

Classes Pràctiques d'Immunologia

Grau en Biologia

Pràctica 1. Quantificació de la capacitat microbicida i de la capacitat fagocítica (mesurada per citometria de flux) de la sang humana.

Pràctica 2. Tècnica de Doble Immunodifusió o Ouchterlony: tècnica qualitativa o semiquantitativa utilitzada per a l'estudi poblacional d'anticossos específics y antígens presents en un sèrum.

Pràctica 3. ELISA indirecte (assaig immunosorbent lligat a enzims), per a quantificar anticossos específics en un sèrum, i ELISA competitiu per a quantificar un antigen.

PRÀCTICA 1

Quantificació de la capacitat fagocítica i microbicida de sang humana.

Introducció y objectius

La fagocitosi i destrucció de microorganismes per leucòcits polimorfonuclears (PMN) i macròfags (fagòcits professionals) és el mecanisme de defensa més important de totes les *filae* del regne animal. Malgrat els components defensius que han desenvolupat els vertebrats i que han culminat en els complexos sistemes immunològics dels mamífers, la fagocitosi continua sent el mecanisme efectiu principal per a l'eliminació de microorganismes invasors, o de partícules i cèl·lules innecessàries. És evident que les funcions fagocítiques han evolucionat juntament amb altres sistemes de la immunitat adaptativa i inespecífica, com són els anticossos i el complement, formant un conjunt fortament interdependent entre els seus respectius components.

Les tècniques utilitzades per a mesurar la fagocitosi utilitzen generalment bacteris (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, etc.) o fongs (*Candida albicans*), i els resultats presenten una variabilitat considerable entre diferents laboratoris. No obstant això, les tècniques que utilitzen *C. albicans* com a microorganisme fagocitable són les que ofereixen valors més concordants. A més, la mesura de la capacitat de fagocitar i destruir *C. albicans* és d'interés, ja que la incidència de les infeccions fúngiques invasives ha augmentat notablement en les últimes dècades a causa de la concurrència d'una sèrie de factors, com l'ús de pautes immunosupressores intensives en pacients neoplàsics i trasplantats. Cal indicar que *C. albicans* és un microorganisme patògen oportunista que causa diferents tipus d'infeccions, de les quals les candidiasis invasives (en què el fong passa a la sang i envaeix els òrgans interns) una de les principals causes de mortalitat en pacients immunocompromesos.

El protocol experimental que realitzarem pretén avaluar, d'una banda, la capacitat de les cèl·lules sanguínies per ingerir llevats i, de l'altra, la seua capacitat per destruir les cèl·lules del fong. Per a fer-ho, utilitzarem sang perifèrica completa de dos donants sans, que cocultivarem durant un temps determinat amb llevats vius.

Per a mesurar la fagocitosi utilitzarem llevats inactivats per fixació d'una soca de *C. albicans* que expressa la GFP ("Green Fluorescent Protein"), de manera que podrem detectar els llevats mesurant l'emissió de fluorescència, analitzant els cocultius mitjançant citometria de flux, després de lisar els eritròcits i fixar les mostres.

Per a mesurar la capacitat fungicida de la sang, utilitzarem llevats vius de *Saccharomyces cerevisiae* com a model (ja que per a treballar amb *C. albicans* viva cal disposar d'un laboratori amb nivell de bioseguretat 2). Després del cocultiu, determinarem el nombre de llevats viables quantificant el nombre d'unitats formadores de colònia (UFC) per recompte en placa. Com a control, es cocultivaran els llevats en presència del plasma sanguini corresponent.

NOTA IMPORTANT* L'ús de mostres de sang humana implica la seua manipulació com si es tractara de material infecciós. Els estudiants han d'acomplir les mesures de seguretat generals que ja coneixen. A més, han de portar en tot moment bata de laboratori i guants. Tot el material contaminat amb sang s'haurà de dipositar en els contenidors disposats a tal efecte.

PRÀCTICA 1-A. Estudi de la capacitat fungicida de cèl·lules sanguínies humanes.**Materials y reactius**

- Cultiu crescut en medi líquid YPD de *S. cerevisiae*
- Mostres de sang perifèrica recollides per punció venosa amb l'anticoagulant heparina de liti (n = 2)
- Plaques de medi agar dextrosa Sabouraud
- Medi RPMI 1640 (Gibco)
- Tampó fosfat salí (PBS) estèril
- Aigua estèril
- Micropipetes i puntes de 2 a 1000 µl
- Tubs d'assaig i gradetes per a preparar dilucions
- Anses de Digradlsky i recipients amb alcohol
- Microcentrífuga
- Microscopis
- Càmeres de Neubauer
- Agitadors mecànics

Protocol experimental**1. Preparació del plasma:**

- Centrifugar 1,5 ml de sang completa 5 min a 3000 x g.
- Recuperar el sobrenedant de la centrifugació (plasma) i transvasar-lo a un tub eppendorf net.
- Centrifugar el plasma 5 min a 3000 x g.
- Recuperar el sobrenedant (plasma lliure de cèl·lules) i transvasar-lo a un tub net.

2. Preparació y recompte dels llevats:

- Centrifuga 1,5 ml del cultiu microbià per a recuperar els llevats 5 min a 3000 x g.
- Rentar els llevats amb PBS.
- Resuspendre'ls en PBS i fer un recompte microscòpic utilitzant la càmera de Neubauer (veure annex).
- Preparar una suspensió amb 50×10^6 llevats en 1 ml de PBS.

