



Inmunología Práctica

UNIDAD 8

European Initiative for Biotechnology Education

Autores de la Unidad

Lisbet Marcussen (coordinadora de la unidad),
Birgit Sandermann, Elisabeth Strömberg,
Eckhard R. Lucius, Ute Steffens, Christine Labahn-Lucius



La Iniciativa Europea para la Enseñanza de la Biotecnología (EIBE) pretende promover experiencias, aumentar la comprensión y facilitar el debate público informado mediante la mejora de la enseñanza de la biotecnología en escuelas e institutos de toda la Unión Europea (UE).

Centros de contacto de la EIBE



ALEMANIA

- | Horst Bayrhuber / Eckhard R. Lucius / Regina Rojek / Ute Harms / Angela Kroß, Institut für die Pädagogik der Naturwissenschaften, Universität Kiel, Olshausenstraße 62, D-24098 KIEL 1.
- | Ognian Serafimov, UNESCO-INCS, c/o Jörg-Zürn-Gewerbeschule, Rauensteinstraße 17, D-88662 ÜBERLINGEN.
- | Eberhard Todt, Fachbereich Psychologie, Universität Gießen, Otto-Behaghel-Straße 10, D-35394 GIEßEN.



AUSTRIA

- | Rainhart Berner, Höhere Bundeslehr- und Versuchsanstalt für Chemische Industrie Wien, Abt. für Biochemie, Biotechnologie und Gentechnik, Rosensteingasse 79, A-1170 WIEN.



BELGICA

- | Vic Damen / Marleen van Strydonck, R&D Groep VEO, Afdeling Didaktiek en Kritiek, Universiteit van Antwerpen, Universiteitsplein 1, B-2610 WILRIJK.



DINAMARCA

- | Dorte Hammelev, Biotechnology Education Group, Foreningen af Danske Biologer, Sønderengen 20, DK-2860 SØBORG.
- | Lisbet Marcussen, Biotechnology Education Group, Foreningen af Danske Biologer, Lindevej 21, DK-5800 NYBORG.



EIRE

- | Catherine Adley / Cecily Leonard, University of Limerick, Plassey, LIMERICK.



ESPAÑA

- | Maria Saez Brezmes / Angela Gomez Niño, Facultad de Educación, Universidad de Valladolid, Geologo Hernández Pacheco 1, ES-47014 VALLADOLID.



FRANCIA

- | Gérard Coutouly, LEGPT Jean Rostand, 18 Boulevard de la Victoire, F-67084 STRASBOURG Cedex.
- | Laurence Simonneaux, Ecole Nationale de Formation Agronomique, Toulouse-Auzeville, Boîte Postale 87, F-31326 CASTANET TOLOSAN Cedex.



ITALIA

- | Antonio Bargellesi-Severi / Stefania Uccelli / Alessandra Corda Mannino, Centro di Biotechnologie Avanzate, Largo Rosanna Benzi 10, I-16132 GENOVA.



LUXEMBURGO

- | John Watson, Ecole Européenne de Luxembourg, Département de Biologie, 23 Boulevard Konrad Adenauer, L-1115 LUXEMBOURG.



PAÍSES BAJOS

- | David Bennett, Cambridge Biomedical Consultants, Schuytstraat 12, NL-2517 XE DEN HAAG.
- | Fred Brinkman, Hogeschool Holland, Afdeling VP&I, Postbus 261, NL-1110 AG DIEMEN.
- | Guido Matthée, Hogeschool van Arnhem en Nijmegen, Technische Faculteit, HLO, Heijendaalseweg 45, NL-6524 SE NIJMEGEN.
- | Liesbeth van de Grint / Jan Frings, Hogeschool van Utrecht, Educatie Centrum voor Biotechnologie, FEO, Afdeling Exacte Vakken, Biologie, Postbus 14007, NL-3508 SB UTRECHT.



REINO UNIDO

- | Wilbert Garvin, Northern Ireland Centre for School Biosciences, NIESU, School of Education, The Queen's University of Belfast, BELFAST, BT7 1NN.
- | John Grainger / John Schollar / Caroline Shearer, National Centre for Biotechnology Education, The University of Reading, PO Box 228, Whiteknights, READING, RG6 6AJ.
- | Jill Turner, Department of Science and Technology Studies, University College London, Gower Street, LONDON, WC1 6BT.
- | Paul Wymer, The Wellcome Centre for Medical Science, The Wellcome Trust, 210 Euston Road, LONDON, NW1 2BE.



SUECIA

- | Margareta Johansson, Föreningen Gensyn, PO Box 37, S-26800 SVALÖV.
- | Elisabeth Strömberg, Östrabo Gymnasiet, PO Box 276, Kaempegatan 36, S-45181 UDDEVALLA.

Coordinadores de EIBE

Horst Bayrhuber, Institut für die Pädagogik der Naturwissenschaften an der Universität Kiel, Olshausenstraße 62, D-24098 KIEL 1, Germany. Telephone: + 49 (0) 431 880 3137 (EIBE Secretary: Regina Rojek). Facsimile: + 49 (0) 431 880 3132.



Inmunología Práctica

UNIDAD
8

European Initiative for Biotechnology Education

Contenidos

★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★

I	Autores y copyright	04
I	Sobre la Unidad	05
I	Precauciones	05
I	KitELISA de <i>Trichem</i>	06
I	Doble inmunodifusión	11
I	KitELISA de <i>STEFFENS</i>	14

MATERIALS

World Wide Web

★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★

Pocas áreas están desarrollándose tan rápidamente como la biotecnología. Por ello para que se puedan revisar y actualizar y posteriormente distribuir con un coste mínimo, las unidades de EIBE se publican en formato electrónico.

Estas páginas (y las otras unidades de EIBE) están disponibles en toda Europa y el resto del mundo en la World Wide Web. Se pueden encontrar en:

<http://www.reading.ac.uk/NCBE>

Todas las unidades de EIBE en la World Wide Web están en ficheros de Portable Document Format (PDF). Eso significa que las ilustraciones de alta calidad, el color, los tipos de letra y la maquetación de esos documentos se mantendrán, sea cual sea el ordenador o sistema operativo del que se disponga (programas Macintosh, incluyendo Power PC, Windows, DOS o Unix).

Los ficheros PDF son también más pequeños que los ficheros desde los que han sido creados, por lo que se necesitará menos tiempo para descargar documentos. Sin embargo, para visualizar las unidades de EIBE necesitará una copia apropiada del programa de lectura *Adobe Acrobat*.®

Se puede disponer gratuitamente del programa lector *Acrobat*® 3. Puede obtenerse a partir de:

<http://www.adobe.com/>

Con este software, se pueden visualizar o imprimir las unidades EIBE. Además, podrá «navegar» y hacer búsquedas en los documentos con facilidad.

