

INTRODUCCIÓN AL ELISA

10 grupos de estudiantes

1. OBJETIVO DEL EXPERIMENTO

El objetivo de este experimento es aportar a los estudiantes el conocimiento y metodología de la técnica del ELISA.

2. COMPONENTES para 10 grupos de estudiantes

COMPONENTES	CONSERVACIÓN
A Tampón Reconstitución Antígeno	Nevera
B Antígeno Suero (líoilizado)	Nevera
C 10X PBST (Tampón de Lavado)	Nevera
D Anticuerpo Primario (líoilizado)	Nevera
E Anticuerpo Secundario (líoilizado)	Nevera
F Substrato ABTS	Nevera
G Ácido Aminosalicílico (co-substrato peróxido)	Nevera
H Peróxido de Hidrógeno estabilizado	Nevera

Guardar los siguientes componentes a temperatura ambiente:

- Placas de microtitulación
- Pipetas de transferencia
- Tubos de microcentrífuga con tapa a presión de 1.5 ml
- Tubos cónicos de 15 ml

ESTA PRÁCTICA NO CONTIENE COMPONENTES PREPARADOS A PARTIR DE FUENTES HUMANAS.

Todos los componentes del experimento están destinados únicamente a la investigación educativa. No se deben utilizar con fines diagnósticos o farmacológicos, ni administrarse o consumirse por seres humanos o animales.

2.1 Material requerido y no suministrado

- Agua destilada
- Vasos.
- Estufa de cultivo 37°C.
- Micropipetas automáticas (5-50 µl) y puntas.
- Guantes de laboratorio.
- Gafas de protección.

Se deben asegurar que la cristalería esté limpia, seca y libre de residuos de jabón. Para mayor comodidad, se pueden comprar pipetas de transferencia desechables adicionales para los pasos de lavado y eliminación de líquidos.

3. INTRODUCCIÓN

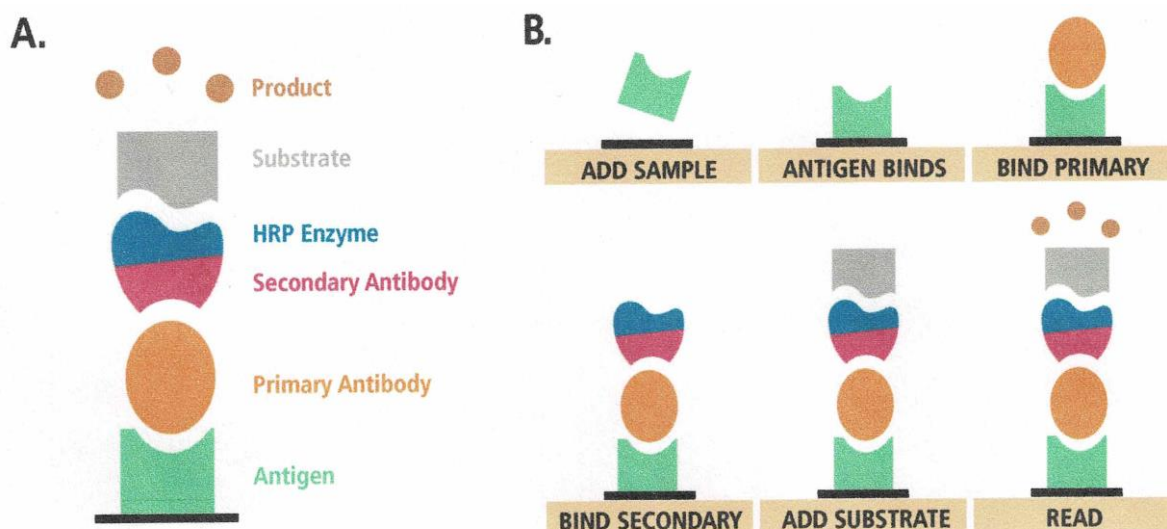
Principios de la técnica de ELISA

Durante una infección, un individuo presenta una respuesta de anticuerpos que eventualmente resulta en la producción de moléculas de IgG en el plasma que se unen a diversas partes del agente infeccioso. Si estos anticuerpos están presentes en la muestra, se unirán a los antígenos adsorbidos en los pocillos de una microplaca y permanecerán allí después del lavado, y serán detectados por la técnica de ELISA.

