

INTERACCIÓN ANTÍGENO-ANTICUERPO EL PROCEDIMIENTO OUCHTERLONY

10 grupos de estudiantes

1. OBJETIVO DEL EXPERIMENTO

El objetivo de este experimento es introducir los principios de las interacciones antígeno-anticuerpo usando el procedimiento Ouchterlony.

2. COMPONENTES para 10 grupos de estudiantes

COMPONENTES	Conservación
A Antisuero (Anticuerpo)	4-8°C
B Suero total (Antígeno)	4-8°C
C Albúmina (Antígeno)	4-8°C
D IgG (Antígeno)	4-8°C
E Tampón en polvo	T ^a ambiente
1 Agarosa™ UltraSpec	T ^a ambiente
1 tubo de solución de carga para practicar	T ^a ambiente
40 Tubos Microtest	
40 Pipetas de transferencia	
1 Plantilla para corte de pocillos (en el protocolo)	
10 Cortadores para pocillos ("well cutters")	
40 Placas de Petri	

NOTA: Tras la recepción, almacenar los componentes a las temperaturas indicadas.

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.

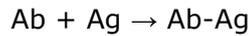
2.1 Material requerido y no suministrado

- Envase de plástico o placa Pyrex
- Baño de agua
- Micropipetas automáticas y puntas
- Baño de agua
- Espátula o mondadientes
- Agua destilada
- Pipetas (5 o 10 ml)
- Rotulador
- Quemador Bunsen, Placa calefactora o Microondas
- Toallas de papel
- Envoltura o lámina de plástico (film transparente)

NOTA: Asegúrense 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.

3. INTRODUCCIÓN

Las interacciones de un anticuerpo (Ab) con un antígeno (Ag) es la reacción fundamental de la inmunología.



La mayoría de los antígenos son proteínas. La identidad exacta de los grupos que reaccionan con el anticuerpo generalmente no se conoce. Los antígenos macromoleculares y los anticuerpos forman complejos que se vuelven insolubles y precipitan. Esta propiedad hace posible realizar ensayos cualitativos y cuantitativos en el sistema anticuerpo-antígeno.

La precipitación ocurre con la mayoría de los antígenos debido a que el antígeno es multivalente, es decir, tiene varios determinantes antigénicos por molécula a los que se pueden unir los anticuerpos. Los anticuerpos tienen al menos dos sitios de unión a antígeno, por lo que se forman grandes agregados o retículos de antígeno y anticuerpo. Experimentalmente, se agrega una cantidad creciente de antígeno a una cantidad constante de anticuerpo en solución. Inicialmente a baja concentración de antígeno, todo el antígeno está contenido en el precipitado. Esto se llama **zona de exceso de anticuerpos**. A medida que se agrega más antígeno, la cantidad de proteína precipitada aumenta hasta que las moléculas de antígeno y anticuerpo están en una proporción óptima. Esto se llama **zona de equivalencia**, o **punto de equivalencia**, donde ocurre la precipitación máxima. Cuando la cantidad de antígeno en solución excede la cantidad de anticuerpo, la cantidad de precipitación disminuirá. Esto se conoce como la **zona de exceso de antígeno** (Figuras 1 y 2).

