

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

10 grupos de estudiantes

1. OBJETIVO DEL EXPERIMENTO

En este experimento los estudiantes estudiarán los conceptos y la metodología detrás del ensayo inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Los estudiantes realizarán un ELISA para detectar la presencia de proteína de suero en varios productos alimenticios. Se creará una curva estándar para cuantificar la concentración de suero en cada muestra.

2. COMPONENTES para 10 grupos de estudiantes

Componentes del experimento

Componente		Almacenamiento
A	Tampón de lavado ELISA 10x	Nevera
B	Tampón de dilución ELISA	Nevera
C	Antígeno de suero (liofilizado)	Nevera
D	Anticuerpo Anti-Suero (liofilizado)	Nevera
E	Anticuerpo secundario (liofilizado)	Nevera
F	Sustrato TMB	Nevera
G	Solución de parada	Nevera

Guardar los componentes detallados a continuación a temperatura ambiente:

- Tira de tubos (8 pocillos)
- Tubos de microcentrífuga con tapa a presión
- Majas de homogeneización con tubos
- Tubos cónicos de 15 ml
- Pipetas de transferencia

NOTA: Tras la recepción, almacene los componentes perecederos (A-G) 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

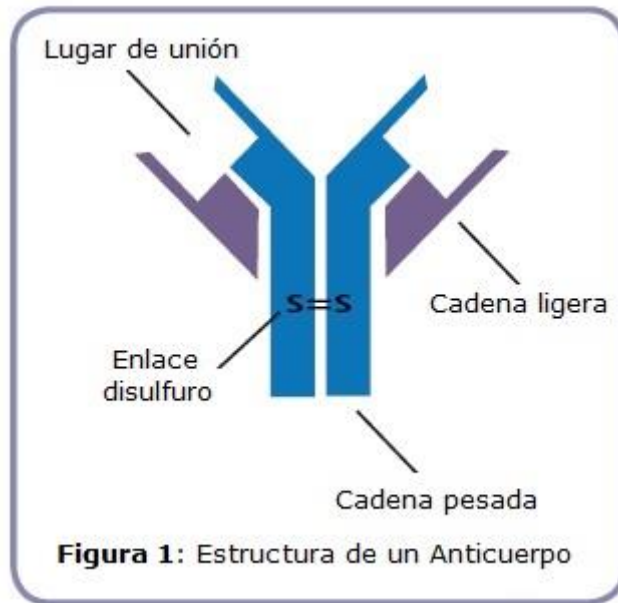
- Varias muestras de alimentos para analizar
- Agua destilada o desionizada
- Vasos o matraces
- Toallas de papel
- Guantes de laboratorio desechables
- Gafas protectoras
- Micropipetas automáticas (5-50 μL , 100-1000 μL) y puntas
- Cámara digital o teléfono celular con cámara
- Computadoras con Internet, programa de análisis de imágenes y programa de gráficos

NOTA: Las pipetas de transferencia desechables se pueden sustituir por micropipetas automáticas 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**).

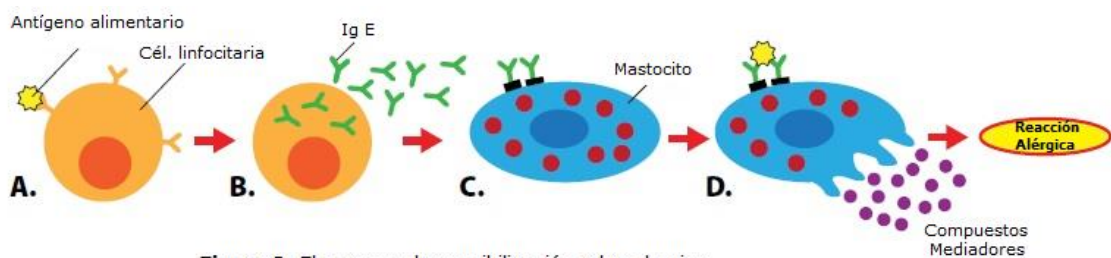


Tabla 1: Síntomas potenciales de una reacción alérgica	
Reacciones inmediatas	Anafilaxia, erupción cutánea aguda, sibilancias, estornudos, congestión, tos seca, vómitos, asma aguda, hinchazón de laringe.
Reacciones diferidas	Dermatitis atópica, vómitos y diarrea, estreñimiento, crecimiento deficiente,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

