

04/01/22

✓ 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
A	706007 73 1/100	706007 73 1/100	706007 73 1/100	706007 73 1/100	465156 7 1/100	465156 7 1/100	465156 7 1/100	465156 7 1/100	452721 8 1/100	452721 8 1/100	452721 8 1/100	452721 8 1/100
B	706007 73 1/500	706007 73 1/500	706007 73 1/500	706007 73 1/500	465156 7 1/500	465156 7 1/500	465156 7 1/500	465156 7 1/500	452721 8 1/500	452721 8 1/500	452721 8 1/500	452721 8 1/500
C	422506 9 1/100	422506 9 1/100	422506 9 1/100	422506 9 1/100	518801 0 1/100	518801 0 1/100	518801 0 1/100	518801 0 1/100	C+ IgG 1/100	C+ IgG 1/100	C+ IgG 1/100	C+ IgG 1/100
D	422506 9 1/500	422506 9 1/500	422506 9 1/500	422506 9 1/500	518801 0 1/500	518801 0 1/500	518801 0 1/500	518801 0 1/500	C+ IgG 1/500	C+ IgG 1/500	C+ IgG 1/500	C+ IgG 1/500
E	706007 73 1/100	706007 73 1/100	706007 73 1/100	706007 73 1/100	465156 7 1/100	465156 7 1/100	465156 7 1/100	465156 7 1/100	452721 8 1/100	452721 8 1/100	452721 8 1/100	452721 8 1/100
F	706007 73 1/500	706007 73 1/500	706007 73 1/500	706007 73 1/500	465156 7 1/500	465156 7 1/500	465156 7 1/500	465156 7 1/500	452721 8 1/500	452721 8 1/500	452721 8 1/500	452721 8 1/500
G	422506 9 1/100	422506 9 1/100	422506 9 1/100	422506 9 1/100	518801 0 1/100	518801 0 1/100	518801 0 1/100	518801 0 1/100	C+ IgM 1/100	C+ IgM 1/100	C+ IgM 1/100	C+ IgM 1/100
H	422506 9 1/500	422506 9 1/500	422506 9 1/500	422506 9 1/500	518801 0 1/500	518801 0 1/500	518801 0 1/500	518801 0 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
A	0,527	0,661	0,624	0,492	0,694	0,871	0,943	0,925	0,818	0,871	0,59	0,54
B	0,306	0,487	0,362	0,434	0,391	0,527	0,506	0,454	0,435	0,506	0,504	0,583
C	0,92	1,369	0,772	0,937	0,599	0,56	0,463	0,6	1,525	3,68	3,68	3,552
D	0,411	0,514	0,375	0,384	0,245	0,468	0,286	0,234	0,805	3,632	3,581	2,423
E	1,2	0,715	0,663	0,684	0,872	0,681	0,607	0,406	0,593	0,364	0,26	0,246
F	0,536	0,299	0,319	0,226	0,448	0,319	0,279	0,212	0,378	0,18	0,177	0,152
G	0,6	0,28	0,292	0,24	0,307	0,232	0,184	0,181	1,178	1,297	2,694	1,764
H	0,313	0,156	0,155	0,121	0,154	0,123	0,106	0,105	0,616	0,749	1,955	0,92

05/01/22

✓ 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
A	530911 1/100	530911 1/100	530911 1/100	530911 1/100	707253 93 1/100	707253 93 1/100	707253 93 1/100	707253 93 1/100	416627 5 1/100	416627 5 1/100	416627 5 1/100	416627 5 1/100
B	530911 1/500	530911 1/500	530911 1/500	530911 1/500	707253 93 1/500	707253 93 1/500	707253 93 1/500	707253 93 1/500	416627 5 1/500	416627 5 1/500	416627 5 1/500	416627 5 1/500
C	521299 4 1/100	521299 4 1/100	521299 4 1/100	521299 4 1/100	364771 1/100	364771 1/100	364771 1/100	364771 1/100	C+ IgG 1/100	C+ IgG 1/100	C+ IgG 1/100	C+ IgG 1/100
D	521299 4 1/500	521299 4 1/500	521299 4 1/500	521299 4 1/500	364771 1/500	364771 1/500	364771 1/500	364771 1/500	C+ IgG 1/500	C+ IgG 1/500	C+ IgG 1/500	C+ IgG 1/500
E	706007 73 1/100	706007 73 1/100	706007 73 1/100	706007 73 1/100	465156 7 1/100	465156 7 1/100	465156 7 1/100	465156 7 1/100	452721 8 1/100	452721 8 1/100	452721 8 1/100	452721 8 1/100
F	706007 73 1/500	706007 73 1/500	706007 73 1/500	706007 73 1/500	465156 7 1/500	465156 7 1/500	465156 7 1/500	465156 7 1/500	452721 8 1/500	452721 8 1/500	452721 8 1/500	452721 8 1/500
G	422506 9 1/100	422506 9 1/100	422506 9 1/100	422506 9 1/100	518801 0 1/100	518801 0 1/100	518801 0 1/100	518801 0 1/100	C+ IgM 1/100	C+ IgM 1/100	C+ IgM 1/100	C+ IgM 1/100
H	422506 9 1/500	422506 9 1/500	422506 9 1/500	422506 9 1/500	518801 0 1/500	518801 0 1/500	518801 0 1/500	518801 0 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
A	0,684	0,905	0,51	0,499	0,398	0,316	0,34	0,279	0,812	0,63	0,647	0,397
B	0,33	0,325	0,239	0,261	0,228	0,228	0,193	0,238	0,373	0,309	0,358	0,212
C	0,962	1,08	0,667	0,84	0,684	0,915	0,731	0,468	1,108	3,627	3,633	3,405
D	0,152	0,169	0,157	0,144	0,363	0,514	0,324	0,336	0,978	3,619	3,55	1,493
E	0,239	0,241	0,185	0,18	0,604	0,578	0,678	0,501	1,196	0,617	0,522	0,302
F	0,166	0,116	0,094	0,122	0,205	0,242	0,266	0,232	0,528	0,26	0,225	0,155
G	0,21	0,194	0,135	0,144	0,526	0,363	0,35	0,275	0,945	0,961	1,979	1,041
H	0,082	0,113	0,077	0,075	0,244	0,16	0,15	0,125	0,545	0,596	1,385	0,569

10/01/2022

Coating Poly-D.Lys (culture slides)

Coating 19 culture slides con Poly-D 1/40 en PBS1x (de stock poly-d 1 mg/ml) → aprox 300 ul por pocillo

11/01/2022

Coating células + transfección Culture slides

19 culture slides:

- 2 Plexin (para Elba) → ricerca
- 10 Perfil → 2 ricerca, 8 IMM
- 2 LRP4 → IMM
- 2 LRP4/CASPR2 → IMM
- 1 NF155/NF186 → ricerca
- 2 NF155/CNTN1 → IMM

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 NF186 (interlab validation)

[NF186]_i = 0,2 mg/ml

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

- NF186: 144 pozos → [NF186]_f = 1 ug/ml → aprox 7,5 ml buffer + 37,5 ul

✓ 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
A	724222 1/100	724222 1/100	724222 1/100	724222 1/100	535889 1/100	535889 1/100	535889 1/100	535889 1/100	485880 6 1/100	485880 6 1/100	485880 6 1/100	485880 6 1/100
B	724222 1/500	724222 1/500	724222 1/500	724222 1/500	535889 1/500	535889 1/500	535889 1/500	535889 1/500	485880 6 1/500	485880 6 1/500	485880 6 1/500	485880 6 1/500
C	521133 1 1/100	521133 1 1/100	521133 1 1/100	521133 1 1/100	800759 33 1/100	800759 33 1/100	800759 33 1/100	800759 33 1/100	C+ IgG 1/100	C+ IgG 1/100	C+ IgG 1/100	C+ IgG 1/100
D	521133 1 1/500	521133 1 1/500	521133 1 1/500	521133 1 1/500	800759 33 1/500	800759 33 1/500	800759 33 1/500	800759 33 1/500	C+ IgG 1/500	C+ IgG 1/500	C+ IgG 1/500	C+ IgG 1/500
E	724222 1/100	724222 1/100	724222 1/100	724222 1/100	535889 1/100	535889 1/100	535889 1/100	535889 1/100	485880 6 1/100	485880 6 1/100	485880 6 1/100	485880 6 1/100
F	724222 1/500	724222 1/500	724222 1/500	724222 1/500	535889 1/500	535889 1/500	535889 1/500	535889 1/500	485880 6 1/500	485880 6 1/500	485880 6 1/500	485880 6 1/500
G	521133 1 1/100	521133 1 1/100	521133 1 1/100	521133 1 1/100	800759 33 1/100	800759 33 1/100	800759 33 1/100	800759 33 1/100	C+ IgM 1/100	C+ IgM 1/100	C+ IgM 1/100	C+ IgM 1/100
H	521133 1 1/500	521133 1 1/500	521133 1 1/500	521133 1 1/500	800759 33 1/500	800759 33 1/500	800759 33 1/500	800759 33 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
A	0,521	0,312	0,223	0,214	0,764	0,577	0,39	0,319	0,321	0,33	0,246	0,249
B	0,246	0,166	0,145	0,177	0,339	0,251	0,202	0,156	0,201	0,173	0,126	0,112
C	0,401	0,37	0,321	0,376	0,804	0,434	0,377	0,322	1,014	3,611	3,619	3,378
D	0,243	0,205	0,162	0,177	0,394	0,253	0,175	0,155	0,451	3,54	3,453	1,961
E	1,145	0,756	0,653	0,593	0,665	0,48	0,341	0,078	0,463	0,3	0,293	0,197
F	0,708	0,378	0,272	0,22	0,308	0,194	0,152	0,133	0,215	0,14	0,126	0,107
G	0,771	0,472	0,418	0,253	1,753	1,128	1,037	0,99	1,761	1,442	2,924	2,377
H	0,454	0,226	0,224	0,157	0,808	0,424	0,422	0,406	0,858	0,603	2,552	1,384

12/01/2022

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, bloquear y congelar a -80°C

13/01/2022

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 (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 CO₂ (dins de la campana) → obrir la clau fins al número 2, pujar CO₂ 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 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 4 plaques de 60 cc amb cubres i 5 places de 100 cc sense cubres**)

Coating ELISA CASPR1 (interlab validation)

[CASPR1]_i = 0,789 mg/ml

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

- CASPR1: 144 pozos (3 placas) → [CASPR1]_f = 5 ug/ml → 7,5 ml buffer + 47,5 ul

✓ 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
A	487030 5 1/100	487030 5 1/100	487030 5 1/100	487030 5 1/100	683633 1/100	683633 1/100	683633 1/100	683633 1/100	368893 1/100	368893 1/100	368893 1/100	368893 1/100
B	487030 5 1/500	487030 5 1/500	487030 5 1/500	487030 5 1/500	683633 1/500	683633 1/500	683633 1/500	683633 1/500	368893 1/500	368893 1/500	368893 1/500	368893 1/500
C	701775 07 1/100	701775 07 1/100	701775 07 1/100	701775 07 1/100	438715 9 1/100	438715 9 1/100	438715 9 1/100	438715 9 1/100	C+ IgM 1/100	C+ IgM 1/100	C+ IgM 1/100	C+ IgM 1/100
D	701775 07 1/500	701775 07 1/500	701775 07 1/500	701775 07 1/500	438715 9 1/500	438715 9 1/500	438715 9 1/500	438715 9 1/500	C+ IgM 1/500	C+ IgM 1/500	C+ IgM 1/500	C+ IgM 1/500
E	487030 5 1/100	487030 5 1/100	487030 5 1/100	487030 5 1/100	683633 1/100	683633 1/100	683633 1/100	683633 1/100	368893 1/100	368893 1/100	368893 1/100	368893 1/100
F	487030 5 1/500	487030 5 1/500	487030 5 1/500	487030 5 1/500	683633 1/500	683633 1/500	683633 1/500	683633 1/500	368893 1/500	368893 1/500	368893 1/500	368893 1/500
G	701775 07 1/100	701775 07 1/100	701775 07 1/100	701775 07 1/100	438715 9 1/100	438715 9 1/100	438715 9 1/100	438715 9 1/100	C+ IgG 1/100	C+ IgG 1/100	C+ IgG 1/100	C+ IgG 1/100
H	701775 07 1/500	701775 07 1/500	701775 07 1/500	701775 07 1/500	438715 9 1/500	438715 9 1/500	438715 9 1/500	438715 9 1/500	C+ IgG 1/500	C+ IgG 1/500	C+ IgG 1/500	C+ IgG 1/500

*Va posar els Ac secundaris al revés

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1,711	0,625	0,615	0,497	1,049	0,451	0,415	0,356	0,823	0,848	0,678	0,562
B	1,185	0,327	0,287	0,242	0,523	0,258	0,223	0,188	0,466	0,416	0,447	0,257
C	0,554	0,665	0,528	0,228	0,651	0,298	0,351	0,276	1,046	0,809	2,165	1,591
D	0,23	0,26	0,198	0,126	0,288	0,158	0,163	0,149	0,626	0,539	2,003	0,927
E	0,563	0,466	0,463	0,71	1,143	0,84	0,944	0,878	0,592	0,675	0,846	0,922
F	0,367	0,243	0,266	0,339	0,565	0,449	0,479	0,521	0,384	0,361	0,519	0,552
G	0,594	0,656	0,711	0,971	0,562	0,459	0,751	0,72	1,57	3,925	3,985	3,342
H	0,256	0,305	0,387	0,479	0,288	0,195	0,258	0,313	0,715	3,401	3,362	1,622

14/01/2022

ICC confirmaciones (interlab validation)

Muestras: (dudosas, las hago a 1/100 igualmente)

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

Combinaciones portas:

	CNTN1	NF140	NF155	NF186
Porta NF155/CNTN1	36, 37, 48, 68		5, 27, 56, 63	
Porta NF155/NF186			68, 148, C-, C+	5, 13, 22, 34
Porta Perfil	86, C+	C-, C+	C-, C+	63, C+

Resultado:

- 5 → NF155 +, NF186 +
- 13 → NF186 -
- 22 → NF186 +
- 27 → NF155 -
- 34 → NF186 +
- 36 → CNTN1 -
- 37 → CNTN1 +
- 48 → CNTN1 -
- 56 → NF155 +
- 63 → NF155 -, NF186 -
- 68 → CNTN1 +, NF155 + muy débil (dudas)
- 86 → CNTN1 + muy débil (dudas)
- 148 → NF155 +

ICC Perfil nodales/paranodales (BD)

Muestras y resultado: (2 portas perfil)

- 21-2-1820 → neg
- 21-2-1821 → neg
- 21-2-1822 → repetir CNTN1
- 22-2-0007 → repetir CNTN1
- 22-2-0010 → neg
- 22-2-0011 → NF155 + → TITULAR!!

17/01/2022

ELISA screening NF186 y CASPR1 (interlab validation)

Muestras:

- 47-92
- 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 **H₂SO₄** 25%
 - Leer a 450-620 nm

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

18/01/2022

Coating células + transfección Culture slides

18 culture slides:

- 12 Perfil
- 4 LRP4
- 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

✓ 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
A	510557 1/100	510557 1/100	510557 1/100	510557 1/100	4952509 1/100	4952509 1/100	4952509 1/100	4952509 1/100	4183342 1/100	4183342 1/100	4183342 1/100	4183342 1/100
B	510557 1/500	510557 1/500	510557 1/500	510557 1/500	4952509 1/500	4952509 1/500	4952509 1/500	4952509 1/500	4183342 1/500	4183342 1/500	4183342 1/500	4183342 1/500
C	4274088 1/100	4274088 1/100	4274088 1/100	4274088 1/100	4964212 1/100	4964212 1/100	4964212 1/100	4964212 1/100	C+ IgG 1/100	C+ IgG 1/100	C+ IgG 1/100	C+ IgG 1/100
D	4274088 1/500	4274088 1/500	4274088 1/500	4274088 1/500	4964212 1/500	4964212 1/500	4964212 1/500	4964212 1/500	C+ IgG 1/500	C+ IgG 1/500	C+ IgG 1/500	C+ IgG 1/500
E	510557 1/100	510557 1/100	510557 1/100	510557 1/100	4952509 1/100	4952509 1/100	4952509 1/100	4952509 1/100	4183342 1/100	4183342 1/100	4183342 1/100	4183342 1/100
F	510557 1/500	510557 1/500	510557 1/500	510557 1/500	4952509 1/500	4952509 1/500	4952509 1/500	4952509 1/500	4183342 1/500	4183342 1/500	4183342 1/500	4183342 1/500
G	4274088 1/100	4274088 1/100	4274088 1/100	4274088 1/100	4964212 1/100	4964212 1/100	4964212 1/100	4964212 1/100	C+ IgM 1/100	C+ IgM 1/100	C+ IgM 1/100	C+ IgM 1/100
H	4274088 1/500	4274088 1/500	4274088 1/500	4274088 1/500	4964212 1/500	4964212 1/500	4964212 1/500	4964212 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
A	1,283	1,129	1,164	1,466	1,1	0,96	0,843	0,88	1,667	1,491	1,657	1,502
B	0,659	0,796	0,641	0,756	0,47	0,452	0,37	0,579	1,184	0,84	0,858	0,875
C	1,04	1,159	0,822	0,898	0,883	0,765	0,782	0,654	1,904	3,64	3,708	3,54
D	0,406	0,484	0,475	0,37	0,531	0,392	0,376	0,348	1,065	3,614	3,587	2,277
E	0,82	0,783	0,545	0,357	1,051	1,087	1,394	0,674	1,214	0,795	0,777	0,613
F	0,501	0,318	0,259	0,173	0,514	0,445	0,641	0,29	0,75	0,418	0,353	0,317
G	0,719	0,449	0,362	0,292	1,143	0,529	0,68	0,497	1,281	1,327	2,105	1,656
H	0,295	0,21	0,176	0,192	0,554	0,21	0,333	0,225	0,884	0,838	2,135	1,133

ELISA screening NF186 y CASPR1 (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 **H₂SO₄** 25%
 - Leer a 450-620 nm

19/01/2022

✓ 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
A	511819 9 1/100	511819 9 1/100	511819 9 1/100	511819 9 1/100	492024 5 1/100	492024 5 1/100	492024 5 1/100	492024 5 1/100	469221 3 1/100	469221 3 1/100	469221 3 1/100	469221 3 1/100
B	511819 9 1/500	511819 9 1/500	511819 9 1/500	511819 9 1/500	492024 5 1/500	492024 5 1/500	492024 5 1/500	492024 5 1/500	469221 3 1/500	469221 3 1/500	469221 3 1/500	469221 3 1/500
C	517576 1 1/100	517576 1 1/100	517576 1 1/100	517576 1 1/100	706674 40 1/100	706674 40 1/100	706674 40 1/100	706674 40 1/100	C+ IgG 1/100	C+ IgG 1/100	C+ IgG 1/100	C+ IgG 1/100
D	517576 1 1/500	517576 1 1/500	517576 1 1/500	517576 1 1/500	706674 40 1/500	706674 40 1/500	706674 40 1/500	706674 40 1/500	C+ IgG 1/500	C+ IgG 1/500	C+ IgG 1/500	C+ IgG 1/500
E	510557 1/100	510557 1/100	510557 1/100	510557 1/100	495250 9 1/100	495250 9 1/100	495250 9 1/100	495250 9 1/100	418334 2 1/100	418334 2 1/100	418334 2 1/100	418334 2 1/100
F	510557 1/500	510557 1/500	510557 1/500	510557 1/500	495250 9 1/500	495250 9 1/500	495250 9 1/500	495250 9 1/500	418334 2 1/500	418334 2 1/500	418334 2 1/500	418334 2 1/500
G	427408 8 1/100	427408 8 1/100	427408 8 1/100	427408 8 1/100	496421 2 1/100	496421 2 1/100	496421 2 1/100	496421 2 1/100	C+ IgM 1/100	C+ IgM 1/100	C+ IgM 1/100	C+ IgM 1/100
H	427408 8 1/500	427408 8 1/500	427408 8 1/500	427408 8 1/500	496421 2 1/500	496421 2 1/500	496421 2 1/500	496421 2 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
A	0,687	0,678	0,675	0,799	1,47	1,023	1,034	1,106	1,336	1,561	1,345	1,01
B	0,369	0,377	0,408	0,461	0,79	0,631	0,67	0,633	0,685	0,769	0,675	0,777
C	0,723	0,627	0,823	0,835	0,993	1,065	1,162	1,017	1,784	3,678	3,676	3,509
D	0,441	0,318	0,501	0,362	0,554	0,503	0,436	0,452	1,089	3,621	3,612	1,497
E	0,655	0,652	0,553	0,339	1,714	0,809	0,715	0,453	1,45	0,911	0,87	0,681
F	0,592	0,303	0,239	0,19	0,87	0,373	0,287	0,244	0,811	0,437	0,39	0,323
G	1,215	0,807	0,583	0,461	0,95	0,542	0,594	0,482	1,254	1,313	2,648	1,729
H	0,643	0,439	0,35	0,257	0,416	0,29	0,308	0,256	0,941	0,703	2,506	1,3

ELISA screening NF186 y CASPR1 (interlab validation)

Muestras: (34 pocillos proteína/ placa)

- Cneg
- Cpos
- **139-170**

Añadir en la placa CASPR1 (al final): en total habrá 40 pocillos proteína

- 3 pocillos CNTN1 (C-, C+ y muestra **86**)
- 3 pocillos NF155 (C-, C+ y muestra **148**)

Añadir en la placa NF186 (al final): en total habrá 37 pocillos proteína (añadir pozos blancos como si hubiera 40)

- 3 pocillos más de NF186 (muestras **22, 71 y 96**)

En la máquina pongo que hay 38 muestras, pero no pongo los tubos de las muestras para repetir → incubar a mano.

*Sobretudo coger nuevos sueros control, y coger nuevo anticuerpo secundario.

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 **H₂SO₄** 25%
 - Leer a 450-620 nm

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, bloquear y congelar a -80°C

20/01/2022

ELISA CASPR1 titulación (interlab validation)

Muestras:

- | | |
|------|-------|
| · 11 | · 128 |
| · 28 | · 158 |
| · 42 | · 163 |
| · 80 | · 167 |

*De muestra 167 sólo hago 4 diluciones, y los otros 2 pocillos los uso para C+ y C-

*Uso la placa nueva hecha el 19/01/22

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 (a: 1/100, b:1/300, c:1/900, d: 1/2700, e: 1/8100 i f: 1/24300)
- Continuar el proceso con el **Quantalyser (Immuno)**: *En este caso lo hago manual!!
 - 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 **H₂SO₄** 25%
 - Leer a 450-620 nm

Resultado:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	11a	11e	28c	42a	42e	80c	128a	128e	158c	163a	163e	167c
B blanc	11a	11e	28c	42a	42e	80c	128a	128e	158c	163a	163e	167c
C prot	11b	11f	28d	42b	42f	80d	128b	128f	158d	163b	163f	167d
D blanc	11b	11f	28d	42b	42f	80d	128b	128f	158d	163b	163f	167d
E prot	11c	28a	28e	42c	80a	80e	128c	158a	158e	163c	167a	Cneg
F blanc	11c	28a	28e	42c	80a	80e	128c	158a	158e	163c	167a	Cneg
G prot	11d	28b	28f	42d	80b	80f	128d	158b	158f	163d	167b	Cpos
H blanc	11d	28b	28f	42d	80b	80f	128d	158b	158f	163d	167b	Cpos

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	1,113	0,19	0,309	0,63	0,048	0,3	0,754	0,036	0,78	1,18	0,262	0,244
B blanc	0,126	0,007	0,018	0,029	0,007	0,009	0,076	0,007	0,028	0,12	0,008	0,015
C prot	0,954	0,073	0,116	0,394	0,024	0,116	0,433	0,015	0,449	0,954	0,095	0,101
D blanc	0,062	0,006	0,003	0,014	0,013	0,008	0,038	0,012	0,012	0,053	0,007	0,01
E prot	0,72	0,589	0,064	0,239	0,818	0,058	0,221	0,996	0,234	0,763	0,774	0,076
F blanc	0,03	0,083	0,01	0,021	0,082	0,019	0,013	0,082	0,006	0,029	0,089	0,078
G prot	0,522	0,484	0,03	0,112	0,597	0,034	0,101	0,989	0,079	0,587	0,527	0,527
H blanc	0,038	0,072	0,025	0,032	0,043	0,025	0,029	0,057	0,029	0,037	0,086	0,173

- 11 → >1/24300
- 28 → 1/8100
- 42 → 1/2700

- 80 → 1/8100
- 128 → 1/2700
- 158 → >1/24300
- 163 → >1/24300
- 167 → 1/2700

ELISA CASPR1 subclases (interlab validation)

Muestras:

- | | |
|------|-------|
| · 11 | · 128 |
| · 28 | · 158 |
| · 42 | · 163 |
| · 80 | · 167 |

*Hacer C- y C+ (a 1/100 IgG totales) → uso placa CASPR1 hecha 13/01/21

*Pongo 2 pozos de NF186 (placas 11/01/21) → C- y C+ → para ver si con el ELISA manual sale mejor.

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 **H₂SO₄** 25%
- Leer a 450-620 nm

Resultado:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	11 IgG1	28 IgG1	42 IgG1	80 IgG1	128 IgG1	158 IgG1	163 IgG1	167 IgG1	Cneg	Cneg NF186		
B blanc	11 IgG1	28 IgG1	42 IgG1	80 IgG1	128 IgG1	158 IgG1	163 IgG1	167 IgG1	Cneg	Cneg NF186		
C prot	11 IgG2	28 IgG2	42 IgG2	80 IgG2	128 IgG2	158 IgG2	163 IgG2	167 IgG2	Cpos	Cpos NF186		
D blanc	11 IgG2	28 IgG2	42 IgG2	80 IgG2	128 IgG2	158 IgG2	163 IgG2	167 IgG2	Cpos	Cpos NF186		
E prot	11 IgG3	28 IgG3	42 IgG3	80 IgG3	128 IgG3	158 IgG3	163 IgG3	167 IgG3		Cneg NF186		
F blanc	11 IgG3	28 IgG3	42 IgG3	80 IgG3	128 IgG3	158 IgG3	163 IgG3	167 IgG3		Cneg NF186		
G prot	11 IgG4	28 IgG4	42 IgG4	80 IgG4	128 IgG4	158 IgG4	163 IgG4	167 IgG4		Cpos NF186		
H blanc	11 IgG4	28 IgG4	42 IgG4	80 IgG4	128 IgG4	158 IgG4	163 IgG4	167 IgG4		Cpos NF186		

Pozos placa CASPR1 día 13/01/22 (utilizadas días 17,18,19/01)

Pozos placa NF186 día 11/01/22 (utilizadas días 17,18,19/01)

Pozos placa NF186 día 19/01/22 (nueva)

Resultado:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	0,31	0,035	0,101	0,1	0,377	0,386	0,373	0,431	0,084	0,115		
B blanc	0,019	0,012	0,008	0,007	0,008	0,009	0,014	0,015	0,077	0,095		
C prot	0,035	0,016	0,015	0,015	0,009	0,046	0,047	0,014	0,38	0,203		
D blanc	0,01	0,008	0,008	0,007	0,008	0,01	0,01	0,011	0,159	0,085		
E prot	0,08	0,021	0,018	0,021	0,352	0,027	0,025	0,347		0,142		
F blanc	0,011	0,012	0,011	0,008	0,007	0,111	0,007	0,011		0,104		
G prot	1,336	1,133	1,09	1,173	0,384	1,167	1,116	0,286		0,371		
H blanc	0,039	0,025	0,023	0,021	0,022	0,027	0,027	0,027		0,173		

Coating ELISA NF186 (interlab validation)

[NF186]i = 0,2 mg/ml

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

· NF186: 48 pozos → [NF186]f = 3 ug/ml → 2,5 ml buffer + 37,5 ul

*Preparo 1 placa a 3 ug/ml para ver si sale mejor que a 1 ug/ml

*Julia prepara 1 placa de CNTN1 y una de NF155

21/01/2022

✓ 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
A	641216 1/100	641216 1/100	641216 1/100	641216 1/100	5285494 1/100	5285494 1/100	5285494 1/100	5285494 1/100	4795584 1/100	4795584 1/100	4795584 1/100	4795584 1/100
B	641216 1/500	641216 1/500	641216 1/500	641216 1/500	5285494 1/500	5285494 1/500	5285494 1/500	5285494 1/500	4795584 1/500	4795584 1/500	4795584 1/500	4795584 1/500
C	720643 1/100	720643 1/100	720643 1/100	720643 1/100	767614 1/100	767614 1/100	767614 1/100	767614 1/100	C+ IgG 1/100	C+ IgG 1/100	C+ IgG 1/100	C+ IgG 1/100
D	720643 1/500	720643 1/500	720643 1/500	720643 1/500	767614 1/500	767614 1/500	767614 1/500	767614 1/500	C+ IgG 1/500	C+ IgG 1/500	C+ IgG 1/500	C+ IgG 1/500
E	641216 1/100	641216 1/100	641216 1/100	641216 1/100	5285494 1/100	5285494 1/100	5285494 1/100	5285494 1/100	4795584 1/100	4795584 1/100	4795584 1/100	4795584 1/100
F	641216 1/500	641216 1/500	641216 1/500	641216 1/500	5285494 1/500	5285494 1/500	5285494 1/500	5285494 1/500	4795584 1/500	4795584 1/500	4795584 1/500	4795584 1/500
G	720643 1/100	720643 1/100	720643 1/100	720643 1/100	767614 1/100	767614 1/100	767614 1/100	767614 1/100	C+ IgM 1/100	C+ IgM 1/100	C+ IgM 1/100	C+ IgM 1/100
H	720643 1/500	720643 1/500	720643 1/500	720643 1/500	767614 1/500	767614 1/500	767614 1/500	767614 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
A	0,784	0,861	0,507	0,495	0,892	1,201	0,637	0,866	1,146	1,223	0,897	0,87
B	0,479	0,49	0,319	0,27	0,368	0,485	0,366	0,383	0,533	0,536	0,461	0,497
C	1,174	1,304	1,022	0,806	1,285	1,327	1,189	0,859	2,232	3,682	3,694	3,612
D	0,679	0,854	0,514	0,419	0,817	0,799	0,545	0,63	1,405	3,642	3,627	3,404
E	1,224	1,467	1,268	0,541	0,569	0,518	0,347	0,227	1,102	0,652	0,5	0,382
F	0,788	0,771	0,701	0,376	0,344	0,15	0,145	0,144	0,483	0,272	0,269	0,197
G	1,042	0,785	0,684	0,391	0,629	0,657	0,559	0,328	0,874	1,037	1,899	1,424
H	0,648	0,427	0,365	0,224	0,337	0,316	0,251	0,18	0,585	0,698	1,941	1,096

ELISA NF155, CNTN1, NF186 titulación (interlab validation)

Muestras:

- NF186
 - 5
 - 7
 - 22
 - 34
- NF155
 - 48
 - 56
 - 148
- CNTN1
 - 37
 - 68

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 (a: 1/100, b:1/300, c:1/900, d: 1/2700, e: 1/8100 i f: 1/24300)
- Continuar el proceso con el **Quantalyser (Immuno)**: *En este caso lo hago manual!!
 - 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 **H₂SO₄** 25%
 - Leer a 450-620 nm

Resultado:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	5	5	7	22	22	34	Cneg	48	48	56	148	148
B blanc	5	5	7	22	22	34	Cneg	48	48	56	148	148
C prot	5	5	7	22	22	34	Cpos	48	48	56	148	148
D blanc	5	5	7	22	22	34	Cpos	48	48	56	148	148
E prot	5	7	7	22	34	34	96 1/100	48	56	56	148	Cneg
F blanc	5	7	7	22	34	34	96 1/100	48	56	56	148	Cneg
G prot	5	7	7	22	34	34		48	56	56	148	Cpos
H blanc	5	7	7	22	34	34		48	56	56	148	Cpos

NF186 3 ug/ml

NF155 1 ug/ml

*Las titulaciones de CNTN1 las pongo en la placa de subclases

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	0,941	0,035	0,15	0,149	0,006	0,049	0,048	1,227	0,196	0,065	0,948	0,043
B blanc	0,047	0,004	0,017	0,046	0,005	0,009	0,038	0,127	0,007	0,006	0,025	0,026
C prot	0,472	0,011	0,041	0,054	0,004	0,018	0,389	0,978	0,066	0,023	0,419	0,029
D blanc	0,01	0,005	0,008	0,021	0,005	0,006	0,046	0,045	0,006	0,005	0,011	0,017
E prot	0,191	0,66	0,025	0,032	0,371	0,012	0,229	0,618	0,407	0,014	0,155	0,065
F blanc	0,024	0,074	0,006	0,01	0,037	0,005	0,012	0,025	0,019	0,005	0,01	0,052
G prot	0,093	0,363	0,016	0,025	0,145	0,009		0,361	0,156	0,012	0,079	0,929
H blanc	0,051	0,077	0,026	0,03	0,044	0,02		0,051	0,052	0,043	0,063	0,089

- 5 → NF186 1/900
- 7 → NF186 1/900

- 22 → NF186 1/300
- 34 → NF186 1/300
- 96 → es positiva con NF186 a 3 ug/ml, pero no con NF186 a 1 ug/ml → igual es más útil usar NF140.
- 48 → NF155 >1/24300
- 56 → NF155 1/900
- 148 → NF155 1/900

ELISA NF155, CNTN1, NF186 subclases (interlab validation)

Muestras:

- | | |
|---------|---------|
| · NF186 | · NF155 |
| ○ 5 | ○ 48 |
| ○ 7 | ○ 56 |
| ○ 22 | ○ 148 |
| ○ 34 | · CNTN1 |
| | ○ 37 |
| | ○ 68 |

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 **H₂SO₄** 25%
- Leer a 450-620 nm

Resultado:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	5	7	22	34	48	56	148	37	68	37 tit.	37 tit.	68 tit.
B blanc	5	7	22	34	48	56	148	37	68	37 tit.	37 tit.	68 tit.
C prot	5	7	22	34	48	56	148	37	68	37 tit.	68 tit.	68 tit.
D blanc	5	7	22	34	48	56	148	37	68	37 tit.	68 tit.	68 tit.
E prot	5	7	22	34	48	56	148	37	68	37 tit.	68 tit.	68 tit.
F blanc	5	7	22	34	48	56	148	37	68	37 tit.	68 tit.	68 tit.
G prot	5	7	22	34	48	56	148	37	68	37 tit.	68 tit.	Cpos
H blanc	5	7	22	34	48	56	148	37	68	37 tit.	68 tit.	Cpos

NF186 3 ug/ml

NF155 1 ug/ml

CNTN1 1 ug/ml

*37 sólo lo titulo hasta 1/8100

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	0,009	0,01	0,005	0,005	0,058	0,006	0,015	0,008	0,007	0,725	0,048	0,05
B blanc	0,005	0,005	0,004	0,005	0,007	0,005	0,003	0,005	0,005	0,022	0,008	0,015
C prot	0,01	0,006	0,006	0,004	0,009	0,004	0,005	0,006	0,006	0,422	0,378	0,024
D blanc	0,007	0,005	0,005	0,004	0,006	0,005	0,004	0,004	0,007	0,008	0,012	0,015
E prot	0,271	0,033	0,013	0,014	0,028	0,019	0,037	0,022	0,01	0,175	0,15	0,024
F blanc	0,008	0,005	0,004	0,004	0,008	0,006	0,006	0,008	0,005	0,007	0,015	0,022
G prot	0,016	0,011	0,009	0,008	0,773	0,01	0,037	0,67	0,009	0,086	0,068	1,036
H blanc	0,035	0,02	0,022	0,021	0,019	0,021	0,024	0,022	0,027	0,028	0,034	0,086

- 5 → NF186 IgG3 (0.263)
- 7, 22, 34 → NF186 ninguna subclase positiva!!!
- 48 → NF155 IgG4 (0.754)
- 56, 148 → NF155 ninguna subclase positiva!!! → Repetir IgG4
- 37 → CNTN1 IgG4 (0.648). Título 1/2700
- 68 → CNTN1 ninguna subclase positiva → repetir!. Título 1/2700

*Algo ha pasado con las subclases!!!! Repetir subclases NF186 a 5 ug/ml, repetir IgG4 de las NF155, repetir subclases de CNTN1

25/01/2022

✓ 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
A	4300143	4300143	4300143	4300143	5372189	5372189	5372189	5372189	120247	120247	120247	120247
B	4300143	4300143	4300143	4300143	5372189	5372189	5372189	5372189	120247	120247	120247	120247
C	339311	339311	339311	339311	4557353	4557353	4557353	4557353	C+IgG	C+IgG	C+IgG	C+IgG
D	339311	339311	339311	339311	4557353	4557353	4557353	4557353	C+IgG	C+IgG	C+IgG	C+IgG
E	4300143	4300143	4300143	4300143	5372189	5372189	5372189	5372189	120247	120247	120247	120247
F	4300143	4300143	4300143	4300143	5372189	5372189	5372189	5372189	120247	120247	120247	120247
G	339311	339311	339311	339311	4557353	4557353	4557353	4557353	C+IgM	C+IgM	C+IgM	C+IgM
H	339311	339311	339311	339311	4557353	4557353	4557353	4557353	C+IgM	C+IgM	C+IgM	C+IgM

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1,159	1,201	0,226	0,806	1,028	1,009	0,797	0,618	1,679	1,526	1,443	0,784
B	0,672	0,772	0,573	0,473	0,24	0,235	0,162	0,135	0,438	0,334	0,328	0,424
C	0,717	1,176	0,966	0,571	1,045	1,007	1,134	0,714	2,155	4	3,986	3,887
D	0,152	0,163	0,137	0,116	0,224	0,201	0,286	0,226	1,4	4	4	2,547
E	1,39	0,937	0,763	0,61	1,581	0,862	0,772	0,59	1,071	1,071	0,849	0,514
F	0,696	0,361	0,35	0,256	0,227	0,132	0,135	0,113	0,166	0,165	0,139	0,107
G	1,139	0,931	0,625	0,452	0,821	0,433	0,354	0,31	1,752	2,15	2,934	2,667
H	0,109	0,114	0,097	0,092	0,124	0,112	0,102	0,093	1,047	1,359	2,819	1,974

26/01/2022

✓ 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
A	4846938	4846938	4846938	4846938	593242	593242	593242	593242	70160952	70160952	70160952	70160952
B	4846938	4846938	4846938	4846938	593242	593242	593242	593242	70160952	70160952	70160952	70160952
C	5308833	5308833	5308833	5308833	433662	433662	433662	433662	C+ IgG	C+ IgG	C+ IgG	C+ IgG
D	5308833	5308833	5308833	5308833	433662	433662	433662	433662	C+ IgG	C+ IgG	C+ IgG	C+ IgG
E	4846938	4846938	4846938	4846938	593242	593242	593242	593242	70160952	70160952	70160952	70160952
F	4846938	4846938	4846938	4846938	593242	593242	593242	593242	70160952	70160952	70160952	70160952
G	5308833	5308833	5308833	5308833	433662	433662	433662	433662	C+ IgM	C+ IgM	C+ IgM	C+ IgM
H	5308833	5308833	5308833	5308833	433662	433662	433662	433662	C+ IgM	C+ IgM	C+ IgM	C+ IgM

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,159	0,138	0,143	0,166	0,61	0,522	0,442	0,399	0,539	0,502	0,475	0,355
B	0,112	0,137	0,132	0,111	0,377	0,326	0,348	0,268	0,209	0,253	0,205	0,26
C	0,208	0,299	0,356	0,232	1,161	1,208	0,72	0,52	1,393	3,605	3,587	3,306
D	0,17	0,189	0,163	0,121	0,52	0,487	0,356	0,289	0,979	3,556	3,566	2,01
E	0,147	0,157	0,117	0,097	1,356	0,745	0,553	0,341	1,026	0,689	0,583	0,39
F	0,091	0,108	0,118	0,129	0,657	0,315	0,262	0,201	0,404	0,253	0,215	0,2
G	2,587	1,772	1,736	1,267	1,86	1,003	0,894	0,533	1,633	1,886	2,95	2,741
H	1,679	0,838	0,935	0,578	1,11	0,438	0,35	0,3	1,032	1,088	2,768	1,781

27/01/2022

✓ 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
A	581371	581371	581371	581371	5350187	5350187	5350187	5350187	689845	689845	689845	689845
B	581371	581371	581371	581371	5350187	5350187	5350187	5350187	689845	689845	689845	689845
C	1793570	1793570	1793570	1793570	1182810	1182810	1182810	1182810	C+ IgG	C+ IgG	C+ IgG	C+ IgG
D	1793570	1793570	1793570	1793570	1182810	1182810	1182810	1182810	C+ IgG	C+ IgG	C+ IgG	C+ IgG
E	581371	581371	581371	581371	5350187	5350187	5350187	5350187	689845	689845	689845	689845
F	581371	581371	581371	581371	5350187	5350187	5350187	5350187	689845	689845	689845	689845
G	1793570	1793570	1793570	1793570	1182810	1182810	1182810	1182810	C+ IgM	C+ IgM	C+ IgM	C+ IgM
H	1793570	1793570	1793570	1793570	1182810	1182810	1182810	1182810	C+ IgM	C+ IgM	C+ IgM	C+ IgM

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1,354	1,354	1,378	1,012	0,832	0,435	0,438	0,361	0,646	0,401	0,34	0,313
B	0,577	0,643	0,587	0,739	0,424	0,343	0,291	0,467	0,524	0,288	0,417	0,185
C	3,463	3,228	2,854	2,352	1,732	1,735	1,522	1,036	1,986	3,705	3,668	3,613
D	2,194	1,961	1,548	1,049	0,854	0,758	0,751	0,824	1,231	3,705	3,696	2,12
E	0,999	0,543	0,419	0,327	0,517	0,209	0,209	0,194	0,739	0,326	0,252	0,214
F	0,586	0,248	0,185	0,161	0,274	0,155	0,136	0,127	0,369	0,227	0,157	0,158
G	1,378	0,851	0,677	0,473	0,78	0,559	0,433	0,313	1,424	1,711	3,031	2,563
H	0,777	0,382	0,361	0,287	0,333	0,254	0,212	0,219	0,983	0,967	2,785	1,681

Coating ELISA NF186 (interlab validation)

[NF186]_i = 0,2 mg/ml

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

- NF186: 48 pozos → [NF186]_f = 5 ug/ml → 2,5 ml buffer + 62,5 ul

ELISA NF155, CNTN1, NF186 subclases y titulación (interlab validation)

Muestras:

- NF186
 - 34 → subclases a 1/200 y titular sólo a 1/900 y 1/2700
 - 7 → subclases y titular sólo a 1/900 y 1/2700

- 96 → subclases y titular
- 148 → subclases
- NF155
 - 48 → subclases
 - 56 → subclases
- CNTN1
 - 119 → subclase

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 **H₂SO₄** 25%
- Leer a 450-620 nm

Resultado:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	7	34	96	7 tit	34 tit	96	Cpos	48	56	148	119	
prot	subclase	subclase	subclase	1/900	1/900	1/900	NF155	subclase	subclase	subclase	subclase	
B	7	34	96	7 tit	34 tit	96	Cpos	48	56	148	119	
blanc	subclase	subclase	subclase	1/900	1/900	1/900	NF155	subclase	subclase	subclase	subclase	
C	7	34	96	7 tit	34 tit	96	Cneg	48	56	148	119	
prot	subclase	subclase	subclase	1/2700	1/2700	1/2700	NF155	subclase	subclase	subclase	subclase	
D	7	34	96	7 tit	34 tit	96	Cneg	48	56	148	119	
blanc	subclase	subclase	subclase	1/2700	1/2700	1/2700	NF155	subclase	subclase	subclase	subclase	
E	7	34	96		96	96	Cpos	48	56	148	119	
prot	subclase	subclase	subclase		1/100	1/8100	CNTN1	subclase	subclase	subclase	subclase	
F	7	34	96		96	96	Cpos	48	56	148	119	
blanc	subclase	subclase	subclase		1/100	1/8100	CNTN1	subclase	subclase	subclase	subclase	
G	7	34	96		96	Cpos	Cneg	48	56	148	119	
prot	subclase	subclase	subclase		1/300	NF186	CNTN1	subclase	subclase	subclase	subclase	
H	7	34	96		96	Cpos	Cneg	48	56	148	119	
blanc	subclase	subclase	subclase		1/300	NF186	CNTN1	subclase	subclase	subclase	subclase	

NF186 5 ug/ml

NF155 1 ug/ml

CNTN1 1 ug/ml

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	0,006	0,004	0,004	0,027	0,042	0,05	1,012	0,042	0,013	0,011	-0,001	
B blanc	0,005	0,004	0,005	0,014	0,009	0,005	0,02	0,013	0,008	0,008	0,005	
C prot	0,005	0,004	0,005	0,011	0,007	0,013	0,046	0,011	0,007	0,003	0,003	
D blanc	0,004	0,004	0,004	0,009	0,006	0,007	0,02	0,014	0,006	0,005	-0,009	
E prot	0,046	0,011	0,012	0,012	0,283	0,014	1,022	0,047	0,02	0,045	-0,006	
F blanc	0,005	0,005	0,005	0,006	0,012	0,005	0,024	0,017	0,01	0,016	0,015	
G prot	0,009	0,011	0,009	-0,007	0,032	0,227	0,04	0,75	0,014	0,041	0,013	
H blanc	0,035	0,02	0,022	0,021	0,019	0,021	0,024	0,022	0,027	0,028	0,034	

- 7 → ninguna subclase positiva (parece IgG3 pero no sale positivo del todo). Negativo a 1/900 y 1/2700
- 34 → ninguna subclase positiva. Negativo a 1/900 y 1/2700
- 96 → ninguna subclase positiva. Título 1/100
- 48 → NF155 IgG4 (0.73)
- 56, 148 → ninguna subclase positiva
- 119 → ninguna subclase positiva

28/01/2022

✓ 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
A	1228201	1228201	1228201	1228201	960770	960770	960770	960770	1189119	1189119	1189119	1189119
B	1228201	1228201	1228201	1228201	960770	960770	960770	960770	1189119	1189119	1189119	1189119
C	1833944	1833944	1833944	1833944	961877	961877	961877	961877	C+ IgG	C+ IgG	C+ IgG	C+ IgG
D	1833944	1833944	1833944	1833944	961877	961877	961877	961877	C+ IgG	C+ IgG	C+ IgG	C+ IgG
E	1228201	1228201	1228201	1228201	960770	960770	960770	960770	1189119	1189119	1189119	1189119
F	1228201	1228201	1228201	1228201	960770	960770	960770	960770	1189119	1189119	1189119	1189119
G	1833944	1833944	1833944	1833944	961877	961877	961877	961877	C+ IgM	C+ IgM	C+ IgM	C+ IgM
H	1833944	1833944	1833944	1833944	961877	961877	961877	961877	C+ IgM	C+ IgM	C+ IgM	C+ IgM

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2,857	1,505	2,653	2,352	0,859	0,942	1,173	0,821	1,086	1,15	0,841	0,937
B	1,409	1,133	1,346	0,966	0,498	0,446	0,648	0,669	0,548	0,829	0,528	0,428
C	1,483	1,53	1,849	1,213	1,921	1,728	2,589	1,702	1,827	3,639	3,604	3,432
D	0,717	0,868	0,83	0,799	1,238	0,865	1,168	1,207	1,344	3,599	3,493	2,9
E	2,481	2,66	2,993	2,785	1,414	0,596	0,923	0,679	1,959	0,712	1,313	0,802
F	1,845	1,444	1,765	1,438	0,563	0,283	0,456	0,287	1,195	0,429	0,607	0,338
G	1,306	1,386	0,896	0,666	1,259	1,105	1,141	0,831	1,984	1,764	2,939	2,26
H	0,689	0,612	0,374	0,278	0,605	0,477	0,424	0,325	1,255	1,148	2,731	1,772

IHC teasing nervio ciático rata (interlab validation)

Muestras:

- 5
- 13
- 22
- 27
- 36
- 56
- 64
- 68
- 96
- 119
- 132
- 148

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

Resultado: No salen bien!! En verde se ve marcaje de nodos y paranodos pequeños, pero en rojo (suero) no se ve prácticamente nada. Repetir.

31/01/2022

IHC teasing nervio ciático rata (interlab validation)

Muestras:

- 5, 13, 27, 36, 56, 64, 96, 119

*No queda muestra 22, 68, 132 y 148

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

Resultado:

- 5 → nodo
- 13 → negativo
- 27 → paranodo (claramente!!)
- 36 → negativo
- 56 → negativo
- 64 → negativo
- 96 → negativo
- 119 → paranodo

01/02/2022

✓ 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
A	1439266	1439266	1439266	1439266	1442204	1442204	1442204	1442204	1751712	1751712	1751712	1751712
B	1439266	1439266	1439266	1439266	1442204	1442204	1442204	1442204	1751712	1751712	1751712	1751712
C	206964	206964	206964	206964	1677337	1677337	1677337	1677337	C+ IgG	C+ IgG	C+ IgG	C+ IgG
D	206964	206964	206964	206964	1677337	1677337	1677337	1677337	C+ IgG	C+ IgG	C+ IgG	C+ IgG
E	1439266	1439266	1439266	1439266	1442204	1442204	1442204	1442204	1751712	1751712	1751712	1751712
F	1439266	1439266	1439266	1439266	1442204	1442204	1442204	1442204	1751712	1751712	1751712	1751712
G	206964	206964	206964	206964	1677337	1677337	1677337	1677337	C+ IgG	C+ IgG	C+ IgG	C+ IgG
H	206964	206964	206964	206964	1677337	1677337	1677337	1677337	C+ IgG	C+ IgG	C+ IgG	C+ IgG

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,442	0,302	0,347	0,262	0,561	0,53	0,612	0,469	0,754	0,684	0,826	0,552
B	0,248	0,262	0,285	0,27	0,386	0,482	0,323	0,357	0,356	0,473	0,599	0,613
C	0,798	0,704	0,732	0,696	0,587	0,774	0,723	0,563	1,653	3,486	3,692	3,636
D	0,465	0,644	0,488	0,432	0,51	0,549	0,367	0,379	1,487	3,51	3,66	3,251
E	0,434	0,384	0,332	0,423	1,149	1,001	0,872	0,768	0,791	0,576	0,465	0,583
F	0,336	0,359	0,367	0,212	0,604	0,66	0,413	0,454	0,442	0,636	0,601	0,449
G	1,075	0,729	0,771	0,504	0,392	0,852	0,504	0,535	1,556	1,557	2,824	2,514
H	0,703	0,438	0,345	0,388	0,386	0,432	0,245	0,458	1,232	1,018	2,291	2,45

✓ 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
A	1541774	1541774	1541774	1541774	911269	911269	911269	911269	1614932	1614932	1614932	1614932
B	1541774	1541774	1541774	1541774	911269	911269	911269	911269	1614932	1614932	1614932	1614932
C	609416	609416	609416	609416	82386	82386	82386	82386	C+ IgG	C+ IgG	C+ IgG	C+ IgG
D	609416	609416	609416	609416	82386	82386	82386	82386	C+ IgG	C+ IgG	C+ IgG	C+ IgG
E	1541774	1541774	1541774	1541774	911269	911269	911269	911269	1614932	1614932	1614932	1614932
F	1541774	1541774	1541774	1541774	911269	911269	911269	911269	1614932	1614932	1614932	1614932
G	609416	609416	609416	609416	82386	82386	82386	82386	C+ IgM	C+ IgM	C+ IgM	C+ IgM
H	609416	609416	609416	609416	82386	82386	82386	82386	C+ IgM	C+ IgM	C+ IgM	C+ IgM

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,194	0,119	0,16	0,169	0,386	0,204	0,358	0,308	0,213	0,115	0,243	0,374
B	0,08	0,094	0,09	0,1	0,211	0,114	0,167	0,162	0,131	0,086	0,152	0,255
C	0,252	0,232	0,217	0,181	0,159	0,157	0,164	0,191	1,147	3,321	3,626	3,582
D	0,144	0,11	0,105	0,107	0,109	0,101	0,122	0,119	0,992	3,044	3,565	3,363
E	0,445	0,239	0,215	0,195	0,474	0,314	0,31	0,201	0,152	0,112	0,122	0,157
F	0,118	0,111	0,111	0,097	0,16	0,133	0,131	0,108	0,082	0,1	0,085	0,097
G	0,302	0,222	0,253	0,182	0,311	0,27	0,296	0,175	1,288	1,027	2,551	2,176
H	0,123	0,097	0,106	0,104	0,116	0,102	0,121	0,137	0,66	0,508	2,451	1,82

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

02/02/2022

Coating células + transfección Culture slides

24 culture slides:

- 13 NF155 → ricerca
- 6 Perfil
- 2 LRP4
- 3 NF155/CNTN1 → IMM

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

✓ 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
A	1598702	1598702	1598702	1598702	1708059	1708059	1708059	1708059	634503	634503	634503	634503
B	1598702	1598702	1598702	1598702	1708059	1708059	1708059	1708059	634503	634503	634503	634503
C	1233356	1233356	1233356	1233356	217975	217975	217975	217975	C+ IgG	C+ IgG	C+ IgG	C+ IgG
D	1233356	1233356	1233356	1233356	217975	217975	217975	217975	C+ IgG	C+ IgG	C+ IgG	C+ IgG
E	1598702	1598702	1598702	1598702	1708059	1708059	1708059	1708059	634503	634503	634503	634503
F	1598702	1598702	1598702	1598702	1708059	1708059	1708059	1708059	634503	634503	634503	634503
G	1233356	1233356	1233356	1233356	217975	217975	217975	217975	C+ IgM	C+ IgM	C+ IgM	C+ IgM
H	1233356	1233356	1233356	1233356	217975	217975	217975	217975	C+ IgM	C+ IgM	C+ IgM	C+ IgM

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,092	0,094	0,109	0,093	0,258	0,243	0,276	0,313	0,757	0,722	0,81	0,532
B	0,082	0,103	0,101	0,106	0,138	0,112	0,181	0,115	0,368	0,311	0,427	0,525
C	0,335	0,291	0,347	0,311	0,514	0,464	0,448	0,311	1,136	3,52	3,63	3,558
D	0,168	0,162	0,197	0,139	0,271	0,213	0,214	0,177	0,671	3,472	3,602	2,947
E	0,111	0,102	0,096	0,088	0,375	0,305	0,356	0,267	0,8	0,734	0,675	0,48
F	0,067	0,074	0,078	0,071	0,177	0,143	0,154	0,131	0,348	0,297	0,289	0,198
G	0,848	0,63	0,531	0,42	0,478	0,32	0,259	0,193	0,564	0,788	2,354	1,712
H	0,323	0,227	0,246	0,233	0,225	0,112	0,141	0,13	0,405	0,503	2,069	1,043

✓ 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
A	415276	415276	415276	415276	1863732	1863732	1863732	1863732	1332690	1332690	1332690	1332690
B	415276	415276	415276	415276	1863732	1863732	1863732	1863732	1332690	1332690	1332690	1332690
C	349191	349191	349191	349191	1127097	1127097	1127097	1127097	C+ IgG	C+ IgG	C+ IgG	C+ IgG
D	349191	349191	349191	349191	1127097	1127097	1127097	1127097	C+ IgG	C+ IgG	C+ IgG	C+ IgG
E	415276	415276	415276	415276	1863732	1863732	1863732	1863732	1332690	1332690	1332690	1332690
F	415276	415276	415276	415276	1863732	1863732	1863732	1863732	1332690	1332690	1332690	1332690
G	349191	349191	349191	349191	1127097	1127097	1127097	1127097	C+ IgM	C+ IgM	C+ IgM	C+ IgM
H	349191	349191	349191	349191	1127097	1127097	1127097	1127097	C+ IgM	C+ IgM	C+ IgM	C+ IgM

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,486	0,454	0,547	0,297	0,167	0,168	0,228	0,229	0,347	0,409	0,433	0,305
B	0,264	0,232	0,311	0,205	0,111	0,107	0,142	0,108	0,165	0,172	0,19	0,131
C	0,92	0,643	0,725	0,441	0,198	0,219	0,304	0,183	0,841	3,413	3,588	3,421
D	0,293	0,302	0,296	0,21	0,127	0,14	0,184	0,166	0,591	3,509	3,551	2,082
E	0,858	0,744	0,754	0,507	0,389	0,316	0,205	0,17	1,012	1,175	1,007	0,772
F	0,375	0,241	0,297	0,218	0,162	0,112	0,112	0,087	0,35	0,352	0,34	0,282
G	0,421	0,497	0,491	0,271	0,293	0,313	0,212	0,169	0,656	0,913	2,39	1,341
H	0,179	0,216	0,206	0,181	0,129	0,119	0,11	0,1	0,414	0,43	2,098	0,817

03/02/2022

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, bloquear y congelar a -80°C

✓ 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
A	1379340	1379340	1379340	1379340	925491	925491	925491	925491	1006256	1006256	1006256	1006256
B	1379340	1379340	1379340	1379340	925491	925491	925491	925491	1006256	1006256	1006256	1006256
C	1287013	1287013	1287013	1287013	514508	514508	514508	514508	C+ IgG	C+ IgG	C+ IgG	C+ IgG
D	1287013	1287013	1287013	1287013	514508	514508	514508	514508	C+ IgG	C+ IgG	C+ IgG	C+ IgG
E	1379340	1379340	1379340	1379340	925491	925491	925491	925491	1006256	1006256	1006256	1006256
F	1379340	1379340	1379340	1379340	925491	925491	925491	925491	1006256	1006256	1006256	1006256
G	1287013	1287013	1287013	1287013	514508	514508	514508	514508	C+ IgM	C+ IgM	C+ IgM	C+ IgM
H	1287013	1287013	1287013	1287013	514508	514508	514508	514508	C+ IgM	C+ IgM	C+ IgM	C+ IgM

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,358	0,331	0,288	0,285	0,168	0,111	0,154	0,121	0,316	0,22	0,33	0,369
B	0,152	0,175	0,15	0,124	0,108	0,125	0,112	0,097	0,144	0,164	0,199	0,192
C	0,17	0,253	0,213	0,146	0,176	0,271	0,198	0,23	1,422	3,512	3,588	3,497
D	0,127	0,11	0,112	0,114	0,118	0,135	0,132	0,123	1,08	3,535	3,614	2,918
E	0,393	0,274	0,262	0,229	0,196	0,16	0,176	0,132	0,531	0,256	0,225	0,205
F	0,154	0,125	0,126	0,114	0,106	0,106	0,101	0,086	0,161	0,118	0,116	0,097
G	0,111	0,112	0,115	0,109	0,226	0,173	0,164	0,155	0,826	1,276	2,538	1,906
H	0,075	0,101	0,086	0,085	0,112	0,103	0,108	0,09	0,524	0,736	2,279	1,184



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
A	1384840	1384840	1384840	1384840	1576895	1576895	1576895	1576895	1002631	1002631	1002631	1002631
B	1384840	1384840	1384840	1384840	1576895	1576895	1576895	1576895	1002631	1002631	1002631	1002631
C	580518	580518	580518	580518	1638251	1638251	1638251	1638251	C+ IgG	C+ IgG	C+ IgG	C+ IgG
D	580518	580518	580518	580518	1638251	1638251	1638251	1638251	C+ IgG	C+ IgG	C+ IgG	C+ IgG
E	1384840	1384840	1384840	1384840	1576895	1576895	1576895	1576895	1002631	1002631	1002631	1002631
F	1384840	1384840	1384840	1384840	1576895	1576895	1576895	1576895	1002631	1002631	1002631	1002631
G	580518	580518	580518	580518	1638251	1638251	1638251	1638251	C+ IgM	C+ IgM	C+ IgM	C+ IgM
H	580518	580518	580518	580518	1638251	1638251	1638251	1638251	C+ IgM	C+ IgM	C+ IgM	C+ IgM

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,235	0,162	0,195	0,156	0,753	0,779	0,654	0,587	0,234	0,225	0,259	0,195
B	0,137	0,151	0,107	0,089	0,342	0,331	0,388	0,363	0,159	0,129	0,184	0,17
C	0,522	0,618	0,406	0,349	0,465	0,447	0,487	0,41	1,044	3,462	3,517	3,442
D	0,232	0,255	0,186	0,172	0,197	0,24	0,289	0,192	0,81	3,523	3,558	2,601
E	0,194	0,141	0,146	0,112	1,191	0,527	0,423	0,353	0,343	0,348	0,338	0,253
F	0,095	0,099	0,1	0,087	0,497	0,263	0,229	0,204	0,175	0,16	0,176	0,146
G	0,719	0,45	0,425	0,334	1,194	0,701	0,502	0,418	0,91	1,038	2,441	1,916
H	0,287	0,197	0,192	0,175	0,548	0,311	0,264	0,243	0,532	0,469	2,153	1,192

09/02/2022

Coating cels de Schwann (primarios rata)

3 placas de 60 mm 26 cubres → Coating 1h Poly-D-lys 1/40 en PBS1x → deajo las placas overnight

10/02/2022

Coating cels de Schwann (primarios rata)

3 placas de 60 mm 26 cubres → planto 50.000cels/placa (porque no hay más) → en medio de proliferación

- **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)

Coating ELISA LIF (Retrogenix)

[LIF]_i = 0,1 mg/ml (100 ug/ml) → reconstituir en 250 ul de PBS con 0'1% de BSA (el vial tiene 25ug)

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

- LIF: 4 pozos [f = 1 ug/ml → 200 ul buffer + 2 ul
- LIF: 4 pozos [f = 3 ug/ml → 200 ul buffer + 6 ul
- LIF: 4 pozos [f = 5 ug/ml → 200 ul buffer + 10 ul

11/02/2022

Cels Schwann rata (cambio prolif.--> dif)

Cambiar medio proliferación a medio diferenciación

- **Medio de diferenciación**
 - Schwann cell medium (47 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)
 - 25 µl NGF

ELISA LIF (Retrogenix) + ELISA NF155 (titulación BD) y CASPR1 (screening BD)

Muestras:

- **LIF:** GDP (CIDP15), 3 controles negativos (175-08, 188-13, 188-17)
- **NF155:** titulación 22-2-11 (Box 285)
- **CASPR1:** testar 22-2-41, 22-2-42 (Box 287)

Protocolo:

- Bloquear con leche 5% en PBS-tween 0'1% → 200 ul pozo (incubar 1h a temp. ambiente)
- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
- Diluir los **sueros**:
 - Titulación: 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 (a: 1/100, b:1/300, c:1/900, d: 1/2700, e: 1/8100 i f: 1/24300)
 - Screening: diluir sueros 1/100 en leche 5% en PBS-tween 0'1%
- 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 **H₂SO₄** 25%
- Leer a 450-620 nm

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	CIDP 15	CIDP 15	CIDP 15		22-2-11 1/100	22-2-11 1/8100		22-2-41				
B blanc	CIDP 15	CIDP 15	CIDP 15		22-2-11 1/100	22-2-11 1/8100		22-2-41				
C prot	Cneg 1	Cneg 1	Cneg 1		22-2-11 1/300	22-2-11 1/24300		22-2-42				
D blanc	Cneg 1	Cneg 1	Cneg 1		22-2-11 1/300	22-2-11 1/24300		22-2-42				
E prot	Cneg 2	Cneg 2	Cneg 2		22-2-11 1/900	Cneg		Cneg				
F blanc	Cneg 2	Cneg 2	Cneg 2		22-2-11 1/900	Cneg		Cneg				
G prot	Cneg 3	Cneg 3	Cneg 3		22-2-11 1/2700	Cpos		Cpos				
H blanc	Cneg 3	Cneg 3	Cneg 3		22-2-11 1/2700	Cpos		Cpos				

LIF 1 ug/ml
 LIF 3 ug/ml
 LIF 5 ug/ml

NF155 1 ug/ml
 CASPR1 5 ug/ml

Resultado: todo ha salido muy subido (el TMB estaba azul) y no hemos leído la placa. Aun así, claramente la muestra CIDP15 se veía positiva por LIF, y los 3 controles negativos se veían negativos. Hacer LIF a 3 ug/ml

ICC kit FLOT1/2 (controles)

Muestras: 1-21 (ELA), 22-42 (Miastenia), 43-60 (sanos)

1. 20-2-0001	21. 21-2-0670	41. 21-2-923
2. 20-2-0009	22. 20-2-0496	42. 21-2-834
3. 20-2-0021	23. 20-2-0521	43. 175-08
4. 20-2-0023	24. 20-2-0319	44. 188-13
5. 20-2-0367	25. 20-2-0518	45. 188-17
6. 20-2-0372	26. 21-2-0834	46. 189-05
7. 20-2-0422	27. 20-2-0274	47. 198-02
8. 21-2-0068	28. 20-2-0299	48. 198-04
9. 21-3-0069	29. 20-2-0312	49. 203-18
10. 21-2-0078	30. 20-2-0317	50. 204-13
11. 21-2-0082	31. 20-2-0361	51. 206-06
12. 21-2-0091	32. 20-2-0494	52. 206-07
13. 21-2-0311	33. 20-2-0497	53. 207-02
14. 21-2-0688	34. 20-2-0502	54. 207-03
15. 21-2-0702	35. 20-2-0507	55. 217-33
16. 21-2-0704	36. 20-2-0622	56. 220-22
17. 21-2-1088	37. 21-2-0546	57. 220-23
18. 21-2-1460	38. 21-2-0563	58. 220-24
19. 21-2-1462	39. 21-2-1170	59. 221-16
20. 21-2-0882	40. 21-2-1204	60. 21-2-1608

Protocolo:

- Suero 1/10 en PBS-tween 0,2% (30 min)
- Lavar 3 veces con PBS-tween 0,2%
- Ac secundario kit (30 min)
- Lavar 3 veces con PBS-tween 0,2% (30 min)

Resultado: todo negativo!