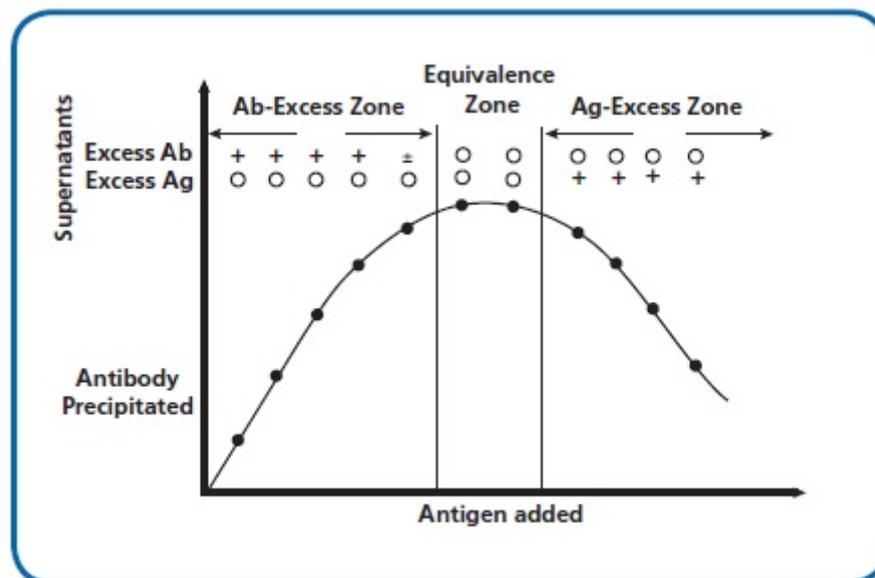


Figura 1

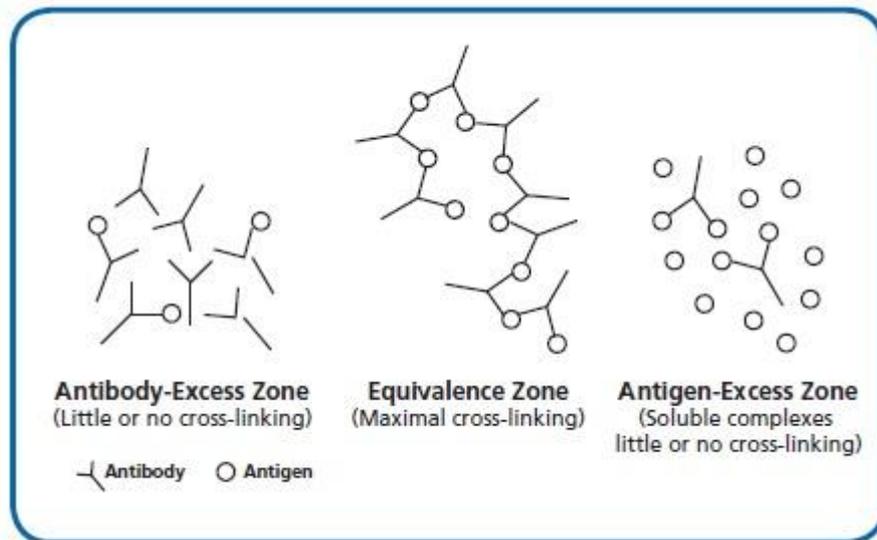


Figura 2

Cuando los anticuerpos y antígenos se insertan en diferentes áreas de un gel de agarosa, se difunden uno hacia el otro y forman bandas opacas de precipitado en la interfaz de sus frentes de difusión. Las reacciones de precipitación de anticuerpos y antígenos en geles de agarosa proporcionan un método para analizar diversas reacciones anticuerpo-antígeno.

EL PROCEDIMIENTO DE OUCHTERLONY

La doble difusión en dos dimensiones es un procedimiento simple inventado por el científico sueco **Örjan Ouchterlony**. Las soluciones de antígeno y anticuerpo se colocan en pocillos separados cortados en una placa de agarosa. Los reactivos se difunden desde los pozos uno hacia el otro y precipitan donde se encuentran en proporciones equivalentes. Un único antígeno se combinará con su anticuerpo homólogo para formar una única línea de precipitación. Cuando dos antígenos están presentes, cada uno se comporta independientemente el uno del otro. Por lo tanto, el número de bandas de precipitación indica que hay al menos muchos pares de anticuerpos y antígenos presentes (Figura 3). Las flechas indican patrones de difusión de antígenos y anticuerpos.

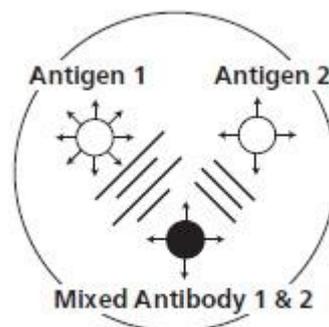


Figura 3

La doble difusión en dos dimensiones es una técnica útil para comparar antígenos para el número de determinantes idénticos o de reacción cruzada. Si se coloca una solución de antígeno en dos pocillos adyacentes y el anticuerpo homólogo se coloca bien en el centro, las dos bandas de precipitación que se forman se unirán en sus extremos más cercanos y se fusionarán. Esto se conoce como una **reacción de identidad** (Figura 4).