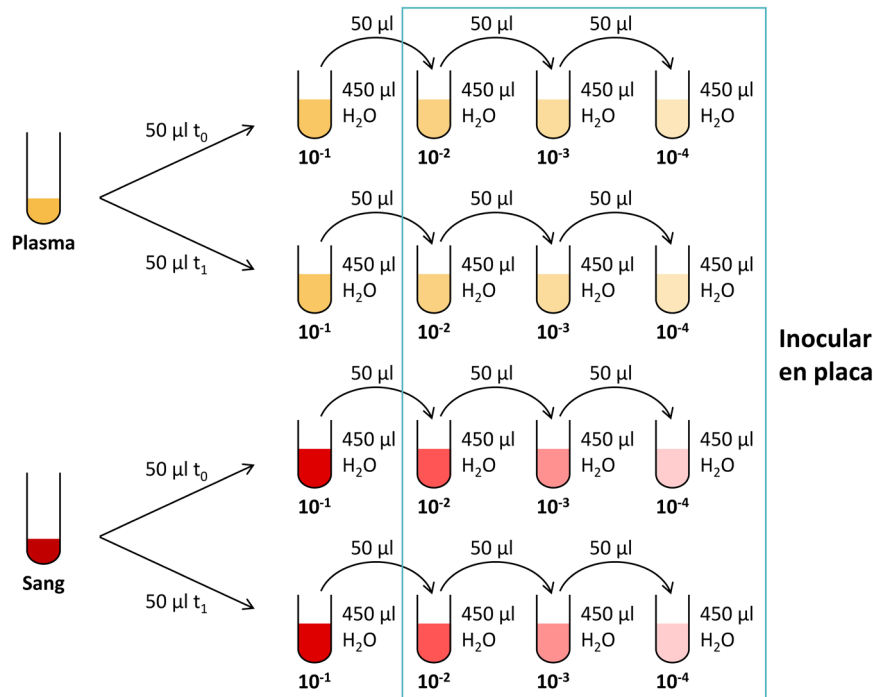
3. Preparar les següents mostres (volum final en el tub 200 µl):

Tub nº	RPMI (µl)	Sang (µl)	Plasma (µl)	Llevats (µl)
1 - Plasma	90	-	100	10
2- Sang	90	100	-	10

El nombre de llevats afegit ($0,5 \times 10^6$ llevats per 100 µl de sang) correspon, en individus amb un recompte leucocitari normal, a una ràtio 1:1 (llevat:leucòcit).

- Agitar bé i prendre una alíquota a t = 0 h de cada tub. Fer dilucions seriades en aigua estèril de cada mostra 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} (afegir 50 µl de la mostra a 450 µl d'aigua per a fer la primera dilució 10^{-1}).

- Incubar les mostres 1 h a 37 °C.
- Tornar a agitar bé i fer a t = 1 h les mateixes dilucions seriades en aigua estèril de cada mostra.
- Inocular 100 µl per placa d'agar dextrosa Sabouraud, de cadascuna de les dilucions 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, estenent l'inòcul amb ajuda de l'ansa de Digradlsky.



- Incubar las plaques tota la nit a 37 °C fins a l'aparició de las colònies.

Interpretació dels resultats

- Comptar el nombre d'UFCs en les plaques de les dilucions amb 30-300 colònies i determinar el nombre d'UFCs en el cocultiu amb plasma i amb sang a t₀ i t₁.

$$\frac{\text{UFCs}}{\text{ml}} = \text{UFCs contades} \times \frac{1}{\text{dilució}} \times \boxed{5} \times \boxed{0,4}$$

comencem amb un V_i = 200 µl
se han inoculat 100 µl

- Calcular el percentatge de supervivència del fong en presència de cèl·lules sanguínies i el percentatge de mort de llevats per les cèl·lules sanguínies de la manera següent:

$$\% \text{ UFC sang} = \frac{\text{UFC sang } t_1}{\text{UFC sang } t_0} \times 100$$

$$\% \text{ UFC plasma} = \frac{\text{UFC plasma } t_1}{\text{UFC plasma } t_0} \times 100$$

$$\% \text{ supervivència} = \frac{\% \text{ UFC sang}}{\% \text{ UFC plasma}} \times 100 \quad \% \text{ mort} = 100 - \% \text{ supervivència}$$

- Completar la taula següent amb els resultats obtinguts.

Supervivència de *S. cerevisiae* en plasma i sang dels dos donants.

<i>S. cerevisiae</i>	UFCs a 0h plasma	UFCs a 1h plasma	UFCs a 0h sang	UFCs a 1h sang	% UFC plasma	% UFC sang	% supervivència	% mort
Donant 1								
Donant 2								

Tasques

- Analitzar i discutir els resultats de tots els estudiants del grup globalment.
- Comparar els resultats per a les dues mostres de sang i plasma.
- Discutir per a quin tipus d'estudis seria aplicable aquesta tècnica.
- Explicar per què és important fer els recomptes a temps 0 h.

PRÀCTICA 1-B. Quantificació de la capacitat fagocítica de cèl·lules sanguínies humanes.**Materials i reactius**

- Llevats fixats de la soca de *C. albicans* que expressa GFP
- Mostres de sang perifèrica recollides per punció venosa amb el anticoagulant heparina de liti (n = 2)
- Tampó fosfat salí (PBS) estèril
- Agua estèril
- Medi RPMI 1640 (Gibco)
- Micropipetes y puntes de 2 a 1000 µl
- Tubs d'assaig y gradetes per a preparar dilucions
- BD FACS Lysing solution 1X
- Microcentrífuga
- Microscopis
- Càmeres de Neubauer
- Citòmetre de flux

Protocol experimental**1. Preparar la suspensió dels llevats:**

- Partim d'un tub amb 100×10^6 llevats fixats de *C. albicans*-GFP prèviament congelats a -80 °C en pellet sec.
- Resuspendre els llevats en 1 ml de RPMI.

