

26/04/2021

### Coating Poly-D.Lys (culture slides)

Coating 24 culture slides con Poly-D 1/40 en PBS1x (de stock poly-d 1 mg/ml) → aprox 300 ul por pocillo

### Separación cels B

3 tubos CPT (Cinta)

#### 1) Extracció de PBMCs

- Centrifugar 20 minuts a 1650 g sense fre a temperatura ambient.
- Invertir els tubs per resuspendre les cèl·lules al plasma i decantar els sobrenadants a un tub de 50 ml.
- Rentar amb suero fisiològic en una proporció 1:1 i centrifugar durant 5 minuts a 300g amb acceleració i fre.
- Treure el sobrenedant i fer un altre rentat amb suero fisiològic (posar 40 ml de suero).
- Centrifugar 5 minuts a 300 g amb acceleració i fre, i treure el sobrenedant.
- Ressuspendre el pellet en 2 ml de **B cell isolation medium**
  - 2% de FBS: 500 µl
  - 1 mM d'EDTA: 50 µl de EDTA 0'5M
  - 24'5 ml de PBS
- Fer recompte cel·lular (95 ul tripan blue + 5 ul cells) → **aprox 80x10<sup>6</sup> cèls/ml**
  - **Faig 4 pellets amb 5x10<sup>5</sup> cels**
  - **Faig 4 pellets amb 5x10<sup>6</sup> cels**
  - **La resta: separació cels B**

#### 2) Separació de cèl·lules B

S'utilitza el kit "EasySep negative selection Human B-cell enrichment kit" (190549, Stemcell Technologies).

- Preparar la suspensió cel·lular a una concentració de 5x10<sup>7</sup> cèls/ml (en *Bcell isolation medium*) → les cèl·lules s'han de posar a un tub de 5 ml de poliestirene (tap de doble tancament). → **2 ml**
- Afegir 50 µl de **Human B Cell Enrichment Cocktail** cada ml de suspensió cel·lular. Barrejar bé i incubar a temperatura ambient durant 10 minuts. → **100 ul**
- Afegir 75 µl de **D Magnetic Particles** cada ml de suspensió cel·lular. Barrejar bé i incubar a temperatura ambient durant 5 minuts. → **150 ul**

- Afegir **Bcell isolation medium** fins a un volum total de 2,5 ml.
- Posar el tub (sense tap) dins de l'ímant lila. Deixar 5 minuts.
- Invertir l'ímant i passar el contingut del tub a un altre tub de 5 ml amb doble tancament
- Fer recompte cel·lular →  $4,6 \times 10^5$  cels/ml
  - Faig 3 pellets amb  $2,5 \times 10^5$  cels
  - Faig 2 pellets amb  $1 \times 10^5$  cels
  - Faig 1 pellet amb 50.000 cels

Para hacer los pellets:

- Subo arriba las células en medio (en cada eppendorf)
- Centrifugo 2000g 5 minutos 4°C
- Quito sobrenadante y lavo con PBS1x (de cultivos)
- Centrifugo 2000g 5min 4°C
- Quito sobrenadante. Congelo a -80°C (caja RNA cels B Cinta):
  - 2 pellets PBMC 500.000 cels
  - 4 pellets PBMC 5 millones cels
  - 1 pellet Cels B 250.000 cels
  - 1 pellet Cels B 50.000 cels

### Extracción RNA y RT (Cells-to-ct)

Kit: TaqMan Fast Advanced Cells-to-CT

**Muestras** (sin congelar previamente, pellet fresco):

- PBMC (CLR) 500.000 cels
- Cels B (CLR) 250.000 cels
- Cels B (CLR) 100.000 cels

#### **1) RNA extraction**

- Add 50 µl of Lysis Solution to each sample → for each sample: 49.5 µl Lysis solution + 0.5 µl DNase I
- Mix by pipetting up and down 5 times
- Incubate for 5 minutes at room temperature
- Add 5 µl of Stop Solution to each lysis reaction

## 2) Reverse Transcription (RT)

- In a nuclease-free microcentrifuge tube on ice, prepare an RT Master Mix for the number of reactions required + 10% overage → for 1 reaction (total = 30 µl): **preparo para 3 muestras + blanco (sin muestra, agua) → todo x4,5**
  - 25 µl 2X Fast Advanced RT Buffer → **112,5 ul**
  - 2.5 µl 20X Fast Advanced RT Enzyme Mix → **11,25 ul**
  - 2.5 µl Nuclease-free water → **11,25 ul**
- Distribute RT Master Mix to nuclease-free PCR tubes (30 µl each)
- Add 20 µl sample to each aliquot of RT Master Mix → final volume 50 µl
- Set up the thermal cycler:

Step	Stage	Cycles	Temperature	Time
Reverse transcription (hold)	1	1	37°C	30 minutes
RT inactivation (hold)	2	1	95°C	5 minutes
Hold	3	1	4°C	Indefinite

Congelo las muestras de RNA sobrantes a -80°C (caja RNA cels B Cinta), y las muestras después de la RT a -20°C (caja tubos pequeños)

## Extracción RNA (kit ThermoFisher)

Kit: **PureLink RNA Mini Kit**. Sigo el protocolo: Protocol for purification from animal and plant cells.

**Muestras** (sin congelar previamente, pellet fresco):

- **PBMC (CLR) 500.000 cels**
- **Cels B (CLR) 250.000 cels**
- **Cels B (CLR) 100.000 cels**

**Protocolo:**

- Añadir 300 µl de Lysis Buffer con B-mercaptoethanol a cada muestra (cada 1 ml de Lysis Buffer, poner 10 µl de B-mercapto).
- Vortear
- Homogeneizar células pasando el lisado por una jeringa de insulina de 5 a 10 veces
- Añadir 1.5 volúmenes de etanol 100 % (450 µl) y vortear
- Transferir todo el volumen a una Spin Cartridge (en collection tube) y centrifugar 12.000g 15s a RT
- Descartar líquido y añadir 700 µl de Wash Buffer I
- Centrifugar 12.000g 15s a RT

- Descartar líquido y poner en un nuevo collection tube
  - Añadir 500 ul de Wash Buffer II
  - Centrifugar 12.000g 15s a RT
  - Descartar líquido y volver a repetir el último lavado (500 ul de Wash Buffer II, centrifugar 12.000g 15s a RT)
  - Centrifugar 12.000g 1min a RT
  - Descartar el líquido y poner la columna en un Recovery tube
  - Añadir **30 ul** de agua RNase-free en el centro de la columna
  - Incubar 1 min a RT
  - Centrifugar 12.000g 2min a RT
  - Cuantificar RNA (lo hago con el nanodrop del labo):
    - **PBMC 500.000 cels: 3,9 ng/ul**
    - **Cels B 250.000 cels: 1,1 ng/ul**
    - **Cels B 100.000 cels: 4,5 ng/ul**
- \*Volver a cuantificar pero en el Nanodrop de plataformas!!

**28/04/2021**

### Coating células + transfección Culture slides

24 culture slides:

- 4 todo CNTN1
- 1 todo NF155 sin tag
- 4 todo LRP4
- 15 Perfil

**Protocolo:**

- Preparar mezclas transfección → cada culture slide (8 pozos)
  - 2,2 ug DNA + 68 ul Optimem
  - 3,2 ul lipofectamina2000 + 68 ul Optimem
- Juntar y dejar reposar mínimo 5 minutos
- Poner 300 ul de medio HEK a cada pozo
- Poner 120.000 cels (HEK293) a cada pozo
- Poner 17 ul de mezcla de transfección a cada pozo

## Separación cels B

4 tubos CPT → paciente CIDP ya tratada con IVIg el día anterior (no sirven para el estudio)

M.Mercedes Bou Rodríguez (MBR) NHC: 1362380, DN: 11/07/1964

### Extracció de PBMCs

- Centrifugar 20 minuts a 1650 g sense fre a temperatura ambient.
- Invertir els tubs per resuspendre les cèl·lules al plasma i decantar els sobrenadants a un tub de 50 ml.
- Rentar amb suero fisiològic en una proporció 1:1 i centrifugar durant 5 minuts a 300g amb acceleració i fre.
- Treure el sobrenedant i fer un altre rentat amb suero fisiològic (posar 40 ml de suero).
- Centrifugar 5 minuts a 300 g amb acceleració i fre, i treure el sobrenedant.
- Ressuspendre el pellet en 2 ml de **B cell isolation medium**
  - 2% de FBS: 500 µl
  - 1 mM d'EDTA: 50 µl de EDTA 0'5M
  - 24'5 ml de PBS
- Fer recompte cel·lular (95 ul tripan blue + 5 ul cels) → **aprox 40 millones cels/ml**
  - **Hago 4 pellets de 500.000 cels/pellet (1 lo uso, los otros 3 los congelo)**

### 3) Separació de cèl·lules B

S'utilitza el kit "EasySep negative selection Human B-cell enrichment kit" (190549, Stemcell Technologies).

- Preparar la suspensió cel·lular a una concentració de  $5 \times 10^7$  cèls/ml (en *Bcell isolation medium*) → les cèl·lules s'han de posar a un tub de 5 ml de poliestirene (tap de doble tancament). → **2 ml**
- Afegir 50 µl de **Human B Cell Enrichment Cocktail** cada ml de suspensió cel·lular. Barrejar bé i incubar a temperatura ambient durant 10 minuts. → **100 ul**
- Afegir 75 µl de **D Magnetic Particles** cada ml de suspensió cel·lular. Barrejar bé i incubar a temperatura ambient durant 5 minuts. → **150 ul**
- Afegir **Bcell isolation medium** fins a un volum total de 2,5 ml.
- Posar el tub (sense tap) dins de l'imant lila. Deixar 5 minuts.
- Invertir l'imant i passar el contingut del tub a un altre tub de 5 ml amb doble tancament
- Fer recompte cel·lular → **170.000 cels/ml (muy pocas!!)**
  - **Hago 2 pellets de 170.000 cels/pellet (1 lo uso, otro lo congelo)**

Para hacer los pellets:

- Subo arriba las células en medio (en cada eppendorf)
- Centrifugo 2000g 5 minutos 4°C
- Quito sobrenadante y lavo con PBS1x (de cultivos)
- Centrifugo 2000g 5min 4°C
- Quito sobrenadante. Congelo a -80°C (caja RNA cels B Cinta):

### Extracción RNA (kit RNeasy Micro Kit, Qiagen)

Kit: RNeasy Micro Kit (cat 74004, Qiagen)

#### **Muestras:**

- **PBMC (MBR) 500.000 cels (sin congelar previamente, pellet fresco)**
- **Cels B (MBR) 170.000 cels (sin congelar previamente, pellet fresco)**
- **PBMC (CLR) 500.000 cels (congeladas día 26/04/21)**
- **Cels B (CLR) 250.000 cels (congeladas día 26/04/21)**

#### **Protocolo:**

- Añadir 350 µl de **Buffer RLT** al pellet (máximo 500.000 cels). Vortear 1 minuto
- Añadir 350 µl de **etanol 70%**
- Transferir toda la muestra a una columna RneasyMinElute (nevera), encima de un collection tube. Centrifugar 8000g 15s
- Descartar el líquido y añadir 350 µl de **Buffer RW1**. Centrifugar 8000g 15s
  - \*después de este punto, si yo fuera a usar sondas de qPCR que no son m1, debería poner 10 µl de DNase I stock solution con 70 µl de Buffer RDD a la muestra, incubar a RT durante 15 min. Volver a añadir 350 µl de Buffer RW1 y centrifugar 8000g 15s
- Descartar el líquido y añadir 500 µl de **Buffer RPE**. Centrifugar 8000g 15s
- Descartar el líquido y añadir 500 µl de **etanol 80%**. Centrifugar 8000g 2 min
- Descartar el líquido y centrifugar a máxima velocidad durante 5 min (para secar la membrana)
- Descartar el líquido, poner la columna en un eppendorf, y poner 14 µl de **RNAse-free water** en el centro de la membrana. Centrifugar 1 min a máxima velocidad

- Cuantificar RNA (nanodrop del labo):
  - PBMC (MBR): 8,8 ng/ul
  - Cels B (MBR): 31,5 ng/ul
  - PBMC (CLR): 9,7 ng/ul
  - Cels B (CLR): 24,3 ng/ul

\*Las curvas de las PBMC y cels B de CLR están mucho mejor.

La próxima vez resuspender en 10 ul en vez de en 14 ul (para aumentar la concentración).

### RT clásica (High Capacity cDNA Reverse Transcription kit)

**Muestras** extraídas 28/04/21 (kit Qiagen):

- PBMC MBR
- Cels B MBR
- PBMC CLR
- Cels B CLR

#### **Protocolo:**

- Preparar el RNA a 1 ug/ 10 ul (100 ng/ul) en H2O free en un volumen final de 10 ul directamente en los microtubos de PCR → en este caso pongo directamente **10 ul de cada muestra (sin agua)**
- Preparar la MIX → **preparo para 4 muestras → todo x4,5**

10X RT Buffer	2 ul	9 ul
25X dNTP Mix (100 mM)	0.8 ul	3,6 ul
10X RT Random Primers	2 ul	9 ul
MultiScribe Reverse Transcriptase	1 ul	4,5 ul
Nuclease-free H2O	4.2 ul	18,9 ul
<b>Total per reaction</b>	<b>10 ul</b>	

- Vortear y añadir 10 ul a cada muestra

- Termociclador

Setting	Step 1	Step 2	Step 3	Step4
Temp. (°C)	25	37	85	4
Time (min)	10	120	5	∞

29/04/2021

### Recoger culture slides

- Quitar medio
- Fijar PFA4% 10 min
- Quitar PFA y lavar con PBS1x
- Quitar los pozos del culture slide (con piezas negra y blanca)
- Secar bordes y bloquear

### qPCR Clásica (TaqMan™ Universal PCR Master Mix - AppliedBiosystems)

Muestras: RT 28/04/2021

- PBMC MBR
- Cels B MBR
- PBMC CLR
- Cels B CLR

#### Protocolo:

- Preparar MIXES de la Master Mix con cada uno de los primers según los pocillos a analizar:

MIX: n (X muestras)x3 + 2 blanco qPCR +2 extra → 4 muestras (x3) + 2 + 2 = 16 reacciones cada sonda

	Cada reacción	<b>GAPDH</b> (16 reac.)
Master Mix 2x	4 ul	64 ul
Primers 20x	0.4 ul	6,4 ul
H2O	3.1 ul	49,6 ul



- Añadir 7.5 ul de la mix a cada pocillo
- Añadir 1ul de cDNA en cada pocillo.
- Centrifugar la placa y llevar a la qPCR.

Stage	Hold	Hold	40 cycles	
Temp. (°C)	50	95	95	60
Time (min)	2	10	15seg	1

### qPCR Cells-to-ct

Kit: TaqMan Fast Advanced Cells-to-CT

**Muestras:** RT cell-to-ct día 26/04/21

- **PBMC (CLR) 500.000 cels**
- **Cels B (CLR) 250.000 cels**
- **Cels B (CLR) 100.000 cels**

#### **Protocolo:**

- Preparar la MIX para cada sonda a analizar (7 ul cada reacción):

MIX:  $n$  (X muestras) $\times$ 3 + 2 blanco qPCR +2 extra  $\rightarrow$  en este caso: **3 muestras (x3) + 2 pozos blanco + 2 extra = 13**

	Cada reacción	<b>GAPDH (13 reac.)</b>	<b>18S (13 reac.)</b>
TaqMan Gene Expression Assay	5 $\mu$ l	<b>65 ul</b>	<b>65 ul</b>
TaqMan Assays (primers 20x)	0.5 $\mu$ l	<b>6,5 ul</b>	<b>6,5 ul</b>
Nuclease-free Water	1.5 $\mu$ l	<b>19,5 ul</b>	<b>19,5 ul</b>

- Distribuir 7 ul de la MIX a cada pocillo
- Añadir 3 ul de cDNA a cada pocillo
- Centrifugar la placa y hacer qPCR

Step	Stage	Cycles	Temperature	Time
UDG activation	1	1	50°C	2 minutes
Enzyme activation (hold)	2	1	95°C	20 seconds
PCR	3	40	95°C	1 seconds
			60°C	20 seconds

03/05/2021

## Separación cels B (NL, CLR)

- 5 tubos CPT Noemí de Luna (NL)
- 5 tubos CPT Cinta Lleixà (CLR)

### 1) Extracció de PBMCs

- Centrifugar 20 minuts a 1650 g sense fre a temperatura ambient.
- Invertir els tubs per resuspendre les cèl·lules al plasma i decantar els sobrenadants a un tub de 50 ml.
- Rentar amb suero fisiològic en una proporció 1:1 i centrifugar durant 5 minuts a 300g amb acceleració i fre.
- Treure el sobrenedant i fer un altre rentat amb suero fisiològic (posar 40 ml de suero).
- Centrifugar 5 minuts a 300 g amb acceleració i fre, i treure el sobrenedant.
- Ressuspendre el pellet en 2 ml de **B cell isolation medium**
  - 2% de FBS: 500 µl
  - 1 mM d'EDTA: 50 µl de EDTA 0'5M
  - 24'5 ml de PBS
- Fer recompte cel·lular (95 ul tripan blue + 5 ul cels):
  - NL →  $52 \times 10^6$  cels/ml
  - CLR →  $50 \times 10^6$  cels/ml

### 2) Separació de cèl·lules B

S'utilitza el kit "EasySep negative selection Human B-cell enrichment kit" (190549, Stemcell Technologies).

- Preparar la suspensió cel·lular a una concentració de  $5 \times 10^7$  cèls/ml (en *Bcell isolation medium*) → les cèl·lules s'han de posar a un tub de 5 ml de poliestirene (tap de doble tancament). → 2 ml
- Afegir 50 µl de **Human B Cell Enrichment Cocktail** cada ml de suspensió cel·lular. Barrejar bé i incubar a temperatura ambient durant 10 minuts. → 100 ul
- Afegir 75 µl de **D Magnetic Particles** cada ml de suspensió cel·lular. Barrejar bé i incubar a temperatura ambient durant 5 minuts. → 150 ul
- Afegir **Bcell isolation medium** fins a un volum total de 2,5 ml.
- Posar el tub (sense tap) dins de l'ímant lila. Deixar 5 minuts.
- Invertir l'ímant i passar el contingut del tub a un altre tub de 5 ml amb doble tancament

- Fer recompte cel·lular:
  - **NL** →  $8,3 \times 10^5$  cels/ml → total:  $2 \times 10^6$  cels
    - Guardo 4 pellets de 150.000 cels para qPCR
    - 700.000 cels: tratar con IVIg
    - 700.000 cels: tratar con BSA
  - **CLR** →  $5,3 \times 10^5$  cels/ml → total:  $1,3 \times 10^6$  cels
    - Guardo 2 pellets de 150.000 cels para qPCR
    - 500.000 cels: tratar con IVIg
    - 500.000 cels: tratar con BSA

\*Para hacer los pellets:

- Subo arriba las células en medio (en cada eppendorf)
- Centrifugo 2000g 5 minutos 4°C
- Quito sobrenadante y lavo con PBS1x (de cultivos)
- Centrifugo 2000g 5min 4°C
- Quito sobrenadante. Congelo a -80°C (caja RNA cels B Cinta)

### 3) Cultiu i estimulació de cèl·lules B

Cultivar les cèls a una densitat de  $2'5 \times 10^6$  cèls/ml

**Medi de cultiu de cèl·lules B** (25 ml totals):

- 24,5 ml de RPMI 1640
  - 1 % de Penicil·lina-Streptomicina: 250 µl
  - 1 % de L-glutamina: 250 µl
1. DIA 0: centrifugar les cèls 5 mins a 300g i resuspendre-les en medi de cultiu de cèls B + 3 µg/ml de **CpG-B** + 10 µg/ml de **GAH IgA+IgG+IgM**.
    - CpG-B 2006: concentració solució stock 500 µM o 3,85 µg/µl → es fan alíquotes de 5 µl i es congelen a -20°C.
    - GAH IgA+IgG+IgM: està a la nevera a una concentració de 2'4 mg/mL.
  2. Les cèl·lules s'han de separar en dues condicions (dos tubs de 5ml) → Tractades amb BSA, i tractades amb IVIg
  3. Deixar les cèl·lules en cultiu (als dos tubs) durant 24 hores (37°C, 5 % CO<sub>2</sub>)

- Preparo 1'2 ml de medio con 0,94 ul de ODN + 5 ul de GAH:
  - **NL** → resuspendo las cels con 560 ul de medio (pongo 280 ul en cada tubo)
  - **CLR** → resuspendo las cels con 400 ul de medio (pongo 200 ul en cada tubo)

### Coating Poly-D.Lys (culture slides)

Coating 18 culture slides con Poly-D 1/40 en PBS1x (de stock poly-d 1 mg/ml) → aprox 300 ul por pocillo

**04/05/2021**

### Tractament de cèl·lules B - dia 1 (NL, CLR)

1. 24 després (DIA 1) → preparar els medis que s'utilitzaran en cada condició (dia abans!)
  - a. **Medi BSA:** dialitzar BSA 10% (A1595 Sigma) en medi de cultiu de cèls B → utilitzant Slide-A-Lyzer Dialysis Cassettes (Thermo Fisher)
    - Preparar 500 ml de medi de cultiu de cèls B. Posar 250 ml a un vas de precipitats
    - Hidratar el casset de diàlisi durant 1-2 minuts (introduir al medi amb el flotador)
    - Posar 3 ml de BSA 10% al casset (xeringa + agulla a una de les cantonades)
    - Treure l'aire del casset (pujant el pistó de la xeringa)
    - Posar el casset al vas de precipitats amb medi (amb el flotador)
    - Deixar 2 hores en agitació a RT (tapar)
    - Canviar tot el medi del vas de precipitats i deixar overnight a 4°C (sense agitar, tapat)
    - Al dia següent: omplir la xeringa amb aire i injectar a una cantonada diferent del casset. Girar el casset i recollir la solució BSA dialitzada
    - La concentració final serà de 40 mg/ml → 1:1 amb medi de cèls B per arribar a 20 mg/ml.
  - b. **Medi IVIg:** dialitzar IVIg 10% (100 mg/ml Grifols) en medi de cultiu de cèls B → utilitzant Slide-A-Lyzer Dialysis Cassettes (igual que BSA).
2. Centrifugar les cèl·lules i afegir a cada tub (un per cada condició) → **preparo 600 ul de cada medi i després reparteixo en els dos tubs (CLR: 200 ul/condició, NL: 280 ul/condició)**

- a. **Medi BSA:** 20 mg/ml + CpG 3 µg/ml + anti-Igs 10 µg/ml → 600 ul medi BSA + 0,5 ul CpG + 2,5 ul anti-Igs
  - b. **Medi IVIg:** 20 mg/ml + CpG 3 µg/ml + anti-Igs 10 µg/ml → 600 ul medi IVIg + 0,5 ul CpG + 2,5 ul anti-Igs
3. Cultivar 24 horas a 37°C, 5 % CO<sub>2</sub>

### Coating células + transfección Culture slides

18 culture slides:

- 11 Perfil
- 1 Doble CNTN1,CASPR1 / CASPR2
- 1 Doble CNTN1,CASPR1 / LRP4
- 1 LRP4
- 2 LRP4/CASPR2
- 2 NF155/CNTN1

#### **Protocolo:**

- Preparar mezclas transfección → cada culture slide (8 pozos)
  - 2,2 ug DNA + 68 ul Optimem
  - 3,2 ul lipofectamina2000 + 68 ul Optimem
- Juntar y dejar reposar mínimo 5 minutos
- Poner 300 ul de medio HEK a cada pozo
- Poner 120.000 cels (HEK293) a cada pozo
- Poner 17 ul de mezcla de transfección a cada pozo

**05/05/2021**

---

### Recoger culture slides

- Quitar medio
- Fijar PFA4% 10 min
- Quitar PFA y lavar con PBS1x
  - LRP4 y CASPR2: tritón 0,3% 5 min, y lavar con PBS 1x
- Quitar los pozos del culture slide (con piezas negra y blanca)
- Secar bordes y bloquear

## Pellet cels B - dia 2 (NL, CLR)

24 hores post-tractament (DIA 2) agafar la meitat de cèl·lules de cada tub i guardar-les per fer **qPCR** (fer recompte per saber quantes cels hi ha):

- 1.2 → Cels B dia 2 BSA (NL): 180.000 cels
- 1.3 → Cels B dia 2 IVIg (NL): 196.000 cels
- 2.2 → Cels B dia 2 BSA (CLR): 150.000 cels
- 2.3 → Cels B dia 2 IVIg (CLR): 194.000 cels

## Extracción RNA (kit RNeasy Micro Kit, Qiagen)

Kit: RNeasy Micro Kit (cat 74004, Qiagen)

**Muestras:** cels B recogidas 03/05/21 y 05/05/21

- 1.1 → Cels B dia 0 (NL)
- 1.2 → Cels B dia 2 BSA (NL)
- 1.3 → Cels B dia 2 IVIg (NL)
- 2.1 → Cels B dia 0 (CLR)
- 2.2 → Cels B dia 2 BSA (CLR)
- 2.3 → Cels B dia 2 IVIg (CLR)

### **Protocolo:**

- Añadir 350 µl de **Buffer RLT** al pellet (máximo 500.000 cels). Vortear 1 minuto
- Añadir 350 µl de **etanol 70%**
- Transferir toda la muestra a una columna RneasyMinElute (nevera), encima de un collection tube. Centrifugar 8000g 15s
- Descartar el líquido y añadir 350 µl de **Buffer RW1**. Centrifugar 8000g 15s
- Poner 10 µl de **DNase I stock solution** con 70 µl de **Buffer RDD** a la muestra, incubar a RT durante 15 min. Volver a añadir 350 µl de **Buffer RW1** y centrifugar 8000g 15s
- Descartar el líquido y añadir 500 µl de **Buffer RPE**. Centrifugar 8000g 15s
- Descartar el líquido y añadir 500 µl de **etanol 80%**. Centrifugar 8000g 2 min
- Descartar el liquid y centrifugar a máxima velocidad durante 5 min (para secar la membrana)
- Descartar el líquido, poner la columna en un eppendorf, y poner 11 µl de **RNAse-free water** en el centro de la membrana. Centrifugar 1 min a máxima velocidad

- Cuantificar RNA (nanodrop plataformas):
  - 1.1 → Cels B dia 0 (NL): 4,6 ng/ul
  - 1.2 → Cels B dia 2 BSA (NL): 22 ng/ul
  - 1.3 → Cels B dia 2 IVIg (NL): 14,7 ng/ul
  - 2.1 → Cels B dia 0 (CLR): 2 ng/ul
  - 2.2 → Cels B dia 2 BSA (CLR): 27,1 ng/ul
  - 2.3 → Cels B dia 2 IVIg (CLR): 14,3 ng/ul

**06/05/2021**

---

### Muestras pacientes EM pre-2a dosis de vacuna Covid

1. Joan Sala Quer → 1 tubo suero
2. Belén García Argudo Gómez (1021881) → 1 tubo suero
3. Noemí Russo (1115327) → 1 tubo suero
4. R.M. Ortega Castillo → 1 tubo suero
5. Ana Carretero Codina (631193) → 1 tubo suero + 1 tubo PAXgene RNA

**07/05/2021**

---

### Pellet cels B - dia 4 (NL, CLR)

72 horas post-tratamiento (DIA 4): recoger todas las cèl·lules que queden en cada tubo y hacer pellet para qPCR.

- 1.4 → Cels B dia 4 BSA (NL) → 156.000 cels
- 1.5 → Cels B dia 4 IVIg (NL) → 226.000 cels
- 2.4 → Cels B dia 4 BSA (CLR) → 155.000 cels
- 2.5 → Cels B dia 4 IVIg (CLR) → 107.000 cels

### Extracción RNA (kit RNeasy Micro Kit, Qiagen)

Kit: RNeasy Micro Kit (cat 74004, Qiagen)

**Muestras:** cels B recogidas 07/05/2021

- 1.4 → Cels B dia 4 BSA (NL)
- 1.5 → Cels B dia 4 IVIg (NL)
- 2.4 → Cels B dia 4 BSA (CLR)
- 2.5 → Cels B dia 4 IVIg (CLR)

### Protocolo:

- Añadir 350 µl de **Buffer RLT** al pellet (máximo 500.000 cels). Vortear 1 minuto
- Añadir 350 µl de **etanol 70%**
- Transferir toda la muestra a una columna RneasyMinElute (nevera), encima de un collection tube. Centrifugar 8000g 15s
- Descartar el líquido y añadir 350 µl de **Buffer RW1**. Centrifugar 8000g 15s
- Poner 10 µl de **DNase I stock solution** con 70 µl de **Buffer RDD** a la muestra, incubar a RT durante 15 min. Volver a añadir 350 µl de **Buffer RW1** y centrifugar 8000g 15s
- Descartar el líquido y añadir 500 µl de **Buffer RPE**. Centrifugar 8000g 15s
- Descartar el líquido y añadir 500 µl de **etanol 80%**. Centrifugar 8000g 2 min
- Descartar el líquido y centrifugar a máxima velocidad durante 5 min (para secar la membrana)
- Descartar el líquido, poner la columna en un eppendorf, y poner 11 µl de **RNAse-free water** en el centro de la membrana. Centrifugar 1 min a máxima velocidad
- Cuantificar RNA (nanodrop plataformas):
  - 1.4 → Cels B dia 4 BSA (NL): 53,1 ng/ul
  - 1.5 → Cels B dia 4 IVIg (NL): 37,6 ng/ul
  - 2.4 → Cels B dia 4 BSA (CLR): 26,1 ng/ul
  - 2.5 → Cels B dia 4 IVIg (CLR): 39,3 ng/ul

### Muestras pacientes EM pre-2a dosis de vacuna Covid

36 pacientes(1 tubo de suero + 1 tubo PAXgene RNA)! Excel "Muestras EM estudio vacuna Covid"

10/05/2021

---

### Separación cels B (CMB, EGV)

- 4 tubos CPT Carmen Martínez (CMB) → control 3
- 5 tubos CPT Eduard Gallardo (EGV) → control 4

#### 1) Extracció de PBMCs

- Centrifugar 20 minuts a 1650 g sense fre a temperatura ambient.
- Invertir els tubs per resuspendre les cèl·lules al plasma i decantar els sobrenadants a un tub de 50 ml.



- Rentar amb suero fisiològic en una proporció 1:1 i centrifugar durant 5 minuts a 300g amb acceleració i fre.
- Treure el sobrenedant i fer un altre rentat amb suero fisiològic (posar 40 ml de suero).
- Centrifugar 5 minuts a 300 g amb acceleració i fre, i treure el sobrenedant.
- Ressuspendre el pellet en 2 ml de **B cell isolation medium**
  - 2% de FBS: 500 µl
  - 1 mM d'EDTA: 50 µl de EDTA 0'5M
  - 24'5 ml de PBS
- Fer recompte cel·lular (95 ul tripan blue + 5 ul cells):
  - CMB →  $56 \times 10^6$  cels/ml
  - EGV →  $40 \times 10^6$  cels/ml

## 2) Separació de cèl·lules B

S'utilitza el kit "*EasySep negative selection Human B-cell enrichment kit*" (190549, Stemcell Technologies).