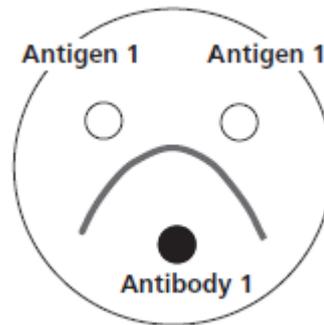


Figura 4: Reacción de identidad.

Cuando se colocan antígenos no relacionados en pocillos adyacentes y el pocillo central se llena con anticuerpos para cada antígeno, las bandas de precipitación se formarán independientemente entre sí y se cruzarán. Esto se conoce como una **reacción de no identidad** (Figura 5).

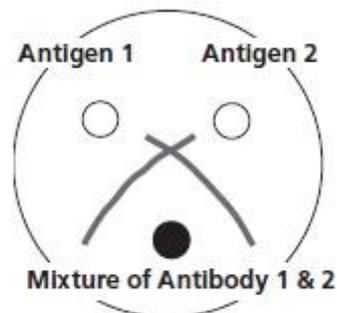


Figura 5: Reacción de no identidad.

Si dos antígenos purificados reaccionan de forma cruzada, colocándolos en pocillos periféricos adyacentes con anticuerpos contra uno en el pocillo central se obtendrá una banda única con el antígeno homólogo y de reacción cruzada. Como el antígeno de reacción cruzada carece de algunos de los determinantes antigénicos presentes en el antígeno homólogo, no puede precipitar todo el anticuerpo. El anticuerpo restante se difundirá más allá de la línea del precipitado de reacción cruzada para reaccionar con el antígeno homólogo para producir un espolón. El espolón forma proyecciones hacia el antígeno con menos determinantes, es decir, el antígeno de reacción cruzada. Esto se llama **reacción de identidad parcial** (Figura 6)

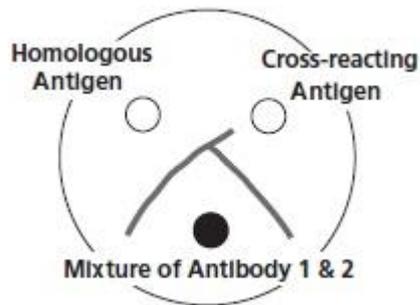


Figura 6: Reacción de identidad parcial.

NOTA: Los patrones que se muestran en las Figuras 3 - 6 son la representación ideal. En condiciones experimentales, las espuelas son a menudo difíciles de visualizar.

Dado que estos anticuerpos que no provocan una reacción cruzada a menudo son solo una fracción del anticuerpo total implicado en la reacción de precipitación homóloga, el espolón suele ser menos denso (a menudo difícil de visualizar) que la banda de precipitación desde la que se proyecta (Figura 7).

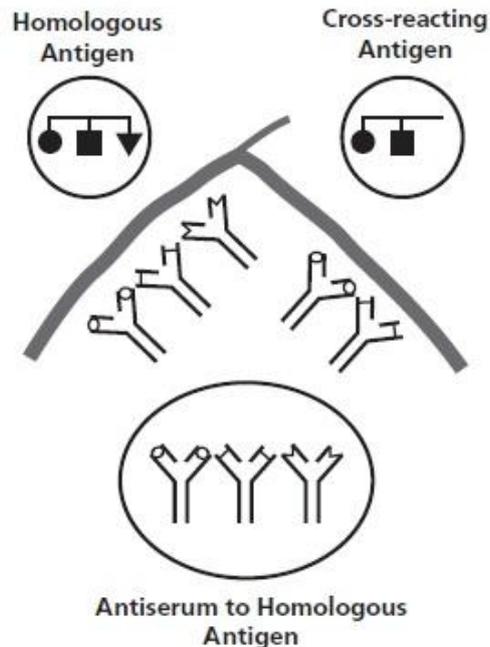


Figura 7

4. DESCRIPCIÓN DEL EXPERIMENTO

El objetivo de este experimento es introducir los principios de las interacciones antígeno-anticuerpo usando el procedimiento Ouchterlony.

4.1 Precauciones

1. Se deben usar los guantes y gafas de protección de forma rutinaria como buenas prácticas de laboratorio durante todo el procedimiento.
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.
6. La agarosa en ebullición puede salpicar y causar quemaduras graves. Al calentar la agarosa, debe usar siempre gafas de seguridad y guantes protectores de calor.

