

¿QUÉ HAY EN MI COMIDA? DETECCIÓN DE ALÉRGENOS POR ELISA

10 grupos de estudiantes

1. OBJETIVO DEL EXPERIMENTO

En esta práctica los estudiantes trabajarán los conceptos y la metodología relacionada con el ensayo inmunoenzimático (**ELISA**). Los estudiantes realizarán un **ELISA** para detectar la presencia de proteína de suero de leche en diversos productos alimenticios. Se creará una curva estándar para cuantificar la concentración de suero de leche en cada muestra.

2. COMPONENTES para 10 grupos de estudiantes

COMPONENTES	Conservación
A. 10X ELISA Wash Buffer	4-8°C
B. ELISA Dilution Buffer	4-8°C
C. Whey Antigen (Lyophilized)	4-8°C
D. Anti-Whey Antibody (Lyophilized)	4-8°C
E. Secondary Antibody (Lyophilized)	4-8°C
F. TMB Substrate	4-8°C
G. STOP Solution	4-8°C
Placas de microtitulación	
Tubos de microcentrífuga (Snap-top)	
Tubos para homogeneización	
Tubos cónicos (15 ml)	
Tubo cónico (50 ml)	
Pipetas de transferencia	

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.
- Varias muestras de alimentos.
- Vasos de vidrio o matraces.
- Toallas de papel.
- Estufa de incubación (para temperaturas de 37°C).
- Guantes desechables de laboratorio.
- Gafas protectoras.

- Micropipetas automáticas (5-50 μ l, 100-1000 μ l) y puntas (recomendado).
- Cámara digital o teléfono móvil con cámara.
- PC con internet, programa de análisis de imágenes y programa de gráficos.
- Mortero de cocina (u otro utensilio para triturar las muestras de alimento).

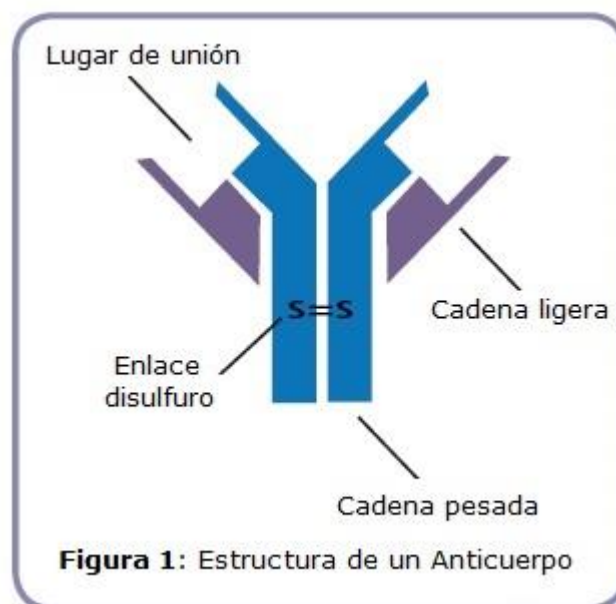
NOTA: Asegúrense que el material de vidrio esté limpio, seco y libre de residuos de jabón. Para mayor comodidad, se pueden comprar pipetas de transferencia desechables adicionales para los pasos de extracción y de lavado con líquidos.

NOTA: Las micropipetas desechables se pueden sustituir por micropipetas automáticos si es necesario.

3. INTRODUCCIÓN

Las **alergias** son una de las enfermedades más comunes del sistema inmunológico, que ocurren en hasta el 20% de las personas en los países desarrollados. Una **respuesta alérgica** se produce cuando el sistema inmunológico reacciona excesivamente a un material extraño, conocido como **antígeno** (abreviatura de generador de **anticuerpos**). Los antígenos comunes para las personas alérgicas incluyen agentes infecciosos, tales como bacterias o virus, productos químicos y diversos materiales ambientales tales como polen y alimentos. Una vez que un antígeno entra en el cuerpo, provoca que los glóbulos blancos produzcan anticuerpos, lo que conduce a una respuesta inmune rápida.

Los **anticuerpos** son proteínas especializadas que son utilizadas por el cuerpo para identificar y eliminar patógenos. Cada anticuerpo está compuesto de cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. Estas cadenas están unidas entre sí por enlaces disulfúricos para crear una forma distinta de "Y" (**Figura 1**). En cada punta de la Y hay una región altamente variable compuesta de 110-130 aminoácidos que da al anticuerpo su especificidad para la unión a antígenos. Cada molécula de anticuerpo puede unirse a dos moléculas de antígeno, una en cada punta. Esta unión neutraliza el antígeno y forma un complejo insoluble a través de un proceso conocido como inmunoprecipitación.



Todas las alergias comienzan con la sensibilización, que comienza cuando un antígeno, normalmente no peligroso, entra en el cuerpo y encuentra una célula linfocitaria (**Figura 2A**). Por razones que todavía están siendo investigadas, la célula de linfocitos registra esta partícula no dañina como una amenaza, lo que desencadena la producción de

anticuerpos de inmunoglobulina E (**IgE**) nuevos (**Figura 2B**). Los anticuerpos IgE altamente específicos se unen a las células inmunitarias, como los **mastocitos** y los **basófilos**, que circulan por todo el cuerpo (**Figura 2C**). El proceso de sensibilización puede durar entre 6-10 días. Después de la sensibilización, los anticuerpos IgE en el torrente sanguíneo pueden unirse rápidamente a su antígeno, provocando que las células inmunitarias liberen compuestos mediadores como la **histamina** y los **proteoglicanos** en el cuerpo (**Figura 2D**). Una vez que una persona se ha sensibilizado, pequeñas cantidades del antígeno pueden desencadenar una reacción alérgica completa. Los síntomas de una reacción alérgica son variados, que van desde los estornudos y picazón ojos a la **anafilaxia** (**Tabla 1**).

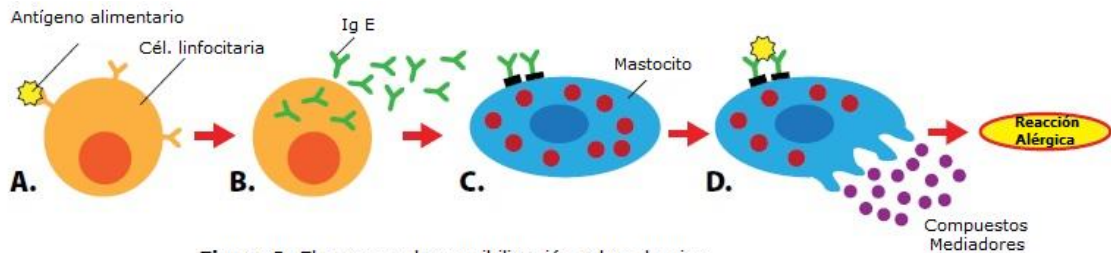


Figura 2: El proceso de sensibilización a las alergias.

Tabla 1: Síntomas potenciales de una reacción alérgica	
Reacciones inmediatas	Anafilaxia, erupción cutánea aguda, sibilancias, estornudos, congestión, tos seca, vómitos, asma aguda, hinchazón de laringe.
Reacciones diferidas	Dermatitis atópica, vómitos y diarrea, estreñimiento, crecimiento deficiente, inflamación del tracto digestivo.