2. Preparar les següents mostres (volum final en el tub 100 µl) en tubs eppendorf de 2 ml:

Tub nº	RPMI (µl)	Sang (µl)	Llevats (µl)
1	10	90	-
2	90	-	10
3	5	90	5
4	-	90	10

El nombre de llevats afegit (0.5×10^6 llevats en el tub 3 i 1×10^6 en el tub 4) correspon, en individus amb un recompte leucocitari normal, a aproximadament una ràtio 1:1 i 2:1, respectivament (llevat:leucòcit).

- Incubar a 37 °C durant 20 min perquè tinga lloc la fagocitosi dels llevats pels fagòcits de la sang.
- Afegir 1,9 ml de solució lisant 1X (per a lisar els eritròcits sanguinis i fixar les cèl·lules).
- Agitar bé i deixar 10 min a temperatura ambient.
- Centrifugar 5 min a 3000 x g.
- Resuspendre el pellet cel·lular en 0,5 ml de PBS.
- Mantindre els tubs a 4°C fins a l'anàlisi per citometria de flux que, que es farà l'endemà.

Interpretació dels resultats: quantificació de la fagocitosi per Citometria de flux.

Utilitzarem el citòmetre **BD FACSVERSE 3L 8C** (BECKTON DIKINSON). Aquest aparell es troba al servei de cultius cel·lulars i citometria de flux del Servei Central de Suport a la Investigació Experimental (SCSIE) de la Universitat de València. El servei està situat a la 5a planta de l'Edifici d'Investigació "Jerónimo Muñoz", al campus de Burjassot.

Aquest citòmetre està equipat amb un làser blau (488 nm) i un làser roig (633 nm), i permet treballar amb sis fluorescències i dos paràmetres de dispersió de la llum, "Forward Scatter" i "Side Scatter" (FS i SS). A més, disposa d'un sistema de processament de senyals digital amb el software FACSDiva.

- Abans d'adquirir les mostres, s'han d'agitar suaument per eliminar els possibles agregats cel·lulars.

- De cadascuna de les mostres s'analitzarà la llum dispersada cap endavant o dispersió frontal (FS), que és una mesura proporcional a la grandària relativa de la partícula que provoca la dispersió frontal del làser; la llum dispersada lateralment (SS), que és proporcional a la granularitat i complexitat relativa de l'estructura interna de la partícula que provoca la dispersió lateral del làser; i l'emissió de fluorescència verda (emesa per la GFP), com a conseqüència de l'excitació de la mostra pel làser blau.

Mostra 1. Sang sola. Hem de ser capaços d'identificar les diferents poblacions de leucòcits (limfòcits, monòcits i granulòcits), basant-nos en les seues propietats de FSC i SSC, en histogrames biparamètrics de FSC front a SSC.

Mostra 2. Llevats sols. Hem d'identificar els llevats, basant-nos en les seues propietats de FSC i SSC. A més, detectarem l'emissió de fluorescència verda utilitzant histogrames monoparamètrics on es representarà la intensitat de la fluorescència verda front al nombre de cèl·lules. La GFP és excitada pel làser blau i té el seu pic d'emissió a 509 nm, de manera que en el citòmetre detectarem la fluorescència emesa amb el filtre de 510/520 nm.

Mostres 3 i 4. Sang coïncubada amb dues quantitats diferents de llevats (0,5 i 1 milió de llevats). Detectarem la fluorescència verda associada als granulòcits, utilitzant histogrames biparamètrics de FSC o SSC front a intensitat de fluorescència.

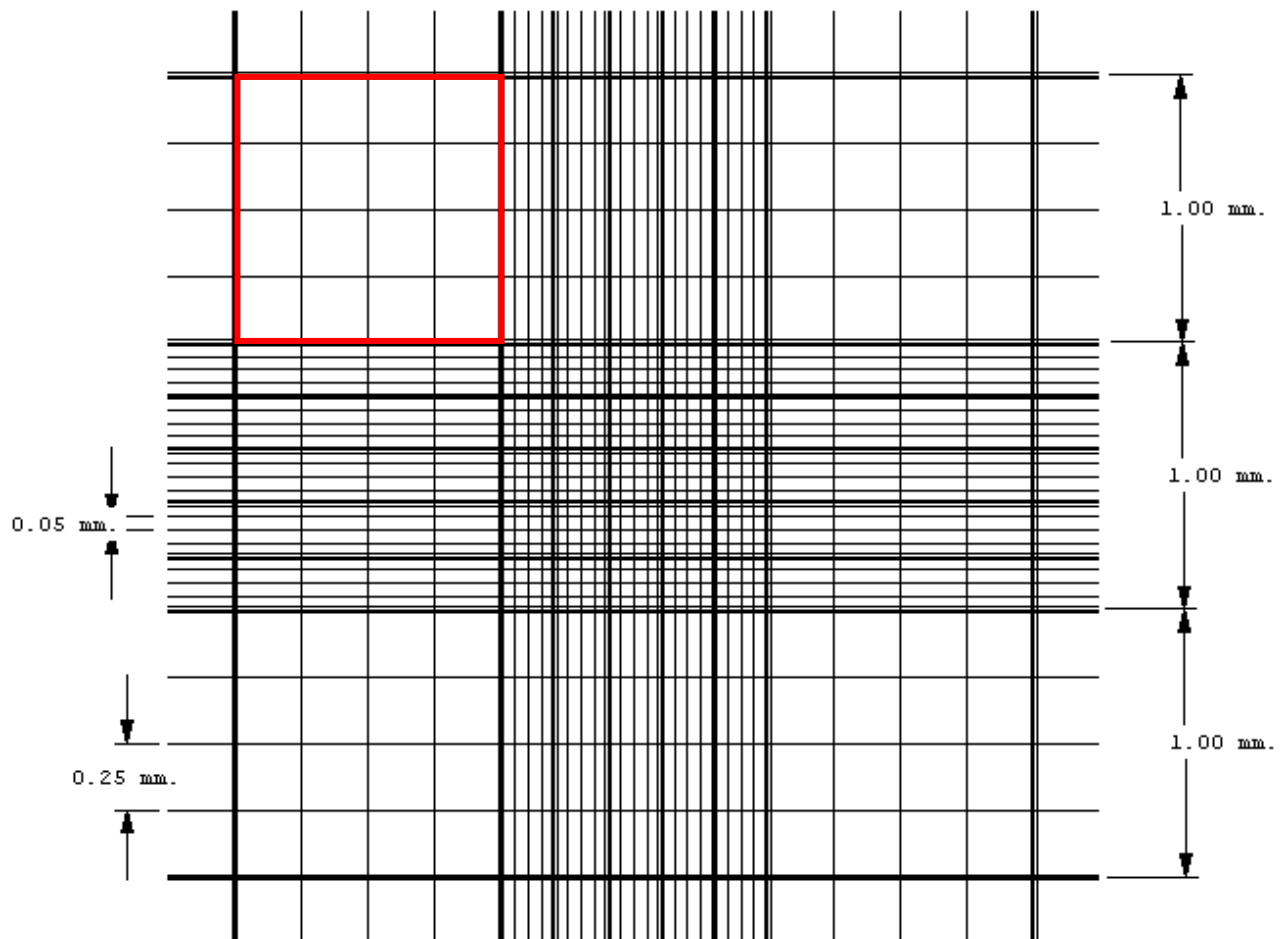
D'aquesta manera, hem de poder determinar el percentatge de granulòcits que han fagocitat llevats per a cadascuna de les dues ràtios.