- Preparar la suspensió cel·lular a una concentració de  $5 \times 10^7$  cèls/ml (en *Bcell isolation medium*) → les cèl·lules s'han de posar a un tub de 5 ml de poliestirene (tap de doble tancament). → **2 ml**
- Afegir 50 µl de **Human B Cell Enrichment Cocktail** cada ml de suspensió cel·lular. Barrejar bé i incubar a temperatura ambient durant 10 minuts. → **100 ul**
- Afegir 75 µl de **D Magnetic Particles** cada ml de suspensió cel·lular. Barrejar bé i incubar a temperatura ambient durant 5 minuts. → **150 ul**
- Afegir **Bcell isolation medium** fins a un volum total de 2,5 ml.
- Posar el tub (sense tap) dins de l'imant lila. Deixar 5 minuts.
- Invertir l'imant i passar el contingut del tub a un altre tub de 5 ml amb doble tancament
- Fer recompte cel·lular:
  - **3.1 → Cels B d0 (CMB):**  $1,8 \times 10^6$  cels/ml → total:  $4,5 \times 10^6$  cels
    - Guardo 4 pellets de 250.000 cels para qPCR
    - $1,75 \times 10^6$  cels: tratar con IVIg
    - $1,75 \times 10^6$  cels: tratar con BSA
  - **4.1 → Cels B d0 (EGV):**  $1,2 \times 10^6$  cels/ml → total:  $3 \times 10^6$  cels
    - Guardo 2 pellets de 250.000 cels para qPCR
    - $1,25 \times 10^6$  cels: tratar con IVIg
    - $1,25 \times 10^6$  cels: tratar con BSA

\*Para hacer los pellets:

- Subo arriba las células en medio (en cada eppendorf)
- Centrifugo 2000g 5 minutos 4°C
- Quito sobrenadante y lavo con PBS1x (de cultivos)
- Centrifugo 2000g 5min 4°C
- Quito sobrenadante. Congelo a -80°C (caja RNA cels B Cinta)

### 3) Cultiu i estimulació de cèl·lules B

Cultivar les cèls a una densitat de  $2'5 \times 10^6$  cèls/ml

**Medi de cultiu de cèl·lules B (25 ml totals):**

- 24,5 ml de RPMI 1640
- 1 % de Penicil·lina-Streptomicina: 250 µl
- 1 % de L-glutamina: 250 µl

4. DIA 0: centrifugar les cèls 5 mins a 300g i resuspendre-les en medi de cultiu de cèls B + 3 µg/ml de **CpG-B** + 10 µg/ml de **GAH IgA+IgG+IgM**.
  - CpG-B 2006: concentració solució stock 500 µM o 3,85 µg/µl → es fan alíquotes de 5 µl i es congelen a -20°C.
  - GAH IgA+IgG+IgM: està a la nevera a una concentració de 2'4 mg/mL.
5. Les cèl·lules s'han de separar en dues condicions (dos tubs de 5ml) → Tractades amb BSA, i tractades amb IVlg
6. Deixar les cèl·lules en cultiu (als dos tubs) durant 24 hores (37°C, 5 % CO<sub>2</sub>)

- **Preparo 3 ml de medio con 2,25 ul de ODN + 12,8 ul de GAH:**
  - **CMB** → resuspendo las cels con 1,4 ml de medio
  - **EGV** → resuspendo las cels con 1 ml de medio

### Extracción RNA (kit RNeasy Micro Kit, Qiagen)

Kit: RNeasy Micro Kit (cat 74004, Qiagen)

**Muestras:** cels B recogidas 10/05/21

- 3.1 → Cels B dia 0 (CMB): 250.000c
- 4.1 → Cels B dia 0 (EGV): 250.000c

### Protocolo:

- Añadir 350 µl de **Buffer RLT** al pellet (máximo 500.000 cels). Vortear
- Añadir 350 µl de **etanol 70%**
- Transferir toda la muestra a una columna RneasyMinElute (nevera), encima de un collection tube. Centrifugar 8000g 15s
- Descartar el líquido y añadir 350 µl de **Buffer RW1**. Centrifugar 8000g 15s
- Poner 10 µl de **DNase I stock solution** con 70 µl de **Buffer RDD** a la muestra, incubar a RT durante 15 min. Volver a añadir 350 µl de **Buffer RW1** y centrifugar 8000g 15s
- Descartar el líquido y añadir 500 µl de **Buffer RPE**. Centrifugar 8000g 15s
- Descartar el líquido y añadir 500 µl de **etanol 80%**. Centrifugar 8000g 2 min
- Descartar el líquido y centrifugar a máxima velocidad durante 5 min (para secar la membrana)
- Descartar el líquido, poner la columna en un eppendorf, y poner 11 µl de **RNAse-free water** en el centro de la membrana. Centrifugar 1 min a máxima velocidad
- Cuantificar RNA (nanodrop plataformas):
  - 3.1 → Cels B dia 0 (CMB): 23,9 ng/ul
  - 4.1 → Cels B dia 0 (EGV): 6,1 ng/ul

11/05/2021

### Tractament de cèl·lules B - dia 1 (CMB, EGV)

1. 24 després (DIA 1) → preparar els medis que s'utilitzaran en cada condició (dia abans!) → en aquest cas utilitzo els medis preparats el dia 04/05/2021
2. Recompte de cèls:
  - CMB →  $2 \times 10^6$  cels/ml, total:  $2'8 \times 10^6$  cels/ml
  - EGV →  $1'6 \times 10^6$  cels/ml, total:  $1'6 \times 10^6$  cels/ml
3. Centrifugar les cèl·lules i afegir a cada tub (un per cada condició) → **preparo 1 ml de cada medi i després reparteixo en els dos tubs (CMB: 560 ul/condició, EGV: 320 ul/condició)**
  - **Medi BSA:** 20 mg/ml + CpG 3 µg/ml + anti-Igs 10 µg/ml → **1 ml medi BSA + 0'83 ul CpG + 4'2 ul anti-Igs**
  - **Medi IVIg:** 20 mg/ml + CpG 3 µg/ml + anti-Igs 10 µg/ml → **1 ml medi IVIg + 0'83 ul CpG + 4'2 ul anti-Igs**
4. Cultivar 24 hores a 37°C, 5 % CO<sub>2</sub>

12/05/2021

---

### Coating Poly-D.Lys (culture slides)

Coating 6 culture slides con Poly-D 1/40 en PBS1x (de stock poly-d 1 mg/ml) → aprox 300 ul por pocillo

### Pellet cels B - dia 2 (CMB, EGV)

24 hores post-tractament (DIA 2) agafar la meitat de cèl·lules de cada tub i guardar-les per fer qPCR (fer recompte per saber quantes cels hi ha):

- 3.2 → Cels B dia 2 BSA (CMB): 543.000 cels
- 3.3 → Cels B dia 2 IVIg (CMB): 616.000 cels
- 4.2 → Cels B dia 2 BSA (EGV): 352.000 cels
- 4.3 → Cels B dia 2 IVIg (EGV): 480.000 cels

Hago 2 pellets de cada condición y los congelo a -80°C

### Muestras pacientes EM pre-2a dosis de vacuna Covid

40 pacientes (1 tubo de suero + 1 tubo PAXgene RNA)! Excel "Muestras EM estudio vacuna Covid"

13/05/2021

---

### Coating células + transfección Culture slides

- 6 culture slides de CV2 (CRMP5) → para pasar muestras ensayo clínico UCB

#### **Protocolo:**

- Preparar mezclas transfección → cada culture slide (8 pozos)
  - 2,2 ug DNA + 68 ul Optimem
  - 3,2 ul lipofectamina2000 + 68 ul Optimem
- Juntar y dejar reposar mínimo 5 minutos
- Poner 300 ul de medio HEK a cada pozo
- Poner 120.000 cels (HEK293) a cada pozo
- Poner 17 ul de mezcla de transfección a cada pozo

14/05/2021

---

### Recoger culture slides (CV2)

- Quitar medio
- Fijar PFA4% 10 min
- Quitar PFA y lavar con PBS1x
- Tritón 0,3% 5 min, y lavar con PBS 1x
- Quitar los pozos del culture slide (con piezas negra y blanca)
- Secar bordes y bloquear

### Pellet cels B - dia 4 (CMB, EGV)

72 horas post-tratamiento (DIA 4): recoger todas las cèl·lules que queden en cada tubo y hacer pellet para qPCR (hago dos pellets de cada uno)

- 3.4 → Cels B dia 4 BSA (CMB) → 840.000 cels
- 3.5 → Cels B dia 4 IVIg (CMB) → 532.000 cels
- 4.4 → Cels B dia 4 BSA (EGV) → 288.000 cels
- 4.5 → Cels B dia 4 IVIg (EGV) → 368.000 cels

18/05/2021

---

### Extracción RNA (kit RNeasy Micro Kit, Qiagen)

Kit: RNeasy Micro Kit (cat 74004, Qiagen)

**Muestras:** cels B recogidas 12/05/21 y 14/05/21 → un pellet de cada

- 3.2 → Cels B dia 2 BSA (CMB): 271.000 cels
- 3.3 → Cels B dia 2 IVIg (CMB): 308.000 cels
- 3.4 → Cels B dia 4 BSA (CMB): 420.000 cels
- 3.5 → Cels B dia 4 IVIg (CMB): 266.000 cels
- 4.2 → Cels B dia 2 BSA (EGV): 176.000 cels
- 4.3 → Cels B dia 2 IVIg (EGV): 240.000 cels
- 4.4 → Cels B dia 4 BSA (EGV): 144.000 cels
- 4.5 → Cels B dia 4 IVIg (EGV): 184.000 cels

### Protocolo:

- Añadir 350 µl de **Buffer RLT** al pellet (máximo 500.000 cels). Vortear
- Añadir 350 µl de **etanol 70%**
- Transferir toda la muestra a una columna RneasyMinElute (nevera), encima de un collection tube. Centrifugar 8000g 15s
- Descartar el líquido y añadir 350 µl de **Buffer RW1**. Centrifugar 8000g 15s
- Poner 10 µl de **DNase I stock solution** con 70 µl de **Buffer RDD** a la muestra, incubar a RT durante 15 min. Volver a añadir 350 µl de **Buffer RW1** y centrifugar 8000g 15s
- Descartar el líquido y añadir 500 µl de **Buffer RPE**. Centrifugar 8000g 15s
- Descartar el líquido y añadir 500 µl de **etanol 80%**. Centrifugar 8000g 2 min
- Descartar el líquido y centrifugar a máxima velocidad durante 5 min (para secar la membrana)
- Descartar el líquido, poner la columna en un eppendorf, y poner 11 µl de **RNAse-free water** en el centro de la membrana. Centrifugar 1 min a máxima velocidad
- Cuantificar RNA (nanodrop plataformas):
  - 3.2 → Cels B dia 2 BSA (CMB): 23,9 ng/ul
  - 3.3 → Cels B dia 2 IVIg (CMB): 50,7 ng/ul
  - 3.4 → Cels B dia 4 BSA (CMB): 37,5 ng/ul
  - 3.5 → Cels B dia 4 IVIg (CMB): 33,8 ng/ul
  - 4.2 → Cels B dia 2 BSA (EGV): 13 ng/ul
  - 4.3 → Cels B dia 2 IVIg (EGV): 40,7 ng/ul
  - 4.4 → Cels B dia 4 BSA (EGV): 54,4 ng/ul
  - 4.5 → Cels B dia 4 IVIg (EGV): 20,2 ng/ul

25/05/2021

---

### Descongelación Células de Schwann

Descongeló 2 cels de Schwann diferentes:

- **Cels de Schwann humanas → línea celular comercial** (1700, ScienceCell) → Cont 3 – Rack 5 – Box 11D8, p2 (05/02/2013)
  - **Medio de proliferación** (1701, ScienceCell)
    - Schwann cell medium (46,5 ml) → viene con el medio
    - 5% FBS (2,5 ml) → viene con el medio

- 1% Schwann cell growth supplement (SCGM) (0,5 ml) → viene con el medio
- 1% Pen-Str. (0,5 ml)

\*Concentración de cels recomendada: 5000 c/cm<sup>2</sup>

- **Cels de Schwann de rata → cultivo primario** a partir de nervio ciático → **Cont 3 – Rack 6 – Box 1G1, p2 (06/11/2018)**
  - **Medio de proliferación:** (1701, ScienceCell)
    - Schwann cell medium (46,5 ml) → viene con el medio
    - 5% FBS (2,5 ml) → viene con el medio
    - 1% Schwann cell growth supplement (SCGM) (0,5 ml) → viene con el medio
    - 1% Pen-Str. (0,5 ml)
    - 0,01% NRG1-β1 (5 ul)
    - 0,02% Forskolin (10 ul)

\*Descongelar en placa 100 mm con gelatina 0,15%

### Descongelación HEK293

Descongelado 1 vial de HEK293 → **p9 (02/11/20)**

#### **Medio de proliferación:**

- DMEM (220 ml)
- 10% FBS (25 ml)
- 1% Sodium-pyruvate (2,5 ml)
- 1% Pen-Str (2,5 ml)

### Descongelación SH-SY5Y

Descongelado 1 vial de SH-SY5Y → **p11+4 (30/11/20)**

#### **Medio de proliferación:**

- EMEM (103,75 ml)
- F-12 (103,75 ml)
- 15 % FBS (37,5 ml)
- 1% Glutamina (2,5 ml)
- 1% Pen-Str (2,5 ml)

28/05/2021

---

### Coating Células de Schwann

- **Cels de Schwann humanas** (línea celular) → 1 placa de 60 mm 26 cubres
  - Coating 1h Poly-D-lys 1/40 en PBS1x
  - 100.000 cels (aprox 5000 cels/cm<sup>2</sup>) en medio de proliferación
- **Cels de Schwann de rata** (cultivo primario) → 1 placa de 60 mm 26 cubres
  - Coating 1h Poly-D-lys 1/40 en PBS1x
  - 100.000 cels (aprox 5000 cels/cm<sup>2</sup>) en **medio de diferenciación**:
    - Schwann cell medium (46,5 ml)
    - 5% FBS (2,5 ml)
    - 1% Schwann cell growth supplement (SCGM) (0,5 ml)
    - 1% Pen-Str. (0,5 ml)
    - 0,05% NGF (25 ul)

### Extracción RNA (kit RNeasy Micro Kit, Qiagen)

Kit: RNeasy Micro Kit (cat 74004, Qiagen)

**Muestras:** repetir extracción de pellets sobrantes 1.1, 2.1 y 4.1 (porque no llega a 100 ng)

- 1.1 → Cels B dia 0 (NL): 150.000 c
- 2.1 → Cels B dia 0 (CLR): 150.000 c
- 4.1 → Cels B dia 0 (EGV): 250.000 c

#### **Protocolo:**

- Añadir **75 µl** de **Buffer RLT** al pellet. Vortear **1 minuto**
- Añadir **75 µl** de **etanol 70%**
- Transferir toda la muestra a una columna RneasyMinElute (nevera), encima de un collection tube. Centrifugar 8000g 15s
- Descartar el líquido y añadir 350 µl de **Buffer RW1**. Centrifugar 8000g 15s
- Poner 10 µl de **DNase I stock solution** con 70 µl de **Buffer RDD** a la muestra, incubar a RT durante 15 min. Volver a añadir 350 µl de **Buffer RW1** y centrifugar 8000g 15s
- Descartar el líquido y añadir 500 µl de **Buffer RPE**. Centrifugar 8000g 15s
- Descartar el líquido y añadir 500 µl de **etanol 80%**. Centrifugar 8000g 2 min



- Descartar el líquido y centrifugar a máxima velocidad durante 5 min (para secar la membrana)
- Descartar el líquido, poner la columna en un eppendorf, y poner 11 µl de **RNAse-free water** en el centro de la membrana. Centrifugar 1 min a máxima velocidad
- Cuantificar RNA (nanodrop plataformas):
  - 1.1 → Cels B día 0 (NL): 2,9 ng/ul
  - 2.1 → Cels B día 0 (CLR): 4,4 ng/ul
  - 4.1 → Cels B día 0 (EGV): 21,1 ng/ul

**01/06/2021**

### ICC Cels de Schwann (línea celular humana)

- Placa 60 mm plantada día 28/05/21
- Fijar con PFA 4% 10 min
- 1 lavado con PBS1x
- Bloqueo con Goat serum 5% 1 h
- La placa se congela a -80°C (sin bloqueo), pero se usan unos cuantos cubres.

#### **Muestras** (CIDP posibles Vinculin+):

- |           |           |
|-----------|-----------|
| · CIDP 9  | · CIDP 71 |
| · CIDP 15 | · CIDP 79 |
| · CIDP 50 | · Cneg    |
| · CIDP 52 |           |

#### **Protocolo ICC:**

- Suero 1/100
- 3 lavados PBS1x
- GAH488 IgG 1/500
- 6 lavados PBS1x
- Montar con DAPI

**Resultado** → no se ve casi nada, sólo marca un poco el fondo.

### RT (High-Capacity RNA-to-cDNA Kit)

Ref: 4387406 (Thermo Fisher)

**Muestras** (cels B NL y CLR)

- 1.1 Cels B NL dia 0
- 1.2 Cels B NL dia 2 BSA
- 1.3 Cels B NL dia 2 IVIg
- 1.4 Cels B NL dia 4 BSA
- 1.5 Cels B NL dia 4 IVIg
- 2.1 Cels B CLR dia 0
- 2.2 Cels B CLR dia 2 BSA
- 2.3 Cels B CLR dia 2 IVIg
- 2.4 Cels B CLR dia 4 BSA
- 2.5 Cels B CLR dia 4 IVIg

**Protocolo:**

- Preparar la mix (descongelar el hielo)

	Cada reacción	10 (+1) reacciones
<b>2X RT Buffer Mix</b>	10 ul	110 ul
<b>20X RT Enzyme Mix</b>	1 ul	11 ul
<b>RNA sample</b>	hasta 9 ul	
<b>Nuclease-free H<sub>2</sub>O</b>	hasta 20 ul	
<b>Total</b>	20 ul	

- Poner 11 ul de la mix en cada tubo
- Poner 9 ul de muestra + agua (100 ng de RNA + el agua necesaria hasta llegar a 9 ul para hacer los 20 ul totales)

		Extracción RNA 1 pellet (Fecha)	Cuant. RNA (ng/ul)	ul RNA RT (100 ng, máximo 9 ul)	ul H <sub>2</sub> O RT (hasta 9 ul)
<b>1.1</b>	Dia 0	05/05/2021	4,6	9,0	0
<b>1.2</b>	Dia 2 BSA (24h post-tto)	05/05/2021	22	4,5	4,5
<b>1.3</b>	Dia 2 IVIg (24h post-tto)	05/05/2021	14,7	6,8	2,2
<b>1.4</b>	Dia 4 BSA (72h post-tto)	07/05/2021	53,1	1,9	7,1
<b>1.5</b>	Dia 4 IVIg (72h post-tto)	07/05/2021	37,6	2,7	6,3
<b>2.1</b>	Dia 0	05/05/2021	2	9,0	0,0
<b>2.2</b>	Dia 2 BSA (24h post-tto)	05/05/2021	27,1	3,7	5,3
<b>2.3</b>	Dia 2 IVIg (24h post-tto)	05/05/2021	14,3	7,0	2,0
<b>2.4</b>	Dia 4 BSA (72h post-tto)	07/05/2021	26,1	3,8	5,2
<b>2.5</b>	Dia 4 IVIg (72h post-tto)	07/05/2021	39,3	2,5	6,5

\*De la muestra 1.1 cojo la primera extracción de RNA (05/05/21), de la muestra 2.1 quiero coger la segunda extracción de RNA (28/05/21) pero no hay 9 ul de muestra, así que cojo la primera extracción (05/05/2021)

- Termociclador:

	Step 1	Step 2	Step3
Temp. (°C)	37	95	4
Time (min)	60	5	∞

### Congelación Cels de Schwann y SH-SY5Y

- **Cels de Schwann de rata** (primarios) p4 → 3 viales de 1 mill de cels.
  - Medio de congelación: medio Cels de Schwann + 10% DMSO
- **Cels de Schwann humanas** (línea celular) p4 → 3 viales de 1 mill de cels.
  - Medio de congelación: medio Cels de Schwann + 10% DMSO
- **SH-SY5Y** p11+5 → 3 viales de 1 mill de cels.
  - Medio de congelación: medio SH-SY5Y + 10% DMSO

\*Cambio de **medio de diferenciación Cels de Schwann** primarios (coated día 28/05/2021)

### Coating Poly-D.Lys (culture slides)

Coating 18 culture slides con Poly-D 1/40 en PBS1x (de stock poly-d 1 mg/ml) → aprox 300 ul por pocillo

**02/06/2021**

### RT (High-Capacity RNA-to-cDNA Kit)

Ref: 4387406 (Thermo Fisher)

**Muestras** (cels B CMB y EGV)

- |                             |                             |
|-----------------------------|-----------------------------|
| ○ 3.1 Cels B CMB dia 0      | ○ 4.1 Cels B EGV dia 0      |
| ○ 3.2 Cels B CMB dia 2 BSA  | ○ 4.2 Cels B EGV dia 2 BSA  |
| ○ 3.3 Cels B CMB dia 2 IVIg | ○ 4.3 Cels B EGV dia 2 IVIg |
| ○ 3.4 Cels B CMB dia 4 BSA  | ○ 4.4 Cels B EGV dia 4 BSA  |
| ○ 3.5 Cels B CMB dia 4 IVIg | ○ 4.5 Cels B EGV dia 4 IVIg |

**Protocolo:**

- Preparar la mix (descongelar el hielo)

	Cada reacción	10 (+1) reacciones
<b>2X RT Buffer Mix</b>	10 ul	110 ul
<b>20X RT Enzyme Mix</b>	1 ul	11 ul
<b>RNA sample</b>	hasta 9 ul	
<b>Nuclease-free H<sub>2</sub>O</b>	hasta 20 ul	
<b>Total</b>	20 ul	

- Poner 11 ul de la mix en cada tubo
- Poner 9 ul de muestra + agua (100 ng de RNA + el agua necesaria hasta llegar a 9 ul para hacer los 20 ul totales)

		Extracción RNA 1 pellet (Fecha)	Cuant. RNA (ng/ul)	ul muestra RT (100 ng, máximo 9 ul)	ul H <sub>2</sub> O de RT (hasta 9 ul)
<b>3.1</b>	Dia 0	10/05/2021	23,9	4,2	4,8
<b>3.2</b>	Dia 2 BSA (24h post-tto)	18/05/2021	23,9	4,2	4,8
<b>3.3</b>	Dia 2 IVIg (24h post-tto)	18/05/2021	50,7	2,0	7,0
<b>3.4</b>	Dia 4 BSA (72h post-tto)	18/05/2021	37,5	2,7	6,3
<b>3.5</b>	Dia 4 IVIg (72h post-tto)	18/05/2021	33,8	3,0	6,0
<b>4.1</b>	Dia 0	28/05/2021	21,1	4,7	4,3
<b>4.2</b>	Dia 2 BSA (24h post-tto)	18/05/2021	13	7,7	1,3
<b>4.3</b>	Dia 2 IVIg (24h post-tto)	18/05/2021	40,7	2,5	6,5
<b>4.4</b>	Dia 4 BSA (72h post-tto)	18/05/2021	54,4	1,8	7,2
<b>4.5</b>	Dia 4 IVIg (72h post-tto)	18/05/2021	20,2	5,0	4,0

\*De la muestra 4.1 cojo la segunda extracción de RNA (28/05/21)

- Termociclador:

	Step 1	Step 2	Step3
Temp. (°C)	37	95	4
Time (min)	60	5	∞

### Coating células + transfección Culture slides

18 culture slides:

- 12 Perfil
- 6 LRP4

#### **Protocolo:**

- Preparar mezclas transfección → cada culture slide (8 pozos)
  - 2,2 ug DNA + 68 ul Optimem
  - 3,2 ul lipofectamina2000 + 68 ul Optimem
- Juntar y dejar reposar mínimo 5 minutos
- Poner 300 ul de medio HEK a cada pozo
- Poner 120.000 cels (HEK293) a cada pozo
- Poner 17 ul de mezcla de transfección a cada pozo

**03/06/2021**

### ICC Cels de Schwann (rata - primarios)

- Placa 60 mm plantada día 28/05/21
- Fijar con PFA 4% 10 min
- 1 lavado con PBS1x
- Bloqueo con Goat serum 5% 1 h

**Protocolo ICC 1** → prueba con NCAM y S100 para ver si marcan

- Ac anti-NCAM o Ac anti-S100 (1/100)
- 3 lavados PBS1x
- GAM594 (para NCAM) o GAR594 (para S100) IgG 1/500
- 6 lavados PBS1x
- Montar con DAPI

**Resultado** → no marcan nada con NCAM ni con S100!!

**Muestras** (CIDP posibles Vinculin+):

- CIDP 9 → -
- CIDP 15 → + (marca muy poco los núcleos)
- Cneg → -

**Protocolo ICC 2:**

- Hacer un paso previo de tritón 0,3% 5 min
- 3 lavados PBS1x
- Suero 1/100
- 3 lavados PBS1x
- GAH488 IgG 1/500
- 6 lavados PBS1x
- Montar con DAPI

**Resultado** → en general las cels no están del todo bien diferenciadas. Hay muchos grupos de células (disgregar bien la próxima vez que se haga un coating)

### ICC Cels de Schwann (línea celular humana)

- Placa 60 mm plantada día 28/05/21 y congelada día 01/06/21

**Protocolo ICC 1** → prueba con NCAM y S100 para ver si marcan

- Ac anti-NCAM o Ac anti-S100 (1/100)
- 3 lavados PBS1x
- GAM594 (para NCAM) o GAR594 (para S100) IgG 1/500
- 6 lavados PBS1x
- Montar con DAPI

**Resultado** → no marca nada con NCAM, y marcan muy poco con S100

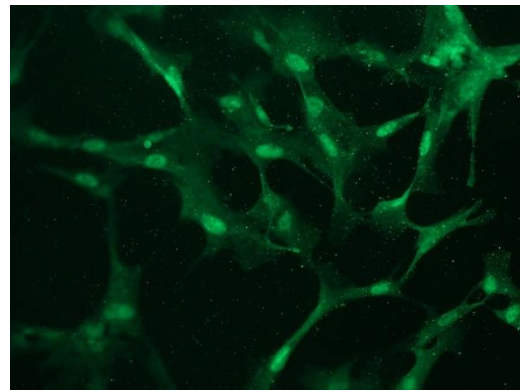
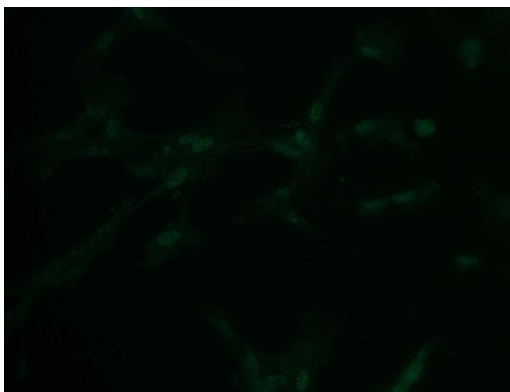
**Muestras** (CIDP posibles Vinculin+):

- CIDP 9 → - (FOTO 1)
- CIDP 15 → ++ Marca mucho los núcleos!! (FOTO 2)
- Cneg → -

**Protocolo ICC:**

- Hacer un paso previo de tritón 0,3% 5 min
- 3 lavados PBS1x
- Suero 1/100
- 3 lavados PBS1x
- GAH488 IgG 1/500
- 6 lavados PBS1x
- Montar con DAPI

**Resultado** → el marcaje de CIDP15 se parece mucho al marcaje de las fotos del paper de la Vinculin.



### Recoger culture slides

- Quitar medio
- Fijar PFA4% 10 min
- Quitar PFA y lavar con PBS1x
  - LRP4 y CASPR2: tritón 0,3% 5 min, y lavar con PBS 1x
- Quitar los pozos del culture slide (con piezas negra y blanca)
- Secar bordes y bloquear

**04/06/2021**

### qPCR Clásica (TaqMan™ Universal PCR Master Mix - AppliedBiosystems)

**Muestras:**

- 3.1
- 3.2
- 3.3
- 3.4
- 3.5

**Protocolo:**

- Preparar MIXES de la Master Mix con cada uno de los primers según los pocillos a analizar:

MIX: n (X muestras)x3 + 2 blanco qPCR +2 extra → 5 muestras (x3) + 2 + 2 = 19 reacciones cada sonda. Sondas:

- ABCG1
- IL13RA1
- PDE3B
- IL10
- MYC
- TP53INP1
- CCNA2
- TYMS
- P2RX7
- GAPDH

	Cada reacción	Cada sonda (19 reac.)
Master Mix 2x	4 ul	76 ul
Primers 20x	0.4 ul	7,6 ul
H <sub>2</sub> O	3.1 ul	58,9 ul

- Añadir 1ul de cDNA en cada pocillo → diluir previamente 1/2 el cDNA para que llegue para todas las sondas (10x3 = necesito 30 ul): 16 ul cDNA + 16 ul H<sub>2</sub>O
- Añadir 7.5 ul de la mix a cada pocillo
- Centrifugar la placa y llevar a la qPCR.

Stage	Hold	Hold	40 cycles	
Temp. (°C)	50	95	95	60
Time (min)	2	10	15seg	1

**07/06/2021**

### ELISA Gangliósidos día1 (Muestras UCB 1-7)

Se sigue el protocolo de Immuno (lo hago en Immuno).

**Muestras** ensayo UCB: 1-7

**Protocolo** (breve):

- Descongelar placas con gangliósidos (congeladas día 31.05.21)



- **Bloquear** con PBS-BSA 1 % → 200 ul/pozo, incubar 2h a 4°C
  - Lavar 2 veces con PBS (en cubeta)
  - Preparar diluciones de **sueros** (en PBS-BSA 0'1%)
    - Dil 1/100: 5 ml PBS-BSA 0'1% + 50 ul suero
    - Dil 1/500: 4 ml de PBS-BSA 0'1% + 1 ml de la dilución anterior.
- Poner 100 ul de suero a cada pozo, incubar toda la noche a 4°C

**08/06/2021**

### ELISA Gangliósidos día 2 (Muestras UCB 1-7)

Se sigue el protocolo de Immuno (lo hago en Immuno).

**Muestras** ensayo UCB: 1-7

**Protocolo** (breve):

- Lavar 4 veces con PBS (2 lavados en cada cubeta)
- Preparar **Ac secundarios**: RAH HRP IgG o IgM dil. 1/3000 en PBS-BSA 0'1%. Poner 100 ul de la dilución a cada pozo, incubar 2h a 4°C
- Lavar 4 veces con PBS (2 lavados en cada cubeta)
- Preparar el **sustrato**: 1 tableta de OPD + 1 tableta de urea hydrogen peroxidase + 20 ml agua destilada (proteger de la luz con papel de aluminio y agitar).  
Poner 100 ul a cada pozo, incubar 40 min a temperatura ambiente
- Parar la reacción añadiendo 50 ul de **H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>** al 25% a cada pozo.
- Leer las placas a 490 – 630

### qPCR Clásica (TaqMan™ Universal PCR Master Mix - AppliedBiosystems)

**Muestras:**

- |       |       |
|-------|-------|
| ○ 4.1 | ○ 4.4 |
| ○ 4.2 | ○ 4.5 |
| ○ 4.3 |       |

**Protocolo:**

- Preparar MIXES de la Master Mix con cada uno de los primers según los pocillos a analizar:  
MIX: **n** (X muestras)x3 + 2 blanco qPCR +2 extra → **5 muestras (x3) + 2 + 2 = 19 reacciones cada sonda. Sondas:**

- ABCG1
- TP53INP1
- IL13RA1
- CCNA2
- PDE3B
- TYMS
- IL10
- P2RX7
- MYC
- GAPDH

	Cada reacción	Cada sonda (19 reac.)
Master Mix 2x	4 ul	76 ul
Primers 20x	0.4 ul	7,6 ul
H <sub>2</sub> O	3.1 ul	58,9 ul

- Añadir 1ul de cDNA en cada pocillo → diluir previamente 1/2 el cDNA para que llegue para todas las sondas (10x3 = necesito 30 ul): 16 ul cDNA + 16 ul H<sub>2</sub>O
- Añadir 7.5 ul de la mix a cada pocillo
- Centrifugar la placa y llevar a la qPCR.

Stage	Hold	Hold	40 cycles	
Temp. (°C)	50	95	95	60
Time (min)	2	10	15seg	1

09/06/2021

### qPCR Clásica (TaqMan Fast Advanced Master Mix - AppliedBiosystems)

**Muestras:**

- 1.1
- 1.4
- 1.2
- 1.5
- 1.3

**Protocolo:**

- Preparar MIXES de la Master Mix con cada uno de los primers según los pocillos a analizar:  
MIX: n (X muestras)x3 + 2 blanco qPCR +2 extra → 5 muestras (x3) + 2 + 2 = 19 reacciones cada sonda. Sondas:

- ABCG1
- IL13RA1
- PDE3B
- IL10
- MYC
- TP53INP1
- CCNA2
- TYMS
- P2RX7
- GAPDH

	Cada reacción	Cada sonda (19 reac.)
Master Mix 2x	5 ul	95 ul
Primers 20x	0,5 ul	9,5 ul
H <sub>2</sub> O	3,5 ul	66,5 ul

- Añadir 1ul de cDNA en cada pocillo → diluir previamente 1/2 el cDNA para que llegue para todas las sondas (10x3 = necesito 30 ul): 16 ul cDNA + 16 ul H<sub>2</sub>O
- Añadir 9 ul de la mix a cada pocillo
- Centrifugar la placa y llevar a la qPCR.

Stage	Hold	Hold	40 cycles	
Temp. (°C)	50	95	95	60
Time (min)	2	20 seg	1 seg	20 seg

**RESULTADO** → el GAPDH de la muestra 1.5 sale undetermined!! Repetir

14/06/2021

### ELISA Gangliósidos día1 (Muestras UCB 8-18)

Se sigue el protocolo de Immuno (lo hago en Immuno).

**Muestras** ensayo UCB: 8-18

**Protocolo** (breve):

- Descongelar placas con gangliósidos (congeladas día 31.05.21)
- **Bloquear** con PBS-BSA 1 % → 200 ul/pozo, incubar 2h a 4°C
- Lavar 2 veces con PBS (en cubeta)
- Preparar diluciones de **sueros** (en PBS-BSA 0'1%)
  - Dil 1/100: 5 ml PBS-BSA 0'1% + 50 ul suero

- Dil 1/500: 4 ml de PBS-BSA 0'1% + 1 ml de la dilución anterior.

Poner 100 ul de suero a cada pozo, incubar toda la noche a 4°C

**15/06/2021**

---

### ELISA Gangliósidos día 2 (Muestras UCB 8-18)

Se sigue el protocolo de Immuno (lo hago en Immuno).

**Muestras** ensayo UCB: 8-18

**Protocolo** (breve):

- Lavar 4 veces con PBS (2 lavados en cada cubeta)
- Preparar **Ac secundarios**: RAH HRP IgG o IgM dil. 1/3000 en PBS-BSA 0'1%. Poner 100 ul de la dilución a cada pozo, incubar 2h a 4°C
- Lavar 4 veces con PBS (2 lavados en cada cubeta)
- Preparar el **sustrato**: 1 tableta de OPD + 1 tableta de urea hydrogen peroxidase + 20 ml agua destilada (proteger de la luz con papel de aluminio y agitar).  
Poner 100 ul a cada pozo, incubar 40 min a temperatura ambiente
- Parar la reacción añadiendo 50 ul de **H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>** al 25% a cada pozo.

### Coating Poly-D.Lys (culture slides)

Coating 12 culture slides con Poly-D 1/40 en PBS1x (de stock poly-d 1 mg/ml) → aprox 300 ul por pocillo

**16/06/2021**

---

### Coating células + transfección Culture slides

- 12 culture slides → perfil

**Protocolo:**

- Preparar mezclas transfección → cada culture slide (8 pozos)
  - 2,2 ug DNA + 68 ul Optimem
  - 3,2 ul lipofectamina2000 + 68 ul Optimem
- Juntar y dejar reposar mínimo 5 minutos
- Poner 300 ul de medio HEK a cada pozo
- Poner 120.000 cels (HEK293) a cada pozo
- Poner 17 ul de mezcla de transfección a cada pozo

## Coating Células de Schwann

- **Cels de Schwann de rata** (cultivo primario) → 1 placa de 60 mm 26 cubres
  - Coating 1h Poly-D-lys 1/40 en PBS1x
  - 150.000 cels en **medio de diferenciación**:
    - Schwann cell medium (46,5 ml)
    - 5% FBS (2,5 ml)
    - 1% Schwann cell growth supplement (SCGM) (0,5 ml)
    - 1% Pen-Str. (0,5 ml)
    - 0,05% NGF (25 ul)
- **Cels de Schwann humanas** (línea celular) → 1 placa de 60 mm 26 cubres
  - Coating 1h Poly-D-lys 1/40 en PBS1x
  - 150.000 cels (aprox 5000 cels/cm<sup>2</sup>) en medio de diferenciación

**17/06/2021**

---

### Recoger culture slides

- Quitar medio
- Fijar PFA4% 10 min
- Quitar PFA y lavar con PBS1x
- Quitar los pozos del culture slide (con piezas negra y blanca)
- Secar bordes y bloquear
- Congelar a -80°C

**18/06/2021**

---

### RT (High-Capacity RNA-to-cDNA Kit)

Ref: 4387406 (Thermo Fisher)

**Muestras** (cels B NL) → repito la RT porque no sale bien la qPCR y no queda más muestra.

- 1.1 Cels B NL dia 0
- 1.2 Cels B NL dia 2 BSA
- 1.3 Cels B NL dia 2 IVIg
- 1.4 Cels B NL dia 4 BSA
- 1.5 Cels B NL dia 4 IVIg

**Protocolo:**

- Preparar la mix (descongelar el hielo)

	Cada reacción	5 (+1) reacciones
<b>2X RT Buffer Mix</b>	10 ul	60 ul
<b>20X RT Enzyme Mix</b>	1 ul	6 ul
<b>RNA sample</b>	hasta 9 ul	
<b>Nuclease-free H<sub>2</sub>O</b>	hasta 20 ul	
<b>Total</b>	20 ul	

- Poner 11 ul de la mix en cada tubo
- Poner 9 ul de muestra + agua (100 ng de RNA + el agua necesaria hasta llegar a 9 ul para hacer los 20 ul totales)

		Extracción RNA 1 pellet (Fecha)	Cuant. RNA (ng/ul)	ul RNA RT (100 ng, máximo 9 ul)	ul H <sub>2</sub> O d RT (hasta 9 ul)
<b>1.1*</b>	Dia 0	28/05/2021	2,9	9,0	0
<b>1.2</b>	Dia 2 BSA (24h post-tto)	05/05/2021	22	4,5	4,5
<b>1.3</b>	Dia 2 IVIg (24h post-tto)	05/05/2021	14,7	Lo que queda (3 ul)	6
<b>1.4</b>	Dia 4 BSA (72h post-tto)	07/05/2021	53,1	1,9	7,1
<b>1.5</b>	Dia 4 IVIg (72h post-tto)	07/05/2021	37,6	2,7	6,3

\*Cojo la segunda extracción de RNA

- Termociclador:

	Step 1	Step 2	Step3
<b>Temp. (°C)</b>	37	95	4
<b>Time (min)</b>	60	5	∞

## qPCR Clásica (TaqMan Fast Advanced Master Mix - AppliedBiosystems)

### Muestras:

- 2.1
- 2.2
- 2.3
- 2.4
- 2.5

### Protocolo:

- Preparar MIXES de la Master Mix con cada uno de los primers según los pocillos a analizar:

MIX:  $n$  (X muestras)x3 + 2 blanco qPCR +2 extra → 5 muestras (x3) + 2 + 2 = 19 reacciones cada sonda. Sondas:

- ABCG1
- IL13RA1
- PDE3B
- IL10
- MYC
- TP53INP1
- CCNA2
- TYMS
- P2RX7
- GAPDH

	Cada reacción	Cada sonda (19 reac.)
Master Mix 2x	5 ul	95 ul
Primers 20x	0,5 ul	9,5 ul
H <sub>2</sub> O	3,5 ul	66,5 ul

- Añadir 1ul de cDNA en cada pocillo → diluir previamente 1/2 el cDNA para que llegue para todas las sondas (10x3 = necesito 30 ul): 16 ul cDNA + 16 ul H<sub>2</sub>O
- Añadir 9 ul de la mix a cada pocillo
- Centrifugar la placa y llevar a la qPCR.

