

Inmunodifusión radial

10 grupos de estudiantes

1. OBJETIVO DEL EXPERIMENTO

La **inmunodifusión radial** es una técnica cuantitativa muy sensible que se utiliza a menudo clínicamente para detectar los niveles de proteínas sanguíneas de los pacientes. En esta práctica, los estudiantes aprenderán a determinar cuantitativamente una concentración desconocida de un antígeno.

2. COMPONENTES para 10 grupos de estudiantes

COMPONENTES	Conservación
A. Solución de anticuerpos	4-8°C
B. Solución de antígeno estándar	4-8°C
C. Agarosa UltraSpec™	4-8°C
D. Tampón en polvo	4-8°C
E. Concentración de antígeno desconocido	4-8°C
1 manga de placas de Petri	
2 pipetas de 10 ml	
10 cortadores para pocillos ("well cutters")	
80 pipetas de transferencia	
70 tubos de microtest	
1 plantilla de papel	
1 solución de carga para practicar	

NOTA: Tras la recepción, almacene 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

- Micropipetas y puntas automáticas (5-50 µl)
- Bombas o peras de succión de pipeta (para pipetas de 10 ml)
- Regla.
- Caja o plato de plástico.
- Lámina de plástico para envolver (film transparente).
- Toallas de papel.
- Agua destilada.
- Placa calefactora, quemador Bunsen o microondas.
- Vaso de 400 a 600 ml o frasco Erlenmeyer.
- Vaso o frasco de 150 ml.
- Baño de agua.
- Probeta graduado de 250 ml.
- Estufa de incubación (37°C).

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 para los pasos de extracción y de lavado con líquidos.

3. INTRODUCCIÓN

Immunodiffusion radial

La reacción fundamental de la inmunología implica la interacción de **anticuerpos (Ab)** y **antígenos (Ag)**. Estas interacciones son útiles en la defensa del cuerpo contra infecciones bacterianas y virales y toxinas. Las capacidades de defensa dependen del reconocimiento de antígenos por componentes humorales del sistema inmunológico. A continuación, se producen anticuerpos específicos en respuesta a la exposición al antígeno.

La formación de **complejos antígeno-anticuerpo** es el primer paso para eliminar agentes infecciosos del cuerpo. Debido a que cada anticuerpo puede unirse a más de un antígeno y cada antígeno puede estar unido por más de una molécula de anticuerpo, pueden formarse complejos macromoleculares muy grandes. Estos complejos forman precipitados que pueden ser eliminados del cuerpo a través de diversos medios. Estos precipitados son también útiles para pruebas de laboratorio y de diagnóstico.

Cuando los anticuerpos y antígenos se insertan en diferentes áreas de un gel de agarosa, se difunden entre sí 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 de análisis de las diversas reacciones anticuerpo-antígeno en un sistema.

La doble difusión en dos dimensiones es un procedimiento simple inventado por el científico sueco, Ouchterlony. Las soluciones de antígeno y anticuerpo se colocan en pocillos separados en una placa de agarosa. Los reactivos se difunden de los pocillos uno hacia el otro y precipitan donde se encuentran en proporciones equivalentes. Un único antígeno se combinará con su anticuerpo homólogo para formar una sola línea de precipitación.

La **inmunodifusión radial (RID)** es una técnica que puede determinar cuantitativamente la concentración de un antígeno. A diferencia de muchas técnicas de precipitación en gel y líquido que detectan cualitativamente el antígeno, el RID es una técnica cuantitativa sensible que se usa a menudo clínicamente para detectar niveles de proteínas sanguíneas en pacientes.

El anticuerpo se incorpora en agarosa fundida que se vierte en una placa de Petri y se deja solidificar. Se cortan pequeños pocillos en la agarosa y se llenan con concentraciones conocidas de antígeno que interacciona con el anticuerpo presente en la agarosa. Se colocan muestras de concentraciones desconocidas en pocillos similares. Los antígenos en solución difunden entonces hacia fuera desde el pocillo en un patrón circular que rodea al pozo. El anticuerpo está presente en exceso y la difusión del antígeno continuará hasta que se forme un anillo estable de antígeno-anticuerpo. Hay complejos antígeno-anticuerpo en toda la zona que rodea el pocillo dentro de la línea de precipitación. En la línea de precipitación es donde se puede encontrar el mayor número de complejos porque el antígeno y el anticuerpo están presentes en proporciones aproximadamente iguales. Esto se conoce como la **zona de equivalencia** o el **punto de equivalencia**. Generalmente, es necesario de 24 a 48 horas para que ocurra la difusión óptima y aparezca la precipitación.