Tasques

- Observar los histogrames obtinguts en l'anàlisi de les mostres adquirides amb el citòmetre, així com l'estadística.
- Comentar el significat biològic de les observacions.
- Proposar millores al protocol experimental utilitzat.

ANNEX**Recompte de cèl·lules amb càmera Neubauer.**

- Preparar i netejar la càmera Neubauer.
- Col·locar un cobreobjectes sobre la càmera Neubauer.
- Amb una pipeta, col·locar 10 μl de la suspensió cel·lular entre la càmera i el cobreobjectes.
- Deixar reposar les cèl·lules durant un parell de minuts.
- Observar al microscopi amb un objectiu de 40x.
- Comptar el nombre de cèl·lules (llevats en aquest cas) observades en els quatre quadres grans (16 quadrats xicotets x 4). Fer la mitjana dels quatre. (Un quadre gran correspon al quadre marcat en roig).
- Multiplicar el nombre obtingut per 10^4 (ja que el volum comprés entre un quadre gran i el cobreobjectes és 1/10000 ml).
- Multiplicar pel factor de dilució per a obtenir la concentració cel·lular per ml.



INTRODUCCIÓ A LA PRÀCTICA

Immunoassajos: Tècniques de detecció basades en la reacció antigen-anticòs

Totes aquelles tècniques que fan servir anticossos i es basen en l'especificitat de la reacció antigen-anticòs reben el nom d'immunoassaigs.

La propietat que tenen les immunoglobulines d'unir-se a un antigen, l'especificitat d'aquesta unió, i el fet que es puga visualitzar mitjançant fenòmens de precipitació, aglutinació i altres mecanismes indirectes (marcatge amb fluorocroms, amb radioisòtops o amb enzims) fan que aquests mètodes s'utilitzen àmpliament.

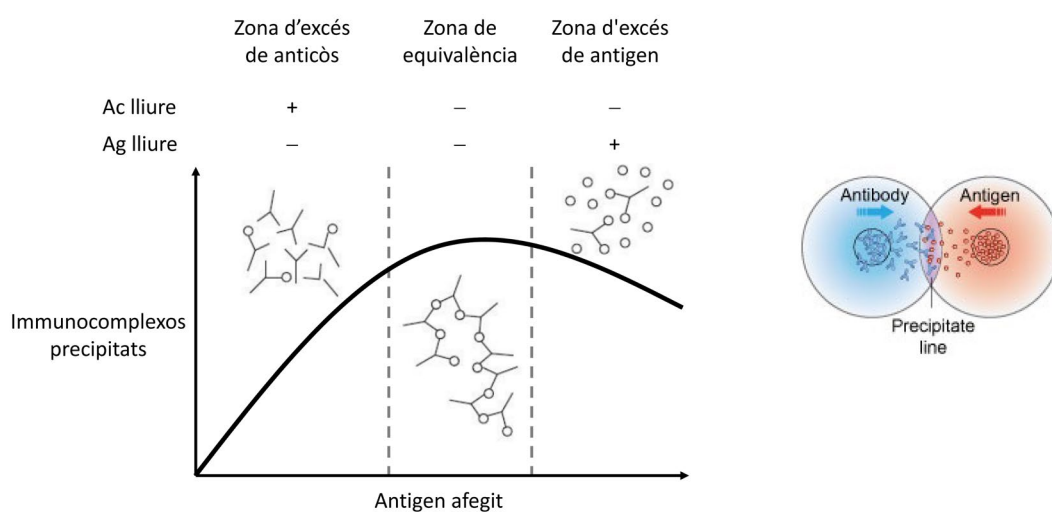
Els immunoassajos tenen una gran importància per al diagnòstic de malalties, per estimar el grau de resposta immunitària humoral i per a la identificació i purificació de molècules i cèl·lules d'interés.

PRÀCTICA 2

Tècnica de doble difusió en gel o Ouchterlony

1.-Introducció i objectius

Reaccions d'Immunoprecipitació: quan un antigen soluble interacciona amb el seu anticòs específic es formen complexos antigen-anticòs o immunocomplexos, que precipiten quan existeix una relació molecular determinada entre antigen i anticòs. Quan augmentem la quantitat d'antigen mantenint constant la quantitat d'anticòs, la quantitat de proteïnes precipitades augmenta al principi, arriba a un valor màxim i després decreix.

