

DETECCIÓN DEL ALZHEIMER CON ELISA

Ref.ELISA7

1.OBJETIVO DEL EXPERIMENTO

El objetivo de este experimento es introducir a los estudiantes en los principios y práctica del ELISA como herramienta para la detección de antígenos presentes en el cuerpo humano.

Los estudiantes adquirirán conocimientos básicos sobre la biología y biología molecular del cerebro y de la técnica de ELISA.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

En 1906, el psiquiatra alemán Alois Alzheimer reportó el primer caso de Alzheimer en una mujer con 50 años. La enfermedad del Alzheimer (AD) se caracteriza con una pérdida de memoria, al mismo tiempo que se ve afectada la funcionalidad neurológica. Normalmente el diagnóstico de esta enfermedad se realiza a los 65 años aproximadamente. Aunque el riesgo de padecerla aumenta con la edad.

Los primeros síntomas son problemas cognitivos, que normalmente son atribuidos al estrés o a la fatiga, como pueden ser descuidos, pérdidas puntuales de memoria, ... El diagnóstico del AD se realiza ya que los pacientes presentan una pérdida rápida de memoria, también por el historial familiar y cambios en el comportamiento de la persona que la padece.

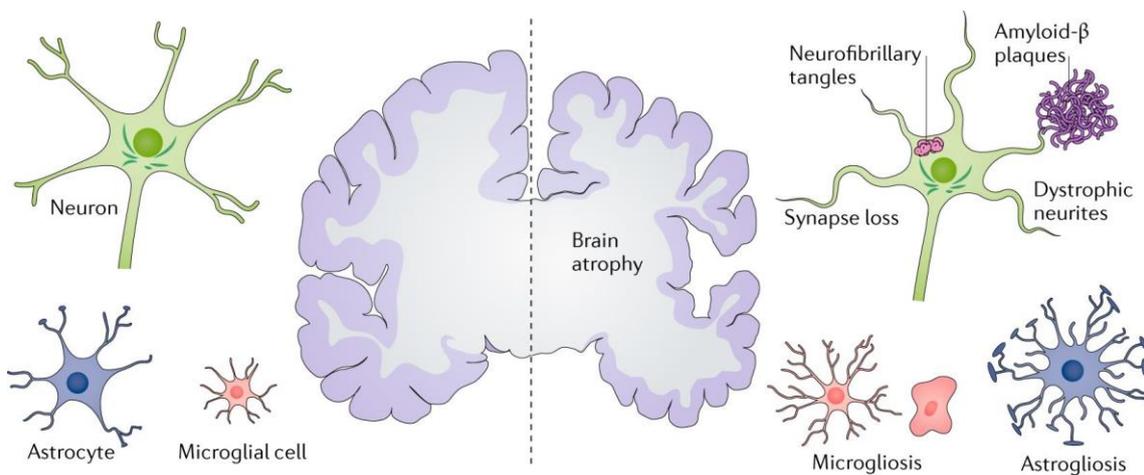
Patofisiología del Alzheimer

El cerebro está dividido en distintos lóbulos y áreas dependiendo de la localización y de la función. Los 5 lóbulos principales son el bulbo raquídeo, lóbulo parietal, cerebelo, lóbulo frontal y lóbulo temporal. El bulbo raquídeo es el responsable de la mayoría de las funciones vitales del cuerpo, es decir, control de la frecuencia cardíaca, la presión y la respiración. El lóbulo parietal es el responsable de procesar la información sensorial. El cerebelo controla la función motora y el movimiento. El lóbulo frontal es el responsable de la ejecución de las decisiones y el mayor procesador del cerebro de las vías motoras. Finalmente, el lóbulo temporal es el responsable de la memoria. Dentro del lóbulo temporal está el hipocampo que es el responsable de la formación de la memoria nueva, es decir, es el responsable de los nuevos aprendizajes y de la memoria de cosas nuevas.