14/02/2022

Coating ELISA LIF, NF155, CASPR1, NF186

[LIF]_i = 0,1 mg/ml (100 ug/ml)

[CASPR1]_i = 0,789 mg/ml

[NF155]_i = 0,505 mg/ml

[NF186]_i = 0,2 mg/ml

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

- LIF: 20 pozos [f = 3 ug/ml → 1ml buffer + 30 ul
- CASPR1: 4 pozos [f = 5 ug/ml → 200ul buffer + 1,3 ul
- NF155: 20 pozos [f = 1 ug/ml → 1 ml buffer + 2 ul (solo usaré 8 pozos, guardo el resto)
- NF186: 2 pozos [f = 5 ug/ml → 100ul buffer + 2,5 ul

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot												
B blanc												
C prot												
D blanc												
E prot												
F blanc												
G prot												
H blanc												

LIF 3 ug/ml

NF186 5 ug/ml

NF155 1 ug/ml

CASPR1 5 ug/ml

15/02/2022

ELISA LIF, NF155, CASPR1, NF140, NF186

Muestras:

- LIF: GDP (CIDP15), 19 controles negativos
- NF155: titulación 22-2-11 (Box 285), screening 18-860

- **NF140:** screening 18-860
- **NF186:** screening 18-860
- **CASPR1:** screening 22-2-41, 22-2-42, 22-2-53 (Box 287)
- **Protocolo:**
- Bloquear con leche 5% en PBS-tween 0'1% → 200 ul pozo (incubar 1h a temp. ambiente)
- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
- Diluir los **sueros:**
 - Titulación: 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 (a: 1/100, b:1/300, c:1/900, d: 1/2700, e: 1/8100 i f: 1/24300)
 - Screening: diluir sueros 1/100 en leche 5% en PBS-tween 0'1%
- 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 **H₂SO₄** 25%
- Leer a 450-620 nm

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	CIDP15	203-18	207-02	220-23	204-04				22-2-11 1/100	22-2-11 1/8100	18-860	22-2-41
B blanc	CIDP15	203-18	207-02	220-23	204-04				22-2-11 1/100	22-2-11 1/8100	18-860	22-2-41
C prot	189-05	204-13	207-03	220-24	195-12				22-2-11 1/300	22-2-11 1/24300	Cpos	22-2-42
D blanc	189-05	204-13	207-03	220-24	195-12				22-2-11 1/300	22-2-11 1/24300	Cpos	22-2-42
E prot	198-02	206-06	217-33	221-16	207-04				22-2-11 1/900	18-860	18-860	22-2-53
F blanc	198-02	206-06	217-33	221-16	207-04				22-2-11 1/900	18-860	18-860	22-2-53
G prot	198-04	206-07	220-22	21-2-1608	198-06				22-2-11 1/2700	Cpos	Cpos	Cpos
H blanc	198-04	206-07	220-22	21-2-1608	198-06				22-2-11 1/2700	Cpos	Cpos	Cpos

LIF 3 ug/ml

NF155 1 ug/ml

NF140 1 ug/ml

NF186 5 ug/ml

CASPR1 5 ug/ml

Resultado:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	0,892	0,073	0,095	0,109	0,081	0	0	0	0,447	0,141	0,255	0,097
B blanc	0,145	0,09	0,096	0,085	0,09	0	0	0	0,162	0,076	0,106	0,106
C prot	0,091	0,082	0,091	0,094	0,099	0	0	0	0,26	0,144	0,417	0,147
D blanc	0,097	0,112	0,084	0,095	0,144	0	0	0	0,096	0,079	0,109	0,137
E prot	0,094	0,077	0,096	0,099	0,081	0	0	0	0,172	0,531	0,306	0,12
F blanc	0,096	0,103	0,11	0,084	0,082	0	0	0	0,102	0,177	0,152	0,143
G prot	0,089	0,128	0,088	0,091	0,086	0	0	0	0,211	0,552	0,617	0,943
H blanc	0,109	0,097	0,089	0,113	0,097	0	0	0	0,087	0,132	0,178	0,196

- **LIF:** todos los controles negativos son negativos!!
- **NF155:** 22-2-11 título 1/300, 18-860 positiva
- **NF140:** 18-860 positiva
- **NF186:** 18-860 positiva
- **CASPR1:** todas las muestras 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

16/02/2022

Coating células + transfección Culture slides

24 culture slides:

- 18 perfil → 6 los guardo para recerca
- 2 NF155/CNTN1
- 4 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

17/02/2022

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, bloquear y congelar a -80°C

ICC Cels de Schwann (primarios rata y línea humana)

Muestras: muestra LIF+ y muestras EM estudio vacunas marcaje mielina

- | | |
|------------------|------------------------|
| 1. CIDP15 (LIF+) | 7. 1677337 (A5 caja 2) |
| 2. 422069 (C1) | 8. 1598702 (B2 caja 2) |
| 3. 767614 (F5) | 9. 217975 (B6 caja 2) |
| 4. 5350187 (G8) | 10. 925491 (C4 caja 2) |
| 5. 1793570 (H1) | 11. 514508 (C7 caja 2) |
| 6. 960770 (H4) | 12. Cneg |

3 tipos de células:

- Línea celular humana → fijadas y congeladas día 11/02/22 (cultivadas por Elba)
- Primarios rata → cels diferenciadas
- Primarios rata → cels no diferenciadas

Protocolo:

- Tritón 0,3% 5 minutos (después de fijar 10 min con PFA4% y congelar cels)
- 3 lavados PBS1x
- Bloqueo con Goat serum 5% 1 h
- 3 lavados PBS1x
- Suero 1/100 (IgG)
- 3 lavados PBS1x
- GAH488 IgG 1/500
- 3 lavados PBS1x
- Montar con DAPI

Muestra	CS línea	CS primarios rata dif	CS primarios rata no dif
CIDP15	2/3	2	2/3
422069	1/2 ¿?	2	1/2
767614	2?	1	1/2
5350187	1	0	0
1793570	2	2	1
960770	1/2	1	1

1677337	1/2	1 núcleos	0
1598702	1 núcleos	0	0
217975	¿	1/2 núcleos	1/2 núcleos
935491	0	0	0
514508	0	0	0
Cpos (Zika 003)	0	3	3
Cneg	0	0	1/2

*Probar creciendo y diferenciando cels Schwann en culture slides

La paciente LIF+ claramente marca en los 3 tipos de células

ICC Perfil (BD)

Muestras:

- 22-2-41 → neg
- 22-2-42 → neg
- 22-2-53 → NF155+
- 18-860 → NF155+, NF140 y NF186
las veo negativas
- 22-2-60 → neg
- 22-2-61 → neg
- 22-2-62 → neg
- 22-2-64 → neg
- 22-2-65 → neg
- Cneg
- Cpos

21/02/2022

IHC teasing nervio ciático rata (18-860)

Muestras:

- 18-860
- Cneg
- Cpos NF140

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

Resultado: negativo

ELISA Gangliósidos día 1

Muestras (IgG):

- | | |
|------------|------------|
| · 701985 | · 465156 |
| · 575657 | · 364771 |
| · 139910 | · 70177507 |
| · 406572 | · 368893 |
| · 70600773 | · 510557 |
| · 4225069 | |

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.
 - Dil 1/2500 (x8 pozos): 0,8 ml de PBS-BSA 0'1% + 0,2 ml de la dilución anterior.
 - Dil 1/12500 (x8 pozos): 0,8 ml de PBS-BSA 0'1% + 0,2 ml de la dilución anterior.
- Poner 100 ul de suero a cada pozo, incubar toda la noche a 4°C

	1 blanco	2 GM1	3 GD1b	4 GQ1b	5 blanco	6 GM1	7 GD1b	8 GQ1b	9 blanco	10 GM1	11 GD1b	12 GQ1b
A 1/100	701985	701985	701985	701985	575657	575657	575657	575657	139910	139910	139910	139910
B 1/500	701985	701985	701985	701985	575657	575657	575657	575657	139910	139910	139910	139910
C 1/2500	701985	701985	701985	701985	575657	575657	575657	575657	139910	139910	139910	139910
D 1/12500	701985	701985	701985	701985	575657	575657	575657	575657	139910	139910	139910	139910
E 1/100	406572	406572	406572	406572	706007 73	706007 73	706007 73	706007 73	422506 9	422506 9	422506 9	422506 9
F 1/500	406572	406572	406572	406572	706007 73	706007 73	706007 73	706007 73	422506 9	422506 9	422506 9	422506 9
G 1/2500	406572	406572	406572	406572	706007 73	706007 73	706007 73	706007 73	422506 9	422506 9	422506 9	422506 9
H 1/12500	406572	406572	406572	406572	706007 73	706007 73	706007 73	706007 73	422506 9	422506 9	422506 9	422506 9

	1 blanco	2 GM1	3 GD1b	4 GQ1b	5 blanco	6 GM1	7 GD1b	8 GQ1b	9 blanco	10 GM1	11 GD1b	12 GQ1b
A 1/100	465156	465156	465156	465156	364771	364771	364771	364771	701775 07	701775 07	701775 07	701775 07
B 1/500	465156	465156	465156	465156	364771	364771	364771	364771	701775 07	701775 07	701775 07	701775 07
C 1/2500	465156	465156	465156	465156	364771	364771	364771	364771	701775 07	701775 07	701775 07	701775 07
D 1/12500	465156	465156	465156	465156	364771	364771	364771	364771	701775 07	701775 07	701775 07	701775 07
E 1/100	368893	368893	368893	368893	510557	510557	510557	510557	C+ IgG	C+ IgG	C+ IgG	C+ IgG
F 1/500	368893	368893	368893	368893	510557	510557	510557	510557	C+ IgG	C+ IgG	C+ IgG	C+ IgG
G 1/2500	368893	368893	368893	368893	510557	510557	510557	510557	C+ IgG	C+ IgG	C+ IgG	C+ IgG
H 1/12500	368893	368893	368893	368893	510557	510557	510557	510557	C+ IgG	C+ IgG	C+ IgG	C+ IgG

Coating ELISA LIF (Retrogenix)

[LIF]_i = 0,1 mg/ml (100 ug/ml)

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

· LIF: 12 pozos [f = 5 ug/ml → 600 ul buffer + 30 ul

*Lo hago a 5 ug/ml para ver si discrimina mejor entre positivo y negativo (sobre todo en las muestras seriadas de CIDP15)

22/02/2022

ELISA Gangliósidos día 2

Protocolo:

- Lavar 4 veces con PBS
- Preparar **Ac secundarios**: RAH HRP IgG dil. 1/5000 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 **H₂SO₄** al 25% a cada pozo.
- Leer en lector de placas de ELISA a 490-630 nm

Resultado:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,812	0,71	1,023	1,005	0,651	0,301	0,511	0,433	2,694	2,104	3,077	2,644
B	0,54	0,512	0,54	0,485	0,439	0,242	0,353	0,364	0,635	0,605	0,949	0,864
C	0,355	0,324	0,383	0,405	0,368	0,215	0,404	0,361	0,409	0,535	0,565	0,357
D	0,241	0,248	0,312	0,339	0,271	0,233	0,323	0,25	0,305	0,253	0,369	0,22
E	1,431	1,621	1,734	1,306	1,185	1,08	1,124	1,239	1,455	1,255	1,692	1,439
F	0,825	0,851	0,747	0,655	0,411	0,315	0,436	0,361	0,562	0,484	0,706	0,635
G	0,539	0,443	0,448	0,42	0,37	0,238	0,342	0,368	0,364	0,255	0,299	0,289
H	0,349	0,348	0,358	0,337	0,287	0,371	0,394	0,304	0,269	0,236	0,281	0,224

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,89	0,903	0,914	0,99	1,194	1,033	1,924	1,313	1,044	0,918	0,972	1,994
B	0,406	0,489	0,592	0,481	0,683	0,539	0,937	0,721	0,567	0,633	0,514	0,616
C	0,308	0,349	0,344	0,335	0,349	0,382	0,445	0,437	0,333	0,311	0,35	0,363
D	0,241	0,26	0,357	0,361	0,295	0,335	0,333	0,321	0,279	0,257	0,269	0,332
E	0,658	0,721	0,928	0,715	1,324	1,395	1,331	1,495	1,415	3,615	3,658	3,582
F	0,44	0,379	0,575	0,591	0,664	0,621	0,722	0,669	0,821	3,579	3,576	2,269
G	0,328	0,307	0,348	0,309	0,366	0,389	0,443	0,388	0,408	3,498	2,446	0,877
H	0,293	0,224	0,221	0,273	0,217	0,241	0,289	0,259	0,268	1,237	1,166	0,368

ELISA LIF (Retrogenix) + ELISA NF155 (titulación BD)

Muestras:

· **LIF:**

- | | |
|--|----------------------------|
| 1. GDP1: 134-17 (CIDP15) | 6. EM vacunas: 422069 (C1) |
| 2. GDP2: 151-21 | 7. CIDP 8 |
| 3. GDP3: 18-1162 Box 189
(ser.immuno) | 8. CIDP 9 |
| 4. GDP4: 134-16 (LCR) → dil
1/10 | 9. CIDP13 |
| 5. SGB86 (IGOS) | 10. CIDP14 |
| | 11. Cneg 204-5 |
| | 12. Cneg 204-7 |

· **NF155:**

- titulación 22-2-53 (Box 287)
- Subclases 18-860 (hacer a 1/50)

Protocolo:

- Bloquear con leche 5% en PBS-tween 0'1% → 200 ul pozo (incubar 1h a temp. ambiente)
- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
- Diluir los **sueros**:
 - Titulación: 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 (a: 1/100, b:1/300, c:1/900, d: 1/2700, e: 1/8100 i f: 1/24300)
 - Screening: diluir sueros 1/100 en leche 5% en PBS-tween 0'1%

- 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 **H₂SO₄** 25%
- Leer a 450-620 nm

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	1	5	9		22-2-53 1/100	22-2-53 1/8100	18-860 IgG1					
B blanc	1	5	9		22-2-53 1/100	22-2-53 1/8100	18-860 IgG1					
C prot	2	6	10		22-2-53 1/300	22-2-53 1/24300	18-860 IgG2					
D blanc	2	6	10		22-2-53 1/300	22-2-53 1/24300	18-860 IgG2					
E prot	3	7	11		22-2-53 1/900	Cneg	18-860 IgG3					
F blanc	3	7	11		22-2-53 1/900	Cneg	18-860 IgG3					
G prot	4	8	12		22-2-53 1/2700	Cpos	18-860 IgG4					
H blanc	4	8	12		22-2-53 1/2700	Cpos	18-860 IgG4					

LIF 5 ug/ml

NF155 1 ug/ml

Resultado:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	1,174	0,084	0,111		1,238	0,443	0,078					
B blanc	0,116	0,143	0,533		0,099	0,084	0,063					
C prot	0,199	0,09	0,097		1,132	0,272	0,085					
D blanc	0,084	0,096	0,103		0,091	0,089	0,073					
E prot	0,151	0,078	0,081		0,805	0,195	0,079					
F blanc	0,084	0,105	0,098		0,078	0,096	0,068					
G prot	0,136	0,097	0,078		0,595	1,208	0,082					
H blanc	0,071	0,091	0,133		0,083	0,115	0,068					

- LIF → las muestra GDP1 y GDP2 son positivas, y las otras dos tienden a ser positivas pero no llegan a serlo. Da igual hacerlo con la proteína a 3 ug/ml o a 5 ug/ml
- 22-2-0053 → títulos NF155 >1/24300
- 18-860 → no salen las subclases a NF155

Transformació plàsmid HEPACAM (GlialCAM), ATP4A i ATP4B (Marta)

Plàsmid HEPACAM (GlialCAM) → RC223693 (Origene) Myc-DDK-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 H₂O_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)

*També preparo plaques de tota la vida:

- 100 de medi LB → afegir 2 g d'Agar (num. 123)
- Autoclavar (no tancar el tap del tot)
- Deixar refredar una mica i posar l'antibiòtic → en aquest cas es posa **kanamicina** 1/2000 (50 ul del stock 50 mg/ml)
- Afegir la solució de LB+agar+ampicil·lina a cada placa (decantant)
- Deixar les plaques mig obertes fins que solidifiqui (posar un paper de filtre a sobre per evitar contaminació)
- Guardar 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 4 tubs falcon de bacteris (amb doble tancament) → control positiu, control negatiu, HEPACAM i ATP4A.
- Descongelar les cèl·lules competents en gel (es troben a -80°C)

- Treure del congelador (del kit) el β mercaptoetanol (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 μ L de cèl·lules a cada tub
- Afegir 4 μ L de β ME 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 μ L
 - **GliaI CAM**: afegir 0'1 – 50 ng \rightarrow afegeixo 0,5 ul de plàsmid (50 ng).
 - **ATP4A**: afegir 0'1 – 50 ng \rightarrow afegeixo 0,5 ul de plàsmid (50 ng).
 - **ATP4B**: afegir 0'1 – 50 ng \rightarrow 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) \rightarrow 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 μ L 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 μ L \rightarrow placa ampicil·lina!!
 - Control **negatiu**: 100 μ L (2 tipus de plaques)
 - **GliaI CAM**: 50 μ L, 100 μ L, 150 μ L (2 tipus de plaques)
 - **ATP4A**: 50 μ L, 100 μ L, 150 μ L (2 tipus de plaques)
 - **ATP4B**: 50 μ L, 100 μ L, 150 μ L (2 tipus de plaques)
- Incubar tota la nit a 37°C (a l'estufa, plaques boca abaix)

23/02/2022

Starter plàsmids GliaI CAM, ATP4A, ATP4B

A primera hora: picar algunes colònies de les plaques amb GliaI CAM, ATP4A i ATP4B 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.
- 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)

24/02/2022

Maxiprep plàsmids GlialCAM, ATP4A, ATP4B

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 QIAprecipitador de la xeringa i treure l'èmbol. Posar el QIAprecipitador un altre cop i posar l'èmbol. Assecar la membrana fent passar aire a través del QIAprecipitador enèrgicament. Repetir aquest pas diverses vegades.
- Assecar la punta del QIAprecipitador amb paper adsorbent.
- Treure l'èmbol d'una xeringa nova de 5ml i posa-hi el QIAprecipitador.
- 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:

- [GlialCAM] = 1131,8 ng/ul
- [ATP4A] = 182 ng/ul
- [ATP4B] = 1075,5 ng/ul

25/02/2022

Descongelación SH-SY5Y

Descongelado 1 vial de SH-SY5Y → p7 29/09/2021

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)

Descongelación HEK293

Descongelado 1 vial de HEK293 → p6 02/02/2022

Medio de proliferación:

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

IHC Monkey peripheral nerve (LIF+, UCB CIDP04, Zika)

Muestras:

- | | |
|--------------------------|----------------------------|
| 1. GDP1: 134-17 (CIDP15) | 21. Zika Z006 |
| 2. GDP2: 151-21 | 22. Zika Z008 |
| 3. GDP3: 18-1162 Box 189 | 23. Zika ZN004A |
| 4. UCB 1 (CIDP04) | 24. Zika ZN005A |
| 5. UCB 5 (CIDP04) | 25. Zika ZN0018A |
| 6. UCB 10 (CIDP04) | 26. Zika Z010 |
| 7. UCB 11 (CIDP04) | 27. Zika Z012 |
| 8. UCB 15 (CIDP04) | 28. Zika ZN007A |
| 9. UCB 18 (CIDP04) | 29. Zika ZN008A |
| 10. Cneg | 30. Zika Z014 |
| 11. Zika 003 | 31. Zika Z016 |
| 12. Zika 004 | 32. Zika Z018 |
| 13. Zika 008 | 33. Zika ZN010A |
| 14. Zika 011 | 34. Zika ZN011A |
| 15. Zika 013 | 35. Zika ZN013A |
| 16. Zika 025 | 36. Zika Z020 |
| 17. Zika Z001 | 37. Zika Z022 |
| 18. Zika Z003 | 38. Zika Z024 |
| 19. Zika ZN001A | 39. Zika ZN015A-4 → a 1/50 |
| 20. Zika ZN002A | 40. Zika ZN017A |

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:

Muestra	Nodo /para nodo	Mielina fibras pequeñas		Mielina fibras grandes		Cels Schwann de fibras amielínicas		Axones fibras pequeñas		Axones fibras grandes		OTROS
		IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	
1		3		3								
2												
3												
4								2	3	2	3	
5						1						Fibros IgM
6						3						
7						2						Fibros IgM
8												Fibros IgM
9												Fibros IgM
10												
11								1		1		
12						2	2					
13												Fibros IgM
14						2						
15						1						Fibros IgM
16								1	1	1	1	
17								1	1	1	1	
18												
19												
20								1		1		
21										2		
22										2	3	
23						3	3					
24								1		1		
25												
26						1		2		2		Fibros IgM
27									1		1	
28										1		
29						1	3					
30								1		1		Fibros IgM
31								1	1	1	1	
32								1	1	1	1	
33						3						
34												
35								1		1		
36												
37						1						Fibros IgM
38												
39												

40						1						Fibros IgM
----	--	--	--	--	--	---	--	--	--	--	--	------------

ICC 18-860

ICC CASPR1 en muestra 18-860 → para confirmar que tiene un marcaje inespecífico contra las HEKs

IHC Monkey cerebrum, cerebellum, stomach

Muestras:

1. GDP1: 134-17 (CIDP15)
2. GDP2: 151-21
3. GDP3: 18-1162 Box 189
4. CIDP 49 (FMM)
5. Cneg

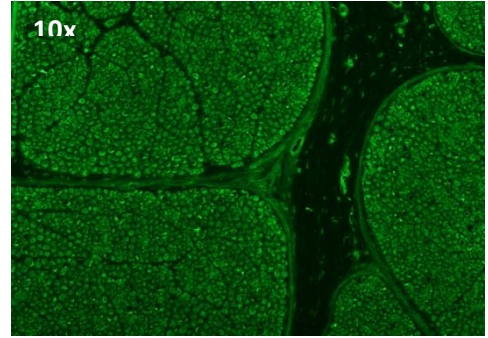
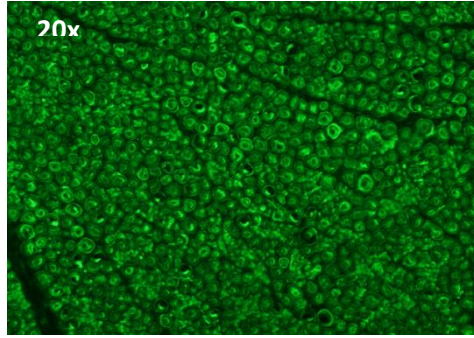
Protocolo: Monkey cerebrum cerebellum stomach

- 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

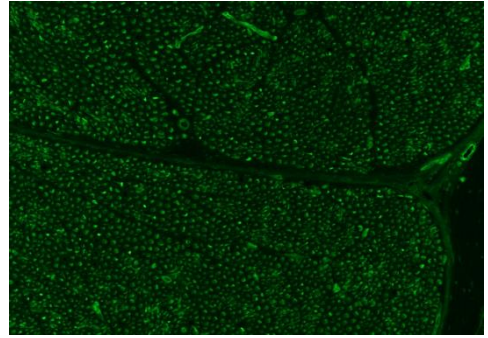
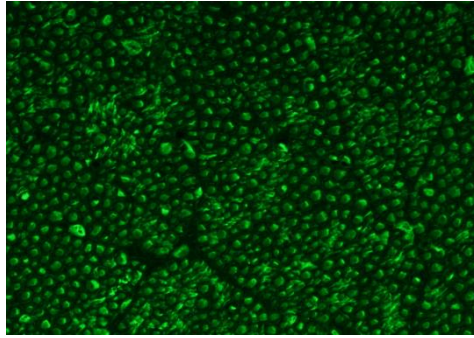
Resultado: FOTOS

- GDP1 marca mucho la mielina y en GDP2 y GDP3 ese marcaje desaparece.
- En el cerebelo las 3 muestras de GDP marcan la capa granular. Es curioso que las muestras GDP2 y 3 marcan bastante más que la muestra GDP1 (al contrario que en la mielina). De momento no he podido ver qué marca el anticuerpo comercial anti-LIF porque nos hemos quedado sin slides de cerebelo de mono.

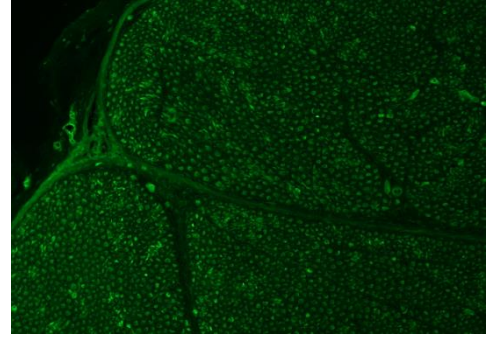
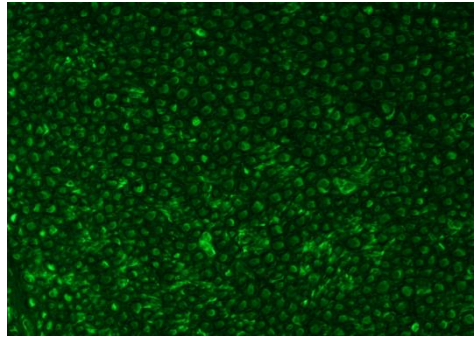
GDP1
Muestra claramente
positiva por ELISA LIF



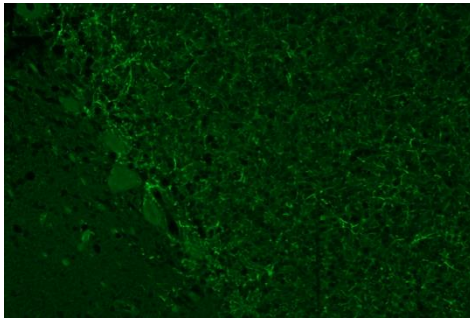
GDP2
Muestra al límite de
positividad por ELISA LIF



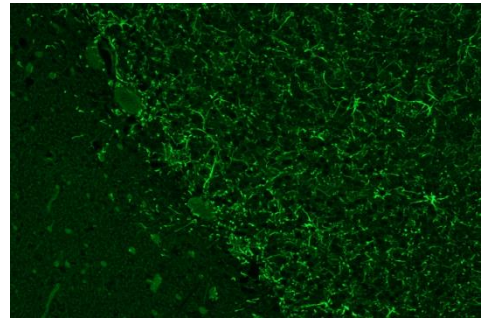
GDP3
Muestra negativa por
ELISA LIF



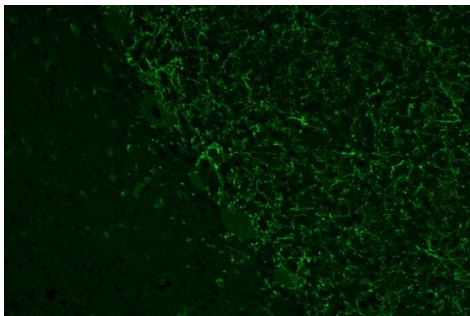
GDP1



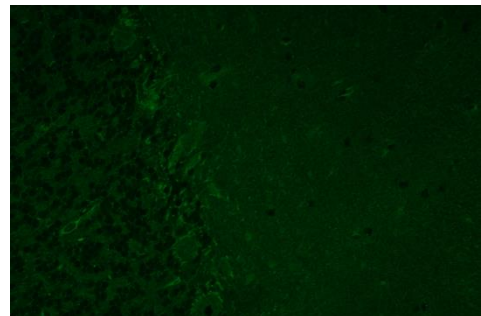
GDP2



GDP3



Cneg



01/03/2022

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

IHC Monkey peripheral nerve (Zika)

Muestras: 35 (7 portas)

41. ZN019A	59. Z039
42. Z052	60. Z042
43. ZN026A	61. ZN022A
44. ZN039A	62. Z055
45. Z030	63. Z057
46. ZN043A	64. ZN057A
47. ZN044A	65. Z062
48. ZN046A	66. Z065
49. ZN022B	67. ZN012B
50. ZN052A	68. ZN048A
51. ZN055A	69. ZN040B
52. Z060	70. ZN009D
53. ZN060A	71. ZN061A
54. ZN009B	72. ZN009E
55. Z027	73. ZN060E
56. ZN041A	74. ZN060F
57. Z034	75. Doble GDP1 - LIF
58. Z037	

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

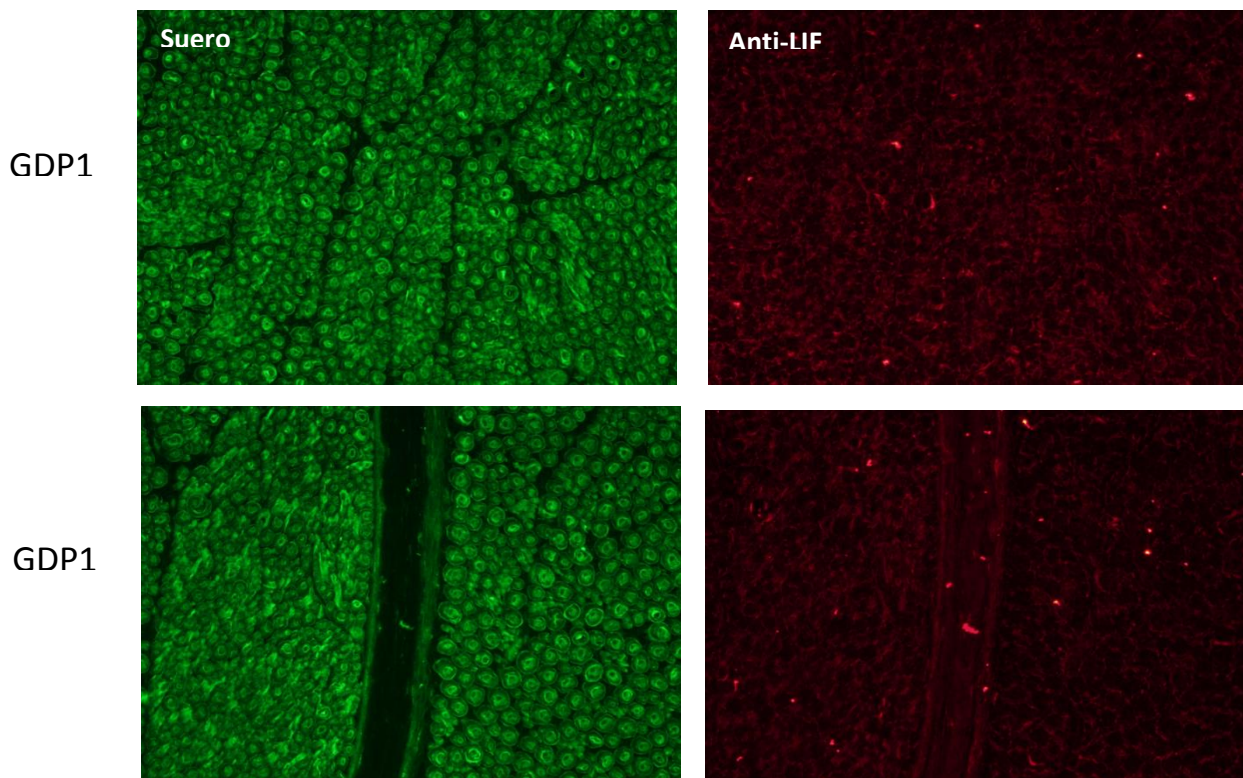
- Bloquear 30 min - 1h con Goat serum 5%
- Incubar 1h con 40 ul de suero diluído 1/10 en Goat serum 5% (4 ul suero + 36 ul goat 5%)
- 3 lavados con PBS1x
- Incubar 1h con 30-40 ul de Ac. secundarios → GAH monkey absorbed IgG 488 + GAH IgM 594 diluídos 1/500 en goat serum 5%
- 3 lavados con PBS1x
- Montar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

Resultado:

Muestra	Nodo /para nodo	Mielina fibras pequeñas		Mielina fibras grandes		Cels Schwann de fibras amielínicas		Axones fibras pequeñas		Axones fibras grandes		OTROS
		IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	
41		1		1		2	2					
42								2	3	2	3	
43								1	1	1	1	Fibros IgG IgM
44						3	3					Vasos IgM?
45								2		2		
46							3	2		2		
47								1		1		
48								2		2		Fibros IgM
49												Fibros IgG IgM
50				1				1	2	1	2	
51								2	2	2	2	
52												
53								1		1		Fibros IgM
54								1		1		
55												Tejido conectivo IgM
56						3						
57												
58									3		3	
59								1	1	1	1	
60									1		1	
61							3??	1		1		
62				1				1	2	1	2	
63								1		1		
64						2		1		1		
65				1								
66												
67								2	1	2	1	
68								1	1	1	1	
69								1		1		Fibros IgM
70												
71								2		2		
72								1		1		
73						1		2	1	2	1	
74						1		2		2		
75		3		3								LIF casi no marca nada

Doble GDP1-LIF:

- 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 primario anti-LIF (ab113262)** 1/100
- Incubar 1h con 30-40 ul de Ac. secundarios → GAH monkey absorbed IgG 488 + GAR IgG 594 diluídos 1/500 en goat serum 5%
- 3 lavados con PBS1x
- Montar con fluoromount



El anticuerpo comercial anti-LIF no marca exactamente la mielina, sin embargo sí que se ve un cierto marcaje alrededor de cada fibra (aunque con poca intensidad) → podría parecer que marca el endoneuro pero hay partes donde hay endoneuro que no están marcadas. Lo que está claro es que no colocaliza con el suero.

ICC Cels de Schwann (primarios rata y línea humana)

Muestras: doble LIF – muestras GDP

1. GDP1 (CIDP15)
2. GDP2
3. GDP3
4. Cneg

2 tipos de células:

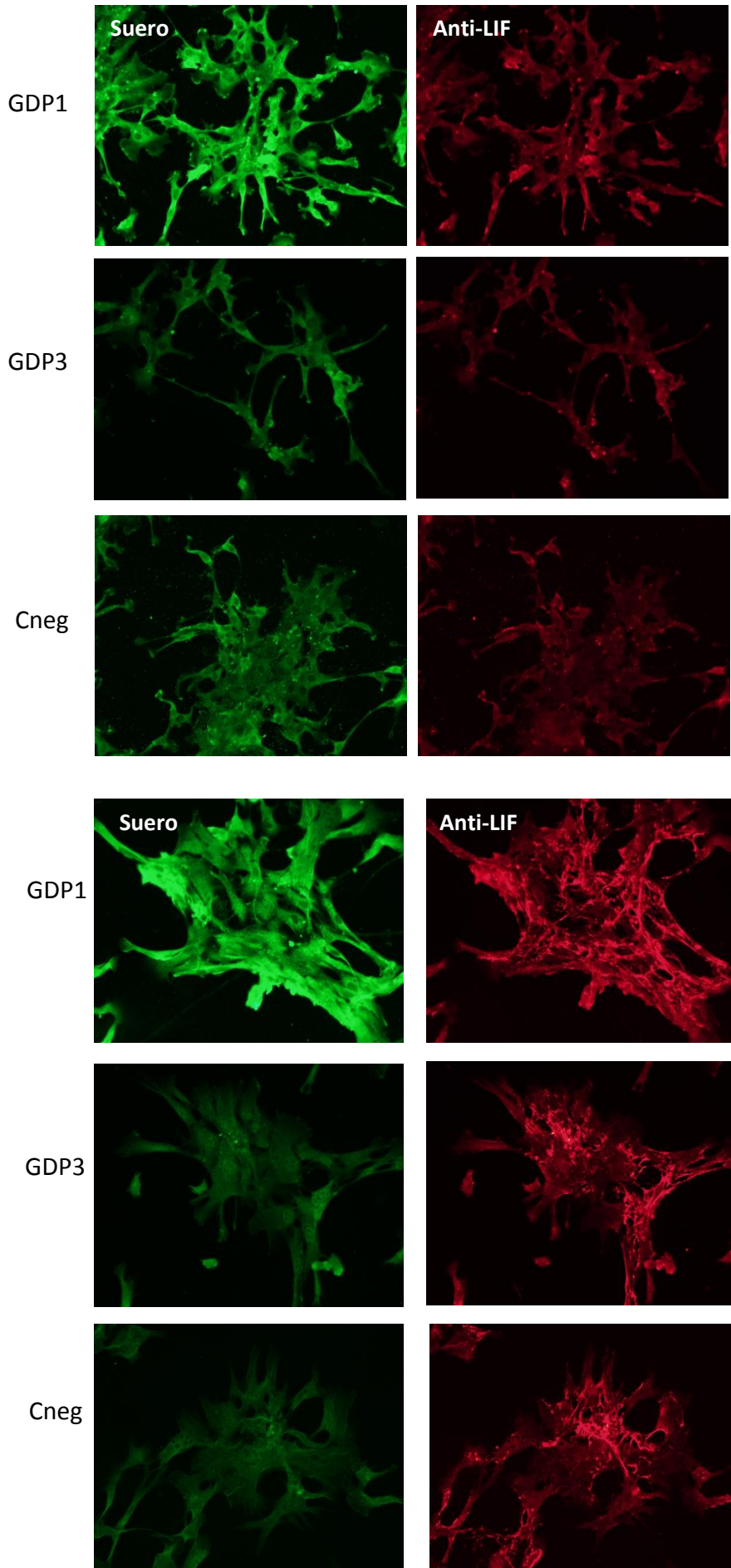
- Línea celular humana → fijadas y congeladas día 11/02/22 (cultivadas por Elba)
- Primarios rata → cels diferenciadas

Protocolo:

- Bloqueo con Goat serum 5% 1 h
- 3 lavados PBS1x
- Suero 1/50 (IgG)
- 3 lavados PBS1x
- Ac. primario anti-LIF (ab113262) 1/100
- GAH488 IgG + GAR594 IgG 1/500
- 3 lavados PBS1x
- Montar con Fluoromount

Resultado:

- CS rata: las muestras no tienen un gran marcaje ni con suero ni con LIF (aún así, parece que marca más la muestra GDP1 que el resto).
- CS línea: la muestra GDP1 marca más que el resto, pero en el resto también se ve un poco de marcaje. El LIF marca muchísimo unas estructuras filamentosas en el interior de las células de Schwann → es curioso que el 03/06/21 hice ICC de CIDP15 en CS línea (porque era supuestamente positiva por vinculin) y tenía un marcaje muy diferente (marcaba núcleos) → en esa ocasión permeabilicé las cels con tritón 0,3% y ahora no lo he hecho.



ELISA Gangliósidos día 1

Muestras:

- 5118199 IgG
- 4692213 IgG
- 720643 IgG
- 528549 IgG
- 1614932 IgG
- 139910 IgG
- 4225069 IgG
- 368893 IgG
- 364771 IgG
- 4952509 IgM

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.
 - Dil 1/2500 (x8 pozos): 0,8 ml de PBS-BSA 0'1% + 0,2 ml de la dilución anterior.
 - Dil 1/12500 (x8 pozos): 0,8 ml de PBS-BSA 0'1% + 0,2 ml de la dilución anterior.
- Poner 100 ul de suero a cada pozo, incubar toda la noche a 4°C.

	1 blanco	2 GM1	3 GD1b	4 GQ1b	5 blanco	6 GM1	7 GD1b	8 GQ1b	9 blanco	10 GM1	11 GD1b	12 GQ1b
A 1/100	511819 9	511819 9	511819 9	511819 9	469221 3	469221 3	469221 3	469221 3	720643	720643	720643	720643
B 1/500	511819 9	511819 9	511819 9	511819 9	469221 3	469221 3	469221 3	469221 3	720643	720643	720643	720643
C 1/2500	511819 9	511819 9	511819 9	511819 9	469221 3	469221 3	469221 3	469221 3	720643	720643	720643	720643
D 1/12500	511819 9	511819 9	511819 9	511819 9	469221 3	469221 3	469221 3	469221 3	720643	720643	720643	720643
E 1/100	528549	528549	528549	528549	161493 2	161493 2	161493 2	161493 2	139910	139910	139910	139910
F 1/500	528549	528549	528549	528549	161493 2	161493 2	161493 2	161493 2	139910	139910	139910	139910
G 1/2500	528549	528549	528549	528549	161493 2	161493 2	161493 2	161493 2	139910	139910	139910	139910
H 1/12500	528549	528549	528549	528549	161493 2	161493 2	161493 2	161493 2	139910	139910	139910	139910

	1 blanco	2 GM1	3 GD1b	4 GQ1b	5 blanco	6 GM1	7 GD1b	8 GQ1b	9 blanco	10 GM1	11 GD1b	12 GQ1b
A 1/100	422506 9	422506 9	422506 9	422506 9	368893	368893	368893	368893	364771	364771	364771	364771
B 1/500	422506 9	422506 9	422506 9	422506 9	368893	368893	368893	368893	364771	364771	364771	364771
C 1/2500	422506 9	422506 9	422506 9	422506 9	368893	368893	368893	368893	364771	364771	364771	364771
D 1/12500	422506 9	422506 9	422506 9	422506 9	368893	368893	368893	368893	364771	364771	364771	364771
E 1/100	495250 9 IgM	495250 9 IgM	495250 9 IgM	495250 9 IgM	C+ IgM	C+ IgM	C+ IgM	C+ IgM	C+ IgG	C+ IgG	C+ IgG	C+ IgG
F 1/500	495250 9 IgM	495250 9 IgM	495250 9 IgM	495250 9 IgM	C+ IgM	C+ IgM	C+ IgM	C+ IgM	C+ IgG	C+ IgG	C+ IgG	C+ IgG
G 1/2500	495250 9 IgM	495250 9 IgM	495250 9 IgM	495250 9 IgM	C+ IgM	C+ IgM	C+ IgM	C+ IgM	C+ IgG	C+ IgG	C+ IgG	C+ IgG
H 1/12500	495250 9 IgM	495250 9 IgM	495250 9 IgM	495250 9 IgM	C+ IgM	C+ IgM	C+ IgM	C+ IgM	C+ IgG	C+ IgG	C+ IgG	C+ IgG

02/03/2022

ELISA Gangliósidos día 2

Protocolo:

- Lavar 4 veces con PBS
- Preparar **Ac secundarios**: RAH HRP IgG dil. 1/5000 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 **H₂SO₄** al 25% a cada pozo.
- Leer en lector de placas de ELISA a 490-630 nm

Resultado:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,812	0,71	1,023	1,005	0,651	0,301	0,511	0,433	2,694	2,104	3,077	2,644
B	0,54	0,512	0,54	0,485	0,439	0,242	0,353	0,364	0,635	0,605	0,949	0,864
C	0,355	0,324	0,383	0,405	0,368	0,215	0,404	0,361	0,409	0,535	0,565	0,357
D	0,241	0,248	0,312	0,339	0,271	0,233	0,323	0,25	0,305	0,253	0,369	0,22
E	1,431	1,621	1,734	1,306	1,185	1,08	1,124	1,239	1,455	1,255	1,692	1,439
F	0,825	0,851	0,747	0,655	0,411	0,315	0,436	0,361	0,562	0,484	0,706	0,635
G	0,539	0,443	0,448	0,42	0,37	0,238	0,342	0,368	0,364	0,255	0,299	0,289
H	0,349	0,348	0,358	0,337	0,287	0,371	0,394	0,304	0,269	0,236	0,281	0,224

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1,23	1,08	0,777	0,893	1,535	0,862	0,677	0,605	1,754	0,998	0,606	0,523
B	0,639	0,593	0,468	0,503	0,871	0,47	0,421	0,467	0,802	0,555	0,468	0,305
C	0,407	0,38	0,346	0,355	0,499	0,362	0,335	0,289	0,473	0,421	0,34	0,244
D	0,311	0,35	0,397	0,264	0,414	0,332	0,347	0,298	0,367	0,406	0,319	0,213
E	2,047	1,592	1,972	0,835	1,686	1,934	2,884	2,288	1,776	3,587	3,563	3,397
F	0,958	0,807	0,942	0,416	1,096	1,152	2,835	1,605	1,196	3,546	3,406	2,631
G	0,513	0,414	0,43	0,332	0,619	0,571	2,147	0,756	0,637	3,293	2,426	0,709
H	0,287	0,276	0,25	0,293	0,318	0,315	0,856	0,415	0,628	1,884	0,921	0,318

- 720643 → GD1b IgG >1/2500 (cálculo Excel: 1/1331)
- 139910 → GD1b IgG >1/500 (cálculo Excel: 1/701)

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

IHC teasing nervio ciático rata (GDP)

Muestras:

1. Suero: GDP1 (CIDP15) / Ac. primario: LIF / GAR488 + GAH594
2. Suero: GDP3 / Ac. primario: LIF / GAR488 + GAH594

3. Suero: GDP1 / Ac. primario: ninguno / GAR488 + GAH594

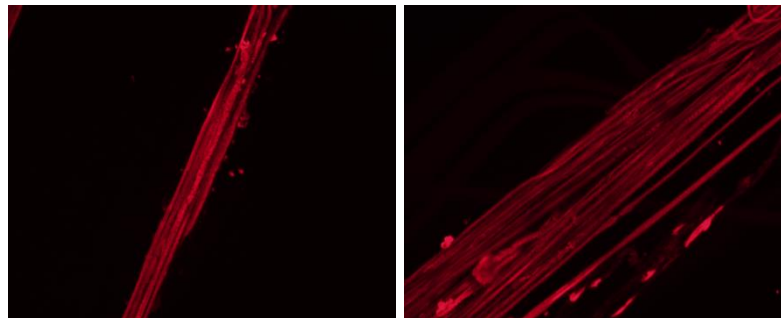
4. Suero: C+ NF155 / Ac. primario: NF / GAC488 + GAH594

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

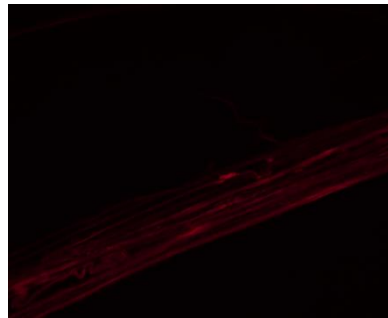
- Fijar con acetona (-20°C) 10 min
- Separar los dos grupos de tejido con Dakopen
- Bloquear con Goat serum 5% + 0'1% tritón 1h
- Suero 1/100 (en bloqueo) 1h
- Ac comercial anti-NF 1/500 o anti-LIF 1/200 (en bloqueo) 1h
- Ac secundarios: GAC488 + GAH594 IgG 1/750 o GAR488 + GAH594 IgG 1/750 (en bloqueo) 1h
- Montar con Fluoromount

Resultado:

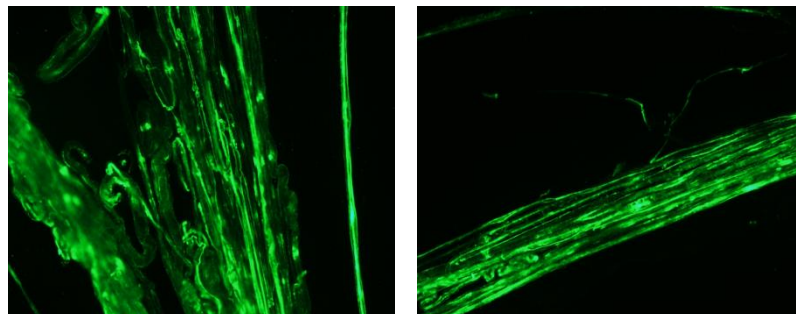
GDP1



GDP3



anti-LIF



En este caso no tengo la colocalización entre LIF y suero de GDP1 porque salieron mal algunas IHC y he hecho un mix de fotos. El anticuerpo anti-LIF marca mucho el teasing de rata (en este caso está en verde), no sabría decir exactamente qué marca pero podría ser la mielina (??).

El marcaje de GDP1 en el teasing es claramente mayor que el de GDP3 (rojo).

03/03/2022

Coating células + transfección Culture slides

6 culture slides:

- 4 perfil
- 2 EPHA7, ATP4A, ATP4B, Doble ATP4A/ATP4B

Protocolo:

- Preparar mezclas transfección → cada culture slide (8 pozos)
 - 2,2 ug DNA + 68 ul Optimem
 - ATP4A/ATP4B: 1,1 ug cada plásmido
 - 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

04/03/2022

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 congelar a -80°C → no se han bloqueado

Descongelación Células de Schwann

Descongelo 2 cels de Schwann diferentes:

- **Cels de Schwann humanas → línea celular comercial (1700, ScienceCell) → p4**
01/06/21
 - **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)
- **Cels de Schwann de rata → cultivo primario a partir de nervio ciático → p4**
01/06/2021
 - **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 placas 100 mm con gelatina 0,15%

07/03/2022

Coating ELISA NF155 / Coating ELISA CASPR1

[CASPR1]_i = 0,789 mg/ml

[NF155]_i = 0,505 mg/ml

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

- CASPR1: 48 pozos [f = 5 ug/ml → 2,5 ml buffer + 15,8 ul
- NF155: 48 pozos [f = 1 ug/ml → 2,5 ml buffer + 4,9 ul

08/03/2022

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

ICC Perfil BD

Muestra: 22-2-113

Resultado: todo negativo

ICC Cels de Schwann (primarios rata y línea humana)

Muestras:

- | | |
|-------------------------------------|--------------------|
| 1. GDP1 (CIDP15) 1/50 | 7. GDP1 1/50 IgG3 |
| 2. CIDP 86 (Laia Conca Campos) 1/50 | 8. GDP1 1/50 IgG4 |
| 3. Cneg 1/50 | 9. Cneg 1/50 IgG1 |
| 4. Cneg 1/50 | 10. Cneg 1/50 IgG2 |
| 5. GDP1 1/50 IgG1 | 11. Cneg 1/50 IgG3 |
| 6. GDP1 1/50 IgG2 | 12. Cneg 1/50 IgG4 |

2 tipos de células:

- Línea celular humana → fijadas y congeladas día 11/02/22 (cultivadas por Elba)
- Primarios rata → cels diferenciadas

Protocolo:

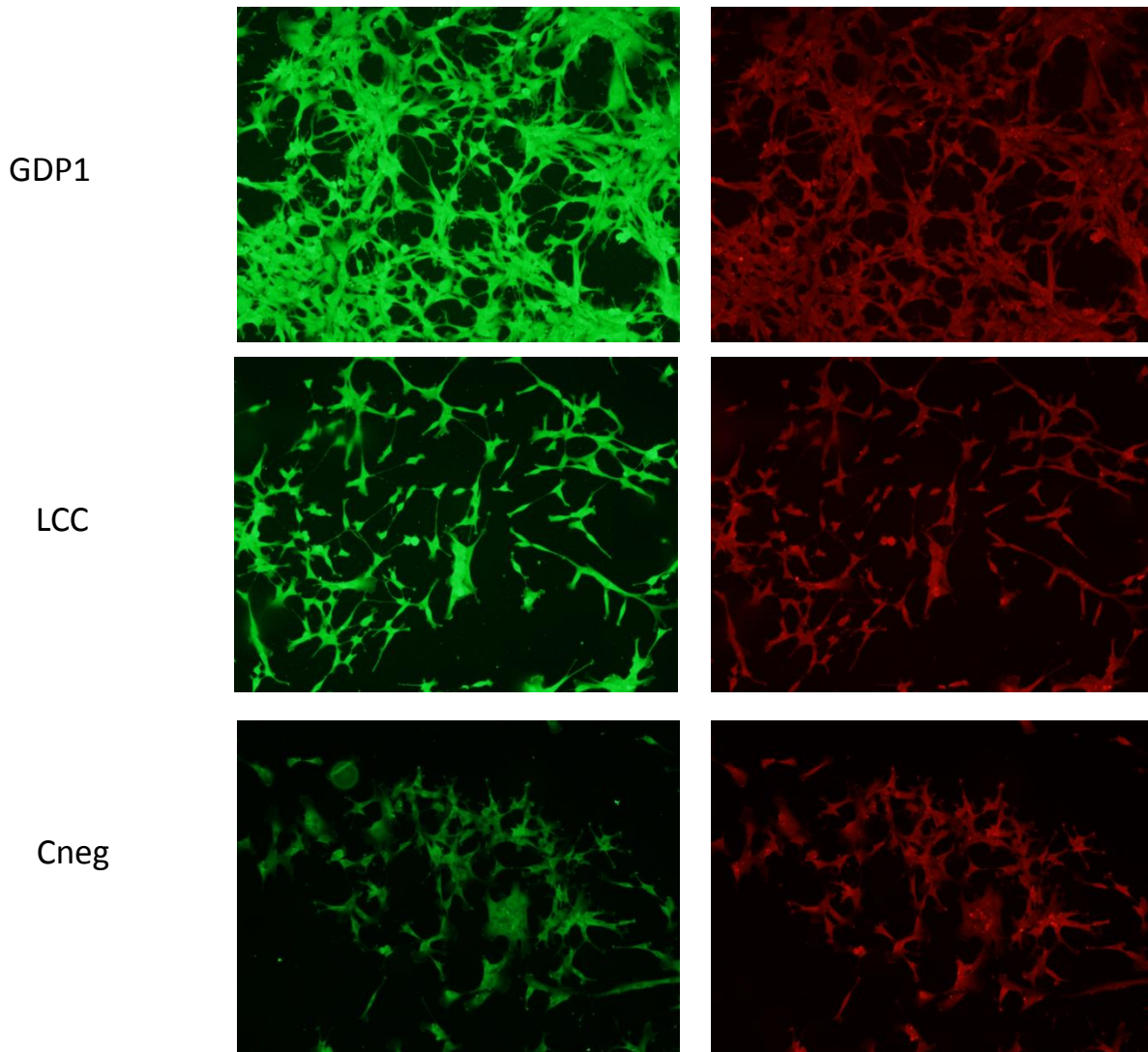
- Permeabilizar con tritón 0,3% 5 min
- 1 lavado PBS1x
- Bloqueo con Goat serum 5% 1 h
- Suero 1/50 o 1/100 (IgG)
- 3 lavados PBS1x
- Ac. primario anti-LIF (ab113262) 1/100
- GAH488 IgG + GAR594 IgG 1/500
- 3 lavados PBS1x
- Montar con Fluoromount

*En subclases no pongo Ac primario anti-LIF, y uso secundarios MAH subclases.

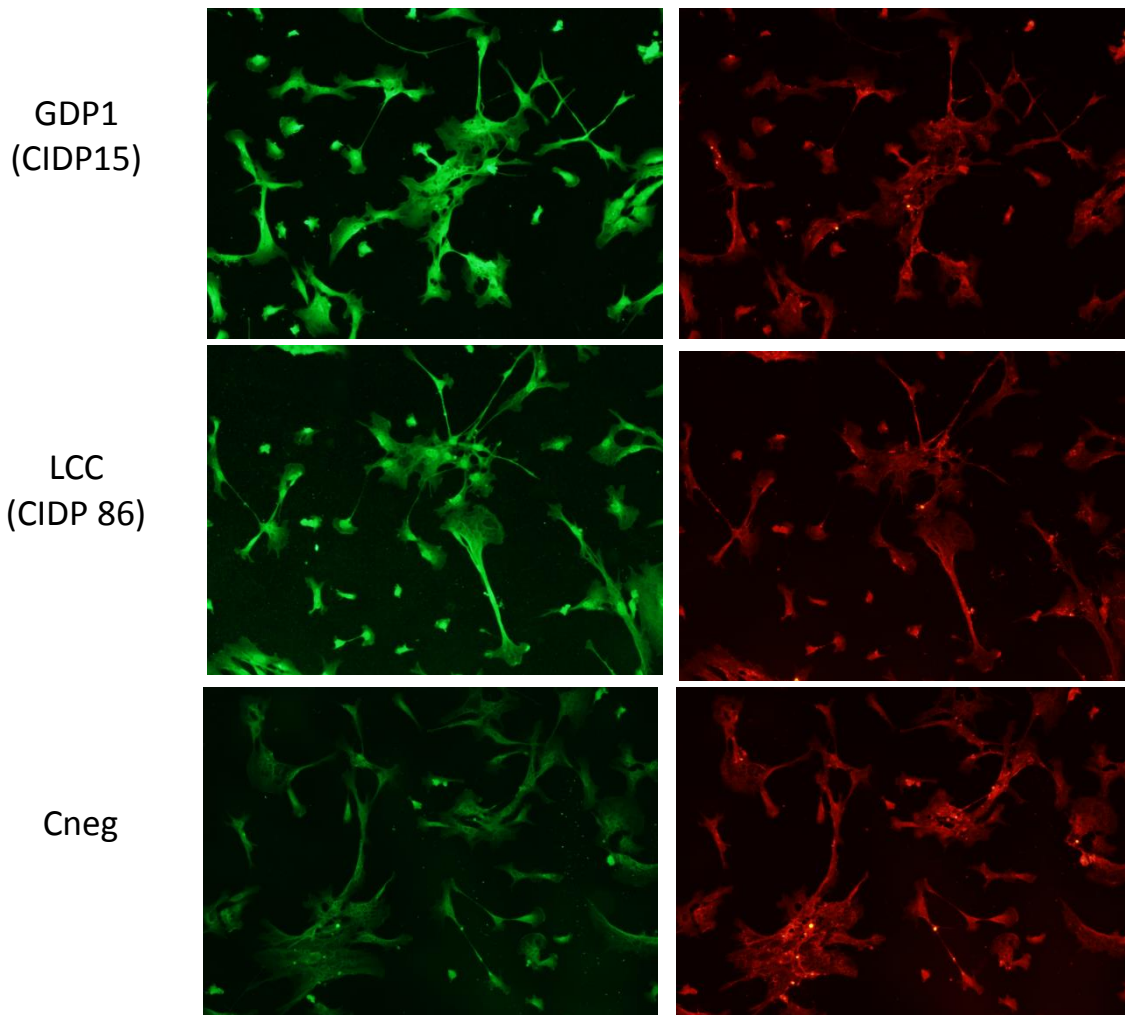
Resultado:

- Los supuestos anticuerpos anti-LIF de GDP1 claramente son IgG1 (por ELISA no nos salen... deberíamos comprar nuevos Ac secundarios para ELISA)

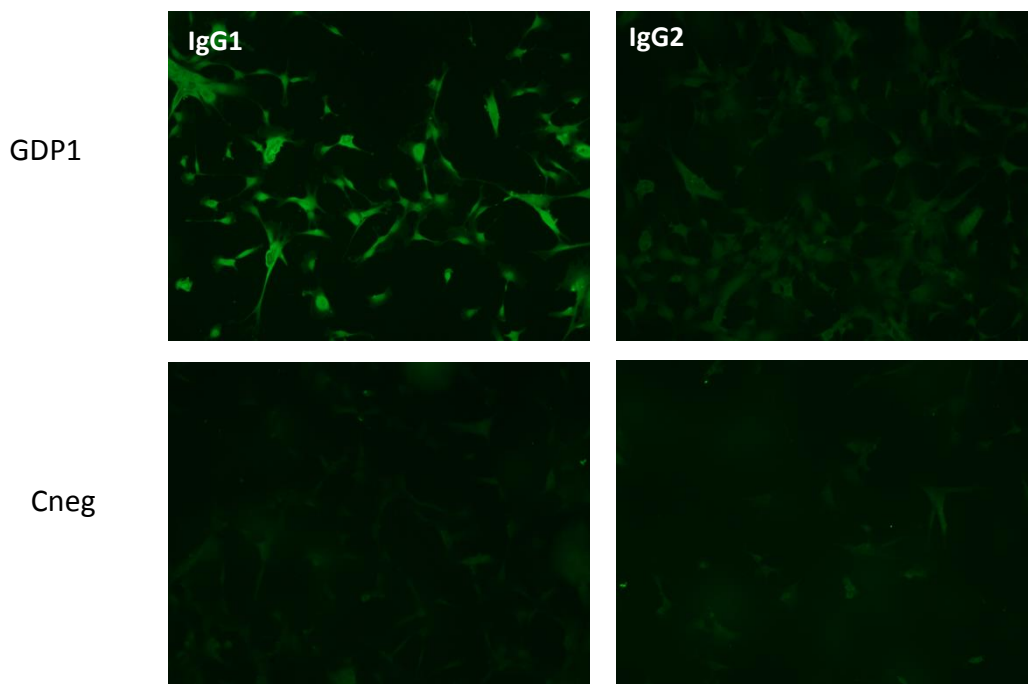
Resultados CS rata (IgG totales, y anti-LIF):

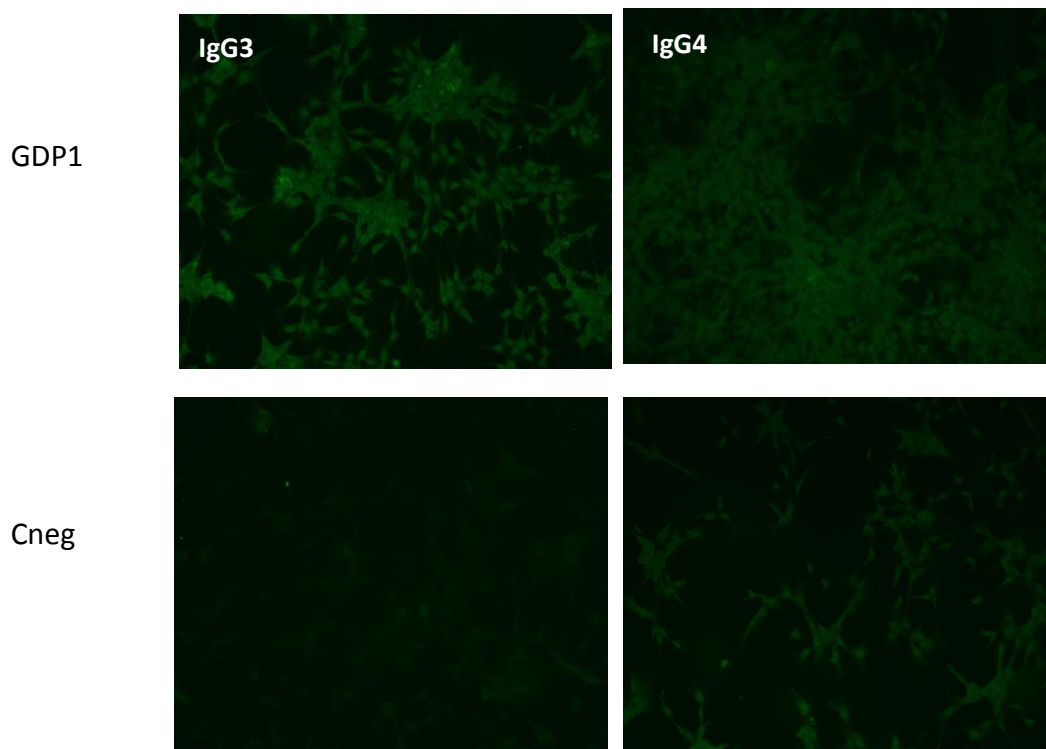


Resultados CS línea humana (IgG totales, y anti-LIF):

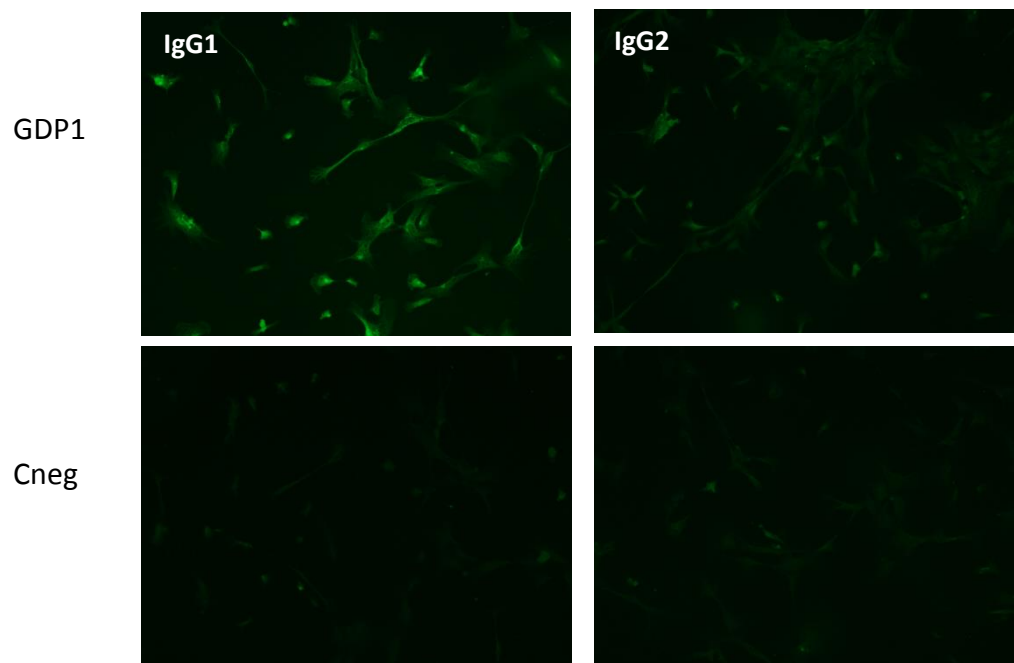


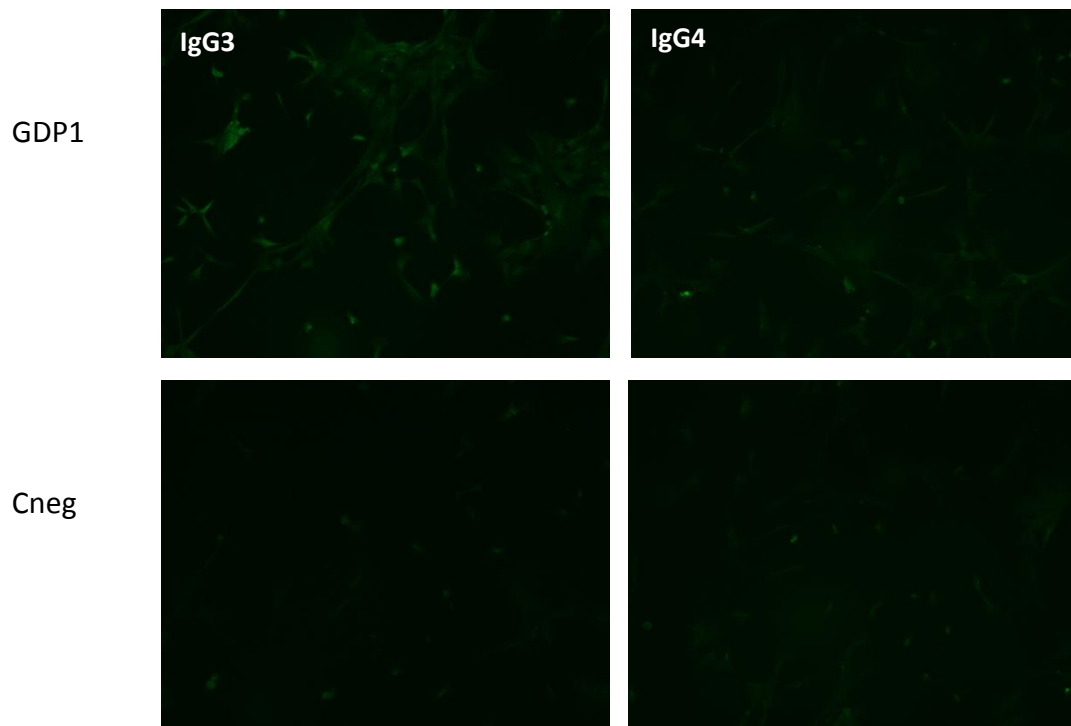
Resultados subclases CS rata:





Resultados subclases CS línea humana:





ICC EPHA7, ATP4a, ATP4b, ATP4a/4b

Muestras:

- CIDP26 (142-2, JMGV) → EPHA7
- CIDP49 (178-21, FMM) → ATP4a, ATP4b, ATP4a/4b
- CIDP86 (20-2-382, LCC) → EPHA7
- CIDP 59 (139-16, MCRA) → ATP4a, ATP4b, ATP4a/4b

Protocolo:

- Permeabilizar con tritón 0,3% 5 min
- 1 lavado PBS1x
- Bloqueo con Goat serum 5% 1 h
- Suero 1/50
- 3 lavados PBS1x
- Ac. primario anti-cMYC 1/200
- GAM488 IgG + GAH594 IgG 1/500
- 3 lavados PBS1x
- Montar con Fluoromount

Resultados:

- CIDP26 (142-2, JMGV) → EPHA7 positivo
- CIDP49 (178-21, FMM) → ATP4a positivo, ATP4b negativo, ATP4a/4b positivo
- CIDP86 (20-2-382, LCC) → EPHA7 negativo
- CIDP 59 (139-16, MCRA) → ATP4a, ATP4b, ATP4a/4b negativos

ELISA NF155, NF140 y NF186

Muestras:

- **NF155:**
 - Titulación 22-223801
 - Titulación 22-237421
 - Titulación y subclases 22-229857
- **NF140:** titulación y subclases 22-229857
- **NF186:** titulación y subclases 22-229857

Protocolo:

- Bloquear con leche 5% en PBS-tween 0'1% → 200 ul pozo (incubar 1h a temp. ambiente)
- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
- Diluir los **sueros**:
 - 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 (a: 1/100, b:1/300, c:1/900, d: 1/2700, e: 1/8100 i f: 1/24300)
 - Screening: diluir sueros 1/100 en leche 5% en PBS-tween 0'1%
- Incubar con los sueros 1h
- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
- Incubar 45min con **RAH IgG HRP** 1/3000 o **MAH HRP** IgG1 o IgG2 o IgG3 o IgG4 1/1000 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 **H₂SO₄** 25%
- Leer a 450-620 nm

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	Cneg	801c	421a	421e	857c	857 IgG1	Cneg	857c	857 IgG1	Cneg	857c	857 IgG1
B blanc	Cneg	801c	421a	421e	857c	857 IgG1	Cneg	857c	857 IgG1	Cneg	857c	857 IgG1
C prot	Cpos	801d	421b	421f	857d	857 IgG2	Cpos	857d	857 IgG2	Cpos	857d	857 IgG2
D blanc	Cpos	801d	421b	421f	857d	857 IgG2	Cpos	857d	857 IgG2	Cpos	857d	857 IgG2
E prot	801a	801e	421c	857a	857e	857 IgG3	857a	857e	857 IgG3	857a	857e	857 IgG3
F blanc	801a	801e	421c	857a	857e	857 IgG3	857a	857e	857 IgG3	857a	857e	857 IgG3
G prot	801b	801f	421d	857b	857f	857 IgG4	857b	857f	857 IgG4	857b	857f	857 IgG4
H blanc	801b	801f	421d	857b	857f	857 IgG4	857b	857f	857 IgG4	857b	857f	857 IgG4

NF155 1 ug/ml

NF186 5 ug/ml

NF140 1ug/ml

Resultado:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,267	0,332	0,853	0,243	0,24	0,103	0,17	0,088	0,097	0,118	0,138	0,076
B	0,154	0,193	0,123	0,098	0,122	0,097	0,194	0,086	0,085	0,126	0,078	0,072
C	1,025	0,23	0,598	0,239	0,237	0,075	0,988	0,066	0,112	0,655	0,117	0,062
D	0,197	0,1	0,116	0,077	0,085	0,154	0,14	0,106	0,086	0,272	0,069	0,054
E	0,572	0,191	0,338	0,263	0,179	0,077	0,135	0,079	0,108	0,266	0,077	0,102
F	0,144	0,103	0,092	0,126	0,092	0,083	0,101	0,066	0,072	0,218	0,075	0,058
G	0,374	0,183	0,234	0,187	0,147	0,069	0,094	0,098	0,095	0,198	0,083	0,061
H	0,131	0,103	0,106	0,139	0,091	0,076	0,1	0,085	0,09	0,18	0,09	0,084

- **NF155:**

- Titulación 22-223801 → 1/300 → repetir con IgG4
- Titulación 22-237421 → >1/24300: raro porque hace 6 meses el paciente tenía 1/300 → repetir con IgG4
- Titulación y subclases 22-229857 → parece 1/100. Las subclases no salen

- **NF140:** titulación y subclases 22-229857 → negativo

- **NF186:** titulación y subclases 22-229857 → negativo

*El día 10/03/2022 repito la ICC de la muestra 22-229857 y es positiva. Repetir ELISA con la muestra más concentrada.

09/03/2022

Coating células + transfección Culture slides

18 culture slides:

- 10 perfil
- 4 LRP4
- 3 NF155/CNTN1
- 1 lo uso para hacer coating de cels de Schwann (línea)

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 cels de Schwann (línea celular humana)

- 5 placas de 100 mm (Corning)
- 1 culture slide → Coating 1h Poly-D-lys 1/40 en PBS1x (día antes)

Medio de proliferación.

10/03/2022

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, bloquear y congelar a -80°C

*También he hecho transfección de **GliaICAM** con Teresa (2 culture slides)

14/03/2022

ELISA NF140 y NF186

Muestras:

- **NF140:**
 - 22-229857 1/25
 - 22-229857 1/50
 - Cneg 200-1 1/25
 - Cneg 200-2 1/25
 - Cneg 204-10 1/25
 - Cpos 1/25
- **NF186:**
 - 22-229857 1/25
 - 22-229857 1/50
 - Cneg 200-1 1/25
 - Cneg 200-2 1/25
 - Cneg 204-10 1/25
 - Cpos 1/25
- **CASPR1:** 22-2-113

Protocolo:

- Bloquear con leche 5% en PBS-tween 0'1% → 200 ul pozo (incubar 1h a temp. ambiente)
- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
- Diluir los **sueros**:
 - Screening: diluir sueros en leche 5% en PBS-tween 0'1%
- Incubar con los sueros 1h
- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
- Incubar 45min con **RAH IgG HRP** 1/3000 o **MAH HRP** IgG1 o IgG2 o IgG3 o IgG4 1/1000 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 **H₂SO₄** 25%
- Leer a 450-620 nm

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	857 1/25	Cneg	857 1/25	Cneg	22-2-113							
B blanc	857 1/25	Cneg	857 1/25	Cneg	22-2-113							
C prot	857 1/50	Cpos	857 1/50	Cpos	Cneg							
D blanc	857 1/50	Cpos	857 1/50	Cpos	Cneg							
E prot	Cneg		Cneg		Cpos							
F blanc	Cneg		Cneg		Cpos							
G prot	Cneg		Cneg									
H blanc	Cneg		Cneg									

NF140 1 ug/ml

NF186 5ug/ml

CASPR1 5 ug/ml

Resultado:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	0,158	0,095	0,863	0,092	0,091							
B blanc	0,089	0,076	0,419	0,162	0,085							
C prot	0,112	1,051	0,511	0,939	0,077							
D blanc	0,092	0,105	0,222	0,152	0,149							
E prot	0,133		0,174	0	1,382							
F blanc	0,093		0,234	0	0,168							
G prot	0,122		0,128	0	0,026							
H blanc	0,133		0,143	0	0							

- NF140 → 22-229857 negativo
- NF186 → 22-229857 positivo a 1/25 y a 1/50 (Cnegativos son negativos)
- CASPR1 → 22-2-113 negativo

IHC teasing nervio ciático rata

Muestras:

- 22-229857 1/25
- 22-2-113 1/50
- Cneg 1/25
- Cpos NF155 1/25

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

Resultado:

- 22-229857 negativo
- 22-2-113 no tengo claro si hay un poco de marcaje en el paranodo

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

15/03/2022

ICC Cels de Schwann vivas (línea humana)

Muestras:

1. GDP1: 134-17 (CIDP15) + LIF
2. GDP2: 151-21 + LIF
3. GDP3: 18-1162 Box 189 (ser.immuno) + LIF
4. LCC (CIDP 86) + LIF
5. Cneg 204-10 + LIF
6. Cneg 200-2 + LIF
7. Sólo GAR594

8. Sólo GAH488

Protocolo: (culture slide)

- Incubar 2h a 37°C con suero 1/50 diluido en medio de células de Schwann
- 1 lavado PBS1x
- Fijar con PFA4% 10 min
- 1 lavado PBS1x y quitar las piezas
- Ac. primario anti-LIF (ab113262) 1/200 en Goat serum 5%
- GAH488 IgG + GAR594 IgG 1/500
- 3 lavados PBS1x
- Montar con Fluoromount

Resultado: se ven como si fuera un telo levantándose.

Pase Células de Schwann (línea celular)

- Paso de 4 placas de 100mm a 12 → para hacer IP.
- Hago 1 placa de mantenimiento de 350.000 cels.
- Con 1 placa hago un extracto para WB → recojo células con scrapper y PBS1x (luego Borja hace el extracto de proteína)

Pase Células de Schwann (rata)

- Preparo 2 placas de mantenimiento con 300.000 c/placa
- Con 1 placa hago un extracto para WB → recojo células con scrapper y PBS1x (luego Borja hace el extracto de proteína)

Diferenciación SH-SY5Y (d0)

- 2 placas de 60mm con 200.000 c/placa y 4 ml de medio de proliferación SH-Sy5Y

Coating células + transfección Culture slides

18 culture slides:

- 3 LRP4-CASPR2
- 6 Perfil
- 9 EPHA7 + ATP4A/B

Protocolo:

- Preparar mezclas transfección → cada culture slide (8 pozos)
 - 2,2 ug DNA + 68 ul Optimem
 - En el caso de ATP4A/B: 1,1 ug de ATP4A y 1,1 ug de ATP4B
 - 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

16/03/2022**Recoger culture slides**

- Quitar medio
- Fijar PFA4% 10 min
- Quitar PFA y lavar con PBS1x
 - LRP4, CASRPR2, EPHA7, ATP4A/B: tritón 0,3% 5 min, y lavar con PBS 1x
- Quitar los pozos del culture slide (con piezas negra y blanca)
- Secar bordes, bloquear y congelar a -80°C

17/03/2022**Diferenciación SH-SY5Y (d2)**

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 µM RA	Preparar a 1/1000 cada vez que se ponga medio

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

*Debería haberlo hecho en D1

Nervio ciático de cerdo

Extraigo nervio ciático de cerdo para hacer teasing y para hacer cortes en transversal.

- **Teasing:**
 - Fijar 1h con PFA2% en agitación y hielo
 - Lavar 3x15min con PBS1x (en agitación y hielo)
- **Cortes transversales:** hago 3 pruebas
 - Fijar 2h con PFA4% y congelar con metilbutano
 - Fijar 24h con PFA4% y congelar con metilbutano
 - Fijar 24h con PFA4%, poner en sucrosa 30% 48h, y congelar con metilbutano

Resultado: el teasing no sale muy bien... está un poco disgregado el nervio. Sólo he probado a cortar el nervio fijado 2h con PFA4% y sale bastante bien.

18/03/2022

Diferenciación SH-SY5Y (d3)

Cambiar medio → medio de diferenciación **1**

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

21/03/2022

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 µM RA	Preparar a 1/1000 cada vez que se ponga medio

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

Congelación células

Congelo varios tipos de células:

- HEK293 → 2 viales de 3 millones
- SH-SY5Y → 1 vial de 1 mill
- Células de Schwann línea celular → 1 vial de 1 mill
- Células de Schwann rata → 1 vial de 1 mill

Immunoprecipitación - Pierce Classic Magnetic IP Kit (dynabeads)

Muestras:

- CIDP15 (GDP1)
- CIDP86 (LCC) (22-2-382)
- Cneg (204-10)

Células: línea células de Schwann humanas (4 placas 100mm/muestra)

Incubación con suero y lisis celular

- Incubar el cultivo con el suero del paciente a analizar 1h a 37°C (en el incubador). La dilución se hace en el propio medio de cultivo (en la placa)
 - Para IgG: 1/100 → 30 µl de suero en 3 ml de medio

**La dilución se hace en la misma placa de cultivo (sacar el medio hasta dejar 3 ml por placa, y poner el suero)*
- Lavar placas 1 vez con PBS 1x
- Añadir 800 µl de IP Lysis/Wash buffer + inhibidores de proteasas 1x a cada placa. Dejar en agitación fuerte (fijadas con cinta) durante 5 min a 4°C → **en este caso lo he dejado 30 min agitando**
- Transferir el lisado a un eppendorf y centrifugar 10 minutos a 13000 g → **he transferido cada IP de cada muestra a 3 eppendorfs (en 1 sólo no cabía)**

Preparación de las bolas magnéticas

- Poner 25 µl de Pierce Protein A/G Magnetic Beads a un eppendorf → **preparo 3 epp/muestra**
- Añadir 175 µl de IP Lysis/Wash Buffer y hacer vórtex (suave)
- Poner el tubo en el soporte magnético. Eliminar el sobrenadante (sin retirar el eppendorf)

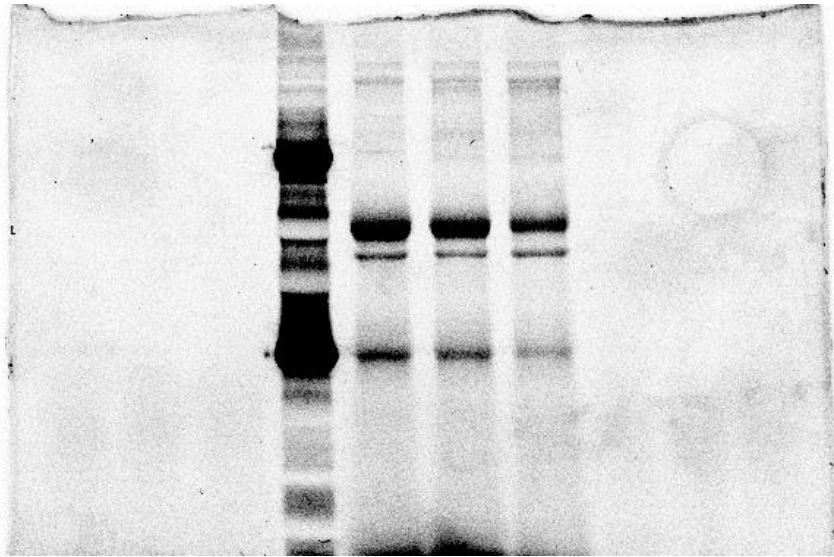
- Añadir 1 ml de IP Lysis/Wash Buffer y hacer vórtex (suave). Poner de nuevo en el soporte magnético y eliminar el sobrenadante.