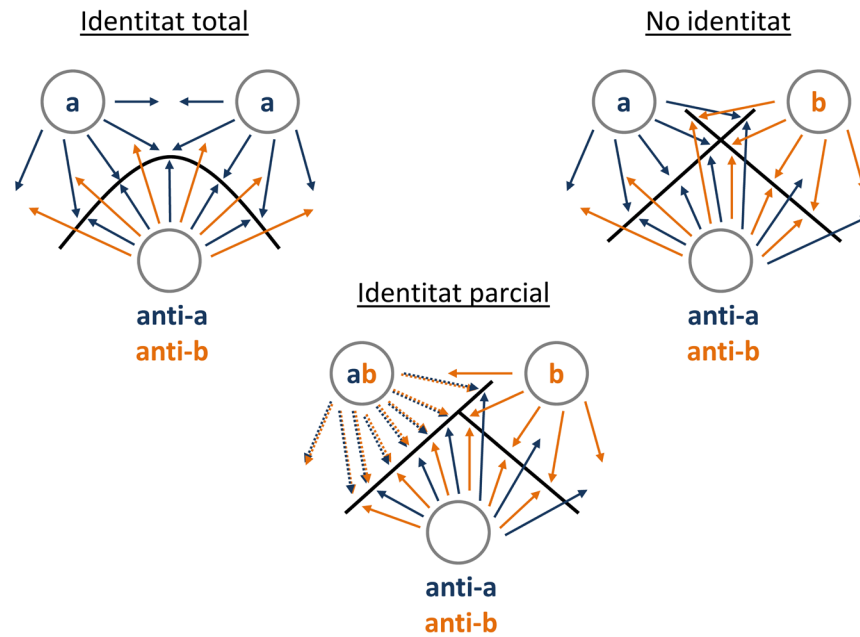


La **Tècnica de Doble Immunodifusió o Ouchterlony** és una tècnica d'immunoprecipitació realitzada en medi sòlid.

Es basa en la difusió d'antígens i anticòssos en medi sòlid (gel d'agarosa) a partir de pouets enfrontats. Quan difonen, les molècules d'antigen i anticòs es troben de manera que, si hi ha reconeixement, precipiten els complexos immunitaris en la zona d'equivalència. És a dir, en la zona on les concentracions de les dues solucions són òptimes perquè la quantitat d'anticòs sature els llocs antigènics. Els precipitats es presenten com un arc blanquinós a simple vista. Cada arc correspon a un únic sistema antigen-anticòs. És a dir, si un anticòs reconeix dos antígens diferents, apareixeran dos arcs de precipitació.

Es poden observar tres patrons de precipitació diferents:

- **Identitat total:** els antígens de les mostres comparteixen el determinant contra el qual està dirigit l'anticòs.
- **Identitat parcial:** els antígens de les mostres comparteixen algun determinant antigènic comú, però no tots.
- **No identitat:** els antígens de les mostres no contenen cap determinant antigènic comú.



Utilitat clínica: aquesta tècnica es pot utilitzar per a detectar la presència d'anticossos específics en un sèrum, per a posar en evidència un antigen present en un líquid biològic, per a determinar la zona d'equivalència, o per a avaluar el grau d'identitat (total, parcial o nul·la) entre diferents antígens. A més, com que la posició del precipitat depèn de la concentració relativa d'antígens i anticossos, es tracta d'un mètode semiquantitatiu.

Aquesta tècnica pot realitzar-se en el fons de xicotetes plaques de Petri (de 60 mm de diàmetre) o sobre un portaobjectes de vidre, on es prepara un gel d'agarosa. S'excaven pouets equidistants amb l'ajuda d'una plantilla, en els quals es dipositen l'immunosèrum i les solucions antigèniques, i després de 12-24 hores de difusió, s'analitzen els arcs de precipitació.

En el nostre cas, les solucions d'anticossos que utilitzarem són sèrums de conill hiperimmunitzats contra dos antígens (albúmina de sèrum de vedella, o BSA, i albúmina d'ou de gallina, o OVA), i les solucions antigèniques són solucions d'albúmines o bé sèrums de diferents animals que contenen les albúmines sèriques corresponents.

2.- Materials, reactius y dissolucions

- Tampó PBS (tampó fosfat salí)
- Plaques Petri de 6 mm de diàmetre amb gel d'agarosa.
- Micropipetes i puntes de 2 a 1000 µl
- Pipetes de 10 ml
- Plantilles y perforadors
- Solucions antigèniques (BSA i OVA a 1 mg/ml, en PBS)
- Sèrums d'animals (sèrum de cavall, sèrum de conill, sèrum de cabra, sèrum de vedella) i anticossos primaris (sèrum anti-BSA i sèrum anti-OVA)
- Tubs d'assaig i gradetes per a preparar dilucions

3.- Protocol experimental

*Preparació de plaques d'agarosa (al 0,5%) (ho farà el personal tècnic)

- Afegir 3 g d'agarosa a 200 ml de tampó PBS en un flascó (per a 4 parelles es necessiten 144 ml). Calfar al microones agitant de tant en tant, fins que la solució siga transparent.
- Quan l'agar estiga completament líquid i el flascó ja no creme en la mà (60 °C aproximadament), es pipetegen uns 6 ml i s'aboquen immediatament sobre el fons de plaques de Petri xicotetes (de 60 mm de diàmetre), cosa que donarà lloc a un gel d'1 a 1,5 mm de gruix. Les plaques han d'estar en un pla perfectament horitzontal.
- Es deixa refredar fins que es solidifica (uns minuts).

* Se us donaran les plaques amb agarosa ja preparades. L'estudiant comença el protocol experimental en aquest punt.