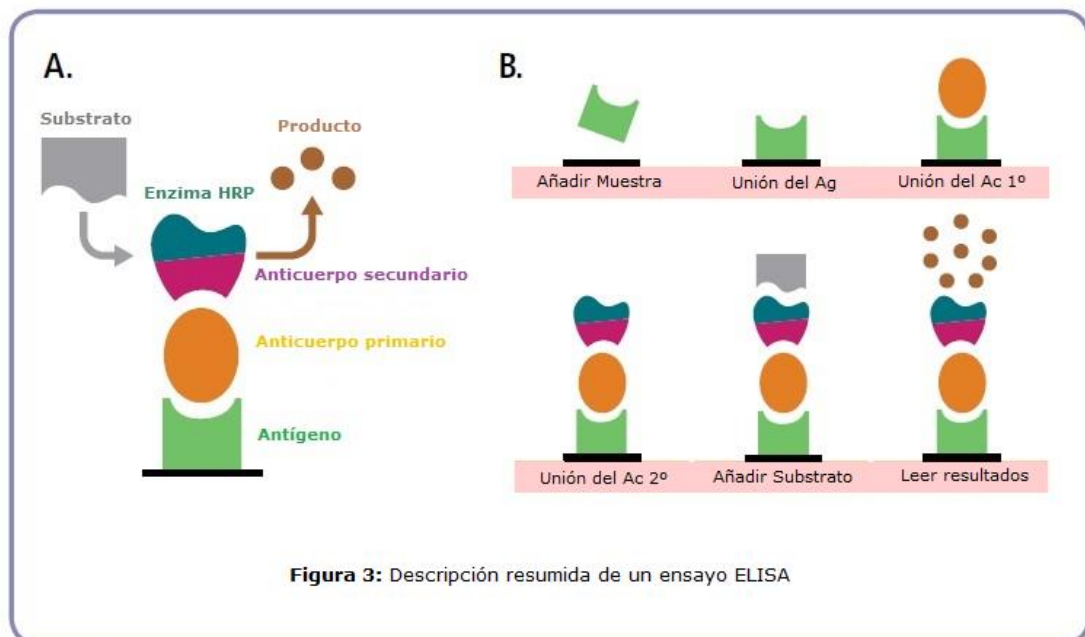
Entre el 2 y el 3% de la población general son diagnosticados de **CMPA**, aunque muchos (79%) aparecen a partir de los 16 años. Para los enfermos, el principal tratamiento es eliminar la proteína de la leche de vaca de su dieta. En general, la leche contiene un 3% de proteína, que puede clasificarse 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 **suero 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 **cualitativos**, 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 este experimento los estudiantes estudiarán los conceptos y la metodología detrás del ensayo inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Los estudiantes realizarán un ELISA para detectar la presencia de proteína de suero en varios productos alimenticios. Se creará una curva estándar para cuantificar la concentración de suero en cada muestra.

4.1 SEGURIDAD DE LABORATORIO

1. Se deben usar guantes y gafas de forma rutinaria como buena práctica de laboratorio.
2. Siempre se deben lavar bien las manos con agua y jabón después de manipular materiales contaminados.

4.2 LIBRETAS DE LABORATORIO:

Los científicos documentan todo lo que sucede durante un experimento, incluidas las condiciones experimentales, los pensamientos y las observaciones durante la realización del experimento y, por supuesto, cualquier dato recopilado. El experimento realizado en esta práctica se documentará en un cuaderno de laboratorio o en una hoja de trabajo separada.

Antes de iniciar el Experimento:

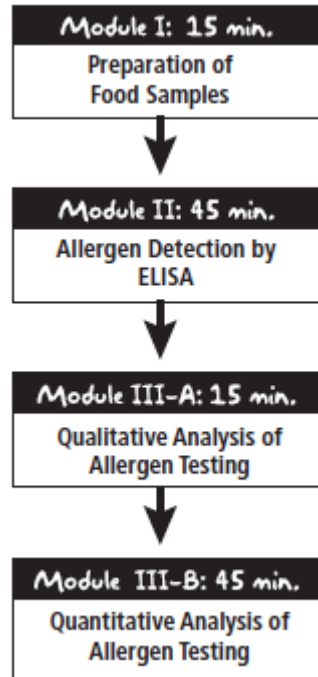
- Leer atentamente la introducción y el protocolo. Utilizar esta información para formular una hipótesis de trabajo para este experimento.
- Predecir los resultados del experimento.

Durante el Experimento:

- Registrar las observaciones.

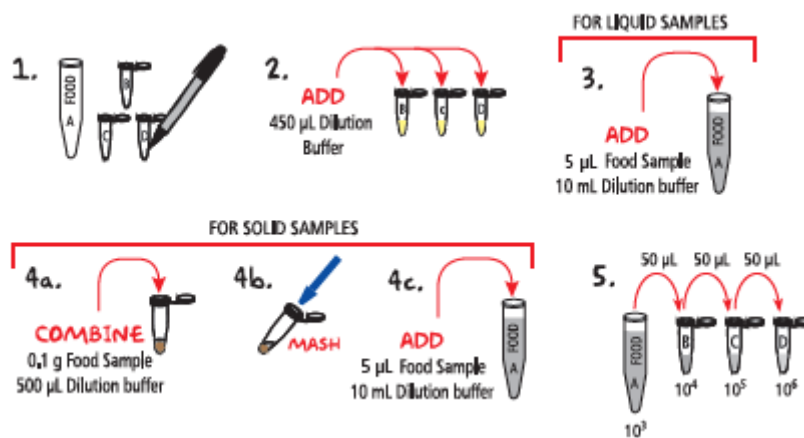
Después del Experimento:

- Interpretar los resultados: ¿los datos obtenidos respaldan o contradicen la hipótesis de trabajo?
- Si se repitiera este experimento, ¿qué cambio propondría? Revisar la hipótesis de trabajo para reflejar este cambio.



4.3 Módulo I: Preparación de Muestras de Alimentos

En este módulo, se preparará y diluirá las muestras de alimentos. La creación de una dilución en serie garantiza que al menos una concentración de alimento analizada esté dentro del rango de concentración descrito por la curva estándar.



1. ETIQUETAR un tubo de 15 mL con el nombre de la muestra de alimento y la letra "A". ETIQUETAR también tres tubos de microcentrífuga B, C y D para las diluciones de muestras de alimentos.
2. AGREGAR 450 µL de tampón de dilución de alimentos a cada tubo de microcentrífuga.
3. Para muestras LÍQUIDAS (como la leche):
 - a. AGREGAR 5 µL de muestra de alimento líquido y 10 mL de tampón de dilución de alimentos al tubo etiquetado de 15 mL para crear una dilución de 1×10^3 . Mezclar bien. PROCEDER directamente al paso 5.
4. Para muestras de alimentos SÓLIDOS (como el queso):
 - a. MEZCLAR 0,1 g del alimento con 500 µL de tampón de dilución de alimentos en un tubo de microcentrífuga.
 - b. Usar una mano de mortero para MACHACAR completamente los alimentos.