Para cada antígeno, se formará un anillo de precipitación de punto final de cierto diámetro. A partir de las concentraciones patrón conocidas, se puede trazar una curva patrón trazando la concentración de antígeno frente a las medidas cuadráticas de diámetro de los anillos. A partir de esta curva de calibración lineal se puede determinar la concentración de las muestras de antígeno desconocidas.

4. DESCRIPCIÓN DEL EXPERIMENTO

La **inmunodifusión radial** es una técnica cuantitativa muy sensible que se utiliza a menudo clínicamente para detectar los niveles de proteínas sanguíneas de los pacientes. En esta práctica, los estudiantes aprenderán a determinar cuantitativamente una concentración desconocida de un antígeno.

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.
6. Elimine las **placas RID** mediante los procedimientos apropiados de eliminación de residuos de laboratorio.

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

El horario lectivo y personal, así como los requisitos de tiempo determinarán cuándo deben prepararse las **placas RID**. Se necesitan aproximadamente 30 minutos para preparar las placas (generalmente se requieren 10 minutos de este tiempo para la solidificación).

Es aconsejable que los propios estudiantes sean los que preparen 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

A. PREPARATIVOS ANTES DE LA PRÁCTICA

PREPARAR LA AGAROSA

1. En un vaso de precipitados de 400 a 600 ml o Erlenmeyer, añadir todo el contenido del envase de Tampón en polvo (componente D) a 200 ml de agua destilada. Agitar la solución hasta que el polvo esté totalmente disuelto. Separar y guardar 50 ml para usar como tampón de dilución en un vaso de precipitados separado.
2. Añadir el contenido completo del paquete de agarosa (componente C) a un matraz o vaso de precipitados que contenga 150 ml de tampón. Agitar vigorosamente la solución para dispersar los grumos. Con un marcador, indicar el nivel de volumen de la solución en el exterior del matraz o vaso.
3. La solución debe llegar a punto de ebullición (pero sin dejar hervir la solución) para disolver la agarosa. Esto se puede lograr con una placa calefactora o microondas. Cubrir el vaso de precipitados con papel de aluminio y calentar la mezcla hasta el punto de ebullición sobre la placa calefactora agitándola ocasionalmente. Usar gafas de seguridad y guantes de protección para el calor durante este proceso. Calentar hasta que se disuelva toda la agarosa. Comprobar que no haya grumos o partículas pequeñas y claras de agarosa. La solución final debe ser clara y transparente.

Calentar la mezcla para disolver el polvo de agarosa. La solución final debe ser clara y transparente (como el agua) sin partículas no disueltas.

A. Método de microondas:

- Cubrir el frasco con una envoltura de plástico para minimizar la evaporación.
- Calentar la mezcla durante 1 minuto.
- Agitar la mezcla y calentarla en intervalos de 25 segundos hasta que toda la agarosa esté completamente disuelta.

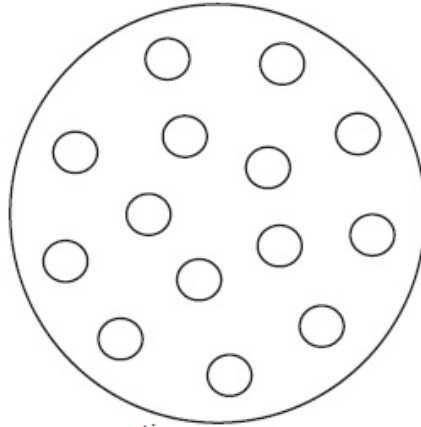
B. Método de placa caliente:

- Cubrir el frasco con papel aluminio para evitar el exceso de evaporación.
- Calentar la mezcla hasta punto de ebullición sobre una placa calefactora agitándola ocasionalmente. Calentar hasta que la agarosa esté completamente disuelta.

