

18. Inmunoanálisis

Aurora Galván Cejudo¹, Isaac Túnez Fiñana²

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular,

¹Campus Universitario de Rabanales, Edificio Severo Ochoa, 14071-Córdoba,

²Facultad de Medicina, Avda. Menéndez Pidal s/n, 14004-Córdoba.

RESUMEN

Las técnicas basadas en las reacciones antígeno-anticuerpo (inmunoanálisis) permiten el estudio, reconocimiento y cuantificación de una gran cantidad de moléculas. El presente texto describe algunas de las más comunes y ejercicios prácticos para la titulación de un anticuerpo y cuantificación de un antígeno, mediante la técnica de ELISA.

Palabras clave: Antígeno, anticuerpo, ELISA, radioinmunoensayo.

Abreviaturas: Ac: Anticuerpo, Ag: Antígeno, ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay, PBS: buffer fosfato salino

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Como toda técnica inmunoquímica se basa en reacciones específicas antígeno (componente a valorar)-anticuerpo (reactivo), que en estos casos es de tipo primario, es decir, el reconocimiento específico y combinación entre ambas moléculas simplemente.

El objetivo principal estará dirigido a la comprensión e identificación de conceptos relacionados es este tipo de ensayos como son: antígeno, anticuerpo, especificidad, afinidad, así como la descripción de las técnicas básicas y su uso.

1.1. Técnicas basadas en reacciones inmunológicas primarias

1.1.1. Inmunofluorescencia indirecta

Se trata de una técnica microscópica cuya base es una reacción inmunológica con marcador fluorescente.

En particular, la técnica consiste en incubar el antígeno (parámetro a valorar de la muestra) con un anticuerpo específico que se encuentra fijado a un cubreobjetos, luego se le añade un anti-anticuerpo marcado con el fluoróforo que se unirá al complejo fijado al portaobjeto, y tras una nueva incubación y un lavado se visualiza la positividad o no del ensayo visualizándolo en un microscopio con lámpara ultravioleta.

1.1.2. Enzimoimmunoanálisis

Su particularidad radica en el empleo de enzimas como marcadores inmunoquímicos que permiten valorar las uniones antígeno-anticuerpo que se

producen tras un periodo de incubación, con la adición posterior de un sustrato.

En estos ensayos hay tres piezas constantes que hay que tener siempre en mente, y que originan distintos tipos de EIA en función de como se combinen; son el analito (antígeno o anticuerpo), el conjugado (de antígeno o de anticuerpo) y el sustrato.

A este tipo de técnicas se las reconoce con distinta terminología, pero con fundamentos comunes. Entre la más habitual se encuentra... ELISA, EIA, MEIA, EMIT,....

Es la metodología que más ha evolucionado en las últimas décadas, y está actualmente muy difundida en todos los laboratorios.

Se emplea para la detección/cuantificación de componentes que se encuentran a muy baja concentración en líquidos biológicos.

Existen distintas clasificaciones de los EIA, entre las que cabe destacar la que los divide en dos grandes grupos en función de la necesidad de medir el grado de reacción inmunológica separando los complejos antígeno-anticuerpo formados del resto de los componentes, o bien, realizando la medida en la matriz original de reacción aprovechando que dicha unión afecta a la actividad catalítica del conjugado, son respectivamente heterogéneos y homogéneos.

Otras clasificaciones surgen a raíz de las combinaciones entre la sustancia a valorar y el marcador que lleva ligada la enzima (conjugado), ya sean antígeno o anticuerpo, así se dividen en competitivos y no competitivos, en "sandwich", de antígeno marcado, de anticuerpo marcado.

Por otra parte, también se pueden clasificar en función del sustrato empleado, el cual puede generar una reacción colorimétrica, ultravioleta, fluorescente, quimioluminiscente, etc.

1.1.3. Fluoroimmunoanálisis

La introducción de marcadores fluorescentes en los inmunoanálisis, fue una de las primeras alternativas al RIA (radio-inmuno-análisis) a mediados del pasado siglo. El primer escollo con que se encontró esta técnica fue la menor sensibilidad con respecto a los radioisótopos, debido a la presencia de "ruido de fondo" por la fluorescencia propia de moléculas endógenas de la muestra y no separables de la misma (sobre todo entre 340-500 nm). El perfeccionamiento de los marcadores fluorescentes (fluoróforos) y de la instrumentación fue dando mayor validez a esta tecnología.

1.1.4. Radioinmunoanálisis

Es una técnica inmunológica en la que se utilizan radioisótopos para detectar antígenos o anticuerpos en líquidos biológicos.

En este ensayo se incorpora una reacción de enlace competitivo, en la que una cantidad fija de antígeno marcado radiactivamente y antígeno de la muestra compiten por un número limitado de sitios de enlaces específicos con el anticuerpo. La unión de los dos antígenos con el anticuerpo forma un complejo precipitable. El porcentaje de antígeno marcado que se precipita

disminuye a medida que la concentración de antígeno no marcado en la muestra aumenta. Por tanto, la concentración de antígeno en la muestra problema es inversamente proporcional a la cantidad de radioactividad de la fracción enlazada.