Todos los anticuerpos pertenecen a un grupo de proteínas séricas conocidas como globulinas. Cada anticuerpo se compone de una cadena de polipéptidos pesada y ligera. En general, los anticuerpos se producen en respuesta a la presencia de una respuesta antigénica.

Los anticuerpos obtenidos a partir de animales, tales como conejos, en respuesta a un antígeno se conocen como anticuerpos policlonales. Los anticuerpos policlonales son heterogéneos en estructura y varían en su capacidad para unirse a antígenos. Los anticuerpos que tienen una alta afinidad por los antígenos no específicos pueden dar reacciones cruzadas no deseadas. Tales anticuerpos también pueden dar resultados falsos negativos. Por el contrario, los anticuerpos con constantes de unión débiles pueden no ser tan sensibles.

Los tests de **ELISA** (acrónimo del inglés *Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*: 'ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas') fueron desarrollados originalmente para la medición de anticuerpos, pero también se han adaptado para detectar con éxito muestras que contienen antígenos. **Este experimento de ELISA ha sido diseñado para detectar un anticuerpo dirigido contra un antígeno.**



El ELISA tradicional requiere dos anticuerpos. Un anticuerpo, llamado primario, reconoce el antígeno de interés. Por ejemplo, un ELISA que detecta el virus del VIH usaría un anticuerpo que reconoce una de las proteínas de la cubierta del virus. El anticuerpo secundario reconoce el anticuerpo primario: si un conejo produce nuestro anticuerpo primario, usaríamos un anticuerpo secundario que reconozca los anticuerpos de conejo. El anticuerpo secundario está unido covalentemente a una enzima llamada peroxidasa de

rábano picante (HRP) que nos permite detectar la presencia del complejo anticuerpo-antígeno. HRP tiene una alta actividad catalítica, lo que nos permite detectar rápidamente incluso la menor cantidad de antígeno.

Para realizar un ELISA, las muestras experimentales se agregan a los pocillos y se permite que los antígenos se adsorban a los pocillos durante una breve incubación (Figura B). Los ELISA se realizan en placas de microtitulación de plástico transparente, que permiten a los científicos visualizar fácilmente los resultados. Después de la incubación, los pocillos se lavan brevemente, para eliminar cualquier muestra no unida, y el anticuerpo primario se agrega a cada pocillo. Si el antígeno está presente, el anticuerpo primario se unirá a él y permanecerá unido después del lavado. A continuación, se agrega un anticuerpo secundario y solo se adherirá cuando el anticuerpo primario ya se haya unido. Finalmente, se agrega un sustrato a cada pocillo; si el anticuerpo secundario está presente, la enzima HRP catalizará una reacción colorimétrica.

Este experimento demuestra la necesidad de cada componente en el ELISA. Por ejemplo, los pocillos a los que les falta el antígeno o el anticuerpo primario no podrán unirse al anticuerpo secundario y, por lo tanto, mostrarán un resultado negativo. Además, los estudiantes examinarán las diferencias colorimétricas entre dos sustratos de peroxidasa. El sustrato 1 (S1) contiene peróxido de hidrógeno y **ácido aminosalicílico**, mientras que el sustrato 2 (S2) contiene peróxido de hidrógeno y ácido 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico), **o ABTS**. Durante el paso final del ELISA, la enzima peroxidasa convierte el peróxido de hidrógeno en H₂O y O₂, utilizando el sustrato como donante de hidrógeno. **El salicilato oxidado es marrón, mientras que el ABTS oxidado se vuelve verde.** Ambos sustratos se pueden distinguir fácilmente del sustrato incoloro sin reaccionar en los pocillos negativos.