- Amb l'ajuda dels "perforadors" i d'unes plantilles es realitzen els pouets sobre l'agarosa a la distància adequada.
- Es dipositen els antígens i els anticossos. Cal evitar que es desborden.
- Es deixen difondre els antígens i els anticossos a temperatura ambient durant 24 h per tal que es formen els immunocomplexos.
- Transcorregut aquest temps s'observa l'agarosa a contrallum per a visualitzar els arcs de precipitació de color blanc opalescent.

Cada parella d'estudiants prepararà 4 plaques d'agar i enfrontarà les solucions d'antígens i anticossos indicades més avall, per a les plaques 1, 2, 3 i 4, o bé 1, 2, 5 i 6. (El professor indicarà a cada parella quines plaques ha de preparar).

Es dipositaran 4 microlitres per pouet en tots els casos, i els pouets perifèrics s'ompliran començant pel pouet situat dalt del central, i després girant en el sentit de les agulles del rellotge.

Placa 1:

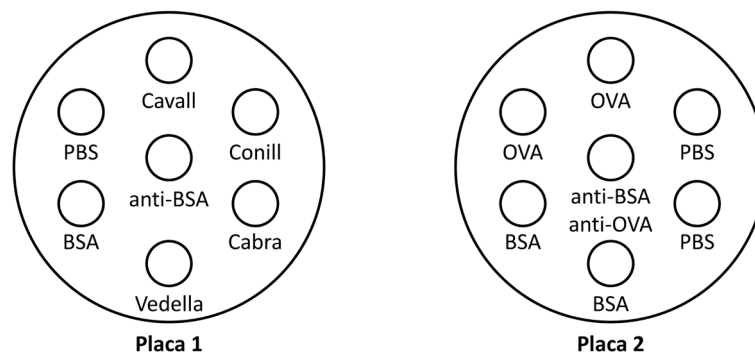
Pouet central: antisèrum anti-BSA

Pouets perifèrics: sèrum de cavall, sèrum de conill, sèrum de cabra, sèrum de vedella, BSA, PBS

Placa 2:

Pouet central: antisèrums anti-BSA y anti-OVA (4 µl de cadascun).

Pouets perifèrics: OVA, PBS, PBS, BSA, BSA, OVA



Placa 3:

Pouet central: BSA

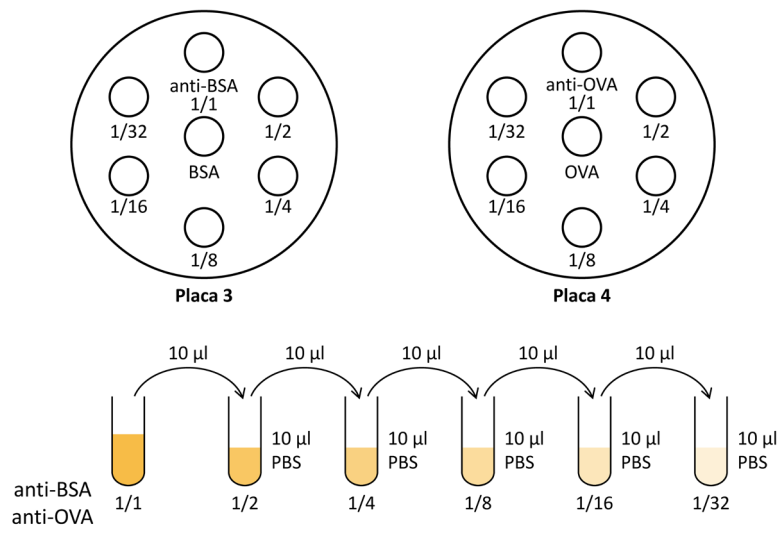
Pouets perifèrics: antisèrum anti-BSA 1/1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32

(nota: fer les dilucions en 10 µl)

Placa 4:

Pouet central: OVA

Pouets perifèrics: antisèrum anti-OVA 1/1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32

**Placa 5:**

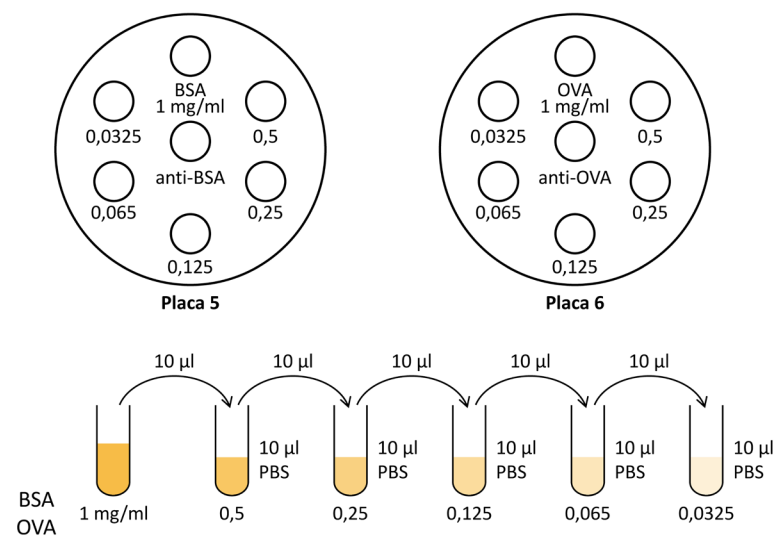
Pouet central: antisèrum anti-BSA

Pouets perifèrics: BSA a 1mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,125 mg/ml, 0,065 mg/ml, 0,0325 mg/ml

Placa 6:

Pouet central: antisèrum anti-OVA

Pouets perifèrics: OVA a 1mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,125 mg/ml, 0,065 mg/ml, 0,0325 mg/ml





Guia per a fer els pouets.
Aspecte dels pouets.
Exemple d'un arc de precipitació.