- c. AGREGAR 5 μL de la solución de muestra de alimentos triturados y 10 mL de tampón de dilución de alimentos al tubo etiquetado de 15 mL para crear una dilución de 1×10^3 . Mezclar bien.
5. Preparar una dilución en serie de la muestra de alimentos. AGREGAR 50 μL de la muestra de alimento 10^3 (tubo A) al tubo B, MEZCLAR bien. AGREGAR 50 μL de la muestra de alimento 10^4 (tubo B) al tubo C, MEZCLAR bien. AGREGAR 50 μL de la muestra de alimento 10^5 (tubo C) al tubo D, MEZCLAR bien.
6. CONTINUAR con el Módulo II.

Table 2: Food Product Dilutions and Concentrations				
Well	A	B	C	D
Concentration	$1:10^3$	$1:10^4$	$1:10^5$	$1:10^6$
Dilution	Food sample dilution prepared in step 3 or 4	50 μL of $1:10^3$ (A) sample + 450 μL food dilution buffer	50 μL of $1:10^4$ (B) sample + 450 μL food dilution buffer	50 μL of $1:10^5$ (C) sample + 450 μL food dilution buffer

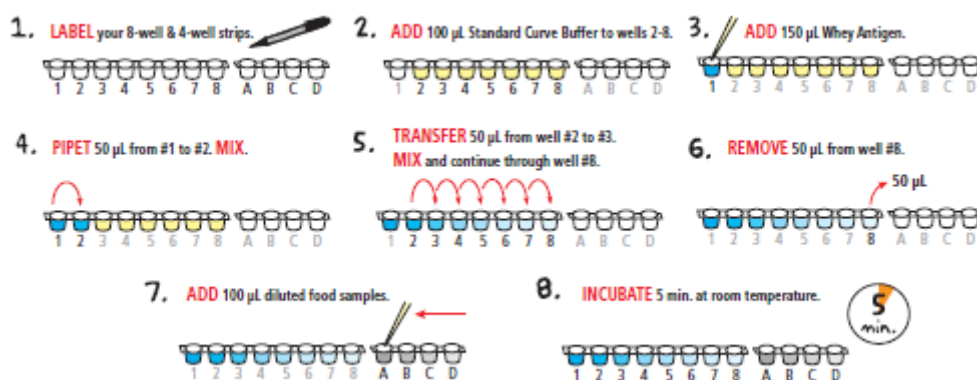
PUNTO DE PARADA OPCIONAL:

La práctica puede detenerse después del paso 5 colocando las muestras de alimentos diluidos (tubos A-D) en almacenamiento durante la noche a 4°C . La práctica puede reanudarse al día siguiente continuando con el Módulo II.

4.4 Módulo II: Detección de Alérgenos por ELISA

En este módulo, se realizará una dilución en serie 1:3 (3 veces) de proteína de suero de leche para crear una curva estándar de ocho concentraciones de antígeno conocidas. A continuación, se realizará un ELISA tanto en las muestras de alimentos diluidos como en las muestras de la curva estándar.

Preparación de la curva estándar y carga de muestras de alimentos diluidos:

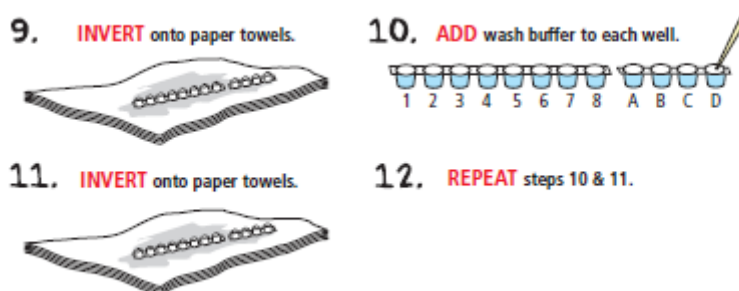


1. Usando un marcador de punta fina, ETIQUETAR los pocillos de la tira de 8 pozos 1-8 y los pocillos de la tira de 4 pozos A-D.
2. AGREGAR 100 μL de tampón de curva estándar a los pocillos 2-8.
3. AGREGAR 150 μL de la solución de antígeno de suero de leche al pocillo nº1. El antígeno se proporciona a una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$.
4. PIPETEAR 50 μL del pocillo nº 1 al pocillo nº 2 y MEZCLAR la muestra pipeteando suavemente hacia arriba y hacia abajo 5 veces.
5. Con la misma punta de pipeta, TRANSFERIR 50 μL del pocillo nº 2 al pocillo nº 3 y MEZCLAR. A continuación, continuar DILUYENDO en serie las muestras restantes hasta el pocillo nº 8 de acuerdo con la tabla 3.

6. RETIRAR y DESECHAR 50 μL del antígeno diluido del pocillo n°8.
7. AGREGAR 100 μL de las muestras de alimentos diluidas (A, B, C, D) a los pozos A, B, C y D. Agregar las soluciones comenzando con la muestra más diluida (pozo D) y terminando con la muestra más concentrada (pocillo A) o cambiar las puntas entre cada muestra.
8. INCUBAR las tiras durante 5 minutos a temperatura ambiente. Mientras está incubando, CALCULAR las concentraciones de antígeno para los pocillos 1 a 8 y ANOTAR las respuestas en la Tabla 3.