4. DESCRIPCIÓN DEL EXPERIMENTO

El objetivo de este experimento es aportar a los estudiantes el conocimiento y metodología de la técnica del ELISA.

Este experimento demuestra dos conceptos importantes. El primero es el efecto de la ausencia del antígeno o el anticuerpo primario que resulta en la interrupción de la reacción de ELISA. El segundo es la demostración de que el sustrato utilizado por la enzima unida al anticuerpo secundario puede resultar en diferentes colores positivos.

4.1 Precauciones

1. Se deben usar gafas de protección y guantes de laboratorio mientras se trabaja de forma habitual.
2. **NO PIPETEAR CON LA BOCA**, utilizar los dispositivos adecuados.
3. Extremar las precauciones cuando se trabajan con equipos que utilizan conjuntamente calor y mezcla de reactivos.
4. Lavarse las manos con jabón y agua después de haber trabajado en el laboratorio o utilizado reactivos o materiales biológicos.

4.2 LIBRETA DE LABORATORIO:

Registrar en una libreta de laboratorio o en una hoja de trabajo separada la siguiente información.

Antes de iniciar la práctica:

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

Durante la práctica:

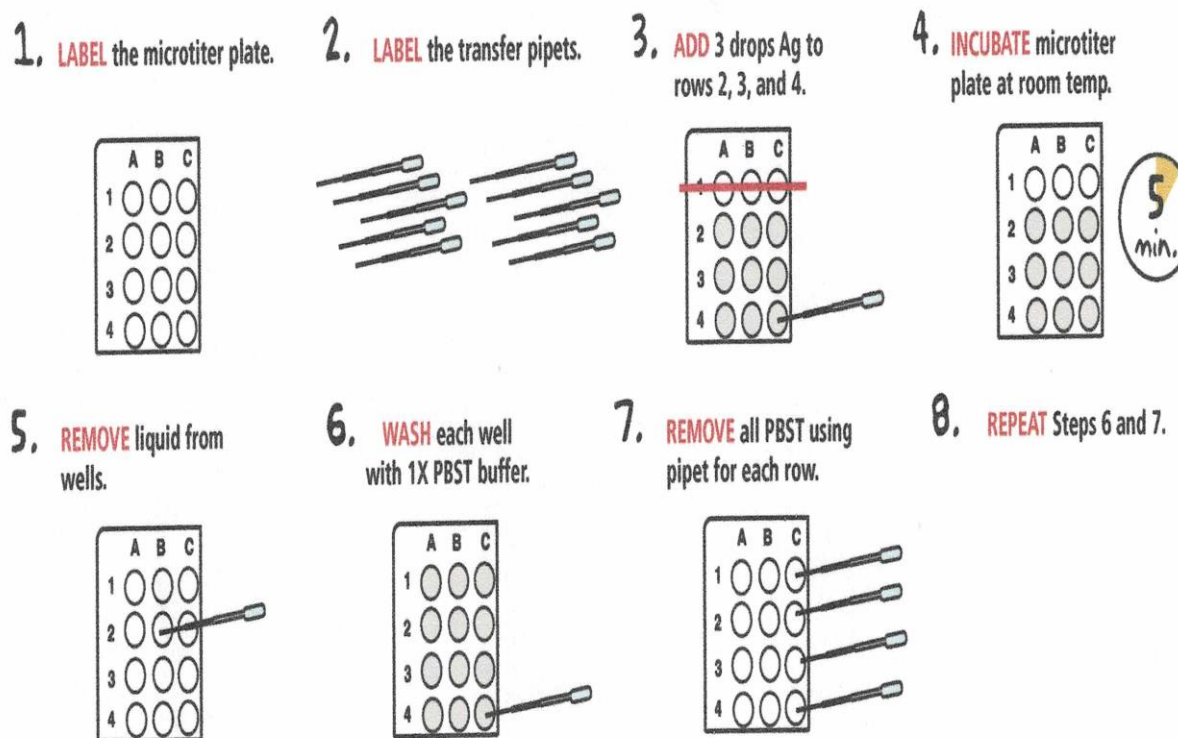
- Registrar (dibujar) las observaciones o fotografiar los resultados.