Immunoprecipitación

- Añadir la mezcla antígeno-anticuerpo (primera parte) al eppendorf con las bolas magnéticas lavadas e incubar a temperatura ambiente 1 hora en agitación (rotación).
- Poner el eppendorf en el soporte magnético y eliminar el sobrenadante.
- Añadir 500 µl de IP Lysis/Wash buffer (con inhibidores de proteasas 1x) y mezclar. Poner en el soporte magnético y eliminar el sobrenadante.
- Volver a repetir el lavado → **en este momento junto las bolas magnéticas de los 3 eppendorfs de cada muestra (pongo 500 ul de buffer a cada epp para resuspender las bolas y lo junto todo)**
- Añadir 500 µl de agua destilada ultrapura y mezclar. Poner en el soporte magnético y eliminar el sobrenadante.
- Añadir **50 µl** de Lane Marker Sample Buffer (diluida 5x en agua destilada) al tubo y calentar a 96 – 100 °C durante 10 minutos. → **añado 5 % de B-mercaptoetanol al Lane Marker Sample Buffer: preparo 50 ul LMSB + 2,5 ul de B-mercapto + 200 ul de agua destilada.**
- Poner en el soporte magnético para que las bolas magnéticas se separen.
- Con el sobrenadante realizar la electroforesis en gel de acrilamida.

Electroforesis IP

- Preparo los geles con el kit TGX Stain-Free FastCast Acrylamide kit 12 % (Bio-Rad) → para poder ver en el ChemyDoc las bandas del gel antes de transferirlas a la membrana (el kit me lo deja Diego).
- Cargo 35 ul de muestra a cada pozo
 1. Marcador (10 ul)
 2. IP GDP
 3. IP LCC
 4. IP Cneg
- Corro el gel 30 min a 20mA y el resto de tiempo a 40 mA
- Miro el gel en Chemydoc
- Transferencia a membrana de nitrocelulosa → programa Mixed Proteins



No se ve la banda del LIF, aparentemente tanto GDP como LCC y el control negativo tienen las mismas bandas.

Western Blot IP LIF

- Bloquear con TBS-caseína
- Ac primario anti-LIF 1/500 (en TBS-caseína) → overnight 4°C
- 3 lavados con TBS-tween
- Ac secundario: GAR680 1/7500 (en TBS tween-caseína)
- 3 lavados con TBS-tween

Resultado: no se ve ninguna banda a la altura del LIF... comprar otro anticuerpo primario para poner a punto el WB → guardo la membrana para incubarla con el nuevo anticuerpo cuando llegue

22/03/2022

Coating Laminina (dif SH-SY5Y)

Coating de 2 placas de 60mm con 26 cubres 9 mm → laminina 2,5 ug/ml en PBS

Dejar overnight a 37°C

Nervio ciático de cerdo

Extraigo nervio ciático de cerdo para hacer teasing y para hacer cortes en transversal.

- **Teasing:**
 - Fijar 1h con PFA2% en agitación y hielo

- Lavar 3x15min con PBS1x (en agitación y hielo)
- **Cortes transversales:**
 - Fijar 4h con PFA4% y congelar con metilbutano

Resultado: sale todo muy bien!!!!

23/03/2022

Nervio ciático de rata

Extraigo nervio ciático de rata para hacer cortes en transversal

- Fijar 24h con PFA4% y congelar con metilbutano → *Finalmente lo dejo 48h fijando en la cámara fría y lo congelo el día 25/03/2022

Resultado: sale muy bien!! En algunas partes hay un poco de artefacto de congelación. La próxima vez poner el nervio en placa de agar, pinchar con agujas los extremos (placa que se usa para sacar los GRD) y fijar así (para que no se encoja el nervio).

24/03/2022

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

Coating ELISA LIF

[LIF]_i = 200 ug/ml (proteína nueva de Abcam, diluída en 250 ul).

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

- LIF: 4 pozos [f] = 1 ug/ml
- LIF: 4 pozos [f] = 3 ug/ml
- LIF: 4 pozos [f] = 5 ug/ml

25/03/2022

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

ELISA LIF (prueba proteína nueva) y CASPR1 (muestras BD)

Pruebo LIF 1ug/ml, 3 ug/ml, 5 ug/ml con muestras GDP1, LCC, y 2 controles negativos.

Muestras CASPR1:

- 22-2-117
- 22-2-118
- 22-2-119
- 22-2-120

	1 (1 ug/ml)	2 (3 ug/ml)	3 (5 ug/ml)	4	5	6
A prot	0,298	1,053	0,913	0	0,167	0,218
B blanc	0,194	0,157	0,148	0	0,129	0,181
C prot	0,253	0,175	0,14	0	0,175	0,663
D blanc	0,241	0,196	0,261	0	0,149	0,163
E prot	0,205	0,144	0,083	0	0,194	0
F blanc	0,256	0,119	1,025	-0,002	0,214	-0,002
G prot	0,162	0,123	0,067	-0,001	0,208	-0,001
H blanc	0,225	0,137	0,217	-0,001	0,271	0

LIF

CASPR1

Resultado:

- LIF: Mejor condición 3 ug/ml. LCC sale negativa!!!
- CASPR1: todas las muestras negativas

28/03/2022**Diferenciación SH-SY5Y (d13)**

Cambiar medio → medio de diferenciación **3**

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

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

29/03/2022**IHC Monkey peripheral nerve (Zika)****Muestras:**

1. Zika 004 IgG	17. Z015
2. Zika 004 IgM	18. Z019
3. ZN004A IgG	19. Z025
4. ZN004A IgM	20. Z060B
5. ZN010A IgG	21. Z033
6. ZN019A IgG	22. Z044
7. ZN019A IgM	23. Z054
8. ZN022A IgM	24. Z056
9. ZN039A IgG	25. 187-11
10. ZN039A IgM	26. 151-6
11. ZN041A IgG	27. 188-13
12. ZN043A IgM	28. 188-17
13. ZN057A IgG	29. 189-05
14. Zika 011 IgG	30. 151-14
15. Z004	31. 151-05
16. Z007	32. 198-01

33. 198-04

37. 206-05

34. 198-06

38. 207-05

35. 205-16

39. 22-3-233

36. 206-04

40. LCC

Protocolo: (muestras 1-14 → para comprobar que marcan las Cels de Schwann amielínicas)

- 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 NCAM 1/50
- 3 lavados con PBS1x
- Incubar 1h con 30-40 ul de Ac. secundarios:
 - IgG: GAH monkey absorbed IgG 488 + GAM 594 diluídos 1/500
 - IgM: GAH IgM 488 + GAM 594 diluídos 1/500
- 3 lavados con PBS1x
- Montar con fluoromount

Protocolo: (muestras 15-40)

- 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

Muestra	Nodo /para nodo	Mielina fibras pequeñas		Mielina fibras grandes		Cels Schwann de fibras amielínicas		Axones fibras pequeñas		Axones fibras grandes		OTROS
		IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	
1						3						
2							2					
3						3						
4							2					
5						3						
6		1		1		1						
7							2					
8							0					
9						2						
10							1					
11						3						
12							2					
13		2				2						
14						2						
15												
16												
17												
18									2		2	
19												
20												
21						1						
22									1		1	
23						1						
24												
25									1		1	
26												
27												
28												
29												
30												
31									2		2	
32												
33												
34												
35												
36						2						
37												
38												
39												

40		1/2		1/2		1						
----	--	-----	--	-----	--	---	--	--	--	--	--	--

IHC teasing nervio ciático cerdo

Muestras:

- 22-2-113
- Cpos NF155+

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

Resultado: no se ve bien ni el control positivo!!! Repetir

IHC cortes transversales nervio ciático de cerdo y de rata

Muestras:

1. GDP1 / Ac.anti-LIF
2. LCC /Ac.anti-LIF
3. EM vacunas 1598702 (B2.2) / Ac. anti-S100
4. Suero anti-MAG positivo (IgM) / Ac. anti-S100
5. EM vacunas 514508 (C7.2) IgG / Ac. anti-NCAM
6. ZN010A (IgG) / Ac. anti-NCAM

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

- Fijar con acetona 10 min
- Separar los grupos de tejido con Dakopen
- Bloquear con Goat serum 5%
- Suero 1/50 (en bloqueo) 1h
- Ac comercial:
 - Anti-LIF 1/100
 - Anti-S100 1/50

- Anti-NCAM (CD56) 1/50
- Ac secundarios:
 - LIF y S100: GAR594 IgG + GAH488 IgG 1/1000
 - NCAM: GAM594 IgG + GAH488 IgG 1/1000
 - Suero 4: GAR594 IgG + GAH488 IgM 1/1000
- Montar con Fluoromount

Resultado:

1. GDP1 / Ac.anti-LIF → no marca ni suero ni LIF
2. LCC /Ac.anti-LIF → no marca ni suero ni LIF
3. EM vacunas 1598702 (B2.2) / Ac. anti-S100 → marca muy bien S100 (tanto en cerdo como en rata), pero no marca el suero)
4. Suero anti-MAG positivo (IgM) / Ac. anti-S100 → marca muy bien S100 (tanto en cerdo como en rata), pero no marca el suero)
5. EM vacunas 514508 (C7.2) IgG / Ac. anti-NCAM → no marca ni suero ni NCAM (en elnervio de rata parece que el suero marque un poco las amielínicas)
6. ZN010A (IgG) / Ac. anti-NCAM → no marca ni suero ni NCAM

Mejorar la permeabilización para que se vean los anticuerpos del suero!! En rata no saldrá nunca el suero anti-MAG porque no hay MAG.

Coating células + transfección Culture slides

24 culture slides:

- 14 perfil
- 4 LRP4
- 1 NCAM (Elba)
- 5 EPHA6 / ATP4A-4B

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

30/03/2022

Recoger culture slides

- Quitar medio
- Fijar PFA4% 10 min
- Quitar PFA y lavar con PBS1x
 - LRP4, EPHA7, ATP4A/B: tritón 0,3% 5 min, y lavar con PBS 1x
- Quitar los pozos del culture slide (con piezas negra y blanca)
- Secar bordes, bloquear y congelar a -80°C

Diferenciación SH-SY5Y (d15)

Cambiar medio → medio de diferenciación **3**

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

*En este caso no lo hago porque me pongo mala

01/04/2022

Diferenciación SH-SY5Y (d17 dif)

- Fijo las 2 placas 15 min con PFA 4% → en una de ellas se habían despegado todas las células, en la otra no
- 1 lavado con PBS1x
- Congelar a -80°C

*Lorena prueba a hacer ICC con estas células y aunque la NF se ve bien, el suero CNTN1+ no marca (las células están preservadas pero no marcan bien los sueros)

05/04/2022

Descongelación SH-SY5Y

Descongelo 1 vial de SH-SY5Y

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)

Descongelación Células de Schwann humanas

Cels de Schwann humanas → línea celular comercial (1700, ScienceCell)

- **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)

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

06/04/2022

Coating células + transfección Culture slides

12 culture slides:

- 10 perfil
- 2 EPHA7

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

Descongelación SH-SY5Y

Descongelo otro vial de SH-SY5Y porque el del día anterior está contaminado

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)

07/04/2022

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, bloquear y congelar a -80°C

08/04/2022

Coating cels de Schwann (línea celular humana)

- 2 placas de Poly-D-lys → Coating Poly-D-lys 1/40 en PBS1x (día antes)
- 200.000 c/placa

Medio de proliferación.

Diferenciación SH-SY5Y (d0-d1)

- 3 placas de 60mm con 120.000 c/placa y 4 ml de medio de proliferación SH-Sy5Y (por la mañana)
- Por la tarde cambio el medio de proliferación por medio de diferenciación 1

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 μ M RA	Preparar a 1/1000 cada vez que se ponga medio

ELISA CASPR1

Muestras:

- 22-2-231
- Cneg
- Cpos

Protocolo:

- Bloquear con leche 5% en PBS-tween 0'1% → 200 ul pozo (incubar 1h a temp. ambiente)
- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
- Diluir los **sueros** en leche 5% en PBS-tween 0'1%
- 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 **H₂SO₄** 25%
- Leer a 450-620 nm

Resultado: negativo

11/04/2022

Congelación cubres Cels.Schwann (línea celular humana)

2 placas con cubres pequeños preparadas el día 08/04/2022

- Fijar con PFA4% 10min
- 1 lavado con PBS1x
- Se quita el PBS1x y se congelan a -80°C (sin bloquear)

Diferenciación SH-SY5Y (d4)

Cambiar medio → medio de diferenciación **1**

*Preparo 12 ml medio dif **1** + 12 ul RA (pongo 4 ml/placa)

13/04/2022

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 µM RA	Preparar a 1/1000 cada vez que se ponga medio

*Preparo 12 ml medio dif **2** + 12 ul RA (pongo 4 ml/placa)

14/04/2022

Coating Laminina (dif d7 SH-SY5Y)

Coating de 3 placas de 60mm con 26 cubres 9 mm → laminina 2,5 ug/ml en PBS

Dejar overnight a 37°C

15/04/2022

Diferenciación SH-SY5Y (d8)

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 12 ml medio dif **2** + 12 ul RA (pongo 4 ml/placa)

Congelación PBMC (NHC 1108585)

6 tubos CPT de M. Bocanegra Campos (NHC 1108585) → posible CASPR1+

- Centrifugar 1650g 20min sin freno
- Lavar con suero fisiológico 1:1
- Centrifugar 300g 5min
- Resuspender en PBS1x y contar las células → 3,3 millones de cels/ml
- Congelar en FBS+10%DMSO → congelo 6 viales con aproxc 3 millones de cels/vial

17/04/2022

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

19/04/2022

ICC EPHA7

Células transfectadas día 07/04/2022

Muestras:

- | | |
|-----------|---------------|
| 1. CIDP6 | 5. Cneg 202-2 |
| 2. CIDP19 | 6. Cneg 198-1 |
| 3. CIDP26 | 7. Cneg 198-3 |
| 4. CIDP49 | 8. Cneg 198-5 |

Protocolo:

- Hago la misma ICC en dos culture slides: uno permeabilizado (tritón 0'3% 5 min) y otro sin permeabilizar
- Bloquear con Goat Serum 5% 1h
- Incubar con sueros 1/40
- Ac.anti-EPHA7 1/50
- GAH594 IgG + GAR488 IgG 1/1000

Resultado: No se ve el ac comercial anti-EPHA7 en ninguna muestra. No se ven muy positivas las muestras... sólo un poco CIDP6 y CIDP49 → nose si están mal transfectadas. HACER DE NUEVO!

IHC Monkey peripheral nerve

Muestras:

1. 22-2-231 (IgG – IgM) / GAH488 IgG monkey adsorbed + GAH594 IgM 1/500
2. Cneg 202-2 (IgG-IgM) / GAH488 IgG monkey adsorbed + GAH594 IgM 1/500
3. CIDP15 - GDP1 (IgG) / Ac.anti-LIF 1:20 (Invitrogen PA579600) / GAH488 IgG monkey adsorbed + GAR594 IgG 1/500
4. CIDP19 (IgG) / Ac. anti-EPHA7 1:50 (ab204113) / GAH488 IgG monkey adsorbed + GAR594 IgG 1/500
5. 22-2-374 (IgG) / Ac. anti-CASPR1 1:20 (ab133634) / GAH488 IgG monkey adsorbed + GAR594 IgG 1/500

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
- 3 lavados con PBS1x
- Montar con fluoromount

Resultado:

1. Marca un poco la mielina en IgG
2. Negativo
3. El suero marca la mielina pero el marcaje está bajo (no es como antes). El LIF parece que no marque nada.
4. Parece que CIDP19 marque un poco las amielínicas pero no lo veo claro. El anticuerpo anti-EPHA7 tiene un marcaje un poco extraño y difuso(no sabría definir qué estructuras marca)
5. Creo que la muestra marca algún paranodo, pero es difícil de diferenciar porque también marca los axones.

Diferenciación SH-SY5Y (d12)

Cambiar medio → medio de diferenciación **3**

*Preparo 12 ml medio dif **3** + 12 ul RA (pongo 4 ml/placa)

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

20/04/2022

Coating células + transfección Culture slides

12 culture slides:

- 2 Doble CNTN1-CASPR1
- 4 LRP4
- 6 Perfil

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

Diferenciación SH-SY5Y (antigua, d0)

- 2 placas de 60mm con cubres → coating Poly-D-lys 1/40 (1h a 37°C)
- 100.000 c/placa y 4 ml de medio de proliferación SH-SY5Y

21/04/2022

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, bloquear y congelar a -80°C

Diferenciación SH-SY5Y (d14)

Cambiar medio → medio de diferenciación **3**

*Preparo 12 ml medio dif **3** + 12 ul RA (pongo 4 ml/placa)

Diferenciación SH-SY5Y (antigua, d1)

- 2 placas de 60mm → poner medio de diferenciación

Medio de diferenciación SH-SY5Y antiguo (50 ml):

- 48 ml Neurobasal
- 1 ml B27 (2 %)
- 25 µl NGF (50 ng/ml) → en este caso no pongo NGF porque no hay
- 0'5 ml Pen-Strep (1 %)
- 0'5 ml Glutamax (1 %)

22/04/2022

Diferenciación SH-SY5Y (d15)

Fijar las 3 placas → 15 min con PFA 4%

Congelar a -80°C

25/04/2022

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

ICC SH-SY5Y

Muestras (IgG):

- CIDP 44
- CIDP 70
- CASPR1+
- Cneg

Resultado: solo CIDP 44 sale claramente positiva, el resto no se ven mucho

27/04/2022

Coating células + transfección Culture slides

24 culture slides:

- | | |
|------------------------|--------------|
| · 4 NF155 | · 6 GlialCAM |
| · 4 NF186 | · 2 EPHA7 |
| · 2 CNTN1 | · 4 Perfil |
| · 2 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

28/04/2022

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, bloquear y congelar a -80°C

ICC confirmaciones Interlab Validation (cels sin fijar y fijadas)

Muestras:

- **NF155:**

- | | |
|---|---|
| ○ 13 → sólo se hace en cels vivas porque no queda muestra | ○ 56 → sólo se hace en cels vivas porque no queda muestra |
| ○ 22 (212-14) | ○ 57 |
| ○ 30 | ○ 71 |
| ○ 39 | ○ 74 |
| ○ 40 | ○ 104 |
| ○ 41 | ○ 129 |
| ○ 51 → sólo se hace en cels vivas porque no queda muestra | ○ 144 |
| | ○ 169 |
| | ○ Cpos |

- **NF186:**

- | | |
|---|---|
| ○ 13 → sólo se hace en cels vivas porque no queda muestra | ○ 56 → sólo se hace en cels vivas porque no queda muestra |
| ○ 22 (212-14) | ○ 71 |
| ○ 40 | ○ 104 |
| ○ 41 | ○ 129 |
| ○ 51 → sólo se hace en cels vivas porque no queda muestra | ○ 144 |
| | ○ Cneg |
| | ○ Cpos |

- **CNTN1:**

- | | |
|------|------|
| ○ 2 | ○ 45 |
| ○ 36 | ○ 86 |

- 143
- Cneg
- Cpos
- **Doble CNTN1/CASPR1:**
 - 90
 - 62
 - 22-2-374
 - 22-2-374 1/50
 - 22-5-391 1/10
 - Cneg
 - Cpos

Protocolo cels vivas (sin fijar):

- Incubar con suero 1/100 en medio HEKs (1h a 37°C) → preparo 200 ul de cada muestra para cubrir el pozo
- 3 lavados con PBS1x
- Fijar 10 min con PFA4%
- 1 lavado con PBS1x y quitar la pieza de los culture slides
- Incubar con anticuerpo comercial (diluído en goat serum 5% o rabbit serum 1/40) 1h a RT
- 3 lavados con PBS1x
- Incubar con Ac.secundarios 1/750 (1h a RT)
- 3 lavados PBS1x
- Montar con Fluoromount

Protocolo cels fijadas (habitual):

- Fijar 5 min con PFA4%
- 1 lavado con PBS1x y quitar la pieza de los culture slides
- Bloquear con Goat Serum 5 % o con Rabbit serum 1/40 30min
- Incubar con sueros 1/100 en goat serum (1h a RT)
- 3 lavados con PBS1x
- Incubar con anticuerpo comercial 1h a RT
- 3 lavados con PBS1x
- Incubar con Ac.secundarios 1/750 (1h a RT)
- 3 lavados PBS1x
- Montar con Fluoromount

Resultado: ICC cels vivas / ICC cels fijadas

- **NF155:**
 - 13: +
 - 22 (212-14): + / +

- 30: - / -
- 39: + / +
- 40: + / +
- 41: - / -
- 51: + débil
- 56: + débil
- 57: + / +
- 71: - / -
- 74: + / +
- 104: - / -
- 129: + / + (mucho fondo)
- 144: + / + dudoso (mucho fondo)
- 169: - / -
- Cpos

· **NF186:**

- 13: + débil
- 22 (212-14): - / -
- 40: + / dudoso
- 41: ++ / -
- 51: + débil
- 56: +
- 71: + / + débil
- 104: - / -
- 129: + / + débil (mucho fondo)
- 144: + / + (mucho fondo)
- Cneg
- Cpos

· **CNTN1:**

- 2: + débil / -
- 36: + / + mucho fondo
- 45: + débil / +
- 86: + / +
- 143: - (pocas cels) / -
- Cneg
- Cpos

· **Doble CNTN1/CASPR1:**

- 90: + débil / -
- 62: - / -
- 22-2-374: + débil / -
- 22-2-374 1/50: + débil / -
- 22-5-391 (LCR 1/10): + débil / -
- Cneg
- Cpos

Coating ELISA NF155, CASPR1, CNTN1

[CASPR1]_i = 0,789 mg/ml

[NF155]_i = 0,20 mg/ml

[CNTN1]_i = 0,25 mg/ml

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

- CASPR1: 24 pozos []f = 5 ug/ml → 1,25 ml buffer + 7,9 ul
- NF155: 8 pozos []f = 1 ug/ml → 400 ul buffer + 2 ul
- CNTN1: 12 pozos []f = 5 ug/ml → 600ul buffer + 2,4 ul

29/04/2022

ELISA NF155, CASPR1, CNTN1

Muestras:

- **NF155:** titulación 22-266115 (con IgG4!)
- **CNTN1:** titulación y subclases 22-269741
- **CASPR1:**
 - Titulación y subclases 22-265763
 - Screening muestras:
 - 22-2-379
 - 22-2-380
 - 22-2-381
 - 22-2-382
 - 22-2-383
 - 22-2-384
 - 22-2-385
 - 22-2-386
 - 22-2-399
 - 22-2-400
 - 22-2-401
 - 22-2-402

Protocolo:

- Bloquear con leche 5% en PBS-tween 0'1% → 200 ul pozo (incubar 1h a temp. ambiente)
- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
- Diluir los **sueros**:
 - Titulación: 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 (a: 1/100, b:1/300, c:1/900, d: 1/2700, e: 1/8100 i f: 1/24300)
 - Screening y subclases: diluir sueros 1/100 en leche 5% en PBS-tween 0'1%
- Incubar con los sueros 1h
- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
- Incubar 45min con **RAH IgG HRP 1/3000** o **MAH HRP IgG1** o IgG2 o IgG3 o IgG4 1/1000 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 **H₂SO₄ 25%**
- Leer a 450-620 nm

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	Cneg	115 c	Cneg	741 c	741 IgG1	Cneg	763 c	763 IgG1	379	383	399	
Bblanc	Cneg	115 c	Cneg	741 c	741 IgG1	Cneg	763 c	763 IgG1	379	383	399	
C prot	Cpos	115 d	Cpos	741 d	741 IgG2	Cpos	763 d	763 IgG2	380	384	400	
Dblanc	Cpos	115 d	Cpos	741 d	741 IgG2	Cpos	763 d	763 IgG2	380	384	400	
E prot	115 a	115e	741 a	741 e	741 IgG3	763 a	763 e	763 IgG3	381	385	401	
F blanc	115 a	115e	741 a	741 e	741 IgG3	763 a	763 e	763 IgG3	381	385	401	
G prot	115 b	115f	741 b	741 f	741 IgG4	763 b	763 f	763 IgG4	382	386	402	
Hblanc	115 b	115f	741 b	741 f	741 IgG4	763 b	763 f	763 IgG4	382	386	402	

NF155

CNTN1

CASPR1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,047	0,113	0,1	0,309	0,067	0,085	0,157	0,066	0,123	0,063	0,077	0,044
B	0,044	0,041	0,112	0,06	0,041	0,139	0,047	0,042	0,162	0,082	0,108	0,046
C	0,873	0,066	0,652	0,188	0,063	0,379	0,128	0,053	0,052	0,059	0,051	0,043
D	0,045	0,049	0,062	0,05	0,044	0,069	0,045	0,044	0,059	0,072	0,058	0,041
E	0,593	0,066	0,751	0,108	0,065	0,587	0,105	0,135	0,072	0,08	0,104	0,042
F	0,048	0,043	0,155	0,05	0,043	0,054	0,044	0,046	0,076	0,24	0,143	0,053
G	0,304	0,057	0,429	0,077	1,087	0,373	0,063	0,105	0,051	0,095	0,063	0,044
H	0,084	0,076	0,148	0,089	0,058	0,063	0,071	0,058	0,1	0,219	0,1	0,05

Resultado:

- 22-266115 → título NF155 1/900 (IgG4)
- 22-269741 → título CNTN1 1/8100 (IgG totales). Subclase IgG4
- 22-265763 → ha salido todo muy bajo (incluso el C+ de CASPR1)
- El resto de muestras son negativas por CASPR1

04/05/2022

Transformació plàsmids LGI4 i NCAM2

Plàsmid LGI4 → SC313909 (Origene) → [] = 100 ng/ul (es reconstitueixen 10 ug de DNA en 100 ul d'aigua), resistència a kanamicina.

Plàsmid NCAM2 → [] = 100 ng/ul

*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 4 tubs falcon de bacteris (amb doble tancament) → control positiu, control negatiu, LGI4, NCAM2.
- 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
 - **LGI4**: afegir 0'1 – 50 ng → afegeixo 0,5 ul de plàsmid (50 ng).
 - **NCAM2**: 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 8 plaques (s'han d'atemperar una estona a Tambient):
 - Control **positiu**: 100 µL → placa ampicil·lina!!
 - Control **negatiu**: 100 µL
 - **LGI4**: 50 µL, 100 µL, 150 µL

- **NCAM2:** 50 µL, 100 µL, 150 µL
- Incubar tota la nit a 37°C (a l'estufa, plaques boca abaix)

05/05/2022

Starter plàsmids LGI4

A primera hora: picar algunes colònies de les plaques amb LGI4 i NCAM2 per fer-les créixer (cabina de bacteris). → **NO HAN CRESCUT COLÒNIES A NCAM2**

- 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.
- 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)

06/05/2022

Maxiprep plàsmid LGI4

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 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'espectrofotòmetre i guardar el tub a la nevera 4°C.

Resultat:

- [LGI4] = 168 ng/ul

Algo ha salido mal en la maxi, no es normal que de tan baja la concentración de DNA.

ELISA NF155

Muestras:

- **NF155:**
 - titulación (IgG totales) y subclases 22-269863
 - titulación 22-286504 (IgG4)

Protocolo:

- Bloquear con leche 5% en PBS-tween 0'1% → 200 ul pozo (incubar 1h a temp. ambiente)
- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%

- Diluir los **sueros**:
 - 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 (a: 1/100, b:1/300, c:1/900, d: 1/2700, e: 1/8100 i f: 1/24300)
 - Screening y subclases: diluir sueros 1/100 en leche 5% en PBS-tween 0'1%
- Incubar con los sueros 1h
- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
- Incubar 45min con **RAH IgG HRP** 1/3000 o **MAH HRP** IgG1 o IgG2 o IgG3 o IgG4 1/1000 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 **H₂SO₄** 25%
- Leer a 450-620 nm

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	Cneg	863 c	863 IgG1	504 a	504 e							
Bblanc	Cneg	863 c	863 IgG1	504 a	504 e							
C prot	Cpos	863 d	863 IgG2	504 b	504 f							
Dblanc	Cpos	863 d	863 IgG2	504 b	504 f							
E prot	863 a	863 e	863 IgG3	504 c								
F blanc	863 a	863 e	863 IgG3	504 c								
G prot	863 b	863 f	863 IgG4	504 d								
Hblanc	863 b	863 f	863 IgG4	504 d								

09/05/2022

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

10/05/2022

Coating células + transfección Culture slides

12 culture slides:

- 1 NF155
- 1 CNTN1/NF186
- 1 CASPR1/Doble CNTN1-CASPR1
- 1 LIF/EPHA7
- 8 Perfil

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

Western Blot CASPR1

Electroforesis:

- Gel 10 pozos 30ul (4-15%, comerciales)
 1. Marcador (10 ul)
 2. Proteína recombinante CASPR1: 10ul (0'789ug/ml) + 12'5 ul RIPA + 7'5 ul Laemli4x
- Calentar muestras 5min a 96°C
- Cargar gel en tampón de carrera (comercial)
- Correr el gel 30 min a 20mA y el resto de tiempo a 40 mA
- Transferencia a membrana de nitrocelulosa → programa Mixed Proteins

WB:

- Bloquear con TBS-caseína
- Suero 22-2-374 1/100 → overnight 4°C
- 3 lavados con TBS-tween
- Ac primario anti-CASPR1 (rabbit) 1/500
- 3 lavados con TBS-tween
- Ac secundarios: GAR800 + GAH680 1/7500 (en TBS tween-caseína)

- 3 lavados con TBS-tween

Resultado: no se ve positivo el ac. comercial anti-CASPR1, pero sí se ve un poco positivo el suero de la paciente → se confirma que es CASPR1?

11/05/2022

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, bloquear y congelar a -80°C

ICC varios BD (cels vivas)

Muestras:

- **NF155:**
 - Alcaraz (CIDP 2)
 - 22-269833
 - 22-271782
 - 18-860
 - Cneg
 - Cpos
- **NF186:**
 - 18-860
 - Cneg
 - Cpos
- **CNTN1:**
 - 22-2-374
 - 22-5-391
 - Cneg
 - Cpos
- **CASPR1:**
 - 22-2-374
 - 22-5-391
 - Cneg
 - Cpos
- **Doble CNTN1/CASPR1:**
 - 22-2-374
 - 22-5-391 1/10
 - Cneg
 - Cpos
- **LIF:**
 - GDP1 (CIDP15)
 - Cneg
- **EPHA7:**
 - CIDP6
 - CIDP19
 - Cneg

Protocolo cels vivas (sin fijar):

- Incubar con suero 1/100 en medio HEKs (1h a 37°C) → preparo 200 ul de cada muestra para cubrir el pozo. Incubo a la vez con anticuerpo comercial.
- 3 lavados con PBS1x
- Fijar 10 min con PFA4%
- 1 lavado con PBS1x y quitar la pieza de los culture slides
- Incubar con Ac.secundarios 1/750 (1h a RT)
- 3 lavados PBS1x
- Montar con Fluoromount

Resultado: se ve todo positivo. REPETIR TODO!!! (poner el Ac.comercial después de fijar)

Congelación PBMC (NHC 100671480)

6 tubos CPT de Juan Carlos González Gandara (NHC 618752) → CIDP naive

- Centrifugar 1650g 20min sin freno
- Lavar con suero fisiológico 1:1
- Centrifugar 300g 5min
- Resuspender en PBS1x y contar las células
- Congelar en FBS+10%DMSO → congelo 5 viales con aprox 3 millones de cels/vial

24/05/2022

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

25/05/2022

Coating células + transfección Culture slides

18 culture slides:

- 1 NF155/CNTN1
- 1 CASPR2/Doble CNTN1-CASPR1
- 2 LIF/EPHA7 (1 fijadas, 1 vivas)
- 10 Perfil

- 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

26/05/2022

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, bloquear y congelar a -80°C

27/05/2022

ELISA CASPR1 BD

Muestras:

- 22-2-410 → negativo
- 22-2-411 → negativo
- 22-2-452 → negativo
- 22-2-493 → negativo
- 22-2-494 → negativo

ICC perfil BD (cels fijadas)

Muestras:

- 22-2-410 → negativo
- 22-2-411 → NF155 positivo (titular!!!)

- 22-2-452 → negativo
- 22-2-493 → negativo
- 22-2-494 → negativo

ICC varios BD (cels vivas)

Muestras:

- **NF155:**
 - Alcaraz (CIDP 2)
 - 22-269833
 - Cneg 204-10
 - Cpos
- **CNTN1:**
 - 22-2-374
 - 22-5-391
 - Cneg 204-10
 - Cpos
- **CASPR2:**
 - 22-2-374
 - 22-5-391
 - Cneg 204-10
- **Cpos**
- **Doble CNTN1/CASPR1:**
 - 22-2-374
 - 22-5-391 1/10
 - Cneg 204-10
 - Cpos
- **LIF:**
 - GDP1 (CIDP15)
 - Cneg 204-10
- **EPHA7:**
 - CIDP6
 - CIDP19
 - Cneg 204-10

Protocolo cels vivas (sin fijar):

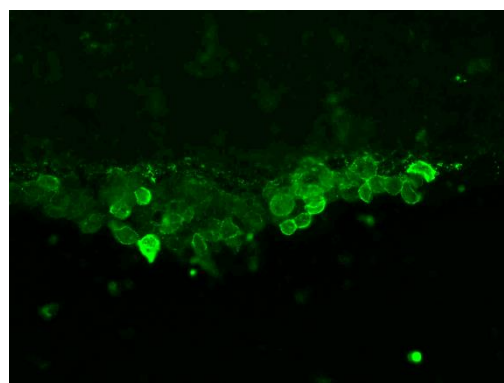
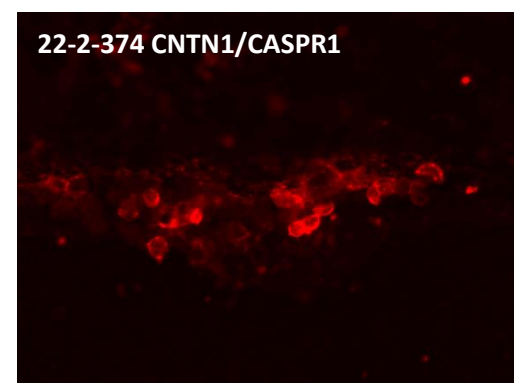
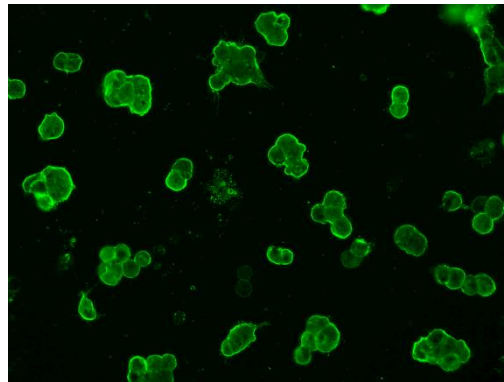
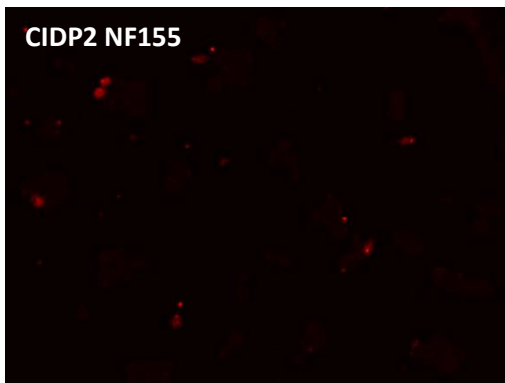
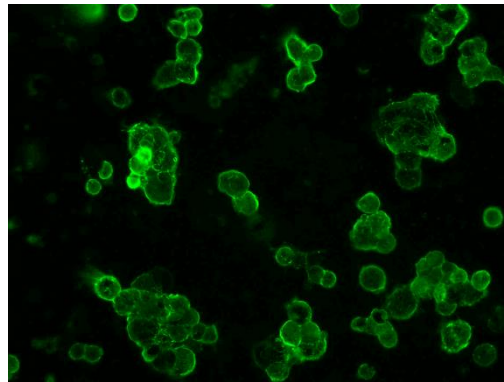
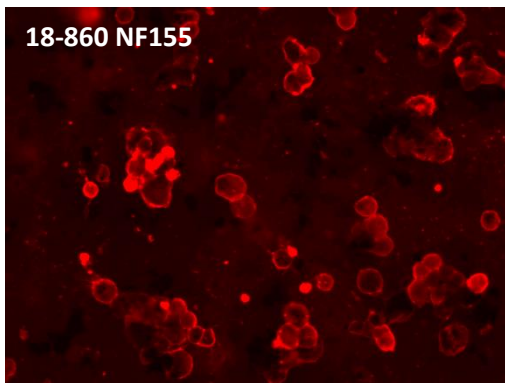
- Incubar con suero 1/100 en medio HEKs (1h a 37°C) → preparo 200 ul de cada muestra para cubrir el pozo
- 1 lavado con PBS1x
- Fijar 10 min con PFA4%
- 1 lavado con PBS1x y quitar la pieza de los culture slides
- Incubar con Ac. comerciales (diluídos en bloqueo)
 - CNTN1 1/1000 (rabbit serum)
 - NF 1/1000 (goat serum)
 - C-myc 1/200 (goat serum)
 - CASPR2 1/200 (goat serum)

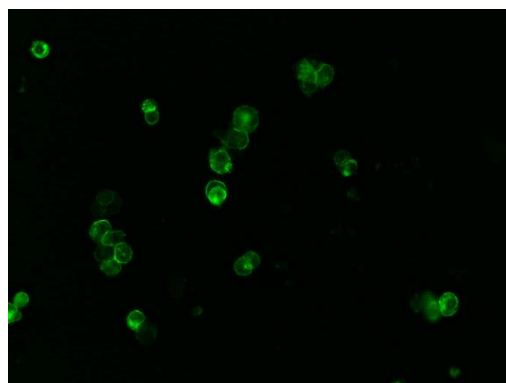
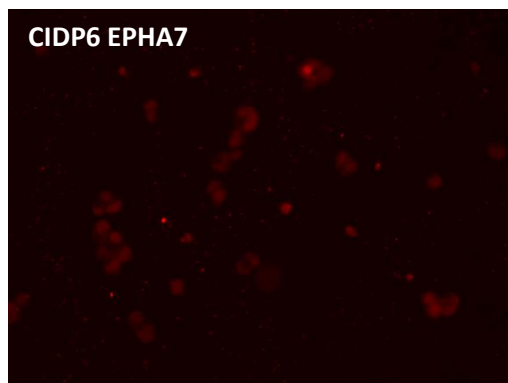
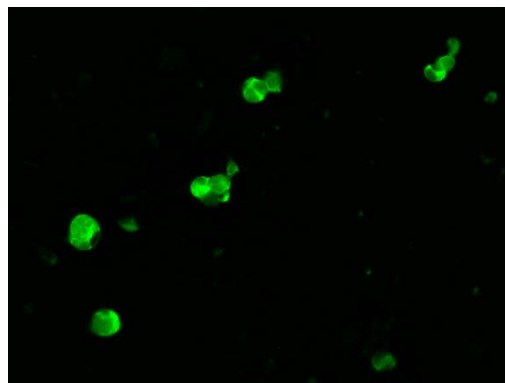
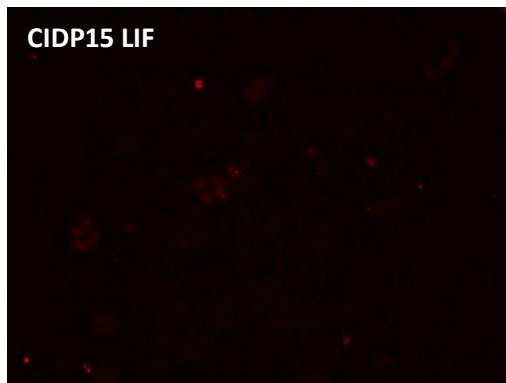
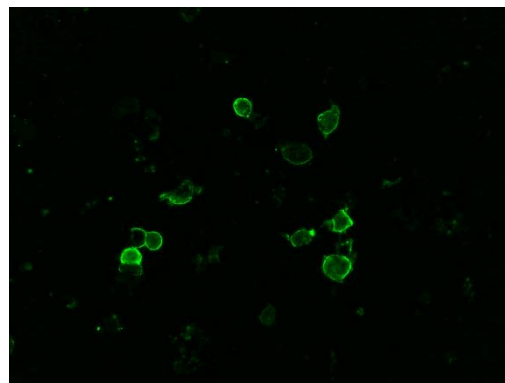
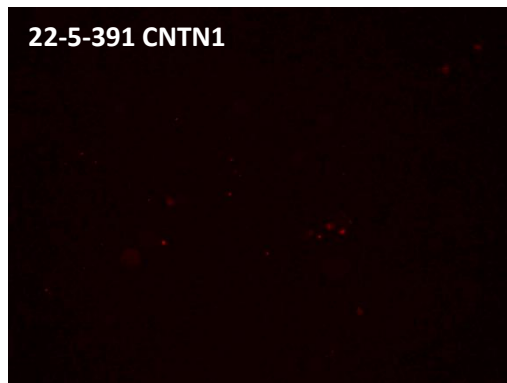
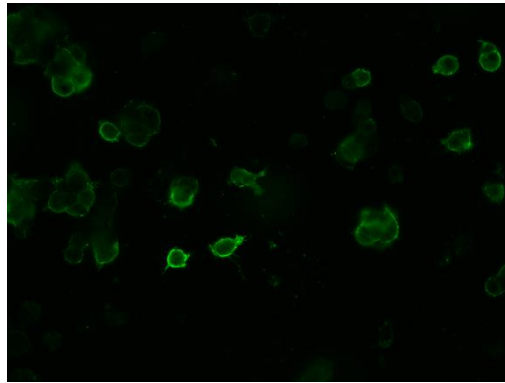
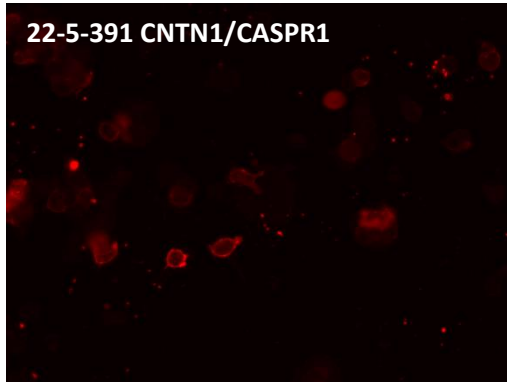
- LIF (PA5-79600) 1/100 (goat serum)
- EPHA7 (ab204113) 1/100 (goat serum)
- 3 lavados PBS1x
- Incubar con Ac.secundarios 1/750 (1h a RT)
 - CNTN1: RAG488 + RAH594
 - NF: GAC488 + GAH594
 - C-myc: GAM488 + GAH594
 - CASPR2: GAR488 + GAH594
 - LIF: GAR488 + GAH594
 - EPHA7: GAR488 + GAH594
- 3 lavados PBS1x
- Montar con Fluoromount

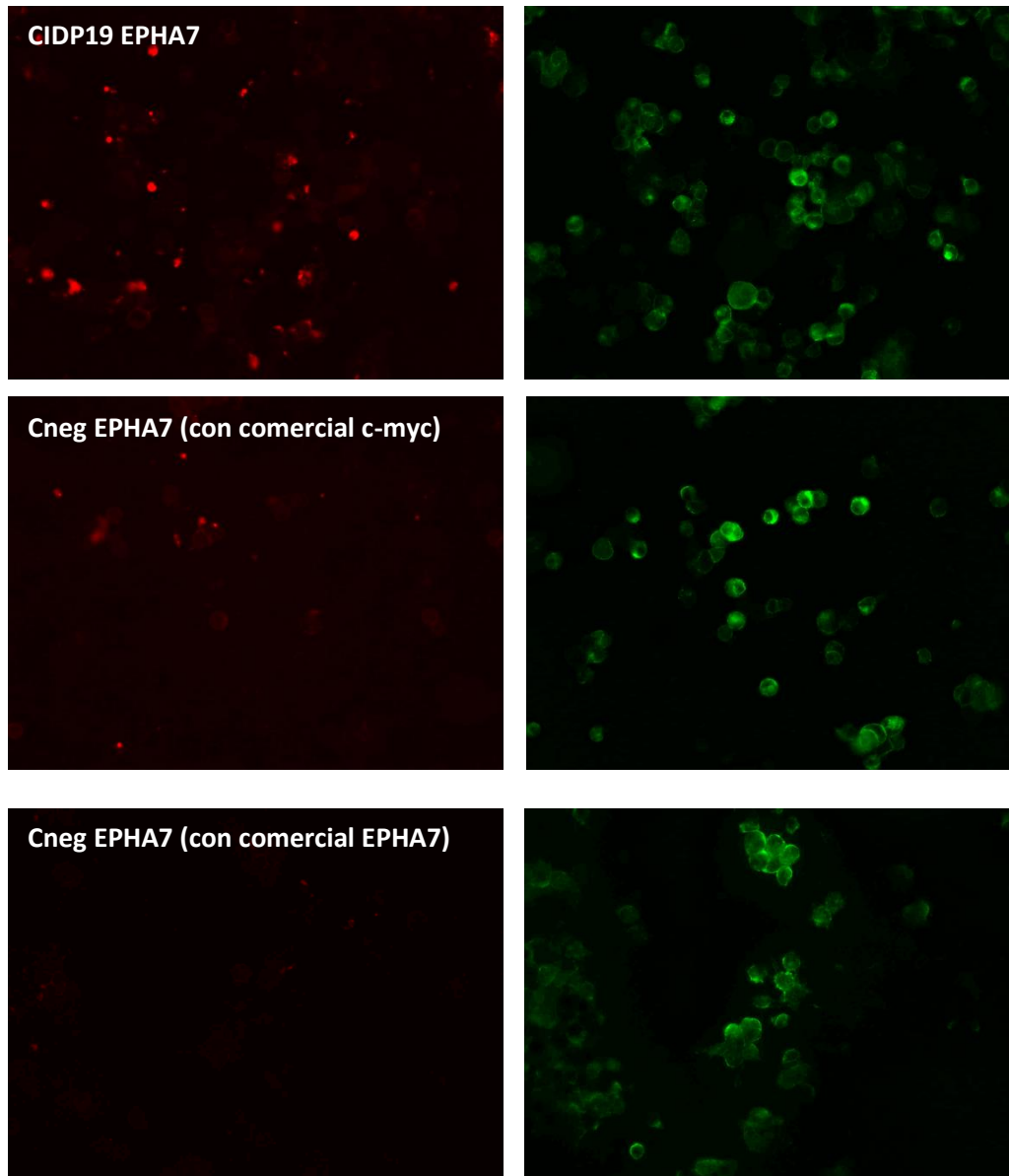
Resultado:

- **NF155:**
 - Alcaraz (CIDP 2) → negativo
 - 18-860 → positivo!!
 - Cneg → negativo
 - Cpos → positivo
- **CNTN1:**
 - 22-2-374 → negativo
 - 22-5-391 → negativo
 - Cneg → negativo
 - Cpos → positivo
- **CASPR2:**
 - 22-2-374 → negativo
 - 22-5-391 → negativo
 - Cneg → negativo
 - Cpos → positivo
- **Doble CNTN1/CASPR1:**
 - 22-2-374 → positivo
 - 22-5-391 1/10 → positivo
 - Cneg → negativo

- Cpos (CNTN1+) → positivo
- **LIF**: no tengo claro si la transfección sale bien o no...
 - GDP1 (CIDP15) → negativo
 - Cneg → negativo
- **EPHA7**: la transfección se ve bien con los dos anticuerpos (c-myc, EPHA7)
 - CIDP6 (doble c-myc) → negativo
 - CIDP19 (doble c-myc) → negativo (en el micro se ve un poco positivo, pero muy débil)
 - Cneg (doble c-myc) → negativo
 - Cneg (doble EPHA7) → negativo







30/05/2022

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

Western Blot IP LIF (membrana 28/03/2022)

- Bloquear con TBS-caseína
- Ac primario anti-LIF (PA579600) 1/500 (en TBS-caseína) → overnight 4°C
- 3 lavados con TBS-tween

- Ac secundario: GAR680 1/7500 (en TBS tween-caseína)
- 3 lavados con TBS-tween

Resultado: se ven muchas bandas inespecíficas...

31/05/2022

Coating células + transfección Culture slides

16 culture slides:

- 1 Plexin
- 10 Perfil
- 2 NF155/CNTN1
- 3 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

Descongelación SH-SY5Y

Descongelo 1 vial de SH-SY5Y → pase inicial (N4-R3-C5)

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)

Descongelación Células de Schwann humanas

Cels de Schwann humanas → línea celular comercial (1700, ScienceCell) → pase inicial (N4-R3-C5)

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)

01/06/2022

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, bloquear y congelar a -80°C

IHC Monkey peripheral nerve (EM vacunas)

Muestras:

1	98722	14	591615	27	1122921
2	111955	15	597217	28	1124890
3	147303	16	631193	29	1153091
4	190943	17	814329	30	1166296
5	219804	18	901936	31	1175686
6	266178	19	927164	32	1215478
7	304320	20	950931	33	1217671
8	344185	21	1004410	34	1248466
9	422044	22	1021881	35	1398484
10	461265	23	1063758	36	1432202
11	472720	24	1097811	37	1454038
12	493713	25	1113212	38	1519499
13	505343	26	1115327		

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

- Bloquear 30 min - 1h con Goat serum 5%
- Incubar 1h con 40 ul de suero diluído **1/20** en Goat serum 5% (2 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% (**me he equivocado y he puesto GAH IgG 488 en vez de monkey absorbed!!**)
- 3 lavados con PBS1x
- Montar con fluoromount

Resultado: no se ve bien... repetir!!

02/06/2022

ICC perfil BD (cels fijadas)

Muestras:

- 22-2-399 → neg
- 22-2-400 → neg
- 22-2-401 → repetir NF vivas (parecen negativas pero para asegurar)
- 22-2-402 → neg

ELISA NF155 subclases y titulación (BD)

Muestra

- 22-269798 (muestra immuno NF155pos)
- 22-2-411 (muestra Birmingham NF155pos)

Protocolo:

- Bloquear con leche 5% en PBS-tween 0'1% → 200 ul pozo (incubar 1h a temp. ambiente)
- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
- Diluir los **sueros**:
 - Titulación: 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 (a: 1/100, b:1/300, c:1/900, d: 1/2700, e: 1/8100 i f: 1/24300)
 - Subclases: diluir sueros 1/100 en leche 5% en PBS-tween 0'1%

- Incubar con los sueros 1h
- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
- Incubar 45min con **RAH IgG HRP** 1/3000 o **MAH HRP** IgG1 o IgG2 o IgG3 o IgG4 1/1000 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 **H₂SO₄** 25%
- Leer a 450-620 nm

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	Cneg	22-269798 1/900	22-269798 IgG1	22-2-411 1/100	22-2-411 1/8100	22-2-411 IgG1						
B blanc	Cneg	22-269798 1/900	22-269798 IgG1	22-2-411 1/100	22-2-411 1/8100	22-2-411 IgG1						
C prot	Cpos	22-269798 1/2700	22-269798 IgG2	22-2-411 1/300	22-2-411 1/24300	22-2-411 IgG2						
D blanc	Cpos	22-269798 1/2700	22-269798 IgG2	22-2-411 1/300	22-2-411 1/24300	22-2-411 IgG2						
E prot	22-269798 1/100	22-269798 1/8100	22-269798 IgG3	22-2-411 1/900		22-2-411 IgG3						
F blanc	22-269798 1/100	22-269798 1/8100	22-269798 IgG3	22-2-411 1/900		22-2-411 IgG3						
G prot	22-269798 1/300	22-269798 1/24300	22-269798 IgG4	22-2-411 1/2700		22-2-411 IgG4						
H blanc	22-269798 1/300	22-269798 1/24300	22-269798 IgG4	22-2-411 1/2700		22-2-411 IgG4						

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	0,045	0,586	0,009	0,59	0,085	0,053						
B blanc	0,041	0,034	0,003	0,049	0,007	0,002						
C prot	0,622	0,174	0,006	0,501	0,019	0,006						
D blanc	0,023	0,015	0,003	0,026	0,005	0,002						
E prot	0,929	0,076	0,012	0,303		0,012						
F blanc	0,144	0,012	0,004	0,018		0,005						
G prot	0,611	0,037	1,166	0,113		0,759						
H blanc	0,129	0,027	0,023	0,03		0,023						

Resultado:

- 22-269798: título 1/8100 (IgG totales). Subclase predominante: IgG4
- 22-2-411: título 1/8100 (IgG totales). Subclase predominante: IgG4

03/06/2022**IHC Monkey peripheral nerve (EM vacunas)****Muestras:**

- | | |
|-----------------|-------------------------------------|
| 1. 4225069 (C1) | 9. 925491 (C4) |
| 2. 767614 (F5) | 10. 514508 (C7) |
| 3. 5350187 (G8) | 11. 21-2-1728 (Box 282) |
| 4. 1793570 (H1) | 12. 98722 (1) |
| 5. 960770 (H4) | 13. 111955 (2) |
| 6. 1677337 (A5) | 14. Control sa: 21-2-1608 (Box 279) |
| 7. 1598702 (B2) | 15. Control sa: 204-11 |
| 8. 217975 (B6) | |

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

- Bloquear 30 min - 1h con Goat serum 5%
- Incubar 1h con 40 ul de suero diluido **1/20** en Goat serum 5% (2 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 diluidos 1/500 en goat serum 5%
- 3 lavados con PBS1x
- Montar con fluoromount

Resultado: repetir todo a 1/10!!! (he tenido problemas con el microscopio de plataformas y no se veía bien...)**07/06/2022****IHC Monkey peripheral nerve (EM vacunas)****Muestras:**

- | | |
|-----------------|-----------------|
| 1. 4225069 (C1) | 3. 5350187 (G8) |
| 2. 767614 (F5) | 4. 1793570 (H1) |

- | | |
|-------------------------|-------------------------------------|
| 5. 960770 (H4) | 16. 190943 (4) |
| 6. 1677337 (A5) | 17. 219804 (5) |
| 7. 1598702 (B2) | 18. 266178 (6) |
| 8. 217975 (B6) | 19. 304320 (7) |
| 9. 925491 (C4) | 20. 344185 (8) |
| 10. 514508 (C7) | 21. 422044 (9) |
| 11. 575657 (A2) | 22. 22-290532 (canomad) |
| 12. 21-2-1728 (Box 282) | 23. 22-269833 (NF155??) |
| 13. 98722 (1) | 24. Control sa: 21-2-1608 (Box 279) |
| 14. 111955 (2) | 25. Control sa: 204-11 |
| 15. 147303 (3) | |

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: (fotos 20x → Image J verde 3/40, rojo 5/50)

1. 4225069 (C1) → mielina 1 (tejido conectivo?) IgG
2. 767614 (F5) → mielina 1 IgG
3. 5350187 (G8) → mielina 1 IgG
4. 1793570 (H1) → **mielina 2 IgG**
5. 960770 (H4) → **mielina 2 IgG**
6. 1677337 (A5) → mielina 1 IgG. Fibros IgM
7. 1598702 (B2) → neg
8. 217975 (B6) → **mielina 2 IgG. Fibros IgM**
9. 925491 (C4) → neg
10. 514508 (C7) → **mielina 3 IgG**
11. 575657 (A2) → neg
12. 21-2-1728 (Box 282) → axones 1, schwann amielínicas 1 (IgG). Axones 2 IgM

13. 98722 (1) → axones 1 IgG
14. 111955 (2) → neg
15. 147303 (3) → axones 1 IgG **mielina 2 IgM**
16. 190943 (4) → axones 1 IgM
17. 219804 (5) → axones 2 IgG (punteado), fibras 2 IgM
18. 266178 (6) → mielina 1 IgG
19. 304320 (7) → axones 1 IgG
20. 344185 (8) → neg
21. 422044 (9) → **mielina 2 IgM**
22. 22-290532 (canomad) → axones 3 IgG. Mielina 3 IgM
23. 22-269833 (NF155??) → axons 1 IgG
24. Control sa: 21-2-1608 (Box 279) → axones 1 IgG. Fibras IgM
25. Control sa: 204-11 → mielina 1, axones 1 IgG. Fibras IgM

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

Coating cels de Schwann (línea celular humana)

- De 5 placas paso las cels a 15 placas de 100 mm (corning) sin ningún coating → Medio de proliferación.

(para hacer IP el día 9)

08/06/2022

Coating células + transfección Culture slides

6 culture slides:

- 1 NF155/NF186 (vivas)
- 1 Doble CNTN1-CASPR1 / CNTN1 (vivas)
- 2 Perfil
- 2 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

09/06/2022

Coating cels de Schwann (línea celular humana)

- 2 placas 35mm → Coating Poly-D-lys 1/40 en PBS1x (1h a 37°C)
- 200.000 c/placa

Medio de proliferación.

ICC HEKs transfectadas vivas (varios inmuno y BD)

Muestras:

- | | |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> · NF155 <ul style="list-style-type: none"> ○ 22-269833 ○ 22-2-401 ○ Cneg ○ Cpos · NF186 <ul style="list-style-type: none"> ○ 18-860 ○ 22-2-401 ○ Cneg ○ Cpos | <ul style="list-style-type: none"> · Doble CNTN1/CASPR1 (rabbit) <ul style="list-style-type: none"> ○ 22-288285 suero ○ 22-288285 LCR ○ Cneg ○ Cpos · CNTN1 <ul style="list-style-type: none"> ○ 22-288285 suero ○ 22-288285 LCR ○ Cneg ○ Cpos |
|---|--|

Protocolo cels vivas (sin fijar):

- Incubar con suero 1/100 en medio HEKs (1h a 37°C) → preparo 250 ul de cada muestra para cubrir el pozo
- 1 lavado con PBS1x
- Fijar 10 min con PFA4%
- 1 lavado con PBS1x y quitar la pieza de los culture slides

- Incubar con Ac. comerciales (diluídos en bloqueo)
 - CNTN1 1/1000 (rabbit serum)
 - NF 1/1000 (goat serum)
- 3 lavados PBS1x
- Incubar con Ac.secundarios 1/750 (1h a RT)
 - CNTN1: RAG488 + RAH594
 - NF: GAC488 + GAH594
- 3 lavados PBS1x
- Montar con Fluoromount

Resultado: Mucho cruce de canales!! (no entiendo porque!!)

IHC teasing nervio ciático rata

Muestras:

- 22-269833
- 22-288285 (suero)
- 22-288285 (LCR)
- Cpos (NF155+)

*A parte, hago un porta en el que no se fijó el nervio con PFA antes de hacer teasing.

Muestras:

- 22-2-374
- 22-5-391

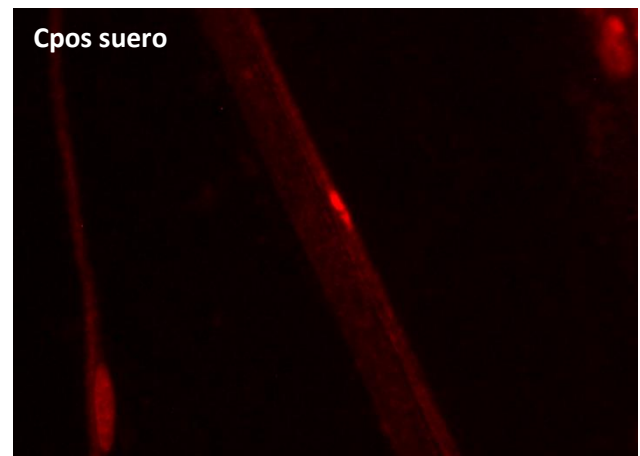
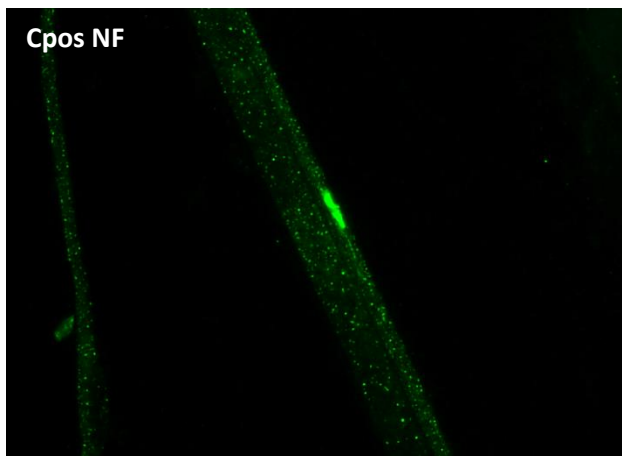
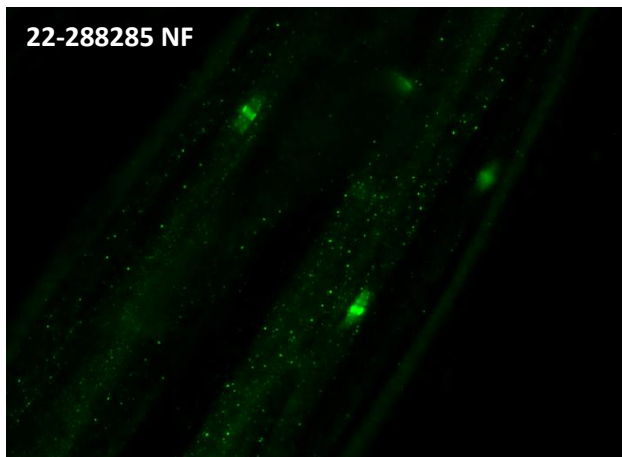
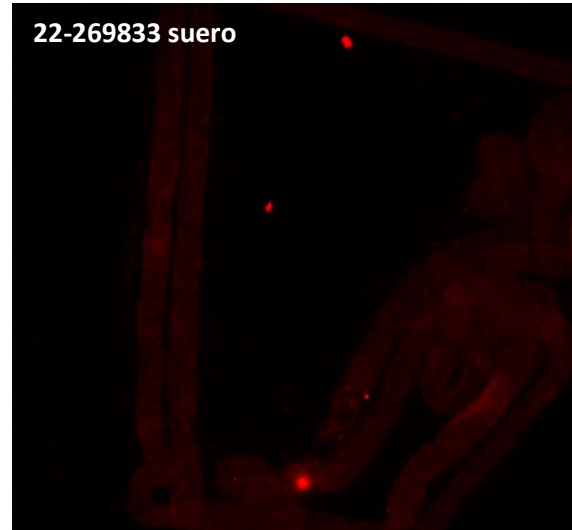
Protocolo: (entre cada paso hacer 3 lavados con PBS1x)

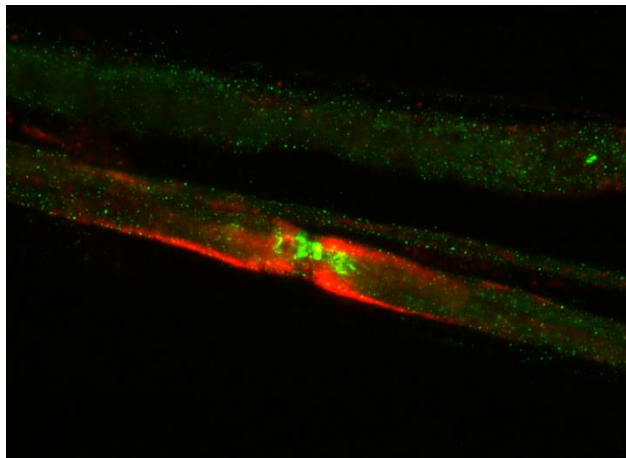
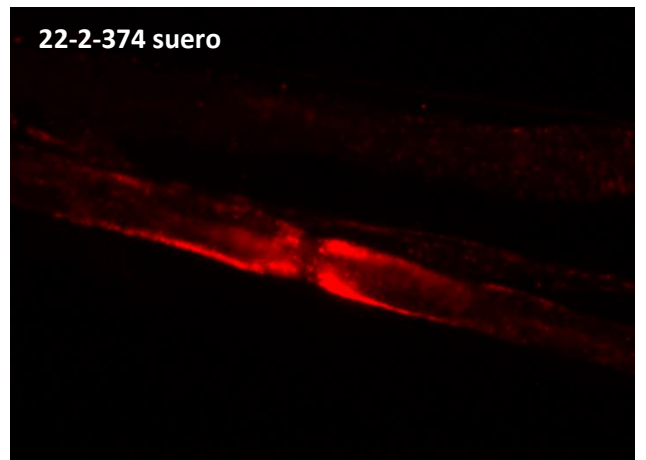
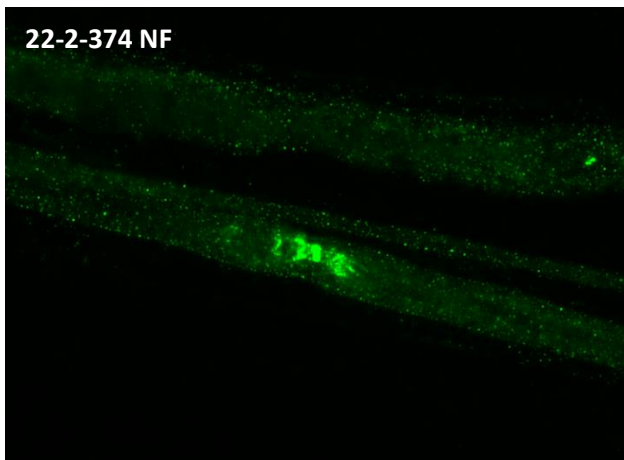
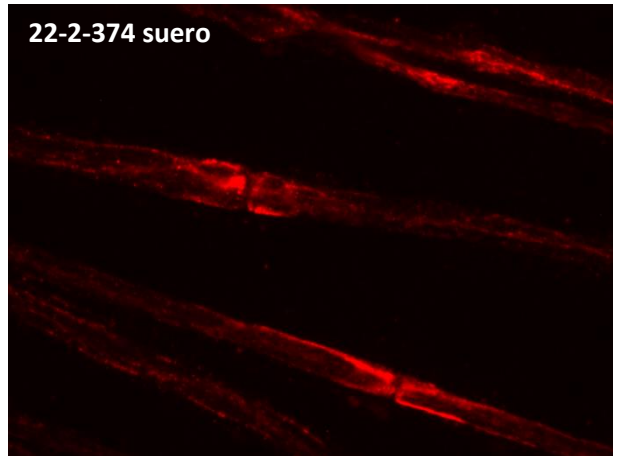
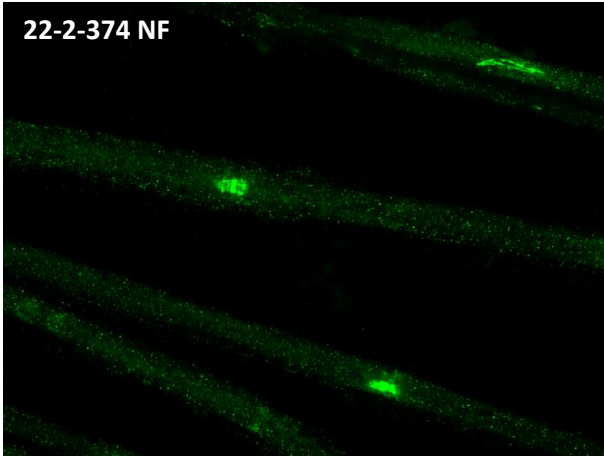
- Fijar con acetona (-20°C) 10 min
- Separar los dos grupos de tejido con Dakopen
- Bloquear con Goat serum 5% + 0'1% tritón 1h
- Suero 1/100 (en bloqueo) 1h
- Ac comercial anti-NF 1/500 (en bloqueo) 1h
- Ac secundarios: GAC488 + GAH594 IgG 1/1000 (en bloqueo) 1h
- Montar con Fluoromount

Resultado:

- 22-269833 → negativo
- 22-288285 (suero) → negativo

- 22-288285 (LCR) → negativo
- Cpos (NF155+) → positivo
- 22-2-374 → marca igual que marcaba el nervio de cerdo (no el paranodo, pero sí las supuestas bandas de cajal)
- 22-5-391 → marca igual que marcaba el nervio de cerdo pero menos (no el paranodo, pero sí las supuestas bandas de cajal)





10/06/2022

ICC Cels de Schwann vivas (línea humana)

Muestras:

- | | |
|-------------------------------|------------------------------------|
| 1. GDP1: 134-17 1/100 | 6. Ac. anti-LIF Invitrogen (1/300) |
| 2. GDP2: 151-21 1/100 | 7. Sólo GAR594 |
| 3. Cneg 204-10 1/100 | 8. Sólo GAH488 |
| 4. Cneg 200-2 1/100 | 9. GDP1: 134-17 (CIDP15) 1/50 |
| 5. Ac. anti-LIF abcam (1/300) | 10. Cneg 204-10 1/50 |

Protocolo: (culture slide)

- Incubar 1h a 37°C con suero 1/100 diluido en medio de células de Schwann
- 1 lavado PBS1x
- Fijar con PFA4% 10 min
- 1 lavado PBS1x y quitar las piezas
- GAH488 IgG + GAR594 IgG 1/750
- 3 lavados PBS1x
- Montar con Fluoromount

Resultado:

- 5. Ac. anti-LIF abcam (1/300) → positivo
- 6. Ac. anti-LIF Invitrogen (1/300) → negativo
- 7. Sólo GAR594 → negativo
- 8. Sólo GAH488 → negativo
- 9. GDP1: 134-17 (CIDP15) 1/50 → positivo
- 10. Cneg 204-10 1/50 → negativo

*Los cubres 1-4 estaban un poco espachurraos y no se ven bien las células

Immunoprecipitación - Pierce Classic Magnetic IP Kit (dynabeads)

Muestras:

- CIDP15 (GDP1)
- Cneg (204-10)
- Anticuerpo comercial anti-LIF (abcam)

Células: línea células de Schwann humanas (5 placas 100mm/muestra)

Incubación con suero y lisis celular

- Incubar el cultivo con el suero del paciente a analizar 1h a 37°C (en el incubador). La dilución se hace en el propio medio de cultivo (en la placa)
 - Para IgG: 1/100 → 30 µl de suero en 3 ml de medio
 - **Anticuerpo anti-LIF: lo pongo a 1/1000 porque no me queda más**
- **La dilución se hace en la misma placa de cultivo (sacar el medio hasta dejar 3 ml por placa, y poner el suero)*
- Lavar placas 1 vez con PBS 1x
- Añadir 800 µl de IP Lysis/Wash buffer + inhibidores de proteasas 1x a cada placa. Dejar en agitación fuerte (fijadas con cinta) durante 5 min a 4°C
- Transferir el lisado a un eppendorf y centrifugar 10 minutos a 13000 g → **he transferido cada IP de cada muestra a 3 eppendorfs (en 1 sólo no cabía)**

Preparación de las bolas magnéticas

- Poner 25 µl de Pierce Protein A/G Magnetic Beads a un eppendorf → **preparo 3 epp/muestra**
- Añadir 175 µl de IP Lysis/Wash Buffer y hacer vórtex (suave)
- Poner el tubo en el soporte magnético. Eliminar el sobrenadante (sin retirar el eppendorf)
- Añadir 1 ml de IP Lysis/Wash Buffer y hacer vórtex (suave). Poner de nuevo en el soporte magnético y eliminar el sobrenadante.