Table 3: Standard Dilutions and Concentrations								
Well	1	2	3	4	5	6	7	8
Dilution	---	1:3	1:9	1:27	1:81	1:243	1:729	1:2187
Dilution Procedure	150 μL of whey antigen	50 μL of well 1 into 100 μL standard curve buffer	50 μL of well 2 into 100 μL standard curve buffer	50 μL of well 3 into 100 μL standard curve buffer	50 μL of well 4 into 100 μL standard curve buffer	50 μL of well 5 into 100 μL standard curve buffer	50 μL of well 6 into 100 μL standard curve buffer	50 μL of well 7 into 100 μL standard curve buffer
Concentration	10 $\mu\text{g/mL}$							

Eliminación de muestras y lavado de pocillos:

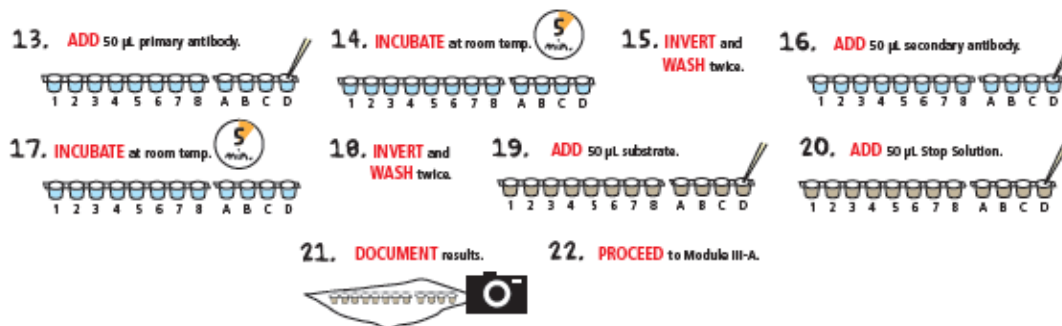


9. INVERTIR las tiras sobre el fregadero o una pila de toallas de papel para eliminar las muestras. Golpear suavemente las tiras 4-5 veces sobre una toalla de papel nueva. DESECHAR las toallas de papel mojadas.
10. Con una pipeta de transferencia, AÑADIR tampón de lavado a cada pocillo hasta que estén casi llenos ($\sim 200 \mu\text{L}$). Es importante NO permitir que el tampón se derrame en los pocillos adyacentes para evitar contaminaciones cruzadas.
11. INVERTIR las tiras sobre el fregadero o una pila de toallas de papel para retirar las muestras. Golpear suavemente las tiras 4-5 veces sobre una toalla de papel limpia. DESECHAR las toallas de papel mojadas.
12. REPETIR los pasos 10 y 11 para lavar los pocillos una vez más.

PUNTO DE PARADA OPCIONAL:

El experimento se puede detener después del paso 12, pero requiere dejar el tampón de lavado en todos los pocillos para su almacenamiento durante la noche a 4°C . El experimento se puede reanudar hasta 24 horas más tarde. Retirar el tampón de lavado y continuar con el paso 13.

Adición y eliminación de anticuerpos



13. Con una punta de micropipeta nueva, AÑADIR 50 µL de la solución de anticuerpo primario a cada pocillo.
14. INCUBAR a temperatura ambiente durante 5 minutos.
15. INVERTIR sobre toallas de papel y GOLPEAR suavemente con los dedos. LAVAR los pozos dos veces como en los pasos 10-12.
16. Con una punta de micropipeta nueva, AÑADIR 50 µL de la solución de anticuerpo secundario a cada pocillo.
17. INCUBAR a temperatura ambiente durante 5 minutos.
18. INVERTIR sobre toallas de papel y GOLPEAR suavemente con los dedos. LAVAR los pozos dos veces como en los pasos 10-12.

Adición de sustrato

19. Con una punta de micropipeta nueva, AÑADIR 50 µL del sustrato TMB a los 12 pocillos. Cuando el primer pocillo sea de color azul oscuro (2-5 min), continuar en el paso 20.

NOTA: La reacción enzimática puede saturarse rápidamente en pozos con una alta concentración de antígeno. Trabajar de forma rápida y a ritmo constante al añadir el sustrato TMB.

20. Con una punta de micropipeta nueva, AÑADIR 50 µL de solución de parada a cada pocillo. Golpear suavemente los tubos para MEZCLAR.
21. DOCUMENTAR los resultados usando una cámara digital para tomar una foto. Colocar las tiras de microtitulación en una hoja de papel blanca o en una caja de luz blanca puede mejorar el contraste entre los pocillos. Fotografiar ambas tiras simultáneamente. Las mejores imágenes se toman con las dos tiras paralelas y con la cámara directamente sobre la cabeza y a unos 30-35 cm de altura. Cuando sea posible, seleccionar alta resolución.
22. CONTINUAR con el Módulo III-A.

4.5 Módulo III-A: Análisis Cualitativo de Pruebas de Alérgenos

La intensidad del color de cada pocillo refleja la concentración inicial de suero. La intensidad del color se puede estimar a simple vista y describir o clasificar en una escala de 0 (claro) a 10 (azul). Debido a que la solución ELISA puede evaporarse rápidamente, es importante responder las preguntas 1 a 3 el mismo día que se realiza el Módulo II. Alternativamente, se puede usar la imagen tomada en el Módulo II para responder estas preguntas en un momento posterior.