Después de la práctica:

- Formular una explicación a partir de los resultados.
- Determinar qué se podría cambiar en el experimento si se repitiera.
- Escribir una nueva hipótesis que reflejaría los cambios del punto anterior.

5. PRÁCTICA

REALIZANDO EL ELISA



1. ETIQUETAR los pocillos de la placa de microtitulación como se muestra.

2. Si no usa una micropipeta de volumen ajustable, ETIQUETAR las pipetas de transferencia como se describe a continuación. Estas 10 pipetas se usarán para agregar y eliminar líquido de los pocillos.

(PBS) Solución tamponada con fosfato

(Ag) Antígeno de suero

(1°AB) Anticuerpo primario

(2°AB) Anticuerpo secundario

- (S1) Sustrato 1
 (S2) Sustrato 2
 (Fila1) Se utiliza para eliminar muestras de la fila 1
 (Fila2) Se utiliza para eliminar muestras de la fila 2
 (Fila3) Se utiliza para eliminar muestras de la fila 3
 (Fila4) Se utiliza para eliminar muestras de la fila 4

3. Usando la pipeta de transferencia "Ag" o una micropipeta, **AÑADIR 3 gotas o 50 µL de Antígeno (Ag)** a todos los pocillos en las filas 2, 3 y 4. No añadir antígeno a los pocillos en la fila 1.

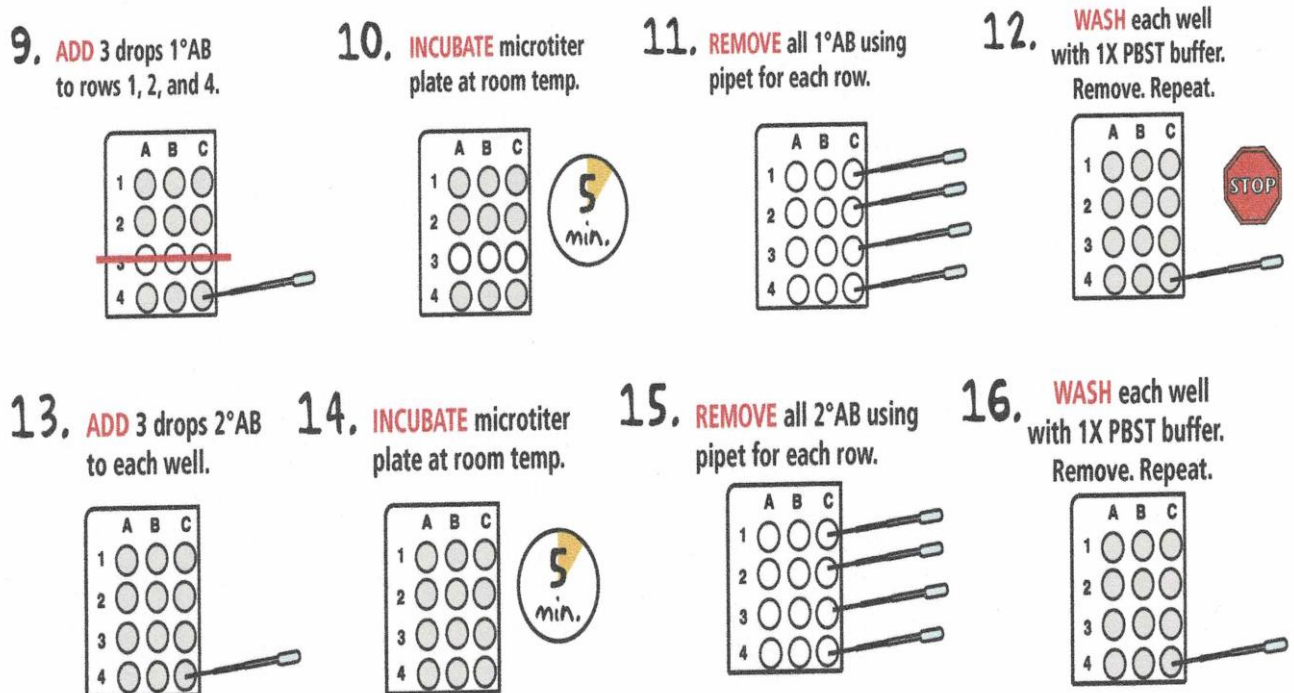
4. INCUBAR la placa a temperatura ambiente durante 5 minutos.

