

Análisis multiplex de citocinas

Russell Garland KWS BioTest

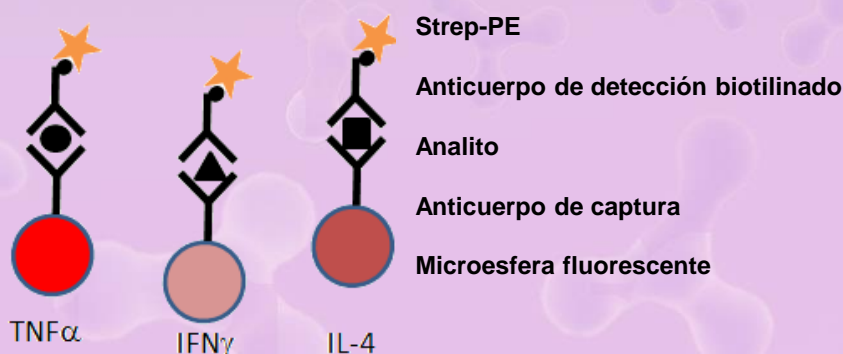
Traducción: Jesús Gil, Würzburg, DE (SEI)

Introducción

El ELISA es un método bien establecido de cuantificación de citocinas en muestras líquidas. El análisis multiplex permite medir múltiples analitos de una misma muestra. Existen distintas plataformas multiplex, como los sistemas basados en microesferas (Luminex y ensayo de microesferas por citometría de flujo) y electroquimioluminiscencia (superficie de carbón, MSD)

Cómo es el ensayo

La descripción siguiente corresponde con el ensayo Luminex, aunque los otros sistemas también están basados en una configuración sandwich, utilizando anticuerpos de captura y detección marcados. El principio es similar al ELISA sandwich de captura, excepto en que el anticuerpo de captura está adherido a microesferas en suspensión y no directamente al pocillo. Las microesferas se recubren con el anticuerpo monoclonal de captura, específico para una citocina, y se marcan internamente con una combinación única de componentes fluorescentes. Mediante la mezcla de diferentes microesferas se pueden detectar hasta 100 analitos simultáneamente. Las microesferas específicas de las citocinas de interés se incuban con la muestra a analizar en una placa de 96 pocillos. Después de lavar para remover la proteína que no ha se unido, los anticuerpos de detección biotilados (de nuevo específicos para cada citocina de interés) se añaden. La estreptavidina-ficoeritrina (Strep-PE), que se une a los anticuerpos de detección, es el siguiente componente. Se recomienda tener pocillos de control donde se añaden concentraciones conocidas de la citocina, para crear curvas estándar.



Las muestras se analizan en una máquina que, al igual que el citómetro de flujo, utiliza láseres para identificar simultáneamente cada microesfera de acuerdo con su fluorescencia particular (que corresponderá a una citocina) y mide la señal de PE (la cantidad de citocina capturada en la superficie de la microesfera). La intensidad de la señal correspondiente a la curva estándar viene dada por cada set de microesferas. El método de electroquimioluminiscencia consiste en un electrodo de carbón recubierto con anticuerpos de captura, con puntos de carbón discretos relacionados con cada citocina del panel multiplex. La muestra o el estándar es posteriormente añadido, seguido de un anticuerpo de detección electroquimioluminiscente. Después se aplica un voltaje a la placa y la luz emitida es cuantificada.

Continúa en la siguiente página...

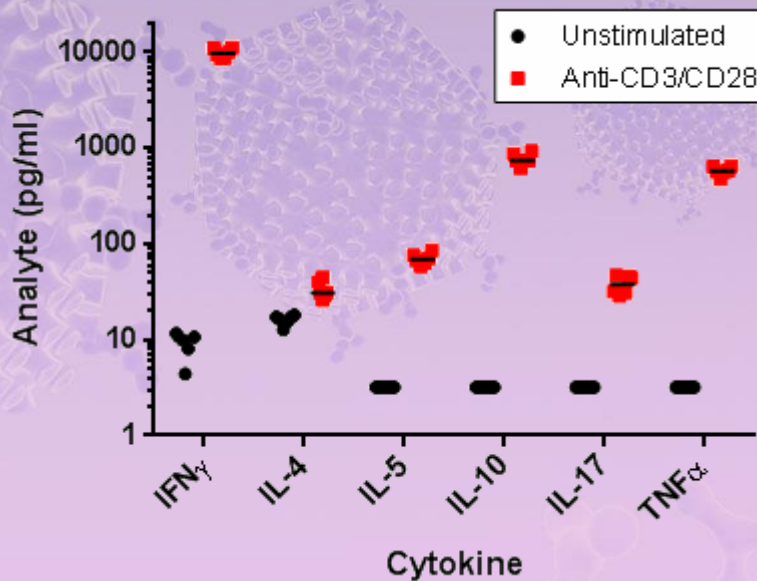
Análisis multiplex de citocinas

Russell Garland KWS BioTest

Traducción: Jesús Gil, Würzburg, DE (SEI)

Ejemplo de resultados

Las células T fueron purificadas de sangre humana y posteriormente cultivadas en presencia o ausencia de antiCD3/CD28. Después de 72 horas, se midieron seis citocinas en el sobrenadante por Luminex. (Aunque se pueden analizar paneles más grandes, hemos puesto a punto paneles de hasta ocho marcadores clave para asegurar que todos están dentro de un rango cuantificable)



© Los derechos de este documento corresponden a su autor.

Ventajas

El ensayo multiplex es un poderoso método que genera datos cuantitativos de muchos analitos en una muestra de menos de 50 μ l, algo muy ventajoso cuando el volumen es limitante. Puede medir múltiples marcadores asociados con estados de enfermedad, lo que permite expandir nuestro entendimiento más allá de los analitos bien establecidos.