidad de unión y afinidad del anticuerpo o la actividad enzimática de la peroxidasa.

## **PASO 5**

Los pocillos son lavados para eliminar los anticuerpos secundarios no unidos.

## **PASO 6**

Después de lavar los pocillos, el sustrato 1 (S1) se añadirá a todos los pozos en las filas 1 y 2. El sustrato 2 (S2) se añadirá a las filas 3 y 4. La enzima unida al anticuerpo secundario es una peroxidasa. La peroxidasa posee una alta actividad catalítica, en consecuencia, la amplificación de una muestra positiva puede ocurrir durante varios órdenes de magnitud. Muchos co-sustratos donantes de hidrógeno pueden ser utilizados por la peroxidasa que se desarrollan color tras la oxidación.

El sustrato 1 (S1) contiene peróxido de hidrógeno y salicilato de amino. La solución de sustrato utilizada para la reacción de ELISA es casi incolora. La peroxidasa convierte el peróxido a  $H_2O + O_2$  utilizando el salicilato como el donante de hidrógeno. El salicilato oxidado es marrón y se puede observar fácilmente en los pocillos positivos.

El sustrato 2 (S2) contiene peróxido de hidrógeno y (ABTS). La solución de sustrato añadido es casi incolora. La Peroxidasa convierte el peróxido a  $H_2O + O_2$  usando el ABTS como el donador de hidrógeno. El ABTS oxidado es verde y puede ser fácilmente observado en los pocillos positivos.

Diferentes inmunizaciones con el mismo antígeno en el mismo animal también pueden producir afinidades de unión variables. El uso de anticuerpos monoclonales dirigidos contra un único epítipo elimina esta variabilidad. Un Western blot de muestras de ELISA positivos se utiliza para confirmar el tamaño y cantidad de antígeno.

## 4. DESCRIPCIÓN DEL EXPERIMENTO

**El objetivo de este experimento es aportar a los estudiantes el conocimiento y metodología de la técnica del ELISA.**

Este experimento demuestra dos conceptos importantes. El primero es el efecto de la ausencia del antígeno o el anticuerpo primario que resulta en la interrupción de la reacción de ELISA. El segundo es la demostración de que el sustrato utilizado por la enzima unida al anticuerpo secundario puede resultar en diferentes colores positivos.

### 4.1 Precauciones

1. Llevar gafas y guantes de laboratorio mientras se trabaja.
2. **NO PIPETEAR CON LA BOCA**, utilizar los dispositivos adecuados.
3. Extremar las precauciones cuando se trabajan con equipos que utilizan conjuntamente calor y mezcla de reactivos.
4. Lavarse las manos con jabón y agua después de haber trabajado en el laboratorio o utilizado reactivos o materiales biológicos.

### 4.2 Preparaciones y consideraciones previas

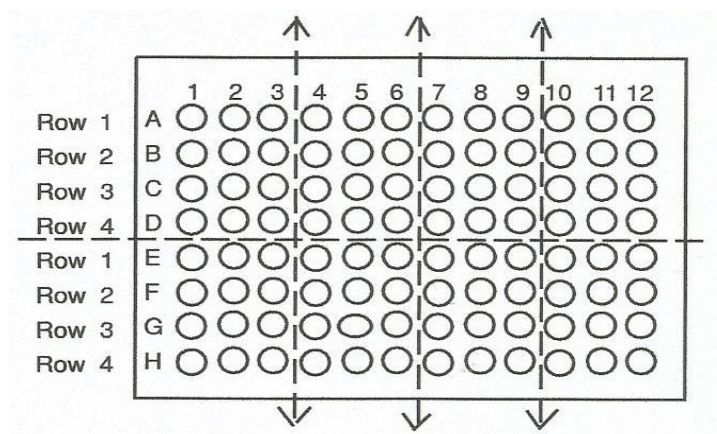
Las preparaciones previas puede realizarlas el profesor o realizarse como otra clase práctica a realizar por los alumnos.