Sea antígeno (Ag) la sustancia que quiere medirse, Ag* la misma sustancia que contiene en su molécula un isótopo radioactivo y el anticuerpo (Ac) que reacciona específicamente con los anteriores y que se encuentra en una cantidad insuficiente para unir todas las moléculas de antígeno presente. Si se incubaba una muestra que contenga Ag, Ag* y Ac, los dos Ag y Ag* compiten por su unión con Ac.

Tras producirse la reacción, se separan los antígenos unidos (Ag-Ac, Ag*-Ac) de los libres Ag*, Ac). Una vez separados se mide la radioactividad de las fracciones unida y libre. Utilizando curvas de calibración obtenidas con patrones de los que se conoce la concentración de Ag, es posible mediante la relación entre el Ag libre y unido calcular la concentración de Ag en la muestra problema.

Los métodos de separación del Ag libre y unido pueden agruparse en tres tipos:

1.2. Método de adsorción

El Ag libre se retiene superficialmente en un material insoluble adecuado (carbón activo, silicato magnésico, resinas de intercambio iónico). La centrifugación deja en el sobrenadante la fracción unida y lleva al sedimento la fracción libre.

1.3. Método de precipitación

El Ag unido se separa del libre precipitando el Ag unido con compuestos precipitante de proteínas como el sulfato amónico, etanol, ácido perclórico. Tras centrifugar, el Ag unido queda en el sedimento y el libre en el sobrenadante.

1.4. Método de doble anticuerpo

El Ag unido puede precipitarse con un segundo Ac para él. Después de centrifugar, el Ag unido queda en el sedimento y el libre en el sobrenadante.

1.5. Otras técnicas

1.5.1. Inmunoensayo de electroquimioluminiscencia

1.5.2. Técnicas basadas en la variación de la radiación emitida debida a la formación de inmunocomplejos

1.5.3. Inmunoensayos en fase sólida

1.5.4. Técnicas basadas en reacciones inmunológicas secundarias

1.5.4.1. Aglutinación

1.5.4.2. Precipitación

1.6. Objetivos

El objetivo de la presente práctica es la utilización la técnica de ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) para la titulación de un anticuerpo y la cuantificación de un antígeno. Los protocolos se adaptan para la utilización de cualquier pareja de Ag-Ac que se disponga en el laboratorio.

2. LISTADO DEL MATERIAL NECESARIO

Pipetas automáticas

Puntas desechables

Agua destilada

Matraz aforado

Vaso de precipitado

Carbonato sódico

Bicarbonato sódico

Fosfato monopotásico

Cloruro monopotásico

Cloruro sódico

Anticuerpos

Placa ELISA

Lector placa ELISA

3. PROTOCOLOS A REALIZAR

3.1. Protocolo 1: Titulación de un anticuerpo específico

A) plaquear el Ag en la placa de ELISA. Preparar una solución de Ag en el tampón bicarbonato a una concentración de 0,02 mg/ml y pipetear 50 μ l/pocillo (1 μ g) (El ELISA es sensible hasta 100 ng/pocillo, rutinariamente se plaquea 0,5-1 μ g/pocillo).

En este caso utilizar cuatro filas horizontales de la placa (ejemplo A (1-12), B (1-12), C (1-12) y D (1-12)).

Dejar secar los pocillos durante toda la noche en campana, o con un secador de aire 1-2 horas.

B) Lavar los pocillos. Los pocillos se lavan tres veces con PBS-Tween para eliminar el exceso de Ag no adsorbido al pocillo.

C) Añadir el primer Ac. Preparar el primer Ac en PBS-Tween.

Puesto que en este caso se va a titular un Ac específico (ej. suero inmune) se recomienda preparar diluciones 1:100 (4 µl Ac más 396 µl PBS-Tween) del suero inmune y de un suero irrelevante ó suero preinmune.

Añadir por duplicado en los pocillos A1 y B1 200 µl del primer anticuerpo específico diluido 1:100

Añadir por duplicado en los pocillos C1 y D1 200 µl del suero preinmune, o suero irrelevante.

Los pocillos A1, B1, C1 y D1 tendrán una dilución 1:1.

En los pocillos restantes se colocan 100 µl de PBS-Tween y con una pipeta multicanal se van haciendo las diluciones de pocillo a pocillo:

Tomar 100 µl de A1/B1/C1/D1 y transferirlos a A2/B2/C2/D2, homogenizar.

Tomar 100 µl de A2/B2/C2/D2 y transferirlos a A3/B3/C3/D3. Tomar 100 µl de A3/B3/C3/D3 y transferirlos a A4/B4/C4/D4 y así sucesivamente.

De esta manera se irán haciendo diluciones el primer Ac 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200, 1: 6400, 1:12800 etc...

Incubar unas 2h a temperatura ambiente ó toda la noche a 4°C.

