

ELISA CUANTITATIVO

REF.: ELISA3

10 grupos de estudiantes

PROTOCOLO ACTUALIZADA: 03/2024

1. OBJETIVO DEL EXPERIMENTO

En esta práctica, los estudiantes dominarán los conceptos y la metodología detrás del ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas cuantitativo (ELISA). Los estudiantes realizarán un ELISA para detectar la concentración de dos antígenos diferentes. Se creará una curva estándar para cada antígeno para permitir una cuantificación precisa en muestras desconocidas.

2. COMPONENTES para 10 grupos de estudiantes

COMPONENTES	Conservación
A Antígeno A.	nevera
B Antígeno B.	nevera
C Tampón de dilución	nevera
D Anticuerpo primario A	nevera
E Anticuerpo primario B	nevera
F 10x Tampón de Lavado	nevera
G Anticuerpo secundario	nevera
H ABTS	nevera
I Solución STOP	nevera

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 Suministros

Guarde los siguientes componentes a temperatura ambiente.

- Placas de microtitulación
- Pipetas de transferencia
- Tubos de microcentrífuga con tapa a presión

- Tubos de 5 ml
- Tubos cónicos de 15 ml
- Tubo cónico de 50 ml

2.2 Material requerido y no suministrado

Material requerido no incluido con este kit.

- Agua destilada o desionizada.
- Vasos de precipitados (pequeños, se recomiendan 100-150 ml).
- Guantes de laboratorio desechables.
- Gafas protectoras.
- Puntas y micropipetas automáticas (5-50 μ L para estudiantes, 200-1000 μ L para preparación de maestros).
- Toallas de papel.

3. INTRODUCCIÓN

Los **anticuerpos** son proteínas humanas y animales específicas que se producen por las células blancas de la sangre en respuesta a materiales extraños. Ejemplos de tales materiales extraños, conocidos como antígenos, incluyen agentes infecciosos y diversos materiales ambientales "no propios". Los **antígenos** biológicos son biomoléculas de elevado peso molecular, tales como proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos que pueden estar circulando libremente o como parte de un complejo, como parte de una cubierta de un virus o de la superficie celular bacteriana. Los anticuerpos son producidos en respuesta a antígenos. Se unen a los antígenos y juegan un papel significativo en la posterior eliminación de dichos materiales en circulación. Por ejemplo, la exposición a un agente infeccioso hace que el individuo inicie una respuesta inmune que finalmente resulta en moléculas de anticuerpos en el plasma que se unen a diferentes proteínas virales (y/o diferentes áreas del mismo polipéptido).

Cuando un anticuerpo se une a un antígeno biológico específico, se pueden reconocer cargas químicas específicas, secuencias o elementos estructurales. Estas características de unión estructural constituyen la huella digital específica para un antígeno. Cada molécula de anticuerpo puede unirse a dos moléculas de antígeno. Este reconocimiento y la unión es altamente específica y hace posible la diferenciación entre los dos virus circulantes que pueden estar muy estrechamente relacionados, como en el caso de dos cepas del mismo virus.

Cuando un antígeno y sus anticuerpos forman complejos insolubles, esta reacción de unión altamente específica es conocida como la **inmunoprecipitación**. La precipitación del complejo es el resultado de diversos anticuerpos policlonales que se unen a los antígenos para formar una red. En el ensayo de inmunoprecipitación tradicional, los anticuerpos se obtienen a partir del suero de un animal expuesto al antígeno específico. El suero, también conocida como plasma, se prepara por la eliminación de las células rojas de la sangre. Contiene las proteínas específicas, los anticuerpos, que actúan contra un antígeno particular "no propio" que se introduce

en el animal, ya sea por diseño o por una infección. Los anticuerpos son purificados a partir de muestras de suero de los animales y se pueden utilizar para detectar antígenos particulares, tales como agentes infecciosos humanos.

Descripción de la prueba de detección inmunológica

Los enzimo-inmunoensayos (ELISA's) fueron desarrollados originalmente para la medición de anticuerpos. Estos inmunoensayos también se han adaptado con éxito para detectar muestras que contienen antígenos. El ELISA se realiza en placas de microtitulación que generalmente están hechas de poliestireno o cloruro de polivinilo. Las placas son algo transparente y contienen muchos pozos pequeños (pocillos), en los que se depositan las muestras líquidas.

Los científicos agregan las muestras de prueba y los controles a los pocillos de la placa de plástico, donde no se adhieren específicamente a los pocillos a través de interacciones hidrofóbicas y electrostáticas (Figura 1). Esto significa que cualquier proteína en la muestra, y no solo el objetivo deseado, puede adherirse al plástico. A continuación, el anticuerpo primario se agrega a los pozos y la mezcla se deja incubar por un corto tiempo. Este anticuerpo reconoce específicamente y se une a la molécula objetivo (Figura 1). Por lo tanto, si alguna proteína objetivo está presente en los pocillos de microtitulación, el anticuerpo primario lo reconocerá.

Después de un breve período de incubación, los pocillos se lavan para eliminar cualquier anticuerpo primario que no se haya unido al antígeno. Después del lavado, se agrega un anticuerpo secundario unido a HRP a los pocillos donde se reconoce y se une al anticuerpo primario (Figura 1). El exceso de anticuerpo secundario se elimina de los pocillos lavando varias veces con tampón. Sin embargo, si el anticuerpo secundario se ha unido al anticuerpo primario, permanecerá en el pozo.