### **TIEMPO APROXIMADO PARA LAS PREPARACIONES PREVIAS Y PROCESOS DEL EXPERIMENTO**

1. Las preparaciones previas de los reactivos y demás pueden tomar un tiempo de una hora o una hora y media.
2. El experimento por parte de los estudiantes puede llevar 1 hora.

#### **A) PREPARACIONES ANTES DEL DÍA DE LA PRÁCTICA**

- 1) Tal y como se muestra en la figura orientar la placa de microtitulación.



- 2) Cortar por las líneas indicadas tal y como se muestra en la figura. Cada pieza tendrá 3 pocillos por 4 filas. Cada grupo de laboratorio recibirá una pieza.

## B) PREPARACIONES DE REACTIVOS EL DÍA DE LA PRÁCTICA

### COMPONENTES A-D

1. Utilizando una micropipeta de 1 ml dispensar el Antígeno (A) directamente del microtubo suministrado en este kit. Marcar 10 microtubos con Ag y dispensar 600 µl por microtubo.
2. Utilizando una micropipeta de 1 ml dispensar el Anticuerpo primario (b) directamente del microtubo suministrado en este kit. Marcar 10 microtubos con **1ºAb** y dispensar 600 µl por microtubo.

### TAMPÓN FOSFATO SALINO PBS

1. Añadir todo el contenido del PBS concentrado (G) a 135 ml de agua destilada. Mezclar.
2. Marcar este PBS diluido como "**PBS**".
3. Dispensar 12 ml en pequeños vasos para cada grupo.

### COMPLEJO ANTI-IgG PEROXIDASA (ANTICUERPO SECUNDARIO)

1. Añadir 0,3 ml del "PBS" diluido al **Complejo Anti-IgG peroxidasa (Anticuerpo secundario) (C)**. Mezclar bien.
2. Añadir 6 ml del PBS diluido a uno de los tubos de 15 ml suministrado.
3. Pasar todo el contenido del tubo C preparado en el punto 1 al tubo que contiene 6 ml de PBS. Marcar el tubo como "**2º Ab**". Mezclar.
4. Dispensar 600 µl del conjugado Anti-IgG peroxidasa a cada grupo.

## C) PREPARACION DURANTE LA PRÁCTICA DEL SUBSTRATO-PEROXIDASA

### Prepararlo 15-30 minutos antes de la incubación.

1. Añadir 9 ml del PBS diluido al segundo tubo de 15 ml suministrado.
2. Añadir el **Peróxido Co-Substrato (E)** a los 9 ml de PBS. Mezclar por inversión y vortex. Normalmente suele quedar partículas sin disolver.
3. Luego añadir 1,0 ml **Peróxido de Hidrógeno estabilizado (D)**. Mezclar.
4. Dispensar 750 µl del substrato-peroxidasa (S1) a cada uno de los 10 grupos.
5. Dispensar 750 µl del **Substrato ABTS (S2)** a cada uno de los 10 grupos.

**Tabla de Preparación de los reactivos del experimento**

		<b>Marca</b>	<b>Volumen a dispensar a cada grupo</b>
<b>A</b>	Antígeno	Ag	600 µl
<b>B</b>	Anticuerpo Primario	1ºAb	600 µl
<b>C+PBS</b>	Conjugado Anti-IgG-peroxidasa	2ºAb	600 µl
<b>PBS+D+E</b>	Peroxidasa-substrato del enzima*	S1	750 µl
<b>F</b>	Substrato ABTS	S2	750 µl
<b>G+AGUA</b>	Tampón salino fosfato	PBS	12 ml

Los componentes A y B pueden ser dispensados el día de antes de la práctica y conservar en nevera. Si los componentes son dispensados el día de la práctica, dejar a temperatura ambiente.