Immunoprecipitación

- Añadir la mezcla antígeno-anticuerpo (primera parte) al eppendorf con las bolas magnéticas lavadas e incubar a temperatura ambiente 1 hora en agitación (rotación).
- Poner el eppendorf en el soporte magnético y eliminar el sobrenadante.
- Añadir 500 µl de IP Lysis/Wash buffer (con inhibidores de proteasas 1x) y mezclar. Poner en el soporte magnético y eliminar el sobrenadante.
- Volver a repetir el lavado → **en este momento junto las bolas magnéticas de los 3 eppendorfs de cada muestra (pongo 500 ul de buffer a cada epp para resuspender las bolas y lo junto todo)**
- Añadir 500 µl de agua destilada ultrapura y mezclar. Poner en el soporte magnético y eliminar el sobrenadante.
- **Añadir 50 µl de Elution Buffer.**
- **Incubar en agitación a Tamb 10 minutos**

- Poner en el soporte magnético para que las bolas magnéticas se separen.
- Añadir 5 ul de Neutralization buffer
- Guardar a -20°C

*Le doy las muestras a Maisa para enviar a espectrometría de masas el 17/06/2022

ELISA NF155, NF186, CNTN1, CASPR1 (confirmación)

Muestras:

- NF155, NF186:
 - Cneg
 - Cpos
 - 22-269833 (muestra murcia NF155 y NF186+ por ICC)
 - 22-299451 (2ª muestra mismo paciente murcia pan-NF+ por ICC)
 - 22-2-401 (muestra Birmingham dudosa por ICC, pero poco dudosa)
- CNTN1, CASPR1:
 - Cneg
 - Cpos
 - 22-288285 suero (positivo CASPR1 por ELISA)
 - 22-288285 LCR (negativo CASPR1 por ELISA, positivo CNTN1 por ICC)

Protocolo:

- Bloquear con leche 5% en PBS-tween 0'1% → 200 ul pozo (incubar 1h a temp. ambiente)
- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
- Diluir los **sueros**: diluir sueros 1/100 en leche 5% en PBS-tween 0'1% (los sueros en los que testaba NF186 los hice a 1/50)
- Incubar con los sueros 1h
- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
- Incubar 45min con **RAH IgG HRP** 1/3000 → 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 **H₂SO₄** 25%
- Leer a 450-620 nm

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	Cneg	22-2-401	Cneg	22-2-401	Cneg	Cneg						
B blanc	Cneg	22-2-401	Cneg	22-2-401	Cneg	Cneg						
C prot	Cpos NF155		Cpos NF186		Cpos CNTN1	Cpos CASPR1						
D blanc	Cpos NF155		Cpos NF186		Cpos CNTN1	Cpos CASPR1						
E prot	22-269833		22-269833		22-288285 suero	22-288285 suero						
F blanc	22-269833		22-269833		22-288285 suero	22-288285 suero						
G prot	22-299451		22-299451		22-299451 LCR	22-299451 LCR						
H blanc	22-299451		22-299451		22-299451 LCR	22-299451 LCR						

NF155 1ug/ml

NF186 5ug/ml

CNTN1 1ug/ml

CASPR1 5ug/ml

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	0,137	0,194	0,086	0,571	0,095	0,149						
B blanc	0,104	0,186	0,092	0,546	0,318	0,104						
C prot	0,456		0,359		1,236	0,611						
D blanc	0,072		0,139		0,129	0,121						
E prot	0,143		0,1		0,264	0,76						
F blanc	0,135		0,142		0,324	0,51						
G prot	0,104		0,105		0,055	0,063						
H blanc	0,195		0,209		0,085	0,113						

Resultado:

· NF155, NF186:

- 22-269833 → negativo
- 22-299451 → negativo
- 22-2-401 → negativo pero muchísimo fondo (repetir por ICC) → se repite ICC 16.06.22 y es negativo.

- CNTN1, CASPR1:
 - 22-288285 suero → negativo CNTN1/ negativo CASPR1 pero muchísimo fondo (repetir) → 16.06.22 se ha repetido el CASPR1 y es positivo claramente.
 - 22-288285 LCR → negativo CNTN1 y CASPR1

15/06/2022

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

16/06/2022

Coating células + transfección Culture slides

6 culture slides:

- 1 NF186 (vivas)
- 2 Doble CNTN1-CASPR1 / CNTN1 (vivas)
- 3 Perfil

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

17/06/2022

ICC HEKs transfectadas vivas (varios inmuno y BD)

Muestras:

- NF186
 - 18-860
- Cneg
- Cpos

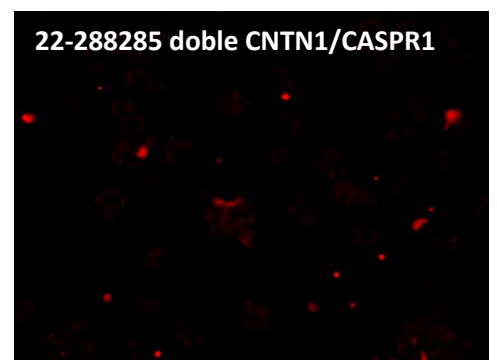
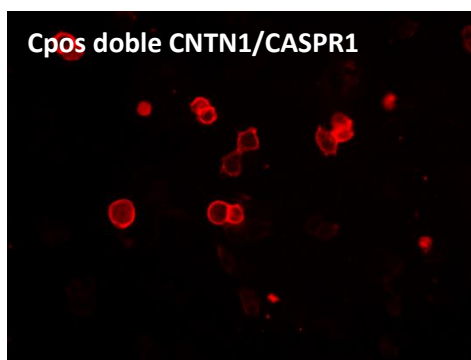
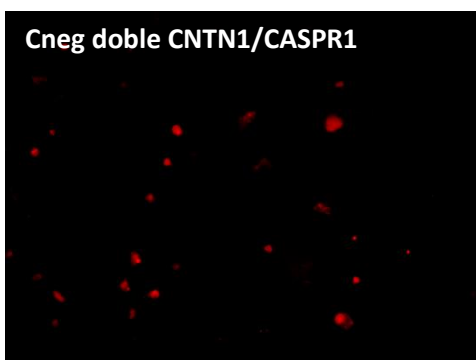
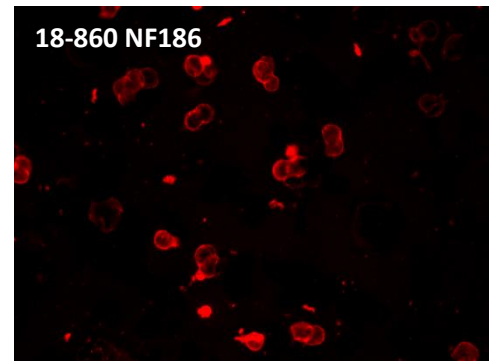
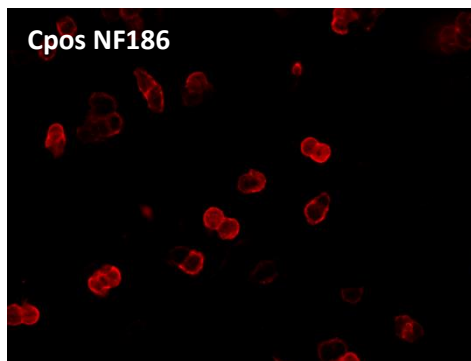
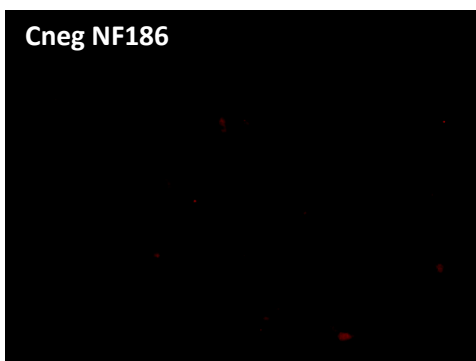
- Ac anti-NF
- GAH594 sólo (x2)
- GAC488 sólo
- 22-288285 LCR
- Cneg
- Cpos
- CNTN1
 - 22-288285 suero
 - 22-288285 LCR
 - Cneg
 - Cpos
- Doble CNTN1/CASPR1 (rabbit)
 - 22-288285 suero

Protocolo cels vivas (sin fijar):

- Incubar con suero 1/100 en medio HEKs (1h a 37°C) → preparo 250 ul de cada muestra para cubrir el pozo
- 1 lavado con PBS1x
- Fijar 10 min con PFA4%
- 1 lavado con PBS1x y quitar la pieza de los culture slides
- Incubar con Ac.secundarios 1/750 (1h a RT) → GAH 594 (no hago dobles con Ac.comercial para evitar cruce de canales)
- 3 lavados PBS1x
- Montar con Fluoromount

Resultado:

- 18-860 → NF186 positivo
- 22-288285 → CASPR1 y CNTN1 negativos



20/06/2022

Descongelar cels de Schwann (primarios rata)

Cels de Schwann de rata → cultivo primario a partir de nervio ciático (p8 01/06/2022)

- **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 placas 100 mm con gelatina 0,15

ELISA Gangliósidos día 1

Muestras (IgG):

- | | |
|-------------------------------|-----------|
| · 70598300 (sólo hasta 1/500) | · 720643 |
| · 70525486 (sólo hasta 1/500) | · 960770 |
| · 4651567 | · 1833944 |

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 (x4 pozos): 0,5 ml PBS-BSA 0'1% + 5 ul suero
 - Dil 1/500 (x4 pozos): 0,4 ml de PBS-BSA 0'1% + 0,1 ml de la dilución anterior.
 - Dil 1/2500 (x4 pozos): 0,4 ml de PBS-BSA 0'1% + 0,1 ml de la dilución anterior.
 - Dil 1/12500 (x4 pozos): 0,4 ml de PBS-BSA 0'1% + 0,1 ml de la dilución anterior.
- Poner 100 ul de suero a cada pozo, incubar toda la noche a 4°C

	1 blanco	2 GM1	3 GD1b	4 GQ1b	5 blanco	6 GM1	7 GD1b	8 GQ1b	9 blanco	10 GM1	11 GD1b	12 GQ1b
A 1/100	7059830 0 1/100	7059830 0	7059830 0	7059830 0	4651567	4651567	4651567	4651567	720643	720643	720643	720643
B 1/500	7059830 0 1/500	7059830 0	7059830 0	7059830 0	4651567	4651567	4651567	4651567	720643	720643	720643	720643
C 1/2500	7052548 6 1/100	7052548 6	7052548 6	7052548 6	4651567	4651567	4651567	4651567	720643	720643	720643	720643
D 1/12500	7052548 6 1/500	7052548 6	7052548 6	7052548 6	4651567	4651567	4651567	4651567	720643	720643	720643	720643
E 1/100	960770	960770	960770	960770	1833944	1833944	1833944	1833944	C+ IgG	C+ IgG	C+ IgG	C+ IgG
F 1/500	960770	960770	960770	960770	1833944	1833944	1833944	1833944	C+ IgG	C+ IgG	C+ IgG	C+ IgG
G 1/2500	960770	960770	960770	960770	1833944	1833944	1833944	1833944	C+ IgG	C+ IgG	C+ IgG	C+ IgG
H 1/12500	960770	960770	960770	960770	1833944	1833944	1833944	1833944	C+ IgG	C+ IgG	C+ IgG	C+ IgG

21/06/2022

ELISA Gangliósidos día 2

Protocolo:

- Lavar 4 veces con PBS
- Preparar **Ac secundarios**: RAH HRP IgG dil. 1/5000 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 **H₂SO₄** al 25% a cada pozo.
- Leer en lector de placas de ELISA a 490-630 nm

Resultado: todo negativo (menos el control positivo)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,47	0,36	0,244	0,216	0,442	0,276	0,209	0,153	0,599	0,39	0,243	0,106
B	0,187	0,142	0,112	0,071	0,215	0,121	0,12	0,092	0,347	0,169	0,139	0,116
C	1,077	0,397	0,394	0,225	0,09	0,067	0,059	0,041	0,152	0,087	0,091	0,069
D	0,687	0,149	0,157	0,094	0,057	0,043	0,055	0,038	0,075	0,056	0,077	0,054
E	0,329	0,242	0,167	0,17	0,24	0,135	0,153	0,126	0,576	1,459	1,394	1,344
F	0,136	0,106	0,076	0,097	0,09	0,062	0,069	0,053	0,371	1,21	1,003	0,57
G	0,042	0,042	0,039	0,041	0,043	0,047	0,041	0,057	0,135	0,518	0,403	0,195
H	0,035	0,038	0,038	0,028	0,034	0,045	0,042	0,03	0,061	0,156	0,136	0,089

IHC Monkey peripheral nerve (EM vacunas)

Muestras:

- | | |
|---------------|--|
| 1. 4225069 T1 | 9. 925491 T3 |
| 2. 767614 T1 | 10. 514508 T1 |
| 3. 5350187 T1 | 11. 22-300907 (S55 07/06/22). NHC: 1119115 (Yasmina Zarco) |
| 4. 5350187 T3 | 12. 22-5-641 (Box 299). NHC: 1119115 (Yasmina Zarco) |
| 5. 1598702 T1 | 13. IVIg sin diluir (100 g/L) |
| 6. 1598702 T3 | 14. IVIg diluídas 2g/L (1/50) |
| 7. 217975 T1 | 15. Cneg 200-2 |
| 8. 925491 T1 | |

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:

1. 4225069 T1 → tejido conectivo alrededor de mielina IgG (como T3)
2. 767614 T1 → neg
3. 5350187 T1 → mielina 1 / 2 IgG
4. 5350187 T3 → neg
5. 1598702 T1 (21-2-1356) → mielina 2 IgG
6. 1598702 T3 → mielina 3 IgG (en IHC de 07/06/2022 salía neg, igual hubo confusión con las alícuotas: repetir)
7. 217975 T1 (21-2-1339) → mielina 1 IgG
8. 925491 T1 (21-2-1360) → neg
9. 925491 T3 → neg
10. 514508 T1 (21-2-1319) → mielina 3 IgG
11. 22-300907 (S55 07/06/22). NHC: 1119115 (Yasmina Zarco) → mielina 1 IgG, axones 2 IgM
12. 22-5-641 (Box 299). NHC: 1119115 (Yasmina Zarco) → neg
13. IVIg sin diluir (100 g/L) → neg
14. IVIg diluídas 2g/L (1/50 en Goat serum) → fondo inespecífico (creo que me equivoqué y aquí puse las IVIg sin diluir, porque no tiene sentido que sin diluir sean negativas y diluídas marquen algo).
15. Cneg 200-2 → neg

27/06/2022

Coating Células de Schwann de rata (cultivo primario)

2 placas de 60 mm 14 cubres

- Coating 1h Poly-D-lys 1/40 en PBS1x
- 100.000 cels (aprox 5000 cels/cm²) en **medio de diferenciación** (diferenciar durante 4-5 días)
 - 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)

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

28/06/2022

IHC Monkey peripheral nerve (EM vacunas)

Muestras:

- | | |
|-------------------------------|-------------------------------|
| 1. 4225069 T1 | 16. 461265 T3 (10) |
| 2. 4225069 T3 | 17. 472720 T3 (11) |
| 3. 5350187 T1 | 18. 493713 T3 (12) |
| 4. 5350187 T3 | 19. 505343 T3 (13) |
| 5. 1598702 T1 (21-2-1356) | 20. 591615 T3 (14) |
| 6. 1598702 T3 | 21. 597217 T3 (15) |
| 7. 217975 T1 (21-2-1339) | 22. 631193 T3 (16) |
| 8. 217975 T3 | 23. 814329 T3 (17) |
| 9. 1233356 T3 | 24. 901936 T3 (18) |
| 10. 415276 T3 | 25. 927164 T3 (19) |
| 11. Cneg 200-2 | 26. 70667440 T3 (scr. in. E9) |
| 12. IVlg sin diluir (100 g/L) | 27. 641216 T3 (scr. in. F1) |
| 13. IVlg dil a 20g/L (1/5) | 28. 5285494 T3 (scr.in F2) |
| 14. IVlg dil a 2g/L (1/50) | 29. 4795584 T3 (scr. in F3) |
| 15. Cneg 200-2 | 30. 720643 T3 (scr. in. F4) |

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 Ac primario:
 - **1-11:** doble S100 (1/50)
 - **12-15:** doble NCAM (1/50)
 - **16-30:** nada (IgG y IgM)

- Incubar 1h con 30-40 ul de Ac. secundarios → GAH monkey absorbed IgG 488 + GAH IgM 594 diluidos 1/500 en goat serum 5%
- 3 lavados con PBS1x
- Montar con fluoromount

Resultados:

1. 4225069 T1 → tejido conectivo alrededor mielina (mielina 1) IgG
2. 4225069 T3 → tejido conectivo alrededor mielina (mielina 1) IgG
3. 5350187 T1 → mielina 1/2 IgG
4. 5350187 T3 → mielina 1/2 IgG
5. 1598702 T1 (21-2-1356) → mielina 3 IgG
6. 1598702 T3 → mielina 3 IgG
7. 217975 T1 (21-2-1339) → mielina 1 IgG
8. 217975 T3 → mielina 2 IgG
9. 1233356 T3 → neg
10. 415276 T3 → neg
11. Cneg 200-2 → neg
12. IVlg sin diluir (100 g/L) → neg (puede ser porque es tan positivo que se satura)
13. IVlg dil a 20g/L (1/5) → marcaje general, pero nada específico (IgG)
14. IVlg dil a 2g/L (1/50) → marcaje general, pero nada específico (IgG)
15. Cneg 200-2 → neg
16. 461265 T3 (10) → axones 2 IgG
17. 472720 T3 (11) → **mielina 1/2 IgG**, fibras IgM
18. 493713 T3 (12) → axones 2 IgG, fibras 3 IgM
19. **505343 T3 (13)** → **fibras o amielínicas IgG** (REPETIR), fibras 3 IgM
20. 591615 T3 (14) → mielina 1 IgG, fibras IgM
21. **597217 T3 (15)** → repetir
22. 631193 T3 (16) → axones 1 y fibras IgG, **mielina 2 IgM** (marcaje raro, nose si es mielina o los fibras circundantes)
23. 814329 T3 (17) → mielina 1, fibras 2, axones 1 IgG
24. 901936 T3 (18) → mielina 1, axones 2 IgG, **mielina 2 IgM** (marcaje raro, nose si es mielina o los fibras circundantes)
25. 927164 T3 (19) → **mielina 2 IgG**, axones 2 IgG
26. 70667440 T3 (scr. in. E9) → fibras IgM

27. 641216 T3 (scr. in. F1) → axones 2 IgG, fibras IgM
28. 5285494 T3 (scr.in F2) → **mielina 1 / 2 IgG**
29. 4795584 T3 (scr. in F3) → **mielina 2 IgM** (marcaje raro, nose si es mielina o los fibros circundantes)
30. 720643 T3 (scr. in. F4) → tejido conectivo IgG, axones 2 IgM

Coating células + transfección Culture slides

24 culture slides:

- 9 **ATP4A/4B**
- 8 Perfil
- 2 NF155/CNTN1
- 4 LRP4
- 1 Doble CNTN1-CASPR1 / CASPR2

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
 - ATP4A/B: 1,1 ug ATP4A + 1,1 ug ATP4B
 - 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

29/06/2022

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, bloquear y congelar a -80°

11/07/2022

Coating ELISA CASPR1

[CASPR1]_i = 0,789 mg/ml

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

- CASPR1: 96 pozos (2 placas) → [CASPR1]_f = 5 ug/ml → 5 ml buffer + 31,7 ul

12/07/2022

ELISA CASPR1 subclases y titulación (IMM)

Muestras:

- 22-265763 (muestra inicial Bocanegra 13/04/2022, NHC 1108585)
- 22-308379 (muestra Bocanegra día 17/06/2022, NHC 1108585)

Protocolo:

- Bloquear con leche 5% en PBS-tween 0'1% → 200 ul pozo (incubar 1h a temp. ambiente)
- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
- Diluir los **sueros**:
 - Titulación: 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 (a: 1/100, b:1/300, c:1/900, d: 1/2700, e: 1/8100 i f: 1/24300)
 - Subclases: diluir sueros 1/100 en leche 5% en PBS-tween 0'1%
- Incubar con los sueros 1h
- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
- Incubar 45min con **RAH IgG HRP** 1/3000 o **MAH HRP** IgG1 o IgG2 o IgG3 o IgG4 1/1000 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 **H₂SO₄** 25%
- Leer a 450-620 nm

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	Cneg	22-265763 1/900	22-308379 1/100	22-308379 1/8100	22-265763 IgG1	22-308379 IgG1						
B blanc	Cneg	22-265763 1/900	22-308379 1/100	22-308379 1/8100	22-265763 IgG1	22-308379 IgG1						
C prot	Cpos	22-265763 1/2700	22-308379 1/300	22-308379 1/24300	22-265763 IgG2	22-308379 IgG2						
D blanc	Cpos	22-265763 1/2700	22-308379 1/300	22-308379 1/24300	22-265763 IgG2	22-308379 IgG2						
E prot	22-265763 1/100	22-265763 1/8100	22-308379 1/900		22-265763 IgG3	22-308379 IgG3						
F blanc	22-265763 1/100	22-265763 1/8100	22-308379 1/900		22-265763 IgG3	22-308379 IgG3						
G prot	22-265763 1/300	22-265763 1/24300	22-308379 1/2700		22-265763 IgG4	22-308379 IgG4						
H blanc	22-265763 1/300	22-265763 1/24300	22-308379 1/2700		22-265763 IgG4	22-308379 IgG4						

Resultado:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	0,017	0,611	0,79	0,034	0,385	0,148						
B blanc	0,045	0,009	0,019	0,007	0,004	0,018						
C prot	1,243	0,321	0,523	0,015	0,004	0,007						
D blanc	0,037	0,005	0,004	0,006	0,003	0,008						
E prot	1,302	0,145	0,297		0,17	0,02						
F blanc	0,019	0,005	0,008		0,006	0,006						
G prot	1,213	0,069	0,069		0,27	0,128						
H blanc	0,041	0,012	0,026		0,036	0,114						

- 22-265763: título CASPR1 >1/24300, Subclases: IgG1>IgG4>IgG3
- 22-308379: título CASPR1 1/2700, Subclases: IgG1, IgG4 (repetir?)

14/07/2022

Extracción y cultivo de neuronas DRG (rata)

Se extraen a partir de embriones de rata. Ratas Sprague-Dawley embarazadas.

Se piden ratas E15 pero se utilizan pasadas 24 horas → el cultivo se inicia en E16.

Extracción de DRGs

➤ Estabulario

- Llevar al estabulario un tubo falcon de 50 ml con medio L15 (en hielo) y material instrumental (tijeras, bisturí, pinzas...).

Medio L15:

- 45 ml de medio Leibovitz's
- 5 ml de FBS (10%)
 - 50 µl de DNasa (stock a 10 µg/ml) *La DNasa no se añade directamente al medio L15 total, sólo se añaden 5 ul de stock de DNasa a los 5 mL que se usan para inactivar la tripsina.
- Poner el animal a la cámara de CO₂ → abrir la llave hasta el número 2, subir el O₂ hasta el 2, y poner el isofluorano al 5.
- Sacar la rata de la cámara y ponerla encima de un corcho. Pinchar 1ml de TP41 (Solución inyectable para eutanasia) en el corazón.
- Mojar la rata con alcohol y abrir por debajo (ponerla boca arriba). Tirar de las bolsas de los fetos y ponerlos en una placa con L15.
- Sacar todos los fetos de las bolsas y ponerlos en un tubo con medio L15 (en hielo).

➤ Cultivos

- Poner todos los fetos en una placa con el medio L15 y mantenerla sobre el hielo.
- Coger un feto, ponerlo sobre la placa con Agar y mojarlo con PBS (estéril y frío, mantenerlo en hielo). Es importante ir mojando el feto con PBS, no puede quedarse seco en ningún momento.
- Cortar la cabeza con unas tijeras y clavar el feto boca abajo con 4 puntas de aguja en las extremidades.
- Sacar las dos capas que envuelven la médula espinal y sacar la médula procurando que no se rompa.
- Sacar los ganglios que se hayan quedado pegados a la médula y pasarlos a una placa pequeña con L15.
- Con una aguja de insulina sacar para fuera los DRG de la columna e irlos pasando a la placa con L15
-

Disgregación de los DRGs

- Pasar todos los DRG a un tubo de 15 ml → con pipeta Pasteur de cristal + *xumet*
- Centrifugar a 300 rpm 5 min
- Eliminar el sobrenadante (con pipeta+xumet e ir tirando a una placa, para no perder ningún DRG).
- Poner PBS1x y centrifugar a 300 rpm 5 min.
- Eliminar el sobrenadante y añadir 5 ml de → 4'5ml PBS1x + 500 ul de tripsina 2.5% sin bromophenol.
- Incubar 15min en el baño a 37°C. Homogeneizar suavemente cada 5 min
- Añadir 5 ml de medio L15 (con DNasa) para inactivar la tripsina.
- Centrifugar a 300 rpm 10 min
- Pasar el pellet a un eppendorf con 1ml de medio NG, y disgregar con una pipeta pasteur de cristal fina (*se hace más fina la punta con el bunsen, preparar unos días antes y autoclavar*). Procurar no hacer mucha espuma. Antes de homogeneizar, pasar la pipeta por FBS para que no se queden pegados los DRG a las paredes.

Medio NG:

- 48 ml de medio Neurobasal
- 1 ml de suplemento B27
- 500 µl de glutamax
- 500 µl de Pen-Str
- 25 µl de NGF → uso un NGF diferente: Native mouse NGF 2.5S protein. Ref N-240, Alomone: guardado resuspendido a 100ug/ml en -20°C
- Pasar el ml disgregado a un tubo de 15ml con 5ml de medio NG.
- Pasar las células a las placas → las células no se cuentan, las proporciones se hacen en función del nombre de embriones. En este caso hago 5 placas de 100cc sin cubres, y 2 placas de 60cc con cubres pequeños.
 - Coating:
 - Día anterior: coating con Poly-D-lys 1/40 → incubar overnight a 37°C
 - Mismo día: lavar placas y hacer coating con Laminina 2'5 ul/ml → incubar 2h a 37°C

Cultivo de las neuronas de DRG

- 24h después del inicio del cultivo (viernes), cambiar le mitad del pedio de cada placa por **medio NGF** (para eliminar las células de la glía)
 - 50 ml de medi NG
 - 10 µl de 5-fluorodesoxiuridina (1)
 - 10 µl de uridina (2)
 - 5 µl de AraC 10 mM
- 72h más tarde (lunes), cambiar la mitad del medio de cada placa por medio NG otra vez.
- A partir de este momento, cambiar la mitad de medio por medio NG nuevo cada 2 días.

Co-cultivo de neuronas DRG i células de Schwann (rata)

Protocolo mixto entre paper “DRG neuron/Schwann cells Myelinating Cocultures” de Taveggia (2018), paper pan-NF de Appelthausen, y paper “A reliable in vitro model for studying peripheral nerve myelination in mouse” de Stettner (2013).

- Placa de 24wells con 1 cubre de 12mm en cada pozo:
 - Día anterior: coating con Poly-D-lys 1/40 → incubar overnight a 37°C
 - Mismo día: lavar pozos y hacer coating con Laminina 2'5 ul/ml → incubar mínimo 1h a 37°C
- D0 → Añadir 400 ul de medio C (co-culture médium) a cada pozo con cubre:
 - **Medio C (co-culture medium):**
 - DMEM (con D-glucosa y Glutamax): 44,5 ml (ref. 10569-010 ThermoFisher)
 - 10% FBS: 5 ml
 - 1% Pen-Str: 0,5ml
 - 50 ng/ml NGF: 25 ul
 - *según el protocolo original, se usaría MEM en vez de DMEM, y también habría que añadir 1% de L-glutamina y 4mg/ml de D-glucosa → como nuestro DMEM ya lleva glutamina y glucosa, no le añadido más.
- Poner un DRG en el centro de cada pozo (a cada cubre) e incubar a 37°C
- D1 → cambiar el medio (poner medio C nuevo) → cambio sólo 200ul (la mitad)
- D3 → cambiar el medio por **medio NG** → cambio 300 ul
 - Neurobasal: 48 ml
 - 2% B27: 1 ml
 - 1% L-glutamina (en este caso, Glutamax): 0,5 ml
 - 1% Pen-Str: 0,5 ml

- 50 ng/ml NGF:25 ul
- *según el protocolo original, también habría que añadir 4mg/ml de D-glucosa → como nuestro Neurobasal ya lleva glucosa, no le añado más.
- D5 → cambiar el medio (poner medio NG nuevo) → cambio 200 ul (la mitad)
- D7 → cambiar el medio por **Medio de mielinización co-cultivos**:
 - Medio C: 30 ml
 - 50 ug/ml de ácido ascórbico: 300 ul del stock 5mg/ml (1/100 en el medio)
 - *Preparación previa ácido ascórbico (A4403, Merck): disolver los 100mg en 20ml de DMEM (para hacer 5mg/ml) → congelar en alícuotas de 400 ul tapado con papel de plata*
 - 0,5 uM Forskolin: 1,5ul del stock 10mM (1/20000 en el medio)
 - *En el paper de Appelthausen pone 0,05uM, pero creo que en realidad es 0,5um porque es lo que ponen en el paper de Stettner 2013 (en el que ella se basa). Normalmente en las células de Schwann lo usamos a 20um, pero según el paper de Stettner 2013, el forskolin provoca desmielinización (el efecto contrario al deseado).*
- D9 → cambiar el medio (poner medio de mielinización nuevo) → a partir de aquí ir cambiando un día sí uno no (cada 2 días).
 - *en teoría a partir del día 12 empiezan a mielinizar, a partir del día 16 ya están bien diferenciados, se pueden cultivar hasta un máximo de 21-25 días.

Immunoprecipitación - Pierce Classic Magnetic IP Kit (dynabeads)

Muestras:

1. Cneg 204-10
2. Cpos CIDP78 (Vinuesa, CASPR1+)
3. 22-5-391 (LCR Bocanegra NHC 1108585)
4. 22-2-374 (Suero Bocanegra NHC 1108585)

Células: Nervio ciático de rata

Incubación con suero y lisis del tejido

- Sacar el nervio ciático de la rata y poner entre dos gasas mojadas con PBS1x.
- Desfilas el nervio en la lupa como si hiciéramos teasing
- Poner una parte del nervio en cada eppendorf (4 en total)
- Incubar con las muestras overnight a 4°C (en agitación en cámara fría):
 - Sueros: 1/20 en PBS1x (25 ul suero + 500ul PBS)

- LCR: 1/2 en PBS1x (150ul LCR + 150ul PBS)
- Al día siguiente: centrifugar 2 min a 200g y tirar el sobrenadante
- Lavar con PBS1x 2 veces (entre cada lavado centrifugar 2 min a 200g y tirar el sobrenadante)
- Añadir 800 µl de IP Lysis/Wash buffer + inhibidores de proteasas 1x a cada eppendorf
- Triturar con TissueDisruptor en hielo: 3 veces x5 segundos
- Incubar aprox. 2 horas a 4°C en agitación fuerte
- Centrifugar 10 min a 13000g
- Hacer IP con el sobrenadante

Preparación de las bolas magnéticas

- Poner 25 µl de Pierce Protein A/G Magnetic Beads a un eppendorf
- Añadir 175 µl de IP Lysis/Wash Buffer y hacer vórtex (suave)
- Poner el tubo en el soporte magnético. Eliminar el sobrenadante (sin retirar el eppendorf)
- Añadir 1 ml de IP Lysis/Wash Buffer y hacer vórtex (suave). Poner de nuevo en el soporte magnético y eliminar el sobrenadante.

Immunoprecipitación

- Añadir la mezcla antígeno-anticuerpo (primera parte) al eppendorf con las bolas magnéticas lavadas e incubar a temperatura ambiente 1 hora en agitación (rotación).
- Poner el eppendorf en el soporte magnético y eliminar el sobrenadante.
- Añadir 500 µl de IP Lysis/Wash buffer (con inhibidores de proteasas 1x) y mezclar. Poner en el soporte magnético y eliminar el sobrenadante.
- Volver a repetir el lavado
- Añadir 500 µl de agua destilada ultrapura y mezclar. Poner en el soporte magnético y eliminar el sobrenadante.
- **Añadir 100 µl de Elution Buffer.**
- **Incubar en agitación a Tamb 10 minutos**
- **Poner en el soporte magnético para que las bolas magnéticas se separen.**
- **Añadir 10 ul de Neutralization buffer**
- **Guardar a 4°C**

15/07/2022

Cuantificación proteína (muestras IP)

Muestras después de IP 14/07/2022:

1. Cneg 204-10
2. Cpos CIDP78 (Vinuesa, CASPR1+)
3. 22-5-391 (LCR Bocanegra NHC 1108585)
4. 22-2-374 (Suero Bocanegra NHC 1108585)

Protocolo: kit ADV02 (Cytoskeleton):

- Poner 10ul de muestra (diluída o no) + 290 ul de producto ADV02 (por duplicado) → en este caso lo hago de dos maneras: diluyendo a 1/5 y sin diluir
- Incubar 1min a TA
- Leer a 600nm
- Cálculos:
 - Hacer media de absorbancias y restar la absorbancia del blanco (10 ul del buffer en que estén diluídas las muestras+290ul de ADV02)
 - Multiplicar la absorbancia por 3,75
 - Multiplicar por el factor de dilución que se ha aplicado a la muestra (si se ha hecho)

Resultado: No sale nada!! Parece que no haya proteína!! Tendría que haber cuantificado antes de hacer la IP (después del TissueDisruptor)

ICC perfil BD

CNTN1, NF140, NF155, NF186

Muestras:

- 22-2-675 → neg
- 22-2-676 → neg
- 22-2-677 → neg
- 22-2-678 → neg
- 22-2-690 → pan NF+ (repetir!)
- 22-2-691 → neg
- 22-2-692 → repetir CNTN1 (no hay cels)
- 22-2-693 → neg
- 22-2-694 → neg

ELISA CASPR1 BD

Muestras:

- 22-2-675 → neg
- 22-2-676 → neg
- 22-2-677 → neg
- 22-2-678 → neg
- 22-2-690 → neg
- 22-2-691 → neg
- 22-2-692 → neg
- 22-2-693 → neg
- 22-2-694 → neg

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	0,313	0,103	0,263									
B blanc	0,259	0,176	0,453									
C prot	0,1	0,117	0,261									
D blanc	0,16	0,166	0,451									
E prot	0,101	0,206	1,36 (Cpos)									
F blanc	0,173	0,396	0,271 (Cpos)									
G prot	0,298	0,274	0									
H blanc	0,318	0,324	0									

Cambiar medio co-cultivos

- D1 → cambiar el medio (poner medio C nuevo) → cambio sólo 200ul (la mitad)

17/07/2022

Cambiar medio co-cultivos

- D3 → cambiar el medio por **medio NG** → cambio 300 ul
 - Neurobasal: 48 ml
 - 2% B27: 1 ml
 - 1% L-glutamina (en este caso, Glutamax): 0,5 ml
 - 1% Pen-Str: 0,5 ml
 - 50 ng/ml NGF: 25 ul

*según el protocolo original, también habría que añadir 4mg/ml de D-glucosa → como nuestro Neurobasal ya lleva glucosa, no le añado más.

19/07/2022

Cambiar medio co-cultivos

- D5 → cambiar el medio (poner medio NG nuevo) → cambio 200 ul (la mitad)

21/07/2022

Cambiar medio co-cultivos

- D7 → cambiar el medio por **Medio de mielinización co-cultivos**:
 - Medio C: 30 ml
 - 50 ug/ml de ácido ascórbico: 300 ul del stock 5mg/ml (1/100 en el medio)
 - *Preparación previa ácido ascórbico (A4403, Merck): disolver los 100mg en 20ml de DMEM (para hacer 5mg/ml) → congelar en alícuotas de 400 ul tapado con papel de plata*
 - 0,5 uM Forskolin: 1,5ul del stock 10mM (1/20000 en el medio)
 - *En el paper de Appelthauser pone 0,05uM, pero creo que en realidad es 0,5um porque es lo que ponen en el paper de Stettner 2013 (en el que ella se basa). Normalmente en las células de Schwann lo usamos a 20um, pero según el paper de Stettner 2013, el forskolin provoca desmielinización (el efecto contrario al deseado).*

✓ Coating ELISA NF155, CASPR1, CNTN1, NF140

[CASPR1]_i = 0,789 mg/ml

[NF155]_i = 0,20 mg/ml

[CNTN1]_i = 0,25 mg/ml

[NF140]_i = 0,25 mg/ml

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

- CASPR1: 48 pozos [f = 5 ug/ml → 2,5 ml buffer + 15,8 ul
- NF155: 48 pozos [f = 1 ug/ml → 2,5 ml buffer + 12,5 ul
- CNTN1: 48 pozos [f = 1 ug/ml → 2,5 ml buffer + 10 ul
- NF140: 48 pozos [f = 5 ug/ml → 2,5 ml buffer + 50 ul

22/07/2022

✓ ELISA NF140, NF155, CASPR1, CNTN1 (screening EM vacunes)

Objetivo: testar las muestras del estudio "*Efficacy and neurological adverse effects of COVID-19 vaccination in patients immunocompromised for multiple sclerosis*"

Muestras: (22 muestras del estudio EM vacunas de H.Santpau, Cpos y Cneg)

			Resultado NF140	Resultado NF155	Resultado CNTN1	Resultado CASPR1
1	98722	T3	neg	neg	neg	neg
2	111955	T3	neg	neg	neg	neg
3	147303	T3	neg	neg	neg	neg
4	190943	T3	neg	neg	neg	neg
5	219804	T3	neg	neg	neg	neg
6	266178	T3	neg	neg	neg	Pos
7	304320	T3	neg	Pos	neg	neg
8	344185	T3	neg	neg	neg	neg
9	422044	T3	neg	neg	neg	neg
10	461265	T3	neg	neg	neg	neg
11	472720	T3	neg	neg	neg	neg
12	493713	T3	neg	neg	neg	Pos
13	505343	T3	neg	neg	neg	neg
14	591615	T3	neg	neg	neg	neg
15	597217	T3	neg	neg	neg	neg
16	631193	T3	neg	neg	neg	neg
17	814329	T3	neg	neg	neg	neg
18	901936	T3	neg	neg	neg	Pos
19	927164	T3	neg	neg	neg	neg
20	950931	T3	neg	neg	neg	neg
21	1004410	T3	neg	neg	neg	neg
22	1021881	T3	neg	neg	neg	neg

Protocolo:

- Bloquear con leche 5% en PBS-tween 0'1% → 200 ul pozo (incubar 1h a temp. ambiente)
- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
- Diluir los **sueros**:
 - Screening: diluir sueros 1/100 en leche 5% en PBS-tween 0'1%
- 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 **H₂SO₄** 25%
- Leer a 450-620 nm

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	Cneg	3	7	11	15	19	Cneg	3	7	11	15	19
Bblanc	Cneg	3	7	11	15	19	Cneg	3	7	11	15	19
C prot	Cpos	4	8	12	16	20	Cpos	4	8	12	16	20
Dblanc	Cpos	4	8	12	16	20	Cpos	4	8	12	16	20
E prot	1	5	9	13	17	21	1	5	9	13	17	21
F blanc	1	5	9	13	17	21	1	5	9	13	17	21
G prot	2	6	10	14	18	22	2	6	10	14	18	22
Hblanc	2	6	10	14	18	22	2	6	10	14	18	22

NF140

NF155

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	Cneg	3	7	11	15	19	Cneg	3	7	11	15	19
Bblanc	Cneg	3	7	11	15	19	Cneg	3	7	11	15	19
C prot	Cpos	4	8	12	16	20	Cpos	4	8	12	16	20
Dblanc	Cpos	4	8	12	16	20	Cpos	4	8	12	16	20
E prot	1	5	9	13	17	21	1	5	9	13	17	21
F blanc	1	5	9	13	17	21	1	5	9	13	17	21
G prot	2	6	10	14	18	22	2	6	10	14	18	22
Hblanc	2	6	10	14	18	22	2	6	10	14	18	22

CNTN1

CASPR1

Resultado:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	0,11	0,104	0,104	0,148	0,086	0,09	0,143	0,103	0,37	0,203	0,1	0,12
Bblanc	0,174	0,076	0,096	0,074	0,066	0,074	0,164	0,086	0,105	0,151	0,077	0,091
C prot	1,046	0,107	0,078	0,097	0,094	0,179	1,222	0,206	0,068	0,103	0,126	0,263
Dblanc	0,125	0,158	0,061	0,075	0,092	0,11	0,241	0,212	0,058	0,086	0,121	0,14
E prot	0,095	0,084	0,073	0,086	0,097	0,079	0,208	0,111	0,069	0,105	0,156	0,092
F blanc	0,111	0,084	0,069	0,075	0,074	0,063	0,126	0,082	0,08	0,075	0,095	0,074
G prot	0,134	0,078	0,131	0,079	0,082	0,099	0,134	0,08	0,13	0,074	0,071	0,152
Hblanc	0,122	0,075	0,126	0,053	0,051	0,113	0,112	0,061	0,121	0,059	0,062	0,122

NF140

NF155

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	0,101	0,074	0,105	0,115	0,073	0,082	0,073	0,063	0,09	0,073	0,058	0,069
Bblanc	0,14	0,07	0,094	0,083	0,064	0,076	0,13	0,07	0,086	0,08	0,048	0,087
C prot	1,369	0,127	0,083	0,131	0,094	0,115	1,427	0,07	0,073	0,214	0,1	0,119
Dblanc	0,149	0,184	0,067	0,082	0,103	0,111	0,126	0,088	0,056	0,087	0,08	0,123
E prot	0,109	0,109	0,084	0,08	0,085	0,074	0,067	0,085	0,082	0,077	0,085	0,103
F blanc	0,113	0,081	0,073	0,077	0,073	0,067	0,105	0,082	0,082	0,069	0,069	0,095
G prot	0,126	0,078	0,098	0,062	0,061	0,101	0,118	0,269	0,074	0,054	0,324	0,09
Hblanc	0,183	0,073	0,13	0,062	0,051	0,108	0,143	0,131	0,096	0,061	0,056	0,09

CNTN1

CASPR1

✓ **ELISA NF140, NF155, CASPR1, CNTN1 (screening EM vacunes)**

Objetivo: testar las muestras del estudio "Efficacy and neurological adverse effects of COVID-19 vaccination in patients immunocompromised for multiple sclerosis"

Muestras: (22 muestras del estudio EM vacunas de H.Santpau, Cpos y Cneg) → no pongo Cpos de NF140 ni de CASPR1 porque no hay mucho

			Resultado NF140	Resultado NF155	Resultado CNTN1	Resultado CASPR1
23	1063758	T3	neg	neg	neg	neg
24	1097811	T3	neg	neg	neg	neg
25	1113212	T3	neg	neg	neg	neg
26	1115327	T3	neg	neg	neg	neg
27	1122921	T3	neg	neg	neg	neg
28	1124890	T3	neg	neg	neg	neg
29	1153091	T3	Pos	neg	neg	neg
30	1166296	T3	neg	neg	neg	neg

31	1175686	T3	neg	neg	neg	neg
32	1215478	T3	neg	neg	neg	neg
33	1217671	T3	neg	neg	neg	neg
34	1248466	T3	neg	neg	neg	neg
35	1398484	T3	neg	neg	neg	neg
36	1432202	T3	neg	neg	neg	neg
37	1454038	T3	neg	neg	neg	neg
38	1519499	T3	neg	neg	neg	neg
39	1534001	T3	neg	neg	neg	neg
40	1556291	T3	neg	neg	neg	neg
41	1562083	T3	neg	neg	neg	neg
42	1566039	T3	neg	neg	neg	neg
43	1643200	T3	neg	neg	neg	neg
44	1668802	T3	neg	neg	Pos	neg

Protocolo:

- Bloquear con leche 5% en PBS-tween 0'1% → 200 ul pozo (incubar 1h a temp. ambiente)
- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
- Diluir los **sueros**:
 - Screening: diluir sueros 1/100 en leche 5% en PBS-tween 0'1%
- 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 **H₂SO₄** 25%
- Leer a 450-620 nm

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	Cneg	25	29	33	37	41	Cneg	25	29	33	37	41
Bblanc	Cneg	25	29	33	37	41	Cneg	25	29	33	37	41
C prot	Cpos	26	30	34	38	42	Cpos	26	30	34	38	42
Dblanc	Cpos	26	30	34	38	42	Cpos	26	30	34	38	42
E prot	23	27	31	35	39	43	23	27	31	35	39	43
F blanc	23	27	31	35	39	43	23	27	31	35	39	43
G prot	24	28	32	36	40	44	24	28	32	36	40	44
Hblanc	24	28	32	36	40	44	24	28	32	36	40	44

NF140

NF155

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	Cneg	25	29	33	37	41	Cneg	25	29	33	37	41
Bblanc	Cneg	25	29	33	37	41	Cneg	25	29	33	37	41
C prot	Cpos	26	30	34	38	42	Cpos	26	30	34	38	42
Dblanc	Cpos	26	30	34	38	42	Cpos	26	30	34	38	42
E prot	23	27	31	35	39	43	23	27	31	35	39	43
F blanc	23	27	31	35	39	43	23	27	31	35	39	43
G prot	24	28	32	36	40	44	24	28	32	36	40	44
Hblanc	24	28	32	36	40	44	24	28	32	36	40	44

CNTN1

CASPR1

Resultado:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	0,166	0,163	0,421	0,158	0,188	0,161	0,213	0,203	0,228	0,204	0,265	0,338
Bblanc	0,203	0,153	0,161	0,151	0,161	0,152	0,239	0,187	0,192	0,178	0,26	0,222
C prot	-0,112	0,164	0,177	0,163	0,184	0,23	1,214	0,164	0,18	0,236	0,2	0,325
Dblanc	-0,212	0,127	0,165	0,215	0,158	0,286	0,314	0,16	0,185	0,24	0,211	0,459
E prot	0,186	0,2	0,162	0,181	0,176	0,196	0,281	0,198	0,18	0,239	0,25	0,298
F blanc	0,233	0,176	0,143	0,171	0,198	0,214	0,303	0,178	0,178	0,241	0,287	0,355
G prot	0,189	0,158	0,176	0,201	0,204	0,24	0,264	0,209	0,212	0,217	0,323	0,261
Hblanc	0,271	0,166	0,146	0,254	0,157	0,357	0,356	0,222	0,217	0,306	0,24	0,582

NF140 (no hay Cpos)

NF155

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	0,124	0,104	0,122	0,114	0,138	0,104	0,122	0,105	0,12	0,14	0,12	0,129
Bblanc	0,127	0,083	0,101	0,085	0,108	0,095	0,14	0,106	0,112	0,124	0,099	0,131
C prot	1,403	0,07	0,097	0,101	0,106	0,197	-0,37	0,068	0,111	0,12	0,086	0,134
Dblanc	0,096	0,065	0,072	0,114	0,091	0,209	-0,234	0,089	0,09	0,157	0,083	0,226
E prot	0,116	0,086	0,086	0,098	0,112	0,11	0,177	0,085	0,084	0,12	0,092	0,148
F blanc	0,128	0,067	0,062	0,099	0,103	0,104	0,148	0,104	0,084	0,163	0,103	0,142
G prot	0,166	0,07	0,074	0,1	0,101	0,512	0,136	0,101	0,12	0,147	0,127	0,206
Hblanc	0,125	0,061	0,067	0,17	0,082	0,226	0,182	0,105	0,102	0,204	0,089	0,28

CNTN1

CASPR1 (no hay CPos)

23/07/2022

Cambiar medio co-cultivos

- D9 → cambiar el medio (poner medio de mielinización nuevo) → cambio 200 ul (la mitad)

25/07/2022

Cambiar medio co-cultivos

- D11 → cambiar el medio (poner medio de mielinización nuevo) → cambio 200 ul (la mitad)

26/07/2022

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

ICC co-cultivos (día 12)

Cojo 5 cubres de los co-cultivos para ir viendo como va la diferenciación.

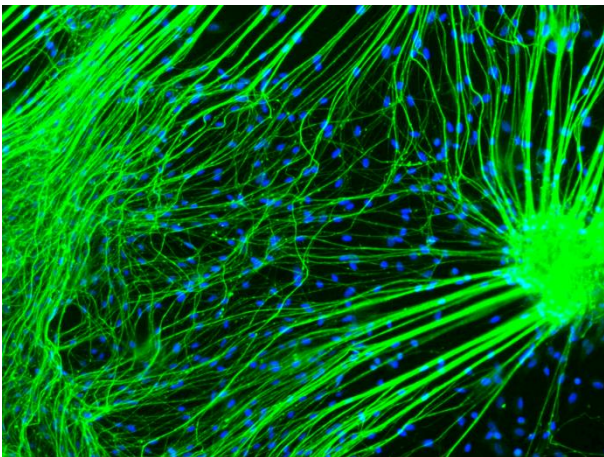
Protocolo: se hace todo en placa de 24 wells

- Fijar 20 min con PFA 4%
- 1 lavado con PBS1x
- Bloquear con Goat serum 5% y 0'3% tritón (en PBS): 1h a RT

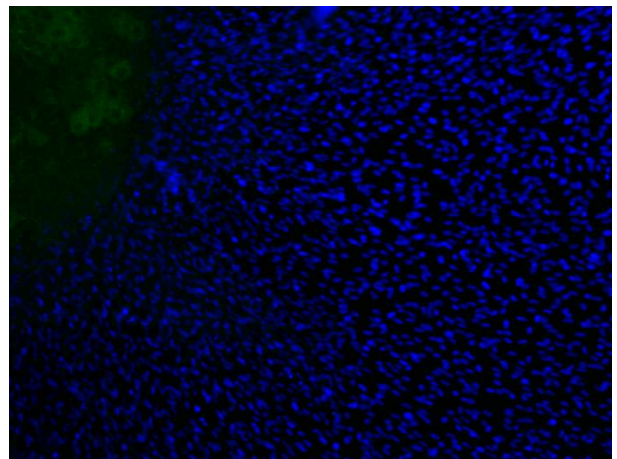
- Incubar overnight a 4°C con anticuerpos primarios diluïdos en Goat serum 5% y 0'3% tritón (en PBS):
 - NFh: anti-Neurofilament H, AB5539 (Merck) Dil. 1/500 (chicken)
 - MBP: anti-Myelin Basic Protein, GTX 11159 (Genetex). Dil. 1/200 (mouse)
 - panNF: anti-panNeurofascin, AF3235 (R&D systems). Dil.1/500 (chicken)
 - S100: anti-S100, ab52642 (abcam). Dil. 1/100 (rabbit)
 - Suero anti-CNTN1+: dil. 1/100 (human)
- 3 lavados con PBS1x
- Incubar 1h con Ac. secundarios diluïdos en Goat serum 5% y 0'3% tritón (todos a 1/500)
 - NFh: GAC488
 - MBP: GAM488
 - panNF: GAC488
 - S100: GAR488
 - Suero CNTN1+: GAH488 IgG
- 3 lavados con PBS1x
- Montar con DAPI

Resultados:

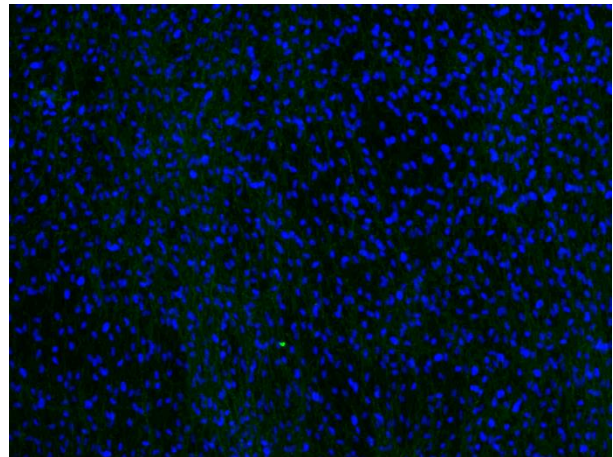
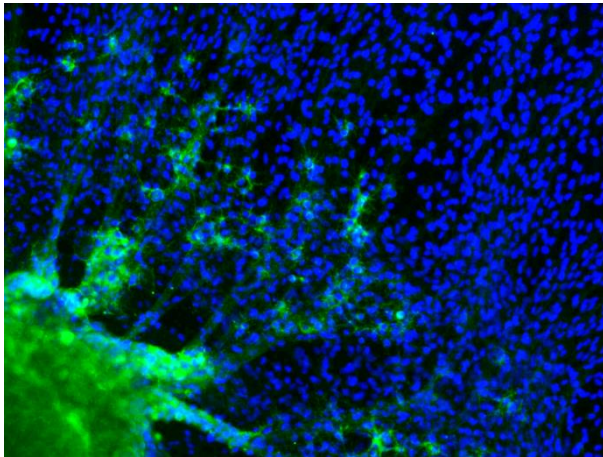
1. **NFh:** muy positivo (axones)



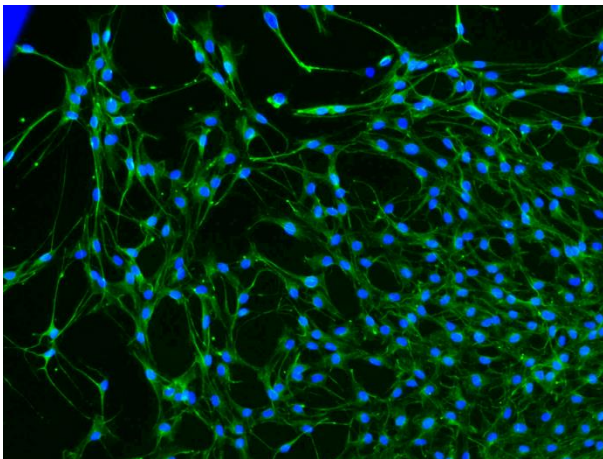
2. **MBP:** negativo (mielina)



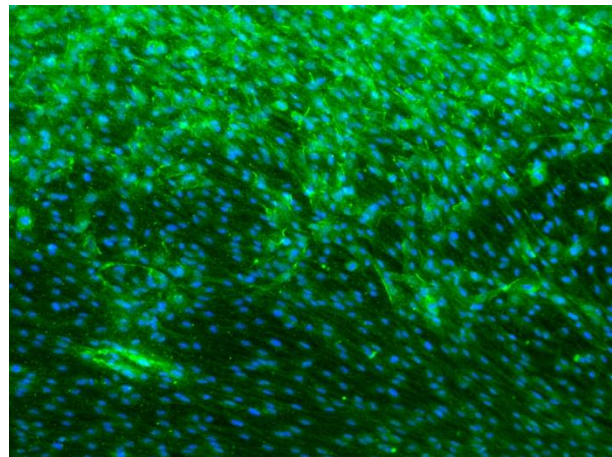
3. **panNF**: un poco positivos los axones, pero no marca nodos ni paranodos. Marque diferente alrededor del ganglio.



4. **S100**: muy positivo (cels Schwann)



5. **Suero CNTN1+**: no marca los axones como en las neuronas DRG habitualmente, marca como si fueran las cels de Schwann.



✓ Coating ELISA NF155, CASPR1, CNTN1, NF140

[CASPR1]_i = 0,789 mg/ml

[NF155]_i = 0,20 mg/ml

[CNTN1]_i = 0,25 mg/ml

[NF140]_i = 0,25 mg/ml

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

- CASPR1: 48 pozos [f = 5 ug/ml → 2,5 ml buffer + 15,8 ul
- NF155: 48 pozos [f = 1 ug/ml → 2,5 ml buffer + 12,5 ul
- CNTN1: 48 pozos [f = 1 ug/ml → 2,5 ml buffer + 10 ul
- NF140: 48 pozos [f = 5 ug/ml → 2,5 ml buffer + 50 ul

27/07/2022

Cambiar medio co-cultivos

- D13 → cambiar el medio (poner medio de mielinización nuevo) → cambio 200 ul (la mitad)

Coating células + transfección Culture slides

18 culture slides:

- 12 Perfil
- 4 LRP4
- 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

✓ ELISA NF140, NF155, CASPR1, CNTN1 (screening EM vacunes)

Objetivo: testar las muestras del estudio "*Efficacy and neurological adverse effects of COVID-19 vaccination in patients immunocompromised for multiple sclerosis*"

Muestras: (46 muestras del estudio EM vacunas, Cpos y Cneg)

	NHC	Tiempo	Resultado NF140	Resultado NF155	Resultado CNTN1	Resultado CASPR1
45	1673967	T3	neg	neg	neg	neg
46	1718374	T3	neg	neg	neg	neg
47	1724109	T3	neg	neg	neg	neg
48	1760298	T3	neg	neg	neg	neg
49	1774129	T3	neg	neg	neg	neg
50	1781650	T3	neg	neg	neg	neg
51	1802061	T3	neg	neg	neg	neg
52	1806805	T3	neg	neg	neg	neg
53	1053831	T3	neg	neg	neg	neg
54	1067401	T3	neg	neg	neg	neg

55	1090182	T3	neg	neg	neg	neg
56	1335436	T3	neg	neg	neg	neg
57	1347111	T3	neg	neg	neg	neg
58	1388963	T3	neg	neg	neg	neg
59	1435237	T3	neg	neg	neg	neg
60	1460652	T3	neg	neg	neg	neg
61	1492808	T3	neg	neg	neg	neg
62	1496265	T3	neg	neg	neg	neg
63	1502610	T3	neg	neg	neg	neg
64	1518208	T3	neg	neg	neg	neg
65	1555633	T3	neg	neg	neg	neg
66	157282	T3	neg	neg	neg	Pos
67	1614932	T3	neg	neg	neg	neg
68	1668530	T3	neg	neg	neg	neg
69	1730429	T3	neg	neg	neg	neg
70	1744031	T3	neg	neg	neg	neg
71	1797029	T3	neg	neg	neg	neg
72	1820271	T3	neg	neg	neg	neg
73	229342	T3	Pos débil	neg	neg	Pos débil
74	352797	T3	neg	neg	neg	neg
75	379372	T3	neg	neg	neg	neg
76	47690	T3	neg	neg	neg	neg
77	532468	T3	neg	neg	neg	neg
78	616940	T3	neg	neg	neg	Pos
79	66440	T3	neg	neg	neg	neg
80	837590	T3	neg	neg	neg	neg
81	896114	T3	neg	neg	neg	neg
82	917368	T3	neg	neg	neg	neg

	NHC	Código externo	Tiempo	Box	Posición	Resultado NF140	Resultado NF155	Resultado CNTN1	Resultado CASPR1
83	4717546	VACEM16	T3	SANT PAU T3.1	A2	neg	neg	neg	neg
84	4719830	VACEM11	T3	SANT PAU T3.1	A3	neg	neg	neg	neg
85	70283823	VACEM12	T3	SANT PAU T3.1	A4	neg	neg	neg	neg
86	70628584	VACEM18	T3	SANT PAU T3.1	A5	neg	neg	neg	neg
87	5075132	VACEM7	T3	SANT PAU T3.1	A6	neg	neg	neg	neg
88	238309	VACEM28	T3	SANT PAU T3.1	A7	neg	neg	neg	neg
89	70078519	VACEM14	T3	SANT PAU T3.1	A9	neg	neg	neg	neg
90	720338	VACEM19	T3	SANT PAU T3.1	B1	neg	neg	neg	neg

Protocolo: 4 placas enteras → NF140, NF155, CNTN1, CASPR1

- Bloquear con leche 5% en PBS-tween 0'1% → 200 ul pozo (incubar 1h a temp. ambiente)
- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
- Diluir los **sueros**:
 - Screening: diluir sueros 1/100 en leche 5% en PBS-tween 0'1%
- 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 **H₂SO₄** 25%
- Leer a 450-620 nm

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	Cneg	47	51	55	59	63	67	71	75	79	83	87
B blanc	Cneg	47	51	55	59	63	67	71	75	79	83	87
C prot	Cpos	48	52	56	60	64	68	72	76	80	84	88
D blanc	Cpos	48	52	56	60	64	68	72	76	80	84	88
E prot	45	49	53	57	61	65	69	73	77	81	85	89
F blanc	45	49	53	57	61	65	69	73	77	81	85	89
G prot	46	50	54	58	62	66	70	74	78	82	86	90
H blanc	46	50	54	58	62	66	70	74	78	82	86	90

Resultado:

NF140	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	0,038	0,042	0,041	0,055	0,051	0,036	0,03	0,036	0,039	0,04	0,032	0,034
B blanc	0,087	0,029	0,023	0,034	0,042	0,03	0,022	0,027	0,052	0,087	0,069	0,032
C prot	0,732	0,028	0,031	0,027	0,073	0,029	0,03	0,04	0,136	0,042	0,04	0,048
D blanc	0,031	0,016	0,022	0,018	0,021	0,019	0,027	0,021	0,348	0,035	0,025	0,032
E prot	0,082	0,03	0,037	0,031	0,029	0,032	0,018	0,037	0,025	0,024	0,037	0,029
F blanc	0,058	0,031	0,022	0,056	0,017	0,025	0,028	0,114	0,025	0,026	0,027	0,059
G prot	0,03	0,026	0,054	0,024	0,03	0,025	0,017	0,014	0,016	0,024	0,028	0,019
H blanc	0,039	0,026	0,193	0,03	0,041	0,031	0,014	0,023	0,02	0,023	0,029	0,046

NF155	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	0,083	0,038	0,028	0,046	0,033	0,035	0,021	0,021	0,04	0,047	0,046	0,02
B blanc	0,08	0,023	0,021	0,037	0,034	0,026	0,022	0,017	0,038	0,049	0,049	0,021
C prot	0,859	0,013	0,02	0,017	0,04	0,013	0,021	0,017	0,215	0,026	0,019	0,022
D blanc	0,08	0,013	0,019	0,016	0,017	0,013	0,021	0,014	0,284	0,022	0,018	0,018
E prot	0,058	0,03	0,022	0,039	0,017	0,018	0,027	0,069	0,026	0,025	0,02	0,022
F blanc	0,056	0,032	0,02	0,054	0,012	0,021	0,025	0,094	0,023	0,02	0,017	0,028
G prot	0,035	0,035	0,149	0,037	0,067	0,029	0,019	0,017	0,014	0,02	0,02	0,016
Hblanc	0,039	0,028	0,187	0,031	0,035	0,031	0,014	0,021	0,019	0,016	0,018	0,017

CNTN1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	0,042	0,064	0,06	0,05	0,051	0,052	0,042	0,043	0,045	0,055	0,044	0,044
B blanc	0,09	0,04	0,035	0,043	0,042	0,041	0,042	0,038	0,052	0,068	0,069	0,049
C prot	0,835	0,037	0,034	0,032	0,037	0,034	0,044	0,042	0,235	0,048	0,05	0,042
D blanc	0,106	0,02	0,027	0,026	0,031	0,028	0,039	0,034	0,298	0,047	0,04	0,033
E prot	0,053	0,043	0,04	0,068	0,032	0,038	0,039	0,144	0,043	0,076	0,05	0,04
F blanc	0,056	0,039	0,031	0,068	0,033	0,042	0,048	0,122	0,042	0,043	0,042	0,03
G prot	0,066	0,023	0,208	0,054	0,046	0,043	0,034	0,062	0,037	0,036	0,037	0,03
Hblanc	0,053	0,041	0,182	0,052	0,055	0,049	0,029	0,034	0,03	0,03	0,029	0,062

CASPR1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	0,041	0,037	0,033	0,036	0,045	0,046	0,043	0,063	0,042	0,046	0,042	0,033
B blanc	0,088	0,049	0,059	0,049	0,048	0,047	0,047	0,041	0,058	0,085	0,068	0,032
C prot	0,923	0,04	0,05	0,057	0,036	0,041	0,042	0,042	0,179	0,036	0,031	0,035
D blanc	0,049	0,034	0,045	0,048	0,039	0,036	0,053	0,049	0,398	0,045	0,042	0,032
E prot	0,085	0,046	0,057	0,053	0,046	0,051	0,058	0,074	0,053	0,038	0,058	0,041
F blanc	0,087	0,056	0,045	0,094	0,035	0,044	0,032	0,199	0,044	0,059	0,04	0,04
G prot	0,046	0,042	0,127	0,051	0,087	0,194	0,032	0,041	0,123	0,056	0,038	0,03
Hblanc	0,059	0,046	0,175	0,057	0,067	0,051	0,04	0,048	0,039	0,044	0,042	0,056

28/07/2022

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, bloquear y congelar a -80

29/07/2022

Cambiar medio co-cultivos

- D15 → cambiar el medio (poner medio de mielinización nuevo) → cambio 200 ul (la mitad)

ICC co-cultivos (día 15)

Cojo 5 cubres de los co-cultivos para ir viendo como va la diferenciación.

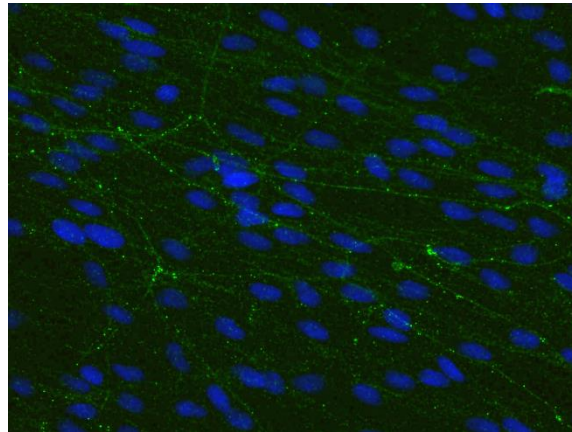
Protocolo: se hace todo en placa de 24 wells

- Fijar 20 min con PFA 4%
- 1 lavado con PBS1x
- Bloquear con Goat serum 5% y 0'3% tritón (en PBS): 1h a RT
- Incubar **1h a RT** con anticuerpos primarios diluídos en Goat serum 5% y 0'3% tritón (en PBS):
 - **NFh y MBP** (los pongo los dos a la vez)
 - anti-Neurofilament H, AB5539 (Merck) **Dil. 1/500** (chicken)
 - anti-Myelin Basic Protein, GTX 11159 (Genetex). Dil. **1/100** (mouse)
 - **MBP:** anti-Myelin Basic Protein, GTX 11159 (Genetex). Dil. **1/100** (mouse)
 - **panNF y NCAM** (los pongo los dos a la vez):
 - anti-panNeurofascin, AF3235 (R&D systems). Dil. **1/500** (chicken)
 - NCAM. Dil. **1/50** (mouse)
 - **S100:** anti-S100, ab52642 (abcam). Dil. **1/100** (rabbit)
 - **NFh y S100** (los pongo los dos a la vez):
 - anti-Neurofilament H, AB5539 (Merck) **Dil. 1/500** (chicken)
 - anti-S100, ab52642 (abcam). Dil. **1/100** (rabbit)
- 3 lavados con PBS1x
- Incubar 1h con Ac. secundarios diluídos en Goat serum 5% y 0'3% tritón (todos a 1/500)
 - NFh y MBP: GAC488 + GAM594
 - MBP: GAM488
 - panNF y NCAM: CAG488 + GAM594
 - S100: GAR488
 - NFh y S100: GAC488 + GAR594
- 3 lavados con PBS1x

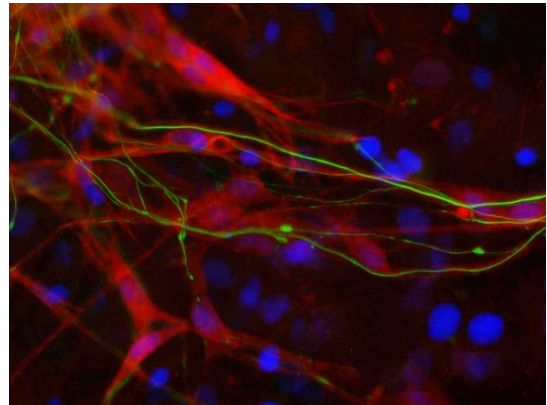
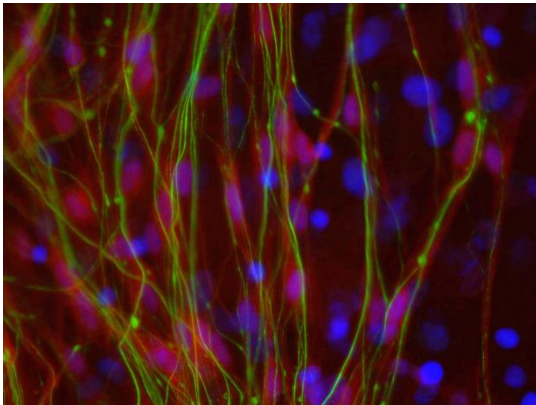
- Montar con DAPI

Resultado:

1. **MBP** no marca nada, **NFh** marca igual que d12
2. **MBP** no marca nada
3. **NCAM** no marca nada, **panNF** igual que d12



4. **S100**: marca igual que el d12
5. **NFh** y **S100**: marca igual que el d12



IHC teasing nervio ciático rata (prueba MBP)

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
- Ac comercial:
 - Izquierda: anti-NF 1/500 (en bloqueo) 1h

- Derecha: anti-MBP 1/100 (en bloqueo) 1h
- Ac secundarios:
 - Izquierda: GAC488 1/500 (en bloqueo) 1h
 - Derecha: GAM488 1/500 (en bloqueo) 1h
- Montar con Fluoromount

Resultado: se ven muy bien los paranodos con anti-NF, pero no se ve nada con MBP → comprar otro anticuerpo anti-MBP!!

01/08/2022

Cambiar medio co-cultivos

- D18 → cambiar el medio (poner medio de mielinización nuevo) → cambio 200 ul (la mitad)

ICC co-cultivos (día 18)

Cojo 4 cubres de los co-cultivos para ir viendo como va la diferenciación.