D) Lavar los pocillos. Los pocillos se lavan tres veces con PBS-Tween para eliminar el exceso de primer Ac que no ha reaccionado con el Ag.

E) Añadir el segundo Ac. Añadir 100 µl del Ac en PBS-Tween y a la dilución que recomiende la casa comercial (1:5000 puede ser correcta).

Incubar 1h a temperatura ambiente

F) Lavar los pocillos. Los pocillos se lavan tres veces con PBS-Tween para eliminar el exceso del segundo Ac que no ha reaccionado con el primer Ac.

G) Revelar. Añadir 200 µl de la solución de revelado de la peroxidasa, preparada inmediatamente antes de usarla.

El color aparecerá en 15-20 min.

Parar la reacción añadiendo 60 µl de sulfúrico 2,5 M por pocillo

Leer absorbancia a 492 nm en un lector de ELISA

H) Representar gráficamente DO frente a las diluciones del primer Ac. La reacción del suero preinmune será una reacción inespecífica que se restaría a la reacción del Ac específico.

3.2. Protocolo 2: Cuantificación de un Ag

A) plaquear el Ag en la placa de ELISA. Preparar una solución del Ag en tampón bicarbonato, ej. a una concentración de 0,02 mg/ml y pipetear por duplicado:

100 μ l (2 μ g) en los pocillos E1 y F1
90 μ l (1,8 μ g) en los pocillos E2 y F2
80 μ l (1,6 μ g) en los pocillos E3 y F3
70 μ l (1,4 μ g) en los pocillos E4 y F4
60 μ l (1,2 μ g) en los pocillos E5 y F5
50 μ l (1 μ g) en los pocillos E6 y F6
40 μ l (0,8 μ g) en los pocillos E7 y F7
30 μ l (0,6 μ g) en los pocillos E8 y F8
20 μ l (0,4 μ g) en los pocillos E9 y F9
10 μ l (0,2 μ g) en los pocillos E10 y F10

Las muestras a cuantificar se prepararan en el mismo tampón y se colocarán en los pocillos E11 y F11, y E12 y F12.

Dejar secar los pocillos como se indicó anteriormente.

B) Lavar los pocillos. Los pocillos se lavan tres veces con PBS-Tween.

C) Añadir el primer Ac específico.

Preparar el primer Ac en PBS-Tween. La titulación realizada en el apartado anterior indicará la dilución más correcta a utilizar. En cualquier caso una dilución de referencia puede ser 1:5000. Se añaden 100 μ l a todos los pocillos

Incubar unas 2h a temperatura ambiente

D) Lavar los pocillos. Los pocillos se lavan tres veces con PBS-Tween .

E) Añadir el segundo Ac. Añadir 100 μ l del segundo Ac en PBS-Tween y a la dilución que recomiende la casa comercial (1:5000 o 1:2000 puede ser correcta).

Incubar 1h a temperatura ambiente.

F) Lavar los pocillos. Los pocillos se lavan tres veces con PBS-Tween.

G) Revelar. Añadir 200 μ l de la solución de revelado de la peroxidasa, preparada inmediatamente antes de usarla.

El color aparecerá en 15-20 min.

Parar la reacción añadiendo 60 μ l de sulfúrico 2,5 M por pocillo

Leer DO a 492 nm en un lector de ELISA

H) Representar gráficamente DO frente a las concentraciones del Ag.

5. BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

Gozález de Buitrago JM (1998): Técnicas inmunoquímicas. En González de Buitrago JM, Arilla E, Rodríguez-Segade M, Sánchez A (eds): Bioquímica Clínica, 1ª Ed. Editorial McGraw-Hill Interamericana(Madrid, España), pp. 29 – 48.

Harlow Ed, Lane D (1988): Antibodies, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Steinbeck MJ, Wyner LR (1995): Ensayo inmunológico y principios relacionados. En Anderson SC, Cockayne (eds): Química Clínica, 1ª Ed. Editorial Interamericana McGraw-Hill (México D.F., México), pp. 94 – 108.

ANEXO 1

Tampón bicarbonato pH 9,6:

- 0,16 g Na₂CO₃

- 0,29 g NaHCO₃

En 100 ml de H₂O y ajustar a pH 9,6 con Na₂CO₃

PBS-Tween:

- 8 g NaCl/l

- 0,2 g KH₂PO₄/l

- 2,9 g Na₂HPO₄/l

- 0,2 g KCl/l

Añadir 5 ml/l de Tween 20

El antígeno (Ag)

Un primer anticuerpo específico

Un anticuerpo irrelevante (no reconoce al Ag) o un suero preinmune

Un segundo anticuerpo marcado con peroxidasa

Solución de revelado (para una placa):

- 10 ml H₂O

- 4,8 ml ácido cítrico 0,1 M

- 5,2 ml de Na₂HPO₄ 0,2 M

- 8 mg O-Phenilendiamine (OPD)

- 8 µl de H₂O₂ al 30%

