

# Protocolo

## ELISA DE COMPETENCIA

### 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

#### Materiales proporcionados en el kit para 6 grupos de estudiantes

Componentes	Concentración (mg/ml)	Volumen (µl) x No. de viales	CONSERVACIÓN
Competidor	1 mg/ml	5x10	4°C*
Estándar	1 mg/ml	5x10	4°C*
Muestra	5x	5x10	4°C*
Estreptavidina Peroxidasa	100x	10x10	-20°C
Sustrato		2000x10	4°C
Solución Stop		2000x10	4°C
Tampón de dilución	10x	5000x10	4°C
Tampón de lavado (PBS-Tween 20)	20x	5000x5	Temperatura ambiente
Placas de microtitulación	5 placas (Cada placa está preparada para dos grupos de estudiantes) Grupo1: Columnas 3-4; Grupo2: Columna 7-8		4°C

*\* Mantener a 4°C durante 1-2 semanas, para tiempos más prolongados almacenar a -20°C*

#### NOTAS:

- 1- Tras la recepción, almacene los componentes según las indicaciones de conservación reflejadas en la tabla.
- 2- Ninguno de los componentes de este kit se ha preparado a partir de material humano.
- 3- 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.

# Protocolo

## Materiales necesarios no administrados por el kit:

- Guantes desechables de laboratorio.
- Gafas protectoras.
- Micropipetas automáticas (5-50  $\mu$ l) y (100-1000  $\mu$ l) y puntas desechables.
- Estufa de cultivo 37°C.

## 3. INTRODUCCIÓN

### Principios de la técnica de ELISA

El ELISA (acrónimo del inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*: 'ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas'), es una técnica potente y ampliamente extendida, que ha sido utilizada en las últimas décadas para la detección de diferentes moléculas tanto con fines de diagnóstico como de investigación. Esta técnica permite la detección de biomoléculas con una alta especificidad y sensibilidad, ya que se basa en la interacción específica entre una molécula de antígeno y su anticuerpo, asociando la lectura a una reacción enzimática posterior que produce una señal colorimétrica, de fluorescencia o luminiscencia.

Los **anticuerpos** son proteínas humanas y animales específicas que se producen por las células blancas de la sangre en respuesta a moléculas u organismos extraños. Estos materiales extraños son conocidos como **antígenos** y pueden ser 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 estos de la 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).

Cada molécula de anticuerpo tiene dos sitios de reconocimiento al antígeno. Este reconocimiento y la unión son altamente específicos y varía en cuanto a afinidad en dependencia del anticuerpo.

Los anticuerpos pueden ser monoclonales o policlonales. Los anticuerpos policlonales son una mezcla de anticuerpos que reconocen diferentes epítomos de un antígeno. Estos anticuerpos, generalmente obtenidos en conejos, cabras, ovejas, etcétera, son producidos por la inmunización de estos organismos con el antígeno y su posterior purificación del suero de estos.

Los anticuerpos monoclonales reconocen solo un epitopo de un antígeno por lo que son más específicos y no producen reacciones cruzadas con otros antígenos. Estos anticuerpos son producidos mediante fusión celular en el laboratorio o mediante ingeniería genética.

Cuando un antígeno y sus anticuerpos forman complejos insolubles, esta reacción de unión altamente específica es conocida como la **inmunoprecipitación**.

## 4. DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ELISA DE COMPETENCIA

La técnica de ELISA puede ser utilizada para la detección y cuantificación de analitos, los cuales pueden ser tanto **antígenos** como **anticuerpos**. Entre los antígenos podemos citar toxinas, alérgenos, proteínas plasmáticas, marcadores tumorales, células, etc. Por otra parte, los anticuerpos que generalmente se cuantifican son los que se encuentran circulando en sangre a causa de la presencia de determinadas patologías, ya sea en animales o en el humano.

El ELISA se realiza en placas de microtitulación que generalmente están hechas de poliestireno o cloruro de polivinilo. Las placas pueden ser transparentes, blancas o negras en dependencia de la lectura final del ensayo, lectura colorimétrica, de fluorescencia o de luminiscencia. Estas placas pueden ser de 96 o 384 pocillos. Las placas están preparadas para fomentar la unión, generalmente, de proteínas mediante interacciones hidrofóbicas y electrostáticas.

El ELISA de competencia se basa en la utilización de un competidor biotinilado que competirá con el antígeno a cuantificar, de modo, que a mayor presencia de antígeno en la muestra menor señal se obtendrá en el ELISA.