4. Si se ha producido una evaporación de solución detectable, agregar agua destilada caliente para ajustar el volumen de solución hasta el nivel original marcado en el matraz o vaso de precipitados en el paso 2. No usar agua fría o la solución de agarosa puede enfriarse demasiado rápido y solidificarse de forma prematura.
5. Enfriar la solución de agarosa a 55°C en un baño de agua. Agitar la solución ocasionalmente mientras se enfría.

PREPARACIÓN DE LAS PLACAS PARA PRACTICAR

1. Si se van a fabricar placas de práctica, pipetear 2,5 ml de agarosa fundida en cada una de las 10 placas petri con una pipeta de 10 ml. Suavemente extender la agarosa con la pipeta en la parte inferior de la placa para cubrir toda la superficie. Volver a colocar la agarosa fundida restante de nuevo en el baño de agua.
2. Permitir que las placas de agarosa se enfríen. Guardar las placas a 4-8°C si no se deben usar en pocas horas.



Placa para practicar

PREPARACIÓN DE PLACAS DE ANTICUERPOS

1. Verter 26 ml de solución de agarosa fundida en un tubo grande o en un matraz.
2. Añadir el contenido completo de la Solución de anticuerpos (Componente A) a la solución de agarosa caliente de 26 ml. Mezclar la solución con una pipeta. Mantener la solución caliente (con el baño de agua a 55°C) para que no se solidifique prematuramente. La concentración del anticuerpo será de 1 mg/ml.

NOTA: Asegurarse que la temperatura de la solución de agarosa se encuentra a 55°C al añadir la Solución de anticuerpos para evitar la degradación de los mismos.

3. Con una pipeta de 10 ml, dispensar 2,5 ml en el fondo de cada placa de Petri, extender suavemente la agarosa con la pipeta para cubrir el fondo. Dejar que la agarosa se solidifique. Este proceso debe durar aproximadamente 10 minutos. Si las placas no se van a utilizar el día de la preparación, se pueden envolver con film transparente de plástico y almacenar en la nevera durante no más de una semana.
4. Cada grupo requiere 1 placa de anticuerpos y 1 placa para practicar.

B. PREPARATIVOS EN EL DÍA DE LA PRÁCTICA PREPARACIÓN DE ANTÍGENOS

Los estudiantes deben preparar diluciones seriadas de la Solución de Antígeno Estándar (Componente B) para determinar la curva estándar.

1. Marcar 10 tubos de microtest como "Estándar".
2. Marcar 10 tubos de microtest como "Desconocido".
3. Marcar 10 tubos de microtest como "Tampón".
4. Alicuotar 75 µl de Solución de Antígeno Estándar (Componente B) en cada tubo microtest marcados como "Estándar".
5. Alicuotar 10 µl de Solución de Antígeno Desconocida (Componente E) en cada tubo microtest marcado como "Desconocido".

6. Alicuotar 1 ml de Tampón (guardado de la etapa de preparación de agarosa del apartado 4.3 A) en cada tubo microtest marcado como "Tampón".
7. Cada grupo necesitará un tubo de cada una de las soluciones: Estándar, Desconocido y Tampón.

NOTA: Se pueden alicuotar las soluciones antes del día de la práctica, en ese caso se deberán guardar a 4-8°C hasta el día de la práctica.

PREPARACIÓN DE LA CÁMARA DE INCUBACIÓN

1. Conseguir un recipiente de plástico o un plato con tapa (que puedan entrar en el interior de la estufa de incubación). Si no hay una tapa disponible, el envase puede estar cubierto con una envoltura de plástico (film transparente).
2. Extender en la parte inferior del recipiente varias toallas de papel. Agregar agua destilada a las toallas hasta saturarlas de agua. Todo el líquido debe ser absorbido por las toallas. Cubrir la cámara con la tapa o envoltura de plástico.