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

El horario de cada profesor y los requisitos de tiempo determinarán cuándo se deben preparar las placas Ouchterlony. Se tarda aproximadamente de 20 a 30 minutos en preparar las placas (generalmente se requieren 10-15 minutos de este tiempo para la solidificación). Es aconsejable que los estudiantes pueden preparar las placas, si el tiempo lo permite.

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 científicos documentan todo lo que ocurre durante un experimento, incluyendo condiciones experimentales, pensamientos y observaciones durante la realización del experimento y, por supuesto, cualquier información recopilada. Hoy, los estudiantes documentarán su práctica en una libreta de laboratorio o en una hoja de trabajo separada.

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

PREPARATIVOS ANTES DE LA PRÁCTICA

A. PREPARACIÓN DE LA CÁMARA DE INCUBACIÓN

(Preparar el día del laboratorio)

Rellenar la parte inferior de un recipiente de plástico o recipiente de vidrio (como un plato pyrex) con varias toallas de papel. Remojar las toallas de papel con agua destilada. No debe haber ninguna capa de líquido sobre las toallas de papel. Todo el líquido debe ser absorbido por la toalla de papel. Cubrir toda la cámara con una envoltura de plástico.

B. PREPARACIÓN DE ANTICUERPOS Y ANTÍGENOS

El anticuerpo (Ab) y los tres antígenos (Ag) se han suministrado en 4 tubos. Se recomienda que el Ab y los Ag se alicuoten para cada grupo.

1. Etiquetar 10 tubos de microtest "A".
2. Etiquetar 10 tubos de microtest "B".
3. Etiquetar 10 tubos de microtest "C".
4. Etiquetar 10 tubos de microtest "D".
5. Alicuotar 100 µl de Muestra A en cada tubo "A".
6. Alicuotar 200 µl de Muestra B en cada tubo "B".
7. Alicuotar 150 µl de Muestra C en cada tubo "C".
8. Alicuotar 80 µl de Muestra D en cada tubo "D".
9. Cada grupo necesita un tubo de microtest A, B, C y D.
10. Alicuotar 100 µl de solución de práctica por grupo en 10 tubos de microtest.

C. PREPARACIÓN DE AGAROSA Y DE PLACAS DE OUCHTERLONY

Dependiendo de la disponibilidad de tiempo para la realización de la práctica, la agarosa y las placas de Ouchterlony pueden prepararse antes de la clase de prácticas siguiendo las indicaciones de los apartados A y B del punto 5 de este protocolo.

Si las placas no se van a usar ese día, pueden envolverse con plástico y almacenarlas invertidas en la nevera hasta dos semanas.

4.4 Material que debe recibir cada grupo

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

- 25 ml solución de agarosa
- 1 tubo microtest "A"
- 1 tubo microtest "B"
- 1 tubo microtest "C"
- 1 tubo microtest "D"
- 1 tubo microtest con solución de práctica
- 4 placas de petri
- Rotulador/marcador

4.5 Evitar los errores más comunes

1. Seguir las instrucciones cuidadosamente al preparar el gel para las placas. Asegurarse que la agarosa esté completamente disuelta.
2. Hacer los pocillos correctamente y limpios con los cortadores de pozos. Tomar medidas para asegurarse de que los pocillos estén espaciados adecuadamente de acuerdo con la plantilla de la página 5.
3. Añadir las muestras a los pocillos con cuidado y precisión. Evitar llenar demasiado los pocillos.

4. No inclinar ni invertir las placas cuando las transfieran a la cámara de humedad.
5. La colocación de la cámara de humedad en un horno de incubación a 37 °C acelerará la formación de arcos de precipitación.
6. La ausencia de líneas de precipitación generalmente se debe a un pipeteo desproporcionado entre los pocillos Ag y Ab, o la distancia entre los pocillos Ag y Ab.
7. Los espolones pueden ser débiles. IgG y albúmina son componentes inmunológicamente no idénticos a los del suero completo. Ambos son reconocidos por diferentes anticuerpos en el antisuero fabricado contra el suero de conejo completo.