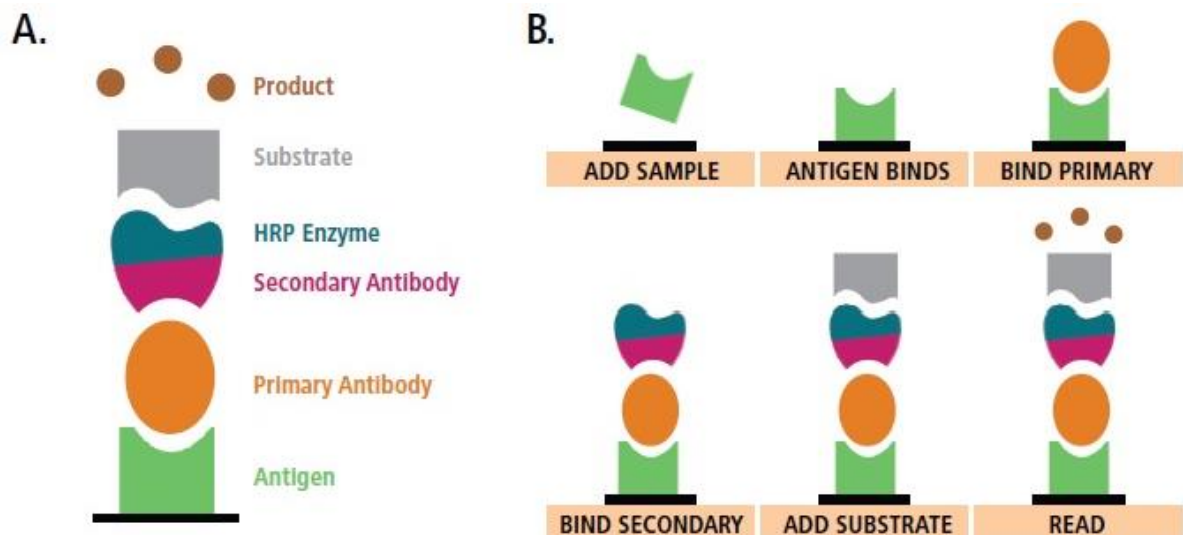


Figura 1

Finalmente, se agrega una solución de sustrato de ABTS y peróxido de hidrógeno a cada pozo. La enzima HRP ligada al anticuerpo secundario puede oxidar el ABTS en los pocillos donde está presente el complejo antígeno-anticuerpo, tornando la solución de sustrato transparente azul-verde.

Es importante destacar que la reacción enzima-sustrato solo puede ocurrir si cada paso del ELISA se realiza correctamente. Si la proteína objetivo no está presente en la solución de la muestra, o si la concentración es demasiado baja, los anticuerpos primarios y secundarios no tendrán nada con qué unirse y serán eliminados del pozo. Del mismo modo, incluso si el antígeno está presente se detectará si se utiliza el anticuerpo primario incorrecto. En cada uno de estos escenarios, no habrá enzima HRP disponible y el sustrato ABTS permanecerá incoloro.

Durante un ELISA cuantitativo, algunos de los pocillos contendrán soluciones donde ya se conoce la concentración del antígeno. **Estas muestras se crean comúnmente al diluir el antígeno para crear una curva estándar que contiene un amplio rango de concentraciones de antígeno. La intensidad del sustrato en las muestras desconocidas se puede comparar con la curva estándar para determinar una concentración de antígeno aproximada.**

En este experimento, se realizará un ELISA para examinar dos antígenos diferentes en muestras experimentales. El anticuerpo primario 1 solo detectará el antígeno A, mientras que el anticuerpo primario 2 es específico para el antígeno B. Ambos anticuerpos primarios pueden ser detectados por el mismo anticuerpo secundario. Se crearán curvas estándar para cada par de antígenos y anticuerpos para permitir una cuantificación precisa de las proteínas. Finalmente, se examinará la especificidad del ELISA intercambiando los pares antígeno-anticuerpo.

4. DESCRIPCIÓN DEL EXPERIMENTO

En esta práctica, los estudiantes dominarán los conceptos y la metodología detrás del ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas cuantitativo (ELISA). Los estudiantes realizarán un ELISA para detectar la concentración de dos antígenos diferentes. Se creará una curva estándar para cada antígeno para permitir una cuantificación precisa en muestras desconocidas.

4.1 Precauciones

1. Se deben usar los guantes y gafas de protección de forma rutinaria como buenas prácticas de laboratorio.
2. Deben tener mucho cuidado al trabajar con equipos que utilizan calor y/o fusión de los reactivos.
3. NO PIPETEAR LOS REACTIVOS CON LA BOCA- PIPETEAR CON PERAS DE SUCCIÓN.
4. Se deben lavar bien 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 Libreta de laboratorio

Registrar la siguiente información en la libreta 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 para este experimento.
- Predecir los resultados del experimento.

Durante el Experimento:

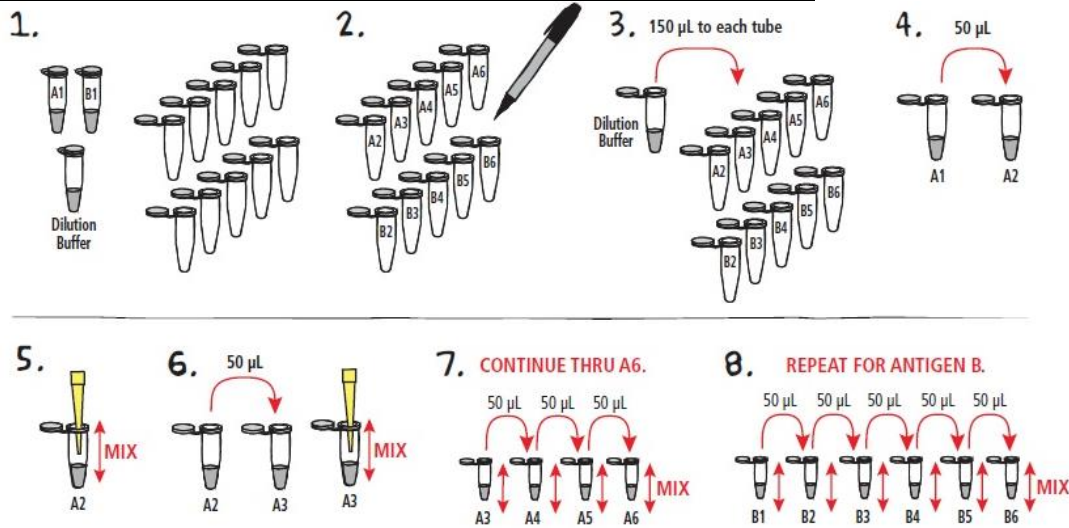
- Registrar (dibujar) las observaciones o fotografiar los resultados.