1. ¿Qué muestras de curva estándar son las más oscuras? ¿Cuáles son las más claras? ¿Qué quiere decir esto? ¿Cómo se relaciona la intensidad del color con las concentraciones que se calcularon en la Tabla 3?
2. Observar las diluciones de muestras de alimentos. ¿Alguna de ellas cambió 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)?
4. Con base en esta similitud, ¿puede estimar la concentración original de suero en la muestra de alimento que se probó? Recordar que los pocillos A a D representan alimentos que han sido diluidos.

4.6 Módulo III-B: Análisis Cuantitativo de Pruebas de Alérgenos

La intensidad del color de cada pocillo se puede determinar mediante densitometría, la medida cuantitativa de la absorción de luz. En este ELISA la concentración inicial de suero determina cuántas moléculas de TMB se oxidan. El TMB oxidado vuelve la solución azul, lo que conduce a una mayor absorción de 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 se puede usar la ecuación de la curva estándar para estimar la concentración original de suero en el alimento elegido.

1. Calcular el "valor de gris medio" y la concentración de proteína de suero para los ocho pocillos de la curva estándar.
 - a. Guarde la imagen digital de sus resultados como JPEG en el ordenador.
 - b. Abrir el programa ImageJ en el ordenador.
 - c. Ir a Archivo > Abrir y abrir la imagen.
 - d. Ir a Imagen > Tipo > 32 bits.
 - e. Ir a Edición > Invertir.
 - f. Ir a Analizar > Establecer medidas y seleccione "valor de gris medio".

NOTA: En las imágenes digitales, cada píxel tiene un valor de luminancia, o intensidad de la luz, que va desde el negro (intensidad cero) al blanco (intensidad total). En la imagen J, este valor se denomina valor de 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.

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

<http://rsb.info.nih.gov/ij/download.html>

- g. Elegir la herramienta de selección redonda y dibujar un círculo que encaje dentro del primer pocillo.

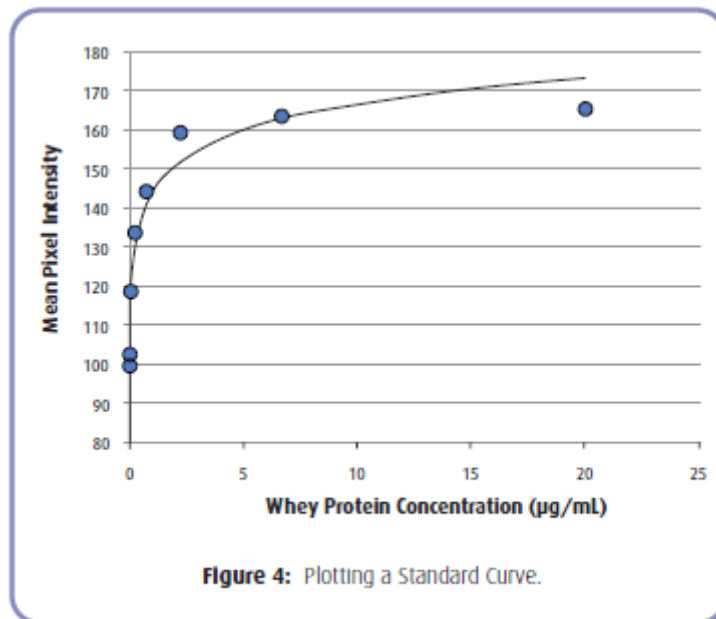
NOTA: Este círculo se utilizará para medir todos los pocillos. Debido a que algunas cámaras pueden distorsionar la forma de los pocillos, sugerimos hacer este círculo un poco más pequeño que el pocillo real.

- h. Ir a Analizar > Medir. Debería aparecer una nueva ventana titulada resultados. Registrar los resultados del "valor de gris medio" en la libreta de laboratorio o en la Tabla 4.
- i. Volver a hacer clic en la imagen digital de los resultados y usar el mouse o las teclas de flecha para mover el círculo al pocillo siguiente. Repetir el paso h para todos los pocillos restantes.
- j. Completar la Tabla 4 utilizando los "valores de grises medios" y las concentraciones de antígeno de la Tabla 3 (página 9).

Table 4: Calculations for the Standard Curve and Diluted Food Samples			
Well	Dilution	Mean Gray Value	Whey Protein Concentration ($\mu\text{g/mL}$)
1	1:1		10
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		

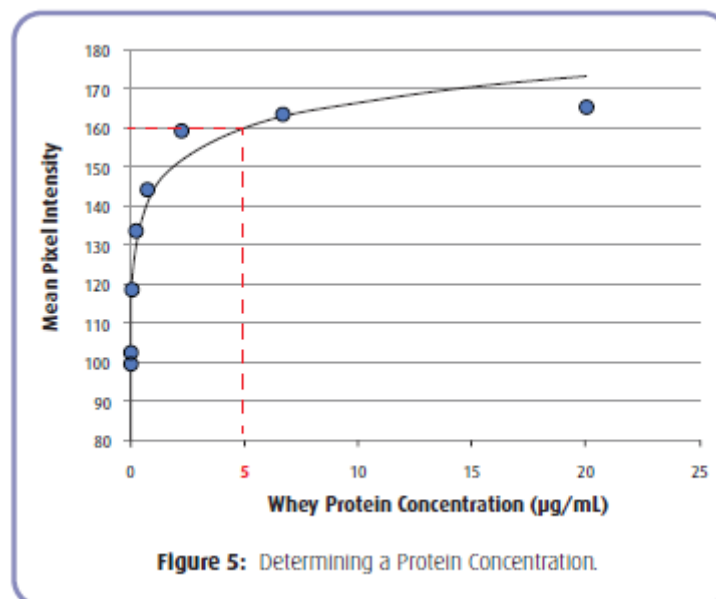
2. Crear una curva estándar.