Como se forma y se almacena la memoria en el cerebro es aún desconocido. Sin embargo, sí que se conocen las áreas del cerebro que están comunicadas con el hipocampo. El hipocampo envía la información en el lóbulo frontal, quien es capaz de procesar la información y dar una respuesta. El área del cerebro que comunica el lóbulo frontal con el hipocampo se llama córtex entorrinal. El córtex entorrinal es

capaz de enviar la información de forma anterógrada y retrógrada entre el hipocampo y el lóbulo frontal, haciendo de esta zona un área importante para la consolidación de la memoria. Hoy en día, se conoce que el AD empieza en la zona del córtex entorrinal y que se extiende por todo el cerebro.

¿Qué ocurre en la corteza entorrinal durante el AD? El mayor síntoma es una muerte neuronal causada por la acumulación de proteínas mutadas y mal plegadas. Hay dos proteínas que juegan un papel clave en la progresión de la enfermedad, éstas son la tau y la A β . A β es un péptido pequeño (proteína) que se forma a partir de la proteína precursora amiloide (APP). Cuando la APP es procesada por una proteasa da como resultado los péptidos A β . Los péptidos A β pueden agruparse formando placas o áreas densas de acumulación de A β . Este proceso puede inhibir el transporte proteico, la actividad mitocondrial y muchos otros procesos críticos para la célula. Por otro lado, tau es una proteína microtubular. Los microtúbulos son como las autopistas de la célula, y tau se encarga de unirse a los microtúbulos y estabilizarlos con el axón. Normalmente, tau no se encuentra fuera del axón. Sin embargo, durante la enfermedad del Alzheimer, tau se localiza en el cuerpo celular y en las dendritas. Esta incorrecta localización de tau es debido a una desregulación y las consecuencias es que se forman ovillos neurofibrilares.



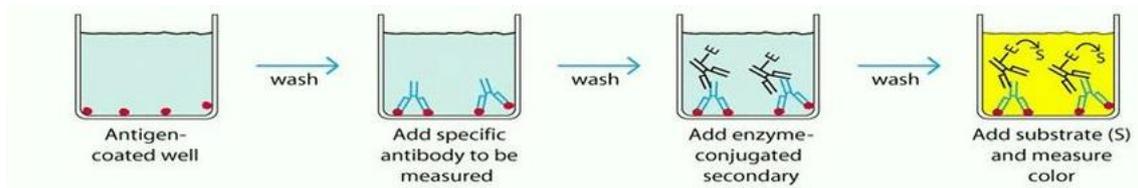
Entre las placas de A β y los ovillos de tau las neuronas están comprimidas y provoca la muerte de ellas. Las neuronas son células que no pueden regenerarse. En el momento en el que se diagnostica a una persona con la enfermedad el daño cerebral es irreversible. Es por ello que muchos científicos y grupos de investigación están trabajando en test para poder diagnosticar la enfermedad en etapas tempranas, antes de una muerte neuronal masiva. Estas placas aparecen unos 20 años antes de que la enfermedad empiece a dar la primera sintomatología.

2.2 ELISA

El ensayo por inmunoadsorción ligado a enzima (ELISA del término en inglés "Enzyme-linked immunosorbent assay test") fue originalmente desarrollado para medir la cantidad de anticuerpos en sangre. Este inmunoensayo se adaptó a la detección de proteínas en el líquido cerebroespinal dando muy buenos resultados.

En este Elisa se simulará un experimento de detección de A β en pacientes simulados a partir de muestras de líquido cerebroespinal. Primeramente, las muestras son añadidas en los pocillos donde las proteínas son adheridas por asociación hidrofóbica con las paredes del pocillo. El exceso de ellas es limpiado con un tampón. Después del lavado no resta muestra no adherida en la pared del

pocillo, los sitios no ocupados de los pocillos normalmente son ocupados por proteínas bloqueadoras, típicamente con suero bovino que satura el pocillo de proteínas.



El ensayo de ELISA requiere anticuerpos para poder visualizar la proteína de interés. Los anticuerpos son proteínas especializadas que permite al sistema inmune distinguir entre propias y no propias. El ELISA tradicional requiere dos anticuerpos, el anticuerpo primario reconoce la proteína de interés, mientras que el anticuerpo secundario reconoce al anticuerpo primario. El anticuerpo secundario va unido covalentemente a la enzima peroxidasa de rábano picante que nos permitirá detectar la presencia de la unión del complejo antígeno-anticuerpo.