5. PRÁCTICA

A. PREPARACIÓN DE AGAROSA.

1. En un matraz o vaso de precipitados de 500 ml, agregar todo el contenido del paquete de tampón en polvo (**componente E**) a 225 ml de agua destilada. Agite el matraz o vaso de precipitados para disolver totalmente el polvo.
2. Añadir todo el contenido del paquete de **Agarosa™ UltraSpec** al matraz o vaso de precipitados (3 gr). Agitar la suspensión para dispersar los grumos. Con un rotulador, indicar el nivel de volumen de la solución en el exterior del matraz o vaso de precipitados.
3. Se debe calentar (hasta punto de ebullición) la solución para disolver la agarosa. Esto se puede lograr con una placa calefactora. Cubrir el vaso con papel de aluminio. Calentar la mezcla hasta que llegue a punto de ebullición sobre una placa con agitación ocasional. Usar gafas de seguridad y guantes protectores para el calor. Mantener la mezcla con calor hasta que toda la agarosa gelatinosa se disuelva. Durante el calentamiento, retirar ocasionalmente el vaso de precipitados del calor y verificar que no haya partículas pequeñas y claras de agarosa. Continuar calentando con agitación ocasional. La solución final debe ser clara y transparente.

Preferiblemente usar un microondas para fundir la agarosa (sin cubrir con aluminio el vaso) a temperatura alta en 30 segundos. También se pueden realizar pulsos de calentamientos durante 2 minutos agitando el matraz entre pulsos. Verificar que no haya pequeñas partículas claras de agarosa. La solución final debe ser clara y transparente.

4. Si se ha producido una evaporación detectable, agregar agua destilada para llevar la solución al volumen original marcado en el matraz o vaso de precipitados en el paso 2. El volumen total debe ser de un mínimo de 230 ml.
5. Enfriar la solución de agarosa a 55 °C en un baño de agua. Agitar el matraz o vaso en el baño para facilitar la disipación de calor.
6. Preparar alícuotas de 25 ml de la solución de agarosa (55 °C) para cada uno de los diez grupos.

B. PREPARACIÓN DE PLACAS DE OUCHTERLONY

1. Cada grupo necesita 4 placas: 1 placa de carga para practicar y 3 placas experimentales. Usar una pipeta de 5 ml o 10 ml, pipetear cuidadosamente 5 ml de la agarosa líquida (**enfriada a 55 °C**) en cada placa, girando la placa para cubrir el fondo con agarosa. Repetir con las placas restantes.
2. Si la agarosa líquida contiene burbujas, agitar suavemente la placa para eliminarlas.

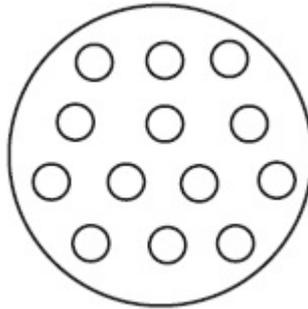
3. Permitir que la agarosa se solidifique. Esto tardará aproximadamente 10-15 minutos, en cuyo momento el gel aparecerá un poco opaco.
4. Si las placas no se van a usar ese día, pueden envolverse con plástico y almacenarse invertidas en la nevera hasta dos semanas.

C. PRÁCTICA DE LA CARGA DE POCILLOS (OPCIONAL).

C.1 Preparación de la placa de práctica.

Este experimento contiene una solución de carga para practicar. Esta solución se incluye para permitir que los profesores y los estudiantes practiquen cargar los pocillos de muestra antes de realizar el experimento real. Usar una micropipeta o una de las pipetas de transferencia de plástico incluidas en el kit del experimento para practicar la carga de los pocillos de muestra con la solución de carga de práctica.

1. Se debe preparar una placa de práctica para cada grupo. Se han proporcionado suficientes reactivos para este fin.
2. Usar los cortadores de pocillo suministrados, cortar varias filas de pocillos como se muestra en el diagrama.



3. Practicar la carga de los pocillos de muestra con las pipetas de transferencia desechables de plástico. (Consultar apartado: "C.2 Carga de los pocillos con la solución para practicar").
4. Si se utiliza una micropipeta automática, la cantidad de muestra que se debe cargar es de 30 microlitros.