Stage	Hold	Hold	40 cycles	
Temp. (°C)	50	95	95	60
Time (min)	2	20 seg	1 seg	20 seg

21/06/2021

## qPCR (TaqMan Fast Advanced Master Mix - AppliedBiosystems)

### Muestras (2a RT control 1):

- 1.1
- 1.2
- 1.3
- 1.4
- 1.5

### Protocolo:

- Preparar MIXES de la Master Mix con cada uno de los primers según los pocillos a analizar:

MIX:  $n$  (X muestras)x3 + 2 blanco qPCR +2 extra → 5 muestras (x3) + 2 + 2 = 19 reacciones cada sonda. Sondas:

- ABCG1
- IL13RA1
- PDE3B
- IL10
- MYC
- TP53INP1
- CCNA2
- TYMS
- P2RX7
- FCFR2
- GAPDH

	Cada reacción	Cada sonda (19 reac.)
Master Mix 2x	5 ul	95 ul
Primers 20x	0,5 ul	9,5 ul
H <sub>2</sub> O	3,5 ul	66,5 ul

- Añadir 1ul de cDNA en cada pocillo → diluir previamente 1/2 el cDNA para que llegue para todas las sondas (11x3 = necesito 33 ul): 18 ul cDNA + 18 ul H<sub>2</sub>O
- Añadir 9 ul de la mix a cada pocillo
- Centrifugar la placa y llevar a la qPCR.

Stage	Hold	Hold	40 cycles	
Temp. (°C)	50	95	95	60
Time (min)	2	20 seg	1 seg	20 seg



22/06/2021

qPCR (TaqMan Fast Advanced Master Mix - AppliedBiosystems)

**Muestras:**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
A	2.1			2.2			2.3			2.4			2.5			NTC	
B	2.1			2.2			2.3			2.4			2.5			NTC	
C	3.1			3.2			3.3			3.4			3.5			NTC	
D	3.1			3.2			3.3			3.4			3.5			NTC	
E	4.1			4.2			4.3			4.4			4.5			NTC	
F	4.1			4.2			4.3			4.4			4.5			NTC	

**Protocolo:**

- Preparar MIXES de la Master Mix con cada uno de los primers según los pocillos a analizar:

MIX: n (X muestras)x3 + 2 blanco qPCR + 2 extra → 15 muestras (x3) + 2 + 2 = 50 reacciones cada sonda. Sondas:

- GAPDH
- FCGR2

	Cada reacción	Cada sonda (50 reac.)
Master Mix 2x	5 ul	250 ul
Primers 20x	0,5 ul	25 ul
H <sub>2</sub> O	3,5 ul	175 ul

- Añadir 1ul de cDNA en cada pocillo → diluir previamente 1/2 el cDNA para que llegue para todas las sondas (2x3 = necesito 6 ul): 4 ul cDNA + 4 ul H<sub>2</sub>O
- Añadir 9 ul de la mix a cada pocillo
- Centrifugar la placa y llevar a la qPCR.

Stage	Hold	Hold	40 cycles	
Temp. (°C)	50	95	95	60
Time (min)	2	20 seg	1 seg	20 seg

**23/06/2021**

---

## ICC FLOT1/2

Cels transfectadas día 25/11/20: 0.72 µg DNA FLOT2/CS + 1.44 µg FLOT1/CS (68 µl Optimem) + 3.2 µl lipo/CS (68 µl Optimem)

### **Muestras (FLOT1/2 +):**

- EM-158 1/10
- EM-163 1/10
- EM-390 1/10
- EM-223 1/10
- EM-316 1/10
- EM-247 1/10
- EM-307 1/10
- EM-397 1/10
- EM-352 1/5 (LCR)
- EM-406 1/10
- 1347111 T3 1/10 (mateixa pacient que 223 i 316)
- 1668530 T3 1/10 (mateixa pacient que 307 i 397)
- EM-163 1/50
- EM-247 1/50
- EM-307 1/50
- C negatiu

### **Protocolo:**

- Suero 1/10 o 1/50 en Goat Serum 5% (1h)
- 3 lavados PBS1x
- Ac anti-FLOT 1 (1/100) en Goat Serum 5 % (1h)
- 3 lavados PBS1x
- GAR488 IgG + GAH594 IgG (1/500) en Goat Serum 5 % (1h)
- 3 lavados PBS1x
- Montar con Fluoromount

**Resultado** → No se ve nada!! Volver a transfectar cels

**28/06/2021**

---

**ICC Perfil CIDP**

- 21-2-1440
- 21-2-1441

Resultado → todo negativo(falta hacer ELISA CASPR1)

**19/07/2021**

---

**ELISA Gangliósidos día1 (Titulación IgG muestras UCB)**

Se sigue el protocolo de Immuno (lo hago en Immuno).

**Muestras** ensayo UCB: titulación IgG (las que previamente en el screening habían salido positivas por algún gangliósido)

- |      |      |      |
|------|------|------|
| · 1  | · 11 | · 21 |
| · 2  | · 16 | · 25 |
| · 5  | · 17 | · 28 |
| · 9  | · 18 | · 29 |
| · 10 | · 20 | · 34 |

**Controles Gangliósidos:** preparo alícuotas de control IgG y control IgM (en los ELISAs de gangliósidos anteriores usaba los controles de immuno asistencial).

- **Control IgG:** 20 ul 09-1161 + 30 ul 09-4901 (cada alícuota sirve para 2 veces)
  - 09-1161: GM1 1/1600, GQ1b >1/12500
  - 09-4901: GM1 >1/12500, aGM1 >1/12500, GD1b >1/12500
- **Control IgM:** 25 ul 09-3791 + 25 ul 09-4599 (cada alícuota sirve para 2 veces)
  - 09-3791: GM1 >1/12500, aGM1 >1/12500, GD1b >1/12500
  - 09-4599: GM2 1/12043

**Protocolo** (breve):

- Descongelar placas con gangliósidos (congeladas día 31.05.21)
- **Bloquear** con PBS-BSA 1 % → 200 ul/pozo, incubar 2h a 4°C
- Lavar 2 veces con PBS
- Preparar diluciones de **sueros** (en PBS-BSA 0'1%) → hacer dil 1/10 del PBS-BSA 1%

- Dil 1/100: 5 ml PBS-BSA 0'1% + 50 ul suero
- Dil 1/500: 4 ml de PBS-BSA 0'1% + 1 ml de la dilución anterior.
- Dil 1/2500: 4 ml de PBS-BSA 0'1% + 1 ml de la dilución anterior.
- Dil 1/12500: 4 ml de PBS-BSA 0'1% + 1 ml de la dilución anterior.
- Poner 100 ul de suero a cada pozo, incubar toda la noche a 4°C

**20/07/2021**

### ELISA Gangliósidos día 2 (Titulación IgG muestras UCB)

Se sigue el protocolo de Immuno (lo hago en Immuno).

**Protocolo** (breve):

- Lavar 4 veces con PBS
- Preparar **Ac secundarios**: RAH HRP IgG dil. 1/3000 en PBS-BSA 0'1%. Poner 100 ul de la dilución a cada pozo, incubar 2h a 4°C
- Lavar 4 veces con PBS (2 lavados en cada cubeta)
- Preparar el **sustrato**: 1 tableta de OPD + 1 tableta de urea hydrogen peroxidase + 20 ml agua destilada (proteger de la luz con papel de aluminio y agitar).  
Poner 100 ul a cada pozo, incubar 40 min a temperatura ambiente
- Parar la reacción añadiendo 50 ul de **H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>** al 25% a cada pozo.
- Leer placa a 490-630

**21/07/2021**

### ELISA anti-MAG

**Muestras:** UCB 1-12

**Protocolo:**

- Diluir las **muestras** 1/1000 con tampón de incubación. Mezclar con vórtex e incubar las muestras diluídas 1 hora a temperatura ambiente.
  - *\*Durante este tiempo, preparar el tampón de lavado (1/10 en agua destilada) y ponerlo en la nevera*
- Poner las muestras y los controles y calibradores 10 min en hielo
- Coger los **pozos** necesarios de la placa → tener en cuenta que cada muestra se hace por duplicado, y se necesitan 8 pozos para los controles y calibradores:
 

○ A: blanco (tampón de incubación)	○ B: calibrador A
	○ C: calibrador B

- D: calibrador C
- E: calibrador D
- F: control bajo (kit)
- G: control alto (kit)
- H: control positivo (suero positivo)
- Lavar los pozos 4 veces con tampón de lavado frío → poner 300 ul de tampón en cada pozo (lavar con multicanal)
- Añadir 100 ul de cada **muestra** (y controles y calibradores) en los pozos correspondientes
- Cubrir la placa con un sellador de placa (plástico del kit) e incubar 2h a 4°C
- Lavar los pozos 4 veces con tampón de lavado frío → poner 300 ul de tampón en cada pozo (lavar con multicanal)
- Añadir 100 ul del **Ac secundario IgM** (kit) a todos los pocillos → cubrir la placa con sellador e incubar 2h a 4°C
  - *Sacar el TMB de la nevera (kit) para atemperarlo*
- Lavar los pozos 4 veces con tampón de lavado frío → poner 300 ul de tampón en cada pozo (lavar con multicanal)
- Añadir 100 ul de **TMB** atemperado a cada pocillo e incubar 30 min a temperatura ambiente
- Añadir 100 ul de **solución de parada** a cada pocillo
- Leer la placa a 450 nm
  - Se calculan los títulos poniendo las OD en la hoja de trabajo anti-MAG de Immuno: si los títulos son de menos de 1000 BTU, se considera negativo

**Resultado** → **Todas las muestras son negativas**

**22/07/2021**

### ELISA anti-MAG

**Muestras:** UCB 13-32

**Protocolo:**

- Diluir las **muestras** 1/1000 con tampón de incubación. Mezclar con vórtex e incubar las muestras diluídas 1 hora a temperatura ambiente.
  - *\*Durante este tiempo, preparar el tampón de lavado (1/10 en agua destilada) y ponerlo en la nevera*
- Poner las muestras y los controles y calibradores 10 min en hielo
- Coger los **pozos** necesarios de la placa → tener en cuenta que cada muestra se hace por duplicado, y se necesitan 8 pozos para los controles y calibradores:

- A: blanco (tampón de incubación)
- B: calibrador A
- C: calibrador B
- D: calibrador C
- E: calibrador D
- F: control bajo (kit)
- G: control alto (kit)
- H: control positivo (suero positivo)
- Lavar los pozos 4 veces con tampón de lavado frío → poner 300 ul de tampón en cada pozo (lavar con multicanal)
- Añadir 100 ul de cada **muestra** (y controles y calibradores) en los pozos correspondientes
- Cubrir la placa con un sellador de placa (plástico del kit) e incubar 2h a 4°C
- Lavar los pozos 4 veces con tampón de lavado frío → poner 300 ul de tampón en cada pozo (lavar con multicanal)
- Añadir 100 ul del **Ac secundario IgM** (kit) a todos los pocillos → cubrir la placa con sellador e incubar 2h a 4°C
  - *Sacar el TMB de la nevera (kit) para atemperarlo*
- Lavar los pozos 4 veces con tampón de lavado frío → poner 300 ul de tampón en cada pozo (lavar con multicanal)
- Añadir 100 ul de **TMB** atemperado a cada pocillo e incubar 30 min a temperatura ambiente
- Añadir 100 ul de **solución de parada** a cada pocillo
- Leer la placa a 450 nm
  - Se calculan los títulos poniendo las OD en la hoja de trabajo anti-MAG de Immuno: si los títulos son de menos de 1000 BTU, se considera negativo

**Resultado:** todas las muestras son negativas menos 19 y 31.

- **UCB – 19 → 10331 BTU**
- **UCB – 31 → 1111 BTU**

### ELISA Gangliósidos día1 (Titulación IgM muestras UCB)

Se sigue el protocolo de Immuno (lo hago en Immuno).

**Muestras** ensayo UCB: titulación IgM (las que previamente en el screening habían salido positivas por algún gangliósido)

**Protocolo** (breve):

- Descongelar placas con gangliósidos (congeladas día 31.05.21)
- **Bloquear** con PBS-BSA 1 % → 200 ul/pozo, incubar 2h a 4°C

- Lavar 2 veces con PBS
- Preparar diluciones de **sueros** (en PBS-BSA 0'1%) → hacer dil 1/10 del PBS-BSA 1%
  - Dil 1/100: 5 ml PBS-BSA 0'1% + 50 ul suero
  - Dil 1/500: 4 ml de PBS-BSA 0'1% + 1 ml de la dilución anterior.
  - Dil 1/2500: 4 ml de PBS-BSA 0'1% + 1 ml de la dilución anterior.
  - Dil 1/12500: 4 ml de PBS-BSA 0'1% + 1 ml de la dilución anterior.
- Poner 100 ul de suero a cada pozo, incubar toda la noche a 4°C

**23/07/2021**

### ELISA anti-MAG

**Muestras:** 19i, 19f, 31i, 31f, 32i, 33, 34

**Protocolo:**

- Diluir las **muestras** 1/1000 con tampón de incubación. Mezclar con vórtex e incubar las muestras diluídas 1 hora a temperatura ambiente.
  - *\*Durante este tiempo, preparar el tampón de lavado (1/10 en agua destilada) y ponerlo en la nevera*
- Poner las muestras y los controles y calibradores 10 min en hielo
- Coger los **pozos** necesarios de la placa → tener en cuenta que cada muestra se hace por duplicado, y se necesitan 8 pozos para los controles y calibradores:
 

○ A: blanco (tampón de incubación)	○ E: calibrador D
○ B: calibrador A	○ F: control bajo (kit)
○ C: calibrador B	○ G: control alto (kit)
○ D: calibrador C	○ H: control positivo (suero positivo)
- Lavar los pozos 4 veces con tampón de lavado frío → poner 300 ul de tampón en cada pozo (lavar con multicanal)
- Añadir 100 ul de cada **muestra** (y controles y calibradores) en los pozos correspondientes
- Cubrir la placa con un sellador de placa (plástico del kit) e incubar 2h a 4°C
- Lavar los pozos 4 veces con tampón de lavado frío → poner 300 ul de tampón en cada pozo (lavar con multicanal)
- Añadir 100 ul del **Ac secundario IgM** (kit) a todos los pocillos → cubrir la placa con sellador e incubar 2h a 4°C
  - *Sacar el TMB de la nevera (kit) para atemperarlo*

- Lavar los pozos 4 veces con tampón de lavado frío → poner 300 ul de tampón en cada pozo (lavar con multicanal)
- Añadir 100 ul de **TMB** atemperado a cada pocillo e incubar 30 min a temperatura ambiente
- Añadir 100 ul de **solución de parada** a cada pocillo
- Leer la placa a 450 nm
  - Se calculan los títulos poniendo las OD en la hoja de trabajo anti-MAG de Immuno: si los títulos son de menos de 1000 BTU, se considera negativo

**Resultado:** muestras 32,33,34 negativas

- **UCB 19 visita inicial → 16504 BTU**
- **UCB 19 visita final → 12340 BTU**
- **UCB 31 visita inicial → 1953 BTU**
- **UCB 31 visita final → 1435 BTU**

### ELISA Gangliósidos día 2 (Titulación IgM muestras UCB)

Se sigue el protocolo de Immuno (lo hago en Immuno).

**Protocolo** (breve):

- Lavar 4 veces con PBS
- Preparar **Ac secundario**: RAH HRP IgM dil. 1/3000 en PBS-BSA 0'1%. Poner 100 ul de la dilución a cada pozo, incubar 2h a 4°C
- Lavar 4 veces con PBS (2 lavados en cada cubeta)
- Preparar el **sustrato**: 1 tableta de OPD + 1 tableta de urea hydrogen peroxidase + 20 ml agua destilada (proteger de la luz con papel de aluminio y agitar).  
Poner 100 ul a cada pozo, incubar 40 min a temperatura ambiente
- Parar la reacción añadiendo 50 ul de **H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>** al 25% a cada pozo.
- Leer placa a 490-630



**26/07/2021**

---

### Coating células + transfección Culture slides

\*Coating poly-D hecho el día 21/07/21 (no me dio tiempo de transfectar al día siguiente)

9 culture slides:

- 2 LRP4
- 2 NF155/CNTN1
- 5 Perfil

#### **Protocolo:**

- Preparar mezclas transfección → cada culture slide (8 pozos)
  - 2,2 ug DNA + 68 ul Optimem
  - 3,2 ul lipofectamina2000 + 68 ul Optimem
- Juntar y dejar reposar mínimo 5 minutos
- Poner 300 ul de medio HEK a cada pozo
- Poner 120.000 cels (HEK293) a cada pozo
- Poner 17 ul de mezcla de transfección a cada pozo

### Coating ELISA CASPR1

1 placa entera → preparar 2,5 ml buffer de coating (carbonate-bicarbonato pastillas) + 29'1 ul proteína CASPR1 (Conc. Inicial 0.43 mg/ml, conc. Final 5 ug/ml).

Orden:

- Proteína
- Blanco
- Proteína
- Blanco...

**27/07/2021**

---

### Recoger culture slides

- Quitar medio
- Fijar PFA4% 10 min
- Quitar PFA y lavar con PBS1x
  - LRP4 y CASPR2: tritón 0,3% 5 min, y lavar con PBS 1x

- Quitar los pozos del culture slide (con piezas negra y blanca)
- Secar bordes y bloquear

**03/08/2021**

---

### Coating HEKs (FLOT1/2)

- 4 placas 12w → coating Poly-D 1/40 1h a 37°C → planto 200.000 cels/pozo (con 1 ml de medio)
- 1 placa 60mm con 26 cubres de 9mm → coating Poly-D 1/40 1h a 37°C → planto 1 millón de cels

### Coating Poly-D.Lys (culture slides)

Coating 18 culture slides con Poly-D 1/40 en PBS1x (de stock poly-d 1 mg/ml) → aprox 300 ul por pocillo

### Descongelar SH-SY5Y

Descongelado 1 vial de SH-SY5Y p11+5 (congelado por mi el 01.06.21) → placa 60mm con coating de gelatine 0,15%

**04/08/2021**

---

### Coating células + transfección Culture slides

12 culture slides: \*no había suficientes células para hacer los 18. Guardo los 6 que me sobran a temperatura ambiente (sin la poly-d)

- 3 LRP4
- 1 NF155/CNTN1
- 8 Perfil

#### **Protocolo:**

- Preparar mezclas transfección → cada culture slide (8 pozos)
  - 2,2 ug DNA + 68 ul Optimem
  - 3,2 ul lipofectamina2000 + 68 ul Optimem
- Juntar y dejar reposar mínimo 5 minutos
- Poner 300 ul de medio HEK a cada pozo
- Poner 120.000 cels (HEK293) a cada pozo
- Poner 17 ul de mezcla de transfección a cada pozo

## Transfección FLOT1/2

**Protocolo:** lo hago por la tarde!

- Preparar mezclas transfección
  - Placa 60 mm (FLOT1/2):
    - 6 ug FLOT1 + 3 ug FLOT2 + 250 ul Optimem
    - 12 ul lipofectamina2000 + 250 ul Optimem
  - Placa 12 w (FLOT1/2) → cada pozo:
    - 1'5 ug FLOT1 + 0'75 ug FLOT2 + 62'5 ul Optimem
    - 3 ul lipofectamina2000 + 62'5 ul Optimem
  - Placa 12 w (FLOT1) → cada pozo:
    - 2 ug FLOT1 + 62'5 ul Optimem
    - 3 ul lipofectamina2000 + 62'5 ul Optimem
  - Placa 12 w (FLOT2) → cada pozo:
    - 2 ug FLOT2 + 62'5 ul Optimem
    - 3 ul lipofectamina2000 + 62'5 ul Optimem
- Juntar y dejar reposar mínimo 5 minutos
- Añadir la mezcla de transfección a las células (placa 60mm: 500 ul, placa 12w: 125 ul)

## Coating ELISA FLOT1/2

[FLOT1]<sub>i</sub> = 0,14 mg/ml

[FLOT2]<sub>i</sub> = 0,066 mg/ml

Buffer coating: carbonate-bicarbonato (100 ml agua destilada + 1 pastilla C3041 Sigma)

- 4 pozos FLOT1/2 → [<sub>f</sub>] = 1 ug/ml → 200 ul buffer + 1,4 ul FLOT1 + 3 ul FLOT2
- 4 pozos FLOT1/2 → [<sub>f</sub>] = 3 ug/ml → 200 ul buffer + 4,2 ul FLOT1 + 9 ul FLOT2
- 4 pozos FLOT1/2 → [<sub>f</sub>] = 5 ug/ml → 200 ul buffer + 7 ul FLOT1 + 15 ul FLOT2

## Coating ELISA CASPR1

[CASPR1]<sub>i</sub> = 0,43 mg/ml

Buffer coating: carbonate-bicarbonato (100 ml agua destilada + 1 pastilla C3041 Sigma)

- 5 pozos → [CASPR1]<sub>f</sub> = 5 ug/ml → 250 ul buffer + 3 ul CASPR1

05/08/2021

---

### Recoger culture slides

- Quitar medio
- Fijar PFA4% 10 min
- Quitar PFA y lavar con PBS1x
  - LRP4 y CASPR2: tritón 0,3% 5 min, y lavar con PBS 1x
- Quitar los pozos del culture slide (con piezas negra y blanca)
- Secar bordes y bloquear
- Congelar a -80°C

### ICC FLOT ½ (kit Euroimmun)

#### **Muestras:**

- EM-163
- EM-390
- EM-223
- EM-316
- T2 vacunas 1347111 (21-2-1293)
- T3 vacunas 1347111
- EM-247
- EM-397
- T2 vacunas 1668530 (21-2-1291)
- T3 vacunas 1668530

#### **Protocolo:**

- Incubar 30 minutos en suero diluido 1/10 en PBS-tween 0'2%
- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'2%
- Incubar 30 minutos con el Ac.Secundario del kit (sin diluir)
- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'2%
- Montar con medio de montaje del kit

#### **Resultado:** fotos en carpeta!

- EM-163 → ++
- EM-390 → +
- EM-223 → + débil
- EM-316 → +++
- T2 vacunas 1347111 → + débil
- T3 vacunas 1347111 → + débil
- EM-247 → +
- EM-397 → +++
- T2 vacunas 1668530 → +++
- T3 vacunas 1668530 → +++

## ELISA FLOT1/2

### Muestras:

- EM-158
- EM-397
- EM-406
- Cneg

### Protocolo:

- Lavar 3 veces con PBS1x
- **Bloquear** con leche 5% en **PBS (normal)** → 200 ul/pozo, 1 h
- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
- Incubar con los **sueros** diluidos 1/100 en leche 5% PBS-tween 0'1% → 100 ul/pozo, 1 h
- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
- Incubar con **RAH HRP IgG 1/5000** en leche 5% PBS-tween 0'1% → 100 ul/pozo, 1 h
- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
- Incubar 5min (o hasta que suba el color) con **TMB**: preparar solución un rato antes y tapar de la luz (para que se atempere) → 100 ul/pozo
- Parar la reacción con 50ul de **H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 25%**
- Leer a 450-620 nm

### Resultado:

	FLOT ½ 1ug/ml	FLOT ½ 3 ug/ml	FLOT ½ 5ug/ml
<b>EM-158 prot</b>	0,234	0,285	0,344
<b>EM-158 blanc</b>	0,107	0,118	0,126
<b>EM-397 prot</b>	0,162	0,215	0,2
<b>EM-397 blanc</b>	0,097	0,099	0,112
<b>EM-406 prot</b>	0,186	0,196	0,208
<b>EM-406 blanc</b>	0,156	0,123	0,139
<b>Cneg prot</b>	0,323	0,317	0,291
<b>Cneg blanc</b>	0,278	0,207	0,15

Parece que EM-158 y EM-397 sean positivas → hay más diferencia de OD entre prot y blanco en esas dos muestras que en 406 y Cneg (que son negativas)

## ELISA CASPR1

### Muestras:

- 21-2-1393
- 21-2-1440
- 21-2-1441
- Cneg
- Cpos

### Protocolo:

- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
- **Bloquear** con leche 5% en PBS-tween 0'1% → 200 ul/pozo, 1 h
- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
- Incubar con los **sueros** diluidos 1/100 en leche 5% PBS-tween 0'1% → 100 ul/pozo, 1 h
- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
- Incubar con **RAH HRP** IgG 1/3000 en leche 5% PBS-tween 0'1% → 100 ul/pozo, 1 h
- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
- Incubar 5min (o hasta que suba el color) con **TMB**: preparar solución un rato antes y tapar de la luz (para que se atempere) → 100 ul/pozo
- Parar la reacción con 50ul de **H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>** 25%
- Leer a 450-620 nm

### Resultado: las 3 muestras son negativas

- 21-2-1393 → blanc: 0,2 / prot: 0,242
- 21-2-1440 → blanc: 0,172 / prot: 0,153
- 21-2-1441 → blanc: 0,179 / prot: 0,186
- Cneg → blanc: 0,32 / prot: 0,262
- Cpos → blanc: 0,219 / prot: 1,453

## Coating ELISA FLOT1/2

[FLOT1]<sub>i</sub> = 0,14 mg/ml

[FLOT2]<sub>i</sub> = 0,066 mg/ml

Buffer coating: carbonate-bicarbonato (100 ml agua destilada + 1 pastilla C3041 Sigma)

- 16 pozos FLOT1/2 → [f = 1 ug/ml → aprox 900 ul buffer + 6,25 ul FLOT1 + 13,6 ul FLOT2

06/08/2021

---

### Recoger placas 12w y placa 60mm FLOT1/2

\*A primera hora de la mañana

- Quitar medio
- Fijar con PFA4% 10 min
- Lavar con PBS1x
- Congelar a -80°C

\*Placa 60 mm → después del último lavado, bloquear 1h con Goat 5% y después congelar a -80°C

### ICC FLOT1/2

Cels recogidas el mismo día (06.08.21)

**Muestras** (FLOT1/2 +): pruebo si ha salido bien la transfección

- EM-158 1/10
- EM-397 1/10
- C neg

**Protocolo:**

- Suero 1/10 en Goat Serum 5% (1h)
- 3 lavados PBS1x
- Ac anti-FLOT 1 (1/100) en Goat Serum 5 % (1h)
- 3 lavados PBS1x
- GAR488 IgG + GAH594 IgG (1/500) en Goat Serum 5 % (1h) → sacar Ac nuevos!!!
- 3 lavados PBS1x
- Montar con Fluoromount

**Resultado:** las dos muestras (158 y 397) se ven claramente positivas. En el control negativo hay un poco de cruce de canal entre el verde y el rojo → diluir más el Ac anti-FLOT1 la próxima vez

## ELISA FLOT1/2

### Muestras:

- |               |                 |
|---------------|-----------------|
| 1. EM-158     | 9. Cneg 202-3   |
| 2. EM-163     | 10. Cneg 200-1  |
| 3. EM-223     | 11. Cneg 204-16 |
| 4. EM-316     | 12. Cneg 204-18 |
| 5. EM-247     | 13. Cneg 200-2  |
| 6. EM-397     | 14. Cneg 151-7  |
| 7. T2 1668530 | 15. Cneg 198-6  |
| 8. EM-406     | 16. Cneg 220-2  |

### Protocolo:

- Lavar 3 veces con PBS
- **Bloquear** con leche 5% en **PBS (normal)** → 200 ul/pozo, 1 h
- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
- Incubar con los **sueros** diluidos 1/100 en leche 5% PBS-tween 0'1% → 100 ul/pozo, 1 h
- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
- Incubar con **RAH HRP IgG 1/5000** en leche 5% PBS-tween 0'1% → 100 ul/pozo, 1 h
- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
- Incubar 5min (o hasta que suba el color) con **TMB**: preparar solución un rato antes y tapar de la luz (para que se atempere) → 100 ul/pozo
- Parar la reacción con 50ul de **H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 25%**
- Leer a 450-620 nm

**Resultado:** Salen igual los controles negativos que los pacientes positivos → descarto el ELISA definitivamente



09/08/2021

### Diferenciación SH-SY5Y (d0)

Sigo el protocolo de Noemí (v2) pero en vez de usar placas de 35mm uso placas de 60mm

**Coating** → preparo 4 placas de 60mm con 200.000 cels/placa (en 4 ml de medio) → para hacer el pase, centrifugar 2min a 1000g.

**Medio de proliferación:**

<b>Basic Media</b>	<b>50 ml</b>	<b>250 ml</b>
E-MEM	20.75	103.75 ml
F-12	20.75	103.75 ml
FBS (15%)	7.5 ml	37.5 ml
Glutamina (Cf= 2mM)	0.5 ml	2.5 ml
Penicillina-Streptomycin (1%)	0.5ml	2.5 ml

### Coating HEKs (FLOT1/2)

- 5 placas 60mm con 26 cubres de 9mm → coating Poly-D 1/40 1h a 37°C → planto 1 millón de cels/placa

### ICC FLOT1/2 (subclases)

Cels recogidas y congeladas día 06.08.21

**Muestras (FLOT1/2 +):**

- EM-397 IgG1
- EM-397 IgG2
- EM-397 IgG3
- EM-397 IgG4
- EM-397 IgG totales
- C neg IgG1
- Cneg IgG2
- Cneg IgG3
- Cneg IgG4
- Cneg IgG totales

**Protocolo:**

- Suero 1/10 en Goat Serum 5% (1h)
- 3 lavados PBS1x
- Ac secundarios: (subclases de Southern Biotech)
  - MAH 488 IgG1 (1/200)
  - MAH 488 IgG2 (1/200)

- MAH 488 IgG3 (1/200)
- MAH 488 IgG4 (1/200)
- GAH 488 IgG (1/500)
- 3 lavados PBS1x
- Montar con Fluoromount

**Resultado:** La muestra 397 se ve muy positiva con **IgG1** y IgG totales. El resto de subclases son negativas.

10/08/2021

### Diferenciación SH-SY5Y (d1)

Cambiar el medio de proliferación por el medio de diferenciación **1** (añadir RA inmediatamente antes de añadir el medio a las células)

Differentiation media #1	50 ml
EMEM	47.7
FBS (2.5%)	1.3 ml
Glutamina (Cf= 2mM)	0.5 ml
Penicillina-Streptomycin (1%)	0.5ml
10 $\mu$ M RA	Preparar a 1/1000 cada vez que se ponga medio

\*Preparo 16 ml medio dif **1** + 16 ul RA (pongo 4 ml/placa)

### Transfección FLOT1/2

**Protocolo:** lo hago por la tarde!

- Preparar mezclas transfección
  - 3 Placas 60 mm (**FLOT1/2**):
    - 6 ug FLOT1 + 3 ug FLOT2 + 250 ul Optimem / placa
    - 12 ul lipofectamina2000 + 250 ul Optimem / placa
  - 1 Placa 60 mm (**FLOT 1**):
    - 8 ug FLOT1 + 250 ul Optimem / placa
    - 12 ul lipofectamina2000 + 250 ul Optimem / placa

- 1 Placa 60 mm (**FLOT 2**):
  - 8 ug FLOT2 + 250 ul Optimem / placa
  - 12 ul lipofectamina2000 + 250 ul Optimem / placa
- Juntar y dejar reposar mínimo 5 minutos
- Añadir la mezcla de transfección a las células (placa 60mm: 500 ul)

### ICC FLOT1/2 (subclases)

Cels recogidas y congeladas día 06.08.21

#### **Muestras:**

- |                      |                      |
|----------------------|----------------------|
| · EM-158 IgG1        | · EM-316 IgG3        |
| · EM-158 IgG2        | · EM-316 IgG4        |
| · EM-158 IgG3        | · EM-316 IgG totales |
| · EM-158 IgG4        | · C neg IgG1         |
| · EM-158 IgG totales | · Cneg IgG2          |
| · EM-316 IgG1        | · Cneg IgG totales   |
| · EM-316 IgG2        |                      |

#### **Protocolo:**

- Suero 1/10 en Goat Serum 5% (1h)
- 3 lavados PBS1x
- Ac secundarios: (subclases de Southern Biotech)
  - MAH 488 IgG1 (1/200)
  - MAH 488 IgG2 (1/200)
  - MAH 488 IgG3 (1/200)
  - MAH 488 IgG4 (1/200)
  - GAH 488 IgG (1/200)
- 3 lavados PBS1x
- Montar con Fluoromount

#### **Resultado:**

- **EM-158** → positiva en **IgG3** y IgG totales (se ve negativa en IgG1)
- **EM-316** → positiva en **IgG1** y IgG totales (en IgG3 no había células así que lo repetiremos)

**11/08/2021**

---

**Immunoabsorción (FLOT1, FLOT2, FLOT1/2, HEKs no transf)**

Placas 12w congeladas día 06.08.21

**Muestras:**

- EM-247 (1/10)
- EM-316 (1/100)

**Protocolo:**

- Diluir muestras en Goat serum 5 % → preparar 300 ul/condición (FLOT1, FLOT2, FLOT1/2, HEKs no transfectadas)
- Incubar 1h en cada uno de los 6 pozos de cada condición

**12/08/2021**

---

**Recoger placas 60mm FLOT1/2, FLOT1, FLOT2**

\*A primera hora de la mañana

- Quitar medio
- Fijar con PFA4% 10 min
- Lavar con PBS1x
- Bloquear 1h con Goat 5 %
- Congelar a -80°C

**Diferenciación SH-SY5Y (d3)**

Cambiar medio → medio de diferenciación **1**

\*Preparo 16 ml medio dif **1** + 16 ul RA (pongo 4 ml/placa)

## ICC FLOT1/2 (subclases + immunoabsorciones)

Cels recogidas y congeladas día 12.08.21

### **Muestras:**

- EM-158 IgG1 → -
- EM-158 IgG3 → +
- EM-316 IgG1 → ++
- EM-316 IgG3 → -
- EM-163 IgG1 → +
- EM-163 IgG2 → -
- EM-163 IgG3 → -
- EM-163 IgG4 → + (cruce)
- EM-247 IgG1 → -
- EM-247 IgG2 → -
- EM-247 IgG3 → -
- EM-247 IgG4 → + (cruce)
- EM-247 IgG totales → +
- C neg (200-2) IgG1 → -
- Cneg IgG2 → -
- Cneg IgG3 → -
- Cneg IgG4 → + (cruce)
- 163 IgG totales → +
- EM-247 abs FLOT1 → +
- EM-247 abs FLOT2 → +
- EM-247 abs FLOT1/2 → +
- EM-247 abs no transf. → +
- EM-316 abs FLOT1 → +
- EM-316 abs FLOT2 → +
- EM-316 abs FLOT1/2 → +
- EM-316 abs no transf. → +

### **Protocolo:**

- Suero 1/10 en Goat Serum 5% (1h) → los sueros de immunoabsorción se ponen directamente (ya están previamente diluidos)
- 3 lavados PBS1x
- Ac comercial anti-FLOT1 1/500
- 3 lavados PBS1x
- Ac secundarios: (subclases de Southern Biotech)
  - MAH 488 IgG1 (1/200) + GAR 594 (1/500)
  - MAH 488 IgG2 (1/200) + GAR 594 (1/500)
  - MAH 488 IgG3 (1/200) + GAR 594 (1/500)
  - MAH 488 IgG4 (1/200) + GAR 594 (1/500)
  - GAH 488 IgG (1/200) + GAR 594 (1/500)
- 3 lavados PBS1x
- Montar con Fluoromount

**Resultado:**

- EM-158 es positivo en IgG3 (negativo en IgG1)
- EM-316 es positivo en IgG1
- Hay cruce de canal entre el rojo y el verde (sobretudo en IgG4) → repetir las subclases de EM-163 y EM-247 sin poner anticuerpo comercial
  - Al repetir las subclases, bloquear con el bloqueo universal de Santa Cruz (no tiene sentido bloquear con Goat si los Ac. secundarios son mouse)
- Las immunoabsorciones no han salido bien → tanto EM-247 como EM-316 siguen siendo positivas en todas las condiciones → repetir immunoabsorciones con los sueros más diluidos.