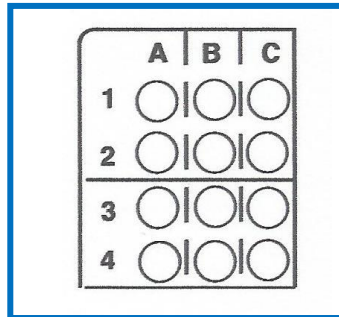
**\*El substrato del enzima peroxidasa debe ser preparado 15-20 minutos antes de la última incubación.**

<b>CADA GRUPO DE TRABAJO RECIBIRÁ LOS SIGUIENTES COMPONENTES</b>	
1	Pieza de placa de microtitulación
1	Tubo marcado "Ag"
1	Tubo marcado "1º Ab"
1	Tubo marcado "2º Ab"
1	Micropipeta automática con puntas (si se dispone)
10	Pipetas de transferencia
1	Vaso o tubo conteniendo el PBS
1	Vaso vacío marcado como "residuos"
1	Tubo marcado como "S1" (antes de la última incubación)
1	Tubo marcado como "S2" (antes de la última incubación)

## 5. PRÁCTICA

### INSTRUCCIONES GENERALES Y PROCEDIMIENTOS

A) Marcar la placa de microtitulación: Colocar la placa verticalmente como se muestra en la figura. Marcar la placa con su número de grupo o iniciales y números de filas.



B) A cada grupo de estudiantes le corresponden 10 pipetas de transferencia, marcarlas como se indica:

- PBS (Tampón Salino Fosfato).
- Ag (Antígeno).
- 1ºAb (Anticuerpo primario).
- 2ºAb (Anticuerpo secundario).
- Sub 1 (Substrato 1).
- Sub 2 (Substrato 2).
- Línea 1.
- Línea 2.
- Línea 3.
- Línea 4.

### INSTRUCCIONES PARA AÑADIR LÍQUIDOS Y LAVADO DE LOS POCILLOS

1. Añadir los reactivos a los pocillos utilizando la pipeta de transferencia marcada apropiada o utilizar una micropipeta automática y puntas si se dispone.

2. Cuando se le indique en los procedimientos experimentales la eliminación de los reactivos líquidos (antígeno, anticuerpos primario y secundario), utilice la pipeta de transferencia debidamente marcada para cada fila.

3. Para lavar los pocillos realizar lo siguiente:

3.1 Utilice la pipeta de transferencia con la marca "PBS", para añadir el tampón PBS a los pocillos en todas las filas. Añadir el tampón PBS hasta que cada pocillo está casi lleno. La capacidad de cada pocillo es de aproximadamente 0,2 ml. No permita que los líquidos se viertan en pocillos adyacentes.

3.2 Eliminar todo el PBS de cada pocillo con la pipeta de transferencia designada para cada fila. Deseche el líquido en el vaso de precipitados con la etiqueta "residuos".

## PRÁCTICA

1. Añadir **50 µl o 3 gotas del antígeno** en todos los pocillos de las filas 2,3 y 4. **No añadir antígeno en la fila 1.**

2. Incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente.

3. Eliminar todo el líquido con la pipeta de transferencia marcada con Ag.

4. Lavar cada pocillo con PBS como se ha descrito (INSTRUCCIONES PARA AÑADIR LÍQUIDOS Y LAVADO DE LOS POCILLOS).

*En laboratorios de investigación, tras este paso, todos los sitios en la placa de microtitulación se saturan con una solución de bloqueo que consiste en una mezcla de proteínas, tal como BSA. Hemos diseñado este experimento para eliminar este paso para ahorrar tiempo.*

PASO OPCIONAL DE STOP: El experimento puede ser parado en el punto 4, pero requiere que el PBS se mantenga en todos los pocillos hasta el día siguiente a temperatura ambiente. Luego eliminar el PBS y continuar con el punto 5.