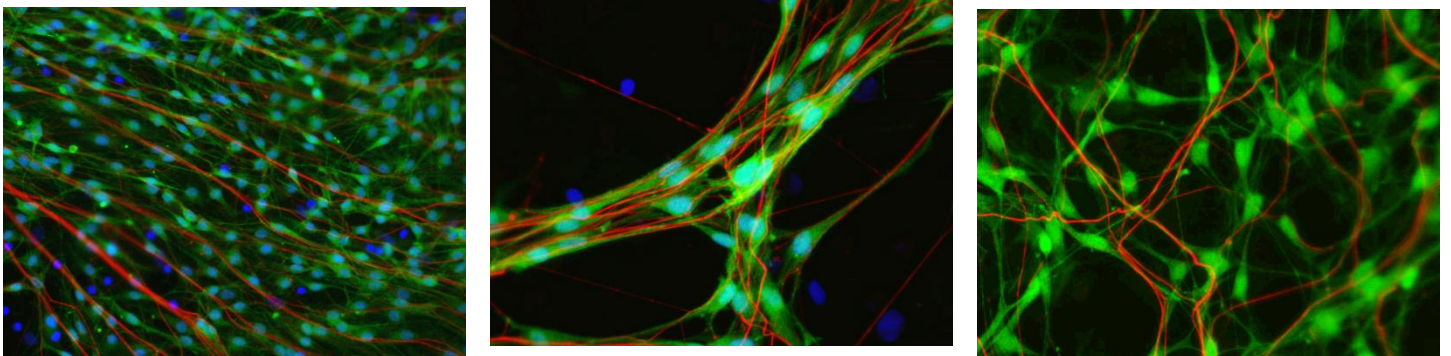
Protocolo: se hace todo en placa de 24 wells

- Fijar 20 min con PFA 4%
- 1 lavado con PBS1x
- Bloquear con Goat serum 5% y 0'3% tritón (en PBS): 1h a RT
- Incubar con anticuerpos primarios diluídos en Goat serum 5% y 0'3% tritón (en PBS):
 - **PLP y NFh**
 - anti-Myelin PLP, ab105784 (abcam). Dil. **1/100** (rabbit) → 2h RT
 - anti-Neurofilament H, AB5539 (Merck) **Dil. 1/500** (chicken) → 1h RT
 - **PLP:** anti-Myelin PLP, ab105784 (abcam). Dil. **1/100** (rabbit) → 2h RT
 - **panNF** : anti-panNeurofascin, AF3235 (R&D systems). Dil. **1/500** (chicken) → 2h RT
 - **S100 y NFh:**
 - anti-S100, ab52642 (abcam). Dil. **1/100** (rabbit) → 2h RT
 - anti-Neurofilament H, AB5539 (Merck) **Dil. 1/500** (chicken) → 1h RT
- 3 lavados con PBS1x
- Incubar 1h con Ac. secundarios diluídos en Goat serum 5% y 0'3% tritón (todos a 1/500) → pongo los NFh con 594 porque el rojo se ve peor en el microscopio
 - PLP y NFh: GAR488 + GAC594
 - PLP: GAR488

- panNF: GAC488
- S100: GAR488 + GAC594
- 3 lavados con PBS1x
- Montar con DAPI

Resultado:

- PLP y NFh: parece que PLP marque un poco las cels Schwann (PLP marca la mielina del SNC, no del SNP!!! Me he equivocado)
- PLP: parece que PLP marque un poco las cels Schwann
- panNF: marca los axones (más que los días anteriores)
- S100 y NFh: se ven las cels de Schwann muy alineadas a los axones (FOTOS)



Coating ELISA NF155, CASPR1, CNTN1, NF140

[CASPR1]_i = 0,789 mg/ml

[NF155]_i = 0,20 mg/ml

[CNTN1]_i = 0,25 mg/ml

[NF140]_i = 0,25 mg/ml

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

- CASPR1: 48 pozos [f = 5 ug/ml → 2,5 ml buffer + 15,8 ul
- NF155: 48 pozos [f = 1 ug/ml → 2,5 ml buffer + 12,5 ul
- CNTN1: 48 pozos [f = 1 ug/ml → 2,5 ml buffer + 10 ul
- NF140: 48 pozos [f = 5 ug/ml → 2,5 ml buffer + 50 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

02/08/2022

ELISA NF140, NF155, CASPR1, CNTN1 (screening EM vacunes)

Objetivo: testar las muestras del estudio "Efficacy and neurological adverse effects of COVID-19 vaccination in patients immunocompromised for multiple sclerosis"

Muestras: (46 muestras del estudio EM vacunas, Cpos y Cneg)

	NHC	Código externo	Tiempo	Box	Posición	Resultado NF140	Resultado NF155	Resultado CNTN1	Resultado CASPR1
91	4711711	VACEM24	T3	SANT PAU T3.1	B2	neg	neg	neg	neg
92	723691	VACEM34	T3	SANT PAU T3.1	B3	neg	neg	Pos	neg
93	4873702	VACEM32	T3	SANT PAU T3.1	B7	neg	neg	neg	neg
94	552403	VACEM21	T3	SANT PAU T3.1	B8	neg	neg	neg	neg
95	70219839	VACEM13	T3	SANT PAU T3.1	C3	neg	neg	neg	neg
96	5190628	VACEM299	T3	SANT PAU T3.1	C4	neg	neg	neg	neg
97	677065	VACEM43	T3	SANT PAU T3.1	C8	neg	neg	neg	neg
98	357152	VACEM53	T3	SANT PAU T3.1	D1	neg	neg	neg	neg
99	21043	VACEM42	T3	SANT PAU T3.1	D4	neg	neg	neg	neg
100	80005335	VACEM36	T3	SANT PAU T3.1	D5	Pos	neg	neg	neg
101	70333876	VACEM39	T3	SANT PAU T3.1	D6	neg	neg	neg	neg
102	4111416	VACEM37	T3	SANT PAU T3.1	D7	neg	neg	neg	neg
103	4027577	VACEM54	T3	SANT PAU T3.1	D8	neg	neg	neg	neg
104	70170685	VACEM40	T3	SANT PAU T3.1	D9	Pos	neg	Pos débil	neg
105	70023763	VACEM1	T3	SANT PAU T3.1	E1	neg	neg	neg	neg
106	306481	VACEM52	T3	SANT PAU T3.1	E3	neg	neg	neg	neg
107	5068000	VACEM33	T3	SANT PAU T3.1	E5	neg	neg	neg	neg
108	70410448	VACEM57	T3	SANT PAU T3.1	E6	neg	neg	neg	neg
109	4628820	VACEM65	T3	SANT PAU T3.1	E9	neg	neg	neg	neg
110	70314943	VACEM10	T3	SANT PAU T3.1	F1	neg	neg	neg	neg
111	4744739	VACEM25	T3	SANT PAU T3.1	F2	neg	neg	neg	neg
112	4189922	VACEM327	T3	SANT PAU T3.1	F3	neg	neg	neg	neg
113	70340291	VACEM61	T3	SANT PAU T3.1	F5	neg	neg	neg	neg
114	70155813	VACEM71	T3	SANT PAU T3.1	F8	neg	neg	neg	neg
115	5358672	VACEM78	T3	SANT PAU T3.1	F9	neg	neg	neg	neg
116	5359092	VACEM63	T3	SANT PAU T3.1	G3	neg	neg	neg	neg
117	545025	VACEM102	T3	SANT PAU T3.1	G5	neg	neg	neg	neg
118	5355578	VACEM49	T3	SANT PAU T3.1	G6	neg	neg	neg	neg
119	694148	VACEM336	T3	SANT PAU T3.1	G7	neg	neg	neg	neg
120	70364021	VACEM46	T3	SANT PAU T3.1	G8	neg	neg	neg	neg
121	70506293	VACEM70	T3	SANT PAU T3.1	G9	neg	neg	neg	neg
122	4550190	VACEM5	T3	SANT PAU T3.1	H2	neg	neg	neg	neg

123	5341820	VACEM41	T3	SANT PAU T3.1	H3	neg	neg	neg	neg
124	4597824	VACEM100	T3	SANT PAU T3.1	H4	neg	neg	neg	neg
125	4090279	VACEM3	T3	SANT PAU T3.1	H5	neg	neg	neg	neg
126	5017966	VACEM67	T3	SANT PAU T3.1	H6	neg	neg	neg	neg
127	4279909	VACEM76	T3	SANT PAU T3.1	H8	neg	neg	neg	neg
128	276746	VACEM136	T3	SANT PAU T3.1	I1	neg	neg	neg	neg

	NHC	Código externo	Tiempo	Box	Posición	Resultado NF140	Resultado NF155	Resultado CNTN1	Resultado CASPR1
129	634826	VACEM68	T3	SANT PAU T3.1	I2	neg	neg	neg	neg
130	608283	VACEM77	T3	SANT PAU T3.1	I4	neg	neg	neg	neg
131	4659257	VACEM134	T3	SANT PAU T3.1	I5	neg	neg	neg	neg
132	4161807	VACEM202	T3	SANT PAU T3.1	I6	neg	neg	neg	neg
133	4094593	VACEM95	T3	SANT PAU T3.1	I7	neg	neg	neg	neg
134	4877075	VACEM87	T3	SANT PAU T3.1	I8	neg	neg	neg	neg
135	324829	VACEM93	T3	SANT PAU T3.1	I9	neg	neg	neg	neg
136	4011252	VACEM82	T3	SANT PAU T3.2	A1	neg	neg	neg	neg

Protocolo: 4 placas enteras → NF140, NF155, CNTN1, CASPR1

- Bloquear con leche 5% en PBS-tween 0'1% → 200 ul pozo (incubar 1h a temp. ambiente)
- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
- Diluir los **sueros**:
 - Screening: diluir sueros 1/100 en leche 5% en PBS-tween 0'1%
- 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 **H₂SO₄** 25%
- Leer a 450-620 nm

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	Cneg	93	97	101	105	109	113	117	121	125	129	133
Bblanc	Cneg	93	97	101	105	109	113	117	121	125	129	133
C prot	Cpos	94	98	102	106	110	114	118	122	126	130	134
Dblanc	Cpos	94	98	102	106	110	114	118	122	126	130	134
E prot	91	95	99	103	107	111	115	119	123	127	131	135
F blanc	91	95	99	103	107	111	115	119	123	127	131	135
G prot	92	96	100	104	108	112	116	120	124	128	132	136
Hblanc	92	96	100	104	108	112	116	120	124	128	132	136

Resultado:

NF140	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	0,134	0,127	0,158	0,124	0,155	0,137	0,166	0,147	0,199	0,255	0,184	0,195
B blanc	0,162	0,11	0,122	0,116	0,152	0,123	0,168	0,142	0,203	0,145	0,171	0,163
C prot	0,688	0,123	0,182	0,143	0,208	0,126	0,144	0,149	0,142	0,15	0,161	0,163
D blanc	0,124	0,121	0,259	0,124	0,242	0,113	0,128	0,137	0,125	0,142	0,157	0,185
E prot	0,113	0,122	0,126	0,163	0,121	0,131	0,127	0,174	0,148	0,147	0,348	0,168
F blanc	0,101	0,096	0,104	0,115	0,101	0,101	0,116	0,191	0,113	0,138	0,191	0,153
G prot	0,179	0,134	0,556	0,762	0,115	0,111	0,138	0,121	0,16	0,132	0,147	0,165
Hblanc	0,112	0,122	0,127	0,147	0,092	0,098	0,133	0,098	0,122	0,121	0,129	0,15

NF155	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	0,154	0,102	0,097	0,078	0,13	0,078	0,117	0,077	0,126	0,102	0,108	0,101
B blanc	0,162	0,108	0,094	0,104	0,124	0,075	0,181	0,097	0,187	0,097	0,161	0,099
C prot	0,863	0,093	0,218	0,193	0,316	0,069	0,15	0,109	0,152	0,177	0,092	0,124
D blanc	0,172	0,096	0,246	0,127	0,205	0,064	0,085	0,109	0,101	0,105	0,088	0,098
E prot	0,169	0,095	0,104	0,106	0,092	0,099	0,095	0,152	0,115	0,114	0,277	0,099
F blanc	0,172	0,115	0,105	0,086	0,112	0,101	0,143	0,158	0,096	0,144	0,17	0,164
G prot	0,197	0,102	0,153	0,126	0,103	0,085	0,136	0,083	0,152	0,171	0,17	0,154
Hblanc	0,187	0,214	0,163	0,139	0,089	0,085	0,106	0,137	0,151	0,132	0,116	0,112

CNTN1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	0,171	0,13	0,151	0,131	0,151	0,132	0,187	0,15	0,264	0,161	0,19	0,185
B blanc	0,159	0,141	0,171	0,154	0,207	0,145	0,19	0,169	0,247	0,143	0,192	0,18
C prot	1,171	0,14	0,305	0,147	0,314	0,159	0,138	0,177	0,174	0,185	0,196	0,203
D blanc	0,211	0,144	0,264	0,159	0,28	0,109	0,132	0,173	0,153	0,177	0,175	0,22
E prot	0,111	0,175	0,147	0,116	0,143	0,143	0,14	0,216	0,149	0,198	0,25	0,184
F blanc	0,223	0,136	0,129	0,12	0,111	0,163	0,14	0,237	0,137	0,155	0,252	0,181
G prot	0,434	0,147	0,211	0,433	0,117	0,134	0,171	0,125	0,177	0,154	0,184	0,178
Hblanc	0,133	0,138	0,286	0,233	0,144	0,186	0,16	0,136	0,168	0,146	0,237	0,204

CASPR1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	0,119	0,093	0,13	0,134	0,159	0,152	0,131	0,082	0,129	0,113	0,129	0,115
B blanc	0,233	0,132	0,142	0,094	0,162	0,192	0,184	0,122	0,176	0,102	0,144	0,127
C prot	0,961	0,133	0,234	0,109	0,169	0,12	0,092	0,146	0,112	0,079	0,102	0,13
D blanc	0,14	0,152	0,309	0,136	0,268	0,088	0,153	0,096	0,129	0,112	0,099	0,148
E prot	0,118	0,194	0,167	0,123	0,167	0,152	0,16	0,1	0,115	0,085	0,105	0,097
F blanc	0,121	0,151	0,182	0,113	0,157	0,087	0,103	0,127	0,094	0,093	0,109	0,077
G prot	0,156	0,209	0,161	0,205	0,105	0,199	0,101	0,081	0,106	0,114	0,111	0,099
Hblanc	0,182	0,135	0,221	0,188	0,192	0,13	0,194	0,126	0,094	0,092	0,17	0,095

02/08/2022

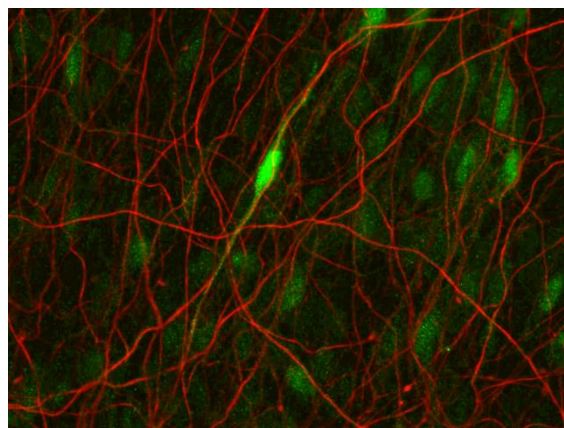
ICC co-cultivos (día 19)

Cojo 1 cubre de los co-cultivos para ir viendo como va la diferenciación.

Protocolo: se hace todo en placa de 24 wells

- Fijar 20 min con PFA 4%
- 1 lavado con PBS1x
- Bloquear con Goat serum 5% y 0'3% tritón (en PBS): 1h a RT
- Incubar con anticuerpos primarios diluídos en Goat serum 5% y 0'3% tritón (en PBS):
 - **PMP2 y NFh:**
 - anti-PMP2, 12717-1-AP (Proteintech). Dil. **1/50** (rabbit) → 2h RT
 - anti-Neurofilament H, AB5539 (Merck) **Dil. 1/500** (chicken) → 1h RT
- 3 lavados con PBS1x
- Incubar 1h con Ac. secundarios diluídos en Goat serum 5% y 0'3% tritón (todos a 1/500) → pongo los NFh con 594 porque el rojo se ve peor en el microscopio
 - PMP2 y NFh: GAR488 + GAC594
- 3 lavados con PBS1x
- Montar con DAPI

Resultado: PMP2 marca parecido a S100 pero menos intensidad (marca el citoplasma de las células de Schwann). Las células de Schwann se siguen viendo bien alineadas con los axones. Buscar un buen marcador de mielina compacta (MBP o MAG) → MBP SMI94 o SMI99 Stenberg (Biolegend).



03/08/2022

Coating células + transfección Culture slides

18 culture slides:

- 14 Perfil
- 2 LRP4
- 2 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

Coating ELISA NF155, CASPR1, CNTN1, NF140

[CASPR1]_i = 0,789 mg/ml

[NF155]_i = 0,20 mg/ml

[CNTN1]_i = 0,25 mg/ml

[NF140]_i = 0,25 mg/ml

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

- CASPR1: 48 pozos [f = 5 ug/ml → 2,5 ml buffer + 15,8 ul
- NF155: 48 pozos [f = 1 ug/ml → 2,5 ml buffer + 12,5 ul
- CNTN1: 48 pozos [f = 1 ug/ml → 2,5 ml buffer + 10 ul
- NF140: 48 pozos [f = 3 ug/ml → 2,5 ml buffer + 30 ul

Cambiar medio co-cultivos

- D20 → cambiar el medio (poner medio de mielinización nuevo) → cambio 200 ul (la mitad)

04/08/2022

ELISA NF140, NF155, CASPR1, CNTN1 (screening EM vacunes)

Objetivo: testar las muestras del estudio "Efficacy and neurological adverse effects of COVID-19 vaccination in patients immunocompromised for multiple sclerosis"

Muestras: (46 muestras del estudio EM vacunas, Cpos y Cneg)

	NHC	Código externo	Tiempo	Box	Posición	Resultado NF140	Resultado NF155	Resultado CNTN1	Resultado CASPR1
137	4822649	VACEM79	T3	SANT PAU T3.2	A5	neg	neg	neg	neg
138	4267257	VACEM56	T3	SANT PAU T3.2	A6	neg	neg	neg	neg
139	4549999	VACEM89	T3	SANT PAU T3.2	A7	neg	neg	neg	neg
140	70412523	VACEM146	T3	SANT PAU T3.2	A8	neg	neg	neg	neg
141	4649631	VACEM75	T3	SANT PAU T3.2	A9	neg	neg	neg	neg
142	70771910	VACEM143	T3	SANT PAU T3.2	B1	neg	neg	neg	neg
143	5266661	VACEM92	T3	SANT PAU T3.2	B4	neg	neg	neg	neg
144	234419	VACEM232	T3	SANT PAU T3.2	B5	neg	neg	neg	neg
145	4664258	VACEM88	T3	SANT PAU T3.2	B6	neg	neg	neg	neg
146	70349200	VACEM128	T3	SANT PAU T3.2	B7	neg	neg	neg	neg
147	70606667	VACEM139	T3	SANT PAU T3.2	B8	neg	neg	neg	neg
148	514190	VACEM44	T3	SANT PAU T3.2	C2	neg	neg	neg	neg
149	378000	VACEM81	T3	SANT PAU T3.2	C3	neg	neg	neg	neg
150	4937694	VACEM62	T3	SANT PAU T3.2	C4	neg	neg	neg	neg
151	4156788	VACEM105	T3	SANT PAU T3.2	C5	neg	neg	neg	neg
152	4763708	VACEM86	T3	SANT PAU T3.2	C6	neg	neg	Pos	neg
153	4116432	VACEM97	T3	SANT PAU T3.2	C7	neg	neg	neg	neg
154	70702764	VACEM259	T3	SANT PAU T3.2	C8	neg	neg	neg	neg
155	522610	VACEM200	T3	SANT PAU T3.2	C9	neg	neg	neg	neg
156	5325458	VACEM98	T3	SANT PAU T3.2	D3	neg	neg	neg	neg
157	5348568	VACEM113	T3	SANT PAU T3.2	D4	neg	neg	neg	neg
158	4225047	VACEM45	T3	SANT PAU T3.2	D5	neg	neg	neg	neg
159	4771037	VACEM236	T3	SANT PAU T3.2	D6	neg	neg	neg	neg
160	5033090	VACEM148	T3	SANT PAU T3.2	D7	neg	neg	neg	neg
161	4428266	VACEM168	T3	SANT PAU T3.2	D8	neg	neg	neg	neg
162	4611072	VACEM101	T3	SANT PAU T3.2	D9	neg	neg	neg	neg
163	4701221	VACEM207	T3	SANT PAU T3.2	E2	neg	neg	neg	neg
164	339710	VACEM172	T3	SANT PAU T3.2	E3	neg	neg	neg	neg
165	697469	VACEM151	T3	SANT PAU T3.2	E4	neg	neg	neg	neg
166	70773727	VACEM23	T3	SANT PAU T3.2	E5	neg	neg	neg	neg
167	4407852	VACEM290	T3	SANT PAU T3.2	E6	neg	neg	neg	neg
168	70064747	VACEM243	T3	SANT PAU T3.2	E7	neg	neg	neg	neg
169	4749578	VACEM116	T3	SANT PAU T3.2	E8	neg	neg	neg	neg
170	57196	VACEM110	T3	SANT PAU T3.2	E9	neg	neg	neg	neg
171	41736	VACEM121	T3	SANT PAU T3.2	F1	neg	neg	neg	neg

172	4638942	VACEM109	T3	SANT PAU T3.2	F2	neg	neg	neg	neg
173	755754	VACEM108	T3	SANT PAU T3.2	F3	neg	neg	neg	neg
174	70587229	VACEM257	T3	SANT PAU T3.2	F4	neg	neg	neg	neg
175	70194568	VACEM171	T3	SANT PAU T3.2	F5	neg	neg	neg	neg
176	70351050	VACEM255	T3	SANT PAU T3.2	F6	neg	neg	neg	neg
177	516107	VACEM176	T3	SANT PAU T3.2	F7	neg	neg	neg	neg
178	4745261	VACEM122	T3	SANT PAU T3.2	F8	neg	neg	neg	neg
179	70054333	VACEM115	T3	SANT PAU T3.2	F9	neg	Pos	neg	neg
180	533427	VACEM157	T3	SANT PAU T3.2	G1	neg	neg	neg	neg
181	4902778	VACEM149	T3	SANT PAU T3.2	G2	neg	neg	neg	neg
182	70754248	VACEM131	T3	SANT PAU T3.2	G3	neg	neg	neg	neg

Protocolo: 4 placas enteras → NF140, NF155, CNTN1, CASPR1

- Bloquear con leche 5% en PBS-tween 0'1% → 200 ul pozo (incubar 1h a temp. ambiente)
- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
- Diluir los **sueros**:
 - Screening: diluir sueros 1/100 en leche 5% en PBS-tween 0'1%
- 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 **H₂SO₄** 25%
- Leer a 450-620 nm

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	Cneg	139	143	147	151	155	159	163	167	171	175	179
Bblanc	Cneg	139	143	147	151	155	159	163	167	171	175	179
C prot	Cpos	140	144	148	152	156	160	164	168	172	176	180
Dblanc	Cpos	140	144	148	152	156	160	164	168	172	176	180
E prot	137	141	145	149	153	157	161	165	169	173	177	181
F blanc	137	141	145	149	153	157	161	165	169	173	177	181
G prot	138	142	146	150	154	158	162	166	170	174	178	182
Hblanc	138	142	146	150	154	158	162	166	170	174	178	182

Resultado:

NF140	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	0,034	0,032	0,035	0,02	0,05	0,023	0,013	0,02	0,017	0,023	0,018	0,046
B blanc	0,05	0,032	0,045	0,021	0,043	0,031	0,024	0,028	0,019	0,017	0,015	0,052
C prot	0,37	0,023	0,016	0,017	0,026	0,019	0,061	0,014	0,02	0,012	0,016	0,012
D blanc	0,049	0,051	0,017	0,021	0,03	0,025	0,139	0,02	0,026	0,012	0,017	0,015
E prot	0,03	0,029	0,021	0,034	0,027	0,018	0,039	0,019	0,027	0,021	0,015	0,018
F blanc	0,037	0,035	0,028	0,041	0,063	0,018	0,036	0,024	0,048	0,027	0,016	0,025
G prot	0,052	0,039	0,04	0,075	0,014	0,014	0,049	0,05	0,024	0,022	0,024	0,011
Hblanc	0,058	0,035	0,06	0,13	0,015	0,015	0,051	0,122	0,019	0,036	0,018	0,019

NF155	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	0,074	0,054	0,073	0,032	0,066	0,052	0,036	0,049	0,029	0,033	0,029	0,412
B blanc	0,059	0,048	0,1	0,027	0,058	0,049	0,035	0,046	0,031	0,03	0,024	0,089
C prot	0,664	0,039	0,017	0,022	0,047	0,037	0,212	0,035	0,043	0,021	0,03	0,021
D blanc	0,097	0,036	0,017	0,021	0,048	0,038	0,235	0,034	0,044	0,022	0,027	0,02
E prot	0,062	0,041	0,029	0,053	0,083	0,028	0,067	0,039	0,099	0,035	0,024	0,039
F blanc	0,04	0,047	0,034	0,052	0,088	0,026	0,063	0,039	0,065	0,034	0,023	0,042
G prot	0,063	0,039	0,075	0,137	0,023	0,019	0,096	0,136	0,024	0,042	0,045	0,021
Hblanc	0,103	0,045	0,085	0,157	0,024	0,022	0,083	0,109	0,026	0,054	0,029	0,03

CNTN1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	0,083	0,054	0,086	0,041	0,063	0,06	0,043	0,049	0,045	0,054	0,055	0,119
B blanc	0,054	0,05	0,075	0,037	0,058	0,047	0,037	0,045	0,026	0,031	0,021	0,107
C prot	1,058	0,047	0,035	0,033	0,102	0,039	0,223	0,035	0,044	0,023	0,032	0,028
D blanc	0,123	0,042	0,025	0,024	0,048	0,036	0,237	0,029	0,037	0,017	0,024	0,019
E prot	0,048	0,047	0,05	0,059	0,096	0,029	0,043	0,033	0,045	0,031	0,028	0,037
F blanc	0,052	0,056	0,043	0,059	0,101	0,024	0,055	0,032	0,066	0,032	0,02	0,036
G prot	0,081	0,052	0,065	0,116	0,022	0,026	0,02	0,025	0,014	0,027	0,014	0,021
Hblanc	0,119	0,065	0,103	0,177	0,025	0,023	0,085	0,102	0,028	0,055	0,03	0,032

CASPR1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	0,043	0,045	0,04	0,019	0,032	0,034	0,018	0,023	0,017	0,024	0,02	0,073
B blanc	0,059	0,032	0,053	0,022	0,053	0,044	0,032	0,039	0,023	0,023	0,021	0,084
C prot	0,809	0,023	0,011	0,013	0,038	0,02	0,165	0,015	0,078	0,017	0,023	0,018
D blanc	0,061	0,028	0,014	0,016	0,043	0,034	0,22	0,027	0,03	0,014	0,022	0,015
E prot	0,038	0,022	0,016	0,032	0,035	0,015	0,029	0,017	0,029	0,019	0,017	0,019
F blanc	0,052	0,037	0,028	0,045	0,09	0,02	0,046	0,03	0,054	0,023	0,018	0,028
G prot	0,047	0,063	0,055	0,109	0,017	0,02	0,081	0,104	0,016	0,026	0,021	0,014
Hblanc	0,071	0,046	0,075	0,157	0,018	0,02	0,079	0,099	0,021	0,043	0,022	0,028

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, bloquear y congelar a -80

Coating ELISA NF155, CASPR1, CNTN1, NF140

[CASPR1]_i = 0,789 mg/ml

[NF155]_i = 0,20 mg/ml

[CNTN1]_i = 0,25 mg/ml

[NF140]_i = 0,25 mg/ml

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

- CASPR1: 48 pozos [f = 5 ug/ml → 2,5 ml buffer + 15,8 ul
- NF155: 48 pozos [f = 1 ug/ml → 2,5 ml buffer + 12,5 ul
- CNTN1: 48 pozos [f = 1 ug/ml → 2,5 ml buffer + 10 ul
- NF140: 48 pozos [f = 3 ug/ml → 2,5 ml buffer + 30 ul

05/08/2022

ELISA NF140, NF155, CASPR1, CNTN1 (screening EM vacunes)

Objetivo: testar las muestras del estudio "*Efficacy and neurological adverse effects of COVID-19 vaccination in patients immunocompromised for multiple sclerosis*"

Muestras: (46 muestras del estudio EM vacunas, Cpos y Cneg)

	NHC	Código externo	Tiempo	Box	Posición	Resultado NF140	Resultado NF155	Resultado CNTN1	Resultado CASPR1
183	4244213	VACEM269	T3	SANT PAU T3.2	G5	neg	neg	neg	neg
184	4238241	VACEM179	T3	SANT PAU T3.2	G6	neg	neg	neg	neg
185	70762455	VACEM262	T3	SANT PAU T3.2	G7	neg	neg	neg	neg
186	5186862	VACEM175	T3	SANT PAU T3.2	G9	neg	neg	neg	neg
187	4583291	VACEM386	T3	SANT PAU T3.2	H3	neg	neg	neg	neg
188	4032597	VACEM194	T3	SANT PAU T3.2	H4	neg	neg	neg	neg
189	5334494	VACEM118	T3	SANT PAU T3.2	H5	neg	neg	neg	neg
190	70418425	VACEM133	T3	SANT PAU T3.2	H6	neg	neg	neg	neg
191	673507	VACEM117	T3	SANT PAU T3.2	H7	neg	neg	neg	neg

192	70170773	VACEM124	T3	SANT PAU T3.2	H8	neg	neg	neg	neg
193	5266464	VACEM72	T3	SANT PAU T3.2	H9	neg	neg	neg	neg
194	70603072	VACEM125	T3	SANT PAU T3.2	I2	neg	neg	neg	neg
195	5181997	VACEM162	T3	SANT PAU T3.2	I3	neg	neg	neg	neg
196	70668292	VACEM166	T3	SANT PAU T3.2	I4	neg	neg	neg	neg
197	5340056	VACEM244	T3	SANT PAU T3.2	I5	neg	neg	neg	neg
198	4566175	VACEM245	T3	SANT PAU T3.2	I6	neg	neg	neg	neg
199	5193888	VACEM123	T3	SANT PAU T3.2	I7	neg	neg	neg	neg
200	4378227	VACEM119	T3	SANT PAU T3.2	I8	neg	neg	neg	neg
201	754709	VACEM268	T3	SANT PAU T3.2	I9	neg	Pos	Pos	neg
202	4256262	VACEM295	T3	SANT PAU T3.3	A1	neg	Pos	neg	neg
203	4839043	VACEM127	T3	SANT PAU T3.3	A4	neg	neg	neg	neg
204	559910	VACEM154	T3	SANT PAU T3.3	A5	neg	neg	neg	neg
205	4204483	VACEM144	T3	SANT PAU T3.3	A6	neg	Pos	neg	neg
206	5160187	VACEM208	T3	SANT PAU T3.3	A7	neg	neg	neg	neg
207	5044644	VACEM147	T3	SANT PAU T3.3	A8	neg	neg	neg	neg
208	70535237	VACEM141	T3	SANT PAU T3.3	A9	neg	neg	neg	neg
209	4020874	VACEM132	T3	SANT PAU T3.3	B1	neg	neg	neg	neg
210	70141058	VACEM126	T3	SANT PAU T3.3	B2	neg	neg	neg	neg
211	5146303	VACEM303	T3	SANT PAU T3.3	B3	neg	neg	neg	neg
212	5299814	VACEM142	T3	SANT PAU T3.3	B4	neg	neg	neg	neg
213	5005391	VACEM96	T3	SANT PAU T3.3	B5	neg	neg	neg	neg
214	70172754	VACEM183	T3	SANT PAU T3.3	B7	neg	neg	neg	neg
215	80076635	VACEM145	T3	SANT PAU T3.3	B8	neg	neg	neg	neg
216	4724310	VACEM258	T3	SANT PAU T3.3	C1	neg	neg	neg	neg
217	134920	VACEM174	T3	SANT PAU T3.3	C2	neg	neg	neg	neg
218	70756276	VACEM152	T3	SANT PAU T3.3	C3	neg	neg	neg	neg
219	4066797	VACEM114	T3	SANT PAU T3.3	C4	neg	neg	neg	neg
220	4543415	VACEM137	T3	SANT PAU T3.3	C5	neg	neg	neg	neg
221	544743	VACEM135	T3	SANT PAU T3.3	C7	neg	neg	neg	neg
222	4363628	VACEM242	T3	SANT PAU T3.3	C8	neg	neg	neg	neg
223	524026	VACEM156	T3	SANT PAU T3.3	C9	neg	neg	neg	neg
224	4967121	VACEM161	T3	SANT PAU T3.3	D3	neg	neg	neg	neg
225	70338543	VACEM158	T3	SANT PAU T3.3	D4	neg	neg	neg	neg
226	4714402	VACEM140	T3	SANT PAU T3.3	D5	neg	neg	neg	neg
227	70561462	VACEM185	T3	SANT PAU T3.3	D6	neg	neg	neg	neg
228	70736855	VACEM83	T3	SANT PAU T3.3	D8	neg	neg	neg	neg

Protocolo: 4 placas enteras → NF140, NF155, CNTN1, CASPR1

- Bloquear con leche 5% en PBS-tween 0'1% → 200 ul pozo (incubar 1h a temp. ambiente)
- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%

- Diluir los **sueros**:
 - **Screening**: diluir sueros 1/100 en leche 5% en PBS-tween 0'1%
- 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 **H₂SO₄** 25%
- Leer a 450-570 nm

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	Cneg	185	189	193	197	201	205	209	213	217	221	225
B blanc	Cneg	185	189	193	197	201	205	209	213	217	221	225
C prot	Cpos	186	190	194	198	202	206	210	214	218	222	226
D blanc	Cpos	186	190	194	198	202	206	210	214	218	222	226
E prot	183	187	191	195	199	203	207	211	215	219	223	227
F blanc	183	187	191	195	199	203	207	211	215	219	223	227
G prot	184	188	192	196	200	204	208	212	216	220	224	228
H blanc	184	188	192	196	200	204	208	212	216	220	224	228

Resultado:

NF140	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	0,027	0,021	0,049	0,04	0,023	0,031	0,025	0,033	0,025	0,029	0,037	0,034
B blanc	0,051	0,025	0,039	0,06	0,027	0,042	0,025	0,059	0,034	0,029	0,036	0,035
C prot	0,689	0,031	0,028	0,032	0,028	0,035	0,025	0,02	0,042	0,024	0,036	0,043
D blanc	0,048	0,029	0,037	0,031	0,028	0,029	0,034	0,031	0,054	0,028	0,03	0,062
E prot	0,041	0,033	0,029	0,038	0,055	0,041	0,032	0,019	0,031	0,026	0,027	0,04
F blanc	0,036	0,038	0,038	0,036	0,049	0,028	0,027	0,022	0,026	0,031	0,029	0,037
G prot	0,041	0,048	0,033	0,049	0,035	0,027	0,037	0,021	0,055	0,03	0,051	0,028
H blanc	0,03	0,02	0,035	0,032	0,042	0,039	0,032	0,025	0,276	0,025	0,061	0,032

NF155	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	0,061	0,052	0,055	0,072	0,039	0,194	0,142	0,047	0,038	0,035	0,046	0,037
B blanc	0,053	0,039	0,039	0,077	0,039	0,041	0,032	0,051	0,04	0,027	0,031	0,038
C prot	0,83	0,029	0,029	0,036	0,039	0,109	0,034	0,033	0,088	0,032	0,032	0,066
D blanc	0,045	0,025	0,028	0,029	0,035	0,033	0,037	0,035	0,058	0,026	0,026	0,057
E prot	0,026	0,037	0,051	0,034	0,07	0,028	0,037	0,029	0,028	0,035	0,037	0,055
F blanc	0,024	0,034	0,038	0,032	0,048	0,024	0,028	0,026	0,034	0,032	0,033	0,04
G prot	0,024	0,02	0,034	0,049	0,039	0,031	0,027	0,028	0,034	0,026	0,099	0,025
H blanc	0,03	0,02	0,032	0,033	0,029	0,032	0,038	0,061	0,034	0,025	0,094	0,032

CNTN1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	0,063	0,059	0,049	0,063	0,045	0,147	0,048	0,07	0,045	0,05	0,048	0,042
B blanc	0,062	0,037	0,043	0,054	0,039	0,038	0,037	0,048	0,035	0,037	0,031	0,032
C prot	0,898	0,046	0,056	0,05	0,043	0,042	0,048	0,041	0,07	0,04	0,031	0,068
D blanc	0,074	0,035	0,032	0,034	0,043	0,03	0,051	0,041	0,046	0,036	0,034	0,06
E prot	0,05	0,058	0,05	0,034	0,067	0,056	0,032	0,041	0,034	0,042	0,042	0,032
F blanc	0,04	0,046	0,053	0,035	0,047	0,038	0,034	0,031	0,042	0,022	0,038	0,034
G prot	0,041	0,038	0,038	0,04	0,049	0,047	0,036	0,046	0,068	0,044	0,106	0,05
Hblanc	0,046	0,037	0,041	0,029	0,031	0,035	0,029	0,044	0,221	0,029	0,166	0,024

CASPR1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	0,044	0,03	0,036	0,034	0,032	0,063	0,034	0,045	0,036	0,026	0,024	0,029
B blanc	0,061	0,065	0,055	0,061	0,035	0,068	0,039	0,052	0,028	0,026	0,024	0,034
C prot	0,888	0,03	0,021	0,022	0,043	0,032	0,027	0,05	0,055	0,027	0,044	0,052
D blanc	0,033	0,035	0,05	0,026	0,035	0,024	0,028	0,042	0,059	0,029	0,03	0,051
E prot	0,021	0,027	0,036	0,026	0,037	0,032	0,033	0,043	0,048	0,026	0,028	0,028
F blanc	0,026	0,042	0,033	0,036	0,044	0,03	0,028	0,04	0,046	0,033	0,035	0,024
G prot	0,031	0,018	0,027	0,029	0,03	0,035	0,046	0,049	0,063	0,021	0,056	0,031
Hblanc	0,036	0,022	0,036	0,027	0,029	0,037	0,038	0,037	0,052	0,027	0,089	0,022

Cambiar medio co-cultivos

- D22 → cambiar el medio (poner medio de mielinización nuevo) → cambio 200 ul (la mitad)

Guardar cubres co-cultivos (día 22)

Cojo 2 cubre de los co-cultivos y los congelo a -80°C para poder hacer las ICC posteriormente (cuando nos llegue el MBP, marcador de mielina compacta)

Protocolo: en placa de 24w

- Fijar 20 min con PFA 4%
- 1 lavado con PBS1x
- Quitar el PBS1x y congelar a -80C

08/08/2022

Coating ELISA NF155, CASPR1, CNTN1, NF140

[CASPR1]_i = 0,789 mg/ml

[NF155]_i = 0,20 mg/ml

[CNTN1]_i = 0,25 mg/ml

[NF140]_i = 0,25 mg/ml

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

- CASPR1: 48 pozos [f = 5 ug/ml → 2,5 ml buffer + 15,8 ul
- NF155: 48 pozos [f = 1 ug/ml → 2,5 ml buffer + 12,5 ul
- CNTN1: 48 pozos [f = 1 ug/ml → 2,5 ml buffer + 10 ul
- NF140: 48 pozos [f = 3 ug/ml → 2,5 ml buffer + 30 ul

Cambiar medio co-cultivos

- D25 → cambiar el medio (poner medio de mielinización nuevo) → cambio 200 ul (la mitad)

Guardar cubres co-cultivos (día 25)

Cojo 2 cubres de los co-cultivos y los congelo a -80°C para poder hacer las ICC posteriormente (cuando nos llegue el MBP, marcador de mielina compacta)

Protocolo: en placa de 24w

- Fijar 20 min con PFA 4%
- 1 lavado con PBS1x
- Quitar el PBS1x y congelar a -80C

09/08/2022

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 **10 placas** (3 columnas de cada gangliósido/placa):

- GM1: 30 ml metanol + 60 ul GM1 reconstituído
- GD1b: 30 ml metanol + 60 ul GD1b reconstituído
- GQ1b: 30 ml metanol + **120 ul GQ1b** reconstituído (en todos los ELISAs anteriores de EM se pusieron sólo 60 ul...)
- 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

ELISA NF140, NF155, CASPR1, CNTN1 (screening EM vacunes)

Objetivo: testar las muestras del estudio "*Efficacy and neurological adverse effects of COVID-19 vaccination in patients immunocompromised for multiple sclerosis*"

Muestras: (46 muestras del estudio EM vacunas, Cpos y Cneg)

	NHC	Código externo	Tiempo	Box	Posición	Resultado NF140	Resultado NF155	Resultado CNTN1	Resultado CASPR1
229	93431	VACEM301	T3	SANT PAU T3.3	D9	neg	neg	neg	neg
230	727731	VACEM246	T3	SANT PAU T3.3	E1	neg	neg	neg	neg
231	5235005	VACEM111	T3	SANT PAU T3.3	E2	neg	Pos	neg	neg
232	432713	VACEM184	T3	SANT PAU T3.3	E3	neg	neg	neg	neg

233	70710228	VACEM120	T3	SANT PAU T3.3	E4	neg	neg	neg	neg
234	4600518	VACEM249	T3	SANT PAU T3.3	E6	neg	neg	neg	neg
235	4693082	VACEM254	T3	SANT PAU T3.3	E7	neg	neg	neg	neg
236	4103514	VACEM164	T3	SANT PAU T3.3	E8	neg	neg	neg	neg
237	80007890	VACEM309	T3	SANT PAU T3.3	E9	neg	neg	neg	neg
238	4176795	VACEM312	T3	SANT PAU T3.3	F1	neg	neg	neg	neg
239	4046869	VACEM256	T3	SANT PAU T3.3	F2	neg	neg	neg	neg
240	142063	VACEM160	T3	SANT PAU T3.3	F3	neg	neg	neg	neg
241	5226408	VACEM267	T3	SANT PAU T3.3	F4	neg	neg	neg	neg
242	4162376	VACEM261	T3	SANT PAU T3.3	F5	neg	neg	neg	neg
243	4728354	VACEM308	T3	SANT PAU T3.3	F6	neg	neg	neg	neg
244	4300736	VACEM196	T3	SANT PAU T3.3	F7	neg	neg	neg	neg
245	70569934	VACEM74	T3	SANT PAU T3.3	F8	neg	neg	neg	neg
246	4843115	VACEM227	T3	SANT PAU T3.3	F9	neg	neg	neg	neg
247	5295710	VACEM276	T3	SANT PAU T3.3	G1	neg	neg	neg	neg
248	363940	VACEM173	T3	SANT PAU T3.3	G2	neg	neg	neg	neg
249	70232395	VACEM182	T3	SANT PAU T3.3	G3	neg	neg	neg	neg
250	4403395	VACEM178	T3	SANT PAU T3.3	G4	neg	neg	neg	neg
251	129965	VACEM289	T3	SANT PAU T3.3	G5	neg	neg	neg	neg
252	305023	VACEM180	T3	SANT PAU T3.3	G7	neg	neg	neg	neg
253	4545412	VACEM193	T3	SANT PAU T3.3	G8	neg	neg	neg	neg
254	5144785	VACEM197	T3	SANT PAU T3.3	H1	neg	neg	neg	neg
255	4576893	VACEM311	T3	SANT PAU T3.3	H3	neg	Pos débil	neg	neg
256	5049693	VACEM73	T3	SANT PAU T3.3	H4	neg	neg	neg	neg
257	5309757	VACEM253	T3	SANT PAU T3.3	H5	neg	neg	neg	neg
258	39683	VACEM4	T3	SANT PAU T3.3	H6	neg	neg	neg	neg
259	26333	VACEM58	T3	SANT PAU T3.3	H7	neg	neg	neg	neg
260	70674835	VACEM186	T3	SANT PAU T3.3	H8	neg	neg	neg	neg
261	5212109	VACEM248	T3	SANT PAU T3.3	H9	neg	neg	neg	neg
262	4159437	VACEM273	T3	SANT PAU T3.3	I1	neg	neg	neg	neg
263	4983277	VACEM198	T3	SANT PAU T3.3	I2	Pos	Pos	neg	neg
264	80007891	VACEM328	T3	SANT PAU T3.3	I3	neg	neg	neg	neg
265	4171007	VACEM163	T3	SANT PAU T3.3	I4	neg	neg	neg	neg
266	4885643	VACEM334	T3	SANT PAU T3.3	I5	neg	neg	neg	neg
267	5029209	VACEM337	T3	SANT PAU T3.3	I6	neg	neg	neg	neg
268	70392394	VACEM190	T3	SANT PAU T3.3	I7	neg	neg	neg	neg
269	5322359	VACEM212	T3	SANT PAU T3.3	I8	neg	neg	neg	neg
270	4015187	VACEM103	T3	SANT PAU T3.3	I9	neg	neg	neg	neg
271	5173623	VACEM64	T3	SANT PAU T3.4	A1	neg	neg	neg	neg
272	5400091	VACEM367	T3	SANT PAU T3.4	A2	neg	neg	neg	neg
273	4920747	VACEM195	T3	SANT PAU T3.4	A3	neg	neg	neg	neg
274	4708504	VACEM263	T3	SANT PAU T3.4	A4	neg	neg	neg	neg

Protocolo: 4 placas enteras → NF140, NF155, CNTN1, CASPR1

- Bloquear con leche 5% en PBS-tween 0'1% → 200 ul pozo (incubar 1h a temp. ambiente)
- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
- Diluir los **sueros**:
 - Screening: diluir sueros 1/100 en leche 5% en PBS-tween 0'1%
- 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 **H₂SO₄** 25%
- Leer a 450-570 nm

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	Cneg	231	235	239	243	247	251	255	259	263	267	271
Bblanc	Cneg	231	235	239	243	247	251	255	259	263	267	271
C prot	Cpos	232	236	240	244	248	252	256	260	264	268	272
Dblanc	Cpos	232	236	240	244	248	252	256	260	264	268	272
E prot	229	233	237	241	245	249	253	257	261	265	269	273
F blanc	229	233	237	241	245	249	253	257	261	265	269	273
G prot	230	234	238	242	246	250	254	258	262	266	270	274
Hblanc	230	234	238	242	246	250	254	258	262	266	270	274

Resultado:

NF140	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	0,03	0,029	0,038	0,023	0,033	0,025	0,029	0,03	0,034	0,345	0,032	0,035
B blanc	0,069	0,029	0,03	0,023	0,022	0,028	0,03	0,035	0,04	0,065	0,032	0,042
C prot	0,542	0,034	0,031	0,026	0,04	0,021	0,027	0,028	0,056	0,058	0,042	0,052
D blanc	0,042	0,03	0,044	0,027	0,039	0,028	0,03	0,028	0,047	0,038	0,055	0,047
E prot	0,041	0,029	0,031	0,025	0,029	0,027	0,034	0,048	0,032	0,025	0,078	0,043
F blanc	0,041	0,036	0,03	0,034	0,03	0,025	0,046	0,045	0,032	0,03	0,038	0,036
G prot	0,038	0,031	0,03	0,049	0,044	0,029	0,036	0,041	0,03	0,035	0,042	0,038
Hblanc	0,055	0,03	0,044	0,034	0,037	0,044	0,043	0,048	0,036	0,034	0,078	0,033

NF155	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	0,07	0,27	0,043	0,04	0,037	0,033	0,033	0,135	0,028	0,311	0,029	0,037
B blanc	0,075	0,035	0,04	0,026	0,025	0,036	0,034	0,034	0,029	0,058	0,029	0,044
C prot	0,974	0,045	0,047	0,058	0,037	0,031	0,032	0,03	0,047	0,042	0,092	0,059
D blanc	0,046	0,035	0,042	0,049	0,056	0,028	0,036	0,028	0,035	0,038	0,054	0,042
E prot	0,036	0,04	0,095	0,045	0,036	0,033	0,046	0,064	0,034	0,027	0,087	0,044
F blanc	0,041	0,027	0,023	0,035	0,036	0,028	0,052	0,042	0,037	0,035	0,034	0,035
G prot	0,022	0,023	0,034	0,044	0,095	0,047	0,023	0,021	0,035	0,036	0,028	0,037
Hblanc	0,035	0,029	0,043	0,043	0,076	0,049	0,032	0,038	0,033	0,04	0,057	0,03

CNTN1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	0,043	0,029	0,038	0,027	0,028	0,034	0,032	0,031	0,027	0,048	0,028	0,033
B blanc	0,052	0,027	0,032	0,018	0,019	0,02	0,033	0,03	0,025	0,063	0,024	0,031
C prot	0,906	0,031	0,041	0,035	0,037	0,032	0,03	0,03	0,054	0,037	0,057	0,032
D blanc	0,071	0,025	0,033	0,021	0,029	0,023	0,026	0,025	0,031	0,023	0,042	0,032
E prot	0,027	0,026	0,029	0,03	0,03	0,033	0,04	0,032	0,03	0,027	0,045	0,031
F blanc	0,031	0,02	0,02	0,021	0,025	0,021	0,042	0,035	0,023	0,017	0,025	0,024
G prot	0,018	0,018	0,019	0,026	0,033	0,023	0,018	0,019	0,036	0,016	0,029	0,018
Hblanc	0,028	0,02	0,032	0,025	0,028	0,033	0,022	0,029	0,023	0,023	0,035	0,02

CASPR1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	0,04	0,023	0,026	0,028	0,019	0,022	0,022	0,022	0,018	0,041	0,017	0,017
B blanc	0,087	0,027	0,025	0,018	0,019	0,027	0,024	0,023	0,017	0,031	0,018	0,045
C prot	0,66	0,027	0,027	0,016	0,034	0,02	0,02	0,016	0,021	0,022	0,024	0,022
D blanc	0,037	0,021	0,028	0,021	0,029	0,032	0,023	0,019	0,021	0,017	0,035	0,02
E prot	0,033	0,019	0,02	0,019	0,022	0,019	0,03	0,023	0,019	0,016	0,026	0,017
F blanc	0,031	0,021	0,018	0,02	0,025	0,018	0,039	0,028	0,018	0,018	0,022	0,017
G prot	0,024	0,021	0,026	0,023	0,03	0,024	0,021	0,019	0,019	0,018	0,025	0,017
Hblanc	0,03	0,022	0,03	0,025	0,026	0,031	0,019	0,025	0,019	0,023	0,033	0,02

10/08/2022

ELISA Gangliósidos día 1

Objetivo: testar las muestras del estudio "Efficacy and neurological adverse effects of COVID-19 vaccination in patients immunocompromised for multiple sclerosis"

Muestras: (29 muestras del estudio EM vacunas – IgG e IgM)

			Resultado GM1	Resultado GD1b	Resultado GQ1b
1	98722	T3	neg	neg	neg
2	111955	T3	neg	neg	neg
3	147303	T3	neg	neg	neg

4	190943	T3	neg	neg	neg
5	219804	T3	neg	neg	neg
6	266178	T3	neg	neg	neg
7	304320	T3	neg	neg	neg
8	344185	T3	neg	neg	neg
9	422044	T3	neg	neg	neg
10	461265	T3	neg	neg	neg
11	472720	T3	neg	neg	neg
12	493713	T3	neg	neg	neg
13	505343	T3	neg	neg	neg
14	591615	T3	neg	neg	neg
15	597217	T3	neg	neg	neg
16	631193	T3	neg	neg	neg
17	814329	T3	neg	neg	neg
18	901936	T3	neg	neg	neg
19	927164	T3	neg	neg	neg
20	950931	T3	neg	neg	neg
21	1004410	T3	neg	neg	neg
22	1021881	T3	neg	neg	neg
23	1063758	T3	neg	neg	neg
24	1097811	T3	neg	neg	neg
25	1113212	T3	neg	neg	neg
26	1115327	T3	neg	neg	neg
27	1122921	T3	neg	neg	neg
28	1124890	T3	neg	neg	neg
29	1153091	T3	neg	neg	neg

Protocolo:

- Descongelar placas con gangliósidos (preparadas día 09/08/22)
- **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.
- Poner 100 ul de suero a cada pozo, incubar toda la noche a 4°C

PLACA 1	1 blanco	2 GM1	3 GD1b	4 GQ1b	5 blanco	6 GM1	7 GD1b	8 GQ1b	9 blanco	10 GM1	11 GD1b	12 GQ1b
A 1/100	1. 98722 T3			2. 111955 T3			3. 147303 T3					
B 1/500	4. 190943 T3			5. 219804 T3			6. 266178 T3					
C 1/100	1. 98722 T3			2. 111955 T3			3. 147303 T3					
D 1/500	4. 190943 T3			5. 219804 T3			6. 266178 T3					
E 1/100	1. 98722 T3			2. 111955 T3			3. 147303 T3					
F 1/500	4. 190943 T3			5. 219804 T3			6. 266178 T3					
G 1/100	1. 98722 T3			2. 111955 T3			3. 147303 T3					
H 1/500	4. 190943 T3			5. 219804 T3			6. 266178 T3					

PLACA 2	1 blanco	2 GM1	3 GD1b	4 GQ1b	5 blanco	6 GM1	7 GD1b	8 GQ1b	9 blanco	10 GM1	11 GD1b	12 GQ1b
A 1/100	7. 304320 T3				8. 344185 T3				9. 422044 T3			
B 1/500												
C 1/100	10. 461265 T3				11. 472720 T3				12. 493713 T3			
D 1/500												
E 1/100	7. 304320 T3				8. 344185 T3				9. 422044 T3			
F 1/500												
G 1/100	10. 461265 T3				11. 472720 T3				12. 493713 T3			
H 1/500												

PLACA 3	1 blanco	2 GM1	3 GD1b	4 GQ1b	5 blanco	6 GM1	7 GD1b	8 GQ1b	9 blanco	10 GM1	11 GD1b	12 GQ1b
A 1/100	13. 505343 T3				14. 591615 T3				15. 5927217 T3			
B 1/500												
C 1/100	16. 631193 T3				17. 814329 T3				18. 901936 T3			
D 1/500												
E 1/100	13. 505343 T3				14. 591615 T3				15. 5927217 T3			
F 1/500												
G 1/100	16. 631193 T3				17. 814329 T3				18. 901936 T3			
H 1/500												

PLACA 4	1 blanco	2 GM1	3 GD1b	4 GQ1b	5 blanco	6 GM1	7 GD1b	8 GQ1b	9 blanco	10 GM1	11 GD1b	12 GQ1b
A 1/100	19. 927164 T3				20. 950931 T3				21. 1004410 T3			
B 1/500												
C 1/100	22. 1021881 T3				23. 1063758 T3				24. 1097811 T3			
D 1/500												
E 1/100	19. 927164 T3				20. 950931 T3				21. 1004410 T3			
F 1/500												
G 1/100	22. 1021881 T3				23. 1063758 T3				24. 1097811 T3			
H 1/500												

PLACA 5	1 blanco	2 GM1	3 GD1b	4 GQ1b	5 blanco	6 GM1	7 GD1b	8 GQ1b	9 blanco	10 GM1	11 GD1b	12 GQ1b
A 1/100	25. 1113212 T3				26. 1115327 T3				27. 1122921 T3			
B 1/500												
C 1/100	28. 1124890 T3				29. 1153091 T3				Cpos IgG			
D 1/500												
E 1/100	25. 1113212 T3				26. 1115327 T3				27. 1122921 T3			
F 1/500												
G 1/100	28. 1124890 T3				29. 1153091 T3				Cpos IgM			
H 1/500												

Cambiar medio co-cultivos

- D27 → cambiar el medio (poner medio de mielinización nuevo) → cambio 200 ul (la mitad)

11/08/2022

ELISA Gangliósidos día 2

Protocolo:

- Lavar 4 veces con PBS
- Preparar **Ac secundarios**: RAH HRP IgG dil. 1/5000 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 **H₂SO₄** al 25% a cada pozo.
- Leer en lector de placas de ELISA a 490-630 nm

Resultado:

PLACA 1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	blanco	GM1	GD1b	GQ1b	blanco	GM1	GD1b	GQ1b	blanco	GM1	GD1b	GQ1b
A 1/100	1,395	1,126	0,918	1,073	2,195	1,064	1,263	1,582	1,224	1,038	0,97	1,586
B 1/500	0,83	0,783	0,842	0,771	2,03	0,903	0,669	1,111	0,834	0,658	0,705	0,756
C 1/100	1,537	1,141	1,111	1,371	2,78	1,783	1,398	1,197	1,389	1,1	0,858	0,925
D 1/500	0,995	0,572	0,615	0,683	1,265	0,894	0,754	0,631	0,765	0,447	0,606	0,582
E 1/100	0,85	0,516	0,424	0,259	2,367	1,009	0,701	0,624	2,928	2,474	2,087	1,915
F 1/500	0,495	0,239	0,2	0,235	1,202	0,421	0,308	0,294	2,195	1,294	0,96	0,93
G 1/100	2,006	0,956	0,729	0,565	2,786	1,406	0,909	0,768	1,19	0,874	0,557	0,389
H 1/500	0,965	0,382	0,287	0,289	1,76	0,501	0,319	0,277	0,53	0,282	0,216	0,166

PLACA 2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	blanco	GM1	GD1b	GQ1b	blanco	GM1	GD1b	GQ1b	blanco	GM1	GD1b	GQ1b
A 1/100	1,687	1,455	1,18	1,513	0,986	0,886	0,974	0,697	1,037	1,026	0,866	0,819
B 1/500	1,167	0,851	0,863	1,016	0,767	0,669	0,701	0,804	0,719	0,597	0,628	0,627
C 1/100	1,85	1,211	1,347	1,286	1,674	1,544	1,786	1,416	3,005	1,95	1,736	1,785
D 1/500	1,063	0,801	1,035	0,992	0,982	0,992	0,96	1,037	2,08	1,094	0,993	1,068
E 1/100	1,225	0,56	0,408	0,325	0,106	0,096	0,097	0,087	0,609	0,362	0,34	0,244
F 1/500	0,517	0,198	0,164	0,135	0,084	0,087	0,087	0,114	0,302	0,157	0,12	0,123
G 1/100	1,917	1,196	0,781	0,741	1,677	1,255	0,698	0,381	2,502	1,675	1,204	1,261
H 1/500	0,813	0,389	0,219	0,219	0,704	0,413	0,259	0,179	1,49	0,717	0,418	0,494

PLACA 3	1 blanco	2 GM1	3 GD1b	4 GQ1b	5 blanco	6 GM1	7 GD1b	8 GQ1b	9 blanco	10 GM1	11 GD1b	12 GQ1b
A 1/100	1,636	1,363	1,338	1,53	1,219	0,751	0,86	1,271	1,727	1,216	1,283	1,538
B 1/500	0,999	0,868	0,655	1,021	0,843	0,585	0,774	0,894	1,32	1,188	0,831	0,922
C 1/100	1,62	1,338	1,123	1,276	2,71	1,751	1,336	1,579	1,76	1,362	1,431	1,467
D 1/500	1,12	0,742	0,672	0,866	1,436	1,146	0,985	1,027	0,991	0,771	0,846	0,806
E 1/100	1,952	1,026	0,543	0,546	0,898	0,322	0,379	0,297	1,792	1,034	0,711	0,458
F 1/500	1,066	0,317	0,395	0,224	0,319	0,17	0,21	0,145	0,913	0,373	0,333	0,193
G 1/100	1,766	1,156	0,698	0,476	1,424	1,018	0,674	0,47	1,507	1,098	0,65	0,401
H 1/500	0,968	0,417	0,378	0,294	0,711	0,34	0,277	0,329	0,776	0,552	0,448	0,398

PLACA 4	1 blanco	2 GM1	3 GD1b	4 GQ1b	5 blanco	6 GM1	7 GD1b	8 GQ1b	9 blanco	10 GM1	11 GD1b	12 GQ1b
A 1/100	1,69	1,439	1,012	1,195	1,698	0,971	0,916	1,262	0,789	0,707	0,625	0,663
B 1/500	0,86	0,776	0,694	0,821	0,868	0,779	0,707	0,585	0,523	0,569	0,349	0,382
C 1/100	1,495	1,215	1,141	1,364	0,386	0,4	0,304	0,482	1,341	0,758	0,689	0,709
D 1/500	1,019	0,647	0,576	0,904	0,222	0,353	0,198	0,185	0,607	0,344	0,381	0,33
E 1/100	2,029	1,479	1,347	1,475	2,347	1,117	0,847	0,69	1,134	0,435	0,368	0,277
F 1/500	1,009	0,495	0,376	0,339	1,447	0,416	0,372	0,258	0,47	0,199	0,216	0,13
G 1/100	2,415	1,267	1,101	0,752	0,284	0,157	0,16	0,139	1,584	0,798	0,671	0,533
H 1/500	1,816	0,623	0,431	0,475	0,138	0,181	0,16	0,226	0,72	0,362	0,329	0,186

PLACA 5	1 blanco	2 GM1	3 GD1b	4 GQ1b	5 blanco	6 GM1	7 GD1b	8 GQ1b	9 blanco	10 GM1	11 GD1b	12 GQ1b
A 1/100	0,688	0,74	0,597	0,562	0,554	0,401	0,392	0,523	0,778	0,58	0,47	0,426
B 1/500	0,578	0,461	0,579	0,576	0,494	0,425	0,376	0,468	0,492	0,506	0,506	0,374
C 1/100	0,833	0,747	0,741	0,867	1,533	1,181	1,17	1,519	1,956	3,348	3,315	3,179
D 1/500	0,699	0,543	0,502	0,539	0,865	0,701	0,75	0,821	1,342	3,058	2,856	2,125
E 1/100	0,89	0,574	0,449	0,379	0,225	0,135	0,145	0,635	0,502	0,312	0,201	0,173
F 1/500	0,419	0,187	0,215	0,197	0,175	0,119	0,167	0,172	0,201	0,187	0,143	0,113
G 1/100	1,049	0,481	0,373	0,192	2,394	1,722	1,452	0,893	1,723	1,516	2,915	2,251
H 1/500	0,384	0,246	0,216	0,128	1,534	0,894	0,729	0,403	1,001	0,759	2,383	1,292

Guardar cubres co-cultivos (día 28)

Cojo 2 cubres de los co-cultivos y los congelo a -80°C para poder hacer las ICC posteriormente (cuando nos llegue el MBP, marcador de mielina compacta)

ICC co-cultivos (día 28)

Cojo 2 cubres de los co-cultivos para ir viendo como va la diferenciación.

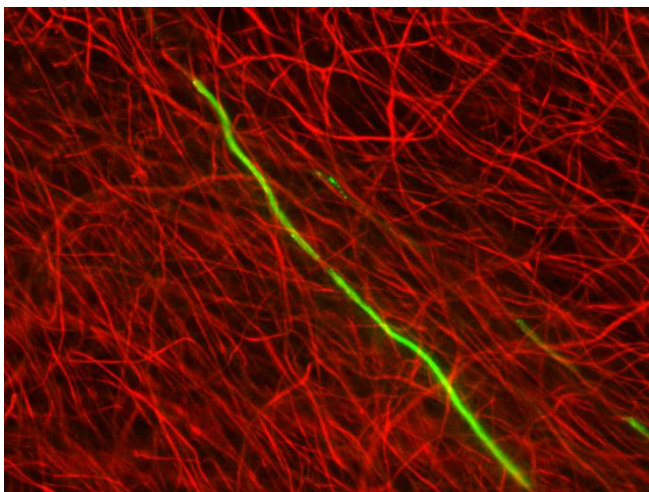
Protocolo: se hace todo en placa de 24 wells

- Fijar 20 min con PFA 4%

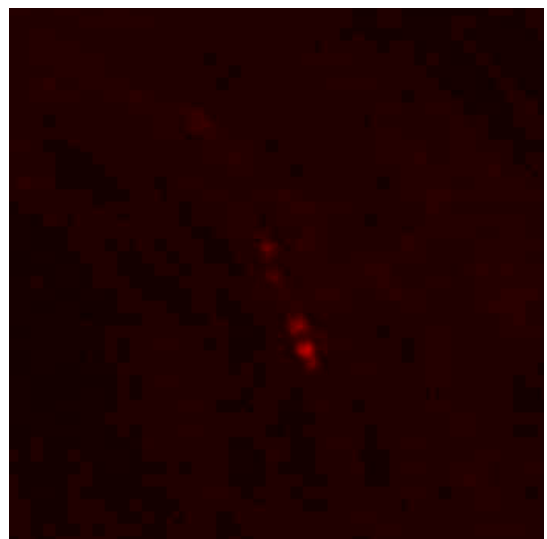
- 1 lavado con PBS1x
- Bloquear con Goat serum 5% y 0'3% tritón (en PBS): 1h a RT
- Incubar con anticuerpos primarios diluídos en Goat serum 5% y 0'3% tritón (en PBS):
 - **MBP y NFh**
 - anti-Myelin basic protein SMI99, 808401 (Biolegend). Dil. **1/100** (mouse) → 2h RT
 - anti-Neurofilament H, AB5539 (Merck) **Dil. 1/500** (chicken) → 1h RT
 - **panNF y CASPR1:**
 - Anti-panNeurofascin, AF3235 (R&D systems). Dil. **1/500** (chicken) → 2h RT
 - Anti-CASPR1, ab133634 (abcam). Dil. **1/100** (rabbit) → 1h RT
- 3 lavados con PBS1x
- Incubar 1h con Ac. secundarios diluídos en Goat serum 5% y 0'3% tritón (todos a 1/500) → pongo los NFh con 594 porque el rojo se ve peor en el microscopio
 - MBP y NFh: GAM488 + GAC594
 - panNF y CASPR1: GAC488 + GAR594
- 3 lavados con PBS1x
- Montar con DAPI

Resultado:

2. Se ve muy bien el MBP → se ve mielina en algunas partes. Hacer MBP menos concentrado (se ve fuerte)
3. Se ven muchos paranodos con CASPR1, pero se ven flojos (hacer CASPR1 más concentrado)
4. No se ve bien la panNF → no se ven nodos ni paranodos, hay como un marcaje muy difuso



MBP (verde), Neurofilamento (rojo)



CASPR1 (rojo)

ELISA Gangliósidos día 1

Objetivo: testar las muestras del estudio "*Efficacy and neurological adverse effects of COVID-19 vaccination in patients immunocompromised for multiple sclerosis*"

Muestras: (29 muestras del estudio EM vacunas – IgG e IgM)

			Resultado GM1	Resultado GD1b	Resultado GQ1b
30	1166296	T3	1/100	neg	neg
31	1175686	T3	neg	neg	neg
32	1215478	T3	neg	neg	neg
33	1217671	T3	neg	neg	neg
34	1248466	T3	1/100	neg	neg
35	1398484	T3	1/100	neg	neg
36	1432202	T3	neg	neg	neg
37	1454038	T3	neg	neg	neg
38	1519499	T3	neg	neg	neg
39	1534001	T3	neg	neg	neg
40	1556291	T3	neg	neg	neg
41	1562083	T3	neg	neg	neg
42	1566039	T3	neg	neg	neg
43	1643200	T3	neg	neg	neg
44	1668802	T3	neg	neg	neg
45	1673967	T3	solo 1/500	neg	neg
46	1718374	T3	neg	neg	neg
47	1724109	T3	neg	neg	neg
48	1760298	T3	neg	neg	neg
49	1774129	T3	neg	neg	neg
50	1781650	T3	neg	neg	neg
51	1802061	T3	neg	neg	neg
52	1806805	T3	neg	neg	neg
53	1053831	T3	neg	neg	neg
54	1067401	T3	neg	neg	neg
55	1090182	T3	neg	neg	neg
56	1335436	T3	neg	neg	neg
57	1347111	T3	1/500	neg	neg
58	1388963	T3	neg	neg	neg

Protocolo:

- Descongelar placas con gangliósidos (preparadas día 09/08/22)
- **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.
- Poner 100 ul de suero a cada pozo, incubar toda la noche a 4°C

PLACA 1	1 blanco	2 GM1	3 GD1b	4 GQ1b	5 blanco	6 GM1	7 GD1b	8 GQ1b	9 blanco	10 GM1	11 GD1b	12 GQ1b
A 1/100	30				31				32			
B 1/500	30				31				32			
C 1/100	33				34				35			
D 1/500	33				34				35			
E 1/100	30				31				32			
F 1/500	30				31				32			
G 1/100	33				34				35			
H 1/500	33				34				35			

PLACA 2	1 blanco	2 GM1	3 GD1b	4 GQ1b	5 blanco	6 GM1	7 GD1b	8 GQ1b	9 blanco	10 GM1	11 GD1b	12 GQ1b
A 1/100	36				37				38			
B 1/500	36				37				38			
C 1/100	39				40				41			
D 1/500	39				40				41			
E 1/100	36				37				38			
F 1/500	36				37				38			
G 1/100	39				40				41			
H 1/500	39				40				41			

PLACA 3	1 blanco	2 GM1	3 GD1b	4 GQ1b	5 blanco	6 GM1	7 GD1b	8 GQ1b	9 blanco	10 GM1	11 GD1b	12 GQ1b
A 1/100	42				43				44			
B 1/500	42				43				44			
C 1/100	45				46				47			
D 1/500	45				46				47			
E 1/100	42				43				44			
F 1/500	42				43				44			
G 1/100	45				46				47			
H 1/500	45				46				47			

PLACA 4	1 blanco	2 GM1	3 GD1b	4 GQ1b	5 blanco	6 GM1	7 GD1b	8 GQ1b	9 blanco	10 GM1	11 GD1b	12 GQ1b
A 1/100	48				49				50			
B 1/500	48				49				50			
C 1/100	51				52				53			
D 1/500	51				52				53			
E 1/100	48				49				50			
F 1/500	48				49				50			
G 1/100	51				52				53			
H 1/500	51				52				53			

PLACA 5	1 blanco	2 GM1	3 GD1b	4 GQ1b	5 blanco	6 GM1	7 GD1b	8 GQ1b	9 blanco	10 GM1	11 GD1b	12 GQ1b
A 1/100	54				55				56			
B 1/500	54				55				56			
C 1/100	57				58				Cpos IgG			
D 1/500	57				58				Cpos IgG			
E 1/100	54				55				56			
F 1/500	54				55				56			
G 1/100	57				58				Cpos IgM			
H 1/500	57				58				Cpos IgM			

12/08/2022

ELISA Gangliósidos día 2

Protocolo:

- Lavar 4 veces con PBS
- Preparar **Ac secundarios**: RAH HRP IgG dil. 1/5000 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 **H₂SO₄** al 25% a cada pozo.
- Leer en lector de placas de ELISA a 490-630 nm

Resultado:

PLACA 1	1 blanco	2 GM1	3 GD1b	4 GQ1b	5 blanco	6 GM1	7 GD1b	8 GQ1b	9 blanco	10 GM1	11 GD1b	12 GQ1b
A 1/100	0,555	0,732	0,354	0,361	1,044	0,663	0,508	0,358	0,65	0,455	0,206	0,303
B 1/500	0,269	0,322	0,228	0,228	0,476	0,509	0,283	0,305	0,309	0,312	0,218	0,159
C 1/100	1,422	1,251	0,63	0,809	1,669	1,211	0,85	0,969	1,257	1,095	0,643	0,7
D 1/500	0,639	0,502	0,408	0,346	0,643	0,587	0,374	0,39	0,635	0,496	0,361	0,487
E 1/100	0,569	0,321	0,173	0,125	2,221	1,214	0,691	0,474	0,484	0,283	0,155	0,126
F 1/500	0,226	0,113	0,1	0,075	1,071	0,476	0,252	0,169	0,167	0,116	0,114	0,064
G 1/100	1,24	0,761	0,389	0,304	1,283	0,684	0,421	0,324	0,582	0,378	0,253	0,117
H 1/500	0,406	0,219	0,133	0,114	0,459	0,214	0,133	0,112	0,174	0,101	0,098	0,069

PLACA 2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	blanco	GM1	GD1b	GQ1b	blanco	GM1	GD1b	GQ1b	blanco	GM1	GD1b	GQ1b
A 1/100	0,533	0,526	0,285	0,345	0,874	0,798	0,356	0,567	1,172	1,141	0,665	0,732
B 1/500	0,256	0,328	0,257	0,229	0,371	0,455	0,393	0,286	0,548	0,526	0,348	0,317
C 1/100	0,997	1,014	0,806	0,725	0,516	0,647	0,357	0,379	1,038	1,178	0,68	0,842
D 1/500	0,517	0,438	0,304	0,394	0,225	0,287	0,228	0,221	0,465	0,475	0,405	0,436
E 1/100	0,51	0,237	0,145	0,117	0,778	0,368	0,184	0,133	1,313	0,545	0,294	0,269
F 1/500	0,191	0,1	0,09	0,104	0,332	0,162	0,143	0,095	0,475	0,19	0,13	0,131
G 1/100	1,44	0,659	0,263	0,267	0,369	0,178	0,136	0,089	1,167	0,393	0,208	0,22
H 1/500	0,544	0,187	0,105	0,109	0,096	0,075	0,073	0,055	0,465	0,142	0,121	0,097

PLACA 3	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	blanco	GM1	GD1b	GQ1b	blanco	GM1	GD1b	GQ1b	blanco	GM1	GD1b	GQ1b
A 1/100	1,258	1,208	0,623	0,892	0,785	0,427	0,481	0,437	1,303	0,873	0,5	0,888
B 1/500	0,534	0,547	0,373	0,468	1,473	1,194	0,998	0,826	0,604	0,476	0,353	0,414
C 1/100	1,573	1,547	1,383	1,153	0,52	0,498	0,406	0,377	1,193	0,994	0,781	0,892
D 1/500	0,628	0,732	0,629	0,439	0,271	0,284	0,291	0,254	0,494	0,457	0,387	0,416
E 1/100	1,677	1,01	0,486	0,365	0,558	0,331	0,196	0,141	1,957	1,202	0,773	0,566
F 1/500	0,621	0,298	0,14	0,132	1,371	1,092	0,639	0,341	0,997	0,417	0,282	0,187
G 1/100	1,423	0,934	0,453	0,358	0,463	0,149	0,097	0,087	0,613	0,239	0,151	0,139
H 1/500	0,65	0,261	0,176	0,137	0,194	0,076	0,071	0,063	0,193	0,089	0,059	0,056

PLACA 4	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	blanco	GM1	GD1b	GQ1b	blanco	GM1	GD1b	GQ1b	blanco	GM1	GD1b	GQ1b
A 1/100	0,494	0,57	0,298	0,331	1,013	0,7	0,535	0,565	1,439	1,347	0,875	1,106
B 1/500	0,304	0,29	0,246	0,171	0,429	0,351	0,168	0,243	0,674	0,607	0,598	0,499
C 1/100	0,732	0,615	0,368	0,477	0,481	0,463	0,224	0,27	1,084	1,145	0,88	0,753
D 1/500	0,343	0,318	0,221	0,249	0,251	0,279	0,193	0,2	0,437	0,531	0,437	0,312
E 1/100	0,495	0,229	0,15	0,141	1,349	0,494	0,296	0,251	0,807	0,343	0,218	0,154
F 1/500	0,225	0,111	0,095	0,082	0,53	0,167	0,11	0,107	0,327	0,121	0,09	0,081
G 1/100	0,944	0,415	0,207	0,157	0,836	0,248	0,164	0,13	1,106	0,371	0,254	0,163
H 1/500	0,336	0,117	0,107	0,083	0,264	0,132	0,108	0,072	0,383	0,144	0,109	0,082

PLACA 5	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	blanco	GM1	GD1b	GQ1b	blanco	GM1	GD1b	GQ1b	blanco	GM1	GD1b	GQ1b
A 1/100	1,097	0,829	0,454	0,771	2,202	1,101	1,212	1,578	1,101	1,021	0,611	0,588
B 1/500	0,579	0,394	0,287	0,295	1,191	0,566	0,465	0,611	0,396	0,331	0,333	0,225
C 1/100	0,787	0,942	0,716	0,763	0,624	0,606	0,454	0,498	2,395	3,46	3,331	3,301
D 1/500	0,342	0,452	0,307	0,326	0,373	0,328	0,26	0,245	1,449	3,186	2,356	2,014
E 1/100	1,231	0,636	0,362	0,306	2,033	1,781	1,286	1,181	0,676	0,299	0,244	0,182
F 1/500	0,46	0,207	0,143	0,088	1,021	0,502	0,362	0,328	0,226	0,167	0,146	0,1
G 1/100	0,479	0,248	0,182	0,168	0,96	0,484	0,305	0,23	2,495	3,054	2,958	1,12
H 1/500	0,187	0,089	0,09	0,068	0,422	0,182	0,152	0,11	1,819	2,876	2,773	0,601

16/08/2022

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 reconstituídos, 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
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 **9 placas** (3 columnas de cada gangliósido/placa):

- GM1: 23 ml metanol + 46 ul GM1 reconstituído
- GD1b: 23 ml metanol + 46 ul GD1b reconstituído
- GQ1b: 23 ml metanol + 92 ul GQ1b reconstituído
- Agitar con vórtex las diluciones
- Poner 100 ul de gangliósido diluido 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

ICC co-cultivos (cubres congelados día 22)

Protocolo: se hace todo en placa de 24 wells (cubres congelados día 05/08/2022)

- Bloquear con Goat serum 5% y 0'3% tritón (en PBS): 1h a RT
- Incubar con anticuerpos primarios diluïdos en Goat serum 5% y 0'3% tritón (en PBS):
 - **CASPR1 y MBP**
 - Anti-CASPR1, ab133634 (abcam). Dil. **1/50** (rabbit) → 2h RT
 - anti-Myelin basic protein SMI99, 808401 (Biolegend). Dil. **1/200** (mouse) → 1h RT
 - **suero NF155+ y MBP:**

- C+ NF155 (J.Moron 212-14). Dil. **1/50** → 2h RT
- anti-Myelin basic protein SMI99, 808401 (Biolegend). Dil. **1/200** (mouse) → 2h RT
- 3 lavados con PBS1x
- Incubar 1h con Ac. secundarios diluïdos en Goat serum 5% y 0'3% tritón (todos a 1/500) → pongo los NFh con 594 porque el rojo se ve peor en el microscopio
 - CASPR1 y MBP: GAR594 + GAM488
 - panNF y CASPR1: GAH549 + GAM488
- 3 lavados con PBS1x
- Montar con DAPI

Resultado:

- No veo CASPR1, pero sí MBP (poquito, creo que todavía no hay formación de nodos)
- Suero NF155 marca todo (axones y cels Schwann), pero no marca paranodos (no hay marcaje de MBP, no debe haber mielina) → ver qué marca un suero Cneg, porque es raro que el suero NF155 marque todos los axones.