Después del Experimento:

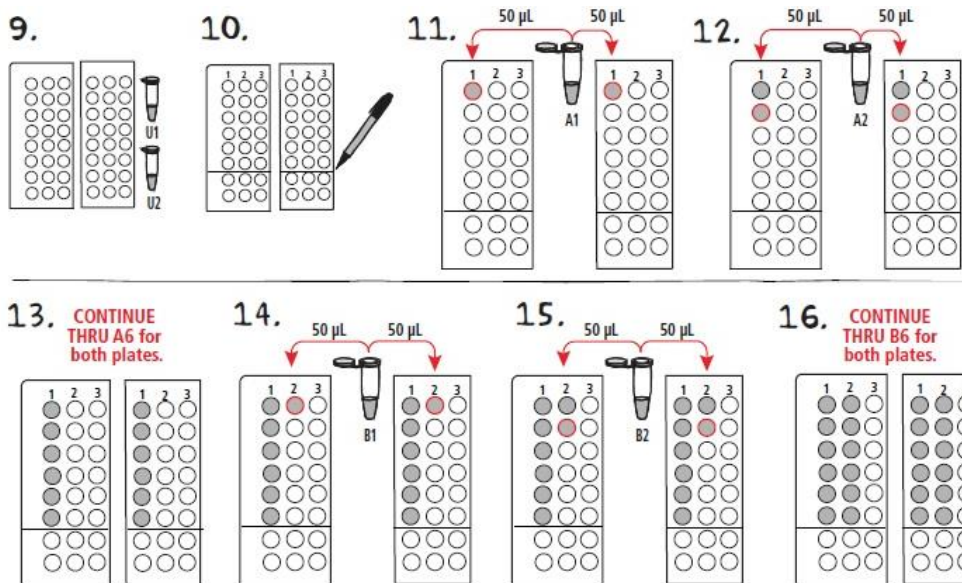
- Formular una explicación a partir de los resultados.
- Determinar qué se podría cambiar en el experimento si se repitiera.
- Escribir una hipótesis que refleje este cambio.

Módulo I: Realización de un ELISA Cuantitativo

CREACIÓN DE DILUCIONES ESTÁNDAR DE PROTEÍNAS



1. PREPARAR los tubos de Antígeno A (A1) y Antígeno B (B1) concentrados, tubos vacíos de microcentrífuga y un tubo de Tampón de Dilución.
2. ETIQUETAR 5 tubos como A2-A6 para el Antígeno A, y un segundo conjunto de tubos como B2-B6 para el Antígeno B.
3. Usando una micropipeta, AGREGAR 150 µL de tampón de dilución a cada uno de los tubos de microcentrífuga etiquetados del paso 2.
4. TRANSFERIR 50 µL de antígeno del tubo A1 al tubo A2.
5. MEZCLAR completamente la muestra pipeteando arriba y abajo 5 veces.
6. Usando la misma punta de pipeta, TRANSFERIR 50 µL del tubo A2 al tubo A3 y mezclar como en el paso 5.
7. Continúe DILUYENDO en serie las muestras restantes a través del tubo A6.
8. REPITA los pasos 4-7 para crear diluciones en serie de Antígeno B.



AÑADIR LOS ANTÍGENOS A LAS PLACAS ELISA

9. OBTENER dos placas ELISA de microtitulación y tubos de Desconocido 1 y Desconocido 2. Cada placa contiene 3 columnas y 8 filas de pocillos.

10. Con un marcador de punta fina, ETIQUETAR la columna izquierda de cada placa como "1", la columna central como "2" y la columna derecha como "3". Finalmente, DIBUJAR una línea entre las filas 6 y 7 en ambas placas. Solo utilizará los pocillos en la sección superior de cada placa.

11. Con una punta de pipeta nueva, TRANSFERIR 50 µL del tubo A1 al pozo superior izquierdo de CADA placa (columna 1, fila 1).

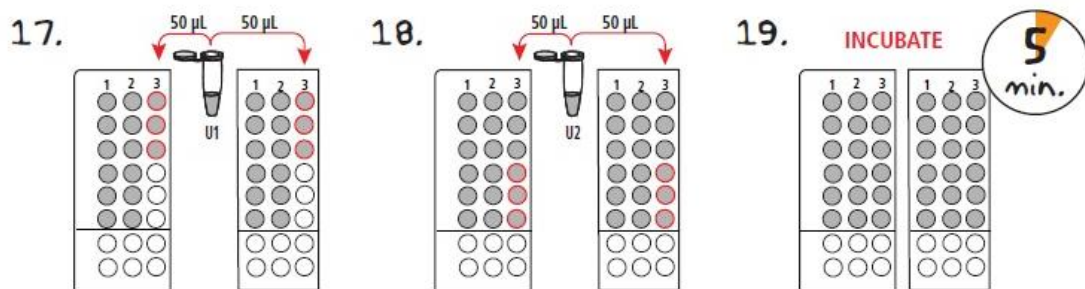
12. Con una punta de pipeta nueva, TRANSFERIR 50 µL del tubo A2 al pozo directamente debajo de la muestra del paso 11 (columna 1, fila 2).