Observación: *Adobe* y *Acrobat* son marcas comerciales de Adobe Systems Incorporated, que pueden estar registradas en ciertas jurisdicciones. *Macintosh* es una marca comercial registrada de Apple Computer Incorporated.

Desarrollo

El Kit ELISA *TriChem* que se utiliza como una parte de la unidad se ha creado para este fin y se puede comprar en:

TriChem
Bernhard Olsensvej 23
DK-2830 Virum, DENMARK
Telephone : + 45 45 85 82 83

La adaptación del Kit para su uso en las aulas la han realizado "The Danish Immunology Group".
Immunologiske Småforsøg, Nucleus Forlag ApS (1994).
ISBN: 87 87661 83 7.

Lisbet Marcussen
Educational Biotechnology Group
Nyborg Gymnasium
Skolebakken 13
DK-5800 Nyborg
e-mail: lisbetma@post2.tele.dk

El Kit ELISA Steffens que se utiliza como una parte de la unidad se ha creado para este fin y se puede comprar en:

Steffens Biotechnische Analysen GmbH
Baumgartenstr 5
D-79285 Ebringen (FRG)

La adaptación del Kit para su uso en las aulas la han realizado Eckard R. Lucius, Ute Steffens, Christine Labahn-Lucius (en caso de estar interesados en conocer sus direcciones, contactar con la secretaria de EIBE)

Autores

- **Lisbet Marcussen (Coordinadora de la Unidad)**
Nyborg Gymnasium og HF, Nyborg, Denmark.
- **Birgit Sandermann Justesen**
Bjerringbro Gymnasium, Bjerringbro, Denmark.
- **Elisabeth Strömberg**
Östrabo Gymnasiet, Uddevalla, Sweden.
- **Eckhard R. Lucius, Ute Steffens, and Christine Labahn-Lucius**
IPN, The University of Kiel, Alemania

Diseño, ilustración, y composición tipográfica, textos adicionales y edición:
Caroline Shearer, NCBE, The University of Reading, Reino Unido.

© Copyright

Estas Unidades de EIBE están protegidas por los derechos de autor. Los colaboradores de esta Unidad declaran su derecho moral a identificarse como titulares de los derechos de autor bajo la Sección 77 del Copyright, Acta de Diseños y Patentes, RU (1988).

Uso Educativo. Pueden realizarse copias en papel o en formato electrónico tanto de esta unidad EIBE como de sus páginas individuales para su utilización en clase, siempre que las copias se distribuyan gratuitamente al precio de costo de la reproducción y los autores de la unidad se reconozcan e identifiquen como los titulares de los derechos de autor.

Otros usos. La Unidad puede ser distribuída individualmente para propósitos no comerciales, pero no mediante listas de distribución electrónica, listas de correo, grupos de noticias, tablón de anuncios ni correo no autorizado por World Wide Web ni otros mecanismos de reproducción, acceso o distribución de masas que reemplace una suscripción o acceso individual autorizado, o de ninguna manera que no constituya un intento de buena fe de cumplir con estas restricciones.

Uso comercial. Está estrictamente prohibido el empleo de materiales de esta Unidad para beneficio comercial, sin el consentimiento previo de los titulares de los derechos de autor. En caso de que desee utilizar este material total o parcialmente para propósitos comerciales, o volver a publicarlo de cualquier forma, debe contactar con:

EIBE Secretariat
c/o IPN
Universität Kiel
Olshausenstrabe 62
D-24098 Kiel
Alemania

Teléfono: +49 431 880 3137
Fax: +49 431 880 3132
E-Mail: rojek ipn.uni-kiel.de

Sobre la Unidad



Estos materiales han sido creados por profesores y educadores en activo de diferentes países europeos, con el apoyo y estímulo financiero del DGXII de la Comisión Europea, bajo la protección de EIBE, *la Iniciativa Europea para Enseñanza de la Biotecnología*. Los materiales de la EIBE han sido extensamente probados en talleres en los que participan profesores de toda Europa.

Las opiniones expresadas en esta Unidad y las actividades propuestas aquí son las de los autores y no las de la Comisión Europea.

Se recomienda una atención especial a las medidas de seguridad que se detallan al principio de la Unidad y a lo largo del texto.

!Precauciones!

En todas las Unidades de EIBE se han tratado de identificar todos los riesgos posibles y se sugieren todos las precauciones pertinentes para evitarlos.

Donde ha sido posible las medidas de seguridad que se proponen son las habitualmente aceptadas de forma general. Si se ha considerado necesaria alguna medida especial para un riesgo particular, se indica específicamente.

Sin embargo los usuarios deben ser conscientes que se pueden haber cometido errores y omisiones y que las diferentes autoridades educativas y las administraciones adoptan normas distintas. En cualquier caso, antes de hacer cualquier actividad los usuarios deben siempre realizar su propia valoración de los riesgos. Especialmente todas las reglas propuestas por la administración local y autoridades educativas TIENEN que obedecerse, a pesar de lo que se sugiera en la Unidad de EIBE.

Si el contexto no dicta otras normas se deben tener en cuenta los siguientes puntos:

- el trabajo práctico se debe llevar a cabo en un laboratorio de ciencias equipado adecuadamente;
- el material que se maneje debe estar en perfectas condiciones;
- las prácticas habituales de laboratorio, como el calentamiento de sustancias, deben realizarse con cuidado;
- mayor cuidado requieren aquellas prácticas de laboratorio en las que hay que manipular con productos químicos u organismos vivos;
- se deben proteger los ojos incluso cuando la actividad no entraña riesgo para ellos;
- los estudiantes deben conocer las normas de seguridad y precauciones adecuadas al manejo para las actividades en las que se manejan productos químicos y microorganismos.

Uso del *Trichem* ELISA en las clases



Introducción

ELISA (Prueba de Inmunoabsorción ligada a un enzima) es un inmunoensayo muy sensible que utiliza un enzima ligado a un anticuerpo o a un antígeno como marcadores para la identificación de una proteína específica, especialmente un antígeno o un anticuerpo.

El método del test ELISA es sencillo y fácil de utilizar para la identificación rápida de, por ejemplo:

- uso de drogas;
- pruebas distintas para VIH;
- detección de genes de diferentes mutantes (por ejemplo, los que se introducen con ingeniería genética);
- genética médica.

Esta Unidad tiene por objetivo dar a los estudiantes y a los profesores una oportunidad para que hagan sus propias (ELISA) investigaciones, al haber alcanzado una mejor comprensión de este moderno método tan frecuentemente utilizado, dado que tendrán una cualificación mayor para participar en la discusión de sus aplicaciones y utilización.

Para obtener información adicional sobre el test es necesario ponerse en contacto con "El Grupo de Inmunología Danés" o con "TriChem" (las direcciones se pueden encontrar al comienzo de la Unidad).