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

*También tengo guardados 3 culture slides que le sobraron a Marta la semana de antes (en nevera con PBS1x)

17/08/2022

Coating células + transfección Culture slides

21 culture slides:

- 14 Perfil
- 6 LRP4
- 1 NPR3

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 Gangliósidos día 1

Objetivo: testar las muestras del estudio "*Efficacy and neurological adverse effects of COVID-19 vaccination in patients immunocompromised for multiple sclerosis*"

Muestras: (29 muestras del estudio EM vacunas – IgG e IgM)

			Resultado GM1	Resultado GD1b	Resultado GQ1b
59	1435237	T3	neg	neg	neg
60	1460652	T3	neg	neg	neg
61	1492808	T3	neg	neg	neg
62	1496265	T3	neg	neg	neg
63	1502610	T3	neg	neg	neg
64	1518208	T3	neg	neg	neg
65	1555633	T3	neg	neg	neg
66	157282	T3	neg	neg	neg
67	1614932	T3	neg	neg	neg
68	1668530	T3	neg	neg	neg
69	1730429	T3	neg	neg	neg
70	1744031	T3	neg	neg	neg
71	1797029	T3	neg	neg	neg
72	1820271	T3	neg	neg	neg
73	229342	T3	neg	neg	neg
74	352797	T3	neg	neg	neg
75	379372	T3	neg	neg	neg
76	47690	T3	neg	neg	neg
77	532468	T3	1/100	neg	neg
78	616940	T3	1/100	neg	neg
79	66440	T3	neg	1/500	solo 1/500
80	837590	T3	neg	neg	neg
81	896114	T3	neg	neg	neg
82	917368	T3	neg	neg	neg

	NHC	Código externo	Tiempo	Box	Posición	Resultado GM1	Resultado GD1b	Resultado GQ1b
83	4717546	VACEM16	T3	SANT PAU T3.1	A2	neg	neg	neg
84	4719830	VACEM11	T3	SANT PAU T3.1	A3	neg	neg	neg
85	70283823	VACEM12	T3	SANT PAU T3.1	A4	neg	neg	neg
86	70628584	VACEM18	T3	SANT PAU T3.1	A5	neg	neg	neg
87	5075132	VACEM7	T3	SANT PAU T3.1	A6	neg	neg	neg

Protocolo:

- Descongelar placas con gangliósidos (preparadas día 16/08/22)
- **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.
- Poner 100 ul de suero a cada pozo, incubar toda la noche a 4°C

PLACA 1	1 blanco	2 GM1	3 GD1b	4 GQ1b	5 blanco	6 GM1	7 GD1b	8 GQ1b	9 blanco	10 GM1	11 GD1b	12 GQ1b
A 1/100	59				60				61			
B 1/500	59				60				61			
C 1/100	62				63				64			
D 1/500	62				63				64			
E 1/100	59				60				61			
F 1/500	59				60				61			
G 1/100	62				63				64			
H 1/500	62				63				64			

PLACA 2	1 blanco	2 GM1	3 GD1b	4 GQ1b	5 blanco	6 GM1	7 GD1b	8 GQ1b	9 blanco	10 GM1	11 GD1b	12 GQ1b
A 1/100	65				66				67			
B 1/500	65				66				67			
C 1/100	68				69				70			
D 1/500	68				69				70			
E 1/100	65				66				67			
F 1/500	65				66				67			
G 1/100	68				69				70			
H 1/500	68				69				70			

PLACA 3	1 blanco	2 GM1	3 GD1b	4 GQ1b	5 blanco	6 GM1	7 GD1b	8 GQ1b	9 blanco	10 GM1	11 GD1b	12 GQ1b
A 1/100	71				72				73			
B 1/500	71				72				73			
C 1/100	74				75				76			
D 1/500	74				75				76			
E 1/100	71				72				73			
F 1/500	71				72				73			
G 1/100	74				75				76			
H 1/500	74				75				76			

PLACA 4	1 blanco	2 GM1	3 GD1b	4 GQ1b	5 blanco	6 GM1	7 GD1b	8 GQ1b	9 blanco	10 GM1	11 GD1b	12 GQ1b
A 1/100	77				78				79			
B 1/500	77				78				79			
C 1/100	80				81				82			
D 1/500	80				81				82			
E 1/100	77				78				79			
F 1/500	77				78				79			
G 1/100	80				81				82			
H 1/500	80				81				82			

PLACA 5	1 blanco	2 GM1	3 GD1b	4 GQ1b	5 blanco	6 GM1	7 GD1b	8 GQ1b	9 blanco	10 GM1	11 GD1b	12 GQ1b
A 1/100	83				84				85			
B 1/500	83				84				85			
C 1/100	86				87				Cpos IgG			
D 1/500	86				87				Cpos IgG			
E 1/100	83				84				85			
F 1/500	83				84				85			
G 1/100	86				87				Cpos IgM			
H 1/500	86				87				Cpos IgM			

[ELISA NF140, NF155, CASPR1, CNTN1 \(screening EM vacunes\)](#)

Objetivo: testar las muestras del estudio "Efficacy and neurological adverse effects of COVID-19 vaccination in patients immunocompromised for multiple sclerosis"

Muestras: (46 muestras del estudio EM vacunas, Cpos y Cneg)

	NHC	Código externo	Tiempo	Box	Posición	Resultado NF140	Resultado NF155	Resultado CNTN1	Resultado CASPR1
275	5351690	VACEM192	T3	SANT PAU T3.4	A5	neg	neg	neg	neg
276	4204807	VACEM293	T3	SANT PAU T3.4	A6	neg	neg	neg	neg
277	4135396	VACEM271	T3	SANT PAU T3.4	A7	neg	neg	neg	neg
278	650956	VACEM272	T3	SANT PAU T3.4	A8	neg	neg	neg	Pos
279	5133767	VACEM428	T3	SANT PAU T3.4	B2	neg	neg	neg	neg
280	70681851	VACEM247	T3	SANT PAU T3.4	B4	neg	neg	neg	neg
281	702597	VACEM325	T3	SANT PAU T3.4	B5	neg	neg	neg	neg
282	392335	VACEM165	T3	SANT PAU T3.4	B6	neg	neg	neg	neg
283	5294464	VACEM430	T3	SANT PAU T3.4	B7	neg	neg	neg	neg
284	5083388	VACEM412	T3	SANT PAU T3.4	B8	neg	neg	neg	neg
285	5236328	VACEM415	T3	SANT PAU T3.4	B9	neg	neg	neg	neg
286	5043844	VACEM201	T3	SANT PAU T3.4	C1	neg	neg	neg	neg
287	4389413	VACEM270	T3	SANT PAU T3.4	C2	neg	neg	neg	neg
288	5341876	VACEM408	T3	SANT PAU T3.4	C3	neg	neg	neg	neg
289	4899902	VACEM345	T3	SANT PAU T3.4	C4	neg	neg	neg	neg
290	129422	VACEM210	T3	SANT PAU T3.4	C5	neg	neg	neg	neg
291	70586124	VACEM204	T3	SANT PAU T3.4	C6	neg	neg	neg	Pos
292	5048799	VACEM306	T3	SANT PAU T3.4	C7	neg	neg	neg	neg
293	4954783	VACEM209	T3	SANT PAU T3.4	C8	neg	neg	neg	neg
294	4712800	VACEM365	T3	SANT PAU T3.4	D5	neg	neg	neg	neg

295	1148576	VACEM281HSJD	T3	SANT PAU T3.4	D6	neg	neg	neg	neg
296	1592323	VACEM285HSJD	T3	SANT PAU T3.4	D7	neg	neg	neg	neg
297	1652447	VACEM421HSJD	T3	SANT PAU T3.4	D9	neg	neg	neg	neg
298	1492240	VACEM279HSJD	T3	SANT PAU T3.4	E1	neg	neg	neg	neg
299	103530535	VACEM316HSJD	T3	SANT PAU T3.4	E2	neg	neg	neg	neg
300	1678842	VACEM287HSJD	T3	SANT PAU T3.4	E3	neg	neg	neg	neg
301	1193968	VACEM286HSJD	T3	SANT PAU T3.4	E6	neg	neg	neg	neg
302	1049661	VACEM320HSJD	T3	SANT PAU T3.4	E7	neg	neg	neg	neg
303	1129611	VACEM317HSJD	T3	SANT PAU T3.4	E8	neg	neg	neg	neg
304	1668234	VACEM323HSJD	T3	SANT PAU T3.4	E9	neg	neg	neg	neg
305	1126522	VACEM319HSJD	T3	SANT PAU T3.4	F1	neg	neg	neg	neg
306	1745671	VACEM321HSJD	T3	SANT PAU T3.4	F2	neg	neg	neg	neg
307	1551095	VACEM324HSJD	T3	SANT PAU T3.4	F3	neg	neg	neg	neg
308	4668233	VACEM375	T3	SANT PAU T3.4	F8	neg	neg	neg	neg
309	4667822	VACEM366	T3	1 (últimas cajas)	C3	neg	neg	neg	neg
310	4977039	VACEM385	T3	1 (últimas cajas)	A6	neg	neg	neg	neg
311	4567054	VACEM339	T3	1 (últimas cajas)	A4	neg	neg	neg	neg
312	5432016	VACEM426	T3	1 (últimas cajas)	A5	neg	neg	neg	neg
313	4533952	VACEM433	T3	1 (últimas cajas)	A9	neg	neg	neg	neg
314	80045421	VACEM409	T3	1 (últimas cajas)	A8	neg	neg	neg	neg
315	5400268	VACEM437	T3	1 (últimas cajas)	B2	neg	neg	neg	neg
316	1763698	VACEM438HSJD	T3	1 (últimas cajas)	B8	neg	neg	neg	neg
317	4800712		T3	1 (últimas cajas)	B7	neg	neg	neg	neg
318	1652922		T3	1 (últimas cajas)	C2	neg	neg	neg	neg
X	4418717	VACEM60	T1 (no hi ha T3)	SANT PAU 1	G2	neg	neg	neg	neg
X	262541	VACEM45	T1 (no hi ha T3)	SANT PAU 1	H3	neg	neg	neg	neg

Protocolo: 4 placas enteras → NF140, NF155, CNTN1, CASPR1

- Bloquear con leche 5% en PBS-tween 0'1% → 200 ul pozo (incubar 1h a temp. ambiente)
- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
- Diluir los **sueros**:
 - Screening: diluir sueros 1/100 en leche 5% en PBS-tween 0'1%
- 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 **H₂SO₄** 25%

Leer a 450-570 nm

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	Cneg	277	281	285	289	293	297	301	305	309	313	317
Bblanc	Cneg	277	281	285	289	293	297	301	305	309	313	317
C prot	Cpos	278	282	286	290	294	298	302	306	310	314	318
Dblanc	Cpos	278	282	286	290	294	298	302	306	310	314	318
E prot		275	279	283	287	291	295	299	303	307	311	X
F blanc		275	279	283	287	291	295	299	303	307	311	X
G prot		276	280	284	288	292	296	300	304	308	312	X
Hblanc		276	280	284	288	292	296	300	304	308	312	X

Resultado:

NF140	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	0,161	0,146	0,13	0,13	0,146	0,108	0,117	0,116	0,131	0,14	0,15	0,159
B blanc	0,179	0,134	0,167	0,194	0,17	0,117	0,159	0,147	0,156	0,184	0,155	0,205
C prot	0,489	0,139	0,147	0,175	0,192	0,139	0,152	0,187	0,144	0,178	0,222	0,174
D blanc	0,108	0,124	0,137	0,161	0,165	0,164	0,171	0,154	0,145	0,17	0,181	0,189
E prot	0,133	0,127	0,138	0,132	0,18	0,147	0,175	0,189	0,168	0,141	0,149	0,183
F blanc	0,15	0,149	0,161	0,203	0,181	0,152	0,165	0,17	0,171	0,164	0,152	0,22
G prot	0,148	0,149	0,191	0,174	0,189	0,189	0,158	0,167	0,2	0,138	0,16	0,175
Hblanc	0,191	0,177	0,187	0,185	0,172	0,185	0,181	0,165	0,175	0,188	0,177	0,198

NF155	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	0,145	0,126	0,11	0,131	0,118	0,128	0,132	0,12	0,108	0,133	0,162	0,15
B blanc	0,147	0,099	0,093	0,107	0,123	0,103	0,117	0,106	0,107	0,141	0,132	0,14
C prot	0,904	0,103	0,105	0,109	0,128	0,109	0,14	0,108	0,114	0,147	0,182	0,122
D blanc	0,094	0,105	0,101	0,097	0,118	0,104	0,118	0,123	0,119	0,15	0,242	0,11
E prot	0,102	0,101	0,126	0,101	0,123	0,098	0,103	0,105	0,128	0,149	0,228	0,164
F blanc	0,096	0,093	0,077	0,114	0,114	0,123	0,116	0,132	0,147	0,12	0,286	0,169
G prot	0,101	0,061	0,029	0,036	0,073	0,091	0,1	0,11	0,103	0,098	0,105	0,122
Hblanc	0,114	0,03	0,024	0,037	0,036	0,086	0,079	0,083	0,083	0,099	0,161	0,191

CNTN1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	0,111	0,082	0,074	0,093	0,1	0,099	0,096	0,097	0,094	0,113	0,121	0,111
B blanc	0,116	0,081	0,09	0,076	0,075	0,071	0,095	0,116	0,071	0,109	0,123	0,118
C prot	0,824	0,092	0,086	0,075	0,082	0,102	0,076	0,1	0,082	0,104	0,141	0,087
D blanc	0,144	0,099	0,087	0,078	0,077	0,084	0,066	0,095	0,075	0,104	0,119	0,11
E prot	0,113	0,12	0,09	0,115	0,104	0,065	0,087	0,111	0,093	0,124	0,099	0,17
F blanc	0,116	0,131	0,109	0,115	0,11	0,085	0,081	0,111	0,099	0,094	0,116	0,157
G prot	0,123	0,113	0,101	0,121	0,116	0,093	0,114	0,092	0,132	0,137	0,104	0,131
Hblanc	0,14	0,109	0,105	0,095	0,085	0,118	0,109	0,121	0,101	0,126	0,129	0,12

CASPR1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	0,119	0,109	0,12	0,139	0,153	0,173	0,177	0,189	0,135	0,152	0,145	0,137
B blanc	0,149	0,13	0,117	0,14	0,151	0,139	0,155	0,165	0,169	0,198	0,178	0,182
C prot	1,053	0,276	0,158	0,137	0,169	0,154	0,237	0,155	0,197	0,188	0,205	0,183
D blanc	0,122	0,118	0,134	0,145	0,146	0,125	0,149	0,154	0,174	0,202	0,211	0,195
E prot	0,123	0,106	0,142	0,135	0,585	0,127	0,151	0,146	0,154	0,193	0,211	0,22
F blanc	0,121	0,111	0,133	0,167	0,171	0,123	0,146	0,157	0,178	0,216	0,242	0,254
G prot	0,129	0,139	0,155	0,149	0,127	0,147	0,135	0,138	0,155	0,215	0,224	0,205
Hblanc	0,143	0,12	0,131	0,15	0,118	0,14	0,142	0,126	0,152	0,16	0,277	0,213

18/08/2022

ELISA Gangliósidos día 2

Protocolo:

- Lavar 4 veces con PBS
- Preparar **Ac secundarios**: RAH HRP IgG dil. 1/5000 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 **H₂SO₄** al 25% a cada pozo.
- Leer en lector de placas de ELISA a 490-630 nm

Resultado:

PLACA 1	1 blanco	2 GM1	3 GD1b	4 GQ1b	5 blanco	6 GM1	7 GD1b	8 GQ1b	9 blanco	10 GM1	11 GD1b	12 GQ1b
A 1/100	0,945	0,677	0,613	0,995	0,728	0,494	0,478	0,37	0,758	0,52	0,462	0,461
B 1/500	0,874	0,641	0,51	0,603	0,39	0,485	0,38	0,393	0,406	0,403	0,357	0,278
C 1/100	1,774	0,911	0,854	0,852	1,94	1,269	1,023	1,098	0,539	0,579	0,496	0,334
D 1/500	0,96	0,55	0,484	0,709	1,041	0,698	0,585	0,754	0,38	0,358	0,441	0,282
E 1/100	1,567	0,949	0,816	0,559	0,379	0,291	0,132	0,179	0,604	0,31	0,288	0,224
F 1/500	0,951	0,39	0,372	0,297	0,271	0,233	0,181	0,274	0,305	0,258	0,241	0,195
G 1/100	1,304	0,795	0,631	0,462	0,909	0,4	0,361	0,519	0,395	0,271	0,233	0,144
H 1/500	0,675	0,324	0,279	0,305	0,532	0,316	0,319	0,571	0,258	0,291	0,217	0,14

PLACA 2	1 blanco	2 GM1	3 GD1b	4 GQ1b	5 blanco	6 GM1	7 GD1b	8 GQ1b	9 blanco	10 GM1	11 GD1b	12 GQ1b
A 1/100	0,948	0,623	0,646	0,681	0,762	0,593	0,366	0,442	1,075	0,837	0,555	0,629
B 1/500	0,524	0,411	0,379	0,457	0,348	0,352	0,311	0,332	0,677	0,478	0,482	0,253
C 1/100	0,747	0,499	0,359	0,399	1,554	0,902	0,715	0,817	0,536	0,404	0,403	0,36
D 1/500	0,226	0,182	0,221	0,228	0,24	0,225	0,143	0,237	0,391	0,336	0,333	0,195
E 1/100	0,954	0,628	0,403	0,41	0,969	0,48	0,388	0,221	0,524	0,51	0,35	0,199
F 1/500	0,511	0,246	0,191	0,169	0,389	0,242	0,2	0,125	0,303	0,21	0,322	0,156
G 1/100	0,771	0,312	0,244	0,136	0,95	0,463	0,373	0,195	0,44	0,284	0,223	0,176
H 1/500	0,226	0,164	0,161	0,107	0,105	0,215	0,14	0,184	0,309	0,195	0,201	0,13

PLACA 3	1 blanco	2 GM1	3 GD1b	4 GQ1b	5 blanco	6 GM1	7 GD1b	8 GQ1b	9 blanco	10 GM1	11 GD1b	12 GQ1b
A 1/100	1,095	0,549	0,506	0,52	1,57	0,651	0,631	0,505	0,544	0,25	0,316	0,328
B 1/500	0,471	0,393	0,274	0,373	0,671	0,322	0,359	0,238	0,313	0,27	0,283	0,174
C 1/100	0,509	0,289	0,309	0,257	1,428	0,563	0,473	0,591	2,599	0,834	0,907	1,146
D 1/500	0,247	0,16	0,238	0,194	0,541	0,219	0,246	0,224	1,191	0,44	0,397	0,331
E 1/100	1,074	0,549	0,442	0,28	0,605	0,26	0,189	0,159	0,381	0,179	0,135	0,09
F 1/500	0,386	0,17	0,156	0,096	0,231	0,16	0,119	0,078	0,164	0,109	0,087	0,088
G 1/100	0,272	0,112	0,111	0,084	0,906	0,463	0,315	0,229	1,364	0,746	0,685	0,47
H 1/500	0,092	0,079	0,09	0,05	0,291	0,183	0,134	0,102	0,525	0,272	0,224	0,147

PLACA 4	1 blanco	2 GM1	3 GD1b	4 GQ1b	5 blanco	6 GM1	7 GD1b	8 GQ1b	9 blanco	10 GM1	11 GD1b	12 GQ1b
A 1/100	0,609	0,789	0,578	0,587	0,505	0,662	0,552	0,507	0,42	0,508	0,594	0,445
B 1/500	0,304	0,392	0,324	0,387	0,268	0,314	0,382	0,329	0,286	0,336	0,43	0,545
C 1/100	0,913	0,827	0,836	1,002	0,421	0,441	0,484	0,403	0,838	0,585	0,679	0,92
D 1/500	0,241	0,272	0,25	0,3	0,314	0,255	0,274	0,216	0,247	0,305	0,316	0,299
E 1/100	0,607	0,389	0,287	0,295	0,587	0,391	0,349	0,232	0,329	0,251	0,271	0,182
F 1/500	0,22	0,195	0,188	0,134	0,221	0,311	0,243	0,258	0,175	0,225	0,201	0,21
G 1/100	1,24	0,51	0,353	0,357	0,306	0,286	0,211	0,231	0,724	0,482	0,297	0,189
H 1/500	0,229	0,16	0,169	0,113	0,141	0,182	0,275	0,144	0,108	0,188	0,119	0,079

PLACA 5	1 blanco	2 GM1	3 GD1b	4 GQ1b	5 blanco	6 GM1	7 GD1b	8 GQ1b	9 blanco	10 GM1	11 GD1b	12 GQ1b
A 1/100	1,044	0,825	0,779	0,7	0,927	0,774	0,816	0,57	3,051	2,451	2,446	2,403
B 1/500	0,756	0,522	0,509	0,419	0,784	0,762	0,635	0,59	2,038	1,399	1,413	1,271
C 1/100	0,953	0,695	0,732	0,661	1,525	1,056	0,893	0,743	2,141	3,346	3,215	2,956
D 1/500	0,677	0,705	0,646	0,504	1,031	0,677	0,571	0,543	1,562	2,774	2,496	1,731
E 1/100	1,128	0,745	0,564	0,327	1,116	0,932	0,841	0,365	2,129	1,621	1,466	1,38
F 1/500	0,564	0,4	0,403	0,175	0,55	0,384	0,413	0,178	1,384	0,822	0,775	0,745
G 1/100	0,948	0,768	0,648	0,334	1,138	0,911	0,814	0,614	2,399	2,55	2,488	1,395
H 1/500	0,447	0,347	0,382	0,243	0,704	0,427	0,459	0,311	1,249	2,386	1,986	0,52

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, bloquear y congelar a -80

*En este caso no permeabilizo ni bloqueo, congelo directamente después de fijar.

23/08/2022

Coating ELISA CASPR1

[CASPR1]_i = 0,789 mg/ml

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

- CASPR1: 48 pozos [f = 5 ug/ml → 2,5 ml buffer + 15,8 ul

24/08/2022

ICC Perfil nodales/paranodales (BD)

Muestras y resultado:

- 22-2-680 BOX 301 → NF155pos → **TITULAR!!**
- 22-2-809 BOX 304 → neg
- 22-2-810 BOX 304 → neg
- 22-2-811 BOX 304 → neg
- 22-2-814 BOX 304 → neg
- 22-2-815 BOX 304 → neg
- 22-2-816 BOX 304 → neg
- 22-2-817 BOX 304 → neg

ELISA CASPR1 y CNTN1

Muestras CASPR1: todo negativo

- 22-2-680 BOX 301
- 22-2-809 BOX 304
- 22-2-810 BOX 304
- 22-2-811 BOX 304
- 22-2-814 BOX 304
- 22-2-815 BOX 304
- 22-2-816 BOX 304
- 22-2-817 BOX 304

Muestras CNTN1: confirmación de cosas ya vistas en inmuno)

- 22-303280 (Rogelio Avilés Rodríguez - pretratamiento) → Pos
- 22-336374 (Rogelio Avilés Rodríguez – post tratamiento) → neg
- 22-341857 (Alfred Tor Riquer) → neg

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	Cneg	22-2-810	22-2-816	Cneg	22-341857							
B blanc	Cneg	22-2-810	22-2-816	Cneg	22-341857							
C prot	Cpos	22-2-811	22-2-817	Cpos								
D blanc	Cpos	22-2-811	22-2-817	Cpos								
E prot	22-2-680	22-2-814		22-303280								
F blanc	22-2-680	22-2-814		22-303280								
G prot	22-2-809	22-2-815		22-336374								
Hblanc	22-2-809	22-2-815		22-336374								

CASPR1

CNTN1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	0,095	0,06	0,074	0,071	0,09							
B blanc	0,088	0,09	0,118	0,067	0,074							
C prot	0,766	0,205	0,048	1,344								
D blanc	0,107	0,311	0,093	0,11								
E prot	0,073	0,079		1,066								
F blanc	0,162	0,103		0,055								
G prot	0,106	0,06		0,119								
Hblanc	0,451	0,084		0,078								

15/09/2022

Extracción y cultivo de neuronas DRG (rata)

Se extraen a partir de embriones de rata. Ratas Sprague-Dawley embarazadas.

Se piden ratas E15 pero se utilizan pasadas 24 horas → el cultivo se inicia en E16.

*En este caso se extraen 18 embriones → yo extraigo los ganglios de 6 embriones (para hacer co-cultivos con ganglio entero o a partir de cels disgregadas), y Elba extrae los ganglios de 12 embriones (para hacer una IP).

Hacemos la disgregación por separado (yo uso NGF de Alomone y Elba usa NGF de Invitrogen)

Extracción de DRGs

➤ Estabulario

- Llevar al estabulario un tubo falcon de 50 ml con medio L15 (en hielo) y material instrumental (tijeras, bisturí, pinzas...).

Medio L15:

- 45 ml de medio Leibovitz's
- 5 ml de FBS (10%)
 - 50 µl de DNasa (stock a 10 µg/ml) *La DNasa no se añade directamente al medio L15 total, sólo se añaden 5 ul de stock de DNasa a los 5 mL que se usan para inactivar la tripsina.
- Poner el animal a la cámara de CO₂ → abrir la llave hasta el número 2, subir el O₂ hasta el 2, y poner el isofluorano al 5.
- Sacar la rata de la cámara y ponerla encima de un corcho. Pinchar 1ml de TP41 (Solución inyectable para eutanasia) en el corazón.
- Mojar la rata con alcohol y abrir por debajo (ponerla boca arriba). Tirar de las bolsas de los fetos y ponerlos en una placa con L15.
- Sacar todos los fetos de las bolsas y ponerlos en un tubo con medio L15 (en hielo).

➤ Cultivos

- Poner todos los fetos en una placa con el medio L15 y mantenerla sobre el hielo.
- Coger un feto, ponerlo sobre la placa con Agar y mojarlo con PBS (estéril y frío, mantenerlo en hielo). Es importante ir mojando el feto con PBS, no puede quedarse seco en ningún momento.
- Cortar la cabeza con unas tijeras y clavar el feto boca abajo con 4 puntas de aguja en las extremidades.
- Sacar las dos capas que envuelven la médula espinal y sacar la médula procurando que no se rompa.

- Sacar los ganglios que se hayan quedado pegados a la médula y pasarlos a una placa pequeña con L15.
- Con una aguja de insulina sacar para fuera los DRG de la columna e irlos pasando a la placa con L15

Disgregación de los DRGs

- Pasar todos los DRG a un tubo de 15 ml → con pipeta Pasteur de cristal + *xumet*
- Centrifugar a 300 rpm 5 min
- Eliminar el sobrenadante (con pipeta+xumet e ir tirando a una placa, para no perder ningún DRG).
- Poner PBS1x y centrifugar a 300 rpm 5 min.
- Eliminar el sobrenadante y añadir 5 ml de → 4'5ml PBS1x + 500 ul de tripsina 2.5% sin bromophenol.
- Incubar 15min en el baño a 37°C. Homogeneizar suavemente cada 5 min
- Añadir 5 ml de medio L15 (con DNasa) para inactivar la tripsina.
- Centrifugar a 300 rpm 10 min
- Pasar el pellet a un eppendorf con 1ml de medio NG, y disgregar con una pipeta pasteur de cristal fina (*se hace más fina la punta con el bunsen, preparar unos días antes y autoclavar*). Procurar no hacer mucha espuma. Antes de homogeneizar, pasar la pipeta por FBS para que no se queden pegados los DRG a las paredes.

Medio NG:

- 48 ml de medio Neurobasal
- 1 ml de suplemento B27
- 500 µl de glutamax
- 500 µl de Pen-Str
- 25 µl de NGF → uso un NGF diferente: Native mouse NGF 2.5S protein. Ref N-240, Alomone: guardado resuspendido a 100ug/ml en -20°C
- Pasar el ml disgregado a un tubo de 15ml con 5ml de medio NG.
- Pasar las células a las placas → las células no se cuentan, las proporciones se hacen en función del nombre de embriones. En este caso hago 5 placas de 100cc sin cubres, y 2 placas de 60cc con cubres pequeños.
 - Coating:
 - Día anterior: coating con Poly-D-lys 1/40 → incubar overnight a 37°C
 - Mismo día: lavar placas y hacer coating con Laminina 2'5 ul/ml → incubar 2h a 37°C

Co-cultivo de neuronas DRG i células de Schwann (rata)

Protocolo mixto entre paper "DRG neuron/Schwann cells Myelinating Cocultures" de Taveggia (2018), paper pan-NF de Appelthausen, y paper "A reliable in vitro model for studying peripheral nerve myelination in mouse" de Stettner (2013).

- 2 placas de 24wells con 1 cubre de 12mm en cada pozo, y 2 culture slides (usaré 1 placa de 24w y 1 culture slide para hacer co-cultivo desde un ganglio entero, y 1 placa de 24w y 1 culture slide para cels disgregadas a partir de un ganglio):
 - Día anterior: coating con Poly-D-lys 1/40 → incubar overnight a 37°C
 - Mismo día: lavar pozos y hacer coating con Laminina 2'5 ul/ml → incubar mínimo 1h a 37°C
- D0 → Añadir 400 ul de medio C (co-culture médium) a cada pozo con cubre:
 - **Medio C (co-culture medium):**
 - DMEM (con D-glucosa y Glutamax): 44,5 ml (ref. 10569-010 ThermoFisher)
 - 10% FBS: 5 ml
 - 1% Pen-Str: 0,5ml
 - 50 ng/ml NGF: 25 ul
 - *según el protocolo original, se usaría MEM en vez de DMEM, y también habría que añadir 1% de L-glutamina y 4mg/ml de D-glucosa → como nuestro DMEM ya lleva glutamina y glucosa, no le añadido más.
- Poner un DRG o cels disgregadas a partir de un DRG en cada pozo/cubre e incubar a 37°C
 - En este caso he contado las cels disgregadas: 1million/ml → pongo 32 ul a cada pozo de una placa de 24w y a cada pozo de un culture slide (32000 cels/pozo)
- D1 → cambiar el medio (poner medio C nuevo) → cambio sólo 200ul (la mitad)
- D4 → cambiar el medio por **medio NG** → cambio 400 ul (todo el medio) → en este caso lo haré en D4 (lunes) a primera hora
 - Neurobasal: 48 ml
 - 2% B27: 1 ml
 - 1% L-glutamina (en este caso, Glutamax): 0,5 ml
 - 1% Pen-Str: 0,5 ml
 - 50 ng/ml NGF:25 ul
- *según el protocolo original, también habría que añadir 4mg/ml de D-glucosa → como nuestro Neurobasal ya lleva glucosa, no le añadido más.
- D6 → cambiar el medio (poner medio NG nuevo) → cambio 200 ul (la mitad)
- D7 → cambiar el medio por **Medio de mielinización co-cultivos:**

- Medio C: 30 ml
- 50 ug/ml de ácido ascórbico: 300 ul del stock 5mg/ml (1/100 en el medio)
 - *Preparación previa ácido ascórbico (A4403, Merck): disolver los 100mg en 20ml de DMEM (para hacer 5mg/ml) → congelar en alícuotas de 400 ul tapado con papel de plata*
- 0,5 uM Forskolin: 1,5ul del stock 10mM (1/20000 en el medio)
 - *En el paper de Appelthauser pone 0,05uM, pero creo que en realidad es 0,5um porque es lo que ponen en el paper de Stettner 2013 (en el que ella se basa). Normalmente en las células de Schwann lo usamos a 20um, pero según el paper de Stettner 2013, el forskolin provoca desmielinización (el efecto contrario al deseado).*
- D8 → cambiar el medio (poner medio de mielinización nuevo) → a partir de aquí ir cambiando un día sí uno no (cada 2 días).

Ninguna de las céls de los DRG disgregados han crecido!! Todas muertas!!

16/09/2022

ICC Perfil nodales/paranodales (BD)

Muestras y resultado:

- 22-2-827: neg
- 22-2-830: **NF155 pos → TITULAR!**
- 22-5-828: neg
- 22-2-831: neg
- 22-2-829: neg
- 22-2-832: neg

ELISA CASPR1

Muestras CASPR1: no hago 22-2-830 porque ya era NF155+ conocido

- 22-2-827: neg
- 22-2-831: neg
- 22-5-828: neg
- 22-2-832: neg
- 22-2-829: neg

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	22-2-827	22-2-832										
B blanc	22-2-827	22-2-832										
C prot	22-5-828	Cpos CASPR1										
D blanc	22-5-828	Cpos CASPR1										
E prot	22-2-829											
F blanc	22-2-829											
G prot	22-2-831											
Hblanc	22-2-831											

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	0,084	0,071										
B blanc	0,086	0,094										
C prot	0,056	1,324										
D blanc	0,045	0,174										
E prot	0,075	0,019										
F blanc	0,067											
G prot	0,068											
Hblanc	0,057											

Cambiar medio co-cultivos

- D1 → cambiar el medio (poner medio C nuevo) → cambio 200 ul (la mitad)

19/09/2022

Cambiar medio co-cultivos

Las neuronas no están creciendo en las placas con ganglios disgregados → sólo crecen los ganglios enteros. Las placas de DRG de Elba tampoco están creciendo... Puede que sea el coating?? (Lo hice yo todo junto)

- D4 → cambiar el medio por **medio NG** → cambio 300 ul
 - Neurobasal: 48 ml
 - 2% B27: 1 ml
 - 1% L-glutamina (en este caso, Glutamax): 0,5 ml
 - 1% Pen-Str: 0,5 ml
 - 50 ng/ml NGF: 25 ul

*según el protocolo original, también habría que añadir 4mg/ml de D-glucosa → como nuestro Neurobasal ya lleva glucosa, no le añadido más.

21/09/2022

Cambiar medio co-cultivos

- D6 → cambiar el medio (poner medio NG nuevo) → cambio 200 ul (la mitad)

Coating Poly-D-lys (placas DRG Elba)

Las neuronas no están creciendo y creo que puede ser algún error en el coating (porque no crecen ni mis co-cultivos a partir de ganglios disgregados ni las neuronas de Elba, y lo único que hicimos a la vez fue el coating).

Repito el coating para intentar crecer de nuevo las cels (cambiarlas de placa, ya que están vivas pero redondas).

- 4 placas 100cc: coating con Poly-D-lys 1/40 → incubar overnight a 37°C

22/09/2022

Coating laminina (placas DRG Elba)

- Lavar placas y hacer coating con Laminina 2'5 ul/ml → incubar mínimo 1h a 37°C
- Hacer 1 lavado con PBS1x y pasar las cels de las placas antiguas a las nuevas sin tripsinizarlas (recoger con scrapper)

Congelación PBMC (NHC X4458)

5 tubos de heparina (tapón verde) de Abdón Rodrigo García Martín (NHC X4458, Hospital Ramon y Cajal) → CIDP NF155+ pre-Rituximab

- Diluir sangre 1:1 con suero fisiológico y mezclar por inversión (en un tubo de 50ml)
- En varios tubos de 15ml poner Ficoll siguiendo una relación 1:2 (Ficoll:Sangre con SF) → poner 4 ml de Ficoll a cada tubo y luego añadir 8 ml de sangre con SF (poco a poco, ir liberando gota a gota para no romper el gradiente)
- Centrifugar 20min a 800g sin freno
- Recuperar la interfase de PBMCs (nube blanca) con una pipeta de vidrio+xumet → pasar a un tubo de 50ml con 10ml de suero fisiológico. Después de pasar todas las interfaces, llenar el tubo con más suero fisiológico (hasta 50ml) y agitar por inversión
- Centrifugar 5min a 400g
- Eliminar el sobrenadante, resuspender las células en PBS1x y contar las células → **aprox 40 millones**
- Congelar en FBS+10%DMSO → **8 tubos con 5 millones cels/tubo**

Coating ELISA NF155, CASPR1, CNTN1, NF140

[CASPR1]_i = 0,789 mg/ml

[NF155]_i = 0,20 mg/ml

[CNTN1]_i = 0,25 mg/ml

[NF140]_i = 0,25 mg/ml

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

- CASPR1: 2 placas → 96 pozos [f = 5 ug/ml → 5 ml buffer + 31,6 ul
- NF155: 2 placas → 96 pozos [f = 1 ug/ml → 5 ml buffer + 25 ul
- CNTN1: 48 pozos [f = 1 ug/ml → 2,5 ml buffer + 10 ul
- NF140: 48 pozos [f = 3 ug/ml → 2,5 ml buffer + 30 ul

23/09/2022

Cambiar medio co-cultivos

- D7 → cambiar el medio por **Medio de mielinización co-cultivos**:
 - Medio C: 30 ml
 - 50 ug/ml de ácido ascórbico: 300 ul del stock 5mg/ml (1/100 en el medio)
 - *Preparación previa ácido ascórbico (A4403, Merck): disolver los 100mg en 20ml de DMEM (para hacer 5mg/ml) → congelar en alícuotas de 400 ul tapado con papel de plata*
 - 0,5 uM Forskolin: 1,5ul del stock 10mM (1/20000 en el medio)
 - *En el paper de Appelthauser pone 0,05uM, pero creo que en realidad es 0,5um porque es lo que ponen en el paper de Stettner 2013 (en el que ella se basa). Normalmente en las células de Schwann lo usamos a 20um, pero según el paper de Stettner 2013, el forskolin provoca desmielinización (el efecto contrario al deseado).*

ELISA NF140, NF155, CASPR1, CNTN1 (screening EM vacunes)

Objetivo: testar las muestras del estudio "Efficacy and neurological adverse effects of COVID-19 vaccination in patients immunocompromised for multiple sclerosis"

Muestras (y resultado final): 9 muestras del estudio EM vacunas, y confirmación del resto de positivos que se han encontrado hasta ahora en el estudio

	NHC	Código externo	Tiempo	Box	Posición	Resultado NF140	Resultado NF155	Resultado CNTN1	Resultado CASPR1
319	1867690		T3	Caja 1 (últimas cajas)	B9	neg	neg	neg	neg
320	1553320		T3	Caja 2 (últimas cajas)	G6	neg	Pos muy débil	neg	neg
321	1694993	VACEM280HSJD	T3	Última caja	C3	neg	neg	neg	neg
322	1615358	VACEM422HSJD	T3	Última caja	C5	Pos muy débil	neg	neg	neg
323	1703785	SJD	T3	Caja 3 (últimas cajas)	G4	neg	neg	neg	neg
324	1018612	SJD	T3	Caja 3 (últimas cajas)	G5	neg	neg	neg	neg
325	1124277	SJD	T3	Caja 3 (últimas cajas)	G6	neg	neg	neg	neg
326	1634073	SJD	T3	Caja 3 (últimas cajas)	G7	neg	neg	neg	neg
327	1091021		T3	Caja 3 (últimas cajas)	G8	neg	neg	neg	neg

NF155:

- 304320 (7): neg
- 70054333 (179): **pos**
- 754709 (201): neg
- 4256262 (202): **pos débil**
- 4204483 (205): neg
- 5235005 (231): neg
- 4576893 (255): neg
- 4983277 (263): neg

NF140:

- 1153091 (29): neg
- 229342 (73): neg
- 80005335 (100): **pos**
- 70170685 (104): **pos**
- 4983277 (263): **pos débil**
- 650956 (278): neg
- 70586124 (291): neg

CNTN1:

- 1668802 (44): neg
- 723691 (92): neg
- 70170685 (104): **pos débil**
- 4763708 (152): neg
- 754709 (201): neg

CASPR1:

- 266178 (6): neg
- 493713 (12): neg
- 901936 (18): neg
- 157282 (66): neg
- 229342 (73): neg
- 616940 (78): neg

Protocolo:

- Bloquear con leche 5% en PBS-tween 0'1% → 200 ul pozo (incubar 1h a temp. ambiente)
- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
- Diluir los **sueros**:
 - Screening: diluir sueros 1/100 en leche 5% en PBS-tween 0'1%
- 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 **H₂SO₄** 25%
- Leer a 450-570 nm

NF155/NF140	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	Cneg	321	325	179	231		Cneg	321	325	73	278	
B blanc	Cneg	321	325	179	231		Cneg	321	325	73	278	
C prot	Cpos	322	326	201	255		Cpos	322	326	100	291	
D blanc	Cpos	322	326	201	255		Cpos	322	326	100	291	
E prot	319	323	327	202	263		319	323	327	104		
F blanc	319	323	327	202	263		319	323	327	104		
G prot	320	324	7	205			320	324	29	263		
Hblanc	320	324	7	205			320	324	29	263		

NF155

NF140

CNTN1/CASPR1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	Cneg	321	325	92		Cneg	321	325	12	78		
B blanc	Cneg	321	325	92		Cneg	321	325	12	78		
C prot	Cpos	322	326	104		Cpos	322	326	18			
D blanc	Cpos	322	326	104		Cpos	322	326	18			
E prot	319	323	327	152		319	323	327	66			
F blanc	319	323	327	152		319	323	327	66			
G prot	320	324	44	201		320	324	6	73			
Hblanc	320	324	44	201		320	324	6	73			

CNTN1

CASPR1

NF155/NF140	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	0,047	0,089	0,076	0,34	0,119	0	0,066	0,086	0,069	0,063	0,09	0
B blanc	0,049	0,077	0,059	0,125	0,087	0	0,057	0,084	0,095	0,109	0,081	0
C prot	0,557	0,135	0,089	0,079	0,128	0	0,26	0,073	0,1	0,3	0,08	0
D blanc	0,066	0,139	0,066	0,069	0,125	0	0,068	0,141	0,068	0,142	0,063	0
E prot	0,091	0,1	0,114	0,175	0,147	0	0,074	0,095	0,102	0,622	0	0
F blanc	0,098	0,118	0,139	0,078	0,134	0	0,076	0,15	0,167	0,162	0	0
G prot	0,127	0,116	0,101	0,149	0	0	0,076	0,076	0,152	0,177	0	0
Hblanc	0,062	0,104	0,104	0,095	0	0	0,087	0,089	0,086	0,078	0	0

*El Cpos de NF140 sale muy bajo porque lo pongo muy diluido (no quedaba más)

CNTN1/CASPR1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	0,029	0,052	0,037	0,04	0	0,028	0,05	0,045	0,039	0,053	0	0
B blanc	0,028	0,069	0,046	0,038	0	0,031	0,063	0,051	0,037	0,038	0	0
C prot	0,873	0,054	0,036	0,278	0	0,999	0,05	0,039	0,039	0	0	0
D blanc	0,093	0,115	0,048	0,086	0	0,064	0,106	0,049	0,034	0	0	0
E prot	0,046	0,05	0,052	0,039	0	0,063	0,071	0,058	0,031	0	0	0
F blanc	0,063	0,078	0,088	0,05	0	0,058	0,067	0,104	0,044	0	0	0
G prot	0,045	0,053	0,046	0,044	0	0,044	0,048	0,04	0,035	0	0	0
Hblanc	0,052	0,057	0,044	0,053	0	0,044	0,043	0,045	0,036	0	0	0

ELISA titulación y subclases NF155, CASPR1 y CNTN1 (muestras IMM y muestras BD recerca)

Muestras:

- **NF155:**
 - 22-223801, 22-2-484 BOX 297 (Morón, NHC 1744206, 07/02/2022) → titulación IgG4 sólo hasta 2700 (muestra previa a la muestra actual, para comparar títulos, en teoría fue 1/300)
 - 22-353683 (Morón, NHC 1744206, 12/09/2022) → titulación IgG4
 - 22-353635 (Muñoz Martínez, NHC 1931451, 12/09/2022) → hacer 2 pozos de NF155 (1/100 y 1/300 IgGtot). Muestra positiva por NF155 ICC. Resumen muestras anteriores:
 - 22-269833 (27/04/2022, H.G.U.Santa Lucía: NF140, NF155 y NF186+ por ICC, pero negativas por ELISA y por teasing
 - 22-299451 (07/06/2022, H.G.U.Santa Lucía, envían LCR y suero): igual que muestra anterior.
 - 22-2-680 Box 301 (Héctor Rodríguez, paciente Argentina) → subclases y titulación IgG totales

- 22-2-830 Box 305 (Nasser Wael, Bélgica) → titulación IgG totales (ya es un paciente NF155+ conocido y se le hicieron las subclases anteriormente)

CNTN1:

- 22-345425 (Julio Flores Torres, CMPL.Hosp. Ciudad Real, 13/09/2022, CNTN1+ por ICC) → subclases y titulación IgG totales
- 22-355156: poner 1 pozo (CNTN1 dudosa por ICC)
- 22-361173 (Rogelio, fue CNTN1+ y luego negativizó,): poner 1 pozo

CASPR1:

- 22-340128 (Bocanegra, NHC 1108585, 18/08/2022) → subclases y titulación IgG totales
- 22-355156: poner 1 pozo (ELISA CASPR1 previo sucio)
- 22-355984: poner 1 pozo (ELISA CASPR1 previo sucio)

PLACA 1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	223801 1/100	353683 1/100	353683 1/8100	22-2- 680 1/100	22-2- 680 1/8100	22-2- 830 1/900	22-2- 680 IgG1	Cneg	345425 1/100	345425 1/8100	345425 IgG1	Cneg
B blanc	223801 1/100	353683 1/100	353683 1/8100	22-2- 680 1/100	22-2- 680 1/8100	22-2- 830 1/900	22-2- 680 IgG1	Cneg	345425 1/100	345425 1/8100	345425 IgG1	Cneg
C prot	223801 1/300	353683 1/300	353683 1/24300	22-2- 680 1/300	22-2- 680 1/24300	22-2- 830 1/2700	22-2- 680 IgG2	Cpos NF155	345425 1/300	345425 1/24300	345425 IgG2	Cpos CNTN1
D blanc	223801 1/300	353683 1/300	353683 1/24300	22-2- 680 1/300	22-2- 680 1/24300	22-2- 830 1/2700	22-2- 680 IgG2	Cpos NF155	345425 1/300	345425 1/24300	345425 IgG2	Cpos CNTN1
E prot	223801 1/900	353683 1/900	353635 1/100	22-2- 680 1/900	22-2- 830 1/100	22-2- 830 1/8100	22-2- 680 IgG3		345425 1/900	355156 1/100	345425 IgG3	
F blanc	223801 1/900	353683 1/900	353635 1/100	22-2- 680 1/900	22-2- 830 1/100	22-2- 830 1/8100	22-2- 680 IgG3		345425 1/900	355156 1/100	345425 IgG3	
G prot	223801 1/2700	353683 1/2700	353635 1/300	22-2- 680 1/2700	22-2- 830 1/300	22-2- 830 1/24300	22-2- 680 IgG4		345425 1/2700	361173 1/100	345425 IgG4	
Hblanc	223801 1/2700	353683 1/2700	353635 1/300	22-2- 680 1/2700	22-2- 830 1/300	22-2- 830 1/24300	22-2- 680 IgG4		345425 1/2700	361173 1/100	345425 IgG4	

NF155

CNTN1

PLACA 2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	340128 1/100	340128 1/8100	340128 IgG1	Cneg								
B blanc	340128 1/100	340128 1/8100	340128 IgG1	Cneg								
C prot	340128 1/300	340128 1/24300	340128 IgG2	Cpos CASPR1								
D blanc	340128 1/300	340128 1/24300	340128 IgG2	Cpos CASPR1								
E prot	340128 1/900	355156 1/100	340128 IgG3									
F blanc	340128 1/900	355156 1/100	340128 IgG3									
G prot	340128 1/2700	355984 1/100	340128 IgG4									
Hblanc	340128 1/2700	355984 1/100	340128 IgG4									

CASPR1

PLACA 1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	0,931	0,827	0,044	0,876	0,067	0,094	0,236	0,088	1,503	0,179	0,533	0,06
B blanc	0,007	0,019	0,023	0,093	0,028	0,047	0,028	0,096	0,074	0,025	0,028	0,099
C prot	0,507	0,45	0,027	0,583	0,041	0,05	0,05	0,764	1,269	0,081	0,044	1,34
D blanc	0,019	0,02	0,022	0,056	0,025	0,031	0,022	0,042	0,044	0,023	0,022	0,168
E prot	0,181	0,194	0,053	0,284	0,416	0,032	0,023	0	0,853	0,073	0,049	0
F blanc	0,021	0,022	0,055	0,033	0,111	0,025	0,022	0	0,034	0,138	0,028	0
G prot	0,098	0,077	0,036	0,131	0,196	0,022	1,341	0	0,397	0,055	1,644	0
Hblanc	0,018	0,017	0,036	0,028	0,058	0,021	0,025	0	0,031	0,062	0,063	0

PLACA 2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	0,579	0,096	0,161	0,104	0	0	0	0	0	0	0	0
B blanc	0,114	0,125	0,106	0,178	0	0	0	0	0	0	0	0
C prot	0,278	0,155	0,111	1,255	0	0	0	0	0	0	0	0
D blanc	0,188	0,085	0,114	0,178	0	0	0	0	0	0	0	0
E prot	0,176	0,142	0,12	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F blanc	0,123	0,205	0,09	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G prot	0,147	0,205	0,238	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hblanc	0,247	0,311	0,223	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Protocolo:

- Bloquear con leche 5% en PBS-tween 0'1% → 200 ul pozo (incubar 1h a temp. ambiente)
- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
- Diluir los **sueros**:
 - Titulación: 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 (a: 1/100, b:1/300, c:1/900, d: 1/2700, e: 1/8100 i f: 1/24300)
 - Subclases: diluir sueros 1/100 en leche 5% en PBS-tween 0'1%
- Incubar con los sueros 1h
- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
- Incubar 45min con **RAH IgG HRP** 1/3000 o **MAH HRP** IgG1 o IgG2 o IgG3 o IgG4 1/1000 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 **H₂SO₄** 25%
- Leer a 450-570 nm

Resultado:

- **NF155:**
 - 22-223801, 22-2-484 BOX 297 (Morón, NHC 1744206, 07/02/2022): 1/2700 (IgG4)
 - 22-353683 (Morón, NHC 1744206, 12/09/2022): 1/2700 (IgG4)
 - 22-353635 (Muñoz Martínez, NHC 1931451, 12/09/2022): negativo
 - 22-2-680 Box 301 (Héctor Rodríguez, paciente Argentina): 1/8100 (IgG totales), IgG4>IgG1
 - 22-2-830 Box 305 (Nasser Wael, Bélgica): 1/900 (IgG totales)
- **CNTN1:**
 - 22-345425 (Julio Flores Torres, CMPL.Hosp. Ciudad Real, 13/09/2022): >1/24300 (IgG totales), IgG4>IgG1
 - 22-355156: negativo
 - 22-361173 (Rogelio, fue CNTN1+ y luego negativizó): negativo

- **CASPR1:**
 - 22-340128 (Bocanegra, NHC 1108585, 18/08/2022): 1/300 (IgG totales), las subclases no salen (hay que hacerlas con el suero más concentrado)
 - 22-355156: negativo
 - 22-355984: negativo

27/09/2022

Cambiar medio co-cultivos

- D12 → cambiar el medio (poner medio mielinización nuevo) → cambio 200 ul (la mitad)

30/09/2022

Cambiar medio co-cultivos

- D15 → cambiar el medio (poner medio mielinización nuevo) → cambio 200 ul (la mitad)

03/10/2022

Cambiar medio co-cultivos

- D18 → cambiar el medio (poner medio mielinización nuevo) → cambio 200 ul (la mitad)

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

04/10/2022

ELISA Gangliósidos día 1 (EM vacunas 88-128)

Objetivo: testar las muestras del estudio "Efficacy and neurological adverse effects of COVID-19 vaccination in patients immunocompromised for multiple sclerosis"

Muestras: (40 muestras del estudio EM vacunas – IgG e IgM)

	NHC	Código externo	Tiempo	Box	Posición	Resultado GM1	Resultado GD1b	Resultado GQ1b
88	238309	VACEM28	T3	SANT PAU T3.1	A7	neg	neg	neg
89	70078519	VACEM14	T3	SANT PAU T3.1	A9	neg	neg	neg
90	720338	VACEM19	T3	SANT PAU T3.1	B1	neg	neg	neg
91	4711711	VACEM24	T3	SANT PAU T3.1	B2	neg	neg	neg
92	723691	VACEM34	T3	SANT PAU T3.1	B3	neg	neg	1/100
93	4873702	VACEM32	T3	SANT PAU T3.1	B7	neg	neg	neg
94	552403	VACEM21	T3	SANT PAU T3.1	B8	neg	neg	neg
95	70219839	VACEM13	T3	SANT PAU T3.1	C3	neg	neg	neg
96	5190628	VACEM299	T3	SANT PAU T3.1	C4	neg	neg	neg
97	677065	VACEM43	T3	SANT PAU T3.1	C8	neg	neg	neg
98	357152	VACEM53	T3	SANT PAU T3.1	D1	neg	neg	neg
99	21043	VACEM42	T3	SANT PAU T3.1	D4	neg	neg	neg
100	80005335	VACEM36	T3	SANT PAU T3.1	D5	neg	neg	neg
101	70333876	VACEM39	T3	SANT PAU T3.1	D6	1/500	neg	solo 1/500
102	4111416	VACEM37	T3	SANT PAU T3.1	D7	neg	neg	solo 1/500
103	4027577	VACEM54	T3	SANT PAU T3.1	D8	1/100	neg	neg
104	70170685	VACEM40	T3	SANT PAU T3.1	D9	neg	neg	solo 1/500
105	70023763	VACEM1	T3	SANT PAU T3.1	E1	1/500	1/100	1/100
106	306481	VACEM52	T3	SANT PAU T3.1	E3	neg	neg	neg
107	5068000	VACEM33	T3	SANT PAU T3.1	E5	neg	neg	solo 1/500
108	70410448	VACEM57	T3	SANT PAU T3.1	E6	solo 1/500	neg	neg
109	4628820	VACEM65	T3	SANT PAU T3.1	E9	neg	neg	neg
110	70314943	VACEM10	T3	SANT PAU T3.1	F1	neg	neg	1/100
111	4744739	VACEM25	T3	SANT PAU T3.1	F2	neg	neg	neg
112	4189922	VACEM327	T3	SANT PAU T3.1	F3	neg	neg	neg
113	70340291	VACEM61	T3	SANT PAU T3.1	F5	neg	neg	neg
114	70155813	VACEM71	T3	SANT PAU T3.1	F8	neg	neg	neg
115	5358672	VACEM78	T3	SANT PAU T3.1	F9	1/100	neg	neg
116	5359092	VACEM63	T3	SANT PAU T3.1	G3	1/500	neg	neg
117	545025	VACEM102	T3	SANT PAU T3.1	G5	neg	neg	neg
118	5355578	VACEM49	T3	SANT PAU T3.1	G6	solo 1/500	neg	neg
119	694148	VACEM336	T3	SANT PAU T3.1	G7	neg	neg	neg
120	70364021	VACEM46	T3	SANT PAU T3.1	G8	neg	neg	neg
121	70506293	VACEM70	T3	SANT PAU T3.1	G9	repetir	repetir	repetir
122	4550190	VACEM5	T3	SANT PAU T3.1	H2	neg	neg	neg
123	5341820	VACEM41	T3	SANT PAU T3.1	H3	neg	neg	neg
124	4597824	VACEM100	T3	SANT PAU T3.1	H4	neg	neg	neg

125	4090279	VACEM3	T3	SANT PAU T3.1	H5	neg	neg	neg
126	5017966	VACEM67	T3	SANT PAU T3.1	H6	neg	neg	neg
127	4279909	VACEM76	T3	SANT PAU T3.1	H8	neg	neg	neg
128	276746	VACEM136	T3	SANT PAU T3.1	I1	neg	neg	neg

Protocolo:

- Descongelar placas con gangliósidos (preparadas día 16/08/22)
- **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.
- Poner 100 ul de suero a cada pozo, incubar toda la noche a 4°C

PLACA 1	1 blanco	2 GM1	3 GD1b	4 GQ1b	5 blanco	6 GM1	7 GD1b	8 GQ1b	9 blanco	10 GM1	11 GD1b	12 GQ1b
A 1/100	88			89			90					
B 1/500	88			89			90					
C 1/100	91			92			93					
D 1/500	91			92			93					
E 1/100	88			89			90					
F 1/500	88			89			90					
G 1/100	91			92			93					
H 1/500	91			92			93					

PLACA 2	1 blanco	2 GM1	3 GD1b	4 GQ1b	5 blanco	6 GM1	7 GD1b	8 GQ1b	9 blanco	10 GM1	11 GD1b	12 GQ1b
A 1/100	94			95			96					
B 1/500	94			95			96					
C 1/100	97			98			99					
D 1/500	97			98			99					
E 1/100	94			95			96					
F 1/500	94			95			96					
G 1/100	97			98			99					
H 1/500	97			98			99					

PLACA 3	1 blanco	2 GM1	3 GD1b	4 GQ1b	5 blanco	6 GM1	7 GD1b	8 GQ1b	9 blanco	10 GM1	11 GD1b	12 GQ1b
A 1/100	100			101			102					
B 1/500	100			101			102					
C 1/100	103			104			105					
D 1/500	103			104			105					
E 1/100	100			101			102					
F 1/500	100			101			102					
G 1/100	103			104			105					
H 1/500	103			104			105					

PLACA 4	1 blanco	2 GM1	3 GD1b	4 GQ1b	5 blanco	6 GM1	7 GD1b	8 GQ1b	9 blanco	10 GM1	11 GD1b	12 GQ1b
A 1/100	106				107				108			
B 1/500	106				107				108			
C 1/100	109				110				111			
D 1/500	109				110				111			
E 1/100	106				107				108			
F 1/500	106				107				108			
G 1/100	109				110				111			
H 1/500	109				110				111			

PLACA 5	1 blanco	2 GM1	3 GD1b	4 GQ1b	5 blanco	6 GM1	7 GD1b	8 GQ1b	9 blanco	10 GM1	11 GD1b	12 GQ1b
A 1/100	112				113				114			
B 1/500	112				113				114			
C 1/100	115				116				117			
D 1/500	115				116				117			
E 1/100	112				113				114			
F 1/500	112				113				114			
G 1/100	115				116				117			
H 1/500	115				116				117			

PLACA 6	1 blanco	2 GM1	3 GD1b	4 GQ1b	5 blanco	6 GM1	7 GD1b	8 GQ1b	9 blanco	10 GM1	11 GD1b	12 GQ1b
A 1/100	118				119				120			
B 1/500	118				119				120			
C 1/100	121				122				123			
D 1/500	121				122				123			
E 1/100	118				119				120			
F 1/500	118				119				120			
G 1/100	121				122				123			
H 1/500	121				122				123			

PLACA 7	1 blanco	2 GM1	3 GD1b	4 GQ1b	5 blanco	6 GM1	7 GD1b	8 GQ1b	9 blanco	10 GM1	11 GD1b	12 GQ1b
A 1/100	124				125				126			
B 1/500	124				125				126			
C 1/100	127				128				Cpos IgG			
D 1/500	127				128				Cpos IgG			
E 1/100	124				125				126			
F 1/500	124				125				126			
G 1/100	127				128				Cpos IgM			
H 1/500	127				128				Cpos IgM			

ICC Perfil (muestras EM vacunas)

Objetivo: testar las muestras del estudio "Efficacy and neurological adverse effects of COVID-19 vaccination in patients immunocompromised for multiple sclerosis" → confirmar la positividad de las muestras que han dado 2 veces positivo por ELISA de alguna proteína nodo/paranodal.

Muestras: cels fijadas

- NF155:
 1. 70054333 (179)
 2. 4256262 (202)
- NF140:
 1. 80005335 (100)
 2. 70170685 (104)
 3. 4983277 (263)
- CNTN1:
 1. 70170685 (104)

Resultado: no se ve ningún positivo claramente, aunque todos tienen algo de marcaje. Repetir ICC pero con las células vivas (sin fijar).

ICC Perfil (BD)

Muestra:

- 22-2-854 Box 306 (muestra urgente de Bélgica)

Hago 2 portas de perfil:

- Porta 1
 - arriba (en orden): 104, 100, 179, 100
 - abajo (en orden): CNTN1+, 104, 202, 104
- Porta 2
 - arriba: 22-2-854
 - abajo (en orden): CNTN1+, 263, NF155+, 263

Resultado: 22-2-854 CNTN1+ → titular y hacer subclases!!

05/10/2022

Coating células + transfección Culture slides

24 culture slides:

- | | |
|-------------|-----------------|
| · 12 Perfil | · 1 LIF* |
| · 4 LRP4 | · 2LRP4/CASPR2 |
| · 4 ATP4A/B | · 1 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

*2 horas (2 pozos) y 4 horas (4 pozos) después de transfectar → añadir **eBioscience Protein transport inhibitor (00-4980-03, ThermoFisher)** a los pocillos de LIF (para intentar que el LIF se quede dentro de la célula y no se secrete) → **1/500** (alícuota caja -20°C)

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
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 **11 placas** (3 columnas de cada gangliósido/placa):
 - GM1: 30 ml metanol + 60 ul GM1 reconstituído
 - GD1b: 30 ml metanol + 60 ul GD1b reconstituído
 - GQ1b: 30 ml metanol + 120 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

ELISA Gangliósidos día 2 (EM vacunas 88-128)

Protocolo:

- Lavar 4 veces con PBS
- Preparar **Ac secundarios**: RAH HRP IgG dil. 1/5000 en PBS-BSA 0'1%. Poner 100 ul de la dilución a cada pozo, incubar 2h a 4°C (**en este caso me he liado y he hecho los Ac.secundarios a 1/3000!!**)
- 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 **H₂SO₄** al 25% a cada pozo.
- Leer en lector de placas de ELISA a 490-630 nm

Resultado:

PLACA 1	1 blanco	2 GM1	3 GD1b	4 GQ1b	5 blanco	6 GM1	7 GD1b	8 GQ1b	9 blanco	10 GM1	11 GD1b	12 GQ1b
A 1/100	2,393	1,58	1,504	1,747	1,094	0,793	0,666	0,48	2,351	1,691	1,313	1,118
B 1/500	1,871	1,048	0,876	0,691	0,91	0,536	0,601	0,61	1,411	0,926	0,975	0,765
C 1/100	1,512	1,122	0,834	0,928	1,924	1,279	1,298	0,828	1,066	0,997	0,726	0,598
D 1/500	0,969	0,655	0,682	0,822	1,31	0,8	0,679	0,95	0,609	0,679	0,698	0,597
E 1/100	1,477	0,85	0,748	0,391	1,122	0,668	0,512	0,2	1,435	0,558	0,493	0,343
F 1/500	0,663	0,319	0,309	0,224	0,537	0,248	0,274	0,131	0,728	0,236	0,267	0,193
G 1/100	1,632	1,261	1,106	0,715	1,571	0,995	0,826	0,533	0,987	0,481	0,396	0,227
H 1/500	0,726	0,471	0,419	0,219	0,689	0,372	0,307	0,19	0,432	0,193	0,21	0,163

PLACA 2	1 blanco	2 GM1	3 GD1b	4 GQ1b	5 blanco	6 GM1	7 GD1b	8 GQ1b	9 blanco	10 GM1	11 GD1b	12 GQ1b
A 1/100	1,98	1,567	1,229	1,041	1,225	1,131	1,134	1,363	1,46	1,42	1,242	1,259
B 1/500	1,253	0,901	0,769	0,898	0,821	0,645	0,742	1,03	0,931	0,85	0,831	0,853
C 1/100	1,356	0,88	0,891	0,808	1,239	1,248	1,154	1,477	1,999	1,541	1,542	1,787
D 1/500	0,905	0,808	0,752	0,831	0,905	0,708	0,687	0,935	1,446	1,115	0,964	1,541
E 1/100	1,729	1,264	1,127	0,917	1,299	0,929	0,731	0,411	0,758	0,567	0,447	0,348
F 1/500	0,894	0,475	0,472	0,382	0,599	0,4	0,339	0,19	0,395	0,272	0,225	0,163
G 1/100	1,231	0,976	0,87	0,588	1,625	0,906	0,875	0,608	1,87	1,626	1,429	0,945
H 1/500	0,565	0,379	0,332	0,268	0,803	0,374	0,421	0,265	1,073	0,787	0,687	0,373

PLACA 3	1 blanco	2 GM1	3 GD1b	4 GQ1b	5 blanco	6 GM1	7 GD1b	8 GQ1b	9 blanco	10 GM1	11 GD1b	12 GQ1b
A 1/100	1,405	1,194	0,929	1,207	0,946	1,028	0,923	0,894	1,988	1,384	1,29	1,328
B 1/500	0,963	0,806	0,744	0,915	0,455	0,726	0,495	0,962	0,927	0,899	0,849	1,062
C 1/100	1,519	1,81	1,102	1,44	1,961	1,906	1,805	1,88	1,351	1,781	1,848	1,725
D 1/500	1,067	1,145	0,839	1,244	1,258	1,324	1,187	1,434	0,964	1,096	0,97	1,08
E 1/100	1,339	0,836	0,767	1,018	0,783	0,436	0,291	0,243	1,314	0,936	0,857	0,825
F 1/500	0,658	0,499	0,472	0,376	0,366	0,177	0,227	0,202	0,7	0,392	0,311	0,278
G 1/100	1,508	0,908	0,773	0,696	2,035	1,549	1,448	0,983	1,494	1,345	1,337	0,944
H 1/500	0,663	0,419	0,368	0,317	1,32	0,769	0,615	0,422	0,779	0,564	0,481	0,395

PLACA 4	1 blanco	2 GM1	3 GD1b	4 GQ1b	5 blanco	6 GM1	7 GD1b	8 GQ1b	9 blanco	10 GM1	11 GD1b	12 GQ1b
A 1/100	1,652	1,317	1,048	1,037	1,496	1,368	1,417	1,311	0,81	0,895	0,812	0,659
B 1/500	0,977	0,935	0,791	0,79	0,971	0,711	0,763	1,1	0,51	0,612	0,541	0,423
C 1/100	1,741	1,461	1,133	1,44	0,959	0,86	0,938	1,209	1,902	1,798	1,796	1,542
D 1/500	0,921	0,717	0,524	0,904	0,812	0,515	0,73	0,901	1,109	0,931	0,726	0,654
E 1/100	1,743	1,204	0,852	0,799	1,498	0,896	0,664	0,584	1,08	0,515	0,399	0,368
F 1/500	0,739	0,454	0,387	0,411	0,949	0,418	0,341	0,229	0,555	0,214	0,177	0,226
G 1/100	1,105	0,86	0,744	0,447	0,892	0,749	0,452	0,306	1,474	0,798	0,661	0,435
H 1/500	0,511	0,362	0,422	0,364	0,526	0,264	0,216	0,204	0,803	0,395	0,407	0,19

PLACA 5	1 blanco	2 GM1	3 GD1b	4 GQ1b	5 blanco	6 GM1	7 GD1b	8 GQ1b	9 blanco	10 GM1	11 GD1b	12 GQ1b
A 1/100	0,962	0,972	0,958	0,702	1,298	1,037	0,89	0,689	1,785	1,553	1,47	1,179
B 1/500	0,584	0,626	0,578	0,759	0,791	0,654	0,661	0,847	0,973	0,869	0,777	0,813
C 1/100	1,892	2,02	1,765	1,881	2,345	2,901	2,192	1,79	1,822	1,733	1,532	1,103
D 1/500	0,905	0,924	0,954	0,733	1,121	1,403	1,162	1,056	0,967	0,881	0,859	1,029
E 1/100	1,412	0,871	0,798	0,524	1,207	0,736	0,812	0,467	1,291	1,052	0,823	0,479
F 1/500	0,595	0,297	0,326	0,239	0,515	0,292	0,339	0,259	0,903	0,395	0,376	0,242
G 1/100	1,322	0,664	0,649	0,526	1,615	1,007	0,985	0,627	2,129	1,603	1,206	0,97
H 1/500	0,585	0,31	0,288	0,199	0,937	0,418	0,453	0,334	1,03	0,677	0,556	0,396

PLACA 6	1 blanco	2 GM1	3 GD1b	4 GQ1b	5 blanco	6 GM1	7 GD1b	8 GQ1b	9 blanco	10 GM1	11 GD1b	12 GQ1b
A 1/100	1,2	1,092	1,193	0,993	1,104	1,187	0,639	0,74	1,606	1,433	0,946	0,759
B 1/500	0,812	0,956	0,819	0,693	0,787	0,699	0,74	0,611	0,836	0,711	0,402	0,296
C 1/100	3,434	3,429	3,438	3,336	1,32	1,186	1,365	0,911	1,069	0,78	0,802	0,798
D 1/500	3,03	3,094	3,097	2,613	0,698	0,681	0,587	0,691	0,727	0,52	0,452	0,382
E 1/100	1,299	0,766	0,824	0,534	1,644	0,899	0,923	0,758	1,397	0,667	0,761	0,534
F 1/500	0,683	0,557	0,52	0,324	0,996	0,485	0,543	0,464	0,718	0,469	0,447	0,577
G 1/100	2,027	1,527	1,289	0,766	0,855	0,565	0,545	0,572	1,059	0,893	0,903	0,509
H 1/500	1,151	1,041	0,835	0,442	0,546	0,364	0,482	0,405	0,676	0,63	0,413	0,251

PLACA 7	1 blanco	2 GM1	3 GD1b	4 GQ1b	5 blanco	6 GM1	7 GD1b	8 GQ1b	9 blanco	10 GM1	11 GD1b	12 GQ1b
A 1/100	2,175	2,063	1,575	1,596	0,846	0,684	0,606	0,8	1,235	0,77	0,675	0,785
B 1/500	1,177	0,905	0,607	0,831	0,445	0,315	0,363	0,481	0,65	0,43	0,404	0,482
C 1/100	0,584	0,435	0,422	0,49	2,115	1,993	1,847	1,686	1,816	3,326	3,165	3,282
D 1/500	0,35	0,229	0,265	0,453	0,914	0,803	0,657	0,692	1,219	2,815	2,432	1,998
E 1/100	1,399	1,086	0,892	0,613	0,356	0,198	0,173	0,12	1,495	1,315	1,215	0,73
F 1/500	0,852	0,361	0,337	0,279	0,142	0,085	0,083	0,06	0,822	0,598	0,52	0,362
G 1/100	1,257	0,725	0,686	0,434	1,639	1,18	1,213	0,64	1,896	2,63	2,552	1,661
H 1/500	0,572	0,335	0,245	0,183	0,92	0,42	0,363	0,224	1,587	2,493	2,23	0,841

Cambiar medio co-cultivos

- D20 → cambiar el medio (poner medio mielinización nuevo) → cambio 200 ul (la mitad)

06/10/2022

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, bloquear y congelar a -80

ELISA Gangliósidos día 1 (EM vacunas 129-163)

Objetivo: testar las muestras del estudio "Efficacy and neurological adverse effects of COVID-19 vaccination in patients immunocompromised for multiple sclerosis"

Muestras: (35 muestras del estudio EM vacunas – IgG e IgM)

	NHC	Código externo	Tiempo	Box	Posición	Resultado GM1	Resultado GD1b	Resultado GQ1b
129	634826	VACEM68	T3	SANT PAU T3.1	I2	neg	neg	neg
130	608283	VACEM77	T3	SANT PAU T3.1	I4	neg	neg	neg
131	4659257	VACEM134	T3	SANT PAU T3.1	I5	neg	neg	neg
132	4161807	VACEM202	T3	SANT PAU T3.1	I6	neg	neg	neg
133	4094593	VACEM95	T3	SANT PAU T3.1	I7	neg	neg	neg
134	4877075	VACEM87	T3	SANT PAU T3.1	I8	neg	neg	neg
135	324829	VACEM93	T3	SANT PAU T3.1	I9	neg	neg	neg

136	4011252	VACEM82	T3	SANT PAU T3.2	A1	neg	neg	neg
137	4822649	VACEM79	T3	SANT PAU T3.2	A5	neg	neg	neg
138	4267257	VACEM56	T3	SANT PAU T3.2	A6	neg	neg	neg
139	4549999	VACEM89	T3	SANT PAU T3.2	A7	neg	neg	neg
140	70412523	VACEM146	T3	SANT PAU T3.2	A8	neg	neg	neg
141	4649631	VACEM75	T3	SANT PAU T3.2	A9	neg	neg	neg
142	70771910	VACEM143	T3	SANT PAU T3.2	B1	neg	neg	neg
143	5266661	VACEM92	T3	SANT PAU T3.2	B4	neg	neg	neg
144	234419	VACEM232	T3	SANT PAU T3.2	B5	neg	neg	neg
145	4664258	VACEM88	T3	SANT PAU T3.2	B6	neg	neg	neg
146	70349200	VACEM128	T3	SANT PAU T3.2	B7	neg	neg	neg
147	70606667	VACEM139	T3	SANT PAU T3.2	B8	neg	neg	neg
148	514190	VACEM44	T3	SANT PAU T3.2	C2	neg	neg	neg
149	378000	VACEM81	T3	SANT PAU T3.2	C3	neg	neg	neg
150	4937694	VACEM62	T3	SANT PAU T3.2	C4	neg	neg	neg
151	4156788	VACEM105	T3	SANT PAU T3.2	C5	neg	neg	neg
152	4763708	VACEM86	T3	SANT PAU T3.2	C6	neg	neg	neg
153	4116432	VACEM97	T3	SANT PAU T3.2	C7	neg	neg	neg
154	70702764	VACEM259	T3	SANT PAU T3.2	C8	neg	neg	neg
155	522610	VACEM200	T3	SANT PAU T3.2	C9	neg	neg	neg
156	5325458	VACEM98	T3	SANT PAU T3.2	D3	neg	neg	neg
157	5348568	VACEM113	T3	SANT PAU T3.2	D4	neg	neg	neg
158	4225047	VACEM45	T3	SANT PAU T3.2	D5	neg	neg	neg
159	4771037	VACEM236	T3	SANT PAU T3.2	D6	neg	neg	neg
160	5033090	VACEM148	T3	SANT PAU T3.2	D7	neg	neg	neg
161	4428266	VACEM168	T3	SANT PAU T3.2	D8	neg	neg	neg
162	4611072	VACEM101	T3	SANT PAU T3.2	D9	neg	neg	neg
163	4701221	VACEM207	T3	SANT PAU T3.2	E2	neg	neg	neg

Protocolo:

- Descongelar placas con gangliósidos (preparadas día 04/10/22)
- **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.
- Poner 100 ul de suero a cada pozo, incubar toda la noche a 4°C

PLACA 1	1 blanco	2 GM1	3 GD1b	4 GQ1b	5 blanco	6 GM1	7 GD1b	8 GQ1b	9 blanco	10 GM1	11 GD1b	12 GQ1b
A 1/100	129				130				131			
B 1/500	129				130				131			
C 1/100	132				133				134			
D 1/500	132				133				134			
E 1/100	129				130				131			
F 1/500	129				130				131			
G 1/100	132				133				134			
H 1/500	132				133				134			

PLACA 2	1 blanco	2 GM1	3 GD1b	4 GQ1b	5 blanco	6 GM1	7 GD1b	8 GQ1b	9 blanco	10 GM1	11 GD1b	12 GQ1b
A 1/100	135				136				137			
B 1/500	135				136				137			
C 1/100	138				139				140			
D 1/500	138				139				140			
E 1/100	135				136				137			
F 1/500	135				136				137			
G 1/100	138				139				140			
H 1/500	138				139				140			

PLACA 3	1 blanco	2 GM1	3 GD1b	4 GQ1b	5 blanco	6 GM1	7 GD1b	8 GQ1b	9 blanco	10 GM1	11 GD1b	12 GQ1b
A 1/100	141				142				143			
B 1/500	141				142				143			
C 1/100	144				145				146			
D 1/500	144				145				146			
E 1/100	141				142				143			
F 1/500	141				142				143			
G 1/100	144				145				146			
H 1/500	144				145				146			

PLACA 4	1 blanco	2 GM1	3 GD1b	4 GQ1b	5 blanco	6 GM1	7 GD1b	8 GQ1b	9 blanco	10 GM1	11 GD1b	12 GQ1b
A 1/100	147				148				149			
B 1/500	147				148				149			
C 1/100	150				151				152			
D 1/500	150				151				152			
E 1/100	147				148				149			
F 1/500	147				148				149			
G 1/100	150				151				152			
H 1/500	150				151				152			

PLACA 5	1 blanco	2 GM1	3 GD1b	4 GQ1b	5 blanco	6 GM1	7 GD1b	8 GQ1b	9 blanco	10 GM1	11 GD1b	12 GQ1b
A 1/100	153			154			155					
B 1/500	156			157			158					
C 1/100	153			154			155					
D 1/500	156			157			158					
E 1/100	153			154			155					
F 1/500	156			157			158					
G 1/100	153			154			155					
H 1/500	156			157			158					

PLACA 6	1 blanco	2 GM1	3 GD1b	4 GQ1b	5 blanco	6 GM1	7 GD1b	8 GQ1b	9 blanco	10 GM1	11 GD1b	12 GQ1b
A 1/100	159			160			161					
B 1/500	162			163			Cpos IgG					
C 1/100	159			160			161					
D 1/500	162			163			Cpos IgM					
E 1/100	159			160			161					
F 1/500	162			163			Cpos IgM					
G 1/100	159			160			161					
H 1/500	162			163			Cpos IgM					

ICC Perfil (muestras EM vacunas)

Objetivo: testar las muestras del estudio "*Efficacy and neurological adverse effects of COVID-19 vaccination in patients immunocompromised for multiple sclerosis*" → confirmar la positividad de las muestras que han dado 2 veces positivo por ELISA de alguna proteína nodo/paranodal.