5. Usando la pipeta "Ag", RETIRAR todo el líquido de los pocillos.

6. Usando la pipeta de transferencia "PBS" LAVAR cada pocillo agregando 1x PBST buffer hasta que los pocillos estén casi llenos (~ 200 µL). No permita que el tampón se derrame a los pozos adyacentes.

7. RETIRAR todo el líquido 1x PBST buffer de los pocillos usando la pipeta de transferencia designada para cada fila.

8. REPETIR los pasos 6 y 7 para lavar los pocillos una vez más.



9. Usando la pipeta de transferencia "1° AB" o una micropipeta, **AÑADIR 3 gotas o 50 µL del anticuerpo primario** a los pocillos en las filas 1, 2 y 4. No añadir el anticuerpo primario a los pocillos fila 3

10. INCUBAR la placa a temperatura ambiente durante 5 minutos.

11. Usando la pipeta de transferencia etiquetada para cada fila, RETIRAR todos los anticuerpos primarios de cada pocillo.

12. LAVAR cada pocillo dos veces con tampón PBST fresco 1x. Entre lavados RETIRAR

todo el 1x PBST de los pocillos usando la pipeta de transferencia designado para cada fila.

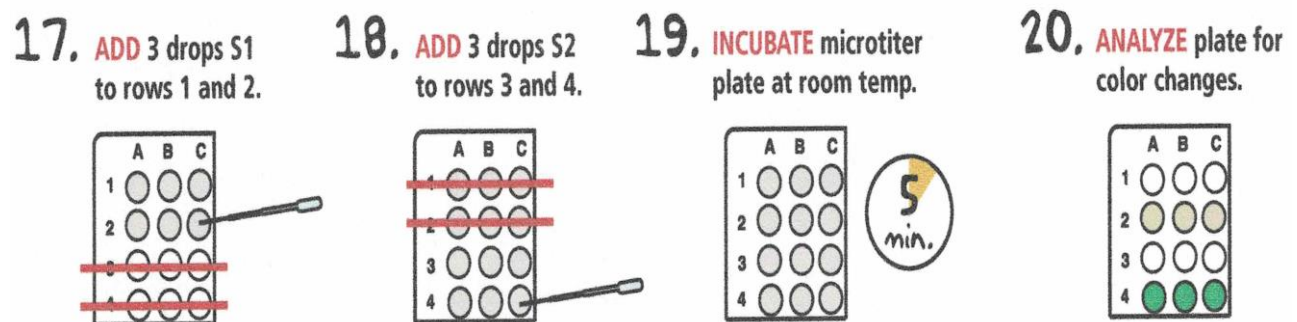
PUNTO DE PARADA OPCIONAL: Para el almacenamiento durante la noche, AGREGAR 200 μ L de 1x PBST a cada pocillo. Cubrir cuidadosamente las muestras y colocar la placa en la nevera. El experimento debe reanudarse durante el próximo período de laboratorio. Retirar el 1x PBST y continuar con el Paso 13.