La **anafilaxia** es una reacción severa de todo el cuerpo a un alérgeno. Los científicos franceses Charles Richet y Paul Portier acuñaron el término en 1902 cuando estudiaban la toxina producida por los tentáculos de la carabela portuguesa (***Physalia physalis***). Ellos aislaron la toxina para inyectarla en perros esperando obtener protección, o "**profilaxis**", contra ella. Sin embargo, se horrorizaron al descubrir que incluso pequeñas dosis de la toxina dieron como resultado el rápido comienzo de la dificultad respiratoria en los perros vacunados. Richet y Portier concluyeron con razón que la exposición inicial causó que el sistema inmune del perro se volviera hipersensibilizado a la toxina. Después de la primera exposición, la reexposición al mismo compuesto produjo una reacción severa, independientemente de la dosificación. Ellos denominaron a este estado de "anafilaxia", que significa "contra la protección".

La principal causa de anafilaxia en los seres humanos está relacionada con los alimentos que comemos. Las alergias alimentarias son un problema de salud grave y creciente que afecta a alrededor de 15 millones de personas en los Estados Unidos. Por ejemplo, la **Alergia a la Proteína de la Leche de Vaca (CMPA)** es la alergia alimentaria más común en los niños. La **CMPA** aparece cuando el sistema inmune por error ataca una o más proteínas de la leche presentes en los productos alimenticios. La respuesta inmunitaria puede ser inmediata (en minutos), diferida (dentro de horas a días), o ambas. Los síntomas comunes incluyen vómitos, sibilancias y eczema (se proporciona una lista detallada en la **Tabla 1**).

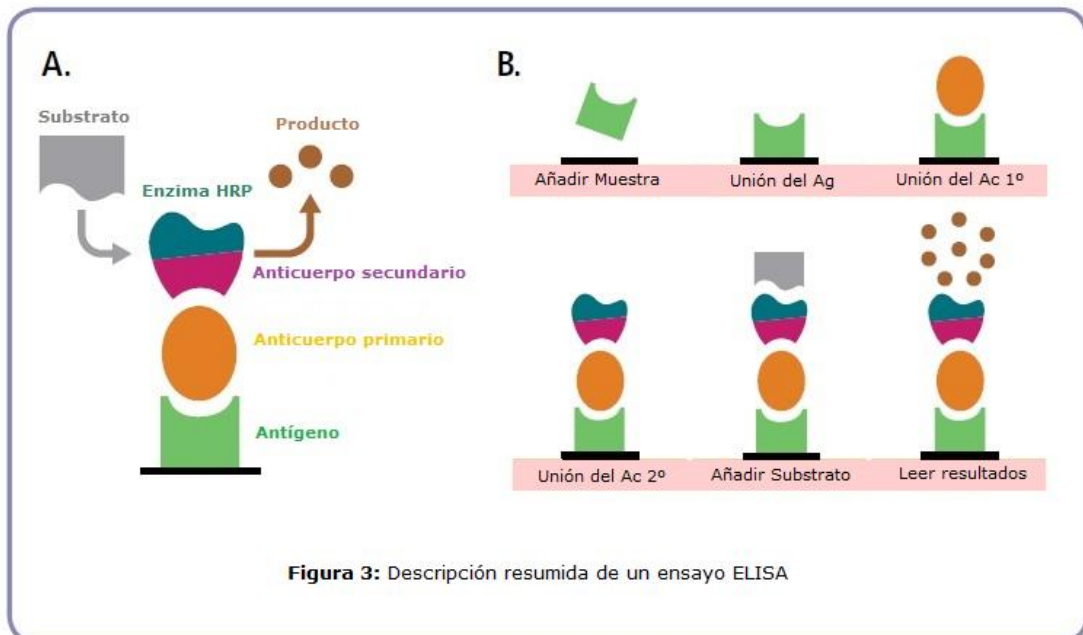
Entre el 2 y el 3% de la población general son diagnosticados de **CMPA**, aunque muchos (79%) aparecen a partir de los 16 años. Para los enfermos, el principal tratamiento es eliminar la proteína de la leche de vaca de su dieta. En general, la leche contiene un 3% de proteína, que puede clasificarse en dos categorías basadas en la presencia o ausencia del elemento fósforo. Las **caseínas** contienen fósforo y coagularán o precipitarán a un

pH de 4,6. Esta coagulación a pH reducido es la base para la formación de cuajada de queso. La mayoría de las especies de mamíferos contienen 3 o 4 proteínas de caseína diferentes, que constituyen aproximadamente el 82% de la proteína total de la leche. Todas las demás proteínas que se encuentran en la leche carecen de fósforo y se agrupan en **siero** o **proteínas del suero**. Las principales proteínas del suero en la leche de vaca son la **beta-lactoglobulina** y la **alfa-lactoalbúmina**. En conjunto, las proteínas de suero de leche comprenden el 18% restante de la proteína total de la leche.

DETECTANDO ALERGENOS ALIMENTARIOS

En 2005, la FDA comenzó a exigir a los fabricantes que etiquetaran la presencia o ausencia de ocho de los alérgenos más comunes (leche, huevos, pescado, cáscara, cacahuete, trigo, soja y nueces) en sus productos alimenticios. Este etiquetado ayuda a los consumidores a identificar y evitar los alérgenos potencialmente peligrosos. Para detectar estos alérgenos en su producto, las empresas de alimentos pueden utilizar PCR, espectrometría de masas o ensayos inmunoquímicos, aunque los ensayos inmunoquímicos tienden a ser los más populares debido a su accesibilidad y robustez. Los ensayos inmunoquímicos identifican una sustancia particular por su capacidad para unirse a un anticuerpo. Un ensayo inmunoquímico de uso común es el **Ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA)**.

Los ELISA's pueden determinar la presencia y la concentración de antígenos específicos en soluciones complejas. Para lograr esto, los ELISA se basan en la capacidad de un anticuerpo para reconocer y unirse a antígenos específicos. La mayoría de los ELISA usan dos anticuerpos diferentes: un **anticuerpo primario** que es específico del antígeno de interés y un **anticuerpo secundario** que reconoce el complejo antígeno-anticuerpo (**Figura 3A**). Este anticuerpo secundario está unido a un enzima que reacciona con un sustrato para producir una señal. Los ELISA pueden diseñarse para detectar antígenos para una gran variedad de propósitos. Por ejemplo, en la medicina se usan a menudo ELISA para determinar las concentraciones séricas de anticuerpos. Esta información ayuda a los médicos a diagnosticar infecciones virales, bacterianas y parasitarias. Los ELISA también pueden usarse para identificar organismos genéticamente modificados, rastrear el uso de drogas y confirmar el embarazo.



Los ELISA tradicionales se realizan en placas de microtitulación transparentes hechas de poliestireno o cloruro de polivinilo. La muestra a ensayar se deposita en pocillos pequeños y las proteínas presentes en la solución, incluyendo el antígeno bajo

investigación, se pegarán a la placa. Estas proteínas/antígenos se podrán unir a la placa después de corto periodo de incubación (**Figura 3B**). Después de esto los pocillos se lavan para eliminar los antígenos no absorbidos y se añade a los pocillos una solución que contiene el anticuerpo primario. Si el antígeno está presente en los pocillos entonces el anticuerpo se unirá a él y formarán un complejo antígeno-anticuerpo.