- a. Hacer una gráfica con la concentración de proteína de suero (eje x) y el valor de gris medio (eje y) para cada concentración estándar.
- b. Dibujar la curva que mejor se ajuste a través de los puntos en el gráfico (para obtener los mejores resultados, sugerimos usar software de gráficos).
- c. Guardar la ecuación de su curva para usarla más tarde.



NOTA: Sugerimos un logarítmico línea de mejor ajuste. Es posible que la línea de mejor ajuste no pase por todos los puntos de los datos.

3. Determinar la concentración de la proteína objetivo en una muestra de alimento.
 - a. Encontrar los valores de grises medios de la muestra en los pocillos A a D como en el paso 1.
 - b. Seleccionar una muestra con un valor de intensidad que se encuentre entre los valores máximo y mínimo de la curva estándar.
 - c. Usar la ecuación de la línea de mejor ajuste para resolver x dado el valor de y . Como alternativa, extienda una línea horizontal desde el valor de absorbancia de la muestra (eje y) hasta la curva estándar y lea la concentración correspondiente (eje x). Ver Figura 5



4. Determinar la concentración de suero en la muestra de alimento original.

- a. Convertir la relación de dilución del pocillo a un número decimal dividiendo el número de la izquierda por el número de la derecha. Por ejemplo, la dilución 1:104 se puede reescribir como 0,0001.
- b. Dividir la concentración de proteína de suero de leche (calculada en el paso 3c) por este número.

4.7 Preguntas de estudio

1. Describir la estructura de una proteína de anticuerpo IgE. ¿Qué tipo de célula produce estas proteínas?
2. Nombrar y describir dos tipos de proteínas de la leche.
3. Describir una reacción ELISA que comience con la adición de un antígeno y finalice con el cambio de color del sustrato.

5. GUÍA DEL PROFESOR

DESCRIPCIÓN GENERAL DE LA PREPARACIÓN PRELABORATORIO DEL PROFESOR:

Esta sección describe los preparativos previos a la práctica en el laboratorio recomendados y el tiempo aproximado requerido para completar cada actividad previa al laboratorio. Además de preparar y dividir en alícuotas los componentes previstos para el Módulo II (tabla a continuación), también se deberán adquirir muestras de alimentos antes del Módulo I y asegurarse de que los estudiantes tengan acceso a cámaras digitales antes del Módulo II y acceso a ordenadores con procesamiento de imágenes y programas de gráficos antes del Módulo III.

Component:	What to do:	When:
Strip Tubes	Divide five strips	Anytime before the experiment.
10X ELISA Wash Buffer (A)	Dilute to 1X solution and aliquot	Anytime before the experiment. Cover and store in the refrigerator.
ELISA Dilution Buffer (B)	Use to rehydrate components C, D, and E and to prepare food and curve buffers.	Anytime before the experiment. Store tubes in the refrigerator.
Whey Antigen (C)	Rehydrate and aliquot	Up to one week before performing the experiment.
Anti-Whey Antigen (D)	Rehydrate and aliquot	Up to one week before performing the experiment.
Secondary Antibody (E)	Rehydrate and aliquot	On the same day as performing the experiment.
TMB Substrate (F)	Aliquot	Up to one week before performing the experiment.
Stop Solution (G)	Aliquot	Up to one week before performing the experiment.

Red = Prepare immediately before module.
 Yellow = Prepare shortly before module.
 Green = Flexible / prepare up to a week before the module.

5.1 Preparaciones previas al laboratorio

Adquirir muestras de alimentos

Se puede probar una variedad de productos lácteos y sin lácteos. ¡Animar a los estudiantes a que traigan sus propias muestras! Si bien los resultados variarán según la marca utilizada, la Tabla 5 proporciona una lista de productos sugeridos y sus resultados generales.

Table 5: Expected Results from Dairy Products	
Product Tested	ELISA Color Change
Cow's Milk	Dark
Soy Milk	None
Protein Drink	Light
Dairy Coffee Creamer	Light
Fresh Cream	Light to Dark (depending on brand)
Dairy Cheese	Light
Dairy Yogurt	Light to Dark
Dairy Ice Cream	Light to Dark
Dairy Free Yogurt	None
Dairy Free Ice Cream	Light
Cookies/Cakes	None to Light
Salad Dressing	Light
Butter	None
Candy bar (nougat)	Light
Energy/Protein bar	Dark

Preparar tiras de pocillos

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

Obtener cámara digital

A los efectos de esta práctica, se pueden utilizar cualquier cámara digital, incluidas las que se encuentran en los teléfonos móviles. Las cámaras digitales deben incluir un cable USB y/o tarjetas de memoria para poder transferir las imágenes a los ordenadores. Si utilizan un teléfono móvil, las imágenes se pueden enviar a una dirección de correo electrónico. Se pueden usar muchos formatos de imagen, incluidos TIFF, GIF y JPEG.