13. Continuar con la TRANSFERENCIA de 50 µL de las muestras restantes de Antígeno A en los pocillos correspondientes de la columna 1 en ambas placas.

14. Con una punta de pipeta nueva, TRANSFERIR 50 µL del tubo B1 al pozo central superior de CADA placa (columna 2, fila 1).

15. Con una punta de pipeta nueva, TRANSFERIR 50 µL del tubo B2 al pozo directamente debajo de la muestra del paso 14 (columna 2, fila 2).

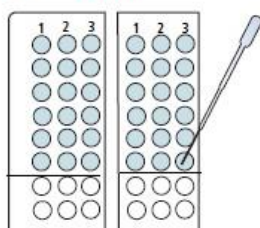
16. Continúe agregando 50 µL de las muestras restantes de Antígeno B en los pocillos correspondientes de la columna 2 en ambas placas.



20. **INVERT & TAP**



21. **WASH**



22. **INVERT & TAP**



23. **REPEAT WASH, INVERT & TAP**

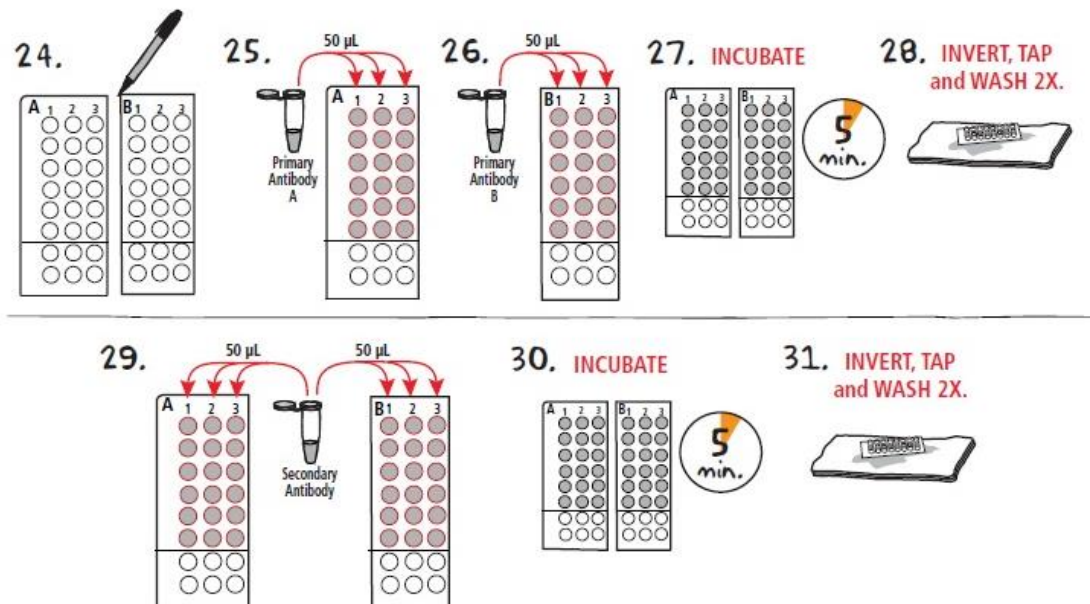
17. Con una punta de pipeta nueva, TRANSFERIR 50 μ L del tubo U1 a los tres pocillos superiores de la columna derecha de CADA placa (columna 3, filas 1-3).
18. Con una punta de pipeta nueva, TRANSFERIR 50 μ L del tubo U2 a los siguientes tres pocillos de la columna derecha de CADA placa (columna 3, filas 4-6).
19. INCUBAR ambas placas durante 5 minutos a temperatura ambiente.

ELIMINACIÓN DE MUESTRAS Y LAVADO DE LOS POCILLOS

20. INVERTIR las placas sobre el fregadero o una pila de toallas de papel para retirar las muestras. Tape suavemente las placas 4-5 veces sobre una toalla de papel nueva. DESECHAR las toallas de papel mojadas.
21. Usando una pipeta de transferencia, AGREGAR el tampón de lavado para llenar cada pocillo, teniendo cuidado de no llenar en exceso.

NOTA: Para minimizar la contaminación cruzada, es importante evitar derramar tampón en los pozos vecinos.

22. REPITA el paso 20 para ELIMINAR el tampón de lavado.
23. Usando la misma pipeta de transferencia, REPETIR el lavado por segunda vez. INVERTIR las tiras sobre toallas de papel frescas y GOLPEAR.