13. Usando la pipeta de transferencia marcada "2°AB" o una micropipeta, **AÑADIR 3 gotas o 50 μ L del anticuerpo secundario a cada pocillo.**

14. INCUBAR la placa a temperatura ambiente durante 5 minutos.

15. Usando la pipeta de transferencia etiquetada para cada fila, RETIRAR todos los anticuerpos secundarios de cada pocillo.

16. LAVAR cada pocillo dos veces con tampón 1x PBST fresco. Entre lavados QUITAR todo el 1x PBST de los pocillos usando la pipeta de transferencia designado para cada fila.



17. Usando la pipeta de transferencia etiquetada "S1" o una micropipeta, **AGREGAR 3 gotas o 50 μ L de sustrato 1 a las filas 1 y 2.**

18. Usando la pipeta de transferencia etiquetada "S2" o una micropipeta, **AGREGAR 3 gotas o 50 μ L de sustrato 2 a las filas 3 y 4.**

19. INCUBAR la placa a temperatura ambiente durante 5 minutos.

20. ANALIZAR inmediatamente la placa para detectar cambios de color en los sustratos. Si el color no está completamente desarrollado, se puede dejar por un período de tiempo más largo.

5. PREGUNTAS DE LA PRÁCTICA

1. ¿Qué es el ELISA? Describa el propósito de cada componente utilizado en un ELISA.
2. ¿Cuál es el efecto de no incluir el antígeno o el anticuerpo primario en la reacción ELISA?
3. ¿Por qué es importante lavar todos los pocillos entre las adiciones de los distintos componentes?
4. ¿Se pueden detectar los ácidos nucleicos mediante el formato ELISA?

6. GUÍA DEL PROFESOR

6.1 Preparaciones y consideraciones previas

DESCRIPCIÓN GENERAL DE LA PREPARACIÓN PRELABORATORIO DEL PROFESOR:

Esta sección describe las preparaciones previas recomendadas y el tiempo aproximado requerido para completar cada actividad previa.

Qué hacer	Cuándo	Tiempo
Dividir placa de microtitulación	Antes de la clase	5 min.
Preparación de alícuotas y reactivos	Hasta 1 semana antes de la práctica	30 min.
Preparación Substrato 1	Durante la práctica (15-20 min. antes de la última incubación)	10 min.
Preparación anticuerpo secundario	El día de la práctica	10 min.

NOTA: Si se preparan y dividen los reactivos en alícuotas con anticipación, se deben almacenar todos los reactivos a 4°C.

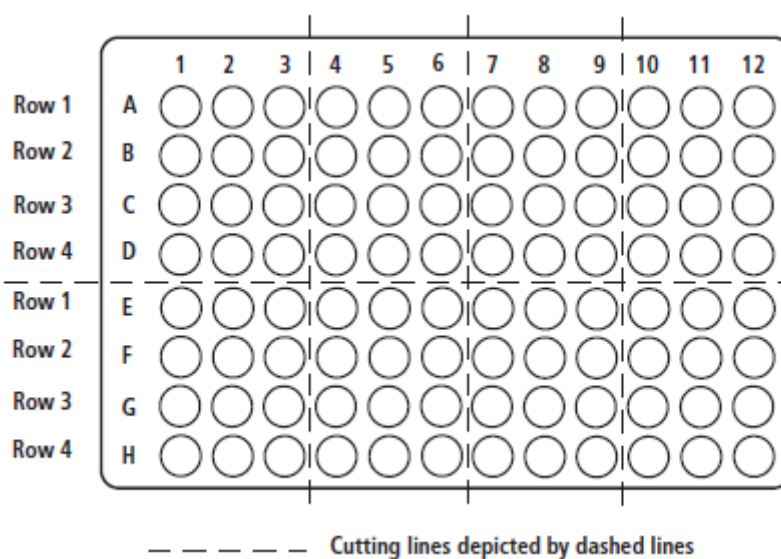
Las preparaciones previas puede realizarlas el profesor o realizarse como otra clase a realizar por los alumnos.