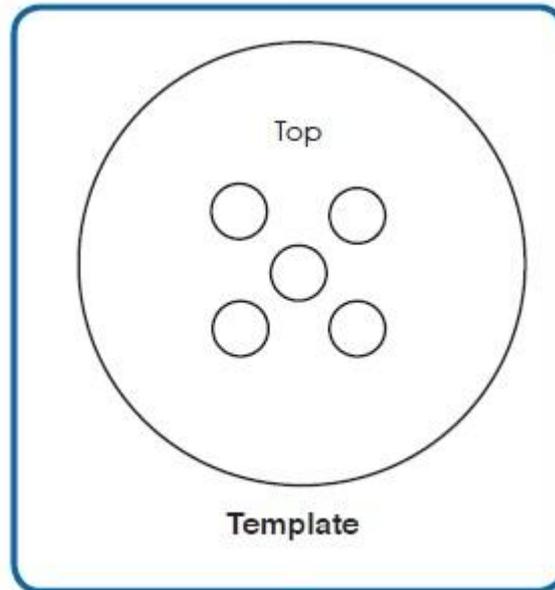
C.2 Carga de los pocillos con la solución para practicar.

1. Apretar y después dejar de ejercer presión sobre el vástago de la pipeta, no la bombilla, para extraer lentamente una parte de la muestra hacia la pipeta. La muestra debe permanecer en la parte inferior de la pipeta.
2. Si la muestra sube dentro de la pipeta y se aloja en la bombilla o en las paredes, dar toques suaves hasta que la muestra se desplace hacia el vástago inferior de la pipeta. Expulsar la muestra en el tubo. Probar a realizar de nuevo el paso 1.
3. Mientras sujeta la punta de la pipeta sobre el tubo, apretar lentamente el vástago de la pipeta hasta que la muestra esté casi en la abertura de la punta de la pipeta.
4. Colocar la punta de la pipeta lo más cerca posible sobre el pocillo, no adentro, para poder depositar mejor la muestra. Mantener una presión constante sobre el vástago de la pipeta para evitar que la muestra vuelva a entrar en la pipeta.
5. Apretar lentamente la bombilla de la pipeta para expulsar dos (2) gotas de muestra. El pocillo debe aparecer lleno, pero tener cuidado de no llenar demasiado los pocillos y causar derrames en la superficie de agarosa. Vuelva a colocar cualquier muestra restante de la pipeta en el tubo.

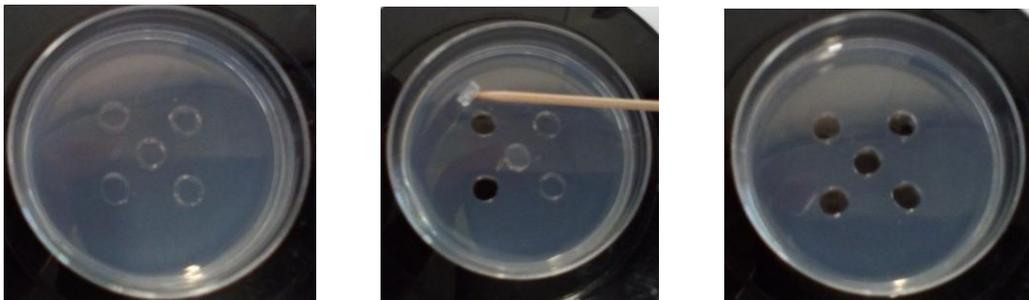
Nota: Es aconsejable la utilización de una micropipeta automática para la carga de los pocillos debido a la mayor facilidad de su uso para los estudiantes y la posibilidad de ajustar mejor el volumen de carga en los pocillos.

D. PREPARACIÓN DE POCILLOS PARA LAS MUESTRAS

1. Hacer varias copias de la plantilla (figura inferior) para los grupos de laboratorio.



2. Colocar la plantilla debajo de una de las placas para que el patrón esté en el centro de la placa. Las distancias entre los pocillos son importantes. Intentar seguir la plantilla con la mayor precisión posible.
3. Cortar los cinco pocillos con el cortador de pocillos (proporcionado en el kit) con un suave movimiento de perforación. Retirar los tapones de agarosa con un palillo de dientes o una espátula de bordes planos.



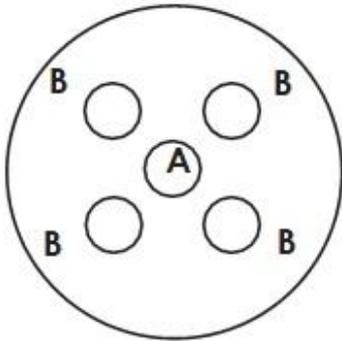
4. Si la colocación del pocillo no es precisa, debe haber suficiente espacio en la placa para volver a cortar los pozos utilizando la plantilla.
5. Repite los pasos 2 y 3 con las otras dos placas.