3. EXPOSICIÓN DE LOS HECHOS

En este experimento se testarán muestras simuladas de líquido cerebrospinal de pacientes con Alzheimer y pacientes sanos. Para testar estas muestras se usará la técnica de ELISA.

4. COMPONENTES

10x ELISA Buffer de Lavado	Conservar a 4°C
ELISA Buffer de Dilución	Conservar a 4°C
Antígeno (liofilizado)	Conservar a 4°C
Anticuerpo primario (liofilizado)	Conservar a 4°C
Anticuerpo secundario (liofilizado)	Conservar a 4°C
Sustrato TMB	Conservar a 4°C
Solución de Stop	Conservar a 4°C
Pipetas de transferencia	Temperatura ambiente
Tiras de 10 pocillos	Temperatura ambiente
Tubos de plásticos de 15 ml	Temperatura ambiente
Tubos de 1,5 ml	Temperatura ambiente

Manual de preparación de los reactivos y muestras en el anexo 1.

5. PRÁCTICA

Se realizarán 5 grupos de trabajo.

5.1 PREPARACIÓN DE LA CURVA ESTÁNDAR

1. Coger dos tiras de 12 pocillos de tubos. Marcar cada uno de los pocillos del 1 al 12 en una tira, y del 13 al 24 en la otra. (Rotular en la pared de los pocillos todos por el mismo lado)
2. Añadir 50 μ l del Buffer de dilución en los pocillos del 2 al 12.
3. Añadir 100 μ l del antígeno (tubo marcado como AB) en el pocillo 1. La concentración del antígeno es de 100 μ g/ml

4. Pipetear 50 μ l del pocillo 1 al 2.
5. Mezclar unas 5 veces con la pipeta.
6. Con la misma pipeta, coger 50 μ l del pocillo 2 y colocarlos en el pocillo 3.
7. Repetir el paso 5.
8. Continuar el proceso de dilución seriada hasta el pocillo 12, cogiendo 50 μ l del pocillo anterior y mezclando con el siguiente.
9. Coger 50 μ l del pocillo 12 (que al final del proceso tendrá 100 μ l) y descartarlos.

5.2 PREPARACIÓN DEL CONTROL Y LAS MUESTRAS DE LOS PACIENTES

1. Añadir 50 μ l del control positivo en los pocillos 13-15.
2. Añadir 50 μ l del control negativo en los pocillos 16-18.
3. Añadir 50 μ l del control del paciente en los pocillos 19-21.
4. Añadir 50 μ l del paciente en los pocillos 22-24.

Recordar: cambiar la punta de la pipeta entre los distintos pasos.

Incubar las dos tiras de 12 pocillos durante 5 min a temperatura ambiente.

5.3 LAVADO DE LOS POCILLOS

1. Invertir las dos tiras de los pocillos encima de un papel absorbente o de un recipiente donde poder descartar líquidos. (Importante: hacerlo con fuerza para que todo el líquido de los pocillos salga). Recomendamos usar un recipiente rectangular o cuadrado donde descartar los líquidos, ya que es más cómodo que con el papel absorbente y hay menor probabilidad de contaminación entre pocillos.
2. Añadir 200 μ l de Buffer de Lavado en cada uno de los pocillos.
3. Eliminar el Buffer de Lavado, dando la vuelta a las dos tiras tal y como se ha realizado en el punto 1.
4. Añadir otra vez 200 μ l de Buffer de Lavador e invertir para eliminar el buffer igual que en el punto 1.