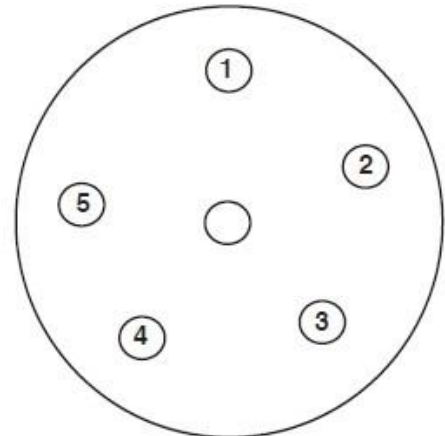
4.4 Material que debe recibir cada grupo

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

- 1 tubo de Tampón
- 1 tubo de solución de anticuerpos estándar
- 1 tubo de solución de antígeno desconocido
- 4 tubos de microtest
- 1 placa para practicar
- 1 placa experimental RID
- 1 cortador de pocillos
- 1 plantilla
- Micropipeta y puntas (o 8 pipetas de transferencia)
- Papel cuadriculado
- Regla
- Rotulador/Marcador

4.5 Evitar los errores más comunes

1. Seguir las instrucciones cuidadosamente al preparar los geles. Asegurarse que la agarosa esté completamente disuelta.
2. Se deben hacer pocillos limpios y correctamente posicionados en la placa de petri con los cortadores de pocillos. Tomar las medidas necesarias para asegurar que los pocillos estén espaciados apropiadamente de acuerdo con la plantilla **en la página 5**.
3. Añadir las muestras a los pocillos con cuidado y precisión. Evitar sobrellenar los pocillos.
4. No inclinar o invertir las placas de petri al transferirlas a la cámara de incubación.
5. La colocación de la cámara de incubación en un horno de incubación a 37°C acelerará la formación de arcos de precipitación.



5. PRÁCTICA

A. PREPARACIÓN DE PLACAS DE AGAROSA

1. Colocar la plantilla debajo de la placa para que el patrón esté centrado.

- Realizar los pocillos utilizando el cortador de pocillos (proporcionado en el kit) con un suave movimiento de perforación. Retirar los tapones de agarosa con un palillo o espátula de borde plano.

B. PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES ESTÁNDAR (DILUCIÓN SERIAL)

- Marcar cuatro tubos de microtest: 1:2, 1:4, 1:8 y 1:16.
- Utilizando una micropipeta, añadir 50 µl de Tampón a cada tubo.
- Con una punta de pipeta nueva, añadir 50 µl de "solución de antígeno estándar" al tubo con la etiqueta 1:2. Mezclar.
- Con una punta de pipeta nueva, transferir 50 µl de la dilución 1:2 al tubo etiquetado 1:4. Mezclar.
- Con una punta de pipeta nueva, transfiera 50 µl de la dilución 1:4 al tubo marcado con 1:8. Mezclar.
- Con una punta de pipeta nueva, transfiera 50 µl de la dilución 1:8 al tubo marcado con 1:16. Mezcla.
- Ahora hay cinco muestras de antígeno para la curva estándar (véase la tabla siguiente).

DILUCIÓN	CONCENTRACIÓN
Sin diluir	2 mg/ml
1:2	1 mg/ml
1:4	0,5 mg/ml
1:8	0,25 mg/ml
1:16	0,125 mg/ml

C. PRACTICAR LA CORRECTA CARGA DE POCILLOS (OPCIONAL)

Esta práctica contiene una solución de carga para practicar. Esta solución se incluye para permitir que los estudiantes practiquen cargar los pocillos de la muestra antes de realizar la práctica real. Utilizar micropipeta automática o una de las pipetas de transferencia de plástico incluidas en el experimento para practicar la carga de los pocillos de muestra con la solución de carga de práctica. Se deben hacer suficientes copias de la plantilla para cada grupo de laboratorio.

- Se debe preparar una placa de prácticas para cada dos grupos. Se proporcionan suficientes reactivos para este propósito.
- Utilizando los cortadores de pocillos proporcionados, cortar varios pocillos en la agarosa como se muestra en la plantilla. Explicar las instrucciones a los estudiantes para la preparación de pocillos de muestras.
- Practicar la carga de los pocillos de muestra con la solución de carga de prácticas utilizando una micropipeta automática. Cargar 5 µl por pocillo y asegurarse que la muestra cubra toda la superficie del pocillo. Si no dispone de una micropipeta automática, utilizar las pipetas de transferencia suministradas, teniendo cuidado de no llenar excesivamente los pocillos. Si usa pipetas de transferencia, colocar suficiente muestra para cubrir el fondo del pocillo.

D. LA CARGA DE LAS MUESTRAS

- En la parte inferior de la placa, numerar los pocillos en el perímetro de la placa del #1 a #5. Dejar el pocillo del centro sin marcar (sin número).