E. CARGA DE LAS MUESTRAS EN LOS POCILLOS

1. Anotar la identificación de cada grupo en la parte superior de la placa antes de cargar las muestras.

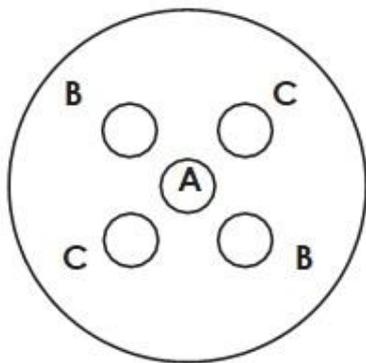
- Usando la misma pipeta, llenar los pocillos centrales de las tres placas con 30 microlitros (2 gotas con una pipeta de transferencia) de antisuero (anticuerpo) del **tubo A**. Los pocillos deben aparecer llenos, pero tener cuidado de no llenar demasiado los pocillos y causar derrame en la superficie de agarosa. Esto puede afectar sus resultados.
- Llenar los pocillos externos con 30 microlitros de antígeno usando una punta de pipeta limpia para cada antígeno de la siguiente manera:

Placa 1



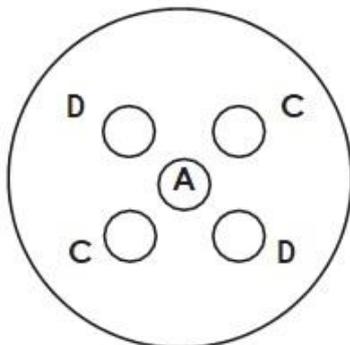
- Pocillo central: antisuero contra el líquido que contiene anticuerpos (tubo A)
- Pocillo superior izquierdo: suero entero (tubo B)
- Pocillo superior derecho: suero entero (tubo B)
- Pocillo inferior izquierdo: suero entero (tubo B)
- Pocillo inferior derecha: suero entero (tubo B)

Placa 2



- Pocillo central: antisuero contra el líquido que contiene anticuerpos (tubo A)
- Pocillo superior izquierdo: suero entero (tubo B)
- Pocillo superior derecho: albúmina (tubo C)
- Pocillo inferior izquierdo: albúmina (tubo C)
- Pocillo inferior derecha: suero entero (tubo B)

Placa 3



- Pocillo central: antisuero contra el líquido que contiene anticuerpos (tubo A)
- Pocillo superior izquierdo: IgG (tubo D)
- Pocillo superior derecho: albúmina (tubo C)
- Pocillo inferior izquierdo: albúmina (tubo C)
- Pocillo inferior derecho: IgG (tubo D)

F. INCUBACIÓN

Colocar las tapas en las placas. Colocar con cuidado las placas cubiertas en la cámara de incubación sobre una capa de toallas de papel húmedas. **No se deben invertir las placas.** Cubrir la cámara con una envoltura de plástico y dejar incubar a temperatura ambiente entre 24 y 48 horas para permitir que se formen líneas de precipitación o la cámara se puede colocar en un horno de incubación a 37 °C.

6. RESULTADOS Y PREGUNTAS DE LA PRÁCTICA

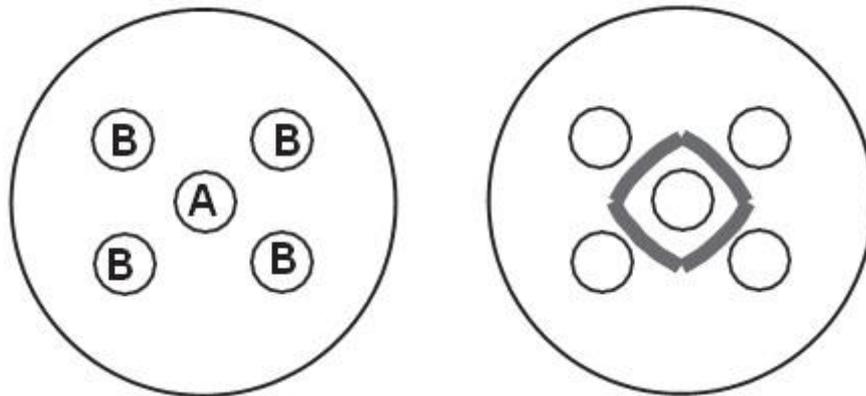
6.1 Resultados

Las líneas de precipitación serán visibles en 24-48 horas a temperatura ambiente. Sostener con cuidado la placa para que las luces superiores (del techo) de la sala brillen a través de ella. Se deben poder ver arcos blancos opacos en cada lado de la placa donde el anticuerpo y el antígeno precipitaron. Se debe hacer un dibujo de los resultados obtenidos.