Después de un segundo lavado, se añade una solución que contiene el anticuerpo secundario unido a un enzima a los pocillos (**Figura 3B**). Este anticuerpo secundario se unirá al complejo antígeno-anticuerpos primarios. Después de una última etapa de lavado, se añade una solución de sustrato incoloro (peróxido de hidrógeno y amino salicilato). Si hay algún anticuerpo secundario unido al pozo, entonces el enzima enlazado (la peroxidasa de rábano picante (HRP)) convertirá el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno usando el salicilato de amino como donante de hidrógeno. El salicilato oxidado es marrón y se puede observar fácilmente en los pocillos que contienen el antígeno (**Figura 3B**).

Debido a que cada anticuerpo secundario puede producir muchas moléculas del sustrato convertido, los ELISA son muy sensibles, incluso a niveles extremadamente bajos de antígeno. Los ELISA pueden ser **cuantitativos**, en cuyo caso indican si está presente o no un antígeno, o **cuantitativo**, en cuyo caso también miden la concentración de antígeno. Un ELISA cuantitativo requiere que varios pozos sean utilizados como estándares. Cada patrón contendrá una solución en la que ya se conoce la concentración del antígeno de interés. Se mide la intensidad de la señal en cada pocillo y se trazan los valores de las normas para crear una curva estándar. La intensidad de las muestras desconocidas puede entonces ser comparada con la curva estándar para determinar una concentración aproximada de proteína. Los ELISA cuantitativos se utilizan en pruebas de investigación, medicina e industria.

En esta práctica, los estudiantes realizarán un ELISA para examinar la presencia de proteína de suero de leche en diversos productos alimenticios. Los estudiantes también prepararán una curva estándar que contiene cantidades conocidas de proteína de suero de leche. Esta curva estándar se utilizará para estimar la concentración de suero de leche en diferentes muestras de alimentos. Como actividad **STEM**, los estudiantes crearán una curva estándar básica con las mediciones de densidad de las imágenes obtenidas por ellos mismos. Este ejercicio permitirá a los estudiantes calcular la cantidad de suero de leche encontrado en una muestra de alimento.

4. DESCRIPCIÓN DEL EXPERIMENTO

En esta práctica los estudiantes trabajarán los conceptos y la metodología relacionada con el ensayo inmunoenzimático (**ELISA**). Los estudiantes realizarán un **ELISA** para detectar la presencia de proteína de suero de leche en diversos productos alimenticios. Se creará una curva estándar para cuantificar la concentración de suero de leche en cada muestra.

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 BOMBAS O 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

Módulo		Tiempo
I	Preparación de las muestras de alimentos	15 min
II	Detección de alérgenos por ELISA	45 min
IIIA	Análisis cualitativo de las pruebas de alérgeno	15 min
IIIB	Análisis cuantitativo de las pruebas de alérgeno	45 min

En esta sección se describen las preparaciones previas a la práctica recomendadas y el requisito de tiempo aproximado para completar cada actividad de pre-laboratorio.

Módulo 1: Preparación de muestras de alimentos

Qué hacer:	Cuándo:	Tiempo requerido:
Adquirir muestra de alimentos	Antes de la práctica	---
Dividir tiras de microtitulación	Antes de la práctica	15 min

Módulo 2: Detección de Alérgenos por ELISA

Qué hacer:	Cuándo:	Tiempo requerido:
Equilibrar un incubadora a 37°C	Día de la práctica	15 min
Preparar y alicuotar los reactivos	Hasta 24h antes de la práctica. Almacenar a 4°C	20 min
Preparar el sustrato de peroxidasa	Durante la práctica (15-30 min antes de la última incubación)	10 min

Módulo 3b: Análisis cuantitativo de pruebas de alérgenos

Qué hacer:	Cuándo:	Tiempo requerido:
Obtener una cámara digital	Antes de la práctica	---
Obtener acceso a computadoras	Antes de la práctica	---
Instalar programa de procesamiento de imágenes	Antes de la práctica	---

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

Las muestras de alimentos

Se puede probar una amplia variedad de productos lácteos (frescos, desnatados, semidesnatados, etc.) y también se puede animar a los estudiantes a que traigan sus propias muestras. Aunque los resultados variarán dependiendo de la marca utilizada, la **Tabla 2** proporciona una lista de productos sugeridos y sus resultados generales.

Tabla 2: Resultados esperados de diferentes productos lácteos	
Producto probado	Color del ELISA
Leche de vaca	Oscuro
Leche de soja	Ninguno
Bebida proteica	Claro
Crema de leche	Claro
Crema fresca	De claro a oscuro
Queso	Claro
Yogur	De claro a oscuro
Helado de leche	De claro a oscuro
Yogur desnatado	Ninguno
Helado (sin leche)	Claro
Galletas/pasteles	De ninguno a claro
Salsa para ensalada	Claro
Mantequilla	Ninguno
Turrón	Claro
Barra energética	Oscuro

Preparar las tiras de pocillos

Se proporcionan quince de tiras de pocillos en este kit. Para el experimento, cada grupo de estudiantes necesitará una tira completa (8 pocillos) para la curva estándar y una media tira (4 pocillos) para la muestra de alimentos. Para crear la tira de 4 pocillos, divida 5 tiras completas por la mitad.

Cámara digital

Para las necesidades de esta práctica se pueden utilizar casi todas las cámaras digitales, incluyendo las que se encuentran en los teléfonos móviles. Las cámaras digitales incluirán un cable USB y/o tarjetas de memoria para transferir las imágenes a los ordenadores. Si se utiliza un teléfono móvil, las imágenes se pueden enviar por correo electrónico. Se pueden utilizar muchos formatos de imagen incluyendo TIFF, GIF y JPEG.

Requisitos del ordenador para el Módulo IIIB

Para llevar a cabo el análisis cuantitativo, los estudiantes necesitarán un ordenador con software de análisis de imágenes y un programa de gráficas capaz de encontrar una curva óptima. Se pueden usar varios programas para comparar la intensidad de los doce pocillos. Recomendamos **ImageJ** (versión 1.49 o posterior). **ImageJ** es un programa de procesamiento de imágenes desarrollado en el **National Institute of Health** de EEUU. Está en un dominio público y por lo tanto se puede descargar e instalar libremente. Las

instrucciones detalladas para la descarga y el archivo apropiado de **ImageJ** para su plataforma se pueden encontrar en <http://rsb.info.nih.gov/ij/download.html>.

Para ejecutar **ImageJ**, necesitará tener Java en ejecución en el equipo. Por favor, consultar con el personal de apoyo tecnológico correspondiente a su centro para obtener ayuda. Numerosos programas de gráficos están disponibles. Alternativamente, los resultados pueden trazarse en papel semi-logarítmico y dibujar a mano una línea de tendencia lineal.