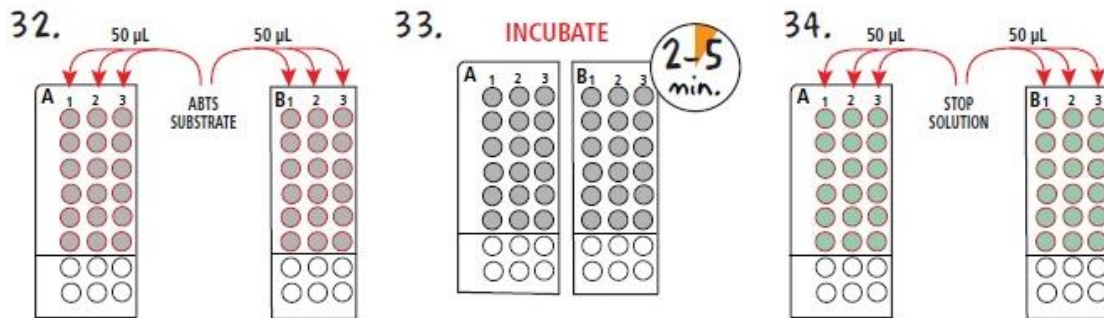


ADICIÓN DE ANTICUERPOS PRIMARIO Y SECUNDARIO

24. Usando un marcador de punta fina, ETIQUETAR una placa con "A" y la otra con "B".
25. Con una punta de micropipeta nueva, AÑADIR 50 μ L del anticuerpo primario A (AbA) a cada pocillo de muestra en la placa A.
26. Con una punta de micropipeta nueva, AÑADIR 50 μ L de anticuerpo primario B (AbB) a cada pocillo de muestra en la placa B.
27. INCUBAR durante 5 minutos a temperatura ambiente.
28. INVERTIR sobre toallas de papel y GOLPEAR. LAVAR los pozos dos veces como en los pasos 20-23.
29. Con una punta de micropipeta nueva, AÑADIR 50 μ L del anticuerpo secundario (2°AB) a cada pocillo de muestra en AMBAS placas.
30. INCUBAR durante 5 minutos a temperatura ambiente.

31. INVERTIR sobre toallas de papel y GOLPEAR. LAVAR los pozos dos veces como en los pasos 20-23.

ADICIÓN DE SUSTRATO



32. Con una punta de micropipeta nueva, AÑADIR 50 µL de sustrato ABTS a cada pocillo de muestra en AMBAS placas.

33. INCUBAR la placa durante 2-5 minutos a temperatura ambiente, o hasta que el color ya no cambie en los pocillos con las concentraciones de antígeno más altas.

NOTA: Es importante que no se permita que la reacción prosiga durante más de 10 minutos, ya que la reacción enzimática puede saturarse en las concentraciones más altas de sustrato.

34. Con una punta de micropipeta nueva, AÑADIR 50 µL de solución de parada a cada pocillo de muestra en AMBAS placas. Toca suavemente las placas para MEZCLAR.

35. DOCUMENTAR los resultados usando una cámara digital para tomar una fotografía. Colocar las placas sobre una hoja de papel blanca o una caja de luz blanca puede aumentar el contraste entre los pocillos.

36. PROCEDER inmediatamente al Módulo II: Análisis de ELISA Cuantitativo.

Módulo II-A: Análisis de ELISA Cuantitativo

1. OBSERVAR el color de las reacciones en tus curvas estándar en ambas placas. Debería haber un sustrato verde fuerte en los pocillos más concentrados que se desvanece gradualmente en los pocillos que recibieron muestras más diluidas (a medida que se desplaza hacia abajo en una columna).

2. CONFIRMAR que los anticuerpos solo pudieron detectar sus antígenos específicos (el anticuerpo A solo debe detectar el antígeno A) examinando la columna 2 en la placa A y la columna 1 en la placa B.

3. Usando las curvas estándar, ESTIMAR la concentración de Antígenos A y B en las dos muestras Desconocidas. Registrar los resultados en la siguiente Tabla:

Tabla :Concentraciones y diluciones de las curvas estándar				
	Antígeno A Curva estándar		Antígen B Curva estándar	
	Dilución	Concentración	Dilución	Concentración
Línea 1	1:1	8 µg/ml	1:1	8 µg/ml
Línea 2	1:4		1:4	
Línea 3	1:16		1:16	
Línea 4	1:64		1:64	

Línea 5	1:256		1:256	
Línea 6	1:1024		1:1024	

MODULO II-B. Análisis cuantitativo

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 antígeno determina cuántas moléculas de ABTS se oxidan. El ATBS oxidado convierte la solución en verde, lo que lleva a una mayor absorción de luz. Por lo tanto, al medir la intensidad del color de la muestra en los pocillos de la curva estándar de concentración conocida, podemos establecer una relación entre la concentración de antígeno y la absorción de luz. Esta relación se describe mediante la ecuación de la curva estándar. Usando la ecuación, podemos estimar la concentración original de antígeno en la muestra desconocida.

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

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

1. Calcular el valor gris medio y la concentración de proteína para los pocillos de la curva estándar de cada antígeno.
 - a. GUARDAR la imagen digital de sus resultados como JPEG en la computadora.
 - b. ABRIR el programa ImageJ en su computadora.
 - c. Ve a Archivo > Abrir y abre tu imagen.
 - d. Vaya a Imagen > Tipo > 32 bits.
 - e. Vaya a Edición > Invertir.
 - f. Vaya 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 dividiendo por el número total de píxeles.

- g. ELEGIR la herramienta de selección redonda y dibuje un círculo alrededor del primer pocillo.
- h. Ir a Analizar > Medir. Debería aparecer una nueva ventana titulada resultados. REGISTRAR los resultados para el "valor medio de gris" en el cuaderno de laboratorio o en la tabla a continuación.
- 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 pozo siguiente. REPETIR el paso h para todos los pozos restantes en ambas placas.
- j. COMPLETAR las Tablas 1 y 2 utilizando los valores grises medios y las concentraciones de antígeno de la Tabla 3.

Table 1: Calculations for the Standard Curve of Antigen A			
Well	Dilution	Mean Gray Value	Antigen A Concentration
1	1:1		8 µg/mL
2	1:4		
3	1:16		
4	1:64		
5	1:256		
6	1:1024		

Table 2: Calculations for the Standard Curve of Antigen B			
Well	Dilution	Mean Gray Value	Antigen B Concentration
1	1:1		8 µg/mL
2	1:4		
3	1:16		
4	1:64		
5	1:256		
6	1:1024		