5.4 ADDICIÓN DEL ANTICUERPO PRIMARIO Y SECUNDARIO

1. Añadir 50 μ l del anticuerpo primario (tubo de 1,5ml rotulado con el nombre de 1AB) en cada uno de los pocillos.
2. Incubar durante 5 min a temperatura ambiente.
3. Invertir las dos tiras sobre un papel absorbente o un recipiente, al igual que en el punto 1 del lavado de los pocillos.
4. Lavar los pocillos repitiendo los pasos del 2 al 4 del apartado lavado de pocillos (añadir 200 μ l de Buffer de lavado en cada uno de los pocillos y removerlo dando la vuelta a las tiras, realizarlo dos veces).
5. Añadir 50 μ l de anticuerpo secundario (tubo de 1,5 ml rotulado con el nombre de 2AB) en cada uno de los pocillos.
6. Incubar durante 5 min a temperatura ambiente.
7. Repetir el paso 3 y 4 de este apartado.

5.5 ADDICIÓN DEL SUSTRATO

1. Añadir 50 μ l de sustrato (tubo de 1,5 ml rotulado con el nombre de sustrato) en cada uno de los pocillos.
2. Incubar a temperatura ambiente durante 5 min, si bien a los 5 min aún se ve cambio en la coloración de los pocillos, esperar hasta que se estabilice la coloración en cada uno de los pocillos.

3. Añadir 50 µl de Solución de Parada (tubo de 1,5 ml rotulado con el nombre de stop) en cada uno de ellos.
4. Analizar la coloración de los distintos pocillos.

6. RESULTADOS

Observar la coloración de las distintas reacciones, sobre todo observar que los controles positivos y negativos están correctos. Para ello, en el control positivo se tendrá que observar una coloración parecida a la del pocillo 1 de la curva patrón, mientras que el control negativo no deberá tener coloración, es decir, será transparente. Además, observar que los triplicados realizados presentan una coloración similar.

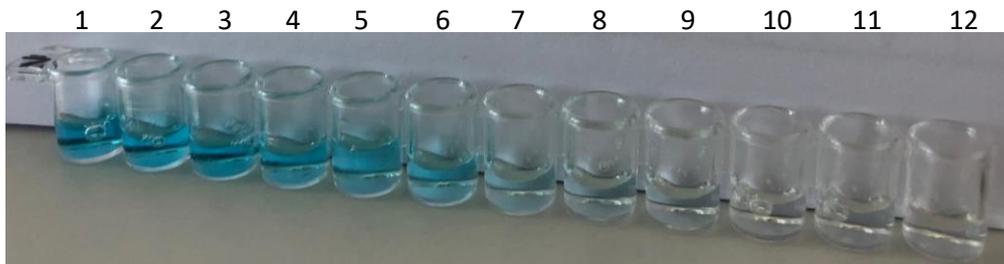


Imagen 1. Curva patrón

Además, a partir de la curva patrón estimar las concentraciones del control positivo y del paciente AD, es decir, observar los pocillos del 19-24.

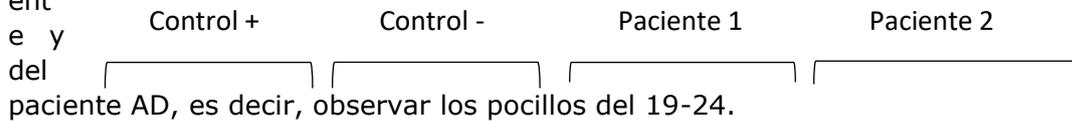


Imagen 2. Controles y muestras de pacientes

Para ello realizar los cálculos que corresponden a cada una de las diluciones realizadas a partir de la muestra madre. Para ello tener las concentraciones más claras para comparar con la curva patrón, rellenar la siguiente tabla

TABLA DILUCIONES Y CONCENTRACIONES						
Pocillo	1	2	3	4	5	6
Dilución	--					
Concentración	100 µg/ml					
Pocillo	7	8	9	10	11	12

Dilución						
Concentración						

Para que resulte más fácil de recoger los resultados, rellenar la siguiente tabla:

TABLA DE IDENTIFICACIÓN DE MUESTRAS DE PACIENTES						
Pocillos	13	14	15	16	17	18
Muestra	Control positivo			Control negativo		
Concentración						
Pocillos	19	20	21	22	23	24
Muestra	Paciente Control			Paciente AD		
Concentración						

7. PREGUNTAS Y RESPUESTAS SOBRE LA PRÁCTICA

Una serie de preguntas se pueden realizar a los alumnos sobre la práctica:

1. **¿Cuál de las dos muestras pacientes control o pacientes AD presentan más A β en su líquido cefalorraquídeo?**
2. **Busca una hipótesis que pueda explicar los resultados obtenidos en el experimento.**
3. **Si tu eres un investigador de biomarcadores de Alzheimer, ¿Cuál sería el siguiente marcador que testar?**

Para cualquier duda o consulta adicional, por favor, contacte con nosotros info@bioted.es

Anexo 1. Manual preparación de los reactivos y muestras

Manual para la preparación de los reactivos y muestras, solamente para los profesores. La duración de la preparación es de 30 minutos. Pueden prepararse todo el día de antes de la práctica o justo antes de empezar la clase. Si se prepara con antelación guardar todo a 4°C.

Preparación del Tampón de Lavado 1x Elisa

1. Añadir 525ml de agua destilada al componente A (10x Tampón de lavado ELISA) y mezclarlo bien. Rotularlo como 1x Tampón de lavado.
2. Dispensar 55ml en cada uno de los tubos de 60ml o bien en un vaso de precipitados por cada grupo y etiquetarlo como tampón de lavado.

Preparación del Tampón de dilución

1. Dispensar 1 ml de Tampón de dilución ELISA (componente B) dentro de 10 microtubos y etiquetarlo como tampón de dilución.

Preparación del antígeno

1. Transferir 7 ml de tampón de dilución de ELISA (componente B) en un tubo cónico de 15ml y etiquetarlo como AB.
2. Añadir 0,5ml de tampón de dilución etiquetado como AB en el tubo del componente C (vial antígeno) y remuévelo bien.
3. Transferir todo el contenido dentro del tubo de 15ml AB.
4. Etiquetar 10 microtubos con el nombre AB y dispensar 0,15ml en cada uno.

Preparación del control negativo y positivo

1. Etiquetar 10 microtubos con el nombre de control + y dispensar 175 µl de AB en cada uno.
2. Etiquetar 10 microtubos con el nombre de control - y dispensar 175 µl de tampón de dilución ELISA (componente B)

Preparación de las muestras de pacientes

Muestras del paciente control

- Mezclar 2ml de AB con 500 µl de tampón de dilución ELISA en un tubo de 15ml. Etiquetar 10 microtubos con el nombre de control y dispensar 175 µl a cada tubo.

Muestras del paciente con Alzheimer

- Mezclar 3,7 ml de tampón de dilución ELISA (componente B) y 100 µl de AB en un tubo de 15ml. Etiquetar 10 microtubos con el nombre de paciente y añadir 175 µl en cada uno de ellos.

Preparación del anticuerpo primario

1. Transferir 14 ml de tampón de dilución de ELISA (componente B) en un tubo cónico de 15 ml y etiquetarlo como "1ºAB".
2. Retirar con cuidado el tapón del vial del anticuerpo primario (componente D). Transferir 0,5 ml del tubo cónico 1ºAB al vial. Cerrar el vial y agitarlo suavemente para mezclarlo.
3. Transferir todo el contenido del anticuerpo primario reconstituido al tubo de 15 ml del paso 1. Mezclarlo bien.

- Etiquetar 10 microtubos con el nombre 1ºAB y dispensar 1,3 ml en cada uno.

Preparación del anticuerpo secundario

- Transferir 14 ml de tampón de dilución de ELISA (componente B) en un tubo cónico de 15 ml y etiquetarlo como "2ºAB".
- Retirar con cuidado el tapón del vial del anticuerpo primario (componente E). Transferir 0,5 ml del tubo cónico 2ºAB al vial. Cerrar el vial y agitarlo suavemente para mezclarlo.
- Transferir todo el contenido del anticuerpo primario reconstituido al tubo de 15 ml del paso 1. Mezclarlo bien.
- Etiquetar 10 microtubos con el nombre 2ºAB y dispensar 1,3 ml en cada uno.

Preparación del sustrato TMB

- Dispensar 1,3 ml del sustrato TMB (componente F) en 10 microtubos. Etiquetar los 10 microtubos como "Sustrato".