Eliminación de las muestras y lavado de los pocillos

Como alternativa a invertir las tiras para eliminar los restos de las muestras durante el Módulo II, los estudiantes pueden usar una pipeta para retirar las muestras y los tampones de lavado. En este caso, es importante cambiar las puntas o las pipetas de transferencia entre los pocillos para evitar la contaminación cruzada. Para reducir el desperdicio, las puntas o las pipetas de transferencia pueden etiquetarse y reutilizarse para el mismo pocillo en pasos futuros.

B. PREPARATIVOS EN EL DÍA DE LA PRÁCTICA

Preparaciones previas a la práctica

MÓDULOS I Y II

Preparación del Tampón de Lavado

1. AÑADIR todo el **10x ELISA Wash Buffer(A)** a 180 ml de agua destilada. Mezclar bien.
2. DISPENSAR 18 ml en vasos de precipitados pequeños para cada uno de los 10 grupos de laboratorio. **ETIQUETAR los vasos como "Tampón de Lavado"**. Reservar el tampón de dilución restante para los pasos siguientes.

Preparación de los Tampones para la preparación de las muestras

1. En un vaso/frasco de 150 ml, **DILUIR** 7 ml de ELISA Dilution Buffer(B) en 150 ml de Agua destilada.
2. **AÑADIR** 13 ml de la dilución del paso 1 en 10 pequeños vasos. **ETIQUETAR como "Tampón Dilución Alimentos"** "Food Dilution Buffer".
3. **AÑADIR** 1 ml de la dilución del paso 1 en 10 microtubos y **ETIQUETAR como "Tampón Curva Estándar"**.
4. **GUARDAR** el restante ELISA Dilution Buffer(B) para los sucesivos pasos

Preparación del Whey Antigen para la curva estándar

1. **AÑADIR** 7 ml de ELISA Dilution Buffer(B) a un tubo de 15 ml. **ETIQUETAR como "Antígeno"**.
2. Quitar el tapón del vial del Antígeno liofilizado (C) y añadir aproximadamente 0.5 ml del ELISA Dilution Buffer(B). Cerrar el vial y agitar suavemente para la disolución.
3. **AÑADIR** 250 μ l del Antígeno rehidratado al tubo de 15 ml del paso 1. **Mezclar bien**.
4. **ETIQUETAR** 10 tubos de microcentrífuga "Whey Antigen" y **DISPENSAR 200 μ l del suero diluido para cada grupo**.

Preparación del anticuerpo primario

1. **AÑADIR** 7 ml de ELISA Dilution Buffer(B) a un tubo de 15 ml. **ETIQUETAR como "Anticuerpo Primario"**.

2. Quitar el tapón del vial del Anticuerpo Primario (D) y añadir aproximadamente 0.5 ml del ELISA Dilution Buffer(B). Cerrar el vial y agitar suavemente para la disolución.

3. **AÑADIR** el total contenido del Anticuerpo primario al tubo de 15 ml del paso 1. **Mezclar bien.**

4. **ETIQUETAR** 10 tubos de microcentrífuga "Anticuerpo primario" y **DISPENSAR 700 µl del anticuerpo primario para cada grupo.**

Preparación del anticuerpo secundario

Preparar el mismo día que se necesite para el experimento

1. **AÑADIR** 7 ml de ELISA Dilution Buffer(B) a un tubo de 15 ml. **ETIQUETAR como "Anticuerpo Secundario".**

2. Quitar el tapón del vial del Anticuerpo Secundario (E) y añadir aproximadamente 0.5 ml del ELISA Dilution Buffer(B). Cerrar el vial y agitar suavemente para la disolución.

3. **AÑADIR** el total contenido del Anticuerpo Secundario al tubo de 15 ml del paso 1. **Mezclar bien.**

4. **ETIQUETAR** 10 tubos de microcentrífuga "Anticuerpo Secundario" y **DISPENSAR 700 µl del Anticuerpo Secundario para cada grupo.**

NOTA: Guardar todos los reactivos a 4°C hasta que sea necesario. Los componentes pueden prepararse hasta 24 horas antes de ser necesario.

NOTA: El volumen de la muestra del anticuerpo secundario es muy pequeño, para recoger toda la muestra en la parte inferior se puede centrifugar el tubo.

Preparación del Substrato TMB y STOP Solution

1. **DISPENSAR 700 µl** del TMS Substrate (F) en 10 microtubos y marcar como "Substrato"

2. **DISPENSAR 700 µl** del STOP Solution (G) en 10 microtubos y marcar como "Stop"

4.4 Material que debe recibir cada grupo

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

1. Para el **Módulo I**, cada grupo debe recibir:
 - Tubo cónico de 15 ml
 - 13 ml de Tampón dilución alimentos
 - 15 ml de tampón de dilución
 - Muestra/muestras de alimentos para analizar
 - 1 tubo para homogeneización (para alimentos sólidos)
2. Para el **Módulo II**, cada grupo debe recibir:
 - 1 tira de 8 pocilos y una de 4 pocillos
 - 1 ml de Tampón para la Curva Estándar
 - 1 pipeta de transferencia grande
 - Vaso vacío para residuos
 - 18 ml de tampón de lavado
 - 200 µl de Antígeno
 - 700 µl de anticuerpo primario
 - 700 µl de anticuerpos secundario
 - 700 µl de Substrato
 - 700 µl de STOP Solution
 - Micropipetas de volumen variable y puntas adecuadas.
 - Toallas de papel

3. Para el **Módulo III**, cada grupo necesita:

Acceso a un ordenador con programas de procesamiento de gráficos e imágenes.

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.

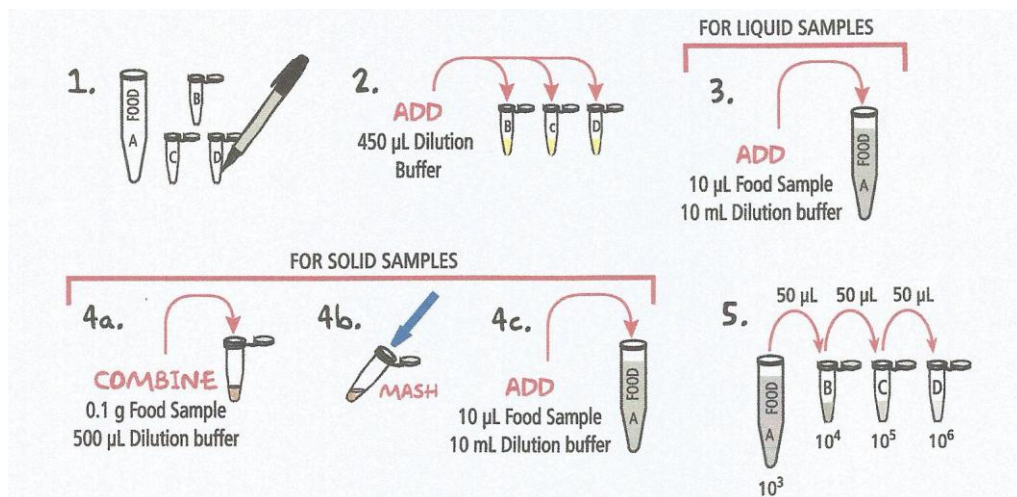
3. No intentar vaciar los pocillos de microtitulación por agitando la placa. No funcionará y provocará la contaminación de los pocillos adyacentes.