Requisitos del ordenador para el módulo III-B

Para realizar el análisis cuantitativo, los estudiantes necesitarán un ordenador con software de análisis de imágenes y un programa de gráficos capaz de encontrar la curva de mejor ajuste. 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 Instituto Nacional de Salud. Es de dominio público y, por lo tanto, puede descargarse e instalarse libremente. Las instrucciones detalladas de descarga y el archivo ImageJ apropiado para su plataforma se pueden encontrar en:

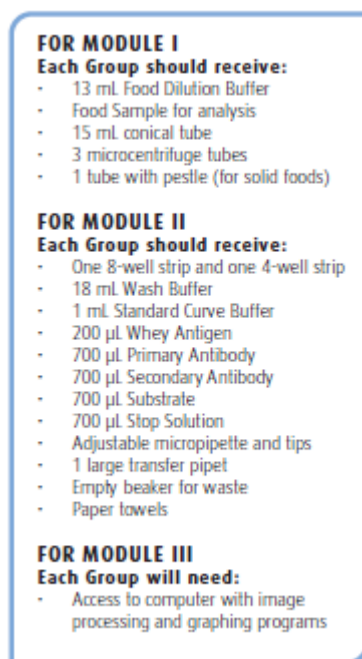
<http://rsb.info.nih.gov/ij/download.html>

Para ejecutar ImageJ, se necesita tener Java ejecutándose en el ordenador. Se debe consultar al personal de soporte tecnológico apropiado de su centro para obtener

ayuda. Numerosos programas gráficos están disponibles. Alternativamente, los resultados se pueden trazar en papel semilogarítmico y dibujar una línea de tendencia lineal a mano.

Extracción de las muestras y lavado de los pocillos

Como alternativa a invertir las tiras para retirar las muestras durante el Módulo II, los estudiantes pueden usar una pipeta para retirar las muestras y lavar los tampones. En este caso, es importante cambiar las pipetas o las puntas de las pipetas entre pocillos para evitar la contaminación cruzada. Se pueden pedir micropipetas de transferencia adicionales. Para reducir el desperdicio, las pipetas de transferencia se pueden etiquetar y reutilizar para el mismo pozo en pasos futuros.



Preparación de tampón de lavado

1. AÑADIR todo el tampón de lavado ELISA 10x (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 prácticas. ETIQUETAR los vasos de precipitados como "Tampón de lavado".

Preparación de tampones de preparación de muestras

1. En un vaso de precipitados/matraz de 250 ml, DILUIR 7 ml de tampón de dilución ELISA (B) en 150 ml de agua destilada.
2. DISPENSAR 13 ml de la dilución del paso 1 en diez vasos de precipitados pequeños. ETIQUETAR como "Tampón de dilución de alimentos".
3. DISPENSAR 1 ml de la dilución del paso 1 en diez tubos de microcentrífuga y ETIQUETAR como "Búfer de curva estándar".
4. GUARDAR el tampón de dilución ELISA restante (B) para los pasos posteriores.

Preparación de antígeno de suero para curva estándar

1. TRANSFERIR 7 ml de tampón de dilución ELISA (B) a un tubo cónico de 15 ml. Etiquetar como "Antígeno".
2. RETIRAR con cuidado el tapón del vial de antígeno liofilizado (C) y TRANSFERIR aproximadamente 0,5 ml de tampón de dilución ELISA del tubo en el paso 1. CERRAR el tapón y agitar suavemente el vial para MEZCLAR.
3. TRANSFERIR 0,25 mL (250 µL) del antígeno rehidratado de vuelta al tubo cónico del paso 1. MEZCLAR bien.
4. ETIQUETAR diez tubos de microcentrífuga como "Antígeno de suero" y DISPENSE 200 µL de la solución preparada en estos tubos.

Preparación del anticuerpo primario

1. TRANSFERIR 7 ml de tampón de dilución ELISA (B) a un tubo cónico de 15 ml. Etiquetar como "anticuerpo primario".
2. RETIRAR con cuidado el tapón del vial de anticuerpo primario liofilizado (D) y TRANSFERIR aproximadamente 0,5 ml del tampón de dilución ELISA del tubo en el paso 1. CERRAR el tapón y agitar suavemente el vial para MEZCLAR.
3. TRANSFERIR todo el volumen del anticuerpo primario rehidratado al tubo cónico del paso 1. MEZCLAR bien.
4. ETIQUETE diez tubos de microcentrífuga como "Anticuerpo primario" y DISPENSE 700 µL de la solución preparada en estos tubos.

Preparación de anticuerpo secundario

Preparar el mismo día que sea necesario para el experimento.

1. TRANSFERIR 7 ml de tampón de dilución ELISA (B) a un tubo cónico de 15 ml. Etiquete como "anticuerpo secundario".
2. RETIRAR con cuidado el tapón del vial de anticuerpo secundario liofilizado (E) y TRANSFERIR aproximadamente 0,5 ml del tampón de dilución ELISA del tubo en el paso 1. CERRAR el tapón y agitar suavemente el vial para MEZCLAR.
3. TRANSFERIR todo el volumen del Anticuerpo Secundario rehidratado al tubo cónico del paso 1. MEZCLAR bien.
4. ETIQUETAR diez tubos de microcentrífuga como "Anticuerpo secundario" y DISPENSAR 700 µL de la solución preparada en estos tubos.

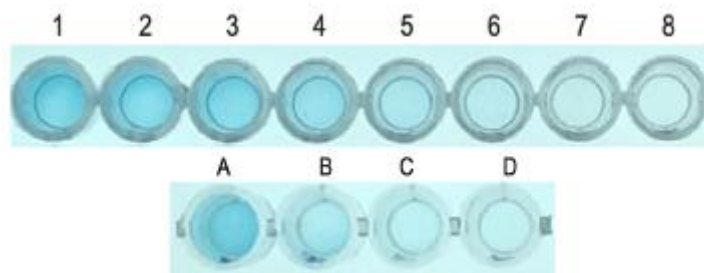
Preparación del sustrato TMB y solución de parada

1. Dispensar 700 µL del sustrato TMB (F) en diez tubos de microcentrífuga etiquetados como "Sustrato".
2. Dispensar 700 µL de solución de parada (G) en diez tubos de microcentrífuga. Etiquetar los tubos como "Stop".