El experimento que se describe a continuación utiliza el principio del test ELISA para analizar muestras de sangre de cerdo para determinar si estos animales han estado expuestos a ciertas bacterias.

La bacteria *Pasteurella multocida* produce una toxina que causa varias deformidades en los

huesos del hocico de los cerdos infectados. Lo que conduce a que su mordedura y estornudo son defectuosos y también sufren numerosas alteraciones en los órganos respiratorios. Estas alteraciones respiratorias se complican a menudo con el ataque de la *Bordetella bronchiseptica* que empeora considerablemente la situación. El resultado de todo ello es un lento crecimiento y pérdidas económicas para el granjero. Es por tanto necesario detener la infección tan pronto como sea posible. El test ELISA puede utilizarse para detectar la toxina y también la bacteria *Bordetella bronchiseptica*.

En este experimento se utilizan antígenos de la bacteria *Bordetella bronchiseptica* (*Bb*). El primer día los antígenos de la bacteria se colocan en los viales de la placa del test ELISA cubriéndola. Al día siguiente las placas están preparadas para el análisis de las muestras de sangre de los cerdos. Si un cerdo ha sido infectado con *Bb* el test de su sangre mostrará una reacción positiva con los antígenos en los viales y aparecerá color.

Pautas para el profesor

Objetivo

Analizar muestras de sangre de cerdos utilizando el test ELISA.

Organización

1. Día - aproximadamente 15 minutos
2. Día - 2 veces aproximadamente 45 minutos

Precauciones



El ácido 5-aminosalicílico no es tóxico y se usa en dosis de gramos para tratar enfermedades humanas, pero se sabe que algunos compuestos derivados tienen efecto mutagénico. De tal forma que es necesario manipular el ácido 5-aminosalicílico cuidadosamente y utilizar guantes de goma.

Protocolo**1^{er} Día: Preparación de los reactivos****PBS**

Disolver los contenidos del frasco etiquetado con "PBS" en 2,5 litros de agua desionizada.

Comprobar el pH -debe encontrarse entre 7,1 y 7,5-. Si fuera necesario ajustar con NaOH 5M o HCl 5M.

Guardar 30 cm³ de esta solución para preparar la SOLUCION PARA CUBRIR.

Al resto del PBS añadir los contenidos del frasco etiquetado con "TWEEN 20".

Lavar el frasco con un poco de PBS para recogerlo todo. Mezclar cuidadosamente y etiquetar la solución como TAMPON DE LAVADO. Tapar el frasco.

Añadir entonces los contenidos del frasco etiquetado con "Antígeno Bb" a los 30 cm³ de PBS. Mezclar bien!. Esta es ahora la SOLUCION PARA CUBRIR.

Las placas de Microtiter están hechas de plástico y tratadas radioactivamente para incrementar la capacidad de unión y garantizar la esterilización.

El antígeno es un extracto muerto (hervido) de la bacteria *Bordetella Bronchisepta* (Bb).

2^o Día: Preparación del suero**Suero 1:**

Control negativo proveniente de un cerdo que no ha sido infectado con la bacteria Bb.

Suero 3 a 10:

Sueros provenientes de cerdos que se

desconocen. 4 de ellos son negativos y otros 4 más o menos positivos.

Suero 12 :

Control positivo.

Todos los sueros positivos provienen de cerdos sanos que han sido vacunados con Bb muertas.

Preparación de la solución del conjugado:

Esta solución debe prepararse para ser usada fresca de la siguiente manera:

Añadir 25 cm³ de tampón de lavado al frasco rotulado como BSA y mezclar la solución hasta que esté trasparente, entonces añadir el contenido del frasco etiquetado como "conjugado". Lavar el frasco con el tampón de lavado BSA para recoger todo. Mezclarlo bien.

El conjugado es la IgG de conejo anti-cerdo al enzima peroxidasa (este enzima ha sido obtenido de r-bano picante).

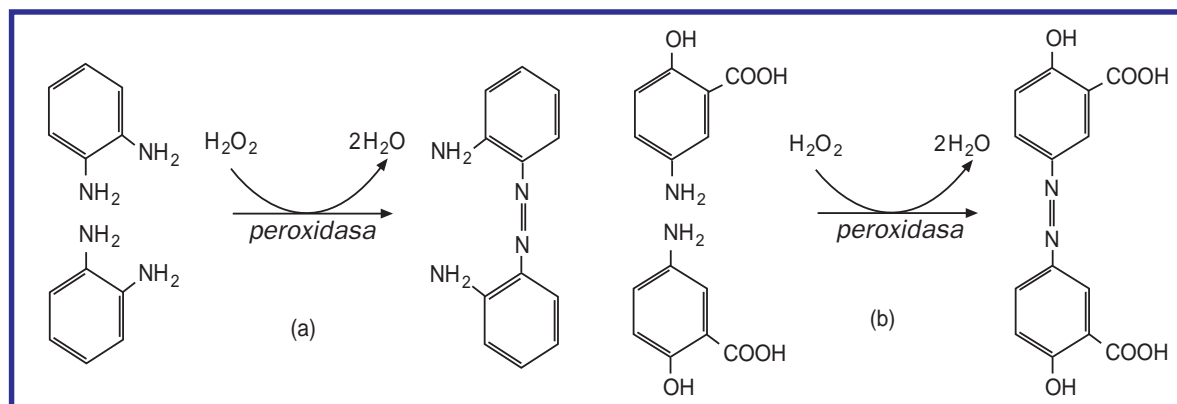
BSA**(Seroalbúmina bovina de ganado vacuno)**

El BSA se utiliza para evitar adsorciones inespecíficas de anticuerpos o conjugados de la superficie de los viales. El BSA se usa en tan elevada concentración que absorber los lugares limpios de la superficie.

La solución del sustrato

Importante - esta solución debe prepararse cuando vaya a utilizarse!.

Disolver el ácido 5-aminosalicílico del frasco etiquetado como "Sustrato" en el contenido del frasco etiquetado "Tampón H₂O₂ del sustrato". Mezclar hasta que se disuelva. **Usar guantes.**



Arriba: a) oxidación de o-fenil diamina

b) oxidación del ácido 5-amino-salicilo

Notas del profesor sobre los resultados

Respuestas a las preguntas

- Los sueros negativos son el 4,5,8 y 9.
Los sueros positivos son (en orden decreciente de la reacción): 6,7,10 y 3.
El suero número 1 es el control negativo tomado de un cerdo que no ha sido infectado con la bacteria *Bb*.
El suero número 12 es el control positivo.
- Los virus del sarampión se usan como antígenos. En el conjugado se usa un anticuerpo a la IgG humana.
- Incluso material patógeno muerto puede resultar peligroso para los humanos. Es muy difícil poder suministrar suero humano que esté libre al 100% de patógenos humanos tales como la hepatitis o el VIH.

Nota:

Una muestra positiva no necesariamente significa que el animal está infectado. Se puede haber recuperado después de la infección.