Interpretació dels resultats:

- Deduir l'especificitat dels antisèrums a partir dels resultats de les plaques 1 i 2. Determinar si BSA i OVA contenen algun determinant antigènic comú.
- Determinar el títol dels dos antisèrums a partir dels resultats de les plaques 3 i 4.
- Determinar la zona d'equivalència a partir dels resultats de les plaques 5 i 6. Observar la distància dels arcs respecte al pouet central en funció de la concentració de l'antigen, a partir de les plaques 5 i 6.

Recordar que:

“Títol d'anticòs”, indica fins a quin punt es pot diluir el sèrum abans que la prova es torne negativa (és, per tant, l'última dilució que dóna lloc a l'aparició d'un arc de precipitació). El títol depèn tant de la concentració d'anticossos en el sèrum com de la seua afinitat, i variarà segons la sensibilitat de la prova.

La zona d'equivalència correspon al precipitat més fi i més clar.

PRÀCTICA 3

EL ELISA (assaig immunosorbent lligat a enzims)

1.- Introducció i objectius

L'Enzim-Immunoassaig denominat ELISA és la tècnica més utilitzada actualment per a quantificar quasi qualsevol proteïna soluble en la major part dels fluids corporals o medis de cultiu en el laboratori. És un immunoassaig en medi líquid, on un dels components (Ag o Ac) està adsorbit sobre plàstic. La tècnica es basa en l'ús d'anticossos marcats amb una enzim, de manera que els immunocomplexos seran revelats mitjançant l'addició d'un substrat específic de l'enzim que donarà un producte acolorit, fàcilment quantificable amb un espectrofotòmetre. El mètode combina l'especificitat de la unió dels anticossos amb l'amplificació de senyal que proporcionen les reaccions enzimàtiques, per la qual cosa, en la pràctica clínica, és la tècnica immunològica més emprada per la seua senzillesa i sensibilitat.

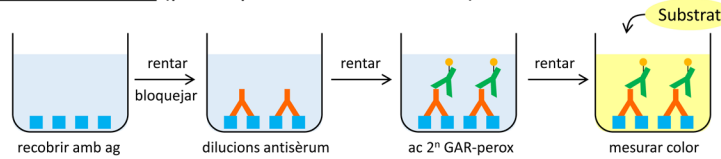
Existeixen múltiples variants de la tècnica, encara que les més habituals són les anomenades ELISA indirecte, ELISA competitiu i ELISA en sandvitx.

1.- L'**ELISA indirecte** és la modalitat a utilitzar quan volem quantificar anticossos específics en un sèrum (per exemple, per a diagnosticar una malaltia infecciosa o autoimmunitària). L'Ag s'adsorbeix al suport (pouets d'una placa de microtitulació), i s'afegeix una dilució del sèrum del pacient en estudi. Si hi ha anticossos, s'uniran als antígens. Per a revelar la unió, s'afegeix un anticòs contra immunoglobulines humanes marcat amb un enzim (anticòs secundari). Finalment, s'afegeix el substrat de l'enzim i es mesura l'aparició del producte acolorit. Podem fer una estimació quantitativa dels anticossos determinant el "Títol d'anticossos", és a dir, fins a quin punt pot diluir-se el sèrum abans que la prova es torne negativa. Cal observar que el títol d'un sèrum donat variarà segons la sensibilitat de la prova.

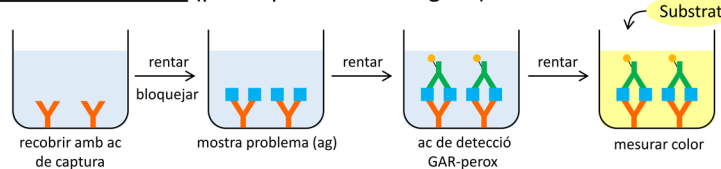
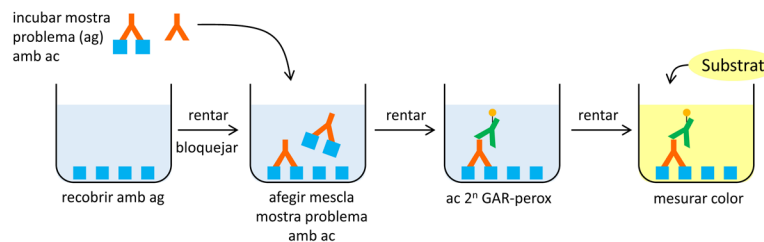
2.- Quan allò que es vol quantificar és una proteïna sèrica (per exemple, una citocina, una hormona o una toxina bacteriana), s'utilitza l'ELISA competitiu o l'ELISA en sandvitx.

ELISA en sandvitx. En aquest cas, s'adhereix al plàstic un anticòs. Després s'afegeix la mostra problema, que si conté la proteïna s'unirà a l'anticòs. Posteriorment s'afegeix un segon anticòs contra la proteïna, marcat amb un enzim. D'aquesta manera, l'antigen queda "emparedat" entre els dos anticossos. Finalment, s'afegeix el substrat de l'enzim i es mesura l'aparició del producte acolorit. Utilitzant dos anticossos monoclonals contra dos epítops diferents del mateix antigen, el sistema té una major capacitat per a discriminar entre antígens diferents. La comparació amb una escala d'estàndards fa possible la quantificació de l'antigen.

ELISA competitiu. S'incuba en solució l'anticòs específic de l'antigen amb la dissolució que conté l'antigen. La mescla s'afegeix a pouets prèviament recoberts amb un excés d'antigen. Després de rentar s'afegeix un anticòs secundari conjugat amb un enzim, que s'unirà a l'anticòs primari que no s'havia unit a l'antigen originalment. Finalment, s'afegeix el substrat de l'enzim. La concentració de l'antigen en el líquid biològic és inversament proporcional al color que es produeix. La comparació amb una escala d'estàndards permet la quantificació de l'antigen.