**13/08/2021**

Diferenciación SH-SY5Y (d4)

Cambiar medio → medio de diferenciación **1**

\*Preparo 16 ml medio dif **1** + 16 ul RA (pongo 4 ml/placa)

**16/08/2021**

Diferenciación SH-SY5Y (d7)

Cambiar el medio de diferenciación **1** por el medio de diferenciación **2** (añadir RA inmediatamente antes de añadir el medio a las células)

Differentiation media #2	50 ml
EMEM	48.5
FBS (1%)	0.5 ml
Glutamina (Cf= 2mM)	0.5 ml
Penicillina-Streptomycin (1%)	0.5ml
10 µM RA	Preparar a 1/1000 cada vez que se ponga medio

\*Preparo 16 ml medio dif **2** + 16 ul RA (pongo 4 ml/placa)

17/08/2021

---

### Coating Laminina (dif SH-SY5Y)

Coating de 4 placas de 60mm con 26 cubres 9 mm → laminina 10 ug/ml en PBS

Dejar overnight a 37°C

### Coating HEKs (FLOT1/2)

- 4 placas 12w → coating Poly-D 1/40 1h a 37°C → planto 200.000 cels/pozo (con 1 ml de medio)
- 1 placa 60mm con 26 cubres de 9mm → coating Poly-D 1/40 1h a 37°C → planto 1 millón de cels

### Coating Poly-D.Lys (culture slides)

Coating 18 culture slides con Poly-D 1/40 en PBS1x (de stock poly-d 1 mg/ml) → aprox 300 ul por pocillo

18/08/2021

---

### Diferenciación SH-SY5Y (d9)

Transferir las células a las placas coated con laminina (primero quitar laminina, no lavar):

- Añadir 400 ul de tripsina a cada placa e incubar 2-3 minutos
- Añadir 4 ml de medio de diferenciación **2\***
- Combinar las células de las 3 placas en un único tubo de 15 ml y disgregar bien las células.
- Poner 4 ml de la suspensión a cada placa (con cubres)

\*Preparo 16 ml medio dif **2** + 16 ul RA (pongo 4 ml/placa)

### Transfección FLOT1/2

**Protocolo:** lo hago por la tarde!

- Preparar mezclas transfección
  - Placa 60 mm (**FLOT1/2**):
    - 6 ug FLOT1 + 3 ug FLOT2 + 250 ul Optimem
    - 12 ul lipofectamina2000 + 250 ul Optimem
  - Placa 12 w (**FLOT1/2**) → cada pozo:

- 1'5 ug FLOT1 + 0'75 ug FLOT2 + 62'5 ul Optimem
- 3 ul lipofectamina2000 + 62'5 ul Optimem
- Placa 12 w (**FLOT1**) → cada pozo:
  - 2 ug FLOT1 + 62'5 ul Optimem
  - 3 ul lipofectamina2000 + 62'5 ul Optimem
- Placa 12 w (**FLOT2**) → cada pozo:
  - 2 ug FLOT2 + 62'5 ul Optimem
  - 3 ul lipofectamina2000 + 62'5 ul Optimem
- Juntar y dejar reposar mínimo 5 minutos
- Añadir la mezcla de transfección a las células (placa 60mm: 500 ul, placa 12w: 125 ul)

### Coating células + transfección Culture slides

18 culture slides:

- 4 LRP4
- 2 LRP4/CASPR2
- 2 NF155/CNTN1
- 10 Perfil

#### **Protocolo:**

- Preparar mezclas transfección → cada culture slide (8 pozos)
  - 2,2 ug DNA + 68 ul Optimem
  - 3,2 ul lipofectamina2000 + 68 ul Optimem
- Juntar y dejar reposar mínimo 5 minutos
- Poner 300 ul de medio HEK a cada pozo
- Poner 120.000 cels (HEK293) a cada pozo
- Poner 17 ul de mezcla de transfección a cada pozo



## ICC FLOT1/2 (subclases)

(MARTA)

Cels recogidas y congeladas día 12.08.21

### **Muestras:**

- EM-163 IgG1 → ++
- EM-163 IgG2 → -
- EM-163 IgG3 → +
- EM-163 IgG4 → ?
- 163 IgG totales → + (flojo)
- EM-247 IgG1 → -
- EM-247 IgG2 → -
- EM-247 IgG3 → +
- EM-247 IgG4 → ?
- EM-247 IgG totales → ?
- C neg IgG1 → -
- Cneg IgG2 → -
- Cneg IgG3 → -
- Cneg IgG4 → +??
- Cneg IgG totales → +??

### **Protocolo:**

- Bloquear los cubres con el bloqueo universal de Santa Cruz (30 min – 1h)
- Suero 1/10 en bloqueo universal (1h)
- 3 lavados PBS1x
- Ac secundarios (diluídos en bloqueo universal):
  - MAH 488 IgG1 (1/200)
  - MAH 488 IgG2 (1/200)
  - MAH 488 IgG3 (1/200)
  - MAH 488 IgG4 (1/200)
  - GAH 488 IgG (1/500)
- 3 lavados PBS1x
- Montar con Fluoromount

### **Resultado:**

- Parece que EM-163 es IgG1 (clarísimo) y IgG3, y que EM-247 es IgG3 (pero no lo veo claro del todo)
- El ac MAH488 IgG4 marca claramente positivo en el Cneg
- Repetir EM-163 IgG3 y IgG4 con cubres transfectados con FLOT1/2 y con FLOT1 solo (para ver si son negativos con FLOT1); y repetir todo el 247 con cubres de los dos tipos también.

19/08/2021

### Diferenciación SH-SY5Y (d10)

Cambiar el medio de diferenciación **2** por el medio de diferenciación **3** (añadir RA inmediatamente antes de añadir el medio a las células)

Differentiation media #3	50 ml
Neurobasal	47.1
B-27 (1x)	1 ml (50X stock)
KCl 20mM	1 ml (1M stock)
Glutamax (1X)	0.5 ml (100x stock)
50ng/mlBDNF	250µl BDNF (stock 10µg/ml)
2mM db-AMPC	100µl db AMP(1M stock)
Penicillina-Streptomycin (1%)	0.5ml
10 µM RA	Preparar a 1/1000 cada vez que se ponga medio

\*el KCl lo tiene Noemí preparado en su caja de la nevera. El B-27, BDNF y db-AMPC están en su caja del congelador -20°C de cultivos (también hay una alícuota de RA)

\*Preparo 16 ml medio dif **3** + 16 ul RA (pongo 4 ml/placa)

### Recoger culture slides

- Quitar medio
- Fijar PFA4% 10 min
- Quitar PFA y lavar con PBS1x
  - LRP4 y CASPR2: tritón 0,3% 5 min, y lavar con PBS 1x
- Quitar los pozos del culture slide (con piezas negra y blanca)
- Secar bordes y bloquear
- Congelar a -80°C

**20/08/2021**

---

### Diferenciación SH-SY5Y (d11)

Cambiar medio → medio de diferenciación **3**

\*Preparo 16 ml medio dif **3** + 16 ul RA (pongo 4 ml/placa)

### Recoger placas 12w y placa 60mm FLOT1/2

\*A primera hora de la mañana

- Quitar medio
- Fijar con PFA4% 10 min
- Lavar con PBS1x
- Congelar a -80°C

\*Placa 60 mm → después del último lavado, bloquear 1h con Goat 5% y después congelar a -80°C

### ICC Perfil paranodales

Muestras:

- 21-2-1478 → neg CNTN1, NF140, NF155, NF186
- 21-2-1479 → neg
- 21-2-1489 → neg
- 21-2-1490 → neg
- 21-2-1491 → neg
- 21-2-1494 → neg
- **21-2-1495 → pos CNTN1** → Hacer ELISA

**23/08/2021**

---

### Diferenciación SH-SY5Y (d14)

Cambiar medio → medio de diferenciación **3**

\*Preparo 16 ml medio dif **3** + 16 ul RA (pongo 4 ml/placa)

**24/08/2021**

---

### Immunoabsorción (FLOT1, FLOT2, FLOT1/2, HEKs no transf)

Placas 12w recogidas 20.08.21

#### **Muestras:**

- EM-247 (1/50)
- EM-316 (1/300)

#### **Protocolo:**

- Diluir muestras en PBS1x → preparar 300 ul/condición (FLOT1, FLOT2, FLOT1/2, HEKs no transfectadas)
- Incubar 1h en cada uno de los 6 pozos de cada condición

### Coating ELISA CASPR1 y CNTN1

[CASPR1]<sub>i</sub> = 0,43 mg/ml, [CNTN1]<sub>i</sub> = 0,25 mg/ml

Buffer coating: carbonate-bicarbonato (100 ml agua destilada + 1 pastilla C3041 Sigma)

- CASPR1: 13 pozos → [CASPR1]<sub>f</sub> = 5 ug/ml
- CNTN1: 6 pozos → [CNTN1]<sub>f</sub> = 1 ug/ml

**25/08/2021**

---

### Coating Poly-D.Lys (culture slides)

Coating 18 culture slides con Poly-D 1/40 en PBS1x (de stock poly-d 1 mg/ml) → aprox 300 ul por pocillo

### Diferenciación SH-SY5Y (d16)

Cambiar medio → medio de diferenciación **3** → sólo cambio el medio a 2 placas → Preparo 8 ml medio dif **3** + 8 ul RA (pongo 4 ml/placa)

Las otras 2 placas las fijo para hacer ICC.

## ICC SH-SY5Y (d16 dif)

### **Muestras:** (todo IgG)

- UCB 1 – UCB 34
- Cpos CNTN1
- Cneg

### **Protocolo:**

- Fijar 10 min con PFA 4%
- 1 lavado con PBS1x
- Bloquear con Goat Serum 5 % 1h
- Suero 1/100 en Goat 5 % (1h) → cubres boca arriba
- 3 lavados PBS1x
- Ac anti-panNF 1/200 en Goat 5% (1h) → cubres boca arriba
- 3 lavados PBS1x
- GAC 594 IgG + GAH 488 IgG 1/500 en Goat 5% (1h) → cubres boca arriba
- Montar con Fluoromount

**Resultado:** Ha salido todo mal! Las células están despegadas de los cubres al final de la immuno. (Después de fijarlas las he mirado y estaban bien). Fijar 15 minutos?

Dia 16 de diferenciación es perfecto!

## ELISA CASPR1 y CNTN1

### **Muestras CASPR1:**

- |                   |                   |
|-------------------|-------------------|
| · 21-2-1478 → neg | · 21-2-1496 → neg |
| · 21-2-1479 → neg | · 21-2-1497 → pos |
| · 21-2-1489 → neg | · 21-2-1498 → neg |
| · 21-2-1490 → neg | · 21-2-1499 → pos |
| · 21-2-1491 → neg | · Cpos → pos      |
| · 21-2-1494 → neg | · Cneg → neg      |
| · 21-2-1495 → neg |                   |

**Muestras CNTN1:**

- 21-2-1495 → pos
- 21-2-1498 → pos
- 21-2-1496 → neg
- Cpos → pos
- 21-2-1497 → pos
- Cneg → neg

**Protocolo:**

- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
- **Bloquear** con leche 5% en PBS-tween 0'1% → 200 ul/pozo, 1 h
- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
- Incubar con los **sueros** diluidos 1/100 en leche 5% en PBS-tween 0'1% → 100 ul/pozo, 1 h
- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
- Incubar con **RAH HRP** IgG 1/3000 en leche 5% en PBS-tween 0'1% → 100 ul/pozo, 1 h
- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
- Incubar 5min (o hasta que suba el color) con **TMB**: preparar solución un rato antes y tapar de la luz (para que se atempere) → 100 ul/pozo
- Parar la reacción con 50ul de **H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>** 25%
- Leer a 450-620 nm

	1 (blanc)	2 (prot)	3 (blanc)	4 (prot)	5	6 (blanc)	7 (prot)	8	9	10	11	12
<b>A</b>	1478	1478	1497	1497		1495	1495					
<b>B</b>	1479	1479	1498	1498		1496	1496					
<b>C</b>	1489	1489	1499	1499		1497	1497					
<b>D</b>	1490	1490	Cpos	Cpos		1498	1498					
<b>E</b>	1491	1491	Cneg	Cneg		Cpos	Cpos					
<b>F</b>	1494	1494				Cneg	Cneg					
<b>G</b>	1495	1495										
<b>H</b>	1496	1496										

CASPR1    CNTN1

	1 (blanc)	2 (prot)	3 (blanc)	4 (prot)	5	6 (blanc)	7 (prot)	8	9	10	11	12
A	0,127	0,1	0,126	0,735		0,119	1,417					
B	0,094	0,096	0,092	0,132		0,093	0,13					
C	0,117	0,194	0,165	0,834		0,154	0,492					
D	0,102	0,133	0,124	1,516		0,115	1,055					
E	0,106	0,12	0,168	0,134		0,285	1,606					
F	0,182	0,136				0,177	0,167					
G	0,133	0,118										
H	0,09	0,092										

**26/08/2021**

### Coating células + transfección Culture slides

18 culture slides:

- 18 Perfil

#### **Protocolo:**

- Preparar mezclas transfección → cada culture slide (8 pozos)
  - 2,2 ug DNA + 68 ul Optimem
  - 3,2 ul lipofectamina2000 + 68 ul Optimem
- Juntar y dejar reposar mínimo 5 minutos
- Poner 300 ul de medio HEK a cada pozo
- Poner 120.000 cels (HEK293) a cada pozo
- Poner 17 ul de mezcla de transfección a cada pozo

### ICC SH-SY5Y (d17 dif)

Fijo las 2 placas que no había sacado del incubador el día de antes. Veo la diferenciación igual que en d16 → pruebo fijando 15 min en vez de 10.

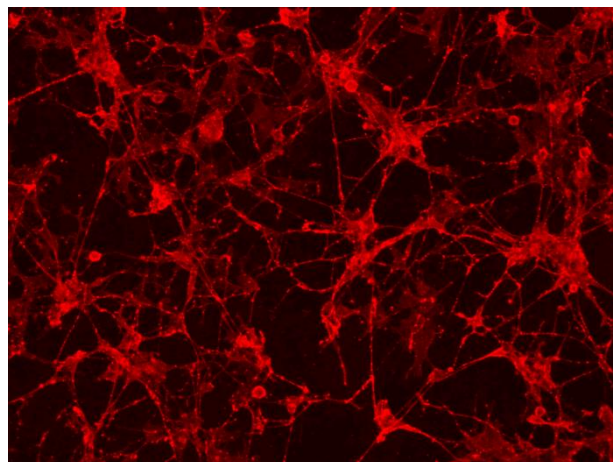
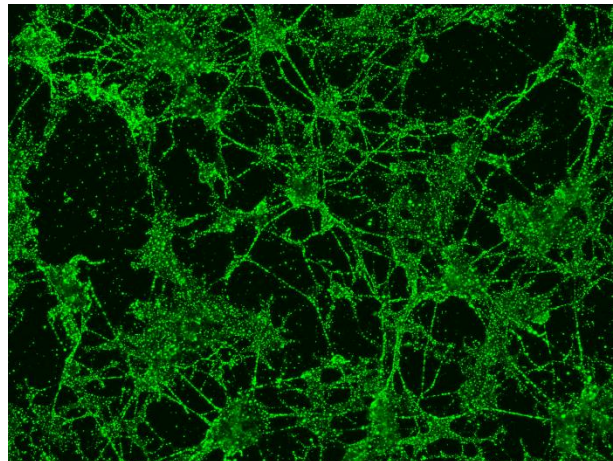
**Muestras (IgG):** pruebo con los cubres sacados en d16 y los cubres sacados en d17

- Cpos CNTN1
- Cneg

**Protocolo:**

- Fijar 15 min con PFA 4%
- 1 lavado con PBS1x
- Bloquear con Goat Serum 5 % 1h
- Suero 1/100 en Goat 5 % (1h) → cubres boca arriba
- 3 lavados PBS1x
- Ac anti-panNF 1/200 en Goat 5% (1h) → cubres boca arriba
- 3 lavados PBS1x
- GAC 594 IgG + GAH 488 IgG 1/500 en Goat 5% (1h) → cubres boca arriba
- Montar con Fluoromount

**Resultado:** en los cubres fijados el día de antes (10 min) no hay células, en los cubres fijados el día d17 (15 min) sí que están bien las células.





27/08/2021

ICC SH-SY5Y (d17 dif)

**Muestras:** (todo IgG y IgM)

- UCB 2 – UCB 26 (menos 1, 5, 11, 16)
- Cneg 202-16
- Cpos IgG CNTN1+
- Cpos IgM SGB-5

**Protocolo:** uso las células fijadas el día de antes (15min), que los había dejado en la nevera toda la noche.

- Suero 1/100 en Goat 5 % (1h) → cubres boca arriba
- 3 lavados PBS1x
- Ac anti-panNF 1/200 en Goat 5% (1h) → cubres boca arriba
- 3 lavados PBS1x
- GAC 594 IgG + GAH 488 IgG 1/500 en Goat 5% (1h) → cubres boca arriba
- Montar con Fluoromount

**Resultado:**

Muestra	Resultado IgG	Resultado IgM
UCB 2	-	-
UCB 3	++	-
UCB 4	+	-
UCB 6	+	++
UCB 7	+	-
UCB 8	+	+
UCB 9	-	+
UCB 10	++	-
UCB 12	+	+
UCB 13	+	+
UCB 14	+	+
UCB 15	++	++
UCB 17	-	-

Muestra	Resultado IgG	Resultado IgM
UCB 18	-	-
UCB 19	-	+
UCB 20	+	-
UCB 21	+	-
UCB 22	-	-
UCB 23	-	-
UCB 24	+	+
UCB 25	-/+	-
UCB 26	-/+	-
UCB 27	+	+
Cneg	-	-
Cpos	++	+++

## Recoger culture slides

- Quitar medio
- Fijar PFA4% 10 min
- Quitar PFA y lavar con PBS1x
- Quitar los pozos del culture slide (con piezas negra y blanca)
- Secar bordes y bloquear, Congelar a -80°C

**30/08/2021**

## Coating ELISA CASPR1, CNTN1, NF186

Para testar muestras de Interlab Validation

[CASPR1]<sub>i</sub> = 0,43 mg/ml, [CNTN1]<sub>i</sub> = 0,25 mg/ml, [NF186]<sub>i</sub> = 0,25 mg/ml

Buffer coating: carbonate-bicarbonato (100 ml agua destilada + 1 pastilla C3041 Sigma)

- CASPR1: 8 pozos → [CASPR1]<sub>f</sub> = 5 ug/ml
- CNTN1: 12 pozos → [CNTN1]<sub>f</sub> = 1 ug/ml
- NF186: 8 pozos → [NF186]<sub>f</sub> = 1 ug/ml

	1 blanc	2 prot	3	4 blanc	5 prot	6 blanc	7 prot	8	9	10	11	12
<b>A</b>	19-222 IgG1	19-222 IgG1		20-022 IgG1	20-022 IgG1	21-2-1495 IgG1	21-2-1495 IgG1		20-2-088 IgG1	20-2-088 IgG1		
<b>B</b>	19-222 IgG2	19-222 IgG2		20-022 IgG2	20-022 IgG2	21-2-1495 IgG2	21-2-1495 IgG2		20-2-088 IgG2	20-2-088 IgG2		
<b>C</b>	19-222 IgG3	19-222 IgG3		20-022 IgG3	20-022 IgG3	21-2-1495 IgG3	21-2-1495 IgG3		20-2-088 IgG3	20-2-088 IgG3		
<b>D</b>	19-222 IgG4	19-222 IgG4		20-022 IgG4	20-022 IgG4	21-2-1495 IgG4	21-2-1495 IgG4		20-2-088 IgG4	20-2-088 IgG4		
<b>E</b>	221-07 IgG1	221-07 IgG1		21-2-94 IgG1	21-2-94 IgG1				136-08 IgG1	136-08 IgG1		
<b>F</b>	221-07 IgG2	221-07 IgG2		21-2-94 IgG2	21-2-94 IgG2				136-08 IgG2	136-08 IgG2		
<b>G</b>	221-07 IgG3	221-07 IgG3		21-2-94 IgG3	21-2-94 IgG3				136-08 IgG3	136-08 IgG3		
<b>H</b>	221-07 IgG4	221-07 IgG4		21-2-94 IgG4	21-2-94 IgG4				136-08 IgG4	136-08 IgG4		

**NF186**   **CNTN1**   **CASPR1**

## Coating Poly-D.Lys (culture slides)

Coating 24 culture slides con Poly-D 1/40 en PBS1x (de stock poly-d 1 mg/ml) → aprox 300 ul por pocillo

**31/08/2021**

---

## ELISA NF186, CNTN1, CASPR1 (subclases)

**Muestras:** tabla página anterior

- NF186: 19-222, 221-07
- CNTN1: 20-022, 21-2-94, 21-2-1495
- CASPR1: 20-2-088, 136-08

**Protocolo:**

- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
- **Bloquear** con leche 5% en PBS-tween 0'1% → 200 ul/pozo, 1 h
- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
- Incubar con los **sueros** diluidos 1/100 en leche 5% en PBS-tween 0'1% → 100 ul/pozo, 1 h
- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
- Incubar con **MAH HRP** IgG1 o IgG2 o IgG3 o IgG4 1/1000 en leche 5% en PBS-tween 0'1% → 100 ul/pozo, 1 h
- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
- Incubar 5min (o hasta que suba el color) con **TMB**: preparar solución un rato antes y tapar de la luz (para que se atempere) → 100 ul/pozo
- Parar la reacción con 50ul de **H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>** 25%
- Leer a 450-620 nm

**Resultado:**

- NF186: **19-222, 221-07** → todo negativo! Repetir con NF140 y probar con NF186 5ug/ml
- CNTN1:
  - **20-022** → IgG4 (OD = 1.085)
  - **21-2-94** → IgG4 (OD 0.777) > IgG1 (OD 0.252) > IgG3 (OD 0.129)
  - **21-2-1495** → IgG4 (OD 1.28)

· CASPR1:

- **20-2-088** → IgG4 (OD 0.968) > IgG1 (OD 0.168)
- **136-08** → IgG3 (OD 0.373) > IgG1 (OD 0.334) > IgG4 (OD 0.226)

	1 blanc	2 prot	3	4 blanc	5 prot	6 blanc	7 prot	8	9	10	11	12
<b>A</b>	0,089	0,089		0,106	0,136	0,77	0,522		0,098	<b>0,266</b>		
<b>B</b>	0,065	0,071		0,066	0,119	0,077	0,095		0,074	0,131		
<b>C</b>	0,065	0,068		0,07	0,094	0,087	0,11		0,068	0,075		
<b>D</b>	0,069	0,074		0,074	<b>1,159</b>	0,078	<b>1,358</b>		0,072	<b>1,04</b>		
<b>E</b>	0,09	0,084		0,077	<b>0,329</b>				0,073	<b>0,407</b>		
<b>F</b>	0,07	0,065		0,076	0,077				0,07	0,071		
<b>G</b>	0,073	0,066		0,062	<b>0,191</b>				0,07	<b>0,443</b>		
<b>H</b>	0,074	0,117		0,08	<b>0,857</b>				0,075	<b>0,301</b>		

**01/09/2021**

Coating células + transfección Culture slides

24 culture slides:

- 16 Perfil
- 5 LRP4
- 2 NF155/CNTN1
- 1 LRP4/CASPR2

**Protocolo:**

- Preparar mezclas transfección → cada culture slide (8 pozos)
  - 2,2 ug DNA + 68 ul Optimem
  - 3,2 ul lipofectamina2000 + 68 ul Optimem
- Juntar y dejar reposar mínimo 5 minutos
- Poner 300 ul de medio HEK a cada pozo
- Poner 120.000 cels (HEK293) a cada pozo
- Poner 17 ul de mezcla de transfección a cada pozo

## ICC Perfil

### Muestras:

- 21-2-1496
- 19-222 (para ver si es positivo por NF140, NF155 y NF186)
- 221-07 (para ver si es positivo por NF140, NF155 y NF186)

## Coating ELISA CASPR1, CNTN1, NF186, NF140 (30.08.21)

Para testar muestras de Interlab Validation

[CASPR1]<sub>i</sub> = 0,43 mg/ml, [CNTN1]<sub>i</sub> = 0,25 mg/ml, [NF186]<sub>i</sub> = 0,16 mg/ml, [NF140]<sub>i</sub> = 0,25 mg/ml

Buffer coating: carbonate-bicarbonato (100 ml agua destilada + 1 pastilla C3041 Sigma)

- CASPR1: 24 pozos → [CASPR1]<sub>f</sub> = 5 ug/ml → 1,2 ml buffer + 14 ul
- CNTN1: 24 pozos → [CNTN1]<sub>f</sub> = 1 ug/ml → 1,2 ml buffer + 4,8 ul
- NF186: 11 pozos → [NF186]<sub>f</sub> = 5 ug/ml → 550 ul buffer + 17,2 ul
- NF140: 11 pozos → [NF140]<sub>f</sub> = 1 ug/ml → 550 ul buffer + 2,2 ul

### PLACA 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	blanc	prot	blanc	prot	blanc	prot	blanc	prot	blanc	prot	blanc	prot
A	20-022	20-022	21-2-94	21-2-94	21-2-1495	21-2-1495	20-2-088	20-2-088	136-08	136-08	¿?	¿?
B	20-022	20-022	21-2-94	21-2-94	21-2-1495	21-2-1495	20-2-088	20-2-088	136-08	136-08	¿?	¿?
C	20-022	20-022	21-2-94	21-2-94	21-2-1495	21-2-1495	20-2-088	20-2-088	136-08	136-08	¿?	¿?
D	20-022	20-022	21-2-94	21-2-94	21-2-1495	21-2-1495	20-2-088	20-2-088	136-08	136-08	¿?	¿?
E	20-022	20-022	21-2-94	21-2-94	21-2-1495	21-2-1495	20-2-088	20-2-088	136-08	136-08	¿?	¿?
F	20-022	20-022	21-2-94	21-2-94	21-2-1495	21-2-1495	20-2-088	20-2-088	136-08	136-08	¿?	¿?
G	20-022	20-022	21-2-94	21-2-94	21-2-1495	21-2-1495	20-2-088	20-2-088	136-08	136-08	¿?	¿?
H	20-022	20-022	21-2-94	21-2-94	21-2-1495	21-2-1495	20-2-088	20-2-088	136-08	136-08	¿?	¿?

**CNTN1**

**CASPR1**

\*Si finalmente no uso los pozos de CASPR1, los guardo congelados

## PLACA 2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	blanc	prot	blanc	prot	blanc	prot	blanc	prot	blanc	prot	blanc	prot
A	19-222 IgG1	19-222 IgG1	19-222 IgG tot	19-222 IgG tot	19-222 IgG1	19-222 IgG1	19-222 IgG tot	19-222 IgG tot				
B	19-222 IgG2	19-222 IgG2	221-07 IgG tot	221-07 IgG tot	19-222 IgG2	19-222 IgG2	221-07 IgG tot	221-07 IgG tot				
C	19-222 IgG3	19-222 IgG3	Cpos IgG tot	Cpos IgG tot	19-222 IgG3	19-222 IgG3	Cpos IgG tot	Cpos IgG tot				
D	19-222 IgG4	19-222 IgG4			19-222 IgG4	19-222 IgG4						
E	221-07 IgG1	221-07 IgG1			221-07 IgG1	221-07 IgG1						
F	221-07 IgG2	221-07 IgG2			221-07 IgG2	221-07 IgG2						
G	221-07 IgG3	221-07 IgG3			221-07 IgG3	221-07 IgG3						
H	221-07 IgG4	221-07 IgG4			221-07 IgG4	221-07 IgG4						

**NF186** **NF140**

### ELISA titulación CNTN1, CASPR1 / subclases NF186, NF140

#### Muestras: tablas

- NF186, NF140: 19-222, 221-07 (subclases)
- CNTN1: 20-022, 21-2-94, 21-2-1495 (titulación con IgGs totales → Luis dice que para homogeneizar es mejor titular todas las muestras con IgGs totales, e indicar cuál es la subclase predominante)
- CASPR1: 20-2-088, 136-08 (titulación con IgGs totales)

#### Protocolo:

- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
- **Bloquear** con leche 5% en PBS-tween 0'1% → 200 ul/pozo, 1 h
- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
- Incubar con los **sueros** diluidos 1/100 en leche 5% en PBS-tween 0'1% → 100 ul/pozo, 1 h
- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%

- Ac secundarios:
  - Titulaciones: Incubar con **RAH IgG HRP** 1/3000 en leche 5% en PBS-tween 0'1% → 100 ul/pozo, 1 h
  - Subclases: Incubar con **MAH HRP** IgG1 o IgG2 o IgG3 o IgG4 1/1000 en leche 5% en PBS-tween 0'1% → 100 ul/pozo, 1 h
- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
- Incubar 5min (o hasta que suba el color) con **TMB**: preparar solución un rato antes y tapar de la luz (para que se atempere) → 100 ul/pozo
- Parar la reacción con 50ul de **H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>** 25%
- Leer a 450-620 nm

### Resultado placa 1:

- CNTN1:
  - **20-022** → título 1/72900
  - **21-2-94** → título 1/24300
  - **21-2-1495** → título 1/24300
- CASPR1:
  - **20-2-088** → título 1/218700
  - **136-08** → título 1/8100

### PLACA 1:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	blanc	prot	blanc	prot	blanc	prot	blanc	prot	blanc	prot	blanc	prot
<b>A</b> 1/100	0,091	<b>1,482</b>	0,115	<b>1,295</b>	0,12	<b>1,308</b>	0,117	<b>1,593</b>	0,068	<b>1,369</b>		
<b>B</b> 1/300	0,069	<b>1,304</b>	0,073	<b>1,24</b>	0,074	<b>1,047</b>	0,091	<b>1,274</b>	0,06	<b>1,034</b>		
<b>C</b> 1/900	0,063	<b>1,011</b>	0,066	<b>0,776</b>	0,065	<b>0,857</b>	0,071	<b>1,066</b>	0,064	<b>0,565</b>		
<b>D</b> 1/2700	0,072	<b>1,236</b>	0,063	<b>0,419</b>	0,063	<b>0,745</b>	0,068	<b>1,131</b>	0,066	<b>0,301</b>		
<b>E</b> 1/8100	0,072	<b>0,677</b>	0,066	<b>0,195</b>	0,059	<b>0,348</b>	0,058	<b>0,67</b>	0,059	<b>0,157</b>		
<b>F</b> 1/24300	0,059	<b>0,387</b>	0,062	<b>0,14</b>	0,057	<b>0,21</b>	0,059	<b>0,384</b>	0,064	0,106		
<b>G</b> 1/72900	0,058	<b>0,171</b>	0,056	0,083	0,068	0,117	0,052	<b>0,21</b>	0,06	0,088		
<b>H</b> 1/218700	0,052	0,094	0,058	0,076	0,059	0,085	0,052	<b>0,115</b>	0,063	0,075		

**CNTN1** **CASPR1**

**Resultado placa 2:**

- NF186 (5 ug/ml):
  - **19-222** → todo negativo (con subclases y con IgG totales)
  - **221-07** → positivo con IgG totales. Aunque las subclases han salido negativas, se intuye que la subclase puede ser IgG4. No titulo la muestra porque será 1/100
  - **Cpos** → ha salido bien (positico con IgGs totales)
- NF140 (1 ug/ml):
  - **19-222** → todo negativo (con subclases y con IgG totales)
  - **221-07** → todo negativo (con subclases y con IgG totales)
  - **Cpos** → ha salido bien (positivo con IgGs totales)

**PLACA 2:**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	blanc	prot	blanc	prot	blanc	prot	blanc	prot	blanc	prot	blanc	prot
<b>A</b>	0,083	0,056	0,097	0,082	0,05	0,05	0,107	0,167				
<b>B</b>	0,053	0,059	0,085	<b>0,199</b>	0,046	0,053	0,093	0,129				
<b>C</b>	0,052	0,052	0,089	<b>1,053</b>	0,053	0,055	0,081	<b>1,126</b>				
<b>D</b>	0,049	0,05			0,058	0,055						
<b>E</b>	0,053	0,055			0,051	0,048						
<b>F</b>	0,055	0,054			0,046	0,051						
<b>G</b>	0,044	0,053			0,047	0,055						
<b>H</b>	0,083	0,137			0,055	0,084						

**NF186** **NF140**

**02/09/2021**

**Recoger culture slides**

- Quitar medio
- Fijar PFA4% 10 min
- Quitar PFA y lavar con PBS1x
- Quitar los pozos del culture slide (con piezas negra y blanca)



- Secar bordes y bloquear
  - \*LRP4 y CASPR2: antes de bloquear, incubar con tritón 0'3% 5 minutos y lavar con PBS1x
- Congelar a -80°C

15/09/2021

### Diferenciación SH-SY5Y (d0)

Sigo el protocolo de Noemí (v2) pero en vez de usar placas de 35mm uso placas de 60mm

**Coating** → preparo 2 placas de 60mm con 200.000 cels/placa (en 4 ml de medio) → para hacer el pase, centrifugar 2min a 1000g.