Equipo y materiales

Es necesario tener en cuenta que al obtener el kit, algunos de los reactivos deben guardarse en el congelador.

Micropipetas hasta 100 μ l
 Probeta 100 cm^3
 Cilindros de medida 20 cm^3 , 100 cm^3
 Agitador magnético
 Frasco de vidrio de 3 litros
 2,5 litros de agua desionizada
 HCl 5M
 NaOH 5M
 Guantes de goma (extra)
 Rotuladores para vidrio
 1 frasco para el antígeno (extracto hervido de la bacteria *Bordetella bronchiseptica*)*
 1 caja con 10 viales de suero de cerdo*
 1 frasco de sustrato -ácido 5-aminosalicílico- (30 mg)*
 1 frasco de conjugado de conejo IgG anti-cerdo al enzima peroxidasa. *
 1 vial de tampón sustrato con H_2O_2 *
 Placas de microtiter con tapa*
 1 frasco de sales para preparar PBS (tampón fosfato)*
 1 frasco de 2,5 cm^3 de Tween 20 (detergente sintético)*
 Pipetas de plástico*
 Guantes de goma*
 1 frasco de BSA (seroalbúmina bovina)*
 Cucharas de plástico*
 Bolsas de desperdicios*

* Los productos que aparecen marcados con el asterisco vienen en el kit.

Guía para los estudiantes



Protocolo

Primer día:

Rellenar los viales con el antígeno:

1. Añadir 100 ml de la solución del antígeno en los viales etiquetados con A, B y C (de un total de 36 viales).
2. Cubrir los viales y dejar las placas a temperatura ambiente hasta el día siguiente. Si no puedes continuar con el experimento al día siguiente, guarda las placas en el frigorífico.

Segundo día:

Desechar el exceso de antígeno:

1. Tirar el contenido de los viales (agitar con rapidez en el lavabo).
2. Agitar la placa con el fin de secar los viales.

Lavado:

3. Llenar los viales cubiertos con tampón de lavado. Esperar un minuto!
4. Vaciar totalmente (agitar hasta que estén secos si es necesario).
5. Repetir el paso 3 y 4 dos veces.

Añadir los sueros:

6. Agitar las soluciones descongeladas de los diferentes sueros.
7. Añadir 100 (l del suero 1 a los viales etiquetados con A,B y C en la columna 1 (3 viales).

CAMBIAR LA PUNTA DE LA PIPETA!

8. Añadir 100 (l del suero 3 a los viales etiquetados con A,B y C en la columna 3. La fila 2 permanece sin tocar.

CAMBIAR LA PUNTA DE LA PIPETA!

9. Continuar con el mismo procedimiento para rellenar los viales de las columnas 4,5,6,7,8,9,10 y 12.

Las columnas 2 y 11 no se utilizan.

ES NECESARIO RECORDAR QUE HAY QUE CAMBIAR LAS PUNTAS DE LAS PIPETAS CADA VEZ QUE SE USA UN SUERO DISTINTO.

10. Incubar las placas durante 15 minutos a temperatura ambiente.

Desechar el exceso de suero:

11. Vaciar todos los viales al mismo tiempo. Agitar hasta que se sequen si es necesario.
12. Lavar, vaciar y secar como se describe en los pasos 3 y 4 tres veces.

Añadir la solución del conjugado:

13. Añadir 100 (l de la solución del conjugado a todos los viales etiquetados con A, B y C.
14. Incubar las placas durante 15 minutos a temperatura ambiente.
15. Lavar, vaciar y secar como se describe en el paso 12.

Añadir el sustrato:

16. Añadir 100 (l de la solución del sustrato a cada vial.
17. Esperar a que se desarrolle el color. Anotar los resultados en una tabla utilizando una escala de 0 a 5 para expresar la intensidad del color. 0 es negativo y 5 es el más coloreado. También se pueden describir los colores.

Tratamiento de la basura:

Colocar las pipetas y las placas en una bolsa de plástico para tirarlos a la basura. El resto de las soluciones que no se han utilizado pueden tirarse por el lavabo.

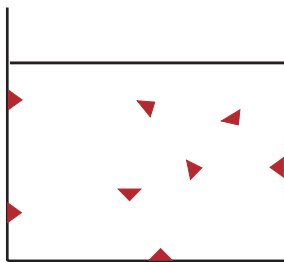
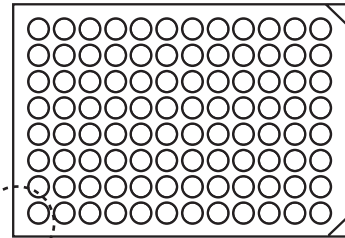
Resultados y evaluación

1. ¿Qué sueros de cerdos desconocidos han dado reacción positiva? Organiza los sueros en orden creciente del resultado positivo.
2. ¿Qué tipo de errores posibles pueden detectarse con este análisis?
3. Si quisieras hacer un test similar para detectar los anticuerpos del virus del sarampión humano, ¿qué reactivo deberías cambiar?
4. ¿Por qué piensas que no se utiliza en este experimento el test para el sarampión?

ELISA para comprobar proteínas

Prueba de inmunoabsorción ligada a un enzima

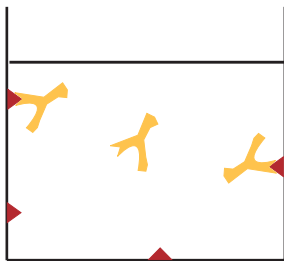
Después de que se haya añadido cada reactivo, se incuba la placa, entonces se lavan los viales para desechar los materiales que no hayan reaccionado.



1. Proteína (antígeno) que se añade y se liga al vial.



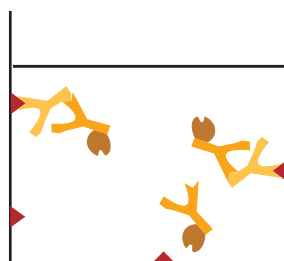
LAVAR para quitar las moléculas que no se han ligado.



2. Se añade la muestra. Los anticuerpos se unen al antígeno que se ha ligado anteriormente.



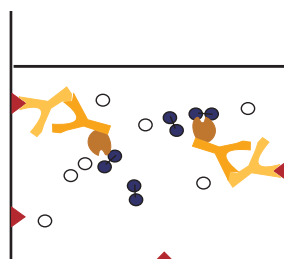
LAVAR para quitar las moléculas que no se han ligado.



3. Se añade el conjugado, enzima ligada al anticuerpo. El conjugado se una a los anticuerpos que se han ligado anteriormente.



LAVAR para quitar las moléculas que no se han ligado.