Muestras: cels vivas

- NF155:
 1. 70054333 (179)
 2. 4256262 (202)
- NF140:
 2. 80005335 (100)
 3. 70170685 (104)
 4. 4983277 (263)
- CNTN1:
 1. 70170685 (104)

Uso 1 porta de Perfil:

2. arriba (en orden): 104, 100, 179, 263
3. abajo (en orden): CNTN1+ , 104, 202, Cneg

Resultado: parece que haya cruce de canales en todas las muestras... repetir sin poner anticuerpo comercial.

ICC LIF (GDP, prueba transfección y protein inhibitor)

Objetivo: probar de nuevo la transfección del plásmido LIF

Muestras:

- Cneg
- GDP1

Anticuerpo comercial anti-LIF (Invitrogen) 1/100

Resultado: en los pozos en que puse Protein transport inhibitor no hay prácticamente células. En los dos pozos transfectados normal, se ven algunas células transfectadas (positivas por anti-LIF), pero la muestra GDP1 no es positiva. Seguir haciendo pruebas (poner suero más concentrado, hacer la ICC vivas, etc). Comprovar qué tag tiene el plásmido (quizás cambia la conformación de la proteína y se pierde la parte antigénica).

ICC Perfil (BD)

Muestras: se hace ICC en CS (CNTN1, NF140, NF155, NF186)

- 22-2-851 Box307 → negativo
- 22-2-852 Box307 → negativo
- 22-2-853 Box307 → negativo
- 22-2-854 Box 307 (sólo se hace CNTN1) → se confirma CNTN1+

07/10/2022

ELISA Gangliósidos día 2 (EM vacunas 129-163)

Protocolo:

- Lavar 4 veces con PBS
- Preparar **Ac secundarios:** RAH HRP IgG dil. 1/5000 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 **H₂SO₄** al 25% a cada pozo.
- Leer en lector de placas de ELISA a 490-630 nm

Resultado:

PLACA 1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	blanco	GM1	GD1b	GQ1b	blanco	GM1	GD1b	GQ1b	blanco	GM1	GD1b	GQ1b
A 1/100	1,162	0,852	0,818	0,617	1,194	0,791	0,809	0,707	1,564	1,185	1,211	0,868
B 1/500	0,747	0,521	0,548	0,484	0,841	0,551	0,656	0,484	0,942	0,735	0,723	0,521
C 1/100	1,794	1,241	1,151	0,717	1,505	0,971	1,019	0,831	1,771	1,129	1,32	0,881
D 1/500	1,112	0,659	0,593	0,586	0,913	0,539	0,547	0,44	1,023	0,743	0,628	0,631
E 1/100	1,606	1,401	1,285	0,793	1,514	1,012	0,991	0,643	1,52	1,127	1,182	0,535
F 1/500	0,842	0,543	0,553	0,388	0,723	0,38	0,379	0,206	0,99	0,422	0,366	0,223
G 1/100	1,12	0,52	0,539	0,298	1,118	0,87	0,713	0,383	0,778	0,532	0,491	0,257
H 1/500	0,459	0,153	0,184	0,112	0,56	0,278	0,235	0,149	0,295	0,17	0,17	0,108

PLACA 2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	blanco	GM1	GD1b	GQ1b	blanco	GM1	GD1b	GQ1b	blanco	GM1	GD1b	GQ1b
A 1/100	2,143	1,311	1,339	0,857	1,363	0,714	1,008	0,619	1,458	0,904	0,845	0,913
B 1/500	1,622	0,825	0,784	0,593	1,073	0,629	0,712	0,641	0,873	0,613	0,748	0,605
C 1/100	1,037	0,71	0,816	0,581	1,434	0,859	0,794	0,531	1,757	1,518	1,486	1,255
D 1/500	0,747	0,609	0,504	0,428	0,871	0,671	0,76	0,455	0,949	0,906	0,895	0,712
E 1/100	0,983	0,645	0,577	0,353	1,214	0,783	0,738	0,542	1,355	0,783	0,622	0,331
F 1/500	0,432	0,229	0,239	0,147	0,71	0,271	0,269	0,207	0,701	0,262	0,239	0,136
G 1/100	1,233	0,523	0,478	0,206	1,13	0,575	0,55	0,284	1,029	0,775	0,715	0,387
H 1/500	0,479	0,159	0,2	0,134	0,521	0,208	0,202	0,154	0,488	0,295	0,272	0,146

PLACA 3	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	blanco	GM1	GD1b	GQ1b	blanco	GM1	GD1b	GQ1b	blanco	GM1	GD1b	GQ1b
A 1/100	1,664	0,993	1,162	0,699	1,033	0,638	0,859	0,786	1,184	0,874	0,844	0,802
B 1/500	1,162	0,602	0,718	0,501	0,904	0,447	0,507	0,405	0,811	0,53	0,335	0,534
C 1/100	1,186	0,725	0,682	0,597	1,383	0,845	0,832	0,87	1,315	0,755	0,652	0,973
D 1/500	0,655	0,457	0,427	0,23	1,036	0,448	0,484	0,562	0,975	0,42	0,363	0,436
E 1/100	1,417	1,16	0,849	0,543	1,045	0,73	0,567	0,298	1,033	0,657	0,575	0,391
F 1/500	1,077	0,43	0,486	0,255	0,531	0,239	0,188	0,161	0,459	0,228	0,179	0,138
G 1/100	0,574	0,282	0,25	0,124	1,714	1,128	1,095	0,911	1,313	0,576	0,486	0,369
H 1/500	0,275	0,112	0,098	0,103	0,962	0,418	0,446	0,298	0,607	0,202	0,181	0,135

PLACA 4	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	blanco	GM1	GD1b	GQ1b	blanco	GM1	GD1b	GQ1b	blanco	GM1	GD1b	GQ1b
A 1/100	1,259	0,693	0,751	0,543	1,518	0,79	0,764	0,733	0,951	0,578	0,591	0,545
B 1/500	0,713	0,366	0,394	0,27	0,704	0,433	0,4	0,355	0,583	0,319	0,381	0,377
C 1/100	0,955	0,604	0,673	0,626	0,887	0,496	0,458	0,47	1,699	1,409	0,82	0,822
D 1/500	0,463	0,325	0,434	0,353	1,54	0,862	0,821	0,727	0,954	0,668	0,498	0,457
E 1/100	1,599	1,266	1,103	0,801	0,836	0,506	0,413	0,233	0,545	0,274	0,22	0,16
F 1/500	0,79	0,423	0,414	0,269	0,336	0,211	0,165	0,138	0,181	0,153	0,108	0,096
G 1/100	1,243	0,505	0,488	0,317	0,73	0,315	0,32	0,216	1,451	0,923	0,716	0,487
H 1/500	0,529	0,251	0,231	0,181	1,333	0,665	0,785	0,504	0,766	0,303	0,242	0,228

PLACA 5	1 blanco	2 GM1	3 GD1b	4 GQ1b	5 blanco	6 GM1	7 GD1b	8 GQ1b	9 blanco	10 GM1	11 GD1b	12 GQ1b
A 1/100	1,301	0,82	0,799	0,452	0,611	0,455	0,383	0,244	1,009	0,87	0,674	0,515
B 1/500	0,644	0,357	0,311	0,306	0,409	0,208	0,231	0,236	0,502	0,339	0,402	0,296
C 1/100	1,079	0,603	0,685	0,479	0,885	0,544	0,567	0,556	1,655	1,179	0,907	0,755
D 1/500	0,532	0,268	0,262	0,242	0,383	0,276	0,263	0,184	0,792	0,46	0,48	0,52
E 1/100	1,179	0,71	0,539	0,283	0,744	0,336	0,286	0,189	1,188	0,881	0,718	0,578
F 1/500	0,447	0,247	0,191	0,121	0,286	0,113	0,121	0,112	0,471	0,301	0,29	0,228
G 1/100	1,414	0,59	0,534	0,301	1,735	1,382	1,229	0,882	1,009	0,908	0,848	0,305
H 1/500	0,507	0,206	0,191	0,133	0,899	0,53	0,511	0,302	0,518	0,388	0,302	0,145

PLACA 6	1 blanco	2 GM1	3 GD1b	4 GQ1b	5 blanco	6 GM1	7 GD1b	8 GQ1b	9 blanco	10 GM1	11 GD1b	12 GQ1b
A 1/100	0,601	0,516	0,644	0,567	1,232	0,704	0,763	0,622	2,668	1,534	1,656	1,451
B 1/500	0,592	0,268	0,499	0,5	0,915	0,525	0,616	0,517	2,183	1,149	1,372	0,915
C 1/100	2,124	1,243	1,189	0,981	1,222	0,724	0,684	0,737	1,804	3,143	3,129	3,267
D 1/500	1,255	0,766	0,728	0,769	0,863	0,512	0,571	0,57	1,355	2,547	2,104	2,235
E 1/100	0,673	0,396	0,305	0,15	1,664	1,028	0,935	0,577	1,487	0,95	0,995	0,681
F 1/500	0,259	0,172	0,135	0,109	1,025	0,423	0,39	0,207	0,65	0,34	0,324	0,226
G 1/100	1,204	0,927	0,899	0,496	1,069	0,821	0,733	0,327	1,987	2,251	2,155	1,155
H 1/500	0,56	0,363	0,295	0,207	0,5	0,264	0,245	0,121	1,533	2,167	2,051	0,651

ELISA Gangliósidos día 1 (EM vacunas 164-192)

Objetivo: testar las muestras del estudio "Efficacy and neurological adverse effects of COVID-19 vaccination in patients immunocompromised for multiple sclerosis"

Muestras: (29 muestras del estudio EM vacunas – IgG e IgM):

	NHC	Código externo	Tiempo	Box	Posición	Resultado GM1	Resultado GD1b	Resultado GQ1b
164	339710	VACEM172	T3	SANT PAU T3.2	E3	neg	neg	neg
165	697469	VACEM151	T3	SANT PAU T3.2	E4	neg	neg	neg
166	70773727	VACEM23	T3	SANT PAU T3.2	E5	neg	neg	neg
167	4407852	VACEM290	T3	SANT PAU T3.2	E6	neg	neg	neg
168	70064747	VACEM243	T3	SANT PAU T3.2	E7	neg	neg	neg
169	4749578	VACEM116	T3	SANT PAU T3.2	E8	neg	neg	neg
170	57196	VACEM110	T3	SANT PAU T3.2	E9	neg	neg	neg
171	41736	VACEM121	T3	SANT PAU T3.2	F1	neg	neg	neg
172	4638942	VACEM109	T3	SANT PAU T3.2	F2	neg	neg	neg
173	755754	VACEM108	T3	SANT PAU T3.2	F3	neg	neg	neg
174	70587229	VACEM257	T3	SANT PAU T3.2	F4	neg	neg	neg
175	70194568	VACEM171	T3	SANT PAU T3.2	F5	neg	neg	neg
176	70351050	VACEM255	T3	SANT PAU T3.2	F6	neg	neg	neg
177	516107	VACEM176	T3	SANT PAU T3.2	F7	neg	neg	neg
178	4745261	VACEM122	T3	SANT PAU T3.2	F8	neg	neg	neg
179	70054333	VACEM115	T3	SANT PAU T3.2	F9	neg	neg	neg
180	533427	VACEM157	T3	SANT PAU T3.2	G1	neg	neg	neg
181	4902778	VACEM149	T3	SANT PAU T3.2	G2	neg	neg	neg
182	70754248	VACEM131	T3	SANT PAU T3.2	G3	neg	neg	neg
183	4244213	VACEM269	T3	SANT PAU T3.2	G5	neg	neg	neg
184	4238241	VACEM179	T3	SANT PAU T3.2	G6	neg	neg	neg
185	70762455	VACEM262	T3	SANT PAU T3.2	G7	neg	neg	neg
186	5186862	VACEM175	T3	SANT PAU T3.2	G9	neg	neg	neg
187	4583291	VACEM386	T3	SANT PAU T3.2	H3	neg	neg	neg
188	4032597	VACEM194	T3	SANT PAU T3.2	H4	neg	neg	neg
189	5334494	VACEM118	T3	SANT PAU T3.2	H5	neg	neg	neg
190	70418425	VACEM133	T3	SANT PAU T3.2	H6	neg	neg	neg
191	673507	VACEM117	T3	SANT PAU T3.2	H7	neg	neg	neg
192	70170773	VACEM124	T3	SANT PAU T3.2	H8	neg	neg	neg

Protocolo:

- Descongelar placas con gangliósidos (preparadas día 04/10/22)
- **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.
- Poner 100 ul de suero a cada pozo, incubar toda la noche a 4°C

PLACA 1	1 blanco	2 GM1	3 GD1b	4 GQ1b	5 blanco	6 GM1	7 GD1b	8 GQ1b	9 blanco	10 GM1	11 GD1b	12 GQ1b
A 1/100	164				165				166			
B 1/500	164				165				166			
C 1/100	167				168				169			
D 1/500	167				168				169			
E 1/100	164				165				166			
F 1/500	164				165				166			
G 1/100	167				168				169			
H 1/500	167				168				169			

PLACA 2	1 blanco	2 GM1	3 GD1b	4 GQ1b	5 blanco	6 GM1	7 GD1b	8 GQ1b	9 blanco	10 GM1	11 GD1b	12 GQ1b
A 1/100	170				171				172			
B 1/500	170				171				172			
C 1/100	173				174				175			
D 1/500	173				174				175			
E 1/100	170				171				172			
F 1/500	170				171				172			
G 1/100	173				174				175			
H 1/500	173				174				175			

PLACA 3	1 blanco	2 GM1	3 GD1b	4 GQ1b	5 blanco	6 GM1	7 GD1b	8 GQ1b	9 blanco	10 GM1	11 GD1b	12 GQ1b
A 1/100	176				177				178			
B 1/500	176				177				178			
C 1/100	179				180				181			
D 1/500	179				180				181			
E 1/100	176				177				178			
F 1/500	176				177				178			
G 1/100	179				180				181			
H 1/500	179				180				181			

PLACA 4	1 blanco	2 GM1	3 GD1b	4 GQ1b	5 blanco	6 GM1	7 GD1b	8 GQ1b	9 blanco	10 GM1	11 GD1b	12 GQ1b
A 1/100	182				183				184			
B 1/500	182				183				184			
C 1/100	185				186				187			
D 1/500	185				186				187			
E 1/100	182				183				184			
F 1/500	182				183				184			
G 1/100	185				186				187			
H 1/500	185				186				187			

PLACA 5	1 blanco	2 GM1	3 GD1b	4 GQ1b	5 blanco	6 GM1	7 GD1b	8 GQ1b	9 blanco	10 GM1	11 GD1b	12 GQ1b
A 1/100	188				189				Cpos IgG			
B 1/500	191				192				190			
C 1/100	188				189				Cpos IgM			
D 1/500	191				192				190			
E 1/100	188				189				Cpos IgM			
F 1/500	191				192				190			
G 1/100	188				189				Cpos IgM			
H 1/500	191				192				190			

Cambiar medio co-cultivos

- D22 → cambiar el medio (poner medio mielinización nuevo) → cambio 200 ul (la mitad)

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
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 **11 placas** (3 columnas de cada gangliósido/placa):
 - GM1: 30 ml metanol + 60 ul GM1 reconstituído
 - GD1b: 30 ml metanol + 60 ul GD1b reconstituído
 - GQ1b: 30 ml metanol + 120 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

08/10/2022

ELISA Gangliósidos día 2 (EM vacunas 164-192)

Protocolo:

- Lavar 4 veces con PBS
- Preparar **Ac secundarios**: RAH HRP IgG dil. 1/5000 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 (en este caso lo he dejado sólo 20min)
- Parar la reacción añadiendo 50 ul de H₂SO₄ al 25% a cada pozo.
- Leer en lector de placas de ELISA a 490-630 nm

Resultado:

PLACA 1	1 blanco	2 GM1	3 GD1b	4 GQ1b	5 blanco	6 GM1	7 GD1b	8 GQ1b	9 blanco	10 GM1	11 GD1b	12 GQ1b
A 1/100	0,787	0,553	0,586	0,588	0,761	0,487	0,581	0,473	0,462	0,365	0,401	0,332
B 1/500	0,549	0,357	0,389	0,488	0,455	0,3	0,456	0,35	0,334	0,281	0,272	0,433
C 1/100	1,005	0,756	0,626	0,565	0,937	0,71	0,712	0,696	1,021	0,651	0,702	0,548
D 1/500	0,558	0,356	0,432	0,432	0,505	0,398	0,479	0,368	0,589	0,37	0,43	0,376
E 1/100	0,724	0,388	0,308	0,3	0,873	0,398	0,325	0,205	0,275	0,133	0,146	0,154
F 1/500	0,342	0,168	0,169	0,135	0,414	0,171	0,175	0,125	0,152	0,103	0,179	0,105
G 1/100	0,677	0,39	0,293	0,173	1,063	0,604	0,544	0,272	1,08	0,624	0,626	0,367
H 1/500	0,34	0,187	0,172	0,102	0,614	0,249	0,234	0,193	0,524	0,313	0,3	0,187

PLACA 2	1 blanco	2 GM1	3 GD1b	4 GQ1b	5 blanco	6 GM1	7 GD1b	8 GQ1b	9 blanco	10 GM1	11 GD1b	12 GQ1b
A 1/100	1,322	0,74	0,967	0,886	0,53	0,325	0,358	0,348	1,146	0,829	0,811	0,596
B 1/500	0,837	0,373	0,331	0,383	0,416	0,254	0,282	0,481	0,658	0,411	0,372	0,393
C 1/100	0,568	0,391	0,42	0,4	1,01	0,741	0,784	0,654	0,66	0,683	0,476	0,439
D 1/500	0,353	0,266	0,251	0,352	0,522	0,384	0,442	0,693	0,37	0,346	0,317	0,302
E 1/100	0,802	0,386	0,357	0,214	0,848	0,662	0,562	0,367	1,265	0,787	0,71	0,368
F 1/500	0,358	0,18	0,165	0,131	0,468	0,262	0,259	0,18	0,761	0,348	0,321	0,203
G 1/100	0,759	0,487	0,348	0,176	0,606	0,414	0,361	0,22	0,495	0,332	0,303	0,151
H 1/500	0,326	0,162	0,166	0,111	0,324	0,195	0,168	0,107	0,202	0,141	0,101	0,094

PLACA 3	1 blanco	2 GM1	3 GD1b	4 GQ1b	5 blanco	6 GM1	7 GD1b	8 GQ1b	9 blanco	10 GM1	11 GD1b	12 GQ1b
A 1/100	0,898	0,688	0,685	0,55	0,89	0,608	0,604	0,616	0,799	0,529	0,605	0,569
B 1/500	0,52	0,521	0,509	0,649	0,625	0,492	0,444	0,447	0,639	0,516	0,445	0,502
C 1/100	1,276	0,889	0,645	0,636	1,139	0,614	0,631	0,552	1,1	0,835	0,765	0,626
D 1/500	0,765	0,576	0,449	0,41	0,62	0,5	0,53	0,607	0,654	0,508	0,508	0,575
E 1/100	0,905	0,688	0,603	0,361	1,119	0,671	0,493	0,385	0,952	0,763	0,725	0,355
F 1/500	0,584	0,351	0,344	0,219	0,702	0,35	0,27	0,2	0,614	0,417	0,353	0,229
G 1/100	0,928	0,846	0,556	0,382	1,213	0,977	0,691	0,389	0,805	0,295	0,271	0,18
H 1/500	0,573	0,411	0,26	0,291	0,697	0,409	0,381	0,262	0,462	0,193	0,215	0,187

PLACA 4	1 blanco	2 GM1	3 GD1b	4 GQ1b	5 blanco	6 GM1	7 GD1b	8 GQ1b	9 blanco	10 GM1	11 GD1b	12 GQ1b
A 1/100	0,416	0,411	0,341	0,351	1,538	1,236	1,082	1,143	0,692	0,525	0,499	0,459
B 1/500	0,254	0,248	0,22	0,254	0,778	0,556	0,545	0,568	0,459	0,333	0,333	0,365
C 1/100	0,956	0,641	0,53	0,605	0,928	0,624	0,555	0,619	0,632	0,491	0,448	0,427
D 1/500	0,58	0,288	0,33	0,334	0,535	0,396	0,408	0,434	0,388	0,388	0,326	0,44
E 1/100	0,714	0,477	0,349	0,291	1,011	0,488	0,399	0,337	1,054	0,723	0,588	0,425
F 1/500	0,439	0,259	0,225	0,137	0,508	0,217	0,178	0,174	0,532	0,343	0,311	0,256
G 1/100	1,252	0,621	0,55	0,343	1,067	0,651	0,49	0,37	1,476	1,097	1,033	0,761
H 1/500	0,553	0,304	0,331	0,174	0,679	0,283	0,248	0,189	0,952	0,5	0,446	0,431

PLACA 5	1 blanco	2 GM1	3 GD1b	4 GQ1b	5 blanco	6 GM1	7 GD1b	8 GQ1b	9 blanco	10 GM1	11 GD1b	12 GQ1b
A 1/100	0,426	0,371	0,37	0,304	1,143	0,964	0,909	0,743	1,088	2,855	2,432	2,539
B 1/500	0,286	0,249	0,259	0,266	0,724	0,475	0,434	0,574	0,744	2,359	1,715	1,566
C 1/100	1,451	1,007	0,919	0,525	1,894	0,953	0,797	0,502	1,035	0,699	0,761	0,563
D 1/500	0,755	0,445	0,451	0,492	0,894	0,423	0,501	0,476	0,627	0,4	0,35	0,408
E 1/100	0,685	0,501	0,415	0,235	1,316	0,958	0,909	0,563	1,645	2,159	2,135	0,808
F 1/500	0,302	0,219	0,256	0,174	0,775	0,36	0,36	0,181	1,171	2,172	2,06	0,54
G 1/100	0,924	0,49	0,444	0,266	0,946	0,434	0,409	0,231	1,432	1,072	1,011	0,534
H 1/500	0,388	0,25	0,232	0,163	0,549	0,21	0,184	0,124	0,883	0,504	0,399	0,236

10/10/2022

ELISA Gangliósidos día 1 (EM vacunas 193-227)

Objetivo: testar las muestras del estudio "Efficacy and neurological adverse effects of COVID-19 vaccination in patients immunocompromised for multiple sclerosis"

Muestras: (35 muestras del estudio EM vacunas – IgG e IgM):

	NHC	Código externo	Tiempo	Box	Posición	Resultado GM1	Resultado GD1b	Resultado GQ1b
193	5266464	VACEM72	T3	SANT PAU T3.2	H9	neg	neg	neg
194	70603072	VACEM125	T3	SANT PAU T3.2	I2	neg	neg	neg
195	5181997	VACEM162	T3	SANT PAU T3.2	I3	neg	neg	1/500
196	70668292	VACEM166	T3	SANT PAU T3.2	I4	neg	neg	neg
197	5340056	VACEM244	T3	SANT PAU T3.2	I5	1/100 IgM	neg	neg
198	4566175	VACEM245	T3	SANT PAU T3.2	I6	neg	solo 1/500	neg
199	5193888	VACEM123	T3	SANT PAU T3.2	I7	neg	solo 1/500	neg
200	4378227	VACEM119	T3	SANT PAU T3.2	I8	neg	neg	neg
201	754709	VACEM268	T3	SANT PAU T3.2	I9	neg	neg	neg
202	4256262	VACEM295	T3	SANT PAU T3.3	A1	neg	neg	neg
203	4839043	VACEM127	T3	SANT PAU T3.3	A4	neg	1/500	1/500
204	559910	VACEM154	T3	SANT PAU T3.3	A5	neg	neg	solo 1/500
205	4204483	VACEM144	T3	SANT PAU T3.3	A6	neg	neg	solo 1/500
206	5160187	VACEM208	T3	SANT PAU T3.3	A7	1/100	1/500	1/500
207	5044644	VACEM147	T3	SANT PAU T3.3	A8	neg	neg	solo 1/500
208	70535237	VACEM141	T3	SANT PAU T3.3	A9	neg	neg	neg
209	4020874	VACEM132	T3	SANT PAU T3.3	B1	neg	neg	neg
210	70141058	VACEM126	T3	SANT PAU T3.3	B2	neg	neg	neg
211	5146303	VACEM303	T3	SANT PAU T3.3	B3	neg	solo 1/500	1/500
212	5299814	VACEM142	T3	SANT PAU T3.3	B4	neg	neg	neg
213	5005391	VACEM96	T3	SANT PAU T3.3	B5	neg	neg	neg
214	70172754	VACEM183	T3	SANT PAU T3.3	B7	neg	neg	neg
215	80076635	VACEM145	T3	SANT PAU T3.3	B8	neg	neg	neg
216	4724310	VACEM258	T3	SANT PAU T3.3	C1	neg	neg	neg
217	134920	VACEM174	T3	SANT PAU T3.3	C2	neg	neg	neg
218	70756276	VACEM152	T3	SANT PAU T3.3	C3	neg	neg	solo 1/500
219	4066797	VACEM114	T3	SANT PAU T3.3	C4	neg	neg	neg
220	4543415	VACEM137	T3	SANT PAU T3.3	C5	neg	neg	neg
221	544743	VACEM135	T3	SANT PAU T3.3	C7	neg	neg	neg
222	4363628	VACEM242	T3	SANT PAU T3.3	C8	neg	neg	neg
223	524026	VACEM156	T3	SANT PAU T3.3	C9	1/500	neg	neg
224	4967121	VACEM161	T3	SANT PAU T3.3	D3	solo 1/500	neg	neg
225	70338543	VACEM158	T3	SANT PAU T3.3	D4	1/100	neg	neg
226	4714402	VACEM140	T3	SANT PAU T3.3	D5	neg	neg	neg
227	70561462	VACEM185	T3	SANT PAU T3.3	D6	neg	neg	neg

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.

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

PLACA 1	1 blanco	2 GM1	3 GD1b	4 GQ1b	5 blanco	6 GM1	7 GD1b	8 GQ1b	9 blanco	10 GM1	11 GD1b	12 GQ1b
A 1/100	193				194				195			
B 1/500	193				194				195			
C 1/100	196				197				198			
D 1/500	196				197				198			
E 1/100	193				194				195			
F 1/500	193				194				195			
G 1/100	196				197				198			
H 1/500	196				197				198			

PLACA 2	1 blanco	2 GM1	3 GD1b	4 GQ1b	5 blanco	6 GM1	7 GD1b	8 GQ1b	9 blanco	10 GM1	11 GD1b	12 GQ1b
A 1/100	199				200				201			
B 1/500	199				200				201			
C 1/100	202				203				204			
D 1/500	202				203				204			
E 1/100	199				200				201			
F 1/500	199				200				201			
G 1/100	202				203				204			
H 1/500	202				203				204			

PLACA 3	1 blanco	2 GM1	3 GD1b	4 GQ1b	5 blanco	6 GM1	7 GD1b	8 GQ1b	9 blanco	10 GM1	11 GD1b	12 GQ1b
A 1/100	205				206				207			
B 1/500	205				206				207			
C 1/100	208				209				210			
D 1/500	208				209				210			
E 1/100	205				206				207			
F 1/500	205				206				207			
G 1/100	208				209				210			
H 1/500	208				209				210			

PLACA 4	1 blanco	2 GM1	3 GD1b	4 GQ1b	5 blanco	6 GM1	7 GD1b	8 GQ1b	9 blanco	10 GM1	11 GD1b	12 GQ1b
A 1/100	211				212				213			
B 1/500	211				212				213			
C 1/100	214				215				216			
D 1/500	214				215				216			
E 1/100	211				212				213			
F 1/500	211				212				213			
G 1/100	214				215				216			
H 1/500	214				215				216			

PLACA 5	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	blanco	GM1	GD1b	GQ1b	blanco	GM1	GD1b	GQ1b	blanco	GM1	GD1b	GQ1b
A 1/100	217				218				219			
B 1/500	217				218				219			
C 1/100	220				221				222			
D 1/500	220				221				222			
E 1/100	217				218				219			
F 1/500	217				218				219			
G 1/100	220				221				222			
H 1/500	220				221				222			

PLACA 6	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	blanco	GM1	GD1b	GQ1b	blanco	GM1	GD1b	GQ1b	blanco	GM1	GD1b	GQ1b
A 1/100	223				224				225			
B 1/500	223				224				225			
C 1/100	226				227				Cpos IgG			
D 1/500	226				227				Cpos IgG			
E 1/100	223				224				225			
F 1/500	223				224				225			
G 1/100	226				227				Cpos IgM			
H 1/500	226				227				Cpos IgM			

- 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

Cambiar medio co-cultivos

- D25 → cambiar el medio (poner medio mielinización nuevo) → cambio 200 ul (la mitad)

ICC co-cultivos (día 25)

Cojo 2 cubres de los co-cultivos para ir viendo como va la diferenciación.

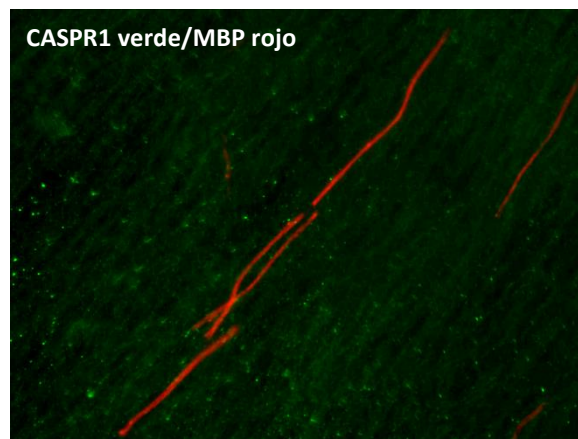
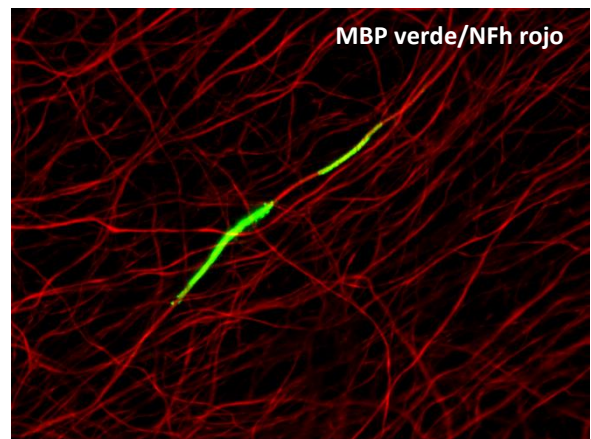
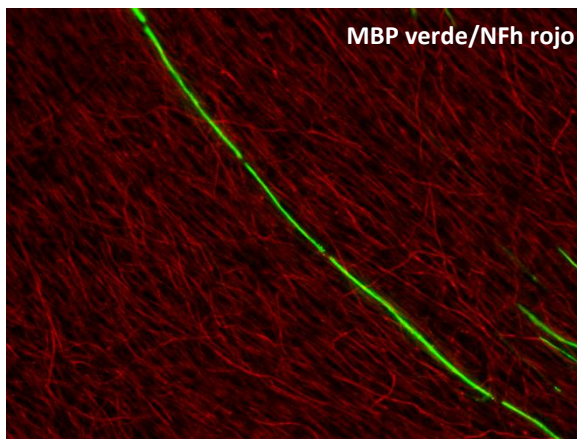
Protocolo: se hace todo en placa de 24 wells

- Fijar 20 min con PFA 4%
- 1 lavado con PBS1x
- Bloquear con Goat serum 5% y 0'3% tritón (en PBS): 1h a RT
- Incubar con anticuerpos primarios diluïdos en Goat serum 5% y 0'3% tritón (en PBS):
 - **MBP y NFh**
 - anti-Myelin basic protein SMI99, 808401 (Biolegend). Dil. **1/300** (mouse) → overnight 4°C
 - anti-Neurofilament H, AB5539 (Merck) **Dil. 1/500** (chicken) → 1h RT
 - **MBP y CASPR1:**

- anti-Myelin basic protein SMI99, 808401 (Biolegend). Dil. **1/300** (mouse) → overnight 4°C
- Anti-CASPR1, ab133634 (abcam). Dil. **1/50** (rabbit) → 1h RT
- 3 lavados con PBS1x
- Incubar 1h con Ac. secundarios diluidos en Goat serum 5% y 0'3% tritón (todos a 1/500)
 - MBP y NFh: GAM488 + GAC594
 - MBP y CASPR1: GAM594 + GAR488
- 3 lavados con PBS1x
- Montar con Fluoromount

Resultado:

- La mielinización está funcionando → se ve muy bien la mielina y las interrupciones de los nodos.
- No se ve nada con CASPR1 → igual todavía no están los paranodos bien formados.
- Fluoromount se ve mejor que dapi



11/10/2022

ELISA Gangliósidos día 2 (EM vacunas 193-227)

Protocolo:

- Lavar 4 veces con PBS
- Preparar **Ac secundarios**: RAH HRP IgG dil. 1/5000 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 **H₂SO₄** al 25% a cada pozo.
- Leer en lector de placas de ELISA a 490-630 nm

Resultado:

PLACA 1	1 blanco	2 GM1	3 GD1b	4 GQ1b	5 blanco	6 GM1	7 GD1b	8 GQ1b	9 blanco	10 GM1	11 GD1b	12 GQ1b
A 1/100	1,489	1,346	1,449	1,286	1,202	1,088	1,032	0,975	1,431	1,233	1,486	1,957
B 1/500	1,427	1,158	1,204	1,269	1,178	0,951	0,852	1,253	1,338	1,148	1,228	1,784
C 1/100	2,572	1,525	1,456	1,326	1,473	1,406	1,398	1,069	1,577	1,402	1,329	1,336
D 1/500	1,625	1,031	1,101	1,127	1,271	1,043	1,114	1,136	1,026	0,991	1,252	1,113
E 1/100	0,625	0,638	0,548	0,337	1,145	0,853	0,703	0,437	1,751	0,971	0,91	0,594
F 1/500	0,36	0,282	0,241	0,202	0,511	0,345	0,274	0,251	0,887	0,447	0,361	0,33
G 1/100	1,255	0,904	0,794	0,48	1,785	1,979	1,587	0,939	1,904	1,067	0,957	0,731
H 1/500	0,525	0,309	0,251	0,276	0,949	0,749	0,593	0,364	1,007	0,502	0,417	0,32

PLACA 2	1 blanco	2 GM1	3 GD1b	4 GQ1b	5 blanco	6 GM1	7 GD1b	8 GQ1b	9 blanco	10 GM1	11 GD1b	12 GQ1b
A 1/100	2,306	1,631	1,98	2,339	2,966	2,232	2,245	2,142	1,901	1,653	1,743	1,792
B 1/500	1,531	1,217	1,649	1,781	1,576	1,511	1,524	1,462	1,516	1,187	1,147	1,368
C 1/100	2,237	2,025	1,809	2,184	1,332	1,209	1,438	1,44	1,866	1,604	1,835	1,897
D 1/500	1,398	1,214	1,204	1,763	0,93	0,916	1,225	1,114	1,264	1,175	1,22	1,446
E 1/100	1,285	0,834	0,869	0,665	1,58	0,717	0,972	0,845	2,346	1,825	2,18	1,585
F 1/500	0,596	0,385	0,372	0,302	0,811	0,415	0,447	0,326	1,894	1,184	1,148	0,79
G 1/100	2,209	1,73	1,595	0,978	1,975	1,956	1,363	1,159	1,941	1,97	1,547	1,381
H 1/500	1,313	0,731	0,651	0,537	0,992	0,709	0,535	0,376	1,492	0,895	0,757	0,644

PLACA 3	1 blanco	2 GM1	3 GD1b	4 GQ1b	5 blanco	6 GM1	7 GD1b	8 GQ1b	9 blanco	10 GM1	11 GD1b	12 GQ1b
A 1/100	1,338	0,833	0,84	1,329	1,335	1,651	1,921	1,466	1,247	1,083	1,003	0,744
B 1/500	0,869	0,622	0,74	1,074	0,989	0,992	1,255	1,506	0,822	0,71	0,88	1,103
C 1/100	1,877	1,478	1,365	1,663	1,604	1,498	1,366	1,613	1,597	1,381	1,323	1,501
D 1/500	1,368	0,946	0,951	1,256	1,093	1,116	1,15	1,144	0,874	0,918	0,98	0,922
E 1/100	0,778	0,411	0,328	0,259	1,655	1,415	1,114	0,84	2,056	1,645	1,396	1,342
F 1/500	0,404	0,286	0,183	0,15	1,032	0,558	0,475	0,385	1,342	0,726	0,565	0,527
G 1/100	1,596	1,497	1,258	0,796	2,586	2,328	2,222	1,688	0,801	0,365	0,486	0,356
H 1/500	0,764	0,538	0,493	0,334	1,834	1,182	1,083	0,834	0,45	0,234	0,233	0,137

PLACA 4	1 blanco	2 GM1	3 GD1b	4 GQ1b	5 blanco	6 GM1	7 GD1b	8 GQ1b	9 blanco	10 GM1	11 GD1b	12 GQ1b
A 1/100	0,851	0,754	0,851	1,165	1,777	1,635	1,372	1,379	1,227	0,911	1,01	1,293
B 1/500	0,564	0,615	0,669	0,879	1,289	0,971	0,881	1,354	0,914	0,831	0,892	0,817
C 1/100	2,785	2,507	2,484	2,184	2,835	2,377	1,876	1,847	3,041	2,566	2,561	2,073
D 1/500	1,381	1,072	1,306	1,248	1,592	1,193	1,092	1,132	1,995	1,525	1,456	1,306
E 1/100	1,675	0,891	0,736	0,606	2,067	1,383	1,252	0,992	1,733	0,954	0,929	0,601
F 1/500	0,74	0,428	0,349	0,303	0,923	0,6	0,599	0,424	0,873	0,449	0,407	0,333
G 1/100	1,774	0,895	0,888	0,6	2,608	2,272	2,081	1,622	2,174	1,608	1,542	1,155
H 1/500	0,766	0,375	0,348	0,281	1,649	1,035	0,878	0,771	1,354	0,74	0,596	0,574

PLACA 5	1 blanco	2 GM1	3 GD1b	4 GQ1b	5 blanco	6 GM1	7 GD1b	8 GQ1b	9 blanco	10 GM1	11 GD1b	12 GQ1b
A 1/100	1,945	1,633	1,753	1,762	1,147	0,785	0,939	1,098	1,711	1,238	1,126	1,058
B 1/500	1,577	1,218	0,872	1,353	0,797	0,753	0,698	0,904	1,202	0,79	0,83	0,71
C 1/100	1,602	1,538	1,301	1,38	1,707	1,743	1,524	1,259	2,289	1,628	1,655	1,503
D 1/500	0,784	0,724	0,704	0,612	0,908	0,75	0,653	0,9	1,16	0,981	1,112	1,033
E 1/100	1,851	1,337	1,299	0,905	1,301	1,271	0,987	0,609	1,543	1,283	0,971	0,816
F 1/500	0,881	0,501	0,537	0,402	0,567	0,503	0,343	0,385	0,746	0,536	0,392	0,32
G 1/100	1,466	0,859	0,965	0,578	1,535	0,952	0,785	0,891	1,891	1,835	1,462	0,932
H 1/500	0,641	0,319	0,402	0,351	0,751	0,406	0,39	0,365	1,033	0,759	0,53	0,4

PLACA 6	1 blanco	2 GM1	3 GD1b	4 GQ1b	5 blanco	6 GM1	7 GD1b	8 GQ1b	9 blanco	10 GM1	11 GD1b	12 GQ1b
A 1/100	1,715	2,371	1,211	1,316	1,43	1,311	1,318	1,117	1,641	1,809	1,593	1,313
B 1/500	1,179	1,318	0,873	0,806	0,783	0,906	0,756	0,831	1,149	0,932	1,054	0,895
C 1/100	2,12	1,746	1,653	1,695	1,676	1,793	1,501	1,384	2,1	3,521	3,47	3,417
D 1/500	1,123	1,06	0,799	0,991	1,008	0,871	0,938	1,092	1,362	3,159	2,842	2,06
E 1/100	2,136	1,593	1,27	1,023	1,877	1,155	1,003	0,738	1,52	1,116	1,221	0,84
F 1/500	1,01	0,604	0,51	0,392	0,862	0,471	0,397	0,368	0,766	0,483	0,431	0,389
G 1/100	1,245	1,034	0,804	0,565	1,053	0,717	0,588	0,474	2,439	3,155	3,13	2,122
H 1/500	0,605	0,423	0,387	0,376	0,585	0,368	0,288	0,263	1,657	3,105	2,972	1,133

13/10/2022

Coating células + transfección Culture slides

12 culture slides:

- 10 Perfil
- 1 NF155/CNTN1
- 1 LIF

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

Cambiar medio co-cultivos

- D28 → cambiar el medio (poner medio mielinización nuevo) → cambio 200 ul (la mitad)

ICC co-cultivos (día 28)

Uso 8 cubres para ver como marcan los pacientes positivos.

Muestras:

- | | |
|-----------------------|---|
| 1. Control CNTN1+ | 6. Cneg 204-11 |
| 2. Control NF155+ | 7. LIF+ (GDP) |
| 3. Control CASPR1+ | 8. No pongo suero: hago doble ICC con Nav y CASPR1 (empezar el día siguiente) |
| 4. 22-364944 (NF186+) | |
| 5. Cneg 21-2-1608 | |

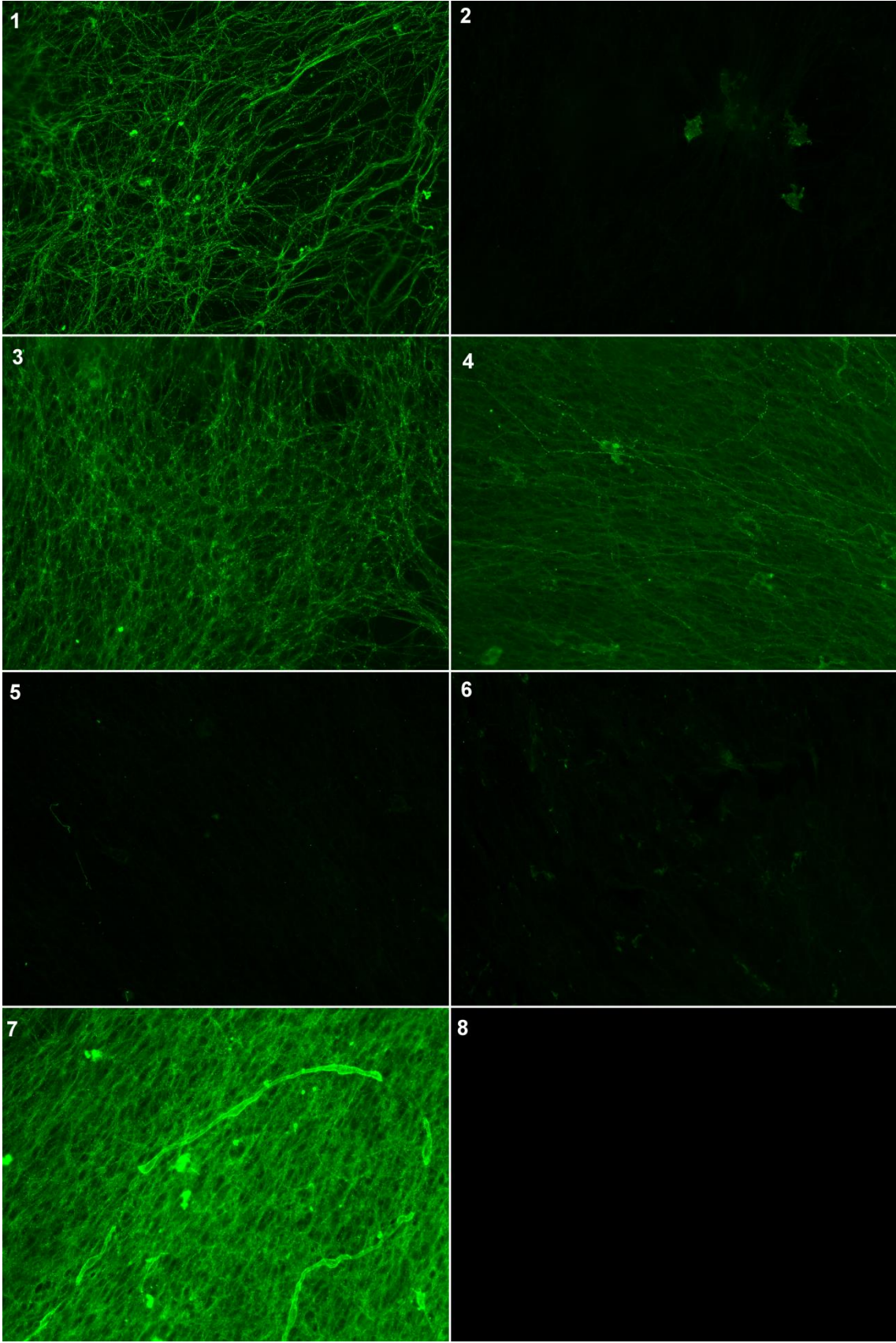
Protocolo:

- Incubar con **suero** 1/100 en medio de mielinización : overnight 37°C (sólo ICC 1-7)
- 1 lavado con PBS1x
- Fijar 20 min con PFA 4% (empezar ICC 8)
- 1 lavado con PBS1x

- Incubar con anticuerpos primarios diluídos en Goat serum 5% (en PBS):
 - 1-7: **MBP** anti-Myelin basic protein SMI99, 808401 (Biolegend). Dil. **1/300** (mouse) → 1h RT
 - 8: **CASPR1** y **Nav** (en este caso diluir con Goat serum 5% tritón 0'3%)
 - Anti-CASPR1, ab133634 (abcam). Dil. **1/50** (rabbit) → 1h RT
 - 3 lavados con PBS1x
 - Anti-NAv, S8809 (Sigma). Dil. **1/500** (mouse) → 1h RT
- 3 lavados con PBS1x
- Incubar 1h con **Ac. secundarios** diluídos en Goat serum 5% (todos a 1/500)
 - 1-7: suero y MBP: GAH488 + GAM594
 - 8: CASPR1 y Nav: GAR594 + GAM488
- 3 lavados con PBS1x
- Montar con Fluoromount

Resultado: en ninguno de los cubres se ve mielina (no hay marcaje de MBP). Al no haber permeabilizado, no se ha podido marcar la mielina.

1. Control CNTN1+ → + + + (marca las neuronas)
2. Control NF155+ → marca bastante algo que podrían ser cels de Schwann mielinizantes
3. Control CASPR1+ → + + (marca las neuronas)
4. 22-364944 (NF186+) → no marca casi nada (+)
5. Cneg 21-2-1608 → -
6. Cneg 204-11 → -
7. LIF+ (GDP) → + + neuronas, + + + mielina
8. Doble Nav y CASPR1 → no se ve nada (permeabilizar!!)



ELISA Gangliósidos día 1 (EM vacunas 228-256)

Objetivo: testar las muestras del estudio "*Efficacy and neurological adverse effects of COVID-19 vaccination in patients immunocompromised for multiple sclerosis*"

Muestras: (29 muestras del estudio EM vacunas – IgG e IgM):

	NHC	Código externo	Tiempo	Box	Posición	Resultado GM1	Resultado GD1b	Resultado GQ1b
228	70736855	VACEM83	T3	SANT PAU T3.3	D8	neg	neg	neg
229	93431	VACEM301	T3	SANT PAU T3.3	D9	neg	neg	neg
230	727731	VACEM246	T3	SANT PAU T3.3	E1	neg	neg	neg
231	5235005	VACEM111	T3	SANT PAU T3.3	E2	neg	neg	neg
232	432713	VACEM184	T3	SANT PAU T3.3	E3	neg	neg	neg
233	70710228	VACEM120	T3	SANT PAU T3.3	E4	neg	neg	neg
234	4600518	VACEM249	T3	SANT PAU T3.3	E6	neg	neg	neg
235	4693082	VACEM254	T3	SANT PAU T3.3	E7	neg	neg	neg
236	4103514	VACEM164	T3	SANT PAU T3.3	E8	neg	neg	neg
237	80007890	VACEM309	T3	SANT PAU T3.3	E9	neg	neg	neg
238	4176795	VACEM312	T3	SANT PAU T3.3	F1	neg	neg	neg
239	4046869	VACEM256	T3	SANT PAU T3.3	F2	neg	neg	neg
240	142063	VACEM160	T3	SANT PAU T3.3	F3	neg	neg	neg
241	5226408	VACEM267	T3	SANT PAU T3.3	F4	neg	neg	neg
242	4162376	VACEM261	T3	SANT PAU T3.3	F5	neg	neg	neg
243	4728354	VACEM308	T3	SANT PAU T3.3	F6	neg	neg	neg
244	4300736	VACEM196	T3	SANT PAU T3.3	F7	neg	neg	neg
245	70569934	VACEM74	T3	SANT PAU T3.3	F8	neg	neg	neg
246	4843115	VACEM227	T3	SANT PAU T3.3	F9	neg	neg	neg
247	5295710	VACEM276	T3	SANT PAU T3.3	G1	neg	neg	neg
248	363940	VACEM173	T3	SANT PAU T3.3	G2	neg	neg	neg
249	70232395	VACEM182	T3	SANT PAU T3.3	G3	neg	neg	neg
250	4403395	VACEM178	T3	SANT PAU T3.3	G4	neg	neg	neg
251	129965	VACEM289	T3	SANT PAU T3.3	G5	neg	neg	neg
252	305023	VACEM180	T3	SANT PAU T3.3	G7	neg	neg	neg
253	4545412	VACEM193	T3	SANT PAU T3.3	G8	neg	neg	neg
254	5144785	VACEM197	T3	SANT PAU T3.3	H1	neg	neg	neg
255	4576893	VACEM311	T3	SANT PAU T3.3	H3	neg	neg	neg
256	5049693	VACEM73	T3	SANT PAU T3.3	H4	neg	neg	neg

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.

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

PLACA 1	1 blanco	2 GM1	3 GD1b	4 GQ1b	5 blanco	6 GM1	7 GD1b	8 GQ1b	9 blanco	10 GM1	11 GD1b	12 GQ1b
A 1/100	228				229				230			
B 1/500	228				229				230			
C 1/100	231				232				233			
D 1/500	231				232				233			
E 1/100	228				229				230			
F 1/500	228				229				230			
G 1/100	231				232				233			
H 1/500	231				232				233			

PLACA 2	1 blanco	2 GM1	3 GD1b	4 GQ1b	5 blanco	6 GM1	7 GD1b	8 GQ1b	9 blanco	10 GM1	11 GD1b	12 GQ1b
A 1/100	234				235				236			
B 1/500	234				235				236			
C 1/100	237				238				239			
D 1/500	237				238				239			
E 1/100	234				235				236			
F 1/500	234				235				236			
G 1/100	237				238				239			
H 1/500	237				238				239			

PLACA 3	1 blanco	2 GM1	3 GD1b	4 GQ1b	5 blanco	6 GM1	7 GD1b	8 GQ1b	9 blanco	10 GM1	11 GD1b	12 GQ1b
A 1/100	240				241				242			
B 1/500	240				241				242			
C 1/100	243				244				245			
D 1/500	243				244				245			
E 1/100	240				241				242			
F 1/500	240				241				242			
G 1/100	243				244				245			
H 1/500	243				244				245			

PLACA 4	1 blanco	2 GM1	3 GD1b	4 GQ1b	5 blanco	6 GM1	7 GD1b	8 GQ1b	9 blanco	10 GM1	11 GD1b	12 GQ1b
A 1/100	246				247				248			
B 1/500	246				247				248			
C 1/100	249				250				251			
D 1/500	249				250				251			
E 1/100	246				247				248			
F 1/500	246				247				248			
G 1/100	249				250				251			
H 1/500	249				250				251			

PLACA 5	1 blanco	2 GM1	3 GD1b	4 GQ1b	5 blanco	6 GM1	7 GD1b	8 GQ1b	9 blanco	10 GM1	11 GD1b	12 GQ1b
A 1/100	252				253				254			
B 1/500	252				253				254			
C 1/100	255				256				Cpos IgG			
D 1/500	255				256				Cpos IgG			
E 1/100	252				253				254			
F 1/500	252				253				254			
G 1/100	255				256				Cpos IgG			
H 1/500	255				256				Cpos IgG			

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

14/10/2022

Recoger culture slides

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

ELISA Gangliósidos día 2 (EM vacunas 228-256)

Protocolo:

- Lavar 4 veces con PBS
- Preparar **Ac secundarios**: RAH HRP IgG dil. 1/5000 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 **H₂SO₄** al 25% a cada pozo.
- Leer en lector de placas de ELISA a 490-630 nm

Resultado:

PLACA 1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	blanco	GM1	GD1b	GQ1b	blanco	GM1	GD1b	GQ1b	blanco	GM1	GD1b	GQ1b
A 1/100	2,419	2,475	1,711	1,853	1,016	0,982	1,151	1,257	1,777	1,429	1,637	1,503
B 1/500	1,963	1,637	1,069	1,159	0,924	0,524	0,727	0,74	1,241	0,641	0,808	0,791
C 1/100	1,284	1,599	1,313	1,369	1,375	0,989	1,057	1,13	1,733	1,452	1,085	1,335
D 1/500	0,781	0,719	0,673	1,037	0,824	0,733	0,819	1,07	1,087	0,713	0,719	0,923
E 1/100	1,291	0,882	0,713	0,548	1,724	1,164	1,004	0,674	1,765	1,15	1,298	0,627
F 1/500	0,559	0,467	0,333	0,282	1,03	0,525	0,437	0,339	0,753	0,475	0,371	0,288
G 1/100	1,659	1,235	1,214	0,973	1,141	0,37	0,393	0,263	1,581	1,21	1,031	0,543
H 1/500	0,57	0,418	0,437	0,428	0,548	0,273	0,271	0,192	0,637	0,424	0,365	0,233

PLACA 2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	blanco	GM1	GD1b	GQ1b	blanco	GM1	GD1b	GQ1b	blanco	GM1	GD1b	GQ1b
A 1/100	1,258	1,034	1,088	1,236	2,151	1,996	1,717	1,497	1,176	1,091	1,215	1,328
B 1/500	0,731	0,758	0,747	0,812	1,61	1,278	1,102	1,314	1,132	0,904	1,099	1,098
C 1/100	1,177	1,167	1,138	1,053	1,456	1,095	1,25	1,189	0,982	1,259	0,987	1,146
D 1/500	0,778	0,799	0,667	0,893	0,981	0,95	0,761	0,944	0,894	0,749	1,007	1,12
E 1/100	0,673	0,447	0,317	0,27	1,64	1,012	0,986	0,92	1,28	0,947	0,894	0,489
F 1/500	0,262	0,173	0,144	0,14	0,776	0,508	0,443	0,435	0,676	0,344	0,402	0,272
G 1/100	1,098	1,236	1,034	0,519	1,002	0,417	0,37	0,313	1,576	0,925	0,793	0,538
H 1/500	0,415	0,452	0,392	0,257	0,492	0,277	0,246	0,159	0,902	0,339	0,424	0,319

PLACA 3	1 blanco	2 GM1	3 GD1b	4 GQ1b	5 blanco	6 GM1	7 GD1b	8 GQ1b	9 blanco	10 GM1	11 GD1b	12 GQ1b
A 1/100	1,065	0,702	0,804	1,259	0,89	0,764	0,942	1,285	2,734	2,783	2,203	1,826
B 1/500	0,719	0,859	0,906	1,032	0,893	0,847	0,952	0,918	2,056	1,836	1,406	1,1
C 1/100	1,478	1,64	1,491	1,614	1,372	1,301	1,41	1,224	1,144	1,046	1,044	1,257
D 1/500	1,219	0,93	1,015	1,124	0,995	0,646	1,035	1,025	0,66	0,719	0,937	1,245
E 1/100	1,547	1,363	1,15	0,782	1,46	1,096	0,665	0,437	2,241	1,764	1,905	2,174
F 1/500	0,879	0,456	0,514	0,327	0,74	0,397	0,277	0,233	1,598	1,047	0,972	1,161
G 1/100	1,65	1,238	1,12	0,826	1,606	1,259	0,994	0,649	0,274	0,184	0,231	0,175
H 1/500	0,87	0,483	0,385	0,291	0,858	0,414	0,395	0,27	0,142	0,158	0,126	0,139

PLACA 4	1 blanco	2 GM1	3 GD1b	4 GQ1b	5 blanco	6 GM1	7 GD1b	8 GQ1b	9 blanco	10 GM1	11 GD1b	12 GQ1b
A 1/100	1,342	1,123	0,891	0,879	1,222	1,021	1,187	1,323	1,786	1,384	1,34	1,425
B 1/500	0,646	0,608	0,783	1,03	0,894	0,695	0,85	1,086	0,899	0,747	0,953	0,926
C 1/100	1,855	1,245	1,23	1,335	2,084	1,783	1,529	1,481	1,824	1,505	1,695	1,394
D 1/500	0,779	0,635	0,668	0,907	1,096	0,833	0,643	0,873	0,939	0,925	1,123	1,126
E 1/100	1,283	0,835	0,603	0,368	1,83	1,272	1,241	0,798	1,87	1,513	1,461	0,959
F 1/500	0,543	0,286	0,262	0,261	1,191	0,535	0,653	0,408	1,054	0,729	0,628	0,438
G 1/100	0,912	0,582	0,5	0,378	0,94	0,693	0,714	0,421	1,092	0,709	0,71	0,418
H 1/500	0,391	0,235	0,278	0,301	0,511	0,3	0,285	0,343	0,54	0,36	0,34	0,192

PLACA 5	1 blanco	2 GM1	3 GD1b	4 GQ1b	5 blanco	6 GM1	7 GD1b	8 GQ1b	9 blanco	10 GM1	11 GD1b	12 GQ1b
A 1/100	1,196	0,79	0,812	1,011	2,024	1,626	1,664	1,489	1,02	1,046	0,835	1,01
B 1/500	0,88	0,469	0,623	0,642	1,015	0,97	0,83	0,903	0,721	0,5	0,624	0,713
C 1/100	1,806	1,484	1,483	1,302	0,808	0,528	0,799	0,82	2,298	3,469	3,483	3,379
D 1/500	1,107	0,908	1,005	1,089	0,789	0,521	0,469	0,475	1,254	3,433	3,329	2,47
E 1/100	0,884	0,782	0,699	0,403	1,295	0,725	0,53	0,497	1,384	0,717	0,599	0,351
F 1/500	0,39	0,467	0,354	0,303	0,594	0,254	0,317	0,264	0,638	0,432	0,272	0,152
G 1/100	2,323	2,326	2,151	1,776	1,331	0,636	0,655	0,533	1,286	1,441	2,382	2,125
H 1/500	1,613	1,352	1,387	1,038	0,873	0,297	0,304	0,221	0,986	0,702	2,09	1,568

ELISA titulación y subclases NF155, CASPR1 y CNTN1 (muestras IMM y muestras BD ricerca)

Muestras:

- **CNTN1:** titulación y subclases 22-2-854
- **CASPR1:** screening
 - 22-2-851
 - 22-2-852
 - 22-2-853
 - 22-2-854

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	Cneg	22-2-854 1/900	22-2-854 IgG1	22-2-851	Cneg							
B blanc	Cneg	22-2-854 1/900	22-2-854 IgG1	22-2-851	Cneg							
C prot	Cpos CNTN1	22-2-854 1/2700	22-2-854 IgG2	22-2-852	Cpos CASPR1							
D blanc	Cpos CNTN1	22-2-854 1/2700	22-2-854 IgG2	22-2-852	Cpos CASPR1							
E prot	22-2-854 1/100	22-2-854 1/8100	22-2-854 IgG3	22-2-853								
F blanc	22-2-854 1/100	22-2-854 1/8100	22-2-854 IgG3	22-2-853								
G prot	22-2-854 1/300	22-2-854 1/24300	22-2-854 IgG4	22-2-854								
Hblanc	22-2-854 1/300	22-2-854 1/24300	22-2-854 IgG4	22-2-854								

CNTN1

CASPR1

Protocolo:

- Bloquear con leche 5% en PBS-tween 0'1% → 200 ul pozo (incubar 1h a temp. ambiente)
- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
- Diluir los **sueros**:
 - Titulación: 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 (a: 1/100, b:1/300, c:1/900, d: 1/2700, e: 1/8100 i f: 1/24300)
 - Subclases y screening: diluir sueros 1/100 en leche 5% en PBS-tween 0'1%
- Incubar con los sueros 1h
- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
- Incubar 45min con **RAH IgG HRP 1/3000** o **MAH HRP IgG1** o IgG2 o IgG3 o IgG4 1/1000 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 **H₂SO₄ 25%**
- Leer a 450-570 nm

Resultado:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	0,047	0,544	0,051	0,055	0,048							
B blanc	0,067	0,022	0,016	0,06	0,101							
C prot	0,79	0,29	0,032	0,042	0,869							
D blanc	0,122	0,019	0,012	0,057	0,102							
E prot	1,034	0,148	0,147	0,053								
F blanc	0,061	0,021	0,016	0,072								
G prot	0,915	0,072	1,32	0,056								
Hblanc	0,047	0,021	0,025	0,078								

- 22-2-854: Título CNTN1 1/24300, Subclases IgG4>>IgG3
- 22-2-851, 22-2-852, 22-2-853, 22-2-854: CASPR1 negativo

17/10/2022

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
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 **17 placas** (3 columnas de cada gangliósido/placa):
 - GM1: 45 ml metanol + 90 ul GM1 reconstituído
 - GD1b: 45 ml metanol + 90 ul GD1b reconstituído
 - GQ1b: 45 ml metanol + 180 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

ICC co-cultivos (día 32)

Uso 7 cubres

Muestras:

1. Control CNTN1+
2. Control NF140/186+
3. LIF+ (GDP)
4. 22-2-374 (Bocanegra, CASPR1+)
5. Cneg 21-2-1608
6. No pongo suero: doble Nav-NFh
7. No pongo suero: doble panNF-MBP

Protocolo: cubres 1-5

- Incubar con **suero** 1/100 en medio de mielinización : overnight 37°C
- 1 lavado con PBS1x
- Fijar 20 min con PFA 4%
- 1 lavado con PBS1x
- Bloquear 30 min con Goat serum 5% tritón 0'5%
- Incubar con anticuerpos primarios diluídos en Goat serum 5% tritón 0'5%:
 - **MBP** anti-Myelin basic protein SMI99, 808401 (Biolegend). Dil. **1/300** (mouse) → 2h RT
- 3 lavados con PBS1x
- Incubar 1h con **Ac. secundarios** diluídos en Goat serum 5% tritón 0'5%(todos a 1/500)
 - suero y MBP: GAH488 + GAM594
- 3 lavados con PBS1x
- Montar con Fluoromount

Protocolo: cubres 6-7

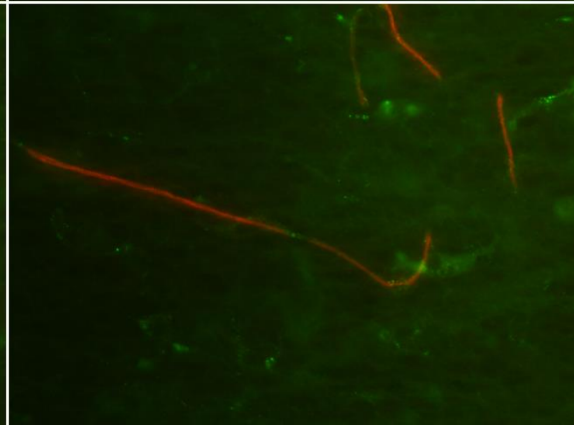
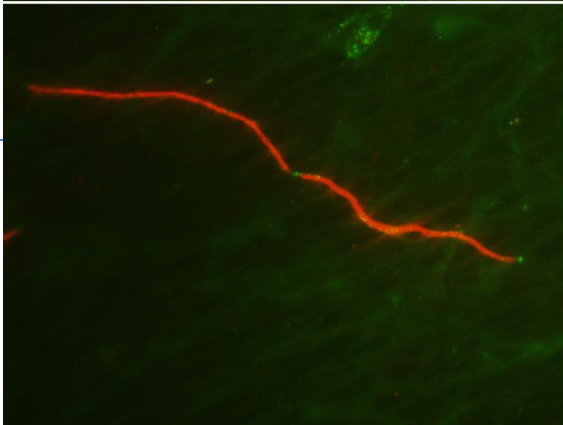
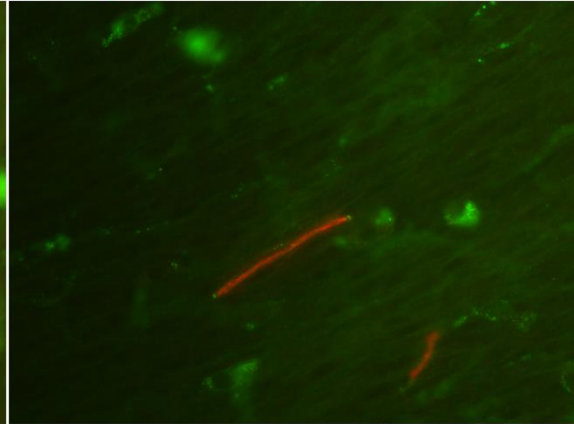
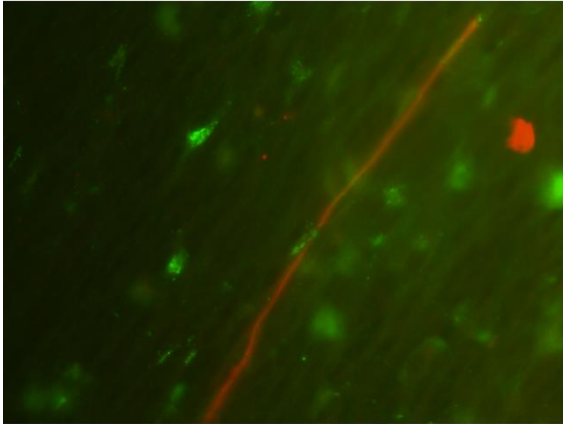
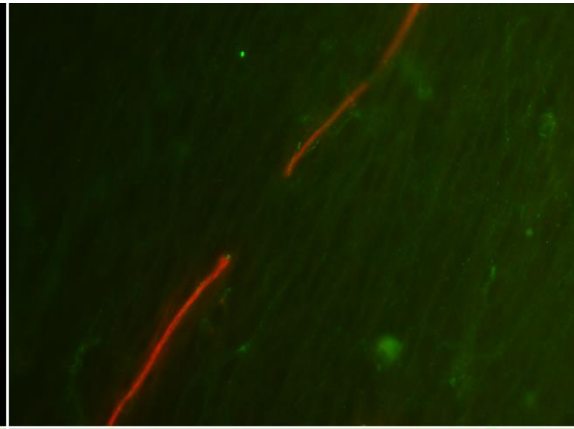
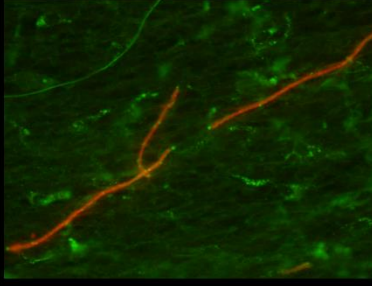
- Fijar 20 min con PFA 4%
- 1 lavado con PBS1x
- Bloquear 30 min con Goat serum 5% tritón 0'5%
- Incubar con anticuerpos primarios diluídos en Goat serum 5% tritón 0'5%:
 - **6: Nav y NFh**
 - Nav: anti-sodium channel, S8809 (Sigma). Dil. **1/500** (mouse) → overnight a 4°C
 - 3 lavados PBS1x
 - NFh: anti-Neurofilament H, AB5539 (Merck) Dil. **1/500** (chicken) → 2h RT
 - **8: panNF y MBP**

- **panNF** : anti-panNeurofascin, AF3235 (R&D systems). Dil.**1/500** (chicken) → overnight a 4°C
- **MBP** anti-Myelin basic protein SMI99, 808401 (Biolegend). Dil. **1/300** (mouse) → 2h RT
- 3 lavados con PBS1x
- Incubar 1h con **Ac. secundarios** diluídos en Goat serum 5% (todos a 1/500)
 - 6: Nav y NFh: GAM488 + GAC594
 - 8: panNF y MBP: GAM488 + GAC594
- 3 lavados con PBS1x
- Montar con Fluoromount

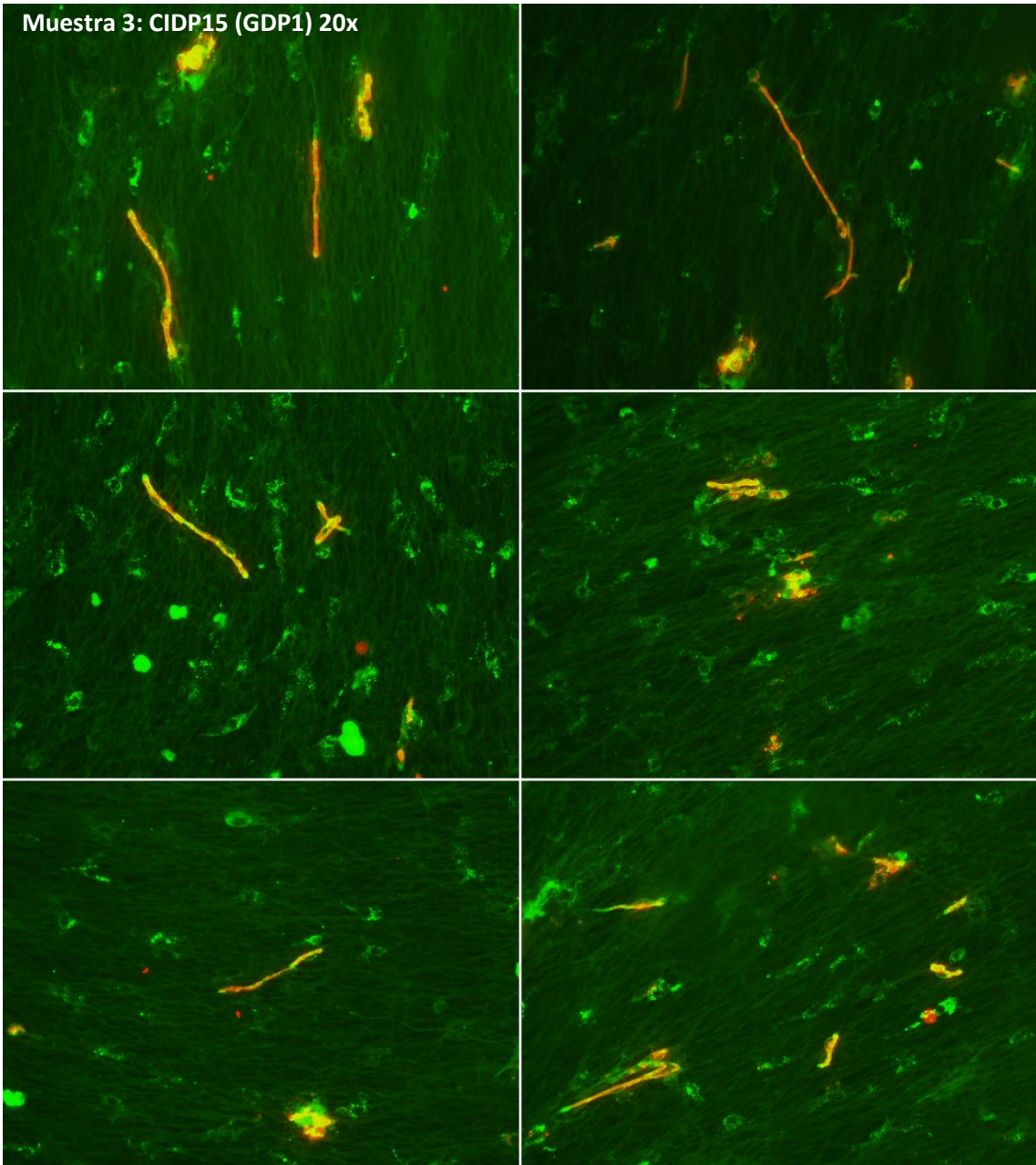
Resultado:

1. Control CNTN1+: no hay células
2. Control NF140/186+: marca claramente los nodos
3. LIF+ (GDP): marca mucho la mielina. En rojo (MBP) se ve la mielina rota → el suero desmieliniza??
4. 22-2-374 (Bocanegra, CASPR1+): se ven bastante negativas las neuronas, al ser CASPR1+ deberían ser más positivas. Casi no hay mielinización y no puedo ver si marca los paranodos.
5. Cneg 21-2-1608: neg
6. Doble Nav-NFh: no veo marcaje de Nav. Quizás son muy pequeños y al no marcar la mielina no soy capaz de identificar dónde deberían estar.
7. Doble panNF-MBP: se ven claramente los nodos y paranodos marcados con panNF.