**Medio de proliferación:**

Basic Media	50 ml	250 ml
E-MEM	20.75	103.75 ml
F-12	20.75	103.75 ml
FBS (15%)	7.5 ml	37.5 ml
Glutamina (Cf= 2mM)	0.5 ml	2.5 ml
Penicillina-Streptomycin (1%)	0.5ml	2.5 ml

### ELISA Gangliósidos día1 (Titulación final IgG y IgM muestras UCB)

Se sigue el protocolo de Immuno (lo hago arriba)

**Muestras** ensayo UCB: confirmación titulaciones IgG y IgM (muestras iniciales) + titulaciones IgG y IgM muestras finales.

- Placa 1 → UCB 9i IgG, UCB 9f IgG
- Placa 2 → UCB 11i IgG, UCB 11f IgG
- Placa 3 → UCB 17i IgG, UCB 17f IgG
- Placa 4 → UCB 29i IgG, UCB 29f IgG
- Placa 5 → UCB 29i IgM, UCB 29f IgM → me equivoco y no lo hago!!!
- Placa 6 → UCB 31i IgM, UCB 31f IgM
- Placa 7 → UCB 32i IgM, UCB 32f IgM
- Placa 8 → Cpos IgG, Cpos IgM

#### Protocolo (breve):

- Descongelar placas con gangliósidos (congeladas día 31.05.21)
- **Bloquear** con PBS-BSA 1 % → 200 ul/pozo, incubar 2h a 4°C
- Lavar 2 veces con PBS
- Preparar diluciones de **sueros** (en PBS-BSA 0'1%) → hacer dil 1/10 del PBS-BSA 1%
  - Dil 1/100: 2'5 ml PBS-BSA 0'1% + 25 ul suero
  - Dil 1/500: 2 ml de PBS-BSA 0'1% + 0'5 ml de la dilución anterior.
  - Dil 1/2500: 2 ml de PBS-BSA 0'1% + 0'5 ml de la dilución anterior.
  - Dil 1/12500: 2 ml de PBS-BSA 0'1% + 0'5 ml de la dilución anterior.
- Poner 100 ul de suero a cada pozo, incubar toda la noche a 4°C

#### Coating placas neuronas DRG

Preparo 10 placas de 60 cc.

- Posar a les plaques **Poly-D-lisina** diluïda 1/40 en PBS → incubar tota la nit a 37°C
  - Poly-D-lisina: stock a 5 µg/µl (afegir 10 ml als 50 mg i congelar a -80°C en alíquotes)
- Dia següent: treure poly-D-lys i afegir **laminina** (2,2 µl/ml PBS, si la laminina està a 1 mg/ml) → incubar mínim 1 hora a 37°C

\*No rento les plaques ni després de la Poly-D ni després de la laminina

**16/09/2021**

---

#### ELISA Gangliósidos día 2 (Titulación final IgG y IgM muestras UCB)

Se sigue el protocolo de Immuno (lo hago arriba)

**Muestras** ensayo UCB: día de antes

#### Protocolo (breve):

- Lavar 4 veces con PBS (2 lavados en cada cubeta)
- Preparar **Ac secundarios**: RAH HRP IgG o IgM dil. 1/3000 en PBS-BSA 0'1%. Poner 100 ul de la dilución a cada pozo, incubar 2h a 4°C
- Lavar 4 veces con PBS (2 lavados en cada cubeta)
- Preparar el **sustrato**: 1 tableta de OPD + 1 tableta de urea hydrogen peroxidase + 20 ml agua destilada (proteger de la luz con papel de aluminio y agitar).  
Poner 100 ul a cada pozo, incubar 40 min a temperatura ambiente
- Parar la reacción añadiendo 50 ul de **H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>** al 25% a cada pozo.
- Leer las placas a 490 – 630

## Extracció y cultivo de neuronas DRG (rata)

S'extreuen a partir d'embrions de rata. Rates Sprague-Dawley embarassades (15 dies de gestació).

Es demanen E15 però s'utilitzen passades 24 hores → el cultiu s'inicia amb E16.

### Extracció de DRGs

#### ➤ Estabulari

- Portar a l'estabulari un tub falcon de 50 ml amb medi L15 (en gel), i material instrumental (tissores, bisturí, pinces...)

#### **Medi L15:**

- 45 ml de medi Leibovitz's
- 5 ml de FBS (10%)
- 50 µl de DNasa (stock a 10 µg/ml)
- Posar a l'animal a la cambra de CO<sub>2</sub> (dins de la campana) → obrir la clau fins al número 2, pujar CO<sub>2</sub> fins al 2 (si no ha pujat), i posar l'isoflurane a 5.
- Treure la rata de la cambra i posar-la sobre una fusta. Punxar-li al cor 1 ml de "Solució inyectable para eutanasia"
- Mullar la rata amb alcohol i obrir per baix (*posada boca amunt*). Tirar dels fetus i posar-los a una placa amb L15.
- Tallar la bossa externa de cada fetus, estirar de la bossa interna i posar-los al tub amb medi L15 (en gel).

#### ➤ Cultius

- Posar tots els fetus a una placa amb el medi L15 i mantenir a sobre del gel.
- Agafar un fetus, posar-lo sobre la placa amb gelatina i mullar-lo amb PBS (estèril i fred, mantingut en gel). *És important anar mullant tota l'estona el fetus amb PBS (no es pot quedar sec).*
- Tallar el cap amb una tisora i clavar el fetus boca baix amb 4 puntes d'agulla a les extremitats.
- Treure els dos tels que envolten la medul·la i treure la medul·la procurant que no es trenqui.
- Treure els ganglis que hagin quedat enganxats a la medul·la i passar-los a una placa amb L15 (no cal que estigui en gel).
- Amb una agulla d'insulina treure cap a fora els DRG de la columna i anar-los passant a la placa amb L15.

### **Purificació dels DRGs**

- Passar els ganglis a un tub de 15 ml → amb pipeta Pasteur de vidre + xumet.
- Centrifugar a 300 rpm 5 minuts
- Eliminar el sobrenedant (amb pipeta+xumet i anar tirant a una placa, per no perdre cap gangli). Posar PBS 1x.
- Centrifugar a 300 rpm 5 minuts
- Eliminar el sobrenedant i afegir 5 ml de → 4'5 ml PBS + 500 µl de tripsina 2,5% sense bromophenol.
- Incubar 15 minuts al bany a 37°C. Homogeneïtzar suaument cada 5 minuts
- Afegir 5 ml de medi L15 per inactivar la tripsina.
- Centrifugar a 300 rpm 10 minuts.
- Passar el pellet a un eppendorf amb 1 ml de medi NG, i disgregar amb una pipeta Pasteur de vidre fina (*es fa més fina la punta amb el bunsen, preparar uns dies abans i autoclavar*). Procurar no fer escuma. Abans d'homogeneïtzar, passar la pipeta Pasteur per FBS per què no es quedin enganxats els ganglis a les parets.

#### **Medi NG:**

- 48 ml de medi Neurobasal
  - 1 ml de suplement B27
  - 500 µl de glutamax
  - 500 µl de Pen-Str
  - 25 µl de NGF
- 
- Passa el ml a un tub de 15 ml amb 5 ml de medi NG.
  - Passar les cèl·lules a les plaques. → Les cèl·lules no es recompten, les proporcions es fan en funció del nombre d'embrions (en aquest cas, faig 12 embrions i faig 10 plaques de 60 cc)

### Diferenciación SH-SY5Y (d1)

Cambiar el medio de proliferación por el medio de diferenciación **1** (añadir RA inmediatamente antes de añadir el medio a las células)

Differentiation media #1	50 ml
EMEM	47.7
FBS (2.5%)	1.3 ml
Glutamina (Cf= 2mM)	0.5 ml
Penicillina-Streptomycin (1%)	0.5ml
10 $\mu$ M RA	Preparar a 1/1000 cada vez que se ponga medio

\*Preparo 8 ml medio dif **1** + 8  $\mu$ l RA (pongo 4 ml/placa)

A partir de ahora, intento diferenciar 2 placas en menos días de los habituales (para que me de tiempo de hacer las ICC antes de la reunión con UCB).

**17/09/2021**

### Cultivo neuronas DRG

- Passades les 24 hores d'incubació del cultiu, canviar la meitat del medi de cada placa per medi NGF (per tal d'eliminar les cèl·lules de la glia).

#### **Medi NGF:**

- 50 ml de medi NG
- 10  $\mu$ l de 5-fluorodesoxiuridina (1)
- 10  $\mu$ l de uridina (2)
- 5  $\mu$ l de AraC 10 mM

### Diferenciación SH-SY5Y (d2)

Cambiar medio (2 placas 60 cc) → medio de diferenciación **1**

\*Preparo 8 ml medio dif **1** + 8  $\mu$ l RA (pongo 4 ml/placa)

20/09/2021

---

### Diferenciación SH-SY5Y (d5)

Cambiar medio (2 placas 60 cc) → medio de diferenciación **1**

\*Preparo 8 ml medio dif **1** + 8 ul RA (pongo 4 ml/placa)

### Cultivo neuronas DRG

72 horas después de iniciar el cultivo, cambiar la mitad del medio de cada placa por medio NG (dilluns) → ya están bien las células para hacer inmunos, pero cambio el medio de las placas que no voy a utilizar hoy.

### Prueba ICC neuronas DRG

#### **Muestras:**

- Cpos IgG (CNTN1+)
- Cneg IgG
- Cpos IgM (IGOS70)
- Cneg IgM

#### **Protocolo:**

- Incubación con el **suero** en placa de 24 pocillos → hacer la dilución del medio con el suero en cada pocillo.

Diluciones del suero:

- Para IgG: 3 µl en 300 µl (1/100)
- Para IgM: 7'5 µl en 300 µl (1/40)

Dejar incubar 1 hora a 37°C

- **Fijado:** vaciar el pocillo y fijar con PFA comercial al 4% 10 min. a temperatura ambiente. (No lavar, ya que tienen poca adherencia y perderíamos células)
- Eliminar el PFA y lavar una vez con PBS 1X.
- Incubación con **anticuerpo secundario:** GAH 488 IgG (o IgM) 1:750 en Goat serum al 5%. Incubar 1h a temperatura ambiente (en caja, cubres hacia arriba)
- Lavar cada cubre con PBS 1x y montarlo sobre un porta con Vectashield.

**Resultado:** las células se ven muy bien! Hacer inmunos

## ICC neuronas DRG

**Muestras:** ensayo UCB

- UCB 1 – UCB 34 (IgG y IgM)
- Cpos IgG (CNTN1+)
- Cneg IgG
- Cpos IgM (IGOS70)
- Cneg IgM

**Protocolo:** Igual que en la prueba del mismo día

**Resultado:** (por un error no se han hecho las muestras 25-30 por IgM)

Muestra	Resultado IgG	Resultado IgM
UCB 1	-	-
UCB 2	-	-
UCB 3	-	-
UCB 4	-	+
UCB 5	+	-
UCB 6	-	-
UCB 7	REP	-
UCB 8	+	+ / ++
UCB 9	-	-
UCB 10	+ / ++	+
UCB 11	+ / ++	-
UCB 12	-	-
UCB 13	-	-
UCB 14	+	-
UCB 15	+ / ++	+
UCB 16	-	+
UCB 17	-	++

Muestra	Resultado IgG	Resultado IgM
UCB 18	+	+
UCB 19	-	-
UCB 20	-	REP
UCB 21	+ / ++	-
UCB 22	+	-
UCB 23	+	+
UCB 24	-	-
UCB 25	+	/
UCB 26	+ / ++	/
UCB 27	-	/
UCB 28	-	/
UCB 29	+	/
UCB 30	-	/
UCB 31	-	-
UCB 32	-	-
UCB 33	+	-
UCB 34	-	-

21/09/2021

### Diferenciación SH-SY5Y (d6)

Cambiar el medio de diferenciación **1** por el medio de diferenciación **2** (añadir RA inmediatamente antes de añadir el medio a las células)

Differentiation media #2	50 ml
EMEM	48.5
FBS (1%)	0.5 ml
Glutamina (Cf= 2mM)	0.5 ml
Penicillina-Streptomycin (1%)	0.5ml
10 $\mu$ M RA	Preparar a 1/1000 cada vez que se ponga medio

\*Preparo 8 ml medio dif **2** + 8  $\mu$ l RA (pongo 4 ml/placa)

### ICC neuronas DRG

**Muestras:** (IgG y IgM)

- **Muestras UCB que faltaban (solo IgM):**
  1. UCB 25
  2. UCB 26
  3. UCB 27
  4. UCB 28
  5. UCB 29
  6. UCB 30
- **Muestras pendientes de pasar (BD): (8 cubres)**
  7. 20-2-405: Rosa Ana Miguel Lacalzada (NHC 1771522)
  8. 21-2-93: Jaime Cerveto (Quirón)
  9. 21-2-1550: Fernando Suárez Miranda (Oviedo)
  10. 21-2-884: Inés Montserrat Meilan Diaz (Basurto)
- **Muestras nuevas base CIDP: (26 cubres)**
  11. CIDP 81: Xia Zhie (NHC 1787443)
  12. CIDP 82: Jose Maria Valero Adan (NHC 1782792)
  13. CIDP 83: Mónica García Pardo (NHC 1820329)
  14. CIDP 84: Teresa Diaz Pedrazas (NHC 841711)
  15. CIDP 85: Katel Voorbraeck Bogaerts (NHC 16916259)
  16. CIDP 86: Laia Conca Campos (NHC 1838178)
  17. CIDP 87: Roberto Alonso Iglesias (NHC 1766236)



18. CIDP 88: Jose Luis Martí Gamundi (NHC 1765197)
19. CIDP 89: Salvador Carranza Gil Dolz del Castell (NHC 1200827)
20. CIDP 90: Jaime Martí Oliver (NHC 1804738)
21. CIDP 91: M.Mercedes Bou Rodríguez (NHC 1362380)
22. CIDP 92: Daniel Asensio Adalid (NHC 179022)
23. CIDP 93: Ramona Jordan Nieto (NHC 1883718)

- Cpos IgG (CNTN1+)
- Cneg IgG
- Cpos IgM (IGOS70)
- Cneg IgM

**Protocolo:** igual que día anterior (20/09/21)

**Resultado:**

Muestra	Resultado IgG	Resultado IgM
UCB 25	/	-
UCB 26	/	-
UCB 27	/	-
UCB 28	/	-
UCB 29	/	++
UCB 30	/	-
20-2-405	-	-
21-2-93	-	-
21-2-1550	+	+
21-2-884	-	-
CIDP 81	+	Rep
CIDP 82	+	Rep
CIDP 83	-	Rep
CIDP 84	+ / ++	-
CIDP 85	-	+ / ++
CIDP 86	-	-
CIDP 87	-	+

Muestra	Resultado IgG	Resultado IgM
CIDP 88	-	-
CIDP 89	+	-
CIDP 90	+ / ++	-
CIDP 91	-	+ / ++
CIDP 92	+ / ++	-
CIDP 93	-	-

22/09/2021

## ICC neuronas DRG

### Muestras:

- **Muestras GBS post-Covid Vall d'Hebron:** (18 cubres: IgG y IgM)

- |                       |             |
|-----------------------|-------------|
| 1. 21-2-768 → BOX 265 | 6. 21-2-773 |
| 2. 21-2-769           | 7. 21-2-774 |
| 3. 21-2-770           | 8. 21-2-775 |
| 4. 21-2-771           | 9. 21-2-776 |
| 5. 21-2-772           |             |

- **Muestras neuralgia amiotrófica (Suiza)** (28 cubres: IgG y IgM)

- |                        |              |
|------------------------|--------------|
| 10. 21-2-099 → BOX 255 | 17. 21-3-108 |
| 11. 21-2-101           | 18. 21-2-109 |
| 12. 21-2-102           | 19. 21-3-110 |
| 13. 21-2-103           | 20. 21-2-111 |
| 14. 21-2-105           | 21. 21-2-112 |
| 15. 21-2-106           | 22. 21-2-113 |
| 16. 21-3-107           | 23. 21-2-114 |

- **Muestras UCB para confirmar**

- |                      |                       |
|----------------------|-----------------------|
| 24. UCB 7i IgG → -   | 37. UCB 21f IgG → +   |
| 25. UCB 7f IgG → -   | 38. UCB 26i IgG → +   |
| 26. UCB 10i IgG → ++ | 39. UCB 26f IgG → -   |
| 27. UCB 10f IgG → ++ | 40. UCB 8i IgM → ++   |
| 28. UCB 11i IgG → ++ | 41. UCB 8f IgM → +    |
| 29. UCB 11f IgG → ++ | 42. UCB 16i IgM → -   |
| 30. UCB 14i IgG → -  | 43. UCB 16f IgM → -   |
| 31. UCB 14f IgG → -  | 44. UCB 17i IgM → ++  |
| 32. UCB 15i IgG → +  | 45. UCB 17f IgM → ++  |
| 33. UCB 15f IgG → +  | 46. UCB 20i IgM → -   |
| 34. UCB 16i IgG → +  | 47. UCB 20f IgM → -   |
| 35. UCB 16f IgG → +  | 48. UCB 29i IgM → ++  |
| 36. UCB 21i IgG → +  | 49. UCB 29f IgM → +++ |

- **Otras muestras para confirmar**

50. CIDP 84 IgG → +

51. CIDP 90 IgG → +

52. CIDP 92 IgG → +

53. CIDP 81 IgM → -

54. CIDP 82 IgM → -

55. CIDP 83 IgM → +

56. CIDP 85 IgM → ++

57. CIDP 91 IgM → +

- Cpos IgG (CNTN1+)
- Cneg IgG
- Cpos IgM (IGOS 70)
- Cneg IgM

Muestra	Resultado IgG	Resultado IgM
21-2-768	+	-
21-2-769	+	-
21-2-770	++	-
21-2-771	-	-
21-2-772	-	-
21-2-773	-	-
21-2-774	++	-
21-2-775	-	-
21-2-776	+ / ++	-
21-2-99	+	-
21-2-101	-	-
21-2-102	+	+++
21-2-103	-	-

Muestra	Resultado IgG	Resultado IgM
21-2-105	-	-
21-2-106	+	-
21-3-107	-	-
21-3-108	-	-
21-2-109	-	-
21-3-110	+	-
21-2-111	+ / ++	+
21-2-112	+ / ++	-
21-2-113	-	-
21-2-114	-	-

**23/09/2021**

### ELISA Gangliósidos día1 (Titulación final IgG y IgM muestras UCB)

Se sigue el protocolo de Immuno (lo hago arriba)

**Muestras** ensayo UCB: confirmación titulaciones IgG y IgM (muestras iniciales) + titulaciones IgG y IgM muestras finales.

- Placa 1 → UCB 9i IgG, UCB 9f IgG
- Placa 2 → UCB 11i IgG, UCB 11f IgG

- Placa 3 → UCB 17i IgG, UCB 17f IgG
- Placa 4 → UCB 29i IgM, UCB 29f IgM
- Placa 5 → UCB 31i IgM, UCB 31f IgM
- Placa 6 → Cpos IgG, Cpos IgM

**Protocolo (breve):**

- Descongelar placas con gangliósidos (congeladas día 31.05.21)
- **Bloquear** con PBS-BSA 1 % → 200 ul/pozo, incubar 2h a 4°C
- Lavar 2 veces con PBS
- Preparar diluciones de **sueros** (en PBS-BSA 0'1%) → hacer dil 1/10 del PBS-BSA 1%
  - Dil 1/100: 2'5 ml PBS-BSA 0'1% + 25 ul suero
  - Dil 1/500: 2 ml de PBS-BSA 0'1% + 0'5 ml de la dilución anterior.
  - Dil 1/2500: 2 ml de PBS-BSA 0'1% + 0'5 ml de la dilución anterior.
  - Dil 1/12500: 2 ml de PBS-BSA 0'1% + 0'5 ml de la dilución anterior.
- Poner 100 ul de suero a cada pozo, incubar toda la noche a 4°C

**24/09/2021**

---

**ELISA Gangliósidos día 2 (Titulación final IgG y IgM muestras UCB)**

Se sigue el protocolo de Immuno (lo hago arriba)

**Muestras** ensayo UCB: día de antes

**Protocolo (breve):**

- Lavar 4 veces con PBS (2 lavados en cada cubeta)
- Preparar **Ac secundarios**: RAH HRP IgG o IgM dil. 1/3000 en PBS-BSA 0'1%. Poner 100 ul de la dilución a cada pozo, incubar 2h a 4°C
- Lavar 4 veces con PBS (2 lavados en cada cubeta)
- Preparar el **sustrato**: 1 tableta de OPD + 1 tableta de urea hydrogen peroxidase + 20 ml agua destilada (proteger de la luz con papel de aluminio y agitar).  
Poner 100 ul a cada pozo, incubar 40 min a temperatura ambiente
- Parar la reacción añadiendo 50 ul de **H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>** al 25% a cada pozo.
- Leer las placas a 490 – 630

### Diferenciación SH-SY5Y (d9)

Cambiar medio (2 placas 60 cc) → medio de diferenciación **2**

\*Preparo 8 ml medio dif **2** + 8 ul RA (pongo 4 ml/placa)

**27/09/2021**

### Coating Laminina (dif SH-SY5Y)

Coating de 2 placas de 60mm con 26 cubres 9 mm → laminina 10 ug/ml en PBS

Dejar overnight a 37°C

### Coating ELISA CASPR1

Preparo 2 placas.

[CASPR1]<sub>i</sub> = 0,43 mg/ml

Buffer coating: carbonate-bicarbonato (100 ml agua destilada + 1 pastilla C3041 Sigma)

· CASPR1: 96 pozos → [CASPR1]<sub>f</sub> = 5 ug/ml → 58,2 ul CASPR1 + 5 ml Buffer

**28/09/2021**

### Diferenciación SH-SY5Y (d13)

Cambiar el medio de diferenciación **2** por el medio de diferenciación **3** (añadir RA inmediatamente antes de añadir el medio a las células)

<b>Differentiation media #3</b>	<b>50 ml</b>
Neurobasal	47.1
B-27 (1x)	1 ml (50X stock)
KCl 20mM	1 ml (1M stock)
Glutamax (1X)	0.5 ml (100x stock)
50ng/mlBDNF	250µl BDNF (stock 10µg/ml)
2mM db-AMPC	100µl db AMP(1M stock)
Penicillina-Streptomycin (1%)	0.5ml
10 µM RA	Preparar a 1/1000 cada vez que se ponga medio

\*el KCl lo tiene Noemí preparado en su caja de la nevera. El B-27, BDNF y db-AMPC están a -20°C de cultivos (también hay una alícuota de RA) → preparo BDNF y db-AMPC según protocolo

\*Preparo 8 ml medio dif 3 + 8 ul RA (pongo 4 ml/placa)

**30/09/2021**

### Diferenciación SH-SY5Y (d15)

Las células están mal!!!! Tiro las dos placas!!! La próxima vez seguir exactamente el mismo protocolo (los mismos días) que la diferenciación del 09/08/21 al 25/08/21

**04/10/2021**

### Coating Poly-D.Lys (culture slides)

Coating 18 culture slides con Poly-D 1/40 en PBS1x (de stock poly-d 1 mg/ml) → aprox 300 ul por pocillo

### Diferenciación SH-SY5Y (d0)

Sigo el protocolo de Noemí (v2) pero en vez de usar placas de 35mm uso placas de 60mm

**Coating** → preparo 4 placas de 60mm con 200.000 cels/placa (en 4 ml de medio) → para hacer el pase, centrifugar 2min a 1000g.

**Medio de proliferación:**

Basic Media	50 ml	250 ml
E-MEM	20.75	103.75 ml
F-12	20.75	103.75 ml
FBS (15%)	7.5 ml	37.5 ml
Glutamina (Cf= 2mM)	0.5 ml	2.5 ml
Penicillina-Streptomycin (1%)	0.5ml	2.5 ml

**05/10/2021**

### Coating células + transfección Culture slides

Finalmente hago 12 culture slides porque no me llegan las células (guardo los otros 6 secos en el incubador para ver si esta semana los puedo usar)

- 12 Perfil

**Protocolo:**

- Preparar mezclas transfección → cada culture slide (8 pozos)
  - 2,2 ug DNA + 68 ul Optimem
  - 3,2 ul lipofectamina2000 + 68 ul Optimem
- Juntar y dejar reposar mínimo 5 minutos
- Poner 300 ul de medio HEK a cada pozo
- Poner 120.000 cels (HEK293) a cada pozo → en este caso pongo sólo 70.000 en cada pozo (no tengo más cels)
- Poner 17 ul de mezcla de transfección a cada pozo

**ICC Perfil CIDP**

Culture slides transfectadas día 25/08/21

Muestras y resultado:

- **21-2-1617** → todo negativo
- **21-2-1618** → NF155 positivo
- **21-2-1619** → CNTN1 positivo
- **21-2-1620** → CNTN1 positivo muy muy leve (sólo las más positivas)
- **21-2-1621** → todo negativo
- **Cpos**

**Diferenciación SH-SY5Y (d1)**

Cambiar el medio de proliferación por el medio de diferenciación **1** (añadir RA inmediatamente antes de añadir el medio a las células)

<b>Differentiation media #1</b>	<b>50 ml</b>
EMEM	47.7
FBS (2.5%)	1.3 ml
Glutamina (Cf= 2mM)	0.5 ml
Penicillina-Streptomycin (1%)	0.5ml
10 µM RA	Preparar a 1/1000 cada vez que se ponga medio

\*Preparo 16 ml medio dif **1** + 16 ul RA (pongo 4 ml/placa)

## Coating ELISA CASPR1, CNTN1, NF155

Para testar muestras de Bélgica (Alicia)

[CASPR1]<sub>i</sub> = 0,43 mg/ml, [CNTN1]<sub>i</sub> = 0,25 mg/ml, [NF155]<sub>i</sub> = 0,2 mg/ml

Buffer coating: carbonate-bicarbonato (100 ml agua destilada + 1 pastilla C3041 Sigma)

- CASPR1: 7 pozos → [CASPR1]<sub>f</sub> = 5 ug/ml → 350 ul buffer + 4 ul
- CNTN1: 14 pozos → [CNTN1]<sub>f</sub> = 1 ug/ml → 700 ul buffer + 2,8 ul
- NF155: 12 pozos → [NF155]<sub>f</sub> = 1 ug/ml → 600 ul buffer + 3 ul

	1 (blanc)	2 (prot)	3	4 (blanc)	5 (prot)	6 (blanc)	7 (prot)	8	9 (blanc)	10 (prot)	11 (blanc)	12 (prot)
<b>A</b>	21-2-1617	21-2-1617		21-2-1618 1/100	21-2-1618 1/100	21-2-1618 IgG1	21-2-1618 IgG1		21-2-1619 1/100	21-2-1619 1/100	21-2-1620 1/100	21-2-1620 1/100
<b>B</b>	21-2-1618	21-2-1618		21-2-1618 1/300	21-2-1618 1/300	21-2-1618 IgG2	21-2-1618 IgG2		21-2-1619 1/300	21-2-1619 1/300	21-2-1620 1/300	21-2-1620 1/300
<b>C</b>	21-2-1619	21-2-1619		21-2-1618 1/900	21-2-1618 1/900	21-2-1618 IgG3	21-2-1618 IgG3		21-2-1619 1/900	21-2-1619 1/900	21-2-1620 1/900	21-2-1620 1/900
<b>D</b>	21-2-1620	21-2-1620		21-2-1618 1/2700	21-2-1618 1/2700	21-2-1618 IgG4	21-2-1618 IgG4		21-2-1619 1/2700	21-2-1619 1/2700	21-2-1620 1/2700	21-2-1620 1/2700
<b>E</b>	21-2-1621	21-2-1621		21-2-1618 1/8100	21-2-1618 1/8100				21-2-1619 1/8100	21-2-1619 1/8100	21-2-1620 1/8100	21-2-1620 1/8100
<b>F</b>	Cpos	Cpos		21-2-1618 1/24300	21-2-1618 1/24300				21-2-1619 1/24300	21-2-1619 1/24300	21-2-1620 1/24300	21-2-1620 1/24300
<b>G</b>	Cneg	Cneg		Cpos	Cpos				Cpos	Cpos		
<b>H</b>				Cneg	Cneg				Cneg	Cneg		

**CASPR1** **NF155** **CNTN1**

06/10/2021

### Recoger culture slides

- Quitar medio
- Fijar PFA4% 10 min
- Quitar PFA y lavar con PBS1x
- Quitar los pozos del culture slide (con piezas negra y blanca)
- Secar bordes y bloquear



## ELISA screening CASPR1 / titulación CNTN1, NF155 / subclases NF155

### Muestras: tablas

- CASPR1: 21-2-1617, 1618, 1618, 1619, 1620, 1621 (screening)
- NF155: 21-2-1618 (titulación con IgGs totales y subclases a 1/100)
- CNTN1: 21-2-1619, 1620 (titulación con IgGs totales, la subclase ya se hizo y era IgG4)

### Protocolo:

- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
- **Bloquear** con leche 5% en PBS-tween 0'1% → 200 ul/pozo, 1 h
- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
- Incubar con los **sueros** diluidos 1/100 en leche 5% en PBS-tween 0'1% → 100 ul/pozo, 1 h
  - Titulación: preparar un tubo con 400 ul de suero diluido 1/100 en leche 5%, y poner en 5 tubos 280 ul de leche 5%. Pasar 140 ul de dilución del primer tubo al 2º tubo, y así sucesivamente hasta obtener las 6 diluciones (1/100, 1/300, 1/900, 1/2700, 1/8100 i 1/24300)
- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
- Ac secundarios:
  - Titulaciones: Incubar con **RAH IgG HRP** 1/3000 en leche 5% en PBS-tween 0'1% → 100 ul/pozo, 1 h
  - Subclases: Incubar con **MAH HRP** IgG1 o IgG2 o IgG3 o IgG4 1/1000 en leche 5% en PBS-tween 0'1% → 100 ul/pozo, 1 h
- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
- Incubar 5min (o hasta que suba el color) con **TMB**: preparar solución un rato antes y tapar de la luz (para que se atempere) → 100 ul/pozo
- Parar la reacción con 50ul de **H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>** 25%
- Leer a 450-620 nm

### Resultado:

- CASPR1:
  - **21-2-1617** → neg
  - **21-2-1618** → neg
  - **21-2-1619** → neg
  - **21-2-1620** → neg
  - **21-2-1621** → neg

- NF155:
  - **21-2-1618** → subclase IgG4. Título 1/2700 (IgG totales)
- CNTN1:
  - **21-2-1619** → repetir titulación
  - **21-2-1620** → repetir titulación (a priori parece 1/100)

	1 (blanc)	2 (prot)	3	4 (blanc)	5 (prot)	6 (blanc)	7 (prot)	8	9 (blanc)	10 (prot)	11 (blanc)	12 (prot)
<b>A</b>	0,094	0,077	0	0,175	0,749	0,066	0,057	0	0,127	0,486	0,141	0,404
<b>B</b>	0,124	0,155	0	0,146	0,746	0,133	0,118	0	0,152	0,265	0,286	0,277
<b>C</b>	0,117	0,147	0	0,1	0,431	0,192	0,125	0	0,104	0,259	0,108	0,209
<b>D</b>	0,159	0,105	0	0,119	0,292	0,071	0,922	0	0,114	0,158	0,165	0,189
<b>E</b>	0,12	0,13	0	0,159	0,236	0	0	0	0,146	0,327	0,258	0,168
<b>F</b>	0,113	0,903	0	0,163	0,169	0	0	0	0,169	0,127	0,142	0,133
<b>G</b>	0,096	0,095	0	0,176	0,899	0	0	0	0,176	0,718	0	0
<b>H</b>	0	0	0	0,181	0,21	0	0	0	0,174	0,152	0	0

**CASPR1** **NF155** **CNTN1**

**07/10/2021**

### ICC Perfil CIDP

Culture slides transfectadas día 25/08/21

Muestras y resultado:

- **21-2-1628** → todo negativo
- **21-2-1630** → CNTN1 positivo
- **21-2-1631** → NF140/NF155/NF186 positivo muy débil
- **21-2-1632** → NF140/NF155/NF186 muy positivo
- **21-2-1633** → todo negativo
- **Cpos**

## Coating ELISA CNTN1, NF140, NF155, NF186

[CNTN1]<sub>i</sub> = 0,25 mg/ml, [NF140]<sub>i</sub> = 0,25 mg/ml, [NF155]<sub>i</sub> = 0,25 mg/ml, [NF186]<sub>i</sub> = 0,16 mg/ml

Buffer coating: carbonate-bicarbonato (100 ml agua destilada + 1 pastilla C3041 Sigma)

- CNTN1: 24 pozos → [CNTN1]<sub>f</sub> = 1 ug/ml → 1,2 ml buffer + 4,8 ul
- NF140: 4 pozos → [NF140]<sub>f</sub> = 1 ug/ml → 200 ul buffer + 0,8 ul
- NF155: 4 pozos → [NF155]<sub>f</sub> = 1 ug/ml → 200 ul buffer + 0,8 ul
- NF186: 4 pozos → [NF186]<sub>f</sub> = 1 ug/ml → 200 ul buffer + 1,25 ul