4. Se añade el sustrato enzimático no coloreado, en presencia del enzima ligado se desarrolla color.

Cómo detectar la presencia de huevo en los alimentos por inmuno-difusión doble



Los huevos se usan en muchos y distintos productos alimenticios tales como hamburguesas, pasta y algunas veces en los helados. Muchas personas son alérgicas al huevo incluso cuando está presente en cantidades pequeñísimas. Actualmente es posible detectar la presencia de trazas de la clara o la yema del huevo utilizando anticuerpos frente a la albúmina del huevo. Este procedimiento recibe el nombre de inmunodifusión.

Cuando los antígenos y los anticuerpos reaccionan cerca del lugar de equivalencia se forman a menudo precipitados de ligamiento cruzado. Si la reacción se realiza en un medio de agar como soporte, los reactivos forman arcos o líneas de precipitado, que pueden usarse para identificar los antígenos y anticuerpos en mezclas complejas.

Los precipitados se forman porque los anticuerpos y los antígenos tienen más de un punto de unión por lo que se forman estructuras grandes o alargadas de ligadura cruzada... Cuanto más lejos de su punto de equivalencia se encuentren los antígenos y los anticuerpos, menos precipitados se formarán.

El método de la doble inmunodifusión fue desarrollado por Swede Örjan Ouchterlony hace 30 años. Su método recibe el nombre de “doble” para

referirse al hecho de que en este procedimiento se permite al antígeno y al anticuerpo migrar hacia su opuesto en el gel, y se forma un arco o una línea de precipitado en el lugar donde los dos reactivos se encuentran.

Esta precipitación es altamente específica y sensible y se utiliza para realizar diagnósticos, detección de proteínas o para comparar antígenos y anticuerpos.

Objetivo

Detectar albumina de huevo en diferentes alimentos.

Organización

1^{er} Día: 60 minutos, más toda la noche para que se formen las líneas de precipitado (ver las notas del profesor) y 20 minutos para analizar los resultados (si también se desea teñir el precipitado se tardará 2h y 45 min más).

Seguridad

No es necesario tomar precauciones especiales.

Notas

Preparación del Molde

Es necesario preparar un molde picando con una forma regular el gel. Puede ser una buena idea para empezar, picar (los pocillos) del primer molde cerca del borde, dejando espacio suficiente para otro que permita realizar un segundo experimento. Utilizar una pajita o una pipeta de plástico.

Las líneas de precipitación se forman rápidamente si la distancia entre los pocillos es pequeña. Una distancia de 5 mm permitirá ver el resultado a las 24 horas y una de 10 mm tardará 48 horas en mostrar los resultados.

Después del primer día:

Si usas portas de microscopía y hace mucho calor o el ambiente del laboratorio está muy seco, los portas deben permanecer

humedecidos, si por ej. se realiza en una placa Petri, se pone un papel de filtro o una toallita de papel húmeda y un papel de aluminio hasta el día siguiente. Si hay que guardar los portas durante varios días, se recomienda guardarlos en una bolsa de plástico humedecida en presencia de un conservante para evitar el crecimiento de mohos. Evitar dañar el gel.

Los portas estarán preparados después de una noche pero se pueden guardar una semana en el frigorífico.

Solución Patrón (de referencia)

Debido a que es difícil preparar la solución patrón (de referencia), puede ser una buena idea batir parte de la clara del huevo primero, y entonces preparar la solución de referencia usando la parte líquida de la clara.

Albúmina de huevo - anticuerpo

Anticuerpo desecado por congelación se diluye en tampón TRIS de acuerdo con las instrucciones. Esta solución se distribuye en alícuotas en los viales y se guarda en el congelador.

Basura

Todos los desperdicios pueden manejarse sin peligro, como en el experimento anterior.

Tinción

La tinción no es necesaria, pero se recomienda si se quieren obtener resultados más claros. Soluciones de Negro Amido y Azul Brillante de Coomassie pueden usarse para la tinción.

Equipo y materiales

Portas de microscopio o Placas Petri pequeñas (5 cm de diámetro).

Una pajita o pipeta de plástico de 2.5 mm de diámetro para hacer los pocillos en el gel

Micropipetas: 0-10 cm³

Cámara húmeda para los portas, por ej. cajas de plástico con un toalla de papel húmedo, se pueden utilizar también Placas Petri pequeñas de plástico.

Homogenizador

Secador de pelo*

Papeles de filtro

Peso- de 1kg*

Caja para teñir el gel*

Tampón TRIS 0.01M pH 8.0

Solución de Agarosa al 1% en tampón TRIS

Solución de referencia: 0.01 % clara de huevo diluida en agua desionizada

Antisuero de conejo frente a albumina de huevo (Pharmacia AS 23)

Acido Acético

Metanol

Solución Negro Amido (0.1 g Negro Amido disuelto en 100 cm³ de una mezcla compuesta de ácido acético, metanol y agua desionizada en proporción 10:70:20)*

Solución de NaCl al 0.9 %

Solución de limpieza compuesta por 10% de ácido acético, metanol al 70%, y agua desionizada al 20%*

* Los productos que llevan un asterisco, sólo son necesarios en caso de desear hacer la tinción.

Guía para el estudiante



Procedimiento

Preparación de las muestras

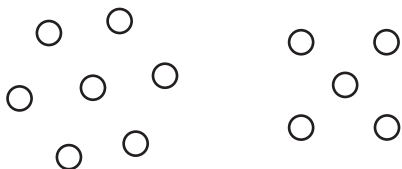
1. Homogenizar 5 gr de la muestra en 5 cm³ de agua, si es posible.
2. Centrifugar la mezcla de la muestra durante 15 min. a 6000 rpm (o 10 min a 9500 rpm).
3. Filtrar el sobrenadante a través de una pieza de tela en un tubo de ensayo limpio.

Preparación del gel

4. Disolver la cantidad correcta de agarosa en el tampón TRIS (1%). Agitar.
Para 1 placa Petri (5 cm) se necesitarán 3-5 cm³ y para el porta de un microscopio se necesitarán 3,5 cm³.
¡CUIDADO, HIERVE CON MUCHA FACILIDAD!
5. Enfriarlo hasta 60-80 C°.
6. Colocar la placa Petri (o los portas) en posición horizontal en una mesa cerca del borde. Quitar las tapas.
7. Poner el gel caliente en las placas o en el cristal, en una capa de 2-3 mm. Cubrir con las tapas.
8. Dejar que el gel se solidifique, tardará entre 5-10 min.

Preparación de los pocillos

9. Utilizar una pajita o una pipeta de aprox. 2,5 mm de diámetro para picar los pocillos en el gel. Hacerlo con cuidado de forma que los laterales sean verticales.
Quitar el gel succionando con la pipeta o utilizando una aguja.
Hacer uno de los siguientes modelos.



Añadir el anticuerpo

Nota: Antes de llenar los pocillos marcar cada uno de ellos por la parte de abajo en la placa o en el porta.