5.2 Resultados y análisis del experimento

MÓDULO II

A continuación se muestran los resultados de un ELISA que realizamos con mitad y mitad de crema. Los resultados en los pocillos A a D variarán según las muestras de alimentos que se utilicen. Los resultados en los pozos 1 a 8 también pueden variar dependiendo de varios factores, incluidos los tiempos de incubación, la precisión del pipeteo y la iluminación de fondo.



MÓDULO III-A

1. ¿Qué muestras de curva estándar son las más oscuras? ¿Cuáles son los más claras? ¿Qué quiere decir esto? ¿Cómo se relaciona la intensidad del color con las concentraciones que calculaste en la Tabla 3?

El pocillo 1, que contenía la muestra de la curva estándar de suero a una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$, es el más oscuro, mientras que el pocillo 8, que contenía la muestra de la curva estándar de suero a una concentración de 0,0046 $\mu\text{g/ml}$, es el más claro. Esto significa que cuanto más oscura sea la reacción, mayor será la concentración de suero.

2. Observe las diluciones de muestras de alimentos. ¿Alguna de ellas cambió de color?

Los cuatro pocillos cambiaron de color. El pozo A mostró el mayor cambio de color mientras que los pozos 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 se ve similar en intensidad de color 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, ¿se puede estimar la concentración original de suero en la muestra de alimento que se probó? Recordar que los pocillos A a D representan alimentos que han sido diluidos.

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

MÓDULO III-B

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

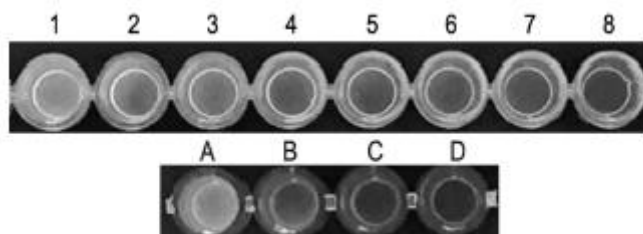
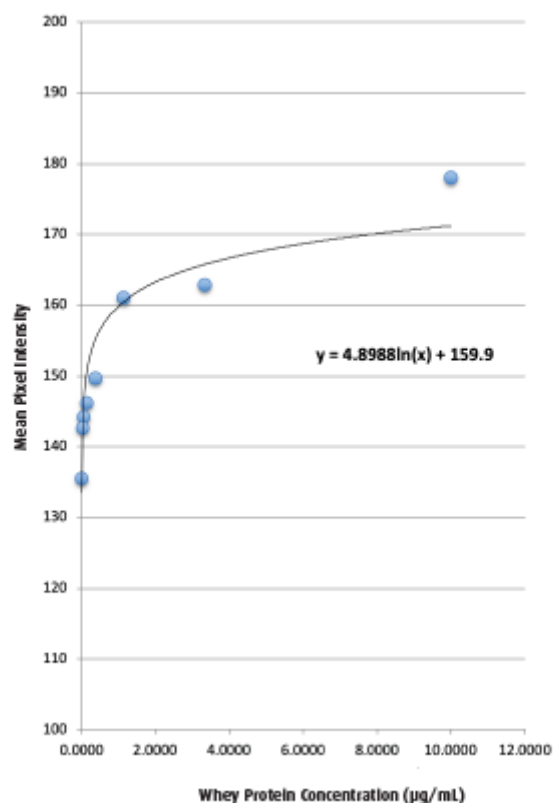


Table 4: Calculations for the Standard Curve and Diluted Food Samples			
Well	Dilution	Mean Gray Value	Whey Protein Conc. (µg/mL)
1	1:1	177.84	10.0000
2	1:3	162.645	3.3333
3	1:9	160.823	1.1111
4	1:27	149.56	0.3704
5	1:81	145.953	0.1235
6	1:243	144.029	0.0412
7	1:729	142.504	0.0137
8	1:2187	135.357	0.0046
A	1:103	199.33	Unknown
B	1:104	164.01	Unknown
C	1:105	134.667	Unknown
D	1:106	129.667	Unknown

MÓDULO III-B, continuación

A continuación se muestra el gráfico de diagrama de dispersión y la línea logarítmica de mejor ajuste creada en el paso 2.



Para el paso 3, solo la dilución de alimentos en el pocillo B (valor de gris medio de 164,01) se encontraba dentro del rango de la curva estándar. Esto se usó para calcular la concentración de suero usando la ecuación lineal de mejor ajuste.

Ecuación de la recta:

$$y = 4,8988 \ln(x) + 159,9$$

donde

y, representa el valor medio de la escala de grises

x, representa la concentración de suero

Resolviendo para x:

$$164,01 = 4.8988 \ln(x) + 159,9$$

$$4,11 = 4,8988 \ln(x)$$

$$0,8389 = \ln(x)$$

$$e(0,8389) = e\ln(x)$$

$$2,3138 = x$$

Finalmente, en el paso 4, el factor de dilución original (1:104) se convierte en un decimal (0,0001). El valor x anterior (2,314) se divide por este número para calcular la concentración original de suero en la muestra de alimentos:

$$2,3138/0,0001 = 23138 \mu\text{g/mL}.$$