	1 blanc	2 prot	3 blanc	4 prot	5 blanc	6 prot	7 blanc	8 prot	9 blanc	10 prot	11 blanc	12 prot
<b>A</b>	1619 1/100	1619 1/100	1620 1/100	1620 1/100	1630 1/100	1630 1/100	1630 IgG1	1630 IgG1	1631	1631	1631	1631
<b>B</b>	1619 1/300	1619 1/300	1620 1/300	1620 1/300	1630 1/300	1630 1/300	1630 IgG2	1630 IgG2	1632	1632	1632	1632
<b>C</b>	1619 1/900	1619 1/900	1620 1/900	1620 1/900	1630 1/900	1630 1/900	1630 IgG3	1630 IgG3	Cpos	Cpos	Cpos	Cpos
<b>D</b>	1619 1/2700	1619 1/2700	1620 1/2700	1620 1/2700	1630 1/2700	1630 1/2700	1630 IgG4	1630 IgG4	Cneg	Cneg	Cneg	Cneg
<b>E</b>	1619 1/8100	1619 1/8100	1620 1/8100	1620 1/8100	1630 1/8100	1630 1/8100			1631	1631		
<b>F</b>	1619 1/24300	1619 1/24300	1620 1/24300	1620 1/24300	1630 1/24300	1630 1/24300			1632	1632		
<b>G</b>	Cpos	Cpos							Cpos	Cpos		
<b>H</b>	Cneg	Cneg							Cneg	Cneg		

**CNTN1** **NF140** **NF155** **NF186**

08/10/2021

### Diferenciación SH-SY5Y (d4)

Cambiar medio (4 placas 60 cc) → medio de diferenciación **1**

\*Preparo 16 ml medio dif **1** + 16 ul RA (pongo 4 ml/placa)

## ELISA titulación CNTN1 / subclases CNTN1 / comprobación NF140, NF155, NF186

### Muestras: tablas

- CNTN1:
  - 21-2-1619 y 21-2-1620: titulación con IgGs totales, la subclase ya se hizo y era IgG4
  - 21-2-1630: titulación con IgGs totales, y subclases
- NF140, NF155, NF186:
  - 21-2-1631: confirmar positividad
  - 21-2-1632: confirmar positividad

### Protocolo:

- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
- **Bloquear** con leche 5% en PBS-tween 0'1% → 200 ul/pozo, 1 h
- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
- Incubar con los **sueros** diluidos 1/100 en leche 5% en PBS-tween 0'1% → 100 ul/pozo, 1 h
  - Titulación: preparar un tubo con 400 ul de suero diluido 1/100 en leche 5%, y poner en 5 tubos 280 ul de leche 5%. Pasar 140 ul de dilución del primer tubo al 2º tubo, y así sucesivamente hasta obtener las 6 diluciones (1/100, 1/300, 1/900, 1/2700, 1/8100 i 1/24300)
- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
- Ac secundarios:
  - Titulaciones y screening: Incubar con **RAH IgG HRP** 1/3000 en leche 5% en PBS-tween 0'1% → 100 ul/pozo, 1 h
  - Subclases: Incubar con **MAH HRP** IgG1 o IgG2 o IgG3 o IgG4 1/1000 en leche 5% en PBS-tween 0'1% → 100 ul/pozo, 1 h
- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
- Incubar 5min (o hasta que suba el color) con **TMB**: preparar solución un rato antes y tapar de la luz (para que se atempere) → 100 ul/pozo
- Parar la reacción con 50ul de **H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>** 25%
- Leer a 450-620 nm

	1 blanc	2 prot	3 blanc	4 prot	5 blanc	6 prot	7 blanc	8 prot	9 blanc	10 prot	11 blanc	12 prot
<b>A</b>	0,116	<b>0,524</b>	0,162	0,178	0,19	0,201	0,08	0,079	0,177	<b>0,408</b>	0,13	<b>0,28</b>
<b>B</b>	0,115	<b>0,346</b>	0,122	0,129	0,131	0,167	0,104	0,143	0,129	<b>0,987</b>	0,147	<b>1,098</b>
<b>C</b>	0,112	0,216	0,134	0,196	0,131	0,135	0,106	0,086	0,147	<b>0,734</b>	0,167	<b>0,816</b>
<b>D</b>	0,138	0,169	0,153	0,127	0,102	0,142	0,084	0,16	0,163	0,151	0,131	0,132
<b>E</b>	0,127	0,134	0,171	0,144	0,138	0,1	0	0	0,15	0,291	0	0
<b>F</b>	0,115	0,115	0,101	0,112	0,1	<b>0,331</b>	0	0	0,162	<b>0,964</b>	0	0
<b>G</b>	0,161	<b>0,523</b>	0	0	0	0	0	0	0,149	<b>0,996</b>	0	0
<b>H</b>	0,131	0,11	0	0	0	0	0	0	0,128	0,172	0	0

**CNTN1** **NF140** **NF155** **NF186**

**Resultado:**

- CNTN1:
  - **21-2-1619** → título 1/300 (IgGs totales)
  - **21-2-1620** → negativo
  - **21-2-1630** → negativo (tanto en IgGs totales como en subclases) → repetir porque no cuadra con lo visto en la ICC (además en el pozo F parece positivo)
- NF140:
  - **21-2-1631** → positivo → titular!
  - **21-2-1632** → positivo → titular!
- NF155:
  - **21-2-1631** → negativo (justito) → titular solo 1/100 y 1/300
  - **21-2-1632** → positivo → titular!
- NF186:
  - **21-2-1631** → positivo → titular!
  - **21-2-1632** → positivo → titular!

11/10/2021

---

### Diferenciación SH-SY5Y (d7)

Cambiar el medio de diferenciación **1** por el medio de diferenciación **2** (añadir RA inmediatamente antes de añadir el medio a las células)

Differentiation media #2	50 ml
EMEM	48.5
FBS (1%)	0.5 ml
Glutamina (Cf= 2mM)	0.5 ml
Penicillina-Streptomycin (1%)	0.5ml
10 $\mu$ M RA	Preparar a 1/1000 cada vez que se ponga medio

\*Preparo 16 ml medio dif **1** + 16 ul RA (pongo 4 ml/placa)

### Coating Laminina (dif SH-SY5Y)

Coating de 4 placas de 60mm con 26 cubres 9 mm  $\rightarrow$  laminina 10  $\mu$ g/ml en PBS

Dejar overnight a 37°C (en este caso lo dejaré 2 días porque el día 12/10 es fiesta)

13/10/2021

---

### Diferenciación SH-SY5Y (d9)

Transferir las células a las placas coated con laminina (primero quitar laminina, no lavar):

- Añadir 400 ul de tripsina a cada placa e incubar 2-3 minutos
- Añadir 4 ml de medio de diferenciación **2**\*
- Combinar las células de las 4 placas en un único tubo de 15 ml y disgregar bien las células.
- Poner 4 ml de la suspensión a cada placa (con cubres)

\*Preparo 16 ml medio dif **2** + 16 ul RA (pongo 4 ml/placa)

### Coating HEKs y transfección (FLOT1/2)

Por la tarde!!! Hago la transfección reversa para ganar un día.

- 4 placas 60mm con 26 cubres de 9mm  $\rightarrow$  coating Poly-D 1/40 1h a 37°C  $\rightarrow$  planto 1 millón de cels/placa
- Preparar mezclas transfección:

- 6 ug FLOT1 + 3 ug FLOT2 + 250 ul Optimem / placa
- 12 ul lipofectamina2000 + 250 ul Optimem / placa
- Juntar y dejar reposar mínimo 5 minutos
- Añadir la mezcla de transfección a las células (placa 60mm: 500 ul)

### Coating Poly-D.Lys (culture slides)

Coating 18 culture slides con Poly-D 1/40 en PBS1x (de stock poly-d 1 mg/ml) → aprox 300 ul por pocillo

**14/10/2021**

### Diferenciación SH-SY5Y (d10)

Cambiar el medio de diferenciación **2** por el medio de diferenciación **3** (añadir RA inmediatamente antes de añadir el medio a las células)

Differentiation media #3	50 ml
Neurobasal	47.1
B-27 (1x)	1 ml (50X stock)
KCl 20mM	1 ml (1M stock)
Glutamax (1X)	0.5 ml (100x stock)
50ng/mlBDNF	250µl BDNF (stock 10µg/ml)
2mM db-AMPC	100µl db AMP(1M stock)
Penicillina-Streptomycin (1%)	0.5ml
10 µM RA	Preparar a 1/1000 cada vez que se ponga medio

\*el KCl lo tiene Noemí preparado en su caja de la nevera. El B-27, BDNF y db-AMPC están en su caja del congelador -20°C de cultivos (también hay una alícuota de RA)

\*En este caso uso medio preparado la última vez

\*Preparo 16 ml medio dif **3** + 16 ul RA (pongo 4 ml/placa)

## Coating células + transfección Culture slides

Finalmente hago 24 culture slides → uso los 18 que tengo coated del día anterior, y los 6 CS que guardé en la nevera (secos) la semana anterior

- 24 Perfil

### **Protocolo:**

- Preparar mezclas transfección → cada culture slide (8 pozos)
  - 2,2 ug DNA + 68 ul Optimem
  - 3,2 ul lipofectamina2000 + 68 ul Optimem
- Juntar y dejar reposar mínimo 5 minutos
- Poner 300 ul de medio HEK a cada pozo
- Poner 120.000 cels (HEK293) a cada pozo
- Poner 17 ul de mezcla de transfección a cada pozo

**15/10/2021**

---

## Diferenciación SH-SY5Y (d11)

Cambiar medio (4 placas 60 cc) → medio de diferenciación **3**

\*En este caso, cambio solo la mitad del medio → Preparo 8 ml medio dif **3** + 8 ul RA (pongo 4 ml/placa)

## Recoger culture slides

- Quitar medio
- Fijar PFA4% 10 min
- Quitar PFA y lavar con PBS1x
- Quitar los pozos del culture slide (con piezas negra y blanca)
- Secar bordes y bloquear

## Recoger placas 60mm FLOT1/2

\*A primera hora de la mañana

- Quitar medio y fijar con PFA4% 10 min
- Lavar con PBS1x
- Bloquear 1h con Goat 5 %
- Congelar a -80°C



## ICC Perfil (interlab validation)

**Muestras:** 1-19

**Resultado:**

- 7 → NF140, NF155, NF186 +
- 11 → NF155, NF186 + débil, NF140 + dudoso
- 15 → NF155 muy +
- 16 → NF155 + débil
- El resto de muestras son negativas

**18/10/2021**

---

## Diferenciación SH-SY5Y (d14)

Tocaría cambiar medio (4 placas 60 cc) → medio de diferenciación **3**, pero durante el fin de semana se han despegado todas las células de los cubres!!!! El viernes estaban bien.

Entre los cubres sí que estaban las células bien pegadas y diferenciadas, cambiar de laminina?

## Prueba ICC FLOT1/2

Comprovación transfección día 15/10/21

**Protocolo:**

- Suero EM-163 y Cneg dil. 1/10 en Goat Serum 5% (1h)
- 3 lavados PBS1x
- Ac anti-FLOT 1 (1/300) en Goat Serum 5 % (1h)
- 3 lavados PBS1x
- GAR488 IgG + GAH594 IgG (1/500) en Goat Serum 5 % (1h)
- 3 lavados PBS1x
- Montar con Fluoromount

**Resultado:** Ha salido bien, pero hacer las titulaciones sin Ac anti-FLOT1 (hay un poco de cruce de canal)

## ICC Perfil (interlab validation)

Muestras: 20-38

Resultado:

- 22 → NF155+
- 23 → NF155+ (creo que se pueden haber juntado los dos sueros al incubarlos en el CS, si hay dudas después del ELISA, repetir ICC)
- 33 → NF155 muy +
- 34 → NF155 +
- 36 → CNTN1 + débil
- 37 → CNTN1 +

## Coating ELISA CNTN1, NF140, NF155

[CNTN1]<sub>i</sub> = 0,25 mg/ml, [NF140]<sub>i</sub> = 0,25 mg/ml, [NF155]<sub>i</sub> = 0,25 mg/ml

Buffer coating: carbonate-bicarbonato (100 ml agua destilada + 1 pastilla C3041 Sigma)

- CNTN1: 2 pozos → [CNTN1]<sub>f</sub> = 1 ug/ml → 100 ul buffer + 0,4 ul
- NF140: 22 pozos → [NF140]<sub>f</sub> = 1 ug/ml → 1,1 ml buffer + 4,4 ul
- NF155: 22 pozos → [NF155]<sub>f</sub> = 1 ug/ml → 1,1 ml buffer + 4,4 ul

	1 blanc	2 prot	3 blanc	4 prot	5 blanc	6 prot	7 blanc	8 prot	9 blanc	10 prot	11 blanc	12 prot
<b>A</b>	1631 1/100	1631 1/100	1631 1/100	1631 1/100	1632 1/100	1632 1/100	1632 1/100	1632 1/100	1632 lgG1	1632 lgG1	1632 lgG1	1632 lgG1
<b>B</b>	1631 1/300	1631 1/300	1631 1/300	1631 1/300	1632 1/300	1632 1/300	1632 1/300	1632 1/300	1632 lgG2	1632 lgG2	1632 lgG2	1632 lgG2
<b>C</b>	1631 1/900	1631 1/900	1631 1/900	1631 1/900	1632 1/900	1632 1/900	1632 1/900	1632 1/900	1632 lgG3	1632 lgG3	1632 lgG3	1632 lgG3
<b>D</b>	1631 1/2700	1631 1/2700	1631 1/2700	1631 1/2700	1632 1/2700	1632 1/2700	1632 1/2700	1632 1/2700	1632 lgG4	1632 lgG4	1632 lgG4	1632 lgG4
<b>E</b>	1631 1/8100	1631 1/8100	1631 1/8100	1631 1/8100	1632 1/8100	1632 1/8100	1632 1/8100	1632 1/8100	1631 lgG1	1631 lgG1	1631 lgG1	1631 lgG1
<b>F</b>	1631 1/24300	1631 1/24300	1631 1/24300	1631 1/24300	1632 1/24300	1632 1/24300	1632 1/24300	1632 1/24300	1631 lgG2	1631 lgG2	1631 lgG2	1631 lgG2
<b>G</b>	Cpos	Cpos	Cpos	Cpos			1630	1630	1631 lgG3	1631 lgG3	1631 lgG3	1631 lgG3
<b>H</b>	Cneg	Cneg	Cneg	Cneg			Cpos	Cpos	1631 lgG4	1631 lgG4	1631 lgG4	1631 lgG4

**CNTN1** **NF140** **NF155**

19/10/2021

## ICC FLOT1/2 (titulaciones)

Cels transfectadas día 15/10/21

### **Muestras (FLOT1/2 +):**

- |   |   |
|---|---|
| 1) EM-158 1/10 → +                        | 16) EM-316 1/300 → -?                     |
| 2) EM-158 1/50 → +                        | 17) 1347111 T2 1/10 → -?                  |
| 3) EM-158 1/100 → +                       | 18) 1347111 T2 1/50 → -                   |
| 4) EM-158 1/300 → +                       | 19) EM-247 1/10 (sacar nueva muestra) → + |
| 5) EM-163 1/10 → +                        | 20) EM-247 1/50 → repetir                 |
| 6) EM-163 1/50 → +                        | 21) EM-307 1/10 → +                       |
| 7) EM-163 1/100 → +                       | 22) EM-307 1/100 → +                      |
| 8) EM-163 1/300 → +                       | 23) EM-307 1/300 → +                      |
| 9) EM-390 1/10 → + débil                  | 24) EM-397 1/10 → +                       |
| 10) EM-390 1/50 → + débil                 | 25) EM-397 1/300 → +                      |
| 11) EM-223 1/10 (sacar nueva muestra) → - | 26) 1668530 T2 1/10 → +                   |
| 12) EM-223 1/50 → -                       | 27) 1668530 T2 1/100 → +                  |
| 13) EM-316 1/10 → +                       | 28) 1668530 T2 1/300 → +                  |
| 14) EM-316 1/50 → +                       | 29) Cneg 1/10 → -                         |
| 15) EM-316 1/100 → +                      |   |

### **Protocolo:**

- Suero dil. en Goat Serum 5% (1h)
- 3 lavados PBS1x
- GAH594 IgG (1/500) en Goat Serum 5 % (1h)
- 3 lavados PBS1x
- Montar con Fluoromount

**Resultado** → arriba. El día siguiente Marta hace algunas ICC para seguir titulando estas muestras pero no salen del todo bien. Repetir haciendo diluciones seriadas (1/10, 1/50, 1/250, 1/1250, 1/6250)

### Coating Poly-D.Lys (culture slides)

Coating 12 culture slides con Poly-D 1/40 en PBS1x (de stock poly-d 1 mg/ml) → aprox 300 ul por pocillo

### ICC Perfil (interlab validation)

**Muestras:** 39-57

**Resultado:**

- 39 → NF155 + débil
- 48 → NF155 +
- 50 → NF155 +
- 51 → NF155 + débil?
- 53 → NF155 +
- 54 → CNTN1 + débil
- 57 → NF155 +

### ELISA titulación NF140, NF155 / subclases NF140, NF155 / comprobación CNTN1

**Muestras:** tablas

- CNTN1:
  - 21-2-1630: confirmar positividad
- NF140, NF155:
  - 21-2-1631: titular + subclases
  - 21-2-1632: titular + subclases

**Protocolo:**

- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
- **Bloquear** con leche 5% en PBS-tween 0'1% → 200 ul/pozo, 1 h
- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
- Incubar con los **sueros** diluidos 1/100 en leche 5% en PBS-tween 0'1% → 100 ul/pozo, 1 h
  - Titulación: preparar un tubo con 400 ul de suero diluido 1/100 en leche 5%, y poner en 5 tubos 280 ul de leche 5%. Pasar 140 ul de dilución del primer tubo al 2º tubo, y así sucesivamente hasta obtener las 6 diluciones (1/100, 1/300, 1/900, 1/2700, 1/8100 i 1/24300)

- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
- Ac secundarios:
  - Titulaciones y screening: Incubar con **RAH IgG HRP** 1/3000 en leche 5% en PBS-tween 0'1% → 100 ul/pozo, 1 h
  - Subclases: Incubar con **MAH HRP** IgG1 o IgG2 o IgG3 o IgG4 1/1000 en leche 5% en PBS-tween 0'1% → 100 ul/pozo, 1 h
- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
- Incubar 5min (o hasta que suba el color) con **TMB**: preparar solución un rato antes y tapar de la luz (para que se atempere) → 100 ul/pozo
- Parar la reacción con 50ul de **H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>** 25%
- Leer a 450-620 nm

	1 blanc	2 prot	3 blanc	4 prot	5 blanc	6 prot	7 blanc	8 prot	9 blanc	10 prot	11 blanc	12 prot
<b>A</b>	0,127	0,448	0,095	0,323	0,096	0,656	0,107	0,691	0,068	0,159	0,073	0,132
<b>B</b>	0,1	0,21	0,097	0,165	0,118	0,746	0,1	0,539	0,101	0,092	0,093	0,099
<b>C</b>	0,07	0,168	0,087	0,11	0,099	0,546	0,127	0,445	0,088	0,463	0,086	0,396
<b>D</b>	0,068	0,128	0,082	0,085	0,091	0,308	0,106	0,262	0,075	0,355	0,089	0,245
<b>E</b>	0,072	0,114	0,083	0,095	0,098	0,169	0,074	0,153	0,083	0,085	0,085	0,11
<b>F</b>	0,068	0,083	0,075	0,081	0,077	0,137	0,082	0,132	0,108	0,087	0,087	0,112
<b>G</b>	0,064	0,513	0,097	0,78	0,077	0,047	0,101	0,796	0,089	0,125	0,093	0,141
<b>H</b>	0,204	0,15	0,101	0,14	0,057	0,047	0,103	0,958	0,071	0,099	0,102	0,11

**CNTN1** **NF140** **NF155**

#### Resultado:

- NF140:
  - **21-2-1631** → título 1/900 (IgG totales). Subclases: no ha salido!!
  - **21-2-1632** → título 1/2700 (IgG totales). Subclases: IgG3>IgG4
- NF155:
  - **21-2-1631** → título 1/100 (IgG totales). Subclase: no sale!!
  - **21-2-1632** → título 1/8100 (IgG totales). Subclase: IgG3>IgG4
- CNTN1:
  - **21-2-1630** → positivo: titular y hacer subclases!!

20/10/2021

### ICC Perfil (interlab validation)

Muestras: 58-80

Resultado:

- 63 → NF155 + débil
- 68 → CNTN1 +. También parece NF155 + débil ¿??
- 69 → CNTN1 +
- 71 → NF186 +
- 74 → NF155 +
- 75 → NF155 +
- 76 → CNTN1 +

### Coating ELISA CNTN1

[CNTN1]<sub>i</sub> = 0,25 mg/ml

Buffer coating: carbonate-bicarbonato (100 ml agua destilada + 1 pastilla C3041 Sigma)

- CNTN1: 12 pozos → [CNTN1]<sub>f</sub> = 1 ug/ml → 600 ul buffer + 2,4 ul

	1 blanc	2 prot	3 blanc	4 prot	5 blanc	6 prot	7 blanc	8 prot	9 blanc	10 prot	11 blanc	12 prot
A	1630 1/100	1630 1/100	1630 IgG1	1630 IgG1								
B	1630 1/300	1630 1/300	1630 IgG2	1630 IgG2								
C	1630 1/900	1630 1/900	1630 IgG3	1630 IgG3								
D	1630 1/2700	1630 1/2700	1630 IgG4	1630 IgG4								
E	1630 1/8100	1630 1/8100										
F	1630 1/24300	1630 1/24300										
G	Cpos	Cpos										
H	Cneg	Cneg										

**CNTN1**

## Coating células + transfección Culture slides

- 12 Perfil

### **Protocolo:**

- Preparar mezclas transfección → cada culture slide (8 pozos)
  - 2,2 ug DNA + 68 ul Optimem
  - 3,2 ul lipofectamina2000 + 68 ul Optimem
- Juntar y dejar reposar mínimo 5 minutos
- Poner 300 ul de medio HEK a cada pozo
- Poner 120.000 cels (HEK293) a cada pozo
- Poner 17 ul de mezcla de transfección a cada pozo

**21/10/2021**

---

## ELISA titulación CNTN1 / subclases CNTN1

### **Muestras:** tablas

- CNTN1:
  - 21-2-1630: titular y subclases

### **Protocolo:**

- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
- **Bloquear** con leche 5% en PBS-tween 0'1% → 200 ul/pozo, 1 h
- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
- Incubar con los **sueros** diluidos 1/100 en leche 5% en PBS-tween 0'1% → 100 ul/pozo, 1 h
  - Titulación: preparar un tubo con 400 ul de suero diluido 1/100 en leche 5%, y poner en 5 tubos 280 ul de leche 5%. Pasar 140 ul de dilución del primer tubo al 2º tubo, y así sucesivamente hasta obtener las 6 diluciones (1/100, 1/300, 1/900, 1/2700, 1/8100 i 1/24300)
- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
- Ac secundarios:
  - Titulaciones y screening: Incubar con **RAH IgG HRP** 1/3000 en leche 5% en PBS-tween 0'1% → 100 ul/pozo, 1 h
  - Subclases: Incubar con **MAH HRP** IgG1 o IgG2 o IgG3 o IgG4 1/1000 en leche 5% en PBS-tween 0'1% → 100 ul/pozo, 1 h

- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
- Incubar 5min (o hasta que suba el color) con **TMB**: preparar solución un rato antes y tapar de la luz (para que se atempere) → 100 ul/pozo
- Parar la reacción con 50ul de **H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>** 25%
- Leer a 450-620 nm

**Resultado:**

- CNTN1:
  - **21-2-1630** → título 1/2700 (IgG totales), subclase IgG4

	1 blanc	2 prot	3 blanc	4 prot	5 blanc	6 prot	7 blanc	8 prot	9 blanc	10 prot	11 blanc	12 prot
<b>A</b>	0,315	1,254	0,153	0,174								
<b>B</b>	0,255	1,373	0,265	0,24								
<b>C</b>	0,309	1,116	0,263	0,339								
<b>D</b>	0,276	0,781	0,131	1,27								
<b>E</b>	0,254	0,424										
<b>F</b>	0,451	0,375										
<b>G</b>	0,448	1,192										
<b>H</b>	0,524	0,358										

Recoger culture slides

- Quitar medio
- Fijar PFA4% 10 min
- Quitar PFA y lavar con PBS1x
- Quitar los pozos del culture slide (con piezas negra y blanca)
- Secar bordes y bloquear



**25/10/2021**

---

### ICC Perfil (interlab validation)

**Muestras:** 81-101

**Resultado:** en casi todos los pozos las células están despegadas. REPETIR

### Coating Poly-D.Lys (culture slides)

Coating 24 culture slides con Poly-D 1/40 en PBS1x (de stock poly-d 1 mg/ml) → aprox 300 ul por pocillo

**26/10/2021**

---

### Coating células + transfección Culture slides

- 21 Perfil
- 3 ANO2

**Protocolo:**

- Preparar mezclas transfección → cada culture slide (8 pozos)
  - 2,2 ug DNA + 68 ul Optimem
  - 3,2 ul lipofectamina2000 + 68 ul Optimem
- Juntar y dejar reposar mínimo 5 minutos
- Poner 300 ul de medio HEK a cada pozo
- Poner 120.000 cels (HEK293) a cada pozo
- Poner 17 ul de mezcla de transfección a cada pozo

**27/10/2021**

---

### Recoger culture slides

- Quitar medio
- Fijar PFA4% 10 min
- Quitar PFA y lavar con PBS1x
- Quitar los pozos del culture slide (con piezas negra y blanca)
- Secar bordes y bloquear

28/10/2021

---

### ICC Perfil (interlab validation)

**Muestras:** 82-101 (repetición)

**Resultado:** Cels tranfectadas 27.10.21 → las células no están muy bien... descongelar HEKs nuevas

- 86 → repetir CNTN1
- 88 → CNTN1 +
- 89 → NF155 +++
- 96 → repetir

### ICC Perfil (interlab validation)

**Muestras:** 102-122

**Resultado:** Cels tranfectadas 27.10.21 → las células no están muy bien... descongelar HEKs nuevas

- 106, 107, 116, 117 → repetir CNTN1
- 119 → CNTN1 +
- 122 → CNTN1 ++

### ICC ANO2 (subclases)

**Muestras:**

- EM-153 (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgGtot)
- EM-217 (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgGtot)
- Cneg (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgGtot)

**Protocolo:**

- Bloquear 1h con Goat serum 5%
- Suero 1/100
- 3 lavados PBS1x
- Ac anti-ANO2 1/500
- 3 lavados PBS1x
- Ac secundarios:
  - IgG totales: GAR488 + GAH594 IgG 1/1000
  - Subclases: MAH 488 IgG1 o IgG2 o IgG3 o IgG4 1/200

- 3 lavados PBS1x
- Montar con fluoromount

**Resultado:** las células no están muy bien... descongelar HEKs y volver a transfectar

**02/11/2021**

---

### Descongelar HEKs

Descongeló 2 viales de HEKs (3 mill cels/vial)

HEK293 p4 congeladas el día 26/07/21

### Coating ELISA CNTN1 y NF155 (interlab val.)

Preparo una placa entera de CNTN1 y una de NF155 para empezar los ELISAs del Interlab Validation → placas estilo Immuno porque las haré en el Quantalyser (filas horizontales).

[CNTN1]<sub>i</sub> = 0,25 mg/ml

[NF155]<sub>i</sub> = 0,505 mg/ml

Buffer coating: carbonate-bicarbonato (100 ml agua destilada + 1 pastilla C3041 Sigma)

- CNTN1: 48 pozos → [CNTN1]<sub>f</sub> = 1 ug/ml → 2,5 ml buffer + 10 ul
- NF155: 48 pozos → [CNTN1]<sub>f</sub> = 1 ug/ml → 2,5 ml buffer + 5 ul

**03/11/2021**

---

### ELISA screening NF155 y CNTN1 (interlab validation)

#### **Muestras:**

- 1-46
- Cneg
- Cpos

#### **Protocolo:**

- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
- **Bloquear** con leche 5% en PBS-tween 0'1% → 200 ul/pozo, 1 h
- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
- Diluir los **sueros** 1/100 en leche 5% en PBS-tween 0'1% → 100 ul/pozo, 1 h (como testaré dos proteínas, preparo 450 ul leche 5% + 4'5 ul suero)
- Continuar el proceso con el **Quantalyser (Immuno)**:
  - Incubar con los sueros 1h

- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
- Incubar 45min con **RAH IgG HRP** 1/3000 en leche 5% en PBS-tween 0'1% → 100 ul/pozo
- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
- Incubar 5min con **TMB**: preparar solució un rato antes y tapar de la luz (para que se atempere) → 100 ul/pozo
- Parar la reacció con 50ul de **H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>** 25%
- Leer a 450-620 nm

**08/11/2021**

---

### Coating Poly-D.Lys (culture slides)

Coating 18 culture slides con Poly-D 1/40 en PBS1x (de stock poly-d 1 mg/ml) → aprox 300 ul por pocillo

**09/11/2021**

---

### Transformació plàsmid NF155 sense tag

Plàsmid NF155 sense tag → EX-Z7183-M02 (Genecopoeia) → []= 184 ng/ul, resistència a ampicil·lina.

**\*Preparació de plaques:** a les cabines de cultius de bacteris

- Diluir 1 sobre comercial (LB+agar+ampicil·lina) en 200 ml H<sub>2</sub>O d (estèril, bidó gris)
- Anar escalfant al microones fins que es dissolgui (seguir instruccions del sobre)
- Quan la solució sigui homogènia → afegir la solució de LB+agar+ampicil·lina a cada placa (decantant)
- Deixar les plaques mig obertes fins que solidifiqui
- Guardar les que no s'utilitzin a 4°C boca baix (embolicat en parafilm i paper de plata)

**\*Transformació E.Coli**

Es segueix el protocol de **Stratagene: XL10-Gold Ultracompetent cells. Cat nº: 200314**

Tot el procés es fa a les cabines de cultius de bacteris

- Posar en gel 3 tubs falcon de bacteris (amb doble tancament) → control positiu, control negatiu i NF155 (plàsmid que utilitzarem).
- Descongelar les cèl·lules competents en gel (es troben a -80°C)
- Treure del congelador (del kit) el βmercaptoetanol (tap verd) i el pUC18 (DNA del control positiu, tap blau). *\*El control positiu pUC18 només es pot utilitzar amb plaques d'ampicil·lina*

- Afegir 100 µL de cèl·lules a cada tub
- Afegir 4 µL de βME a cada tub
- Incubar 10 minuts en gel i anar barrejant cada dos minuts (suaument).
- Afegir el DNA als tubs (cada DNA al tub corresponent):
  - **pUC18** (control positiu): afegir 1 µL
  - **NF155**: afegir 0'1 – 50 ng → afegeixo 0,3 ul de plàsmid (50 ng).
- Incubar 30 minuts en gel
 

*\*durant aquesta estona, escalfar l'agitador orbital (37°C) i el bany humit (42°C) → preescalfar un tub de LB a 42°C*
- Posar els tubs 30 segons al bany humit a 42°C (pas crític!!!)
- Posar en gel 2 minuts
- Afegir 0,8 ml de LB preescalfat a cada tub.
- Incubar 1 hora a 37°C agitant a 225-250 rpm (agitador orbital)
- Plaquejar: posar a cada placa uns µL de la solució i escampar amb una nansa
- En aquest cas, es fan 5 plaques (s'han d'atemperar una estona a Tambient):
  - Control **positiu**: 100 µL
  - Control **negatiu**: 100 µL
  - **NF155**: 50 µL, 100 µL, 150 µL
- Incubar tota la nit a 37°C (a l'estufa, plaques boca abaix)

### Coating Poly-D.Lys (culture slides)

Coating 24 culture slides con Poly-D 1/40 en PBS1x (de stock poly-d 1 mg/ml) → aprox 300 ul por pocillo

**10/11/2021**

### Starter plàsmid NF155 sense tag

A primera hora: picar algunes colònies de les plaques amb NF155 per fer-les créixer (cabina de bacteris).

- S'escullen 2 colònies que estiguin ben aïllades (encerclar amb rotulador).
- Amb una punta de pipeta mitjana agafar una colònia aïllada
- Posar-la a un tub falcon de bacteris amb 5 mL de LB + ampicil·lina 1/1000 (del stock 100 mg/ml, o 1/500 del stock 50 mg/ml) → deixar anar la punta dins del tub i deixar-la allà.

- Si el *Starter* es fa a partir d'un **glicerolat** → sense deixar que el glicerolat es descongeli (recollir del congelador en gel), raspar la mostra de glicerolat amb el bacteri transfectat d'interès i afegir dins el tub amb LB+antibiòtic.
- Deixar unes hores a 37°C agitant a 225-250 rpm (agitador orbital)
- Preparar un erlenmeyer de 250 mL de medi LB amb ampicil·lina 1/1000 (del stock 100 mg/ml, o 1/500 del stock 50 mg/ml)
- A última hora de la tarda abocar l'*starter* prèviament seleccionat a l'erlenmeyer.
- Incubar overnight a 37 °C en agitació (agitador orbital)

### Coating células + transfección Culture slides

- 10 Perfil
- 5 LRP4
- 3 NF155/CNTN1

#### **Protocolo:**

- Preparar mezclas transfección → cada culture slide (8 pozos)
  - 2,2 ug DNA + 68 ul Optimem
  - 3,2 ul lipofectamina2000 + 68 ul Optimem
- Juntar y dejar reposar mínimo 5 minutos
- Poner 300 ul de medio HEK a cada pozo
- Poner 120.000 cels (HEK293) a cada pozo
- Poner 17 ul de mezcla de transfección a cada pozo

### Coating células + transfección Culture slides

- 24 perfil

#### **Protocolo:**

- Preparar mezclas transfección → cada culture slide (8 pozos)
  - 2,2 ug DNA + 68 ul Optimem
  - 3,2 ul lipofectamina2000 + 68 ul Optimem
- Juntar y dejar reposar mínimo 5 minutos
- Poner 300 ul de medio HEK a cada pozo
- Poner 120.000 cels (HEK293) a cada pozo
- Poner 17 ul de mezcla de transfección a cada pozo

## Recoger culture slides

- Quitar medio
- Fijar PFA4% 10 min
- Quitar PFA y lavar con PBS1x
  - LRP4: tritón 0,3% 5 min, y lavar con PBS 1x
- Quitar los pozos del culture slide (con piezas negra y blanca)
- Secar bordes y bloquear

11/11/2021

## Maxiprep plàsmid NF155 sense tag

Amb una part del cultiu bacterià fet el dia anterior continuar amb el protocol per a maxi-preps, i amb l'altra preparar un **glicerolat** (cabina de bacteris):

- Preparar 3 mL d'una solució de glicerol al 50%. *\*el glicerol comercial disponible és al 87%. Pipetejar 1.72 mL de glicerol al 87% i 1,28 mL d'aigua destil·lada estèril. Homogeneïtzar i filtrar (en esterilitat).*
- En un criotub rotulat, afegir 300 µL de glicerol al 50%
- Afegir 600 µL de cultiu i barrejar. Congelar a -80°C.