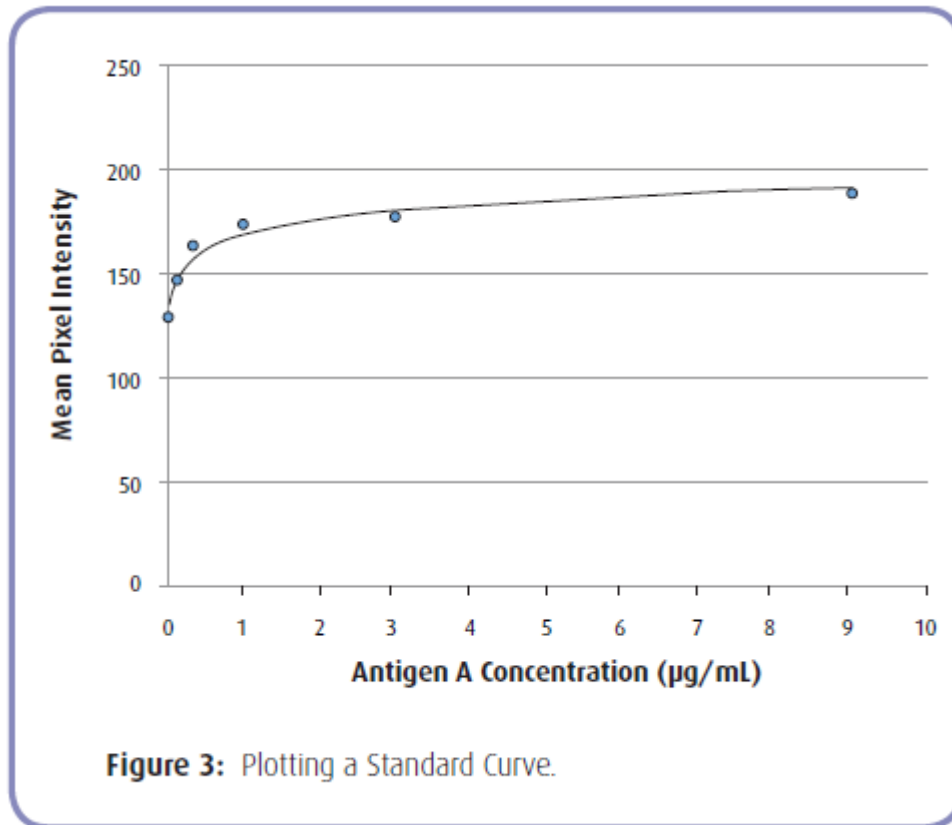
OPCIONAL: Si se dispone de un espectrofotómetro, la absorbancia de ABTS se puede medir a 420 nm. Transferir las muestras a la placa o cubeta adecuada y medir la absorbancia de la curva estándar y las muestras desconocidas. La curva estándar se puede utilizar para medir con precisión la concentración de antígenos en las muestras desconocidas.

2. Crear una curva estándar.

a. GRAFICAR la concentración de antígeno (eje x) contra el valor gris medio (eje y) para cada concentración estándar para el antígeno A.

b. DIBUJAR una curva de mejor ajuste a través de los puntos en el gráfico (para mejores resultados sugerimos usar software de gráficos). Registrar la ecuación de su curva para usarla más adelante.

C. REPETIR los pasos 2a y 2b para el antígeno B.



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

3. Determinar la concentración de la proteína objetivo en las muestras desconocidas.

a. Encontrar los valores grises medios de la muestra en los pocillos desconocidos como en el paso 1.

b. Determinar el valor de gris promedio para cada muestra desconocida.

c. Desde el eje Y del gráfico de la curva estándar, extender una línea horizontal desde este valor de absorbancia hasta la curva estándar. En el punto de intersección, extender una línea vertical hasta el eje X y leer la concentración correspondiente. Como alternativa, usar la ecuación de la curva de mejor ajuste para resolver X dado el valor de Y (consultar la Figura 4). Se tiene que hacer esto dos veces para cada incógnita: una para el antígeno A y otra para el antígeno B.

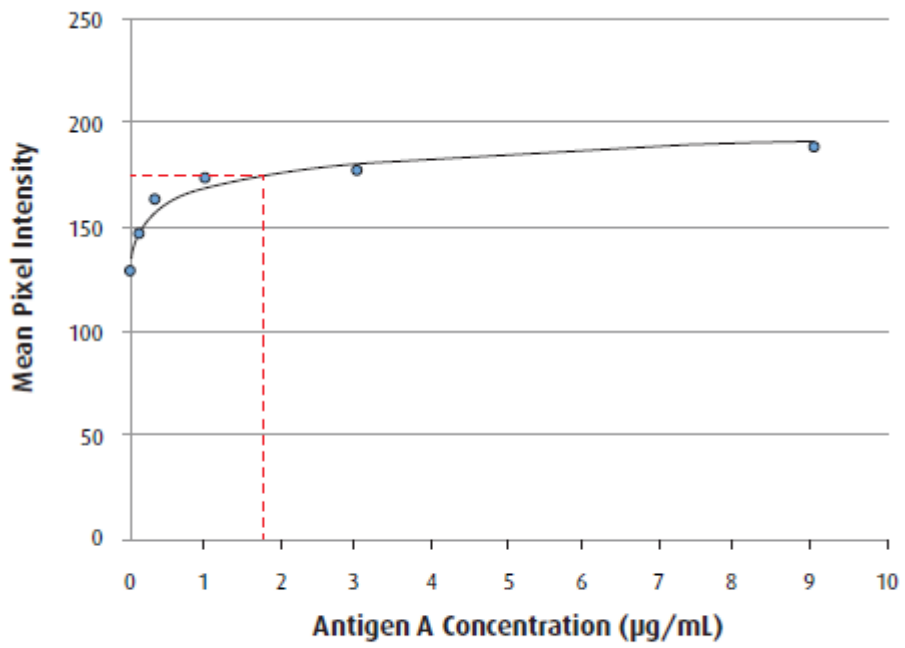


Figure 4: Determining a Protein Concentration.