Esquema idealizado de resultados

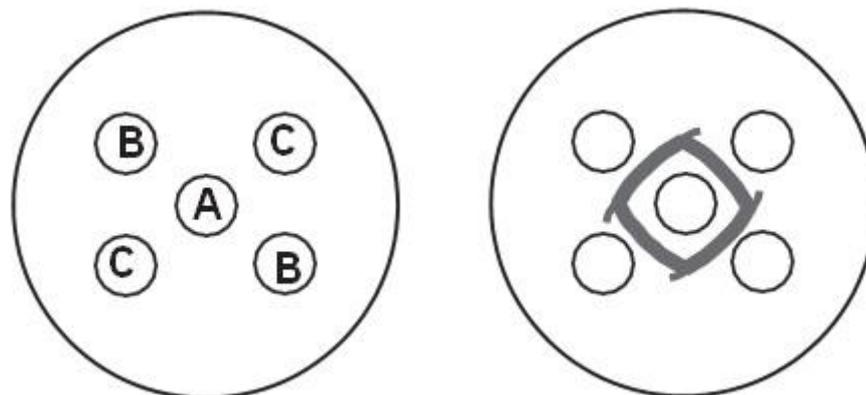
Placa 1: Reacción de identidad

Se debe tener en cuenta la serie de líneas de precipitación que indican que muchos sistemas Ab-Ag pueden estar visibles.



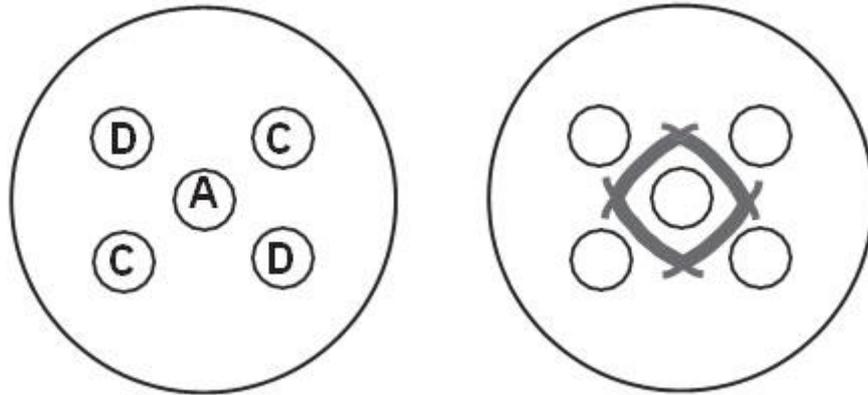
Placa 2: Reacción de identidad parcial

Los "espolones" (prolongaciones de las líneas de precipitación) pueden ser débiles. La albúmina es reconocida por el antisuero en forma purificada o como un componente del suero. El antisuero también reconoce muchos otros componentes del suero.



Placa 3: Reacción de no identidad

Los "espolones" pueden ser débiles. IgG y albúmina son componentes inmunológicamente no idénticos a los del suero completo. Ambos son reconocidos por diferentes anticuerpos en el antisuero fabricado contra el suero de conejo completo.



Técnicamente, esta no es una reacción de identidad parcial. Es una reacción de no identidad, ya que la albúmina también está en el suero. El espolón son todas las otras proteínas que reaccionan con el antisuero que antigénicamente no tienen nada en común con la albúmina.

6.2 Preguntas

Responder a las siguientes preguntas en la libreta de prácticas:

4. Explicar cómo se pueden realizar las observaciones cualitativas en el sistema antígeno-anticuerpo.
5. ¿Cuál es la zona de equivalencia o punto de equivalencia?
6. ¿Cuándo se puede observar la zona de exceso de antígeno? ¿Qué efecto tiene esto en la cantidad de precipitación?
7. ¿Qué causaría la formación de dos o más bandas de precipitación en un experimento antígeno-anticuerpo?