PREPARACIONES PRELABORATORIO

A) PREPARACIONES ANTES DEL DÍA DE LA PRÁCTICA

Preparación de la placa de microtitulación:

1. Como se muestra en la figura a continuación, orientar la placa de microtitulación de modo que los números 1-12 estén en la parte superior y las letras A-H estén a la izquierda.
2. Cortar cada placa por las líneas punteadas como se muestra en la figura. Cada pieza contendrá 3 pocillos en un eje y 4 pocillos en el otro eje. Cada grupo de laboratorio recibirá una pieza.



B) PREPARACIONES DE REACTIVOS EL DÍA DE LA PRÁCTICA

Preparación Antígeno de Suero

1. Transferir 7 ml de tampón de reconstitución de antígeno (A) a un tubo cónico de 15 ml. Etiquete el **tubo "Antígeno"**.
2. Retirar con cuidado el tapón del vial de antígeno de suero liofilizado (B) y transferir aproximadamente 0,5 ml del tampón de reconstitución de antígeno del tubo en el paso 1. Cerrar el tapón y agitar suavemente el vial de vidrio para mezclar
3. Transferir todo el contenido del antígeno de suero reconstituido al tubo de 15 ml del paso 1. Mezclar bien.
4. Etiquetar 10 tubos de **microcentrífuga "Ag" y dispensar 0.6 mL por tubo.**

Preparación 1x PBST Tampón de Lavado

1. Agregar todo el 10x PBST (C) a 180 ml de agua destilada y mezclar bien. Etiquetar como **"1xPBST"**.
2. Dispensar 16 ml en vasos pequeños para cada grupo de laboratorio.
3. Guardar el 1xPBST restante para la preparación de los anticuerpos primario y secundario y el sustrato 1.

Preparación Anticuerpo Primario

1. Transferir 7 ml de 1xPBST a un tubo cónico de 15 ml. Etiquetar el tubo **"1°AB"**.
2. Retirar con cuidado el tapón del vial de anticuerpo primario liofilizado (D) y transferir aproximadamente 0,5 ml de PBST del tubo en el paso 1. Cerrar el tapón y agitar suavemente el vial de vidrio para mezclar.
3. Transferir todo el contenido del Anticuerpo primario reconstituido al tubo de 15 ml del paso 1. Mezclar bien.
4. Etiquetar 10 tubos de **microcentrífuga "1°AB" y dispense 0.6 mL por tubo.**

Preparación Anticuerpo Secundario

NOTA: Se debe preparar el mismo día que sea necesario para el experimento.

1. Transferir 6.5 ml de 1xPBST a un tubo cónico de 15 ml. Etiquetar el tubo **"2°AB"**.
2. Retirar con cuidado el tapón del vial de Anticuerpo Secundario liofilizado (E) y transferir aproximadamente 0,5 ml de PBST del tubo del paso 1. Cerrar el tapón y agitar suavemente el vial de vidrio para mezclar.
3. Transferir todo el contenido del anticuerpo secundario reconstituido al tubo de 15 ml del paso 1. Mezclar bien.
4. Etiquetar 10 tubos de **microcentrífuga "2°AB" y dispensar 0.6 ml por tubo.**

Preparación del sustrato ABTS

1. Etiquetar 10 tubos de microcentrífuga con **"S2"** para el sustrato 2.
2. Dispensar 0,5 ml de sustrato ABTS (F) en los tubos etiquetados.

C) PREPARACION DURANTE LA PRÁCTICA

Preparación Sustrato de ácido aminosalicílico

NOTA: Se debe preparar DURANTE la práctica, 15-20 minutos antes de que sea necesario.

1. Dispense 9 ml de 1x PBST en un tubo cónico de 15 ml.
2. Agregar el ácido aminosalicílico (G) al PBST. Tapar y mezclar bien agitando y/o agitando en vórtex. Puede quedar material no disuelto en el tubo.
3. Agregar 1 ml de peróxido de hidrógeno (H). Tapar y mezclar bien.
4. **Dispensar 0,5 ml de sustrato de ácido aminosalicílico** preparado en tubos de microcentrífuga. Etiquete los tubos como "**S1**" para sustrato 1.