## 5. DESCRIPCIÓN DEL EXPERIMENTO

**El objetivo de esta práctica es realizar y dominar los conceptos experimentales y la metodología implicados en un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Los estudiantes realizarán un ELISA para detectar la concentración de una muestra que contiene el antígeno. Se creará una curva estándar del antígeno para permitir una cuantificación precisa.**

### 5.1. 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. Lavarse bien siempre las manos con agua y jabón después de manipular reactivos o materiales biológicos del laboratorio.
5. Tener cuidado al usar cualquier equipo eléctrico en el laboratorio.

### 5.2. Requisitos de tiempo (aproximado) de los procedimientos de la práctica

Este experimento está destinado a ejecutarse en el transcurso de un único período de laboratorio y debe tomar aproximadamente 90-120 minutos.

# Protocolo

## 5.3. Preparaciones previas

### Día de la práctica

- Solución de lavado: La solución de lavado se utiliza a 1x. Diluir la solución de lavado 20 veces con agua destilada.
- Tampón de dilución: El tampón de dilución se utiliza 1x. Diluir el tampón de dilución 10 veces con agua destilada.

## 5.4. Protocolo del ELISA

1. En las placas recubiertas, añadir 50 µl de cada concentración del estándar y de la muestra, ambas por duplicado, como se muestra en la Tabla. La muestra va diluida 5 veces en el ensayo. Todas las diluciones se realizan en tampón de dilución. En el caso de los controles negativos añadir 50 µl del tampón de dilución.

**Nota:** Las placas están recubiertas en las columnas 3-4 y en las columnas 7-8. Cada grupo de estudiante utiliza 2 columnas, por tanto, cada placa está preparada para dos grupos de estudiantes.

	GRUPO 1				GRUPO 2							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

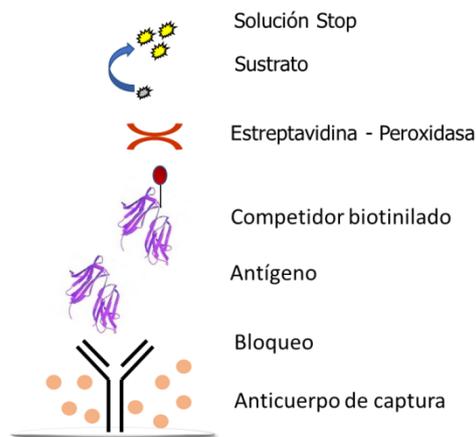
  

	3	4
A	500 ng/ml estándar	
B	250 ng/ml estándar	
C	125 ng/ml estándar	
D	62,5 ng/ml estándar	
E	31,25 ng/ml estándar	
F	Muestra	
G	Control negativo	
H	Control negativo	

# Protocolo

2. Añadir inmediatamente en los pocillos del estándar y de la muestra, 50 µl por pocillo del competidor a 50 ng/ml diluido en tampón de dilución. En los pocillos correspondientes al control negativo añadir 50 µl del tampón de dilución. Incubar 1 hora a 37°C.
3. Lavar cada pocillo con 200 µl de solución de lavado. Eliminar el contenido volcando la placa y secando sobre papel de filtro. Repetir un total de tres veces. **(NO hacer el último lavado hasta que la dilución de la estreptavidina peroxidasa no esté preparada).**
4. Diluir la estreptavidina peroxidasa 100 veces en el tampón de dilución protegida de la luz. Añadir 50 µl por pocillo en todos incluido el control negativo. Incubar 30 minutos a temperatura ambiente protegido de la luz.
5. Atemperar el sustrato de la reacción al menos 20 minutos.
6. Lavar cada pocillo con 200 µl de solución de lavado. Eliminar el contenido volcando la placa y secando sobre papel de filtro. Repetir un total de tres veces.
7. Añadir 100 µl por pocillo del sustrato protegido de la luz y observar reacción colorimétrica. Incubar a temperatura ambiente durante 20- 30 minutos.
8. Parar la reacción enzimática con 100 µl por pocillo de la solución Stop.
9. Leer la placa a 450 nm de longitud de onda en un lector de placas.
10. Realizar el análisis de los resultados en Excel.

## Esquema del ELISA



## 5.5. Análisis de los resultados

1. Hacer un promedio de cada concentración del estándar, la muestra y los 4 controles negativos. A cada uno restarle la media del control negativo.
2. Hacer el logaritmo de cada concentración del estándar.
3. Hacer una curva lineal del logaritmo de la concentración del estándar contra la media de las absorbancias menos la media del control negativo.

# Protocolo

4. Usar la ecuación de la recta para calcular la concentración de la muestra.

## Ejemplo del análisis de los resultados:

ng/ml Estándar	Log [Estándar] ng/ml	Media Absorbancia 450nm	Media Abs 450nm - Media Control (-)
500	2,6989700	0,195	0,020
250	2,3979400	0,605	0,430
125	2,0969100	1,315	1,140
62,5	1,7958800	1,956	1,781
31,25	1,4948500	2,765	2,590
Control (-)		0,175	0