10. Llenar el centro del pocillo con el anticuerpo (anti-albúmina de huevo),

habitualmente con 5-10 micro litros es suficiente.

NO RELLENAR HASTA EL BORDE

Añadir los antígenos

11. Llenar un pocillo de cada 2 con la solución patrón.
NO RELLENAR HASTA EL BORDE
12. Llenar los otros pocillos con las muestras del test. Apuntar que muestra se ha colocado en cada pocillo.
NO RELLENAR HASTA EL BORDE

Dejar que se produzca la difusión dejando las placas Petri/ portas durante la noche en una cámara húmeda a temperatura ambiente o en el frigorífico.

13. Más tarde se podrán estudiar las líneas o arcos de precipitación blancas en donde se haya producido una reacción positiva. Será más fácil ver las líneas si sujetas las placas/ portas frente a una base oscura.

Tinción (opcional)

14. Eliminar las proteínas que no han precipitado bañando el gel en una solución de NaCl durante 60 min a temperatura ambiente.
15. Eliminar la solución salina y rellenar la caja con agua desionizada. Dejar 60 min a temperatura ambiente.
16. Eliminar el agua.
Prensar el gel bajo una capa de 10 papeles de filtro y un peso de cerca de un kilo, durante 15 min.
17. Secar el gel con un secador de pelo.
18. Cubrir el gel con la solución de tinción y dejar 10 min.
19. Eliminar la solución de tinción.
Lavar con la solución de limpiado durante 10 min.
Puede ser necesario repetir la operación de limpiado.

Resultados

El límite de detección para la clara de huevo es 2.5 mg en 100 gr. Si hubiera bastantes proteínas de pollo en la muestra aparecerán reacciones cruzadas. También la yema contiene suficientes proteínas de clara de huevo como para hacer la detección posible.

Uso del kit ELISA de STEFFENS en clase



Introducción

En este kit, un anticuerpo policlonal del Virus Pelargonium Flower Break (PFBV) está inmovilizado en un peine especial lo que permite llevar a cabo la reacción antígeno-anticuerpo, de forma sencilla y económica durante el horario escolar. El kit permite probar por duplicado, de forma segura y con un grado importante de sensibilidad, la infección que el PFBV puede haber producido en 10 muestras. El peine lleva incorporado un control negativo y otro positivo.

La sensibilidad del test se establece haciendo una extracción del material a partir de una planta previsiblemente infectada con un tampón, en el que se diluye. La existencia del virus se puede apreciar en una proporción del 1:1000 -una dilución al 10% del extracto- (100mOD sobre el límite permitido).

Los reactivos que se utilizan en el kit para la realización del experimento son estables hasta la fecha de caducidad incluida en la etiqueta si se almacenan a 4°C.

Referencias Bibliográficas

- Bömer, H. (1989) Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz. UTB 518. Stuttgart, Verlag Eugen Ulmer.
- Clark, M.F. and Adams, A.N. (1977) Journal of General Virology, 34, 475-483.

- Hollings, M. and Stone, O. M. (1974) Description of plant viruses CMI/AAB, 130, 4.
- Nellen, U. (1992) El Test ELISA: es un procedimiento universal para la identificación de antígenos a través de un procedimiento bitemológico basado en el uso de anticuerpos monoclonales - Información y descripción del experimento escolar. Biotechnology Education (3) 3, 107-112.

Pautas para el profesor

Materiales

Para la realización de cada experimento se necesita:

Incluido en el kit ELISA de STEFFENS para la realización de 12 análisis por duplicado (Orden n° 04093P00):

- En una bolsa de plástico con cierre hermético y en presencia de un desecante, envasados por separado, se puede encontrar:
- Un peine especial con 12 púas, en los que está inmovilizado el anticuerpo del PFBV,
- 3 filas con 12 viales para la reacción,
- 10 bolsas de extracción (bolsas de plástico con gasa),
- 50 cm³ de tampón preparado para utilizar con la muestra (amarillo)
- 12 pipetas de usar y tirar (para las 10 muestras de conjugado diluido y el sustrato),
- 1 pipeta de usar y tirar graduada (para el tampón de la muestra),
- 1 pipeta de usar y tirar, de punta fina y no graduada (para la solución concentrada del conjugado),
- 1 minitubo con 0.05 cm³ de la solución concentrada del conjugado (incolora),
- 1 frasco pequeño de tapón de rosca con 1.6 cm³ del tampón del conjugado (azul),
- 1 frasco pequeño con tapón de rosca con 1.6 cm³ de la solución del sustrato lista para usar (incolora),
- 1 soporte de pipetas (parte del envase),

En el kit ya preparado

(Todos los reactivos deben mantenerse a temperatura ambiente antes de empezar el experimento)

Las tres filas de viales deben colocarse en el soporte formado con el cartón del interior de la tapa de la caja (marcas y punteados).

La solución concentrada del conjugado debe transferirse en su totalidad (sin desperdiciar una gota) al tampón del conjugado de color azul, utilizando la pipeta de punta fina, de usar y tirar. Tener cuidado de que ninguna gota se quede pegada en la tapa. La mezcla debe prepararse con cuidado.

Además se necesita:

- Un máximo de 10 plantas de geranios, infectadas con el virus de lugares diferentes
- 1 par de tijeras
- Un homogenizador (por ej. el mango de un destornillador u otro objeto sólido como la mano de un mortero)
- Agua fría del grifo
- Fotómetro (650nm) si está disponible (los resultados pueden evaluarse a simple vista)
- Contenedor de basuras

Organización

Se sugieren las siguientes etapas como estrategia de enseñanza:

1er Día

- Introducir el tema
- Reacción Antígeno-Anticuerpo
- Enfermedades causadas por virus
- Trabajo para casa: recoger plantas como material para el experimento (plantas completas de geranio u hojas cogidas recientemente)

2º Día

- Homogenizar 10 muestras en las bolsas de extracción (trabajo en grupo para los estudiantes)
- Preparar los viales y las soluciones. Distribuir las muestras
- Los alumnos o el profesor deben llevar a cabo las etapas que conlleva la reacción
- Evaluar los resultados

3er Día

- Discutir los resultados
- ¿Qué factores favorecen las enfermedades virales?
- Objetivos del cultivo de plantas

Preparación del Experimento

Preparación del experimento con el kit: El kit ELISA se ha diseñado para la realización de dos pruebas de 12 análisis cada una, por lo que todo

se suministra por duplicado. La mitad de los componentes pueden por lo tanto dejarse en la caja y guardarse en un lugar frío (4°C) para usarse posteriormente.

Pipetas: Las pipetas no deben tocarse antes de usarse.

Homogenizador: Un objeto liso por ej. el mango de un destornillador o la mano de un mortero pueden usarse como homogenizador.