Cada grupo de estudiantes de laboratorio debe recibir:

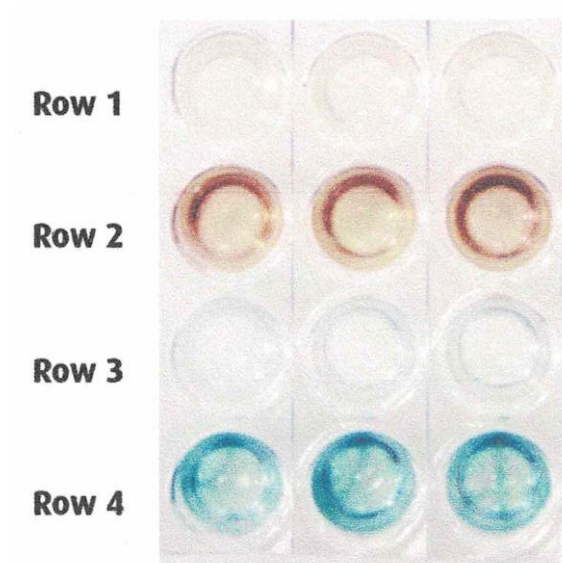
- 1 placa de microtitulación (3 x 4 pocillos)
- 1 tubo de microcentrífuga que contiene 0,6 ml de antígeno
- 1 tubo de microcentrífuga que contiene 0,6 ml de anticuerpo primario
- 1 tubo de microcentrífuga que contiene 0,6 ml de anticuerpo secundario
- 1 tubo de microcentrífuga que contiene 0,5 ml de sustrato 1 (ácido aminosalicílico)
- 1 tubo de microcentrífuga que contiene 0,5 ml de sustrato 2 (ABTS)
- 10 pipetas de transferencia
- 1 vaso de precipitados que contiene 16 mL 1X PBST
- 1 vaso de precipitados vacío para residuos

CADA GRUPO DE TRABAJO RECIBIRÁ LOS SIGUIENTES COMPONENTES	
1	placa de microtitulación (3 x 4 pocillos)
1	tubo de microcentrífuga que contiene 0,6 ml de antígeno
1	tubo de microcentrífuga que contiene 0,6 ml de anticuerpo primario
1	tubo de microcentrífuga que contiene 0,6 ml de anticuerpo secundario
1	Micropipeta automática con puntas (si se dispone)
10	Pipetas de transferencia
1	vaso de precipitados que contiene 16 ml 1x PBST
1	Vaso vacío marcado como "residuos"
1	tubo de microcentrífuga que contiene 0,5 ml de sustrato 1 (ácido aminosalicílico)
1	tubo de microcentrífuga que contiene 0,5 ml de sustrato 2 (ABTS)

7. EVITAR ERRORES COMUNES

1. Se debe recomendar a los estudiantes que tengan mucho cuidado al transferir soluciones dentro y fuera de los pocillos de la placa de microtitulación.
2. Utilizar únicamente pipetas limpias o debidamente etiquetadas.
3. No intentar vaciar los pocillos de microtitulación agitándolos. Esto no funcionará; dará como resultado la contaminación de los pozos adyacentes.
4. Lavar los pocillos suave y lentamente, sin forzar.

8. RESULTADOS DE LA PRÁCTICA



El color aparece sólo en las líneas 2 y 4. En la línea 2 aparecerá un color marrón y en la línea 4 aparecerá de color verde. En las líneas 1 y 3 no habrá color, ya que en ambas no se han puesto algún ingrediente crítico para la técnica del ELISA.

Row	Antigen	1°AB	2°AB	S1	S2
1		✓	✓	✓	
2	✓	✓	✓	✓	
3	✓		✓		✓
4	✓	✓	✓		✓