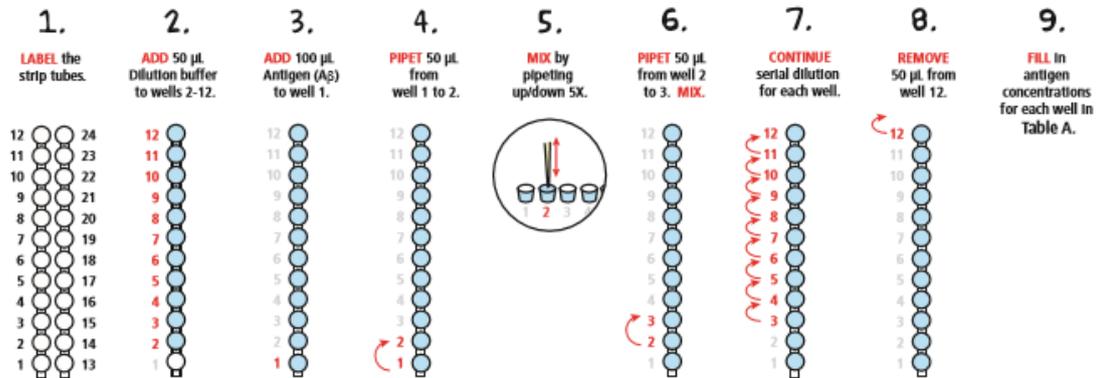
Preparación de la solución de parada

- Dispensar 1,3 ml de solución de parada (componente G) en 10 microtubos. Etiquetar los 10 microtubos como "Stop".

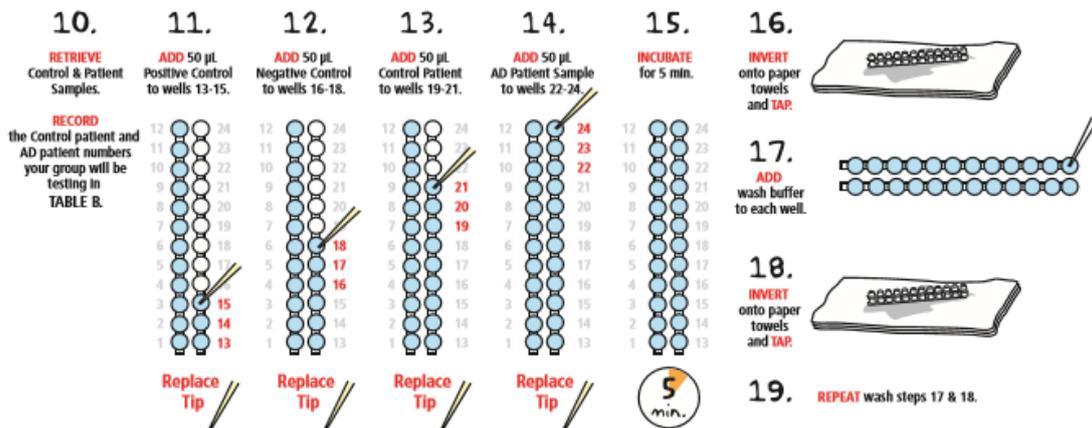
Cada grupo de laboratorio debe recibir:

2	Tubos de tiras de 12 pocillos
1	Vaso de precipitados de tampón de lavado (55 ml)
1	Tubo de tampón de dilución (1 ml)
1	Tubo de antígeno (120 µl)
1	Tubo de control positivo (175 µl)
1	Tubo de control negativo (175 µl)
1	Tubo de muestra del primer paciente (175 µl)
1	Tubo de muestra del segundo paciente (175 µl)
1	Tubo de anticuerpo primario (1,3 ml)
1	Tubo de anticuerpo secundario (1,3 ml)
1	Tubo de sustrato (1,3 ml)
1	Tubo de solución de parada (1,3 ml)
1	Pipeta de transferencia
1	Vaso de precipitados vacío para residuos

Anexo 2. Esquema de la práctica



Preparación curva patrón



Preparación muestras y lavados

Incubación anticuerpo primario y secundario, y sustrato