➤ **ELISA INDIRECTE** (per a quantificar anticossos)

Titular antisèrums anti-OVA y anti-BSA assajant-los contra solucions antigèniques de OVA y BSA, respectivament.

➤ **ELISA EN SANDVITX** (per a quantificar antigens)➤ **ELISA COMPETITIU** (per a quantificar antigens)

Determinar la concentració de BSA en una mostra problema interpolant el valor d'absorbància en una recta patró.

En la pràctica realitzarem un **ELISA indirecte** i un **ELISA competitiu**. Les solucions d'anticossos que utilitzarem són sèrums de conill hiperimmunitzats (antisèrums policlonals) contra dos antigens (albúmina de sèrum de vedell: BSA i albúmina de ou de gallina: OVA), és a dir, anti-BSA i anti-OVA.

ELISA indirecte

L'antisèrum anti-BSA s'assajarà contra la solució de BSA i l'antisèrum anti-OVA s'assajarà contra la solució d'OVA. D'aquesta manera, podrem titular els dos antisèrums.

ELISA competitiu

Determinarem la concentració d'un antigen (BSA) en una mostra problema, interpolant el valor de l'absorbància en una recta patró.

2.- Materials, reactius y dissolucions

- Solucions antigèniques (BSA i OVA a 1 mg/ml, en PBS)
- Mostra problema: solució de BSA de concentració desconeguda.
- Anticossos primaris (antisèrums anti-BSA i anti-OVA)
- Anticòs secundari (GAR-perox, antisèrum de cabra contra immunoglobulines de conill, marcat amb peroxidasa)
- Plaques de microtitulació per a ELISA de 96 pouets
- Tampó PBS
- Tampó PBS amb Tween 20 al 0,1% per a rentar
- Tampó carbonat/bicarbonat 60 mM a pH 9,6
- Solució de saturació (1% de gelatina en PBS)

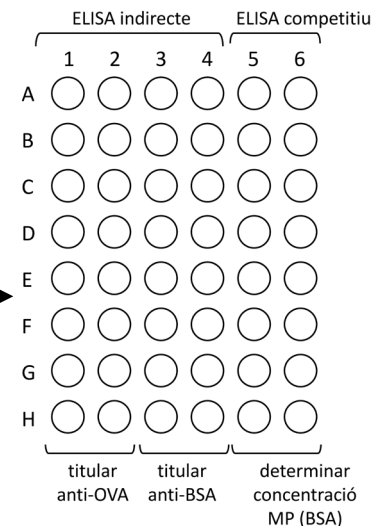
- Solució del substrat de l'enzim (3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB) junt amb peròxid d'hidrogen)
- Solució de parada (àcid sulfúric 0,5 M)
- Micropipetes i puntes de 2 a 1000 µl
- Lector ELISA de lectura automàtica
- Matrassos, tubs d'assaig i gradetes per a preparar dilucions

3.- Protocol experimental

Primer dia

- Realitzar el recobriment de la placa amb 50 µl/pouet de la solució antigènica preparada en el tampó carbonat sòdic. OVA (columnes 1 i 2) i BSA (columnes 3-6) a 25 µg per ml i incubar les plaques a 4 °C durant tota la nit.

Disposició dels dos ELISAS en la placa de microtitulació →



Segon dia

- Per a l'ELISA competitiu es preparen una sèrie de **tubs** per a la incubació prèvia de l'antigen (patró i problema) amb l'anticòs, amb les quantitats següents. Incubar a temperatura ambient durant dues hores amb agitació ocasional.

Tub	BSA a 1mg/ml (µl)	PBS (µl)	Mostra problema (µl)	Antisèrum anti-BSA (1:2500) (µl)	Posició en la placa
1	-	100	-	100	A
2	2,5	97,5	-	100	B
3	5	95	-	100	C
4	10	90	-	100	D
5	20	80	-	100	E
6	30	70	-	100	F
7	40	60	-	100	G
8	-	-	100	100	H

- Rentar tres vegades els pouets de la placa amb PBS amb tween 20 al 0,1% (100 µl/pouet)
- Saturar les plaques amb 100 µl/pouet d'una solució de gelatina a l'1% en PBS, durant 45 min a 37 °C.
- Rentar tres vegades els pouets de la placa amb PBS amb tween 20 al 0,1% (100 µl/pouet)
- Per a l'ELISA indirecte afegir als pouets 50 µl de les diferents dilucions dels anticossos primaris en PBS. Els anticossos primaris s'assajaran a diferents dilucions (que es realitzaran a la mateixa placa), començant per 1/5000.
- Per a l'ELISA competitiu, carregar 50 µl de cada tub als pouets corresponents (per duplicat).
- Incubar tota la nit a 4 °C.

Tercer dia

- Rentar tres vegades els pouets de la placa amb PBS amb tween 20 al 0,1% (100 µl/pouet)
- Afegir als pouets 50 µl de l'anticòs secundari (GAR-peroxidasa) diluït 1/10000 en PBS, i incubar 45 min a 37 °C.
- Rentar quatre vegades els pouets de la placa amb PBS amb tween 20 al 0,1% (100 µl/pouet)
- Afegir als pouets 50 µl del substrat de la peroxidasa i incubar fins a l'aparició del color. La reacció es para afegint 25 µl de la solució de parada.
- Llegir el color desenvolupat a 450 nm amb un lector microtitulador d'ELISA de lectura automàtica.

Interpretació dels resultats:

- ELISA indirecte. Després de la lectura de l'absorbància per a cada dilució de l'antisèrum (per a cada sistema antigen-anticòs), determinar el títol dels dos antisèrums i compararlo amb l'obtingut mitjançant Ouchterlony.
- ELISA competitiu. Representar els valors d'absorbància a 450 nm enfront de la concentració de BSA (mg/ml) en la corba patró. Determinar la concentració de BSA de la mostra problema.