Según los cálculos realizados, ¿cuál es la concentración de cada antígeno en las muestras desconocidas?

Preguntas de estudio

1. Describir un experimento ELISA que comience con la adición de muestras de antígeno al pocillo y finalice con la reacción de cambio de color del sustrato.
2. ¿Por qué es importante lavar todos los pozos entre la adición de los componentes durante el ELISA?
3. ¿Qué puede pasar si se permite que el sustrato reaccione por más de 10 minutos sin agregar la solución de parada?
4. ¿Por qué era importante probar el Anticuerpo A con el Antígeno B y el Anticuerpo B con el Antígeno A?

5. GUIA DEL PROFESOR

5.1 DESCRIPCIÓN GENERAL DE LA PREPARACIÓN PRELABORATORIO DEL PROFESOR:

Es necesario preparar los antígenos, anticuerpos y tampones antes de realizar el experimento. Todos los componentes deben mantenerse a 4° C en la oscuridad hasta que se necesiten. Se puede proporcionar una hoja o tabla de trabajo a estudiantes (como la presentada a continuación) para ayudar a los estudiantes a recolectar los reactivos necesarios y realizar el experimento.

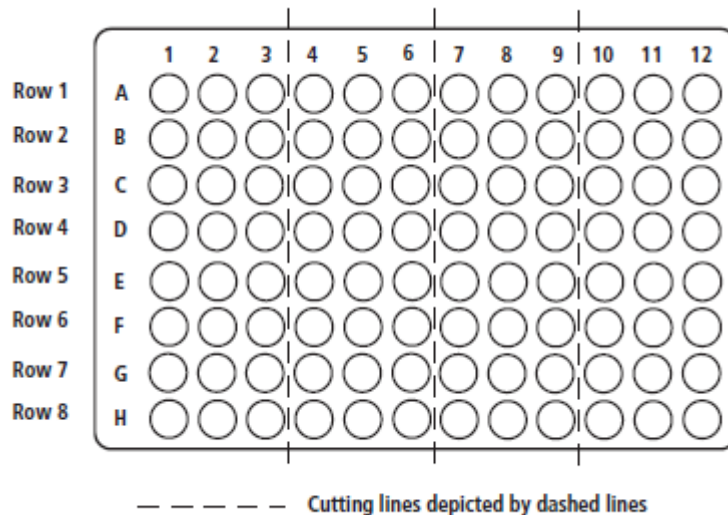
Each Student Group should receive:	Check (✓)
10 Empty 0.5 mL Microcentrifuge tubes	<input type="checkbox"/>
1 Microtiter plates (3x8 well)	<input type="checkbox"/>
1 Microcentrifuge tube containing 1.6 mL Dilution Buffer	<input type="checkbox"/>
1 Microcentrifuge tube containing 180 µL Antigen A (A1)	<input type="checkbox"/>
1 Microcentrifuge tube containing 180 µL Antigen B (B1)	<input type="checkbox"/>
1 Microcentrifuge tube containing 360 µL Unknown 1 (U1)	<input type="checkbox"/>
1 Microcentrifuge tube containing 360 µL Unknown 2 (U2)	<input type="checkbox"/>
1 Microcentrifuge tube containing 1.1 mL Antibody A (AbA)	<input type="checkbox"/>
1 Microcentrifuge tube containing 1.1 mL Antibody B (AbB)	<input type="checkbox"/>
1 Microcentrifuge tube containing 1.9 mL Secondary Antibody (2°AB)	<input type="checkbox"/>
1 Microcentrifuge tube containing 1.9 mL Substrate 2 (ABTS)	<input type="checkbox"/>
1 Microcentrifuge tube containing 1.9 mL Stop Solution (Stop)	<input type="checkbox"/>
1 Transfer pipet	<input type="checkbox"/>
1 Beaker containing 55 mL 1X Wash Buffer	<input type="checkbox"/>
• Paper towels	<input type="checkbox"/>

NOTA: Este experimento está diseñado para realizarse en el transcurso de una sesión de laboratorio y debe durar aproximadamente entre 45 y 60 minutos. Si es necesario, el experimento se puede detener después del primer lavado, paso 23 en la página 7. En caso de parada, indicar a los estudiantes que deben agregar tampón de lavado a cada pocillo de sus placas, cubrir con cuidado con una envoltura de plástico o colocarlas en una bolsa de plástico para evitar la evaporación y guardar las placas durante la noche a 4 °C. No es recomendable almacenar las placas por más de 24 horas antes de continuar con el experimento.

MODULO I. Realización de Elisa Cuantitativo

PREPARACIÓN DE LA PLACA DE MICROTITULCIÓN

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. Dividir cada plato en las líneas punteadas como se muestra en la figura anterior. Cada pieza contendrá 3 pocillos en un eje y 8 pocillos en el otro eje. Cada grupo de laboratorio recibirá dos piezas.

PREPARACIÓN DE ANTIGENO

Los antígenos utilizados en este experimento se suministran como proteínas liofilizadas y deben rehidratarse antes de su uso. Seguir las instrucciones detalladas a continuación para preparar los antígenos A y B como soluciones madre de 8 µg/ml. Estos se utilizarán para que los estudiantes creen curvas estándar, así como para las muestras desconocidas.