Peine especial: El peine, base de la reacción antígeno-anticuerpo, se encuentra junto a las tres filas de viales en una bolsa de plástico que contiene un desecante. En las púas del peine está inmovilizado un anticuerpo policlonal que reconoce específicamente al virus PFBV. La púa número 11 del peine está preparada con el control negativo (verde), la púa número 12 con el control positivo (roja). El peine debe sujetarse únicamente por la parte verde (las púas no deben tocarse).

Preparación de los viales: Se sacan de la caja la mitad de las bolsas de extracción y las pipetas que se necesiten. La tapa del compartimento interior debe desempaquetarse de tal forma que se pueda construir con ella el soporte para colocar las tres filas de viales. Se sacan los viales de la bolsa de plástico y se colocan en el portaviales. Las series y la orientación no tienen importancia. Es mejor dejar el peine en la bolsa para no tocar las púas innecesariamente. El agente desecante desecharse, porque ya no se necesita.

Conjugado: La solución del conjugado concentrado debe transferirse totalmente al tampón azul del conjugado, utilizando la pipeta de punta fina. Tener cuidado con las gotas de la solución concentrada del conjugado que permanecen en la tapa. Tirar la pipeta después de usarla. La solución del conjugado y el tampón deben mezclarse con cuidado.

Basura: Una vez que se ha evaluado el test, lavar el peine y los viales con agua corriente antes de tirarlos. No utilizar los viales incluso después de haberlos lavado, porque pueden dar lugar a reacciones incorrectas.

Notas del profesor sobre los resultados

El siguiente dibujo esquemático de la tercera fila de viales muestra unos resultados típicos:



Vial 11: (control negativo, corresponde a la púa del peine marcada con verde), no debe producirse reacción coloreada.

Vial 12: (control positivo, corresponde a la púa del peine marcada con rojo) debe dar lugar a un color azul intenso.

Comparar la coloración de estos viales con la obtenida en las muestras (viales del 1 al 10). Los tonos del color varían del azul claro al oscuro, dependiendo de la intensidad de la infección en las plantas que se hayan usado para preparar las muestras.

¡¡Precauciones!!



Los reactivos químicos

Composición del tampón de la muestra: tampón TRIS/ClH, polivinil pirrolidona, cloruro sódico, Tween 20, azida de sodio, colorante E 102.

Composición de la solución del conjugado: Tampón fosfato, peroxidasa de rábano picante, seroalbúmina bovina, Tween 20, Bronidox L (5-bromo-5nitro 1,3 dioxano) colorante E 131.

Composición de la solución del sustrato: El tampón TMB (Tetrametil benzidina) y agua oxigenada (H₂O₂).

Nota: Los reactivos contienen **Azida de sodio** y **Bronidox L** como estabilizantes, que son tóxicos si se ingieren.

Basura No se necesitan precauciones especiales.

Garantía y sensibilidad del test

EIBE no puede garantizar ni aceptar responsabilidades por los materiales y reactivos que aparecen en el kit.

Steffens Biotestnisch Analysen GmbH garantiza que los productos suministrados se han probado cuidadosamente para asegurar que el kit puede lograr las especificaciones que se incluyen y corresponde a las indicaciones dadas. Pero no pueden dar otro tipo de garantía.

Steffens Biotestnisch Analysen GmbH no puede aceptar responsabilidades por daños debidos al almacenamiento inadecuado o a la mala utilización del producto.

Tabla de resultados

Nº prueba	Observaciones (nombre muestra, origen)	Anotaciones (notas del test)	Resultados
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11	control negativo		no coloreado
12	control positivo		azul

Guía del estudiante



Introducción

La inmunobiología es en la actualidad una de las ramas más importantes de la investigación en biología aplicada. Comenzó al inicio de este siglo cuando Paul Ehrlich (Premio Nobel en 1908) descubrió el papel de los anticuerpos en la resistencia a las enfermedades infecciosas.

La defensa inmunológica en los vertebrados depende de la formación de un complejo antígeno-anticuerpo específico. Un antígeno es cualquier sustancia capaz de estimular la producción de anticuerpos. Los antígenos pueden ser cualquier compuesto orgánico como polisacáridos, proteínas, péptidos o ácidos nucleicos, reconocidos como extraños.

Algunas proteínas endógenas globulares, llamadas inmunoglobulinas, actúan como “anticuerpos”. Estos “reconocen” ciertas estructuras de la superficie del antígeno a nivel molecular y se combinan con él para formar un complejo insoluble.

Esta propiedad de los anticuerpos se utiliza en el proceso de diagnóstico inmunológico y permite identificar trazas del antígeno del orden de 10^{-8} gr/cm³ por muestra. Antes, los anticuerpos se extraían de animales a los que se había inyectado un antígeno determinado, pero este mecanismo producía un rendimiento muy bajo de producción de anticuerpos, que ha mejorado con el desarrollo del “proceso de hibridación”, que se utiliza para la producción de anticuerpos “monoclonales”. Actualmente se utilizan técnicas biotecnológicas para la producción de las células híbridas, producto de la combinación de linfocitos que son los que forman los anticuerpos de los animales y de las células tumorales. Estas células, los hibridomas, tienen características combinadas y son capaces de multiplicarse constantemente y producir anticuerpos “monoclonales”.

Los anticuerpos utilizados en un test de diagnóstico necesitan marcarse para que el complejo antígeno-anticuerpo sea visible. Con este objetivo los anticuerpos con frecuencia se combinan con un enzima. El enzima puede entonces reaccionar con un sustrato al que transforma en un producto coloreado. El color de la reacción indica que la muestra es positiva.

El test ELISA se basa en el principio de la Prueba de Inmuno Absorción ligada a un Enzima. Se pueden examinar un importante número de antígenos con este método, principalmente aquellos que son de origen vírico.

Las enfermedades virales afectan no sólo a los animales y a los humanos sino también a las plantas. La difusión del material infeccioso por la propagación intensiva de los métodos que se usan en la agricultura y en los semilleros ha hecho que la técnica ELISA cobre más importancia cada día.

Este test detecta una infección vírica de los geranios. La infección del PFBV hace que los capullos cambien de color de forma no deseada. Es una infección común de los geranios por lo que no debería haber problema para encontrar muestras positivas para el experimento. El principio en el que se basa el test se conoce con el nombre de la “técnica del sandwich”, en la que un anticuerpo inmovilizado se une al antígeno, si está presente en la muestra, y un segundo anticuerpo se une entonces al antígeno inmovilizado para formar un complejo anticuerpo-antígeno-anticuerpo. El segundo anticuerpo se marca con un enzima, que transforma el sustrato incoloro en un producto coloreado.

En el kit Elisa de Steffens, el primer anticuerpo al PFBV está inmovilizado en las púas del peine.

1ª Reacción

Los antígenos PFBV de las muestras se unen a los anticuerpos inmovilizados del peine. El complejo antígeno-anticuerpo se forma en las púas del peine.