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

5. PRÁCTICA

Módulo I: Preparación de muestras de alimentos

Las muestras de alimentos deben diluirse para asegurar que las concentraciones estén dentro del rango establecido por la curva estándar. Los mejores resultados se, normalmente, se obtienen usando una dilución de 1:10 de la muestra de alimento.



1. MARCAR un tubo de 15 ml con el nombre de la muestra de alimento. También MARCAR tres tubos de microcentrifuga B, C, D para las diluciones de la muestra de alimentos.

2. **AÑADIR 450 µl** de tampón de dilución alimentos a cada tubo de microcentrifuga.

3. Para muestras LÍQUIDAS (como la leche):

a. **AÑADIR 10 µl** de una muestra de alimento líquido y 10 ml de tampón de dilución alimentos al tubo marcado de 15 ml para crear una dilución 1×10^3 . Mezclar bien. PASAR directamente al paso 6.

4. Para muestras de alimentos SÓLIDOS (como el queso):

a. **MEZCLAR 0,1 g** del alimento con 500 µl de tampón de dilución alimentos en un tubo de microcentrifuga.

b. UTILIZAR un mortero de cocina (o cualquier otro utensilio que pueda realizar su función) para triturar completamente el alimento.

- c. **AÑADIR 10 µl** de la muestra con el alimento triturado y 10 ml de tampón de dilución alimentos al tubo de 15 ml marcado para obtener una dilución 1×10^3 . Mezclar bien.

5. **AÑADIR 50 µl** de la muestra de alimento (tubo de 15 ml) al tubo A, mezclar bien. AÑADIR 50 µl de la muestra de alimento 10^4 (tubo A) al tubo B, mezclar bien. Continuar con la DILUCIÓN en serie pasando 50 µl de la muestra del tubo B al tubo C, y 50 µl de la muestra del tubo C al tubo D, siempre mezclando bien después.

6. PASAR a realizar el **Módulo II**.

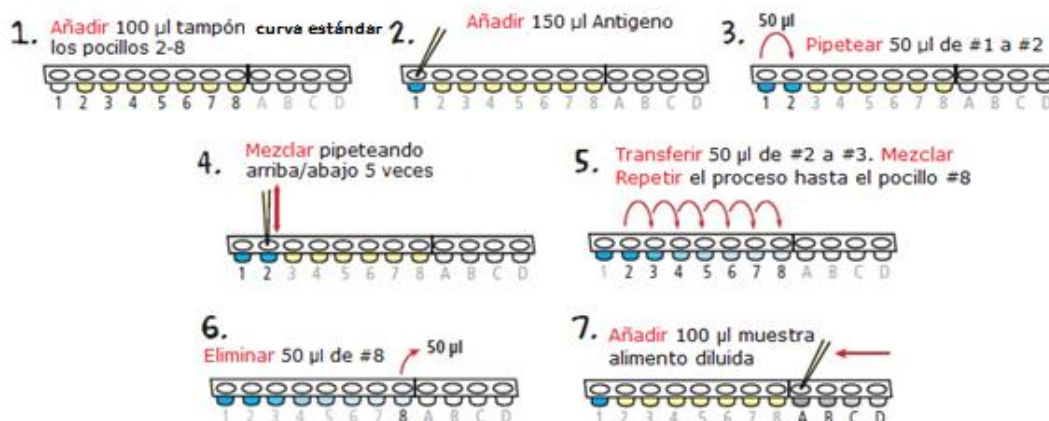
Pocillo/tubo		A	B	C	D
Concentración		$1:10^3$	$1:10^4$	$1:10^5$	$1:10^6$
Dilución	Muestra alimento	50µl tubo 15ml	50µl tubo A	50µl tubo B	50µl tubo C
	Tampón dilución	450 µl	450 µl	450 µl	450 µl

PUNTO DE PARADA OPCIONAL: El experimento puede ser detenido después del paso 6 guardando las muestras de alimentos diluidas (tubos A-D) a 4°C durante la noche. La práctica se puede reanudar al día siguiente continuando con el Módulo II.

Módulo II: Detección de Alérgenos por ELISA

Una curva estándar permite a los investigadores determinar la relación entre dos concentraciones conocidas. Para ello, realizaremos una dilución en serie de 1:3 (3 veces) de proteína de suero de leche en buffer, creando ocho muestras de concentración conocida de antígeno. Después de realizar el ELISA, estas muestras se utilizan para crear una curva estándar que establece la relación entre la concentración de suero y la intensidad de color de la muestra.

Preparación de las diluciones para la curva estándar:

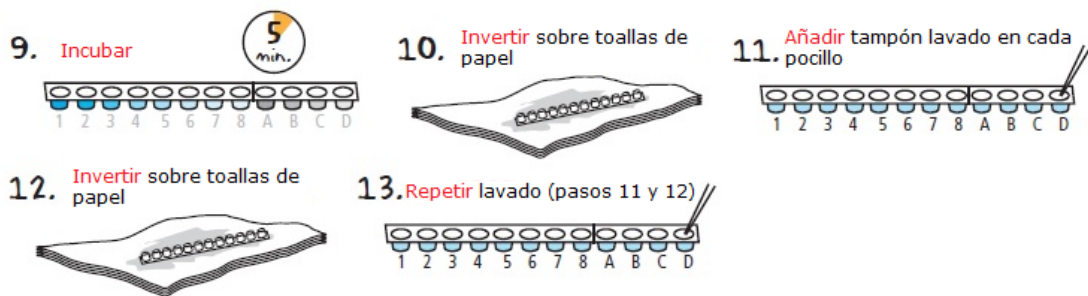


1. AÑADIR 100 µl de Tampón para la curva estándar a los pocillos 2-8 de la tira.
2. AÑADIR 150 µl de la solución de antígeno al pocillo #1. El antígeno se proporciona a una concentración de 10 µg/ml.
3. PIPETEAR 50 µl del pozo #1 en el pozo #2.
4. MEZCLAR completamente la muestra suavemente pipeteando hacia arriba y hacia abajo 5 veces.

5. Usando la misma punta de la pipeta, TRANSFERIR 50 µl del pocillo #2 en el pozo #3 y MEZCLAR como en el paso 4. Continúa DILUYENDO en serie las muestras restantes hasta llegar al pocillo #8.
6. PIPETEAR y DESECHAR 50 µl del antígeno diluido del pozo #8.
7. AÑADIR 100 µl de las muestras de alimentos diluidos (A, B, C, D) a los pocillos A, B, C y D. AÑADIR las soluciones comenzando con la más diluida (pocillo D) y finalice con la más concentrada (pocillo A) o cambiar las puntas entre cada muestra.
8. CALCULAR las concentraciones de antígeno para cada pocillo y REGISTRAR los resultados en la **Tabla 4**.