2. Cargar los pocillos #1 a #5 con la misma micropipeta o pipeta de transferencia. En el pocillo #5, cargar 5 μ l de la dilución de antígeno 1:16. Asegurarse que la muestra cubre toda la superficie del pocillo extendiéndola cuidadosamente con la punta de la pipeta.
3. En el pocillo #4, cargar 5 μ l de la dilución de antígeno 1:8.
4. En el pocillo #3, cargar 5 μ l de la dilución de antígeno 1:4.
5. En el pocillo #2, cargar 5 μ l de la dilución de antígeno 1:2.
6. En el pocillo #1, cargar 5 μ l del antígeno no diluido.

NOTA: Puede usar la misma micropipeta o pipeta de transferencia para cargar los pocillos #1 a #5, comenzando con la dilución de antígeno más diluida y terminando con la más concentrada. Usar una punta nueva para si no están seguros.

7. Con una punta de micropipeta nueva o una pipeta de transferencia, cargar 5 μ l de la solución de antígeno desconocido en el pocillo central.
8. Marcar la cubierta de la placa de Petri con el número del grupo de laboratorio o las iniciales de los estudiantes. Colocar la tapa sobre placa, colocar la placa hacia arriba (no invertir) dentro de la cámara de incubación sobre las toallas de papel húmedas. Cubrir la cámara de incubación y colocarla en una estufa de incubación a 37°C o a temperatura ambiente durante 24 a 48 horas.

E. LECTURA DE LOS RESULTADOS

Los anillos de precipitina serán visibles en 24 a 48 horas. Sostener con cuidado una placa para que las luces del techo del aula brillen a través de ella. Deberían ser capaces de ver los círculos opacos alrededor de cada pocillo donde el antígeno y el anticuerpo han precipitado.

Con una regla, medir el diámetro (a partir de los centros de los pocillos) del anillo de precipitación en milímetros. Para trazar la curva estándar, elevar al cuadrado el valor del diámetro, para realizar la gráfica indicar la concentración del antígeno en el eje X y el diámetro al cuadrado en el eje Y. Dibujar la línea que mejor se ajuste entre estos puntos. Calcular el valor de la concentración de antígeno desconocido de esta gráfica.

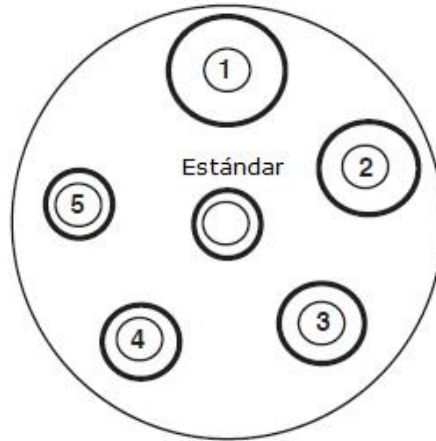
6. RESULTADOS Y PREGUNTAS DE LA PRÁCTICA

6.1 Resultados

En un papel cuadriculado regular, se debe obtener una curva lineal estándar. Si la curva no es lineal, la concentración desconocida no se puede determinar con precisión. Los anillos de precipitina variarán en función de la concentración de los antígenos, anticuerpos, agarosa y el tiempo y la temperatura de incubación.

A partir de la curva estándar, se puede determinar la concentración desconocida encontrando el valor del cuadrado del diámetro en el eje Y, encontrando el punto de intersección en la línea de la curva estándar y obteniendo el valor en el eje X. El valor en el eje X es la concentración de antígeno en la solución.

La concentración de la Solución de antígeno desconocido proporcionada es de **0,40 mg/ml**.



6.2 Preguntas

Responder a las siguientes preguntas en la libreta de prácticas:

1. ¿Qué representan los anillos circulares de precipitina?
2. ¿Por qué cambian los tamaños de los anillos hasta que se alcanza el equilibrio?
3. Predecir los resultados si se cargó una concentración muy baja de antígeno en un pocillo. ¿Qué sucedería si no se incorporara suficiente anticuerpo en la agarosa?
4. Comparar y contrastar la inmunodifusión radial, la técnica de la placa de Ouchterlony, realizada por los diferentes grupos.