1. Dispensar 1,6 ml del tampón de dilución (Componente C) en 10 tubos de microcentrífuga y etiquetarlos como "Tampón de dilución". Reservar el tampón restante para la preparación de las muestras de antígeno.
2. Transferir 5 ml de tampón de dilución (componente C) a un tubo cónico de 15 ml. Etiquetar el tubo como "A1".
3. Transferir aproximadamente 0,5 ml del tampón de dilución del paso 2 al tubo de antígeno A (componente A). Pipetear hacia arriba y hacia abajo o agitar para mezclar.
4. Transferir todo el contenido del antígeno A reconstituido nuevamente al tubo de 15 ml del paso 2. Mezclar bien.
5. Dispensar 180 µL de antígeno A reconstituido en diez tubos de microcentrífuga con tapa a presión de 0,5 ml. Etiquetar los tubos como "A1". Guardar el antígeno A restante para las muestras desconocidas.
6. Utilizando un tubo cónico nuevo de 15 ml, repetir los pasos 2 a 4 para el antígeno B (Componente B).
7. Dispensar 180 µL de antígeno B reconstituido en diez tubos de microcentrífuga con tapa a presión de 0,5 ml. Etiquetar los tubos como "B1". Guardar el antígeno B restante para las muestras desconocidas.

PREPARACIÓN DE MUESTRAS DESCONOCIDAS

1. Etiquetar un tubo de 5 ml como "Un1" y un segundo tubo como "Un2" y preparar las muestras desconocidas utilizando el tampón de dilución y los antígenos rehidratados de la sección anterior.

Sample	Dilution Buffer	Antigen A	Antigen B
Unknown 1	2600 µL	1300 µL	50 µL
Unknown 2	3400 µL	20 µL	580 µL

2. Dispensar 360 µL de Desconocido 1 en diez tubos de microcentrífuga de 0,5 ml. Etiquetar los tubos como "U1".
3. Dispensar 360 µL de Desconocido 2 en diez tubos de microcentrífuga de 0,5 ml. Etiquetar los tubos como "U2".

PREPARACIÓN DE LOS ANTICUERPOS PRIMARIOS

1. Transferir 12 ml de tampón de dilución (componente C) a un tubo cónico de 15 ml. Etiquetar el tubo como "AntiA".
2. Retirar con cuidado el tapón del vial del anticuerpo primario A (componente D) y transferir aproximadamente 0,5 ml del tampón de dilución del 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. Dispensar 1,1 ml de anticuerpo primario A en 10 tubos de microcentrífuga. Etiquetar los tubos como "AbA" o "1°A".
5. Repetir los pasos 1-3 para el Anticuerpo B (Componente E) utilizando un tubo cónico de 15 ml nuevo.
6. Dispensar 1,1 ml de anticuerpo primario B en 10 tubos de microcentrífuga. Etiquetar los tubos como "AbB" o "1°B".

PREPARACIÓN DEL TAMPÓN DE LAVADO 1x

1. Agregar el contenido del tampón de lavado 10x (componente F) a 540 ml de agua destilada. Mezclar bien.
2. Dispensar 55 ml del tampón de lavado diluido en un vaso de precipitados pequeño para cada grupo. Etiquetar los vasos de precipitado como "tampón de lavado". Guardar el tampón de lavado restante para rehidratar el anticuerpo secundario.

DILUCIÓN DEL ANTICUERPO SECUNDARIO

Preparar el mismo día que sea necesario para la práctica.

NOTA: Se debe utilizar **TAMPÓN DE LAVADO DILUIDO** para preparar el anticuerpo secundario.

1. Transferir 19 ml de tampón de lavado diluido a un tubo cónico de 50 ml. Etiquetar el tubo "2°AB".
2. Retirar con cuidado el tapón del vial de Anticuerpo Secundario (Componente G) y transferir aproximadamente 0,5 ml del tampón de lavado 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 50 ml del paso 1. Mezclar bien.

4. Etiquetar 10 tubos de microcentrífuga "2°AB" y dispensar 1,9 ml por tubo.

PREPARACIÓN DEL SUSTRATO ABTS Y SOLUCIÓN DE PARADA

1. Dispensar 1,9 ml de ABTS (Componente H) en 10 tubos de microcentrífuga. Etiquetar los tubos como "ABTS".

2. Dispensar 1,9 ml de solución de parada (componente I) en 10 tubos de microcentrífuga. Etiquetar los tubos como "Stop".

NOTA: La solución de parada puede precipitar cuando se almacena a 4 °C. Si se observa un precipitado, calentar suavemente la solución para volver a suspenderla antes de dividirla en alícuotas.

CADA GRUPO DE ESTUDIANTES DEBE RECIBIR EL SIGUIENTE MATERIAL:

10 tubos de microcentrífuga vacíos de 0,5 ml
2 placas de microtitulación (3x8 pocillos)
1 tubo de microcentrífuga que contiene 1,6 ml de tampón de dilución
1 tubo de microcentrífuga que contiene 180 µL de antígeno A (A1)
1 tubo de microcentrífuga que contiene 180 µL de antígeno B (B1)
1 tubo de microcentrífuga que contiene 360 µL Desconocido 1 (U1)
1 tubo de microcentrífuga que contiene 360 µL Desconocido 2 (U2)
1 tubo de microcentrífuga que contiene 1,1 ml de anticuerpo A (AbA)
1 tubo de microcentrífuga que contiene 1,1 ml de anticuerpo B (AbB)
1 tubo de microcentrífuga que contiene 1,9 ml de anticuerpo secundario (2°AB)
1 tubo de microcentrífuga que contiene 1,9 ml de sustrato (ABTS)
1 tubo de microcentrífuga que contiene 1,9 ml de solución de parada (parada)
1 pipeta de transferencia
1 vaso de precipitados que contenga 55 ml de tampón de lavado PBST 1x
• Toallas de papel

6. 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. Lavar los pocillos suave y lentamente, sin forzar.

7. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE LA PRÁCTICA

A continuación se puede ver un ELISA representativo. La intensidad de las reacciones variará ligeramente debido a las diferencias en los tiempos de incubación y la temperatura de los reactivos, pero los resultados deberían ser similares.

Las muestras desconocidas deben compararse con las curvas estándar para determinar la concentración de antígeno en cada muestra.