Pocillo	1	2	3	4	5	6	7	8
Dilución	--	1:3	1:9	1:27	1:81	1:243	1:729	1:2187
Procedimiento de dilución	150 µl antígeno	50 µl pocillo 1	50 µl pocillo 2	50 µl pocillo 3	50 µl pocillo 4	50 µl pocillo 5	50 µl pocillo 6	50 µl pocillo 7
	--	+100µl tampón curva	+100µl tampón curva	+100µl tampón curva	+100µl tampón curva	+100µl tampón curva	+100µl tampón curva	+100µl tampón curva
Concentración (µg/ml)	10							

Eliminación de la muestra y lavado de los pocillos:



9. INCUBAR durante 5 minutos a temperatura ambiente.

10. INVERTIR la tira de microtitulación sobre una pila de toallas de papel para retirar las muestras. SECAR la tira de microtitulación golpeándola suavemente sobre una toalla de papel nueva para quitar cualquier muestra restante. DESCARTAR las toallas de papel húmedas.

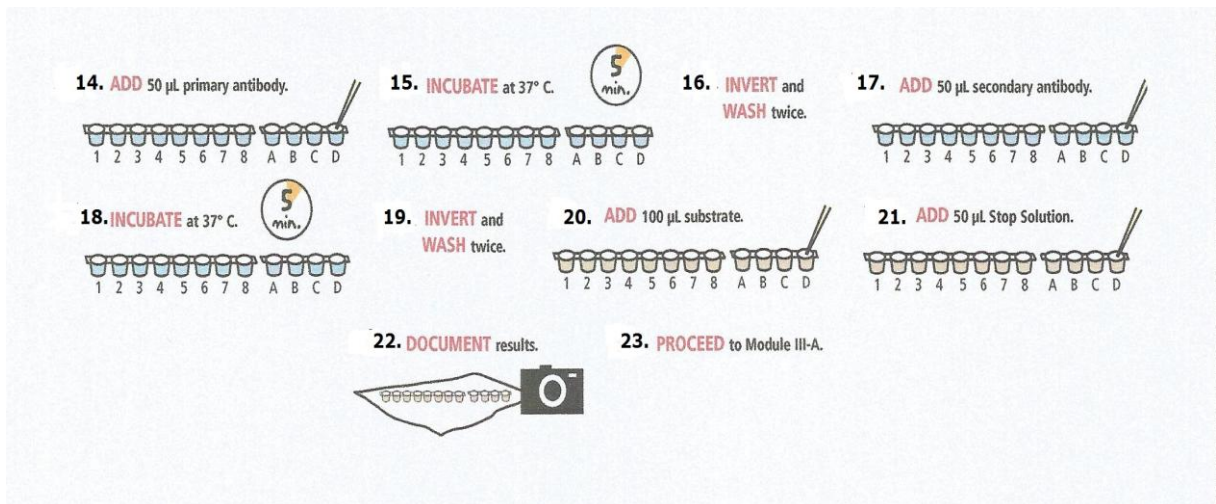
11. Usando una pipeta de transferencia, AÑADIR tampón de lavado para llenar casi cada pocillo (approx. 200 µl).

NOTA: Para minimizar la contaminación cruzada, es importante evitar que se derrame tampón en los pocillos vecinos.

12. REPETIR el paso 10 para ELIMINAR el tampón de lavado.

13. Utilizando la misma pipeta de transferencia, REPETIR los pasos 11 y 12 para lavar los pocillos.

Adición y eliminación de los anticuerpos



14. AÑADIR 50 µl de la solución de anticuerpo primario a cada pocillo.
15. INCUBAR a temperatura ambiente o 37°C durante 5 minutos.
16. LAVAR los pocillos dos veces como en los pasos 10 a 13.
17. AÑADIR 50 µl de la solución de anticuerpo secundario a cada pocillo.
18. INCUBAR a temperatura ambiente durante 37°C 5 minutos.
19. LAVAR los pocillos dos veces como en los pasos 10 a 13.

Adición del Substrato

20. AÑADIR 100 µl del sustrato TMB a los 12 pocillos.
21. Utilizando una nueva punta de micropipeta, AÑADIR 50 µl de STOP Solution a cada pocillo. Mezclar suavemente.

NOTA: La reacción enzimática puede saturarse rápidamente en pozos con una alta concentración de antígeno. Trabaje de manera rápida pero constante al agregar el sustrato TMB y proceda inmediatamente a agregar la solución de parada (paso 20).

22. DOCUMENTAR los resultados obtenidos utilizando una cámara digital para tomar una foto. COLOCAR la tira de microtitulación en una hoja de papel blanco o una caja de luz blanca puede mejorar el contraste entre los pocillos.
23. PASAR inmediatamente al **Módulo III A**.

NOTA: Es importante que la incubación no se deje proceder durante demasiado tiempo, ya que la reacción puede saturar y observarse el mismo color en todos los pocillos.

Módulo III A: Análisis Cualitativo de las Pruebas de Alérgeno

La intensidad de color de cada pocillo refleja la concentración inicial de suero. La intensidad del color se puede estimar de forma visual y se describe o se clasifica en una escala de 0 (clara) a 10 (marrón rojizo oscuro). Debido a que el ácido aminosalicílico continuará oxidándose, es importante completar los pasos 1 a 3 durante los quince minutos posteriores a completar el **Módulo II**. Alternativamente, se puede tomar una fotografía de la tira de microtitulación y examinarla posteriormente.

Módulo III B: Análisis Cuantitativo de Pruebas de Alérgeno

La intensidad del color de cada pocillo se puede determinar mediante densitometría, la medición cuantitativa de la absorción de luz. En este ELISA, la concentración inicial de suero determina cuántas moléculas de TMB se oxidan. El TMB oxidado convierte la solución en azul, lo que conduce a una mayor absorción de la luz. Por lo tanto, al medir la intensidad del color de la muestra en los ocho pocillos de concentración conocida, puede establecer una relación entre la concentración de suero y la absorción de luz. Esta relación se describe mediante la ecuación de la curva estándar. Luego puede usar la ecuación de curva estándar para estimar la concentración original de suero en el alimento elegido.

1. CALCULAR el **valor medio de gris** y la concentración de proteína de suero para los ocho pocillos de la curva estándar.

NOTA: En las imágenes digitales, cada píxel tiene un valor de luminancia o intensidad de luz que varía desde negro (intensidad cero) hasta blanco (intensidad total). En el programa **imagenJ** este valor se denomina **valor gris**. El **valor medio de gris** se calcula sumando todos los valores de gris en una selección y luego dividiéndolos por el número total de píxeles.

- a. GUARDAR la imagen digital de los resultados como archivo JPEG en el PC.
- b. ABRIR el programa **ImageJ** en el PC.
- c. IR a **Archivo>Abrir** y abrir la imagen de los resultados.
- d. IR a **Imagen>Tipo>32 bits**.
- e. IR a **Edición>Invertir**.
- f. IR a **Analizar>Ajustar mediciones** y seleccione "**valor medio de gris**".