Seguir el protocol del kit **HiSpeed Plasmid Maxi Kit**:

- Centrifugar el cultiu a 6000G durant 15 minuts a 4°C (ultracentrífuga 3a planta).
- Resuspendre el pellet en 10 ml de Buffer P1 (aquest és l'únic pas que cal fer a la cabina de bacteris)
- Afegir 10ml de Buffer P2, barrejar-ho per inversió i incubar-ho fins que la solució es torni blava (aproximadament 5 minuts).
- Durant la incubació, posar el tap del QIAfilterCartridge.
- Afegir 10ml de Buffer P3 al lisat i barrejar-ho immediatament fins que la solució sigui completament incolora.
- Abocar el lisat al QIA filterCartridge i incuba-ho a temperatura ambient durant 10 minuts.
- Equilibrar un HiSpeed Tip amb 10 ml de Buffer QBT.
- Treure el tap del QIAfilterCartidge i gradualment insertar l'èmbol i filtrar el lisat cel·lular al HiSpeed Tip equilibrat.
- Un cop el lisat ha entrat, rentar el HiSpeed Tip amb 60ml de Buffer QC.
- Eluir el DNA amb 15ml de Buffer QF en tubs de 50 ml.

- Precipitar el DNA afegint 10,5 ml d'isopropanol, barrejar-ho i incubar-ho 5 minuts.
- Durant la incubació treure l'èmbol d'una xeringa i posar-li el QIAprecipitatorModule.
- Posar el QIAprecipitator damunt d'una ampolla de deixalles, transferir la solució d'eluat amb isopropanol i posar-hi l'èmbol.
- Filtrar la barreja amb el QIAprecipitator utilitzant una pressió constant.
- Treure el QIAprecipitator de la xeringa i treure l'èmbol.
- Tornar a posar el QIAprecipitator i afegir 2ml d'etanol 70% a la xeringa.
- Rentar el DNA posant l'èmbol i fent passar l'etanol pel QIAprecipitator.
- Treure el QIAprecipitator de la xeringa i treure l'èmbol. Posar el QIAprecipitator un altre cop i posar l'èmbol. Assecar la membrana fent passar aire a través del QIAprecipitator enèrgicament. Repetir aquest pas diverses vegades.
- Assecar la punta del QIAprecipitator amb paper adsorvent.
- Treure l'èmbol d'una xeringa nova de 5ml i posa-hi el QIAprecipitator.
- Afegir 500 ul de Buffer TE a la xeringa i posa-hi l'èmbol eluint el DNA en un tub fent servir pressió constant.
- Treure el QIAprecipitator de la xeringa, treure l'èmbol i tornar a posar el QIAprecipitator.
- Transferir l'eluit a la xeringa i torna-ho a eluir al mateix tub.
- Mesurar la quantitat de DNA amb l'espectofotòmetre i guardar el tub a la nevera 4°C.

**Resultat** → [NF155 sense tag] = 850 ng/ul

### Recoger culture slides

- Quitar medio
- Fijar PFA4% 10 min
- Quitar PFA y lavar con PBS1x
- Quitar los pozos del culture slide (con piezas negra y blanca)
- Secar bordes y bloquear



12/11/2021

---

### IHC Monkey peripheral nerve

**Muestras:**

1. Xia Zihe (NHC 1787443) → anti-MAG+ (taller Immuno)
2. 4206179 (num. 1 d'estudi vacunes EM)
3. 575657 (num. 2 d'estudi vacunes EM)
4. 27419 (num. 3 d'estudi vacunes EM)
5. 70198581 (num. 4 d'estudi vacunes EM)

**Protocolo:** Monkey peripheral nerve slides → ref. 504210 (Werfen)

- Bloquear 30 min - 1h con Goat serum 5%
- Incubar 1h con 40 ul de suero diluído 1/10 en Goat serum 5% (4 ul suero + 36 ul goat 5%)
- 3 lavados con PBS1x
- Incubar 1h con 30-40 ul de ac. secundarios → GAH monkey absorbed IgG 488 + GAH IgM 594 diluídos 1/500 en goat serum 5%
- 3 lavados con PBS1x
- Montar con fluoromount

**Resultado:** Xia Zihe tiene patrón claramente anti-MAG (marca la mielina en IgM). El resto de muestras las tengo que analizar.

A partir de ahora poner los ac.secundarios a 1/1000 (a 1/500 se ven muy potentes)

### ICC Perfil (interlab validation)

**Muestras:** 123-168 (en 2 tandas)

**Resultado:** Cels tranfectadas 11.11.21

- 127 → NF155 +
- 129 → NF140, NF155, NF186 + débil
- 130 → repetir
- 132 → NF140 y NF155 +, NF186 + débil
- 139 → CNTN1 +
- 140 → CNTN1+

- 141 → CNTN1+
- 144 → NF140, NF155, NF186 + débil
- 145 → CNTN1+
- 146 → CNTN1+
- 148 → NF155+
- 150 → CNTN1+
- 152 → CNTN1+
- 154 → NF140, NF155, NF186 + débil
- 155 → NF155+
- 162 → NF155+
- 164 → NF140 y NF186 + débil
- 165 → NF155+

**18/11/2021**

### Extracción y cultivo de neuronas DRG (rata)

S'extreuen a partir d'embrions de rata. Rates Sprague-Dawley embarassades (15 dies de gestació).

Es demanen E15 però s'utilitzen passades 24 hores → el cultiu s'inicia amb E16.

#### Extracció de DRGs

##### ➤ Estabulari

- Portar a l'estabulari un tub falcon de 50 ml amb medi L15 (en gel), i material instrumental (tisoires, bisturí, pinces...)

#### **Medi L15:**

- 45 ml de medi Leibovitz's
- 5 ml de FBS (10%)
- 50 µl de DNasa (stock a 10 µg/ml)
- Posar a l'animal a la cambra de CO<sub>2</sub> (dins de la campana) → obrir la clau fins al número 2, pujar CO<sub>2</sub> fins al 2 (si no ha pujat), i posar l'isoflurane a 5.
- Treure la rata de la cambra i posar-la sobre una fusta. Punxar-li al cor 1 ml de "Solución inyectable para eutanasia"
- Mullar la rata amb alcohol i obrir per baix (*posada boca amunt*). Tirar dels fetus i posar-los a una placa amb L15.

- Tallar la bossa externa de cada fetus, estirar de la bossa interna i posar-los al tub amb medi L15 (en gel).

➤ Cultius

- Posar tots els fetus a una placa amb el medi L15 i mantenir a sobre del gel.
- Agafar un fetus, posar-lo sobre la placa amb gelatina i mullar-lo amb PBS (estèril i fred, mantingut en gel). *És important anar mullant tota l'estona el fetus amb PBS (no es pot quedar sec).*
- Tallar el cap amb una tisora i clavar el fetus boca abaix amb 4 puntes d'agulla a les extremitats.
- Treure els dos tels que envolten la medul·la i treure la medul·la procurant que no es trenqui.
- Treure els ganglis que hagin quedat enganxats a la medul·la i passar-los a una placa amb L15 (no cal que estigui en gel).
- Amb una agulla d'insulina treure cap a fora els DRG de la columna i anar-los passant a la placa amb L15.

**Purificació dels DRGs**

- Passar els ganglis a un tub de 15 ml → amb pipeta Pasteur de vidre + xumet.
- Centrifugar a 300 rpm 5 minuts
- Eliminar el sobrenedant (amb pipeta+xumet i anar tirant a una placa, per no perdre cap gangli). Posar PBS 1x.
- Centrifugar a 300 rpm 5 minuts
- Eliminar el sobrenedant i afegir 5 ml de → 4'5 ml PBS + 500 µl de tripsina 2,5% sense bromophenol.
- Incubar 15 minuts al bany a 37°C. Homogeneitzar suaument cada 5 minuts
- Afegir 5 ml de medi L15 per inactivar la tripsina.
- Centrifugar a 300 rpm 10 minuts.
- Passar el pellet a un eppendorf amb 1 ml de medi NG, i disgregar amb una pipeta Pasteur de vidre fina (*es fa més fina la punta amb el bunsen, preparar uns dies abans i autoclavar*). Procurar no fer escuma. Abans d'homogeneitzar, passar la pipeta Pasteur per FBS per què no es quedin enganxats els ganglis a les parets.

**Medi NG:**

- 48 ml de medi Neurobasal
- 1 ml de suplement B27
- 500 µl de glutamax

- 500 µl de Pen-Str
  - 25 µl de NGF
- Passa el ml a un tub de 15 ml amb 5 ml de medi NG.
  - Passar les cèl·lules a les plaques. → Les cèl·lules no es recompten, les proporcions es fan en funció del nombre d'embrions → **En aquest cas els embrions eren més petits que de normal, i només he pogut treure alguns ganglis.**
- Faig una placa de 60cc amb cubres, i una placa de 100cc sense cubres.**

**22/11/2021**

### Coating Poly-D.Lys (culture slides)

Coating 24 culture slides con Poly-D 1/40 en PBS1x (de stock poly-d 1 mg/ml) → aprox 300 ul por pocillo

### ELISA screening NF155 y CNTN1 (interlab validation)

#### **Muestras:**

- 47-92
- Cneg
- Cpos

**Protocolo:** cojo dos placas con coating y bloqueo hecho por Borja.

- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
- Diluir los **sueros** 1/100 en leche 5% en PBS-tween 0'1% → 100 ul/pozo, 1 h (como testaré dos proteínas, preparo 450 ul leche 5% + 4'5 ul suero)
- Continuar el proceso con el **Quantalyser (Immuno)**:
  - Incubar con los sueros 1h
  - Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
  - Incubar 45min con **RAH IgG HRP** 1/3000 en leche 5% en PBS-tween 0'1% → 100 ul/pozo
  - Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
  - Incubar 5min con **TMB**: preparar solución un rato antes y tapar de la luz (para que se atempere) → 100 ul/pozo
  - Parar la reacción con 50ul de **H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>** 25%
  - Leer a 450-620 nm

## Coating ELISA CNTN1 y NF155 (interlab val.)

Preparo una placa entera de CNTN1 y una de NF155 para empezar los ELISAs del Interlab Validation → placas estilo Immuno porque las haré en el Quantalyser (filas horizontales).

[CNTN1]<sub>i</sub> = 0,25 mg/ml

[NF155]<sub>i</sub> = 0,505 mg/ml

Buffer coating: carbonate-bicarbonato (100 ml agua destilada + 1 pastilla C3041 Sigma)

- CNTN1: 48 pozos → [CNTN1]<sub>f</sub> = 1 ug/ml → 2,5 ml buffer + 10 ul
- NF155: 48 pozos → [CNTN1]<sub>f</sub> = 1 ug/ml → 2,5 ml buffer + 5 ul

23/11/2021

---

## Coating células + transfección Culture slides

- 10 perfil
- 3 ANO2
- 1 NF155 amb tag / CNTN1 → 3 pous NF155 amb tag (per comprovar LRP4+ immuno) | 5 pous CNTN1 (per repetir les immunos de interlab val)
- 2 NF155 sense tag / CNTN1
- 8 CASPR1/Doble CNTN1-CASPR1

### **Protocolo:**

- Preparar mezclas transfección → cada culture slide (8 pozos)
  - 2,2 ug DNA + 68 ul Optimem
    - Doble CNTN1/CASPR1: 1,4 ug CNTN1 + 0,8 ug CASPR1
  - 3,2 ul lipofectamina2000 + 68 ul Optimem
- Juntar y dejar reposar mínimo 5 minutos
- Poner 300 ul de medio HEK a cada pozo
- Poner 120.000 cels (HEK293) a cada pozo
- Poner 17 ul de mezcla de transfección a cada pozo

## ELISA screening NF155 y CNTN1 (interlab validation)

### **Muestras:**

- 93-138
- Cneg
- Cpos

### Protocolo:

- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
- Diluir los **sueros** 1/100 en leche 5% en PBS-tween 0'1% → 100 ul/pozo, 1 h (como testaré dos proteínas, preparo 450 ul leche 5% + 4'5 ul suero)
- Continuar el proceso con el **Quantalyser (Immuno)**:
  - Incubar con los sueros 1h
  - Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
  - Incubar 45min con **RAH IgG HRP** 1/3000 en leche 5% en PBS-tween 0'1% → 100 ul/pozo
  - Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
  - Incubar 5min con **TMB**: preparar solución un rato antes y tapar de la luz (para que se atempere) → 100 ul/pozo
  - Parar la reacción con 50ul de **H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>** 25%
  - Leer a 450-620 nm

24/11/2021

---

### Recoger culture slides

- Quitar medio
- Fijar PFA4% 10 min
- Quitar PFA y lavar con PBS1x
- Quitar los pozos del culture slide (con piezas negra y blanca)
- Congelar a -80°C → en este caso no los he bloqueado antes de congelar!!

### Preparació LB

- 250 ml H<sub>2</sub>O + 6, 25 g de LB (num. 189) → posar H<sub>2</sub>O a ampolla i posar-hi LB. Escalfar i barrejar amb mosca.
- Autoclavar (treure la mosca abans) → no tancar el tap del tot.
- Deixar a Tambient

Preparo 2 ampolles.

## Transformació plàsmid EPHA7

Plàsmid EPHA7 → RC226293 (Origene) Myc-DDDK-tagged → [ ]= 100 ng/ul (es reconstitueixen 10 ug de DNA en 100 ul d'aigua), resistència a kanamicina.

**\*Preparació de plaques:** a les cabines de cultius de bacteris

- Diluir 1 sobre comercial (LB+agar+kanamicina) en 200 ml H<sub>2</sub>O d (estèril)
- Anar escalfant al microones fins que es dissolgui (seguir instruccions del sobre)
- Quan la solució sigui homogènia → afegir la solució de LB+agar+kanamicina a cada placa (decantant)
- Deixar les plaques mig obertes fins que solidifiqui
- Guardar les que no s'utilitzin a 4°C boca baix (embolicat en parafilm i paper de plata)

**\*Transformació E.Coli**

Es segueix el protocol de **Stratagene: XL10-Gold Ultracompetent cells. Cat nº: 200314**

Tot el procés es fa a les cabines de cultius de bacteris

- Posar en gel 3 tubs falcon de bacteris (amb doble tancament) → control positiu, control negatiu i NF155 (plàsmid que utilitzarem).
- Descongelar les cèl·lules competents en gel (es troben a -80°C)
- Treure del congelador (del kit) el βmercaptoetanol (tap verd) i el pUC18 (DNA del control positiu, tap blau). *\*El control positiu pUC18 només es pot utilitzar amb plaques d'ampicil·lina*
- Afegir 100 µL de cèl·lules a cada tub
- Afegir 4 µL de βME a cada tub
- Incubar 10 minuts en gel i anar barrejant cada dos minuts (suaument).
- Afegir el DNA als tubs (cada DNA al tub corresponent):
  - **pUC18** (control positiu): afegir 1 µL
  - **EPHA7**: afegir 0'1 – 50 ng → afegeixo 0,5 ul de plàsmid (50 ng).
- Incubar 30 minuts en gel  
*\*durant aquesta estona, escalfar l'agitador orbital (37°C) i el bany humit (42°C) → preescalfar un tub de LB a 42°C*
- Posar els tubs 30 segons al bany humit a 42°C (pas crític!!!)
- Posar en gel 2 minuts
- Afegir 0,8 ml de LB preescalfat a cada tub.
- Incubar 1 hora a 37°C agitant a 225-250 rpm (agitador orbital)
- Plaquejar: posar a cada placa uns µL de la solució i escampar amb una nansa
- En aquest cas, es fan 5 plaques (s'han d'atemperar una estona a Tambient):

- Control **positiu**: 100 µL → placa ampicil·lina!!
  - Control **negatiu**: 100 µL
  - **EPHA7**: 50 µL, 100 µL, 150 µL
- Incubar tota la nit a 37°C (a l'estufa, plaques boca abaix)

**25/11/2021**

### Starter plàsmid EPHA7

A primera hora: picar algunes colònies de les plaques amb EPHA7 per fer-les créixer (cabina de bacteris).

- S'escullen 2 colònies que estiguin ben aïllades (encerclar amb rotulador).
- Amb una punta de pipeta mitjana agafar una colònia aïllada
- Posar-la a un tub falcon de bacteris amb 5 mL de LB + kanamicina 1/2000 (del stock 50 mg/ml, per fer una concentració final de 25 µg/ml) → deixar anar la punta dins del tub i deixar-la allà.
  - Si el *Starter* es fa a partir d'un **glicerolat** → sense deixar que el glicerolat es descongeli (recollir del congelador en gel), raspar la mostra de glicerolat amb el bacteri transfectat d'interès i afegir dins el tub amb LB+antibiòtic.
- Deixar unes hores a 37°C agitant a 225-250 rpm (agitador orbital)
- Preparar un erlenmeyer de 250 mL de medi LB amb kanamicina 1/2000
- A última hora de la tarda abocar l'*starter* prèviament seleccionat a l'erlenmeyer.
- Incubar overnight a 37 °C en agitació (agitador orbital)

### ICC Perfil (interlab validation)

**Muestras:** 169, 170

**Resultado:** negativo

### ICC CNTN1 (interlab validation)

**Muestras:** 86, 106, 107, 116,117

**Resultado:** negativo



26/11/2021

## Maxiprep plàsmid EPHA7

\*Ens hem oblidat de guardar glicerolat!!

Seguir el protocol del kit **HiSpeed Plasmid Maxi Kit**:

- Centrifugar el cultiu a 6000G durant 15 minuts a 4°C (ultracentrífuga 3a planta).
- Resuspendre el pellet en 10 ml de Buffer P1 (aquest és l'únic pas que cal fer a la cabina de bacteris)
- Afegir 10ml de Buffer P2, barrejar-ho per inversió i incubar-ho fins que la solució es torni blava (aproximadament 5 minuts).
- Durant la incubació, posar el tap del QIAfilterCartridge.
- Afegir 10ml de Buffer P3 al lisat i barrejar-ho immediatament fins que la solució sigui completament incolora.
- Abocar el lisat al QIA filterCartridge i incuba-ho a temperatura ambient durant 10 minuts.
- Equilibrar un HiSpeed Tip amb 10 ml de Buffer QBT.
- Treure el tap del QIAfilterCartidge i gradualment insertar l'èmbol i filtrar el lisat cel·lular al HiSpeed Tip equilibrat.
- Un cop el lisat ha entrat, rentar el HiSpeed Tip amb 60ml de Buffer QC.
- Eluir el DNA amb 15ml de Buffer QF en tubs de 50 ml.
- Precipitar el DNA afegint 10,5 ml d'isopropanol, barrejar-ho i incubar-ho 5 minuts.
- Durant la incubació treure l'èmbol d'una xeringa i posar-li el QIAprecipitatorModule.
- Posar el QIAprecipitator damunt d'una ampolla de deixalles, transferir la solució d'eluat amb isopropanol i posar-hi l'èmbol.
- Filtrar la barreja amb el QIAprecipitator utilitzant una pressió constant.
- Treure el QIAprecipitator de la xeringa i treure l'èmbol.
- Tornar a posar el QIAprecipitator i afegir 2ml d'etanol 70% a la xeringa.
- Rentar el DNA posant l'èmbol i fent passar l'etanol pel QIAprecipitator.
- Treure el QIAprecipitator de la xeringa i treure l'èmbol. Posar el QIAprecipitator un altre cop i posar l'èmbol. Assecar la membrana fent passar aire a través del QIAprecipitator enèrgicament. Repetir aquest pas diverses vegades.
- Assecar la punta del QIAprecipitator amb paper adsorbent.
- Treure l'èmbol d'una xeringa nova de 5ml i posa-hi el QIAprecipitator.
- Afegir 500 ul de Buffer TE a la xeringa i posa-hi l'èmbol eluint el DNA en un tub fent servir pressió constant.

- Treure el QIAprecipitador de la xeringa, treure l'èmbol i tornar a posar el QIAprecipitador.
- Transferir l'eluit a la xeringa i torna-ho a eluir al mateix tub.
- Mesurar la quantitat de DNA amb l'espectrofotòmetre i guardar el tub a la nevera 4°C.

**Resultat** → [EPHA7] = 230 ng/ul

**30/11/2021**

### ICC CASPR1 y Doble CNTN1/CASPR1 (interlab validation y muestra EM)

**Muestras:**

- 1-30
- Muestra F8 vacunas EM (120247 T3)
- Cpos

**Protocolo:**

- Bloquear con Goat 5 % (1h)
- Suero 1/100
- Ac anti-CASPR1 1/250
- Ac secundarios: GAR488 + GAH594 1/1000

**Resultado:**

- 11 → CASPR1 + dèbil, Doble CNTN1/CASPR1 +
- 28 → CASPR1-, Doble CNTN1/CASPR1 +
- El resto de muestras son negativas

### ICC Perfil (muestras BD y muestras EM)

**Muestras:**

- 21-2-1680
- 21-2-1727
- 21-2-1728
- En el mismo perfil:
  - CNTN1 → Muestra B1.2 vacunas EM (82386 T3)
  - NF140 → Muestra A4 vacunas EM (70198581 T3)
  - NF186 → Muestra F8 vacunas EM (120247 T3)

**Resultado:** todo negativo

## ELISA CASPR1 (muestras BD)

### **Muestras:**

- 21-2-1680 → neg
- 21-2-1727 → neg
- 21-2-1728 → neg

**Resultado:** las 3 muestras son negativas

## Coating Poly-D.Lys (culture slides)

Coating 24 culture slides con Poly-D 1/40 en PBS1x (de stock poly-d 1 mg/ml) → aprox 300 ul por pocillo

## ELISA screening NF186 y CASPR1 (interlab validation)

### **Muestras:**

- 1-46
- Cneg
- Cpos

### **Protocolo:**

- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
- Diluir los **sueros** 1/100 en leche 5% en PBS-tween 0'1% → 100 ul/pozo, 1 h (como testaré dos proteínas, preparo 450 ul leche 5% + 4'5 ul suero)
- Continuar el proceso con el **Quantalyser (Immuno)**:
  - Incubar con los sueros 1h
  - Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
  - Incubar 45min con **RAH IgG HRP** 1/3000 en leche 5% en PBS-tween 0'1% → 100 ul/pozo
  - Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
  - Incubar 5min con **TMB**: preparar solución un rato antes y tapar de la luz (para que se atempere) → 100 ul/pozo
  - Parar la reacción con 50ul de **H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>** 25%
  - Leer a 450-620 nm

01/12/2021

---

### Coating células + transfección Culture slides

- 24 CASPR1/Doble CNTN1-CASPR1

#### **Protocolo:**

- Preparar mezclas transfección → cada culture slide (8 pozos)
  - 2,2 ug DNA + 68 ul Optimem
    - Doble CNTN1/CASPR1: 1,4 ug CNTN1 + 0,8 ug CASPR1
  - 3,2 ul lipofectamina2000 + 68 ul Optimem
- Juntar y dejar reposar mínimo 5 minutos
- Poner 300 ul de medio HEK a cada pozo
- Poner 120.000 cels (HEK293) a cada pozo
- Poner 17 ul de mezcla de transfección a cada pozo

### Coating Poly-D.Lys (culture slides)

Coating 18 culture slides con Poly-D 1/40 en PBS1x (de stock poly-d 1 mg/ml) → aprox 300 ul por pocillo

02/12/2021

---

### Recoger culture slides

- Quitar medio
- Fijar PFA4% 10 min
- Quitar PFA y lavar con PBS1x
- Quitar los pozos del culture slide (con piezas negra y blanca)
- Secar bordes y bloquear

### Coating células + transfección culture slides

- 14 CASPR1/Doble CNTN1-CASPR1
- 4 LRP4

#### **Protocolo:**

- Preparar mezclas transfección → cada culture slide (8 pozos)
  - 2,2 ug DNA + 68 ul Optimem
    - Doble CNTN1/CASPR1: 1,4 ug CNTN1 + 0,8 ug CASPR1

- 3,2 ul lipofectamina2000 + 68 ul Optimem
- Juntar y dejar reposar mínimo 5 minutos
- Poner 300 ul de medio HEK a cada pozo
- Poner 120.000 cels (HEK293) a cada pozo
- Poner 17 ul de mezcla de transfección a cada pozo

### ELISA screening NF155 y CNTN1 (interlab validation)

**Muestras:** 34 pozos (x2) Placas congeladas

- 139-170
- Cneg
- Cpos

**Protocolo:** en este caso no lo hago en el Quantalyser de Immuno porque la máquina estaba ocupada.

- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
- Diluir los **sueros** 1/100 en leche 5% en PBS-tween 0'1% → 100 ul/pozo, 1 h (como testaré dos proteínas, preparo 450 ul leche 5% + 4'5 ul suero)
- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
- Incubar con **RAH HRP** IgG 1/3000 en leche 5% PBS-tween 0'1% → 100 ul/pozo, 1 h
- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
- Incubar 5min (o hasta que suba el color) con **TMB**: preparar solución un rato antes y tapar de la luz (para que se atempere) → 100 ul/pozo
- Parar la reacción con 50ul de **H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>** 25%
- Leer a 450-620 nm

### ICC CASPR1 y Doble CNTN1/CASPR1 (interlab validation)

**Muestras:** 12 CS

- 124-170 (hago estas muestras porque de la 139 a la 170 las voy a descongelar el mismo día y así aprovecho)
- Cpos

**Protocolo:**

- Bloquear con Goat 5 % (1h)
- Suero 1/100

- Ac anti-CASPR1 1/250
- Ac secundarios: GAR488 + GAH594 1/1000

**Resultado:**

- 128 → CASPR1 -, Doble CNTN1/CASPR1 +
- 136 → repetir Doble CNTN1/CASPR1
- 139 → CASPR1 -, Doble CNTN1/CASPR1 +
- 140 → CASPR1 -, Doble CNTN1/CASPR1 +
- 141 → CASPR1 -, Doble CNTN1/CASPR1 +
- 145 → CASPR1 -, Doble CNTN1/CASPR1 +
- 146 → CASPR1 -, Doble CNTN1/CASPR1 +
- 150 → CASPR1 -, Doble CNTN1/CASPR1 +
- 152 → CASPR1 -, Doble CNTN1/CASPR1 +
- 158 → CASPR1 + muy débil, Doble CNTN1/CASPR1 +
- 163 → CASPR1 -, Doble CNTN1/CASPR1 +
- 167 → CASPR1 -, Doble CNTN1/CASPR1 +
- El resto de muestras son negativas

**03/12/2021**

---

**Recoger culture slides**

- Quitar medio
- Fijar PFA4% 10 min
- Quitar PFA y lavar con PBS1x
- Quitar los pozos del culture slide (con piezas negra y blanca)
  - LRP4: incubar con tritón 0'3% 5 min
- Secar bordes y bloquear

09/12/2021

---

**ICC CASPR1 y Doble CNTN1/CASPR1 (interlab validation)**

**Muestras:** (hago 2 tandas)

- 5
- Cpos

**Protocolo:**

- Bloquear con Goat 5 % (1h)
- Suero 1/100
- Ac anti-CASPR1 1/250
- Ac secundarios: GAR488 + GAH594 1/1000

**Resultado:**

- 37 → CASPR1 -, Doble CNTN1/CASPR1 +
- 42 → CASPR1 + débil, Doble CNTN1/CASPR1 +
- 54 → CASPR1 -, Doble CNTN1/CASPR1 +
- 69 → CASPR1 -, Doble CNTN1/CASPR1 + +
- 76 → CASPR1 -, Doble CNTN1/CASPR1 + +
- 80 → CASPR1 -, Doble CNTN1/CASPR1 +
- 88 → CASPR1 -, Doble CNTN1/CASPR1 +
- 93 → CASPR1 + débil, Doble CNTN1/CASPR1 -
- 122 → CASPR1 -, Doble CNTN1/CASPR1 +

13/12/2021

---

**IHC teasing nervio ciático rata (interlab validation)**

**Muestras:**

- |                          |                   |                 |
|--------------------------|-------------------|-----------------|
| · 5 → + nodo?            | · 26 → negativo   | · 40 → negativo |
| · 11 → + paranodo        | · 27 → + paranodo | · 43 → negativo |
| · 13 → negativo          | · 30 → negativo   | · 45 → negativo |
| · 16 → negativo          | · 34 → + nodo??   |                 |
| · 22 → + nodo y paranodo | · 36 → negativo   |                 |
|                          | · 37 → + paranodo |                 |

**Protocolo:** (entre cada paso hacer 3 lavados con PBS1x)

- Fijar con acetona (-20°C) 10 min
- Separar los dos grupos de tejido con Dakopen
- Bloquear con Goat serum 5% + 0'1% tritón 1h
- Suero 1/100 (en bloqueo) 1h
- Ac comercial anti-NF 1/500 (en bloqueo) 1h
- Ac secundarios: GAC488 + GAH594 IgG 1/1000 (en bloqueo) 1h
- Montar con Fluoromount

**14/12/2021**

---

**Coating Poly-D.Lys (culture slides)**

Coating 18 culture slides con Poly-D 1/40 en PBS1x (de stock poly-d 1 mg/ml) → aprox 300 ul por pocillo

**15/12/2021**

---

**IHC teasing nervio ciático rata (interlab validation)**

**Muestras:**

- |      |       |       |
|------|-------|-------|
| · 52 | · 73  | · 154 |
| · 56 | · 86  | · 156 |
| · 63 | · 129 | · 158 |
| · 64 | · 130 | · 164 |
| · 68 | · 144 |       |
| · 71 | · 149 |       |

**Protocolo:** (entre cada paso hacer 3 lavados con PBS1x)

- Fijar con acetona (-20°C) 10 min
- Separar los dos grupos de tejido con Dakopen
- Bloquear con Goat serum 5% + 0'1% tritón 1h
- Suero 1/100 (en bloqueo) 1h
- Ac comercial anti-NF 1/500 (en bloqueo) 1h
- Ac secundarios: GAC488 + GAH594 IgG 1/1000 (en bloqueo) 1h
- Montar con Fluoromount



16/12/2021

---

### Coating células + transfección culture slides

- 10 Perfil
- 4 LRP4
- 4 NF155/CNTN1

#### **Protocolo:**

- Preparar mezclas transfección → cada culture slide (8 pozos)
  - 2,2 ug DNA + 68 ul Optimem
  - 3,2 ul lipofectamina2000 + 68 ul Optimem
- Juntar y dejar reposar mínimo 5 minutos
- Poner 300 ul de medio HEK a cada pozo
- Poner 120.000 cels (HEK293) a cada pozo
- Poner 17 ul de mezcla de transfección a cada pozo

### ELISA NF155 titulación (interlab validation)

**Muestras:** claramente positivas por NF155

- |      |      |
|------|------|
| · 15 | · 50 |
| · 23 | · 51 |
| · 33 | · 53 |
| · 39 | · 57 |

#### **Protocolo:**

- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
- Diluir los **sueros** → preparar un tubo con 400 ul de suero diluído 1/100 en leche 5%, y poner en 5 tubos 280 ul de leche 5%. Pasar 140 ul de dilución del primer tubo al 2º tubo, y así sucesivamente hasta obtener las 6 diluciones (1/100, 1/300, 1/900, 1/2700, 1/8100 i 1/24300)
- Continuar el proceso con el **Quantalyser (Immuno)**:
  - Incubar con los sueros 1h
  - Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
  - Incubar 45min con **RAH IgG HRP** 1/3000 en leche 5% en PBS-tween 0'1% → 100 ul/pozo
  - Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%

- Incubar 5min con **TMB**: preparar solución un rato antes y tapar de la luz (para que se atempere) → 100 ul/pozo
- Parar la reacción con 50ul de **H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>** 25%
- Leer a 450-620 nm

**Resultado:**

- |                |               |
|----------------|---------------|
| · 15 → 1/24300 | · 50 → 1/2700 |
| · 23 → 1/8100  | · 51 → 1/2700 |
| · 33 → 1/24300 | · 53 → 1/2700 |
| · 39 → 1/900   | · 57 → 1/900  |

**ELISA NF155 subclases (interlab validation)**

**Muestras:** claramente positivas por NF155

- |  |             |
|--|-------------|
| · <b>15</b> → las subclases se hacen a 1/200 porque no queda muestra | · <b>39</b> |
| · <b>23</b>  | · <b>50</b> |
| · <b>33</b> → no hay muestra para hacer subclases                    | · <b>51</b> |
|  | · <b>53</b> |
|  | · <b>57</b> |

**Protocolo:**

- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
- Diluir los **sueros** 1/100 en leche 5% en PBS-tween 0'1% → 100 ul/pozo, 1 h (de cada suero se hacen 8 pozos: 4 subclases)
- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
- Ac secundarios: Incubar con **MAH HRP** IgG1 o IgG2 o IgG3 o IgG4 1/1000 en leche 5% en PBS-tween 0'1% → 100 ul/pozo, 1 h
- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
- Incubar 5min (o hasta que suba el color) con **TMB**: preparar solución un rato antes y tapar de la luz (para que se atempere) → 100 ul/pozo
- Parar la reacción con 50ul de **H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>** 25%
- Leer a 450-620 nm

	1 blanc	2 prot	3 blanc	4 prot	5 blanc	6 prot	7 blanc	8 prot	9 blanc	10 prot	11 blanc	12 prot
A	15 IgG1	15 IgG1	39 IgG1	39 IgG1	51 IgG1	51 IgG1	57 IgG1	57 IgG1				
B	15 IgG2	15 IgG2	39 IgG2	39 IgG2	51 IgG2	51 IgG2	57 IgG2	57 IgG2				
C	15 IgG3	15 IgG3	39 IgG3	39 IgG3	51 IgG3	51 IgG3	57 IgG3	57 IgG3				
D	15 IgG4	15 IgG4	39 IgG4	39 IgG4	51 IgG4	51 IgG4	57 IgG4	57 IgG4				
E	23 IgG1	23 IgG1	50 IgG1	50 IgG1	53 IgG1	53 IgG1						
F	23 IgG2	23 IgG2	50 IgG2	50 IgG2	53 IgG2	53 IgG2						
G	23 IgG3	23 IgG3	50 IgG3	50 IgG3	53 IgG3	53 IgG3						
H	23 IgG4	23 IgG4	50 IgG4	50 IgG4	53 IgG4	53 IgG4						

**Resultado:**

	1 blanc	2 prot	3 blanc	4 prot	5 blanc	6 prot	7 blanc	8 prot	9 blanc	10 prot	11 blanc	12 prot
A	0,051	<b>0,136</b>	0,051	0,063	0,061	0,061	0,088	0,076				
B	0,054	0,055	0,05	0,081	0,051	0,058	0,071	0,102				
C	0,059	0,078	0,048	0,062	0,052	0,054	0,075	0,077				
D	0,051	<b>0,861</b>	0,05	<b>0,191</b>	0,051	<b>0,368</b>	0,078	<b>0,314</b>				
E	0,05	0,058	0,048	0,06	0,051	0,064						
F	0,054	0,055	0,056	0,049	0,06	0,06						
G	0,055	0,057	0,055	0,053	0,067	0,067						
H	0,051	<b>1,386</b>	0,066	<b>0,742</b>	0,067	<b>0,873</b>						

- 15 → IgG4 (OD – blanc = 0,81) >> IgG1 (0,085) → S'ha fet a 1/200!!!
- 23 → IgG4 (1,335)
- 39 → IgG4 (0,141)
- 50 → IgG4 (0,676)
- 51 → IgG4 (0,317)
- 53 → IgG4 (0,806)
- 57 → IgG4 (0,236)

17/12/2021

---

### Recoger culture slides

- Quitar medio
- Fijar PFA4% 10 min
- Quitar PFA y lavar con PBS1x
- Quitar los pozos del culture slide (con piezas negra y blanca)
  - LRP4: incubar con tritón 0'3% 5 min
- Congelar a -80°C (en este caso no bloqueo!!)