5. Añadir **50 µl o 3 gotas del anticuerpo primario 1<sup>o</sup>AB** en todos los pocillos de las filas 1, 2 y 4. **No añadir antígeno en la fila 3.**

	A	B	C
1	○	○	○
2	○	○	○
No 1Ab	X	X	X
4	○	○	○

6. Incubar a 37°C durante 5 minutos.

7. Eliminar todo el líquido de cada pocillo con la pipeta de transferencia marcada apropiada para cada línea.

8. Lavar cada pocillo con PBS tal y como se ha descrito.

9. Añadir **50 µl o 3 gotas del anticuerpo secundario 2<sup>o</sup>Ab** en todos los pocillos de las filas 1, 2, 3 y 4.

10. Incubar a 37°C durante 5 minutos.

11. Eliminar todo el líquido de cada pocillo con la pipeta de transferencia marcada apropiada para cada línea.

12. Lavar cada pocillo con PBS tal y como se ha descrito.

13. Añadir **100 µl o 5 gotas del Substrato S1** en todos los pocillos de las filas 1 y 2.

14. Añadir **100 µl o 5 gotas del Substrato S2** en todos los pocillos de las filas 3 y 4.



	A	B	C
1	S <sub>1</sub>	S <sub>1</sub>	S <sub>1</sub>
2	S <sub>1</sub>	S <sub>1</sub>	S <sub>1</sub>
3	S <sub>2</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>2</sub>
4	S <sub>2</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>2</sub>

15. Incubar a 37°C durante 5 minutos.

16. Retire la placa para su análisis.

17. Si el color no está completamente desarrollado después de los 5 minutos. Incubar a 37°C durante un periodo de tiempo mayor.

## 6. RESULTADOS Y PREGUNTAS DE ESTUDIO

	A	B	C	
missing Ag	1	○	○	○
	2	○	○	○
missing 1Ab	3	○	○	○
	4	○	○	○



El color aparece sólo en las líneas 2 y 4. En la línea 2 aparecerá un color marrón y en la línea 4 aparecerá de color verde. En las líneas 1 y 3 no habrá color ya que en ambas no se han puesto algún ingrediente para la técnica del ELISA.

### **1. Describe el mecanismo del ELISA. ¿Por qué es necesario bloquear los sitios de unión no ocupados en los pocillos de la placa? ¿Por qué es importante tener un control positivo?**

Los antígenos absorbidos en los pocillos de la microplaca se unen a las IgG presentes en el suero de un paciente dado. La segunda IgG está conjugada a un marcador como la peroxidasa que produce productos coloreados a partir de ciertos substratos. Si los sitios no ocupados por los antígenos no son bloqueados, los anticuerpos primarios y secundarios no serán específicamente absorbidos produciendo falsos positivos. Un control positivo asegura que los reactivos y microplaca trabajan óptimamente.

### **2. ¿Por qué hay un periodo de incubación de 37°C después de la adición del sustrato?**

La incubación a 37°C es la temperatura óptima a la que el enzima cataliza la conversión del sustrato al producto de color. Aumentar el periodo de incubación producirá un aumento en la intensidad del color.

**3. ¿Cuál es el efecto de no incluir el antígeno o el anticuerpo primario en la reacción de ELISA?**

La ausencia de antígeno o anticuerpo primario no produce la formación del complejo ELISA resultando en la incapacidad de formarse el color del substrato

**4. ¿Por qué es importante lavar todos los pocillos entre la adición de los diferentes componentes?**

Las placas de microtitulación son de plástico y tiene la capacidad de unir proteínas no específicas. Las condiciones de la reacción de ELISA favorece la unión del antígeno mientras la adición secuencial de los otros componentes se realiza bajo condiciones que minimizan la unión. Los lavados entre los diferentes pasos son importantes para evitar falsos resultados, lo cual puede ocurrir cuando hay una elevada concentración de reactivos residuales.

**5. ¿Pueden detectarse ácidos nucleicos mediante el ELISA?**

El ELISA puede ser modificado para trabajar con ácidos nucleicos. Primero se unirá un oligonucleótido pequeño a los pocillos que actuará de sonda. Una muestra positiva, por ejemplo debido a la presencia de virus, se unirá a la sonda designada específicamente para ese virus y será detectado.