NOTA: Las instrucciones detalladas para ImageJ se pueden encontrar en:

[Http://rsb.info.nih.gov/ij/download.html](http://rsb.info.nih.gov/ij/download.html)

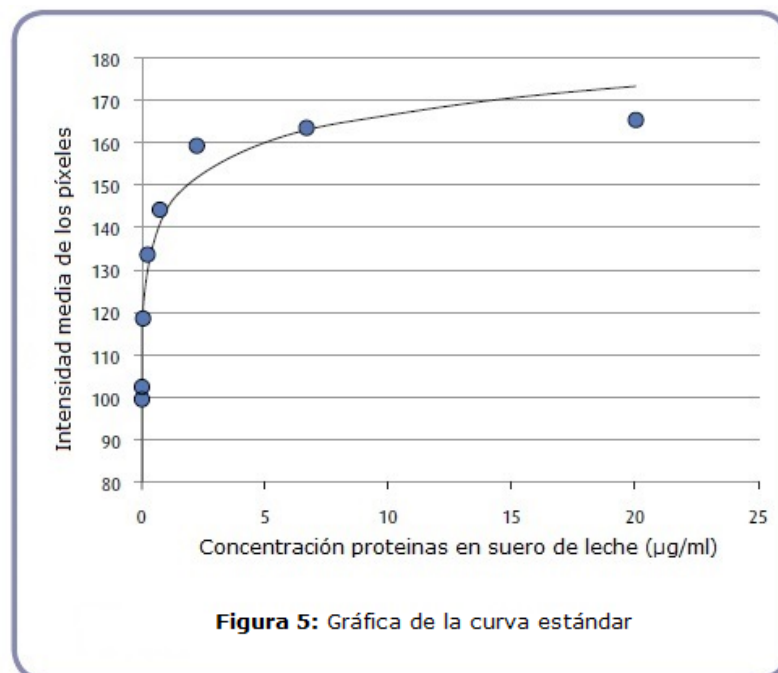
- g. ELEGIR la herramienta de selección redonda y dibujar un círculo alrededor del primer pocillo.
- h. IR a **Analizar>Medir**. Debería aparecer una nueva ventana con los resultados. REGISTRAR los resultados de "**valor medio de gris**" en su libreta de laboratorio o en la tabla siguiente.
- i. HACER clic de nuevo en la imagen digital de los resultados y utilizar el ratón o las teclas de flecha para mover el círculo al siguiente pozo. Repetir el paso h para todos los pocillos restantes.
- j. COMPLETAR la **Tabla 5** usando los **valores medios de gris** y las concentraciones de antígeno de la **Tabla 4**.

Tabla 5: Cálculos para la curva estándar y muestras de alimento diluidos			
Pocillo	Dilución	Valor medio de gris	Concentración proteína de suero de leche
1	1:1		10 µg/ml
2	1:3		
3	1:9		
4	1:27		
5	1:81		
6	1:243		
7	1:729		
8	1:2187		
A	1:10 ³		
B	1:10 ⁴		
C	1:10 ⁵		
D	1:10 ⁶		

2. CREAR una curva estándar.

- MARCAR en una gráfica la concentración de proteína de suero (eje x) en función del valor medio de gris (eje y) para cada concentración estándar.
- DIBUJAR una curva óptima a través de los puntos de la gráfica (para obtener mejores resultados sugerimos usar software gráfico). REGISTRAR la ecuación de la curva para usarla más tarde.

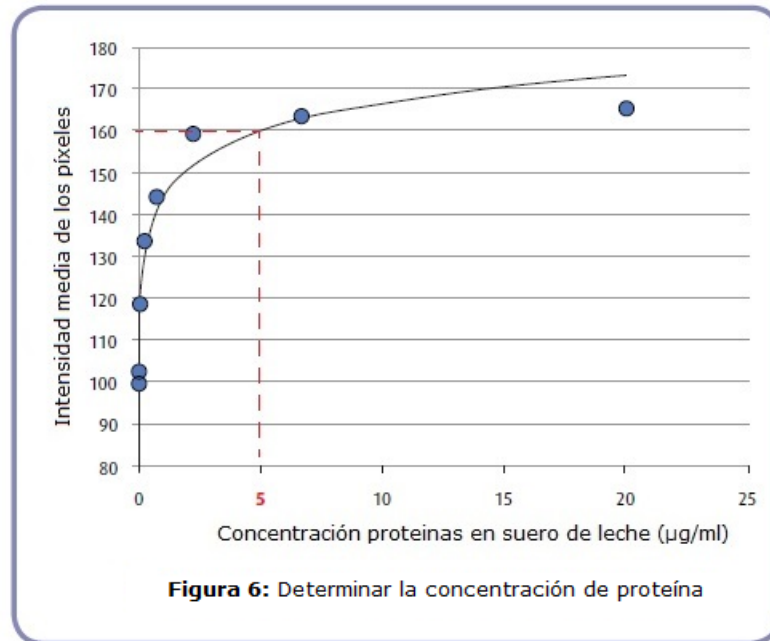
NOTA: La línea de mejor calidad puede no pasar por todos los puntos de datos.



4. Determinar la concentración de proteína objetivo en las muestras de alimentos.

- Encontrar los valores medios de gris de las muestras en los pocillos A a D como en el paso 1.
- Seleccione una muestra con un valor de intensidad que esté entre los valores máximo y mínimo de la curva estándar.

- c. Desde el eje Y del gráfico de curva estándar, extienda una línea horizontal desde este valor de absorbancia a la curva estándar. En el punto de intersección, extienda una línea vertical hacia el eje X y lea la concentración correspondiente. Alternativamente, utilice la ecuación de la mejor curva para resolver una X dado el valor de Y (véase la **Figura 6**).



6. RESULTADOS Y PREGUNTAS DE LA PRÁCTICA

6.1 Resultados

Módulo II

A continuación (**Foto 1**) se presentan los resultados de un ELISA que realizamos usando leche con vitamina D. Los resultados en los pozos A a D variarán dependiendo de qué muestras de alimentos se utilicen. Los resultados en los pocillos 1 a 8 también pueden variar dependiendo de una serie de factores, incluyendo tiempos de incubación, precisión de pipeteo y iluminación de fondo.

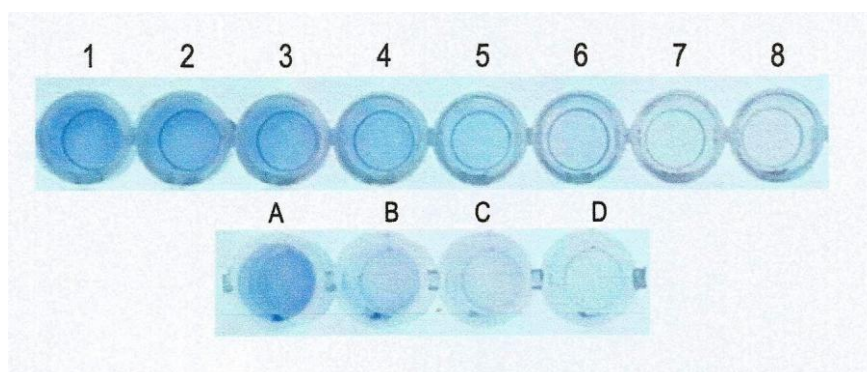


Foto 1

Módulo III-A

1. ¿Qué muestras de la curva estándar son las más oscuras? ¿Cuáles son las más ligeras? ¿Qué significa esto? ¿Cómo se relaciona la intensidad del color con las concentraciones que calculó en la Tabla 3?