2ª Reacción

El segundo anticuerpo del PFBV que se marca con peroxidasa de rábano picante (enzima conjugada) se une al complejo antígeno-anticuerpo en las púas del peine.

3ª Reacción

El complejo antígeno-anticuerpo que está marcado con el enzima transforma el sustrato tetrametil benzidina en un producto coloreado azul. Las pruebas infectadas con el PFBV muestran color azulado, las no infectadas no se colorean.

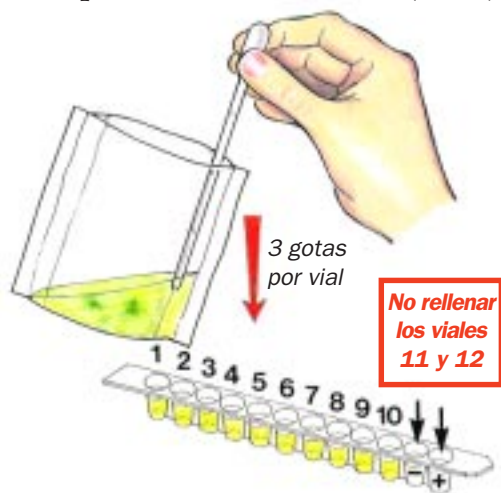
Procedimiento

1. Preparación de las muestras (10 min)



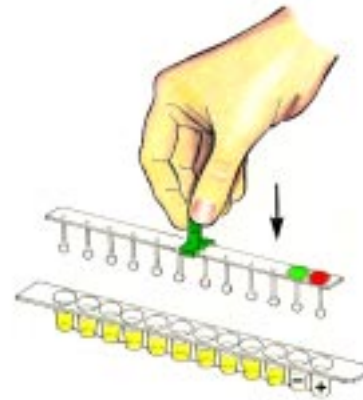
- 1.1 Colocar un trozo de hoja de aproximadamente 15 cm² (unos 0.5 gr) en el interior de la bolsa de extracción, entre la gasa.
- 1.2 Añadir 5 cm³ del tampón para la extracción de la muestra (amarillo) con la pipeta graduada. Evitar toda contaminación de este tampón con el extracto de la planta.
- 1.3 Colocar la bolsa para la extracción en una superficie lisa y estable donde se pueda machacar la hoja, ejerciendo una presión moderada con el homogenizador sobre la bolsa y realizando movimientos circulares, hasta conseguir una suspensión fina. La liberación de la clorofila (color verde) es una buena señal del grado de extracción.

2. Preparación de las muestras (5 min)



- 2.1 Numerar las muestras de 1 a 10 y transferir 3 gotas de cada una de ellas a los viales de la primera fila de la reacción, empezando por la izquierda. Utilizar una pipeta limpia para cada muestra.
- 2.2 Dejar los viales 11 y 12 vacíos, en el extremo derecho. Permanecerán vacíos durante la primera reacción.

3. Primera incubación (10 min)



- 3.1 Colocar el peine en la fila de la primera reacción de tal forma que los controles (que están inmobilizados en el peine, los puntos verde y rojo) coincidan con los viales vacíos 11 y 12. Así comienza la primera reacción que necesita 10 min de tiempo de incubación. Se puede utilizar este tiempo para preparar la solución del conjugado.

4. Preparación de la solución del conjugado



- 4.1 Utilizando la pipeta de punta fina, transferir la solución concentrada del conjugado en su totalidad (sin dejar gota) en el tampón del conjugado de color azul. Tener cuidado de no dejar ninguna gota en la tapa. Mezclar cuidadosamente.

5. Preparación del conjugado



- 5.1 Utilizando una nueva pipeta poner 3 gotas del conjugado diluido en cada vial (incluyendo el vial 11 y 12) de la segunda fila. Evitar contaminar la tercera (vacía) fila de viales.

6. Lavar el peine (30 seg)



- 6.1 Después de incubar durante 10 min. sacar el peine de la primera fila.
- 6.2 Lavar las púas debajo de agua fría dejando correr suavemente el agua de 15 a 30 seg. No mantener al peine en posición vertical mientras fluye el agua para evitar la contaminación cruzada. Es necesario lavar cuidadosamente para evitar restos de las coloraciones anteriores.
- 6.3 Eliminar todo el agua restante en el peine con unas pocas sacudidas.

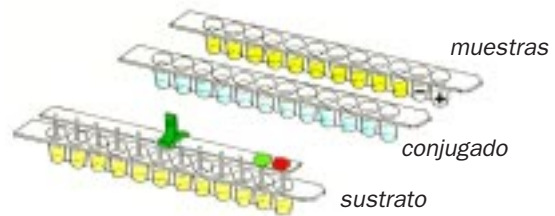
7. Incubación con el conjugado (10 min) y distribución del sustrato



- 7.1 Colocar el peine en la segunda fila, dejando también los controles en el extremo derecho (puntos rojo y verde).
- 7.2 Incubar durante 10 min.
- 7.3 Utilizar una pipeta nueva y poner 3 gotas de la solución del sustrato en cada vial de la tercera fila (incluyendo el 11 y el 12)

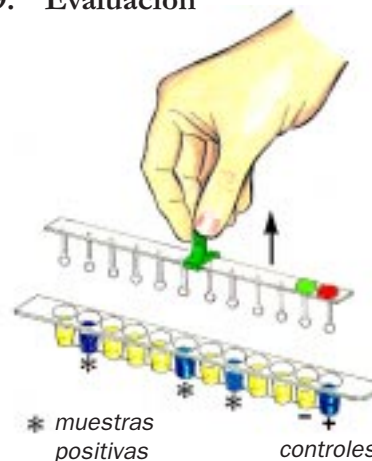
Nota: El sustrato es sensible a la luz. Evitar trabajar bajo la luz directa del sol.

8. Incubación con el sustrato (11 min)



- 8.1 Después de la incubación, lavar el peine de nuevo cuidadosamente con agua corriente fría como se explicó en la etapa 6
- 8.2 Colocar el peine en la tercera fila de viales (que contienen el sustrato) con los controles situados en el extremo derecho. Incubar durante 10 min. Evitar la acción directa del sol.

9. Evaluación



- 9.1 El test se evalúa inmediatamente después de sacar el peine tras la última incubación, observando a simple vista y apuntando el color desarrollado o con la ayuda de un fotómetro a 650 nm.
- 9.2 Los controles están diseñados para comprobar el funcionamiento del test. El test ha funcionado bien si el control positivo muestra un color azul intenso, mientras que el control negativo permanece sin color. Las muestras que exhiban un color de reacción más fuerte que el control negativo significa que la planta de origen está infectada por el virus. Si la muestra tiene menos color o tiene el mismo que el control negativo, significa que probablemente no estaba infectada. La infección sin embargo no puede excluirse completamente, debido a que la concentración del virus en la muestra puede ser menor que la sensibilidad del test.