\*\*\* el día 22/12 hago inmunos en inmuno y no se ve nada!!! No se han transfectado las células!!!

20/12/2021

---

### ICC perfil confirmaciones (interlab validation)

Muestras: (dudosas, las hago todas a 1/40)

- 5 → NF155, NF186
- 22 → NF186
- 34 → NF186
- 36 → CNTN1
- 37 → CNTN1
- 48 → CNTN1
- 56 → NF155
- 63 → NF155, NF186
- 68 → CNTN1, NF155
- 86 → CNTN1
- 148 → NF155

Combinaciones portas (NF186 y NF140 las hago indistintamente):

	CNTN1	NF140	NF155	NF186
Perfil 1	36	5	5	22
Perfil 2	37	34	63	63
Porta NF155/CNTN1	48, 68, 86, C+		56, 68, 148, C+	

**Resultado:** TODO MAL! No se han transfectado las células!!!

22/12/2021

## ELISA NF155 titulación (interlab validation)

**Muestras:** claramente positivas por NF155

- |       |       |
|-------|-------|
| · 74  | · 132 |
| · 75  | · 155 |
| · 89  | · 162 |
| · 127 | · 165 |

**Protocolo:**

- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
- Diluir los **sueros** → preparar un tubo con 400 ul de suero diluído 1/100 en leche 5%, y poner en 5 tubos 280 ul de leche 5%. Pasar 140 ul de dilución del primer tubo al 2º tubo, y así sucesivamente hasta obtener las 6 diluciones (1/100, 1/300, 1/900, 1/2700, 1/8100 i 1/24300)
- Continuar el proceso con el **Quantalyser (Immuno)**:
  - Incubar con los sueros 1h
  - Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
  - Incubar 45min con **RAH IgG HRP** 1/3000 en leche 5% en PBS-tween 0'1% → 100 ul/pozo
  - Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
  - Incubar 5min con **TMB**: preparar solución un rato antes y tapar de la luz (para que se atempere) → 100 ul/pozo
  - Parar la reacción con 50ul de **H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>** 25%
  - Leer a 450-620 nm

**Resultado:**

- |                |               |
|----------------|---------------|
| · 74: 1/2700   | · 132: 1/2700 |
| · 75: 1/2700   | · 155: 1/2700 |
| · 89: 1/24300  | · 162: 1/2700 |
| · 127: 1/24300 | · 165: 1/8100 |

## ELISA NF155 subclases (interlab validation)

**Muestras:** claramente positivas por NF155

- 74
- 75
- 89
- 127
- 132 → las subclases se hacen a 1/200 porque no queda muestra
- 155
- 162
- 165

**Protocolo:**

- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
- Diluir los **sueros** 1/100 en leche 5% en PBS-tween 0'1% → 100 ul/pozo, 1 h (de cada suero se hacen 8 pozos: 4 subclases)
- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
- Ac secundarios: Incubar con **MAH HRP** IgG1 o IgG2 o IgG3 o IgG4 1/1000 en leche 5% en PBS-tween 0'1% → 100 ul/pozo, 1 h
- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
- Incubar 5min (o hasta que suba el color) con **TMB**: preparar solución un rato antes y tapar de la luz (para que se atempere) → 100 ul/pozo
- Parar la reacción con 50ul de **H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>** 25%
- Leer a 450-620 nm

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A prot</b>	74 IgG1	75 IgG1	89 IgG1	127 IgG1	132 IgG1	155 IgG1	162 IgG1	165 IgG1				
<b>B blanc</b>	74 IgG1	75 IgG1	89 IgG1	127 IgG1	132 IgG1	155 IgG1	162 IgG1	165 IgG1				
<b>C prot</b>	74 IgG2	75 IgG2	89 IgG2	127 IgG2	132 IgG2	155 IgG2	162 IgG2	165 IgG2				
<b>D blanc</b>	74 IgG2	75 IgG2	89 IgG2	127 IgG2	132 IgG2	155 IgG2	162 IgG2	165 IgG2				
<b>E prot</b>	74 IgG3	75 IgG3	89 IgG3	127 IgG3	132 IgG3	155 IgG3	162 IgG3	165 IgG3				
<b>F blanc</b>	74 IgG3	75 IgG3	89 IgG3	127 IgG3	132 IgG3	155 IgG3	162 IgG3	165 IgG3				
<b>G prot</b>	74 IgG4	75 IgG4	89 IgG4	127 IgG4	132 IgG4	155 IgG4	162 IgG4	165 IgG4				
<b>H blanc</b>	74 IgG4	75 IgG4	89 IgG4	127 IgG4	132 IgG4	155 IgG4	162 IgG4	165 IgG4				

## Resultado:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A prot</b>	0,053	0,058	0,079	0,061	0,073	0,056	0,057	0,058				
<b>B blanc</b>	0,051	0,049	0,049	0,05	0,048	0,048	0,049	0,05				
<b>C prot</b>	0,052	0,057	0,051	0,06	0,048	0,051	0,051	0,052				
<b>D blanc</b>	0,049	0,05	0,05	0,049	0,049	0,049	0,052	0,049				
<b>E prot</b>	<b>0,13</b>	<b>0,211</b>	0,062	0,058	0,086	0,05	0,052	0,052				
<b>F blanc</b>	0,05	0,052	0,049	0,05	0,05	0,049	0,049	0,05				
<b>G prot</b>	<b>0,671</b>	<b>0,816</b>	<b>0,873</b>	<b>0,376</b>	0,069	<b>0,784</b>	<b>0,686</b>	<b>0,912</b>				
<b>H blanc</b>	0,051	0,05	0,051	0,05	0,054	0,049	0,052	0,052				

- 74 → IgG4 (0,62) > IgG3 (0,08)
- 75 → IgG4 (0,766) > IgG3 (0,159)
- 89 → IgG4 (0,822)
- 127 → IgG4 (0,326)
- 132 → no salen!! (se han hecho a 1/200)
- 155 → IgG4 (0,735)
- 162 → IgG4 (0,634)
- 165 → IgG4 (0,86)

23/12/2021

### ELISA CNTN1 titulación (interlab validation)

**Muestras:** claramente positivas por CNTN1

- 54
- 69
- 76
- 88
- 119
- 122
- 139
- 140

**Protocolo:**

- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
- Diluir los **sueros** → preparar un tubo con 400 ul de suero diluído 1/100 en leche 5%, y poner en 5 tubos 280 ul de leche 5%. Pasar 140 ul de dilución del primer tubo al 2º tubo, y así sucesivamente hasta obtener las 6 diluciones (1/100, 1/300, 1/900, 1/2700, 1/8100 i 1/24300)
- Continuar el proceso con el **Quantalyser (Immuno)**:

- Incubar con los sueros 1h
- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
- Incubar 45min con **RAH IgG HRP** 1/3000 en leche 5% en PBS-tween 0'1% → 100 ul/pozo
- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
- Incubar 5min con **TMB**: preparar solución un rato antes y tapar de la luz (para que se atempere) → 100 ul/pozo
- Parar la reacción con 50ul de **H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>** 25%
- Leer a 450-620 nm

**Resultado:**

- |               |                |
|---------------|----------------|
| · 54 → 1/900  | · 119 → 1/300  |
| · 69 → 1/2700 | · 122 → 1/8100 |
| · 76 → 1/8100 | · 139 → 1/2700 |
| · 88 → 1/900  | · 140 → 1/2700 |

**ELISA CNTN1 subclases (interlab validation)**

**Muestras:** claramente positivas por CNTN1

- |   |       |
|---|-------|
| · 54  | · 119 |
| · 69 → no se hacen subclases<br>porque no queda muestra | · 122 |
| · 76  | · 139 |
| · 88  | · 140 |

**Protocolo:**

- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
- Diluir los **sueros** 1/100 en leche 5% en PBS-tween 0'1% → 100 ul/pozo, 1 h (de cada suero se hacen 8 pozos: 4 subclases)
- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
- Ac secundarios: Incubar con **MAH HRP** IgG1 o IgG2 o IgG3 o IgG4 1/1000 en leche 5% en PBS-tween 0'1% → 100 ul/pozo, 1 h
- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
- Incubar 5min (o hasta que suba el color) con **TMB**: preparar solución un rato antes y tapar de la luz (para que se atempere) → 100 ul/pozo
- Parar la reacción con 50ul de **H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>** 25%
- Leer a 450-620 nm



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A prot</b>	54 IgG1	76 IgG1	88 IgG1	119 IgG1	122 IgG1	139 IgG1	140 IgG1					
<b>B blanc</b>	54 IgG1	76 IgG1	88 IgG1	119 IgG1	122 IgG1	139 IgG1	140 IgG1					
<b>C prot</b>	54 IgG2	76 IgG2	88 IgG2	119 IgG2	122 IgG2	139 IgG2	140 IgG2					
<b>D blanc</b>	54 IgG2	76 IgG2	88 IgG2	119 IgG2	122 IgG2	139 IgG2	140 IgG2					
<b>E prot</b>	54 IgG3	76 IgG3	88 IgG3	119 IgG3	122 IgG3	139 IgG3	140 IgG3					
<b>F blanc</b>	54 IgG3	76 IgG3	88 IgG3	119 IgG3	122 IgG3	139 IgG3	140 IgG3					
<b>G prot</b>	54 IgG4	76 IgG4	88 IgG4	119 IgG4	122 IgG4	139 IgG4	140 IgG4					
<b>H blanc</b>	54 IgG4	76 IgG4	88 IgG4	119 IgG4	122 IgG4	139 IgG4	140 IgG4					

**Resultado:**

<b>A prot</b>	0,052	<b>0,112</b>	0,053	0,061	<b>0,355</b>	<b>0,16</b>	<b>0,125</b>					
<b>B blanc</b>	0,051	<b>0,049</b>	0,051	0,051	<b>0,05</b>	<b>0,078</b>	<b>0,049</b>					
<b>C prot</b>	0,048	0,052	0,048	0,051	0,078	0,095	0,057					
<b>D blanc</b>	0,049	0,048	0,058	0,051	0,049	0,076	0,075					
<b>E prot</b>	0,062	<b>0,176</b>	0,06	0,064	0,112	0,094	0,07					
<b>F blanc</b>	0,047	<b>0,05</b>	0,052	0,062	0,075	0,076	0,057					
<b>G prot</b>	<b>0,869</b>	<b>1,442</b>	<b>0,816</b>	0,09	<b>1,349</b>	<b>0,898</b>	<b>0,733</b>					
<b>H blanc</b>	<b>0,118</b>	<b>0,052</b>	<b>0,079</b>	0,063	<b>0,075</b>	<b>0,073</b>	<b>0,056</b>					

- 54 → IgG4
- 76 → IgG4 > IgG3 > IgG1
- 88 → IgG4
- 119 → no salen... parece IgG4
- 122 → IgG4 > IgG1
- 139 → IgG4 > IgG1
- 140 → IgG4 > IgG1

## Preparación placas ELISA gangliósidos

- Reconstituir los viales de gangliósidos con 1 ml de cloroformo/metanol (1:1), excepto en el caso de GQ1b que se reconstituyen con 0,5ml. Una vez reconstituidos, se guardan a -20°C
  - GM1: 1 mg + 1 ml → 1 mg/ml
  - GD1b: 1 mg + 1 ml → 1 mg/ml
  - GQ1b: 0,5 mg + 0,5 ml → 1 mg/ml
- Diseñar placas → en este caso se harán así:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	blanco	GM1	GD1b	GQ1b	blanco	GM1	GD1b	GQ1b	blanco	GM1	GD1b	GQ1b
B	blanco	GM1	GD1b	GQ1b	blanco	GM1	GD1b	GQ1b	blanco	GM1	GD1b	GQ1b
C	blanco	GM1	GD1b	GQ1b	blanco	GM1	GD1b	GQ1b	blanco	GM1	GD1b	GQ1b
D	blanco	GM1	GD1b	GQ1b	blanco	GM1	GD1b	GQ1b	blanco	GM1	GD1b	GQ1b
E	blanco	GM1	GD1b	GQ1b	blanco	GM1	GD1b	GQ1b	blanco	GM1	GD1b	GQ1b
F	blanco	GM1	GD1b	GQ1b	blanco	GM1	GD1b	GQ1b	blanco	GM1	GD1b	GQ1b
G	blanco	GM1	GD1b	GQ1b	blanco	GM1	GD1b	GQ1b	blanco	GM1	GD1b	GQ1b
H	blanco	GM1	GD1b	GQ1b	blanco	GM1	GD1b	GQ1b	blanco	GM1	GD1b	GQ1b

- Preparar la solución de metanol+gangliósido en función de las placas que se vayan a preparar. La concentración final es de 2 ug/ml (excepto GQ1b que es 4 ug/ml).  
Para **5 placas** (3 columnas de cada gangliósido/placa):
  - GM1: 15 ml metanol + 30 ul GM1 reconstituído
  - GD1b: 15 ml metanol + 30 ul GD1b reconstituído
  - GQ1b: 15 ml metanol + 30 ul GQ1b reconstituído
- Agitar con vórtex las diluciones
- Poner 100 ul de gangliósido diluído a cada pozo (en la columna que corresponda). En los pozos del blanco se pone sólo metanol
- Dejar secar las placas a temperatura ambiente (preferiblemente en campana extractora) hasta que se evapore el metanol (mínimo 4 horas)
- Congelar las placas a -20°C

24/12/21

---

### ELISA CASPR1 BD (Julia)

**Muestras:**

- 21-2-1820
- 21-2-1821
- 21-2-1822
- 21-413273

**Resultado:** todo negativo

27/12/21

---

### ELISA Gangliósidos día 1 (Julia)

**Muestras:** todas las muestras se hacen por IgG y por IgM, a dilución 1/100 y 1/500 (en total se usarán 16 pozos para cada muestra). En cada placa podremos testar 5 muestras y los controles.

**Protocolo:**

- Descongelar placas con gangliósidos
- **Bloquear** con PBS-BSA 1 % → 200 ul/pozo, incubar 2h a 4°C
- Lavar 2 veces con PBS (en cubeta)
- Preparar diluciones de **sueros** (en PBS-BSA 0'1%)
  - Dil 1/100 (x8 pozos): 1 ml PBS-BSA 0'1% + 10 ul suero
  - Dil 1/500 (x8 pozos): 0,8 ml de PBS-BSA 0'1% + 0,2 ml de la dilución anterior.
    - *En el caso de los controles, como ponemos un suero para IgG y otro para IgM, preparamos la mitad de cada dilución*
- Poner 100 ul de suero a cada pozo, incubar toda la noche a 4°C

**Controles positivos gangliósidos:**

- **C+ IgG:** mezcla 1/1 de 2 muestras
  - **09-4804** Box 107:
    - GM1 >1/12500
    - GD1b >1/12500
    - aGM1 >1/12500
  - **09-4773** Box 106:
    - GQ1b 1/12134
    - GT1a 1/11899

- **C+ IgM:**

- **09-4550 Box 103:**

- GM1 1/5366
    - GM2 >1/12500
    - GM3 >1/12500
    - aGM1 1/1758
    - GD1b 1/3771
    - GD3 1/4533
    - GT1b >1/12500
    - GQ1b 1/3935

\*Ejemplo: si testamos las muestras A1, A2, A3, A4, A5 el esquema de la placa sería el siguiente:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A1 1/100	A1 1/100	A1 1/100	A1 1/100	A2 1/100	A2 1/100	A2 1/100	A2 1/100	A3 1/100	A3 1/100	A3 1/100	A3 1/100
B	A1 1/500	A1 1/500	A1 1/500	A1 1/500	A2 1/500	A2 1/500	A2 1/500	A2 1/500	A3 1/500	A3 1/500	A3 1/500	A3 1/500
C	A4 1/100	A4 1/100	A4 1/100	A4 1/100	A5 1/100	A5 1/100	A5 1/100	A5 1/100	C+ IgG 1/100	C+ IgG 1/100	C+ IgG 1/100	C+ IgG 1/100
D	A4 1/500	A4 1/500	A4 1/500	A4 1/500	A5 1/500	A5 1/500	A5 1/500	A5 1/500	C+ IgG 1/500	C+ IgG 1/500	C+ IgG 1/500	C+ IgG 1/500
E	A1 1/100	A1 1/100	A1 1/100	A1 1/100	A2 1/100	A2 1/100	A2 1/100	A2 1/100	A3 1/100	A3 1/100	A3 1/100	A3 1/100
F	A1 1/500	A1 1/500	A1 1/500	A1 1/500	A2 1/500	A2 1/500	A2 1/500	A2 1/500	A3 1/500	A3 1/500	A3 1/500	A3 1/500
G	A4 1/100	A4 1/100	A4 1/100	A4 1/100	A5 1/100	A5 1/100	A5 1/100	A5 1/100	C+ IgM 1/100	C+ IgM 1/100	C+ IgM 1/100	C+ IgM 1/100
H	A4 1/500	A4 1/500	A4 1/500	A4 1/500	A5 1/500	A5 1/500	A5 1/500	A5 1/500	C+ IgM 1/500	C+ IgM 1/500	C+ IgM 1/500	C+ IgM 1/500

**IgG**    **IgM**

### ELISA CNTN1 titulación (interlab validation)

**Muestras:** claramente positivas por CNTN1

- 141
- 145
- 146
- 150
- 152

**Protocolo:**

- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
- Diluir los **sueros** → preparar un tubo con 400 ul de suero diluído 1/100 en leche 5%, y poner en 5 tubos 280 ul de leche 5%. Pasar 140 ul de dilución del primer tubo al 2º

tubo, y así sucesivamente hasta obtener las 6 diluciones (1/100, 1/300, 1/900, 1/2700, 1/8100 i 1/24300)

- Continuar el proceso con el **Quantalyser (Immuno)**:
  - Incubar con los sueros 1h
  - Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
  - Incubar 45min con **RAH IgG HRP** 1/3000 en leche 5% en PBS-tween 0'1% → 100 ul/pozo
  - Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
  - Incubar 5min con **TMB**: preparar solución un rato antes y tapar de la luz (para que se atempere) → 100 ul/pozo
  - Parar la reacción con 50ul de **H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>** 25%
  - Leer a 450-620 nm

#### **Resultado:**

- 141 → >1/24300
- 145 → >1/24300
- 146 → >1/24300
- 150 → >1/24300
- 152 → >1/24300

#### **ELISA CNTN1 subclases (interlab validation)**

**Muestras:** claramente positivas por CNTN1

- 141
- 145
- 146 → subclases a 1/200
- 150
- 152 → subclases a 1/200

#### **Protocolo:**

- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
- Diluir los **sueros** 1/100 en leche 5% en PBS-tween 0'1% → 100 ul/pozo, 1 h (de cada suero se hacen 8 pozos: 4 subclases)
- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
- Ac secundarios: Incubar con **MAH HRP** IgG1 o IgG2 o IgG3 o IgG4 1/1000 en leche 5% en PBS-tween 0'1% → 100 ul/pozo, 1 h
- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%

- Incubar 5min (o hasta que suba el color) con **TMB**: preparar solución un rato antes y tapar de la luz (para que se atempere) → 100 ul/pozo
- Parar la reacción con 50ul de **H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>** 25%
- Leer a 450-620 nm

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A prot</b>	141 IgG1	145 IgG1	146 IgG1	150 IgG1	152 IgG1							
<b>B blanc</b>	141 IgG1	145 IgG1	146 IgG1	150 IgG1	152 IgG1							
<b>C prot</b>	141 IgG2	145 IgG2	146 IgG2	150 IgG2	152 IgG2							
<b>D blanc</b>	141 IgG2	145 IgG2	146 IgG2	150 IgG2	152 IgG2							
<b>E prot</b>	141 IgG3	145 IgG3	146 IgG3	150 IgG3	152 IgG3							
<b>F blanc</b>	141 IgG3	145 IgG3	146 IgG3	150 IgG3	152 IgG3							
<b>G prot</b>	141 IgG4	145 IgG4	146 IgG4	150 IgG4	152 IgG4							
<b>H blanc</b>	141 IgG4	145 IgG4	146 IgG4	150 IgG4	152 IgG4							

**Resultado:**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A prot</b>	<b>0,412</b>	<b>0,126</b>	0,084	<b>0,302</b>	0,24							
<b>B blanc</b>	0,058	0,054	0,057	0,068	0,135							
<b>C prot</b>	0,063	0,092	0,078	0,067	0,074							
<b>D blanc</b>	0,059	0,056	0,06	0,059	0,067							
<b>E prot</b>	<b>0,515</b>	0,092	0,078	<b>0,327</b>	0,102							
<b>F blanc</b>	0,068	0,062	0,053	0,06	0,088							
<b>G prot</b>	<b>1,848</b>	<b>2,076</b>	<b>2,097</b>	<b>1,705</b>	<b>1,488</b>							
<b>H blanc</b>	0,104	0,105	0,098	0,083	0,177							

- 141 → IgG4 > IgG3 > IgG1
- 145 → IgG4 > IgG1
- 146 → IgG4
- 150 → IgG4 > IgG3 > IgG1
- 152 → IgG4

**28/12/21**

### ELISA Gangliósidos día 2 (Julia)

**Protocolo:**

- Lavar 4 veces con PBS
- Preparar **Ac secundarios**: RAH HRP IgG o IgM dil. 1/3000 en PBS-BSA 0'1%. Poner 100 ul de la dilución a cada pozo, incubar 2h a 4°C
- Lavar 4 veces con PBS
- Preparar el **sustrato**: 1 tableta de OPD + 1 tableta de urea hydrogen peroxidase + 20 ml agua destilada (proteger de la luz con papel de aluminio y agitar).  
Poner 100 ul a cada pozo, incubar 40 min a temperatura ambiente
- Parar la reacción añadiendo 50 ul de **H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>** al 25% a cada pozo.
- Leer en lector de placas de ELISA a 450 nm

**Resultado:** Sale todo bastante alto. A partir de ahora se hace el **Ac secundario a 1/5000**.

	1 blanc	2 gm1	3 gd1b	4 gq1b	5 blanc	6 gm1	7 gd1b	8 gq1b	9 blanc	10 gm1	11 gd1b	12 gq1b
<b>A</b>	420617 9 1/100	420617 9 1/100	420617 9 1/100	420617 9 1/100	575657 1/100	575657 1/100	575657 1/100	575657 1/100	27419 1/100	27419 1/100	27419 1/100	27419 1/100
<b>B</b>	420617 9 1/500	420617 9 1/500	420617 9 1/500	420617 9 1/500	575657 1/500	575657 1/500	575657 1/500	575657 1/500	27419 1/500	27419 1/500	27419 1/500	27419 1/500
<b>C</b>	701985 81 1/100	701985 81 1/100	701985 81 1/100	701985 81 1/100	705254 86 1/100	705254 86 1/100	705254 86 1/100	705254 86 1/100	C+ IgG 1/100	C+ IgG 1/100	C+ IgG 1/100	C+ IgG 1/100
<b>D</b>	701985 81 1/500	701985 81 1/500	701985 81 1/500	701985 81 1/500	705254 86 1/500	705254 86 1/500	705254 86 1/500	705254 86 1/500	C+ IgG 1/500	C+ IgG 1/500	C+ IgG 1/500	C+ IgG 1/500
<b>E</b>	420617 9 1/100	420617 9 1/100	420617 9 1/100	420617 9 1/100	575657 1/100	575657 1/100	575657 1/100	575657 1/100	27419 1/100	27419 1/100	27419 1/100	27419 1/100
<b>F</b>	420617 9 1/500	420617 9 1/500	420617 9 1/500	420617 9 1/500	575657 1/500	575657 1/500	575657 1/500	575657 1/500	27419 1/500	27419 1/500	27419 1/500	27419 1/500
<b>G</b>	701985 81 1/100	701985 81 1/100	701985 81 1/100	701985 81 1/100	705254 86 1/100	705254 86 1/100	705254 86 1/100	705254 86 1/100	C+ IgM 1/100	C+ IgM 1/100	C+ IgM 1/100	C+ IgM 1/100
<b>H</b>	701985 81 1/500	701985 81 1/500	701985 81 1/500	701985 81 1/500	705254 86 1/500	705254 86 1/500	705254 86 1/500	705254 86 1/500	C+ IgM 1/500	C+ IgM 1/500	C+ IgM 1/500	C+ IgM 1/500

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	2,857	1,505	2,653	2,352	0,859	0,942	<b>1,173</b>	0,821	1,086	1,15	0,841	0,937
<b>B</b>	1,409	1,133	1,346	0,966	0,498	0,446	<b>0,648</b>	<b>0,669</b>	0,548	<b>0,829</b>	0,528	0,428
<b>C</b>	1,483	1,53	<b>1,849</b>	1,213	1,921	1,728	<b>2,589</b>	1,702	1,827	<b>3,639</b>	<b>3,604</b>	<b>3,432</b>
<b>D</b>	0,717	<b>0,868</b>	<b>0,83</b>	0,799	1,238	0,865	1,168	1,207	1,344	<b>3,599</b>	<b>3,493</b>	<b>2,9</b>
<b>E</b>	2,481	<b>2,66</b>	<b>2,993</b>	<b>2,785</b>	1,414	0,596	0,923	0,679	1,959	0,712	1,313	0,802
<b>F</b>	1,845	1,444	1,765	1,438	0,563	0,283	0,456	0,287	1,195	0,429	0,607	0,338
<b>G</b>	1,306	1,386	0,896	0,666	1,259	1,105	1,141	0,831	1,984	1,764	<b>2,939</b>	<b>2,26</b>
<b>H</b>	0,689	0,612	0,374	0,278	0,605	0,477	0,424	0,325	1,255	1,148	<b>2,731</b>	<b>1,772</b>



29/12/21

### Resultado ELISA Gangliósidos - estudio vacunas EM (Julia)

	1 blanc	2 gm1	3 gd1b	4 gq1b	5 blanc	6 gm1	7 gd1b	8 gq1b	9 blanc	10 gm1	11 gd1b	12 gq1b
<b>A</b>	400078 9 1/100	400078 9 1/100	400078 9 1/100	400078 9 1/100	607739 1/100	607739 1/100	607739 1/100	607739 1/100	518938 6 1/100	518938 6 1/100	518938 6 1/100	518938 6 1/100
<b>B</b>	400078 9 1/500	400078 9 1/500	400078 9 1/500	400078 9 1/500	607739 1/500	607739 1/500	607739 1/500	607739 1/500	518938 6 1/500	518938 6 1/500	518938 6 1/500	518938 6 1/500
<b>C</b>	468859 5 1/100	468859 5 1/100	468859 5 1/100	468859 5 1/100	433184 7 1/100	433184 7 1/100	433184 7 1/100	433184 7 1/100	C+ IgG 1/100	C+ IgG 1/100	C+ IgG 1/100	C+ IgG 1/100
<b>D</b>	468859 5 1/500	468859 5 1/500	468859 5 1/500	468859 5 1/500	433184 7 1/500	433184 7 1/500	433184 7 1/500	433184 7 1/500	C+ IgG 1/500	C+ IgG 1/500	C+ IgG 1/500	C+ IgG 1/500
<b>E</b>	400078 9 1/100	400078 9 1/100	400078 9 1/100	400078 9 1/100	607739 1/100	607739 1/100	607739 1/100	607739 1/100	518938 6 1/100	518938 6 1/100	518938 6 1/100	518938 6 1/100
<b>F</b>	400078 9 1/500	400078 9 1/500	400078 9 1/500	400078 9 1/500	607739 1/500	607739 1/500	607739 1/500	607739 1/500	518938 6 1/500	518938 6 1/500	518938 6 1/500	518938 6 1/500
<b>G</b>	468859 5 1/100	468859 5 1/100	468859 5 1/100	468859 5 1/100	433184 7 1/100	433184 7 1/100	433184 7 1/100	433184 7 1/100	C+ IgM 1/100	C+ IgM 1/100	C+ IgM 1/100	C+ IgM 1/100
<b>H</b>	468859 5 1/500	468859 5 1/500	468859 5 1/500	468859 5 1/500	433184 7 1/500	433184 7 1/500	433184 7 1/500	433184 7 1/500	C+ IgM 1/500	C+ IgM 1/500	C+ IgM 1/500	C+ IgM 1/500

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	1,751	1,109	1,15	1,25	1,334	1,086	0,919	<b>1,522</b>	1,76	1,406	1,498	1,234
<b>B</b>	0,6	0,56	0,548	0,514	0,822	0,768	0,634	0,6	0,797	0,848	0,791	0,585
<b>C</b>	0,642	0,641	0,501	0,475	1,185	0,943	0,857	0,83	1,578	<b>3,687</b>	<b>3,686</b>	<b>3,535</b>
<b>D</b>	0,293	0,323	0,296	0,323	0,489	0,562	0,403	0,498	0,994	<b>3,66</b>	<b>3,614</b>	<b>1,806</b>
<b>E</b>	1,188	0,787	0,636	0,542	1,588	1,28	1,271	1,209	1,562	1,52	0,992	0,854
<b>F</b>	0,619	0,382	0,286	0,274	1,007	0,758	0,58	0,558	0,916	0,649	0,42	0,392
<b>G</b>	0,459	0,373	0,306	0,269	0,6	0,326	0,281	0,228	1,596	1,646	<b>2,903</b>	<b>2,244</b>
<b>H</b>	0,205	0,177	0,157	0,127	0,348	0,185	0,17	0,167	0,932	0,997	<b>2,683</b>	<b>1,218</b>

30/12/21

### Resultado ELISA Gangliósidos - estudio vacunas EM (Julia)

	1 blanc	2 gm1	3 gd1b	4 gq1b	5 blanc	6 gm1	7 gd1b	8 gq1b	9 blanc	10 gm1	11 gd1b	12 gq1b
<b>A</b>	139910 1/100	139910 1/100	139910 1/100	139910 1/100	421370 4 1/100	421370 4 1/100	421370 4 1/100	421370 4 1/100	705983 00 1/100	705983 00 1/100	705983 00 1/100	705983 00 1/100
<b>B</b>	139910 1/500	139910 1/500	139910 1/500	139910 1/500	421370 4 1/500	421370 4 1/500	421370 4 1/500	421370 4 1/500	705983 00 1/500	705983 00 1/500	705983 00 1/500	705983 00 1/500
<b>C</b>	391156 1/100	391156 1/100	391156 1/100	391156 1/100	406572 9 1/100	406572 9 1/100	406572 9 1/100	406572 9 1/100	C+ IgG 1/100	C+ IgG 1/100	C+ IgG 1/100	C+ IgG 1/100
<b>D</b>	391156 1/500	391156 1/500	391156 1/500	391156 1/500	406572 9 1/500	406572 9 1/500	406572 9 1/500	406572 9 1/500	C+ IgG 1/500	C+ IgG 1/500	C+ IgG 1/500	C+ IgG 1/500
<b>E</b>	139910 1/100	139910 1/100	139910 1/100	139910 1/100	421370 4 1/100	421370 4 1/100	421370 4 1/100	421370 4 1/100	705983 00 1/100	705983 00 1/100	705983 00 1/100	705983 00 1/100
<b>F</b>	139910 1/500	139910 1/500	139910 1/500	139910 1/500	421370 4 1/500	421370 4 1/500	421370 4 1/500	421370 4 1/500	705983 00 1/500	705983 00 1/500	705983 00 1/500	705983 00 1/500
<b>G</b>	391156 1/100	391156 1/100	391156 1/100	391156 1/100	406572 9 1/100	406572 9 1/100	406572 9 1/100	406572 9 1/100	C+ IgM 1/100	C+ IgM 1/100	C+ IgM 1/100	C+ IgM 1/100
<b>H</b>	391156 1/500	391156 1/500	391156 1/500	391156 1/500	406572 9 1/500	406572 9 1/500	406572 9 1/500	406572 9 1/500	C+ IgM 1/500	C+ IgM 1/500	C+ IgM 1/500	C+ IgM 1/500

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	0,941	<b>2,195</b>	<b>1,176</b>	0,761	1,481	0,953	1,213	0,852	1,521	<b>1,918</b>	1,455	1,483
<b>B</b>	0,607	<b>0,839</b>	0,447	0,579	0,881	0,534	0,619	0,342	0,942	0,815	0,597	0,522
<b>C</b>	1,109	<b>1,302</b>	1,12	0,875	1,221	<b>1,537</b>	0,953	1,187	2,254	<b>3,707</b>	<b>3,693</b>	<b>3,629</b>
<b>D</b>	0,514	0,559	<b>0,784</b>	<b>0,681</b>	0,789	<b>0,928</b>	0,747	0,771	1,502	<b>3,702</b>	<b>3,653</b>	<b>2,985</b>
<b>E</b>	0,669	0,381	0,431	0,3	1,112	0,449	0,416	0,312	1,141	1,11	0,852	0,6
<b>F</b>	0,299	0,17	0,187	0,146	0,392	0,191	0,204	0,154	0,517	0,432	0,289	0,251
<b>G</b>	0,786	0,38	0,289	0,282	1,463	1,219	1,051	0,761	1,577	1,869	<b>2,852</b>	<b>1,886</b>
<b>H</b>	0,385	0,186	0,146	0,15	0,837	0,501	0,394	0,305	0,912	0,977	<b>2,905</b>	<b>1,232</b>