El pocillo 1, que contenía la muestra de la curva estándar de suero a una concentración de $10 \mu\text{g} / \text{mL}$, es el más oscuro, mientras que el pocillo 8, que contenía la muestra de la curva estándar de suero a $0.0046 \mu\text{g} / \text{mL}$, es el más claro. Esto significa que cuanto más oscura es la reacción, mayor es la concentración de suero.

2. Observe las diluciones de la muestra de alimentos. ¿Alguno de ellos cambió de color?

Los cuatro pocillos cambiaron de color. El pocillo A mostró el mayor cambio de color, mientras que el C y D mostraron solo ligeros cambios de color.

3. ¿Alguno de los pocillos de dilución de muestras de alimentos (A a D) se parece mucho a los pocillos de la curva estándar (1 a 8)?

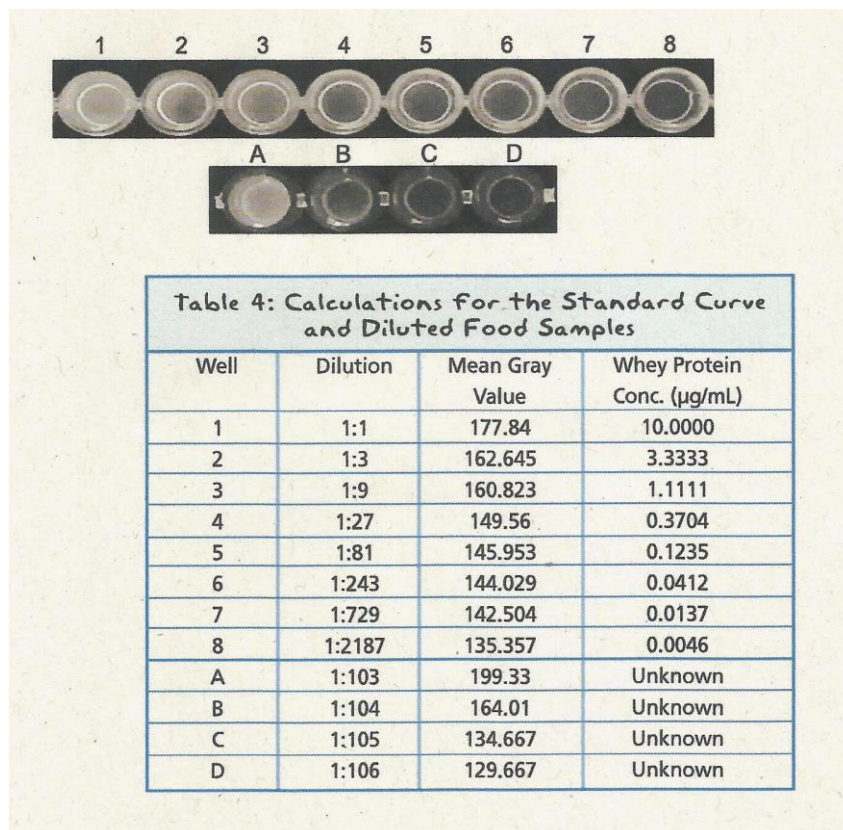
El pocillo A tiene una intensidad de color similar a los pocillos 1 y 2, el pocillo B se parece a los pocillos 5 y 6, y los pocillos C y D se parecen a los pocillos 7 y 8.

4. Con base en esta similitud, ¿puede estimar la concentración original de suero en la muestra de alimentos que se analizó? Recuerde que los pocillos A a D representan los alimentos que se han diluido.

Basado en la similitud entre el pocillo A y los pocillos 1, parecería que la concentración de alimento original tenía una concentración de suero de $10 \mu\text{g} / \text{mL} * 1000$ que equivale a $10,000 \mu\text{g} / \text{mL}$

Módulo III-B

A continuación se muestran la imagen y la tabla generadas en el paso 1.



La creación de una curva estándar de acuerdo con las instrucciones del módulo III B paso 2 dio como resultado la **Figura 7**.

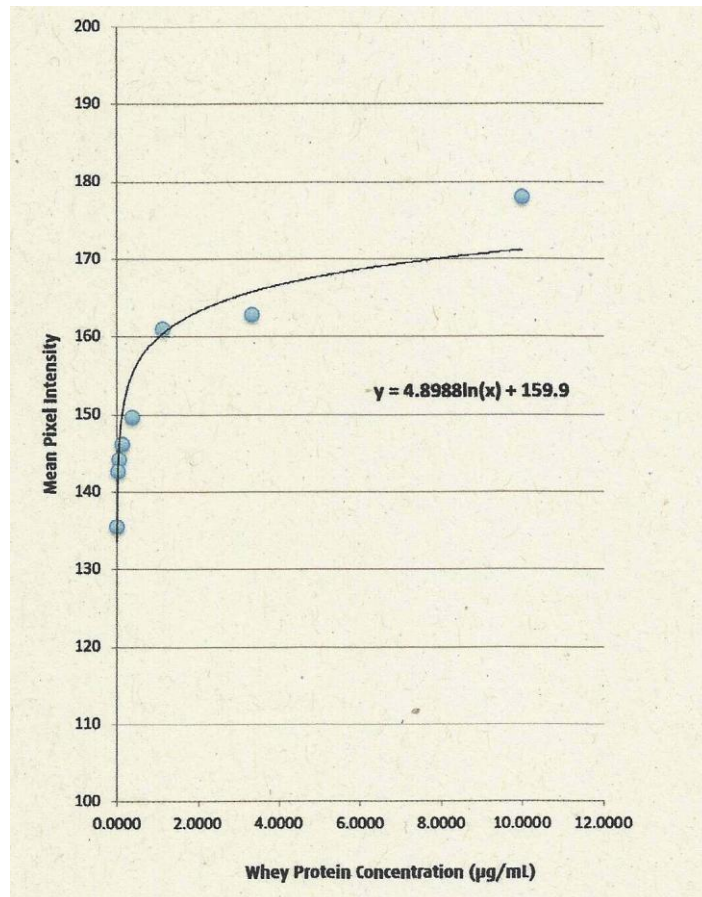


Figura 7

Para el paso 3, solo la dilución de alimentos en el pocillo B (valor de gris promedio de 164.01) cayó dentro del rango de la curva estándar. Esto se usó para calcular la concentración de suero utilizando la ecuación de línea de mejor ajuste.

Ecuación de la línea:

$$Y = 4,8988 \ln(X) + 159,90$$

Y representa el valor medio de la escala de color gris.

X representa la concentración de suero (µg/ml)

Solución para **X**:

$$164.01 = 4,8988 \ln(X) + 159,90$$

$$9,8225 \ln(X) = 4.11$$

$$\ln(X) = 0.8389$$

$$e^{\ln(X)} = e^{0.8389}$$

$$X = 2.3138$$

Finalmente, en el paso 4, el factor de dilución original (1: 10⁴) se convierte en un decimal (0.0001). El valor x de arriba (2.314) se divide por este número para calcular la concentración original de suero en la muestra de alimentos:

$$2.3138/0.0001 = 23.138 \text{ ug/ml}$$