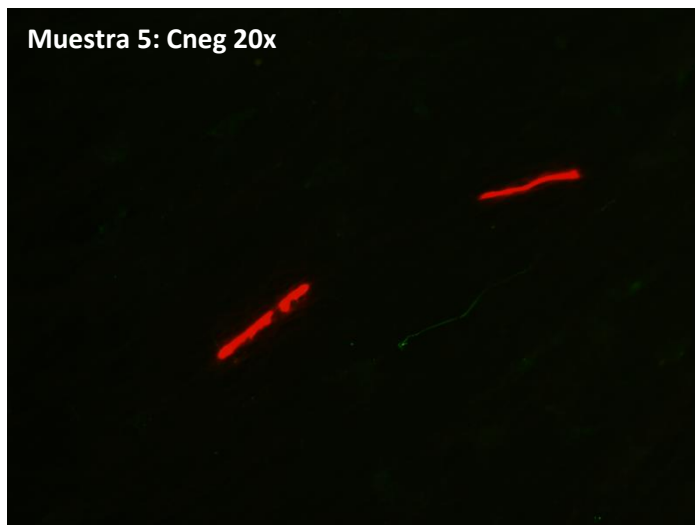
Muestra 2: panNF+ 40x



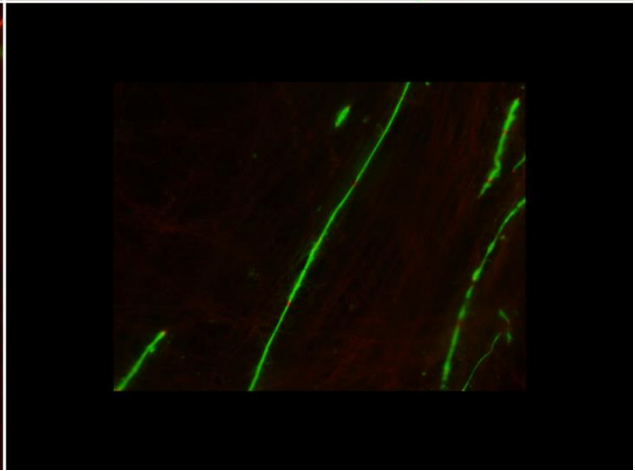
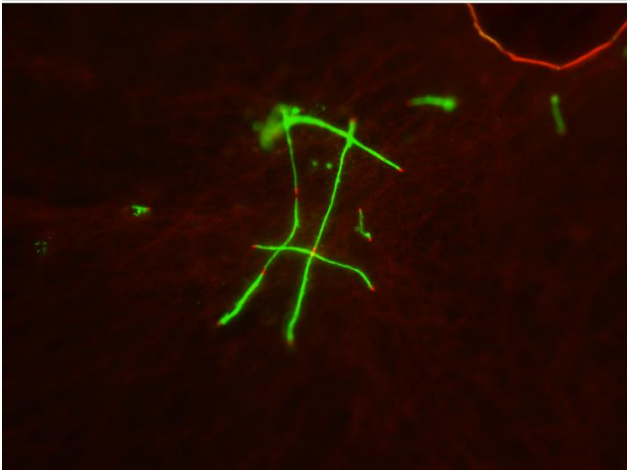
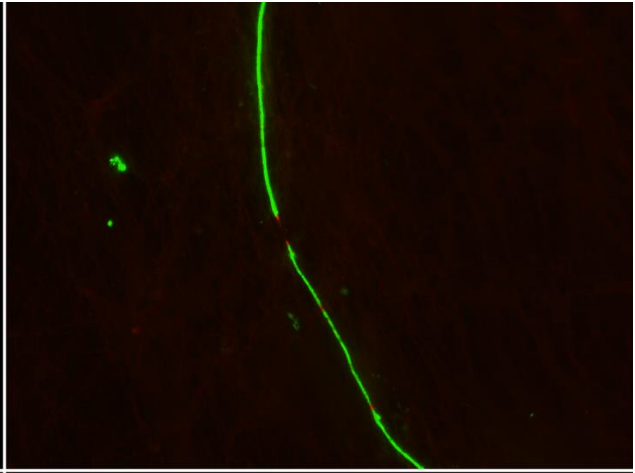
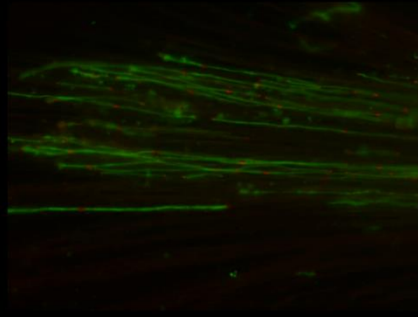
Muestra 3: CIDP15 (GDP1) 20x



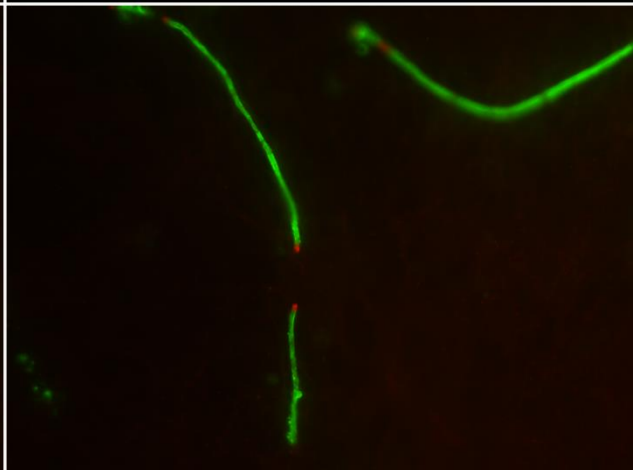
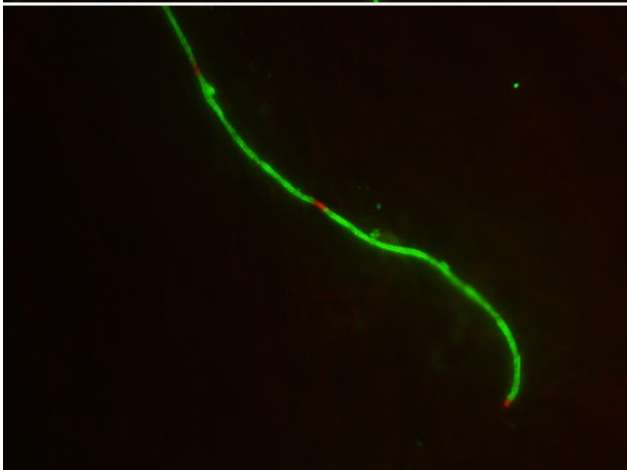
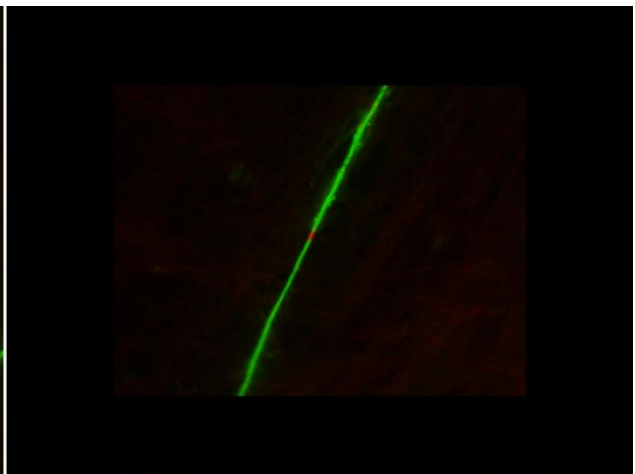
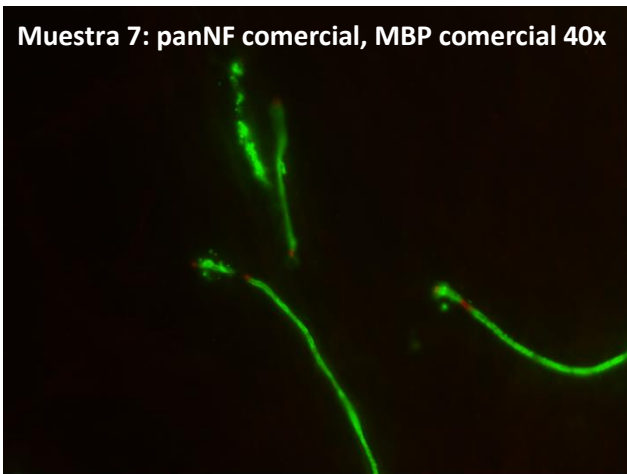
Muestra 5: Cneg 20x



Muestra 7: panNF comercial, MBP comercial 20x



Muestra 7: panNF comercial, MBP comercial 40x



	NHC	Código externo	Tiempo	Box	Posición	Resultado GM1	Resultado GD1b	Resultado GQ1b
257	5309757	VACEM253	T3	SANT PAU T3.3	H5	1/100	neg	neg
258	39683	VACEM4	T3	SANT PAU T3.3	H6	solo 1/500	neg	solo 1/500
259	26333	VACEM58	T3	SANT PAU T3.3	H7	neg	neg	neg
260	70674835	VACEM186	T3	SANT PAU T3.3	H8	neg	neg	neg
261	5212109	VACEM248	T3	SANT PAU T3.3	H9	neg	solo 1/500	neg
262	4159437	VACEM273	T3	SANT PAU T3.3	I1	neg	neg	neg
263	4983277	VACEM198	T3	SANT PAU T3.3	I2	neg	neg	neg
264	80007891	VACEM328	T3	SANT PAU T3.3	I3	neg	neg	neg
265	4171007	VACEM163	T3	SANT PAU T3.3	I4	neg	neg	neg
266	4885643	VACEM334	T3	SANT PAU T3.3	I5	neg	neg	neg
267	5029209	VACEM337	T3	SANT PAU T3.3	I6	neg	neg	neg
268	70392394	VACEM190	T3	SANT PAU T3.3	I7	neg	neg	neg
269	5322359	VACEM212	T3	SANT PAU T3.3	I8	neg	neg	neg
270	4015187	VACEM103	T3	SANT PAU T3.3	I9	1/100	solo 1/500	1/100
271	5173623	VACEM64	T3	SANT PAU T3.4	A1	neg	neg	neg
272	5400091	VACEM367	T3	SANT PAU T3.4	A2	neg	neg	solo 1/500
273	4920747	VACEM195	T3	SANT PAU T3.4	A3	neg	neg	neg
274	4708504	VACEM263	T3	SANT PAU T3.4	A4	neg	neg	neg
275	5351690	VACEM192	T3	SANT PAU T3.4	A5	neg	neg	neg
276	4204807	VACEM293	T3	SANT PAU T3.4	A6	solo 1/500	neg	neg
277	4135396	VACEM271	T3	SANT PAU T3.4	A7	neg	neg	neg
278	650956	VACEM272	T3	SANT PAU T3.4	A8	neg	solo 1/500	neg
279	5133767	VACEM428	T3	SANT PAU T3.4	B2	solo 1/500	solo 1/500	solo 1/500
280	70681851	VACEM247	T3	SANT PAU T3.4	B4	solo 1/500	neg	neg
281	702597	VACEM325	T3	SANT PAU T3.4	B5	neg	neg	neg
282	392335	VACEM165	T3	SANT PAU T3.4	B6	neg	neg	neg
283	5294464	VACEM430	T3	SANT PAU T3.4	B7	neg	neg	neg
284	5083388	VACEM412	T3	SANT PAU T3.4	B8	neg	solo 1/500 IgM	solo 1/500
285	5236328	VACEM415	T3	SANT PAU T3.4	B9	neg	neg	neg
286	5043844	VACEM201	T3	SANT PAU T3.4	C1	neg	neg	neg
287	4389413	VACEM270	T3	SANT PAU T3.4	C2	solo 1/500	solo 1/500	solo 1/500
288	5341876	VACEM408	T3	SANT PAU T3.4	C3	1/100	1/100	1/100
289	4899902	VACEM345	T3	SANT PAU T3.4	C4	1/100	1/100	neg
290	129422	VACEM210	T3	SANT PAU T3.4	C5	neg	neg	solo 1/500
291	70586124	VACEM204	T3	SANT PAU T3.4	C6	neg	neg	neg
292	5048799	VACEM306	T3	SANT PAU T3.4	C7	neg	neg	neg
293	4954783	VACEM209	T3	SANT PAU T3.4	C8	solo 1/500	neg	neg
294	4712800	VACEM365	T3	SANT PAU T3.4	D5	solo 1/500	neg	neg
295	1148576	VACEM281HSJD	T3	SANT PAU T3.4	D6	1/100 IgM	neg	neg
296	1592323	VACEM285HSJD	T3	SANT PAU T3.4	D7	1/500	neg	neg
297	1652447	VACEM421HSJD	T3	SANT PAU T3.4	D9	neg	neg	neg

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

PLACA 1	1 blanco	2 GM1	3 GD1b	4 GQ1b	5 blanco	6 GM1	7 GD1b	8 GQ1b	9 blanco	10 GM1	11 GD1b	12 GQ1b
A 1/100	257				258				259			
B 1/500	260				261				262			
C 1/100	257				258				259			
D 1/500	260				261				262			
E 1/100	257				258				259			
F 1/500	260				261				262			
G 1/100	257				258				259			
H 1/500	260				261				262			

PLACA 2	1 blanco	2 GM1	3 GD1b	4 GQ1b	5 blanco	6 GM1	7 GD1b	8 GQ1b	9 blanco	10 GM1	11 GD1b	12 GQ1b
A 1/100	263				264				265			
B 1/500	266				267				268			
C 1/100	263				264				265			
D 1/500	266				267				268			
E 1/100	263				264				265			
F 1/500	266				267				268			
G 1/100	263				264				265			
H 1/500	266				267				268			

PLACA 3	1 blanco	2 GM1	3 GD1b	4 GQ1b	5 blanco	6 GM1	7 GD1b	8 GQ1b	9 blanco	10 GM1	11 GD1b	12 GQ1b
A 1/100	269				270				271			
B 1/500	272				273				274			
C 1/100	269				270				271			
D 1/500	272				273				274			
E 1/100	269				270				271			
F 1/500	272				273				274			
G 1/100	269				270				271			
H 1/500	272				273				274			

PLACA 4	1 blanco	2 GM1	3 GD1b	4 GQ1b	5 blanco	6 GM1	7 GD1b	8 GQ1b	9 blanco	10 GM1	11 GD1b	12 GQ1b
A 1/100	275				276				277			
B 1/500	275				276				277			
C 1/100	278				279				280			
D 1/500	278				279				280			
E 1/100	275				276				277			
F 1/500	275				276				277			
G 1/100	278				279				280			
H 1/500	278				279				280			

PLACA 5	1 blanco	2 GM1	3 GD1b	4 GQ1b	5 blanco	6 GM1	7 GD1b	8 GQ1b	9 blanco	10 GM1	11 GD1b	12 GQ1b
A 1/100	281				282				283			
B 1/500	281				282				283			
C 1/100	284				285				286			
D 1/500	284				285				286			
E 1/100	281				282				283			
F 1/500	281				282				283			
G 1/100	284				285				286			
H 1/500	284				285				286			

PLACA 6	1 blanco	2 GM1	3 GD1b	4 GQ1b	5 blanco	6 GM1	7 GD1b	8 GQ1b	9 blanco	10 GM1	11 GD1b	12 GQ1b
A 1/100	287				288				289			
B 1/500	287				288				289			
C 1/100	290				291				292			
D 1/500	290				291				292			
E 1/100	287				288				289			
F 1/500	287				288				289			
G 1/100	290				291				292			
H 1/500	290				291				292			

PLACA 7	1 blanco	2 GM1	3 GD1b	4 GQ1b	5 blanco	6 GM1	7 GD1b	8 GQ1b	9 blanco	10 GM1	11 GD1b	12 GQ1b
A 1/100	293				294				295			
B 1/500	293				294				295			
C 1/100	296				297				Cpos IgG			
D 1/500	296				297				Cpos IgG			
E 1/100	293				294				295			
F 1/500	293				294				295			
G 1/100	296				297				Cpos IgM			
H 1/500	296				297				Cpos IgM			

ICC co-cultivos (día 35)

Uso el culture slide con 8 pozos, también uso 2 cubres que quedaban

Muestras culture slide: (incubar 24h en el suero)

1. Control CNTN1+ - doble MBP
2. Control NF140/186+ - doble MBP
3. Control NF155+ - doble panNF
4. LIF+ (GDP1) – doble MBP
5. LIF+ (GDP1) – doble LIF abcam
6. LIF+ (GDP1) – doble LIF invitrogen
7. GDP3 – doble MBP
8. Cneg 21-2-1608 – doble MBP

Muestras cubres: (incubar 48h en el suero)

9. Control CASPR1+ - doble CASPR1
10. Control NF155+ (CIDP80) - doble MBP

Protocolo:

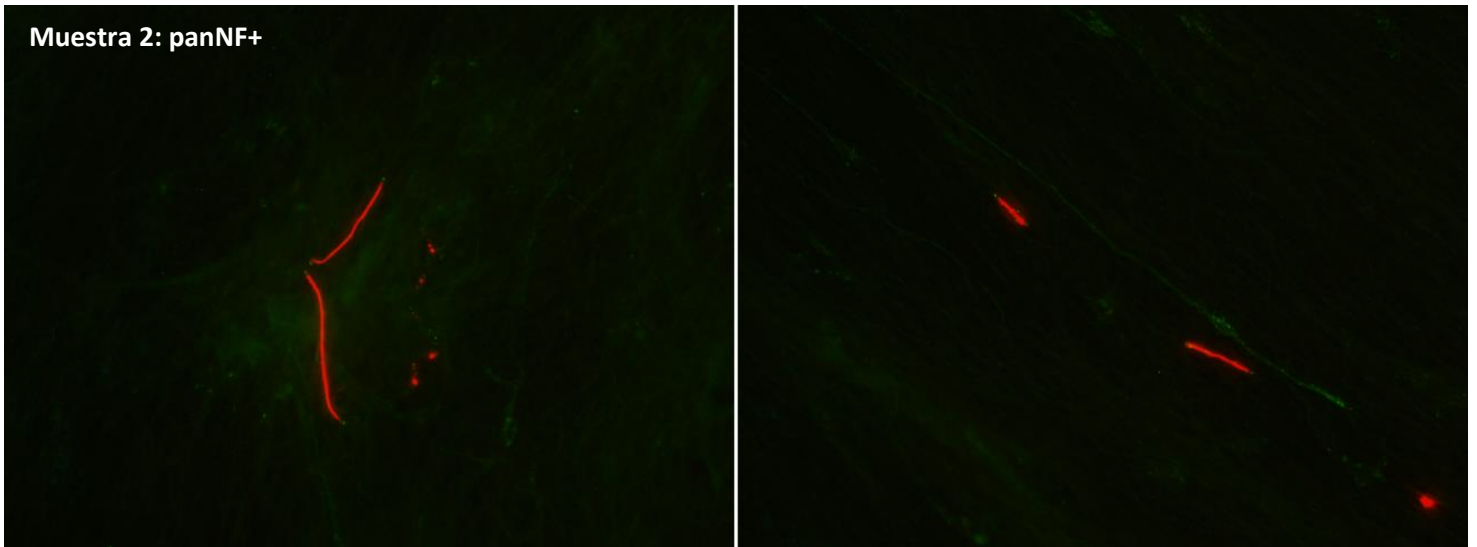
- Incubar con **suero** 1/100 en medio de mielinización : **48h** 37°C
- 1 lavado con PBS1x
- Fijar 20 min con PFA 4%
- 1 lavado con PBS1x
- Bloquear 30 min con Goat serum 5% tritón 0'5%
- Incubar con anticuerpos primarios diluídos en Goat serum 5% tritón 0'5%:
 - **MBP** anti-Myelin basic protein SMI99, 808401 (Biolegend). Dil. **1/300** (mouse) → 2h RT
 - **CASPR1:** Anti-CASPR1, ab133634 (abcam). Dil. **1/100** (rabbit) → 1h RT
 - **panNF:** anti-panNeurofascin, AF3235 (R&D systems). Dil. **1/500** (chicken) → overnight a 4°C
 - **LIF:** anti-LIF Invitrogen PA579600. Dil. 1/100 (rabbit)
 - **LIF:** anti-LIF abcam. Dil. 1/100 (rabbit)
- 3 lavados con PBS1x
- Incubar 1h con **Ac. secundarios** diluídos en Goat serum 5% tritón 0'5%(todos a 1/500)
 - suero y MBP: GAH488 + GAM594
 - suero y LIF o CASPR1: GAH488 + GAR594
 - suero y panNF: GAH488 + GAC594

- 3 lavados con PBS1x
- Montar con Fluoromount

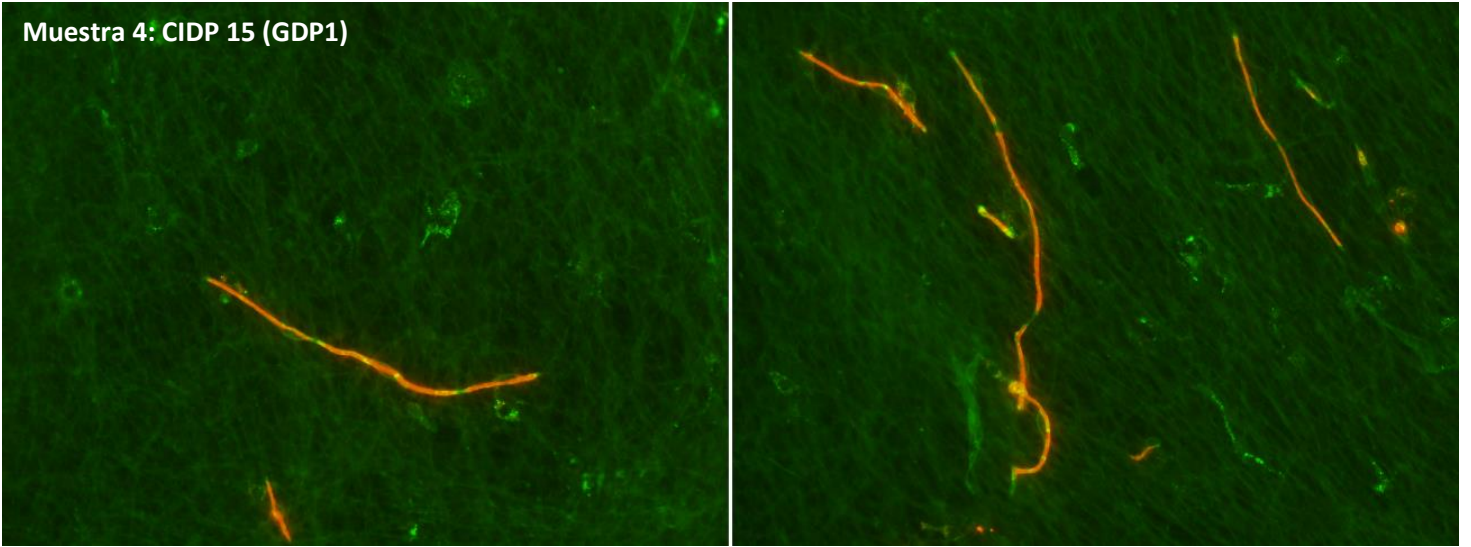
Resultado: se ven muy bien los co-cultivos cultivados en culture slide

1. Control CNTN1+ - doble MBP: casi no hay células
2. Control NF140/186+ - doble MBP: poca mielina. El suero marca los nodos.
3. Control NF155+ - doble panNF: no se ve nada (nose si hay nodos)
4. LIF+ (GDP1) – doble MBP: neuronas ++, mielina +++
5. LIF+ (GDP1) – doble LIF abcam: neuronas ++, mielina +++. El anti-LIF no marca nada
6. LIF+ (GDP1) – doble LIF invitrogen: neuronas ++, mielina +++. El anti-LIF no marca nada
7. GDP2 – doble MBP: el suero no marca casi nada. No hay mielina suficiente para hacer foto doble con MBP, aunque se ve claramente que toda la intensidad de señal está disminuida respecto a GDP1.
8. Cneg 21-2-1608 – doble MBP: no hay mielina y no puedo hacer foto doble con MBP
9. Control CASPR1+ - doble CASPR1 (cubre): el suero marca los axones, pero no consigo ver marcaje en los paranodos → hacer tripe ICC con MBP
10. Control NF155+ - doble MBP (cubre): parece que el suero marque un poco el paranodo (quizás necesita más tiempo para que entren los anticuerpos). En los paranodos más formados (más juntos) se ve más claro el marcaje del paranodo.

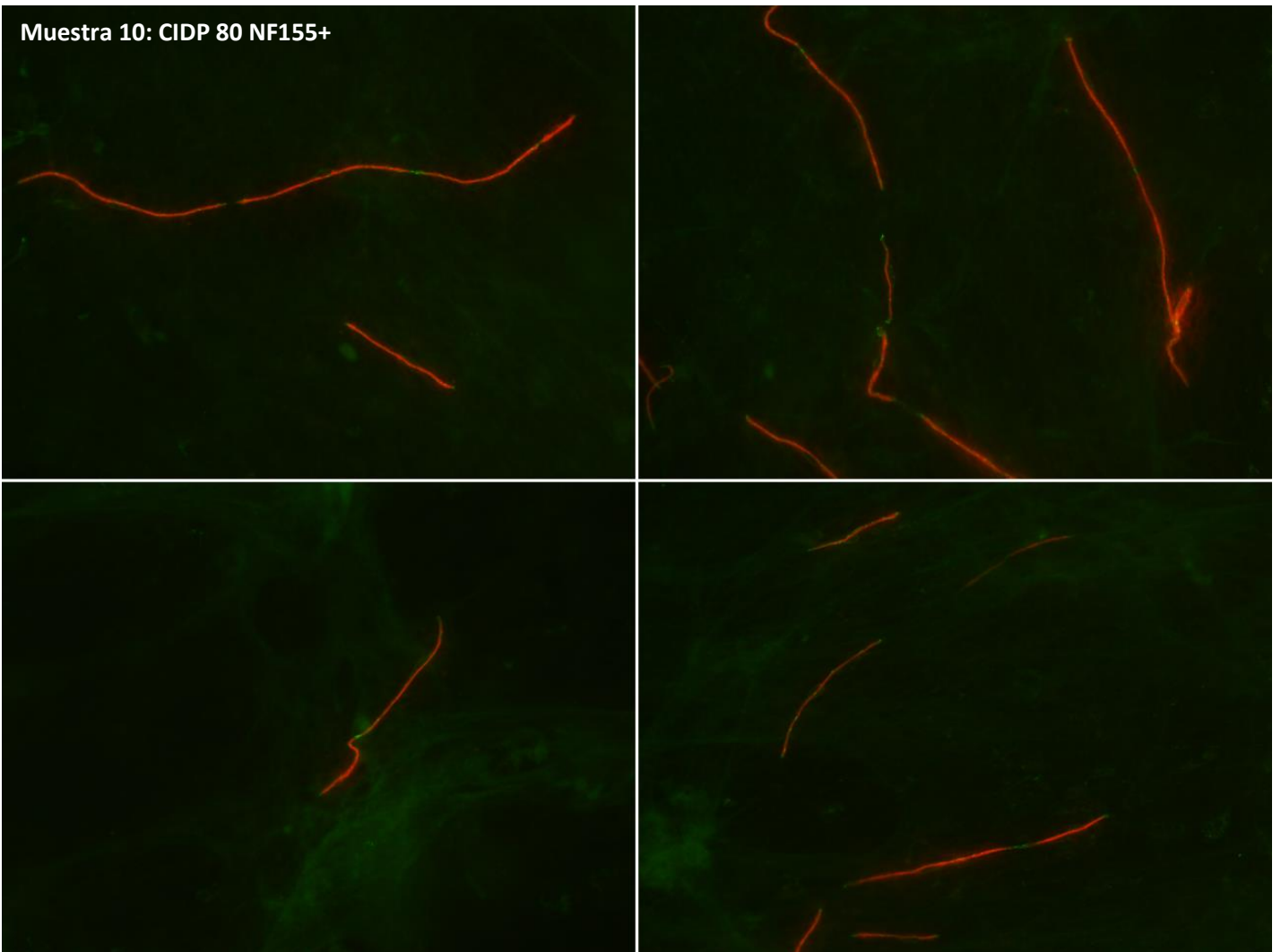
Muestra 2: panNF+



Muestra 4: CIDP 15 (GDP1)



Muestra 10: CIDP 80 NF155+



20/10/2022

Extracción y cultivo de neuronas DRG (rata)

Se extraen a partir de embriones de rata. Ratas Sprague-Dawley embarazadas.

Se piden ratas E15 pero se utilizan pasadas 24 horas → el cultivo se inicia en E16.

Extracción de DRGs

➤ Estabulario

- Llevar al estabulario un tubo falcon de 50 ml con medio L15 (en hielo) y material instrumental (tijeras, bisturí, pinzas...).

Medio L15:

- 45 ml de medio Leibovitz's
- 5 ml de FBS (10%)
 - 50 µl de DNasa (stock a 10 µg/ml) *La DNasa no se añade directamente al medio L15 total, sólo se añaden 5 ul de stock de DNasa a los 5 mL que se usan para inactivar la tripsina.
- Poner el animal a la cámara de CO₂ → abrir la llave hasta el número 2, subir el O₂ hasta el 2, y poner el isofluorano al 5.
- Sacar la rata de la cámara y ponerla encima de un corcho. Pinchar 1ml de TP41 (Solución inyectable para eutanasia) en el corazón.
- Mojar la rata con alcohol y abrir por debajo (ponerla boca arriba). Tirar de las bolsas de los fetos y ponerlos en una placa con L15.
- Sacar todos los fetos de las bolsas y ponerlos en un tubo con medio L15 (en hielo).

➤ Cultivos

- Poner todos los fetos en una placa con el medio L15 y mantenerla sobre el hielo.
- Coger un feto, ponerlo sobre la placa con Agar y mojarlo con PBS (estéril y frío, mantenerlo en hielo). Es importante ir mojando el feto con PBS, no puede quedarse seco en ningún momento.
- Cortar la cabeza con unas tijeras y clavar el feto boca abajo con 4 puntas de aguja en las extremidades.
- Sacar las dos capas que envuelven la medula espinal y sacar la médula procurando que no se rompa.
- Sacar los ganglios que se hayan quedado pegados a la médula y pasarlos a una placa pequeña con L15.
- Con una aguja de insulina sacar para fuera los DRG de la columna e irlos pasando a la placa con L15

Disgregación de los DRGs

- Pasar todos los DRG a un tubo de 15 ml → con pipeta Pasteur de cristal + *xumet*
- Centrifugar a 300 rpm 5 min
- Eliminar el sobrenadante (con pipeta+xumet e ir tirando a una placa, para no perder ningún DRG).
- Poner PBS1x y centrifugar a 300 rpm 5 min.
- Eliminar el sobrenadante y añadir 5 ml de → 4'5ml PBS1x + 500 ul de tripsina 2.5% sin bromophenol.
- Incubar 15min en el baño a 37°C. Homogeneizar suavemente cada 5 min
- Añadir 5 ml de medio L15 (con DNasa) para inactivar la tripsina.
- Centrifugar a 300 rpm 10 min
- Pasar el pellet a un eppendorf con 1ml de medio NG, y disgregar con una pipeta pasteur de cristal fina (*se hace más fina la punta con el bunsen, preparar unos días antes y autoclavar*). Procurar no hacer mucha espuma. Antes de homogeneizar, pasar la pipeta por FBS para que no se queden pegados los DRG a las paredes.

Medio NG:

- 48 ml de medio Neurobasal
- 1 ml de suplemento B27
- 500 µl de glutamax
- 500 µl de Pen-Str
- 25 µl de NGF → uso un NGF diferente: Native mouse NGF 2.5S protein. Sigma: guardado resuspendido a 100ug/ml en -20°C
- Pasar el ml disgregado a un tubo de 15ml con 5ml de medio NG.
- Pasar las células a las placas → las células no se cuentan, las proporciones se hacen en función del nombre de embriones. En este caso hago 5 placas de 100cc sin cubres, y 2 placas de 60cc con cubres pequeños.
 - Coating:
 - Día anterior: coating con Poly-D-lys 1/40 → incubar overnight a 37°C
 - Mismo día: lavar placas y hacer coating con Laminina 2'5 ul/ml → incubar 2h a 37°C

Co-cultivo de neuronas DRG i células de Schwann (rata) → protocolo general

Protocolo mixto entre paper “DRG neuron/Schwann cells Myelinating Cocultures” de Taveggia (2018), paper pan-NF de Appelthausen, y paper “A reliable in vitro model for studying peripheral nerve myelination in mouse” de Stettner (2013).

- **2 placas de 24wells con 1 cubre de 12mm en cada pozo, y 2 culture slides:**
 - Día anterior: coating con Poly-D-lys 1/40 → incubar overnight a 37°C
 - Mismo día: lavar pozos y hacer coating con Laminina 2'5 ul/ml → incubar mínimo 1h a 37°C
- D0 → Añadir 400 ul de medio C (co-culture médium) a cada pozo con cubre:
 - **Medio C (co-culture medium):**
 - DMEM (con D-glucosa y Glutamax): 44,5 ml (ref. 10569-010 ThermoFisher)
 - 10% FBS: 5 ml
 - 1% Pen-Str: 0,5ml
 - 50 ng/ml NGF: 25 ul
 - *según el protocolo original, se usaría MEM en vez de DMEM, y también habría que añadir 1% de L-glutamina y 4mg/ml de D-glucosa → como nuestro DMEM ya lleva glutamina y glucosa, no le añadido más.
- **Poner un DRG o cels disgregadas a partir de un DRG en cada pozo/cubre e incubar a 37°C**
- D1 → cambiar el medio (poner medio C nuevo) → cambio sólo 200ul (la mitad)
- D4 → cambiar el medio por **medio NG** → cambio 400 ul (todo el medio) → en este caso lo haré en D4 (lunes) a primera hora
 - Neurobasal: 48 ml
 - 2% B27: 1 ml
 - 1% L-glutamina (en este caso, Glutamax): 0,5 ml
 - 1% Pen-Str: 0,5 ml
 - 50 ng/ml NGF:25 ul- *según el protocolo original, también habría que añadir 4mg/ml de D-glucosa → como nuestro Neurobasal ya lleva glucosa, no le añadido más.
- D6 → cambiar el medio (poner medio NG nuevo) → cambio 200 ul (la mitad)
- D7 → cambiar el medio por **Medio de mielinización co-cultivos:**
 - Medio C: 30 ml
 - 50 ug/ml de ácido ascórbico: 300 ul del stock 5mg/ml (1/100 en el medio)

- *Preparación previa ácido ascórbico (A4403, Merck): disolver los 100mg en 20ml de DMEM (para hacer 5mg/ml) → congelar en alícuotas de 400 ul tapado con papel de plata*
- 0,5 uM Forskolin: 1,5ul del stock 10mM (1/20000 en el medio)
 - *En el paper de Appelthausen pone 0,05uM, pero creo que en realidad es 0,5um porque es lo que ponen en el paper de Stettner 2013 (en el que ella se basa). Normalmente en las células de Schwann lo usamos a 20um, pero según el paper de Stettner 2013, el forskolin provoca desmielinización (el efecto contrario al deseado).*
- D8 → cambiar el medio (poner medio de mielinización nuevo) → a partir de aquí ir cambiando un día sí uno no (cada 2 días).

Ninguna de las céls de los DRG disgregados han crecido!! Todas muertas!! → descubrimos que la temperatura del baño está a 60°C en vez de a 37°C (está mal calibrada) → al disgregar las cels con la tripsina y ponerlas 15min al baño se mueren todas. Pedir otra rata.

21/10/2022

ELISA Gangliósidos día 2 (EM vacunas 257-297)

Protocolo:

- Lavar 4 veces con PBS
- Preparar **Ac secundarios**: RAH HRP IgG dil. 1/5000 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 **H₂SO₄** al 25% a cada pozo.
- Leer en lector de placas de ELISA a 490-630 nm

Resultado:

PLACA 1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	blanco	GM1	GD1b	GQ1b	blanco	GM1	GD1b	GQ1b	blanco	GM1	GD1b	GQ1b
A 1/100	1,155	1,782	1,155	1,042	0,851	0,846	0,816	0,796	0,619	0,573	0,648	0,503
B 1/500	0,772	0,795	0,7	0,65	0,508	0,668	0,58	0,629	0,466	0,497	0,491	0,508
C 1/100	1,355	0,864	0,8	0,744	1,049	0,878	0,786	0,787	1,355	0,9	0,936	0,692
D 1/500	0,732	0,61	0,6	0,579	0,515	0,501	0,693	0,551	0,807	0,574	0,635	0,54
E 1/100	1,409	1,017	0,871	0,702	1,104	0,562	0,444	0,54	1,616	0,979	0,812	0,631
F 1/500	0,688	0,429	0,36	0,395	0,488	0,267	0,263	0,301	1,225	0,467	0,44	0,396
G 1/100	1,178	0,931	0,734	0,541	1,229	1,051	0,793	0,497	0,532	0,398	0,387	0,286
H 1/500	0,588	0,284	0,262	0,281	0,537	0,383	0,332	0,217	0,26	0,171	0,169	0,149

PLACA 2	1 blanco	2 GM1	3 GD1b	4 GQ1b	5 blanco	6 GM1	7 GD1b	8 GQ1b	9 blanco	10 GM1	11 GD1b	12 GQ1b
A 1/100	0,686	0,501	0,642	0,429	0,626	0,574	0,538	0,535	0,759	0,508	0,567	0,529
B 1/500	0,398	0,417	0,36	0,29	0,505	0,339	0,336	0,306	0,444	0,287	0,319	0,364
C 1/100	0,83	0,787	0,655	0,548	0,581	0,401	0,425	0,312	1,382	1,07	0,963	0,763
D 1/500	0,43	0,335	0,395	0,294	0,258	0,328	0,298	0,267	0,393	0,33	0,272	0,316
E 1/100	1,215	0,7	0,712	0,527	1,322	1,177	0,915	0,623	1,308	1,312	1,095	0,585
F 1/500	0,589	0,298	0,303	0,311	0,744	0,468	0,438	0,368	0,498	0,433	0,367	0,261
G 1/100	1,838	1,364	1,442	1,441	0,691	0,432	0,413	0,392	1,618	1,09	1,048	0,637
H 1/500	1,061	0,405	0,399	0,447	0,3	0,305	0,349	0,229	0,26	0,247	0,194	0,177

PLACA 3	1 blanco	2 GM1	3 GD1b	4 GQ1b	5 blanco	6 GM1	7 GD1b	8 GQ1b	9 blanco	10 GM1	11 GD1b	12 GQ1b
A 1/100	1,028	0,824	0,802	0,709	0,615	0,732	0,668	0,957	0,523	0,582	0,573	0,473
B 1/500	0,605	0,572	0,607	0,525	0,401	0,393	0,53	0,39	0,345	0,351	0,431	0,321
C 1/100	0,709	0,699	0,61	0,622	0,868	0,655	0,491	0,527	1,202	0,855	0,999	0,817
D 1/500	0,402	0,482	0,399	0,521	0,559	0,507	0,403	0,417	0,432	0,374	0,462	0,434
E 1/100	1,173	0,683	0,648	0,466	0,966	0,536	0,506	0,393	0,348	0,205	0,235	0,232
F 1/500	0,576	0,298	0,269	0,209	0,278	0,268	0,186	0,234	0,161	0,188	0,174	0,173
G 1/100	0,967	0,844	0,635	0,327	0,631	0,413	0,349	0,305	1,468	1,167	0,98	0,721
H 1/500	0,399	0,308	0,252	0,246	0,345	0,248	0,182	0,172	0,516	0,325	0,268	0,26

PLACA 4	1 blanco	2 GM1	3 GD1b	4 GQ1b	5 blanco	6 GM1	7 GD1b	8 GQ1b	9 blanco	10 GM1	11 GD1b	12 GQ1b
A 1/100	1,318	0,721	0,65	0,668	0,476	0,565	0,436	0,382	0,584	0,497	0,577	0,386
B 1/500	0,84	0,551	0,441	0,469	0,335	0,452	0,376	0,323	0,217	0,268	0,164	0,147
C 1/100	1,106	0,828	0,729	0,816	0,672	0,715	0,678	0,723	0,733	0,666	0,705	0,698
D 1/500	0,33	0,321	0,453	0,375	0,369	0,502	0,511	0,47	0,417	0,532	0,318	0,337
E 1/100	1,435	0,999	0,973	0,772	0,337	0,208	0,155	0,154	1,522	1,155	1,07	0,735
F 1/500	0,651	0,382	0,351	0,309	0,161	0,161	0,105	0,139	0,328	0,209	0,213	0,158
G 1/100	1,475	0,895	0,856	0,69	1,075	0,854	0,626	0,528	0,947	0,629	0,508	0,355
H 1/500	0,235	0,129	0,126	0,174	0,565	0,32	0,253	0,211	0,478	0,257	0,214	0,153

PLACA 5	1 blanco	2 GM1	3 GD1b	4 GQ1b	5 blanco	6 GM1	7 GD1b	8 GQ1b	9 blanco	10 GM1	11 GD1b	12 GQ1b
A 1/100	0,646	0,566	0,727	0,715	0,977	0,802	0,906	0,728	0,719	0,757	0,778	0,687
B 1/500	0,583	0,469	0,68	0,67	0,833	0,553	0,677	0,544	0,672	0,578	0,627	0,497
C 1/100	1,275	1,052	1,215	1,049	1	0,998	1,023	1,049	0,838	0,853	0,711	0,716
D 1/500	0,753	0,796	0,811	0,954	0,698	0,714	0,7	0,533	0,571	0,456	0,593	0,669
E 1/100	0,851	0,6	0,66	0,447	1,857	1,335	1,176	0,981	1,42	1,091	1,031	0,664
F 1/500	0,432	0,295	0,384	0,486	1,024	0,746	0,601	0,477	1,096	0,509	0,485	0,366
G 1/100	1,196	1,252	1,264	0,692	1,328	0,976	0,7	0,612	1,101	0,803	0,63	0,572
H 1/500	0,523	0,458	0,727	0,479	0,777	0,53	0,421	0,39	0,546	0,395	0,412	0,315

PLACA 6	1 blanco	2 GM1	3 GD1b	4 GQ1b	5 blanco	6 GM1	7 GD1b	8 GQ1b	9 blanco	10 GM1	11 GD1b	12 GQ1b
A 1/100	0,999	1,085	1,081	1,087	0,993	1,004	1,069	1,196	0,937	1,038	1,041	0,606
B 1/500	0,654	0,796	0,801	0,965	0,724	0,799	0,823	0,792	0,436	0,507	0,501	0,513
C 1/100	1,194	0,991	1,016	0,829	1,412	1,264	1,375	1,152	0,608	0,704	0,522	0,458
D 1/500	0,623	0,654	0,648	0,813	0,851	0,865	0,858	0,808	0,548	0,45	0,519	0,629
E 1/100	1,272	0,687	0,643	0,542	1,287	0,928	0,812	0,543	1,014	0,916	0,711	0,603
F 1/500	0,735	0,455	0,439	0,627	0,79	0,662	0,586	0,401	0,498	0,499	0,566	0,437
G 1/100	1,726	1,31	1,049	0,817	1,641	1,129	1,018	0,755	0,435	0,428	0,468	0,436
H 1/500	0,509	0,528	0,45	0,382	1,047	0,612	0,576	0,526	0,456	0,275	0,568	0,448

PLACA 7	1 blanco	2 GM1	3 GD1b	4 GQ1b	5 blanco	6 GM1	7 GD1b	8 GQ1b	9 blanco	10 GM1	11 GD1b	12 GQ1b
A 1/100	0,574	0,587	0,534	0,551	0,791	0,746	0,415	0,694	0,522	0,416	0,476	0,403
B 1/500	0,383	0,497	0,326	0,438	0,449	0,56	0,443	0,427	0,392	0,364	0,387	0,409
C 1/100	0,957	1,479	1,049	1,054	1,184	1,206	1,109	1,001	1,835	3,817	3,688	3,115
D 1/500	0,615	0,837	0,674	0,63	0,705	0,675	0,719	0,571	1,398	3,699	3,462	2,164
E 1/100	0,223	0,314	0,246	0,228	1,197	1,031	0,53	0,587	1,148	1,263	0,789	0,46
F 1/500	0,275	0,38	0,252	0,202	0,669	0,562	0,441	0,395	0,513	0,555	0,394	0,253
G 1/100	1,452	1,036	0,893	0,587	1,341	1,208	0,866	0,694	1,155	1,666	2,199	1,788
H 1/500	0,712	0,451	0,378	0,343	0,913	0,601	0,442	0,309	0,831	1,056	2,117	1,395

Cambiar medio co-cultivos (rata 20/10/22)

- D1 → cambiar el medio (poner medio C nuevo) → cambio sólo 200ul (la mitad)

24/10/2022

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

- También hago coating 1 culture slide nuevo para probar (son más baratos) → Imaging chamber 8wells (130-098-272 Milteny)

Coating placas 12w (inmunoabsorción LIF)

- Coating 2 placas de 12w con Poly-D 1/40 en PBS1x (de stock poly-d 1 mg/ml) → mínimo 1h a 37°C
- Coating HEK293: 200.000 cels/pozo + 1ml de medio

ELISA Gangliósidos día 1 (EM vacunas 298-327)

Objetivo: testar las muestras del estudio "Efficacy and neurological adverse effects of COVID-19 vaccination in patients immunocompromised for multiple sclerosis"

Muestras: (40 muestras del estudio EM vacunas – IgG e IgM):

	NHC	Código externo	Tiempo	Box	Posición	Resultado GM1	Resultado GD1b	Resultado GQ1b
298	1492240	VACEM279HSJD	T3	SANT PAU T3.4	E1	neg	neg	neg
299	103530535	VACEM316HSJD	T3	SANT PAU T3.4	E2	neg	solo 1/500	neg
300	1678842	VACEM287HSJD	T3	SANT PAU T3.4	E3	neg	solo 1/500	neg
301	1193968	VACEM286HSJD	T3	SANT PAU T3.4	E6	neg	neg	1/100
302	1049661	VACEM320HSJD	T3	SANT PAU T3.4	E7	neg	neg	neg
303	1129611	VACEM317HSJD	T3	SANT PAU T3.4	E8	neg	1/100	neg
304	1668234	VACEM323HSJD	T3	SANT PAU T3.4	E9	neg	neg	neg
305	1126522	VACEM319HSJD	T3	SANT PAU T3.4	F1	solo 1/500	solo 1/500	1/500
306	1745671	VACEM321HSJD	T3	SANT PAU T3.4	F2	neg	neg	neg
307	1551095	VACEM324HSJD	T3	SANT PAU T3.4	F3	neg	neg	neg
308	4668233	VACEM375	T3	SANT PAU T3.4	F8	neg	neg	neg
309	4667822	VACEM366	T3	1 (últimas cajas)	C3	neg	solo 1/500	solo 1/500
310	4977039	VACEM385	T3	1 (últimas cajas)	A6	neg	neg	neg
311	4567054	VACEM339	T3	1 (últimas cajas)	A4	neg	neg	neg
312	5432016	VACEM426	T3	1 (últimas cajas)	A5	neg	neg	neg
313	4533952	VACEM433	T3	1 (últimas cajas)	A9	neg	neg	neg
314	80045421	VACEM409	T3	1 (últimas cajas)	A8	neg	neg	neg
315	5400268	VACEM437	T3	1 (últimas cajas)	B2	neg	neg	neg
316	1763698	VACEM438HSJD	T3	1 (últimas cajas)	B8	solo 1/500	neg	solo 1/500
317	4800712		T3	1 (últimas cajas)	B7	neg	1/100	neg
318	1652922		T3	1 (últimas cajas)	C2	1/100	1/100	neg
319	1867690		T3	Caja 1 (últimas cajas)	B9	neg	neg	neg
320	1553320		T3	Caja 2 (últimas cajas)	G6	neg	neg	neg
321	1694993	VACEM280HSJD	T3	Última caja	C3	neg	neg	neg
322	1615358	VACEM422HSJD	T3	Última caja	C5	1/100	1/100	neg
323	1703785	SJD	T3	Caja 3 (últimas cajas)	G4	neg	neg	neg
324	1018612	SJD	T3	Caja 3 (últimas cajas)	G5	neg	neg	neg
325	1124277	SJD	T3	Caja 3 (últimas cajas)	G6	neg	neg	neg
326	1634073	SJD	T3	Caja 3 (últimas cajas)	G7	neg	neg	neg
327	1091021		T3	Caja 3 (últimas cajas)	G8	neg	neg	neg

A parte, **repetición** muestras que han salido un poco positivas a 1/100 y 1/500 previamente:

- 45 IgG (1673967)
- 57 IgG (1347111)
- 79 IgG (66440)
- 98 IgG (357152 Box 3.1)
- 101 IgG (70333876 Box 3.1)
- 103 IgG (4027577 Box 3.1)
- 105 IgG (70023763 Box 3.1)
- 116 IgG (5359092 Box 3.1)

· 121 IgG (70506293 Box 3.1)

· 161 IgG (4428266 Box 3.2)

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

PLACA 1	1 blanco	2 GM1	3 GD1b	4 GQ1b	5 blanco	6 GM1	7 GD1b	8 GQ1b	9 blanco	10 GM1	11 GD1b	12 GQ1b
A 1/100	298				299				300			
B 1/500	298				299				300			
C 1/100	301				302				303			
D 1/500	301				302				303			
E 1/100	298				299				300			
F 1/500	298				299				300			
G 1/100	301				302				303			
H 1/500	301				302				303			

PLACA 2	1 blanco	2 GM1	3 GD1b	4 GQ1b	5 blanco	6 GM1	7 GD1b	8 GQ1b	9 blanco	10 GM1	11 GD1b	12 GQ1b
A 1/100	304				305				306			
B 1/500	304				305				306			
C 1/100	307				308				309			
D 1/500	307				308				309			
E 1/100	304				305				306			
F 1/500	304				305				306			
G 1/100	307				308				309			
H 1/500	307				308				309			

PLACA 3	1 blanco	2 GM1	3 GD1b	4 GQ1b	5 blanco	6 GM1	7 GD1b	8 GQ1b	9 blanco	10 GM1	11 GD1b	12 GQ1b
A 1/100	310				311				312			
B 1/500	310				311				312			
C 1/100	313				314				315			
D 1/500	313				314				315			
E 1/100	310				311				312			
F 1/500	310				311				312			
G 1/100	313				314				315			
H 1/500	313				314				315			

PLACA 4	1 blanco	2 GM1	3 GD1b	4 GQ1b	5 blanco	6 GM1	7 GD1b	8 GQ1b	9 blanco	10 GM1	11 GD1b	12 GQ1b
A 1/100	316				317				318			
B 1/500	316				317				318			
C 1/100	319				320				321			
D 1/500	319				320				321			
E 1/100	316				317				318			
F 1/500	316				317				318			
G 1/100	319				320				321			
H 1/500	319				320				321			

PLACA 5	1 blanco	2 GM1	3 GD1b	4 GQ1b	5 blanco	6 GM1	7 GD1b	8 GQ1b	9 blanco	10 GM1	11 GD1b	12 GQ1b
A 1/100	322				323				324			
B 1/500	322				323				324			
C 1/100	325				326				327			
D 1/500	325				326				327			
E 1/100	322				323				324			
F 1/500	322				323				324			
G 1/100	325				326				327			
H 1/500	325				326				327			

PLACA 6	1 blanco	2 GM1	3 GD1b	4 GQ1b	5 blanco	6 GM1	7 GD1b	8 GQ1b	9 blanco	10 GM1	11 GD1b	12 GQ1b
A 1/100	Cpos IgM				Cpos IgG				Rep. 45 IgG			
B 1/500	Cpos IgM				Cpos IgG				Rep. 45 IgG			
C 1/100	Rep. 57 IgG				Rep. 79 IgG				Rep. 98 IgG			
D 1/500	Rep. 57 IgG				Rep. 79 IgG				Rep. 98 IgG			
E 1/100	Rep. 101 IgG				Rep. 103 IgG				Rep. 105 IgG			
F 1/500	Rep. 101 IgG				Rep. 103 IgG				Rep. 105 IgG			
G 1/100	Rep. 116 IgG				Rep. 121 IgG				Rep. 161 IgG			
H 1/500	Rep. 116 IgG				Rep. 121 IgG				Rep. 161 IgG			

Cambiar medio co-cultivos (rata 20/10/22)

- D4 → cambiar el medio por **medio NG** → cambio 400 ul
 - Neurobasal: 48 ml
 - 2% B27: 1 ml
 - 1% L-glutamina (en este caso, Glutamax): 0,5 ml
 - 1% Pen-Str: 0,5 ml
 - 50 ng/ml NGF: 25 ul

*según el protocolo original, también habría que añadir 4mg/ml de D-glucosa → como nuestro Neurobasal ya lleva glucosa, no le añado más.

25/10/2022

Coating células + transfección Culture slides

13 culture slides (12 normales y 1 nuevo):

- 8 perfil (contando el nuevo)
- 4 LRP4
- 1 perfil (pero en vez de NF186 poner dos veces NF140) → para testar las muestras de las vacunas de EM

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 placas 12w (inmunoabsorción LIF)

El día anterior hice coating de 2 placas de 12w → sólo voy a transfectar 1 placa con LIF, en la otra dejo HEKs sin transfectar para usarlas como control de inmunoabsorción.

Protocolo:

- Preparar mezclas transfección → cada pozo (12 pozos)
 - 2 ug DNA + 62,5 ul Optimem
 - 3 ul lipofectamina2000 + 62,5 ul Optimem
- Juntar y dejar reposar mínimo 5 minutos
- Poner 125 ul de mezcla de transfección a cada pozo

ELISA Gangliósidos día 2 (EM vacunas 298-327)

Protocolo:

- Lavar 4 veces con PBS

- Preparar **Ac secundarios**: RAH HRP IgG dil. 1/5000 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 **H₂SO₄** al 25% a cada pozo.
- Leer en lector de placas de ELISA a 490-630 nm

Resultado:

PLACA 1	1 blanco	2 GM1	3 GD1b	4 GQ1b	5 blanco	6 GM1	7 GD1b	8 GQ1b	9 blanco	10 GM1	11 GD1b	12 GQ1b
A 1/100	1,936	1,431	1,315	1,212	1,32	1,229	1,222	1,254	1,809	1,483	1,746	1,606
B 1/500	1,298	1,136	1,193	0,821	0,924	0,811	1,109	0,926	1,283	1,12	1,412	0,892
C 1/100	1,251	1,122	1,324	1,385	1,438	1,028	1,221	0,984	1,688	1,766	1,854	1,567
D 1/500	1,332	0,847	0,926	0,865	1,049	0,761	0,813	0,824	1,337	1,114	1,191	0,877
E 1/100	2,324	1,508	1,401	0,903	2,368	1,698	1,613	1,109	2,843	2,222	1,944	1,213
F 1/500	1,004	0,49	0,39	0,393	1,267	0,592	0,58	0,437	1,997	0,938	0,796	0,547
G 1/100	0,31	0,201	0,194	0,2	1,601	1,015	0,917	0,863	2,555	2,363	2,365	1,398
H 1/500	0,17	0,147	0,152	0,154	0,762	0,406	0,392	0,323	1,508	1,148	1,084	0,561

PLACA 2	1 blanco	2 GM1	3 GD1b	4 GQ1b	5 blanco	6 GM1	7 GD1b	8 GQ1b	9 blanco	10 GM1	11 GD1b	12 GQ1b
A 1/100	2,133	1,5	1,776	1,46	1,279	1,127	1,193	1,425	1,868	1,475	1,409	1,272
B 1/500	1,484	1,493	1,354	1,319	1,071	1,288	1,329	1,164	1,348	1,31	1,158	0,869
C 1/100	1,819	1,615	1,331	0,872	2,286	2,205	2,219	1,839	1,543	1,495	1,477	1,551
D 1/500	1,336	1,09	1,029	1,187	1,534	1,329	1,467	1,413	1,068	0,785	1,562	1,337
E 1/100	1,821	1,484	1,113	0,902	1,938	0,82	0,898	0,769	2,905	2,223	2,166	1,7
F 1/500	0,863	0,566	0,431	0,317	0,837	0,395	0,388	0,456	2,216	1,039	1,098	0,727
G 1/100	1,062	0,85	0,825	0,413	1,546	1,153	1,176	1,066	2,339	1,331	1,336	0,994
H 1/500	0,539	0,314	0,246	0,253	0,899	0,539	0,515	0,454	1,338	0,597	0,519	0,408

PLACA 3	1 blanco	2 GM1	3 GD1b	4 GQ1b	5 blanco	6 GM1	7 GD1b	8 GQ1b	9 blanco	10 GM1	11 GD1b	12 GQ1b
A 1/100	1,809	1,331	1,331	1,559	2,172	1,537	1,673	1,626	2,132	1,383	1,385	1,162
B 1/500	1,107	0,969	1	0,855	1,291	1,03	1,108	0,927	1,011	0,916	0,966	0,763
C 1/100	1,383	1,23	1,07	1,17	2,123	1,667	1,862	1,667	1,3	1,264	0,857	1,101
D 1/500	0,873	0,803	0,724	0,776	1,24	0,948	1,122	1,016	0,796	0,666	0,602	0,582
E 1/100	2,828	1,943	1,616	1,438	1,251	0,819	0,75	0,538	2,372	1,881	1,662	1,25
F 1/500	2,085	0,857	0,704	0,543	0,621	0,336	0,348	0,36	1,307	0,872	0,718	0,566
G 1/100	1,413	0,974	0,871	0,847	2,091	1,92	1,67	1,681	2,227	0,783	0,68	0,444
H 1/500	0,617	0,393	0,393	0,323	1,185	0,844	0,895	0,753	1,139	0,277	0,256	0,151

PLACA 4	1 blanco	2 GM1	3 GD1b	4 GQ1b	5 blanco	6 GM1	7 GD1b	8 GQ1b	9 blanco	10 GM1	11 GD1b	12 GQ1b
A 1/100	1,297	1,29	1,313	1,372	1,746	1,674	1,969	1,49	1,367	1,628	1,508	1,319
B 1/500	0,745	0,871	0,823	0,907	1,441	0,979	1,14	1,116	0,953	0,82	0,876	0,91
C 1/100	1,555	1,344	1,198	1,198	1,747	1,125	1,14	1,204	1,805	1,653	1,786	1,513
D 1/500	0,961	0,725	0,946	0,704	0,903	0,674	0,687	0,94	1,183	1,038	1,087	0,887
E 1/100	2,317	1,46	1,534	1,038	2,706	1,709	1,047	1,086	1,084	0,526	0,459	0,44
F 1/500	1,644	0,751	0,62	0,458	1,657	0,929	0,648	0,601	0,494	0,23	0,21	0,266
G 1/100	1,865	1,377	1,039	0,737	2,107	1,153	1,054	0,952	1,43	1,077	0,82	0,504
H 1/500	0,969	0,455	0,436	0,329	1,055	0,54	0,499	0,403	0,624	0,474	0,399	0,323

PLACA 5	1 blanco	2 GM1	3 GD1b	4 GQ1b	5 blanco	6 GM1	7 GD1b	8 GQ1b	9 blanco	10 GM1	11 GD1b	12 GQ1b
A 1/100	1,274	1,377	1,374	0,798	1,771	1,288	1,236	0,948	1,659	1,486	1,363	1,131
B 1/500	0,67	0,563	0,522	0,54	0,959	0,799	0,763	0,546	1,047	0,834	0,947	0,718
C 1/100	1,555	1,375	1,381	1,112	1,717	1,313	1,092	1,222	1,511	1,295	1,449	1,233
D 1/500	0,702	0,732	0,582	0,688	0,735	0,837	0,733	0,679	0,874	0,712	0,803	0,81
E 1/100	2,091	0,752	0,694	0,48	2,451	1,318	1,155	0,848	1,896	0,962	0,897	0,788
F 1/500	1,405	0,378	0,377	0,31	1,358	0,667	0,54	0,446	1,063	0,413	0,446	0,386
G 1/100	1,708	1,276	1,048	0,947	1,935	1,542	1,464	1,13	1,086	0,722	0,488	0,438
H 1/500	0,796	0,526	0,444	0,446	0,92	0,698	0,598	0,434	0,513	0,28	0,409	0,291

PLACA 6	1 blanco	2 GM1	3 GD1b	4 GQ1b	5 blanco	6 GM1	7 GD1b	8 GQ1b	9 blanco	10 GM1	11 GD1b	12 GQ1b
A 1/100	1,629	1,886	3,21	2,471	2,215	3,888	3,903	3,909	1,464	1,249	1,175	1,206
B 1/500	1,322	1,115	3,03	1,878	1,881	3,9	3,882	3,198	1,174	0,939	1,03	0,814
C 1/100	1,527	1,305	1,619	1,592	0,809	1,013	0,79	1,006	1,435	1,1	1,261	1,168
D 1/500	1,579	1,416	1,212	1,296	0,767	1,049	0,958	0,955	1,151	1,054	1,163	0,963
E 1/100	1,398	1,256	1,594	1,152	1,77	1,949	1,413	1,118	2,088	1,244	1,669	1,061
F 1/500	1,112	1,345	1,349	1,057	1,289	1,326	1,13	1,17	1,624	0,988	1,304	1,039
G 1/100	2,423	2,753	2,235	1,41	2,69	2,407	2,129	1,583	2,968	1,578	1,692	1,419
H 1/500	1,705	1,698	1,399	1,149	2,257	1,768	1,593	1,372	2,688	1,366	1,447	1,137

IHC Monkey peripheral nerve (GDP1)

Objetivo: establecer a qué dilución máxima se sigue viendo el marcaje de mielina en la muestra GDP1 (CIDP15, muestra LIF+), para saber a qué dilución hacer la inmunoabsorción en HEKs transfectadas con LIF (y ver si el marcaje de la mielina desaparece o se mantiene).

Muestras:

1. GDP1 (CIDP15, 134-17) 1/20
2. GDP1 (CIDP15, 134-17) 1/50

3. GDP1 (CIDP15, 134-17) 1/100
4. GDP1 (CIDP15, 134-17) 1/200
5. Cneg 1/100

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

- Bloquear 30 min - 1h con Goat serum 5%
- Incubar 1h con 40 ul de suero diluído en Goat serum 5%
- 3 lavados con PBS1x
- Incubar 1h con 30-40 ul de Ac. secundario: GAH488 IgG monkey absorbed 1/500
- 3 lavados con PBS1x
- Montar con fluoromount

Resultados:

- Se ve positivo claramente a 1/20 y a 1/50, a 1/100 y 1/200 también se ve la mielina pero hay menos diferencia con el control negativo → hacer inmunoabsorción a 1/50

26/10/2022

Inmunoabsorción LIF

Placas 12w transfectadas día 25/10/2022 (placa con HEKs no transfectadas y placa con HEKs transfectadas con LIF)

Muestra:

- GDP1 (CIDP15, 134-17) 1/50

Protocolo:

- Fijar pozos con PFA4% 10min
- 1 lavado con PBS1x
- Permeabilizar con tritón 0'3% 5min
- Diluir muestras en Goat serum 5 % → preparar 300 ul/condición (HEKs transfectadas con LIF, HEKs no transfectadas)
- Incubar 30min en cada uno de los 12 pozos de cada condición
- Congelar el suero inmunoabsorbido a -20°C

Resultado: Marta ha hecho las IHC en nervio de mono (28.10.22) con las muestras absorbidas, y se ven prácticamente iguales las dos (abs con HEKs no transf. y abs con LIF). Marta hace la ICC en HEKs transfectadas con LIF y ha desaparecido el marcaje en las dos muestras → puede que al haberlo inmunoabsorbido tanto, se hayan ido todas las IgG.

Probar a immunoabsorber alguna muestra de EM que marque mucho la mielina en IgG y ver si también desaparece el marcaje de mielina, y repetir immunoabsorción de GDP1 a 1/20 (sólo pasar cada muestra por 6 pozos).

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

27/10/2022

Cambiar medio co-cultivos (rata 20/10/22)

- D7 → cambiar el medio por **Medio de mielinización co-cultivos**:
 - Medio C: 30 ml
 - 50 µg/ml de ácido ascórbico: 300 µl del stock 5mg/ml (1/100 en el medio)
 - *Preparación previa ácido ascórbico (A4403, Merck): disolver los 100mg en 20ml de DMEM (para hacer 5mg/ml) → congelar en alícuotas de 400 µl tapado con papel de plata*
 - 0,5 µM Forskolin: 1,5µl del stock 10mM (1/20000 en el medio)
 - *En el paper de Appelthauser pone 0,05µM, pero creo que en realidad es 0,5µm porque es lo que ponen en el paper de Stettner 2013 (en el que ella se basa). Normalmente en las células de Schwann lo usamos a 20µm, pero según el paper de Stettner 2013, el forskolin provoca desmielinización (el efecto contrario al deseado).*

28/10/2022

Cambiar medio co-cultivos (rata 20/10/22)

- D8 (a última hora) → cambiar el medio (poner medio mielinización nuevo) → cambio 200 µl (la mitad)

31/10/2022

Cambiar medio co-cultivos (rata 20/10/22)

- D11 → cambiar el medio (poner medio mielinización nuevo) → cambio 200 ul (la mitad)

01/11/2022

ELISA Gangliósidos día 1 (EM vacunas 298-327)

Objetivo: testar las muestras del estudio "*Efficacy and neurological adverse effects of COVID-19 vaccination in patients immunocompromised for multiple sclerosis*"

Muestras: repetición de muestras que han salido positivas a 1/100 y 1/500 previamente (las que han salido sólo a 1/100 o sólo a 1/500 de momento no se testan)

- 57 IgG (1347111)
- 79 IgG (66440)
- 98 IgG (357152)
- 101 IgG (70333876 Box 3.1)
- 103 IgG (4027577 Box 3.1)
- 105 IgG (70023763 Box 3.1)
- 107 IgG (5068000)
- 110 IgG (70314943)
- 116 IgG (5359092 Box 3.1)
- 121 IgG (70506293 Box 3.1)
- 195 IgG (5181997 Box 3.2)
- 199 IgG (5193888)
- 203 IgG (4839043 Box 3.3)
- 205 IgG (4204483)
- 206 IgG (5160187 Box 3.3)
- 211 IgG (5146303 Box 3.3)
- 218 IgG (70756276)
- 223 IgG (524026 Box 3.3)
- 296 IgG (1592323 Box 3.4)
- 305 IgG (1126522 Box 3.4)
- 22-2-827 Box 305

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

PLACA 1	1 blanco	2 GM1	3 GD1b	4 GQ1b	5 blanco	6 GM1	7 GD1b	8 GQ1b	9 blanco	10 GM1	11 GD1b	12 GQ1b
A 1/100	57				98				103			
B 1/500	57				98				103			
C 1/100	105				107				110			
D 1/500	105				107				110			
E 1/100	116				121				195			
F 1/500	116				121				195			
G 1/100	199				203				205			
H 1/500	199				203				205			

PLACA 2	1 blanco	2 GM1	3 GD1b	4 GQ1b	5 blanco	6 GM1	7 GD1b	8 GQ1b	9 blanco	10 GM1	11 GD1b	12 GQ1b
A 1/100	206				211				218			
B 1/500	206				211				218			
C 1/100	223				296				305			
D 1/500	223				296				305			
E 1/100	79 (1/100 1/500)				101 (1/100 1/500)				22-2-827			
F 1/500	79 (1/100 1/500)				101 (1/100 1/500)				22-2-827			
G 1/100	79 (1/2500 1/12500)				101 (1/2500 1/12500)				Cpos IgG			
H 1/500	79 (1/2500 1/12500)				101 (1/2500 1/12500)				Cpos IgG			

Transformació plàsmids NCAM2 i CASPR1

Plàsmid NCAM2 → OHu59215C (GenScript) []= 100 ng/ul (es reconstitueixen 10 ug de DNA en 100 ul d'aigua), resistència a ampicil·lina

Plàsmid CASPR1 → EX-M0417-M02 (Genecopoeia). Resistència a ampicil·lina. Agafo el DNA originari de Genecopoeia, no el DNA que utilitzem per transfectar.

*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 4 tubs falcon de bacteris (amb doble tancament) → control positiu, control negatiu, LGI4, NCAM2.
- 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

- **CASPR1**: afegir 0'1 – 50 ng → afegeixo 0,5 ul de plàsmid (50 ng).
- **NCAM2**: 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 8 plaques (s'han d'atemperar una estona a Tambient):
 - Control **positiu**: 100 µL
 - Control **negatiu**: 100 µL
 - **CASPR1**: 50 µL, 100 µL, 150 µL
 - **NCAM2**: 50 µL, 100 µL, 150 µL
- Incubar tota la nit a 37°C (a l'estufa, plaques boca abaix)

02/11/2022

Starter plàsmids NCAM2 i CASPR1

A primera hora: picar algunes colònies de les plaques amb CASPR1 i NCAM2 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 + ampil·lina 1/1000 → deixar anar la punta dins del tub i deixar-la allà.
- Deixar unes hores a 37°C agitant a 225-250 rpm (agitador orbital)
- Preparar un erlenmeyer de 250 mL de medi LB amb ampil·lina 1/1000
- A última hora de la tarda abocar l'*starter* prèviament seleccionat a l'erlenmeyer.
- Incubar overnight a 37 °C en agitació (agitador orbital)

ELISA Gangliósidos día 2 (EM vacunas repeticiones)

Protocolo:

- Lavar 4 veces con PBS
- Preparar **Ac secundarios**: RAH HRP IgG dil. 1/5000 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 **H₂SO₄** al 25% a cada pozo.
- Leer en lector de placas de ELISA a 490-630 nm

Resultado:

PLACA 1	1 blanco	2 GM1	3 GD1b	4 GQ1b	5 blanco	6 GM1	7 GD1b	8 GQ1b	9 blanco	10 GM1	11 GD1b	12 GQ1b
A 1/100	0,718	0,658	0,766	0,582	0,8	0,657	0,645	0,582	1,044	0,963	0,734	0,56
B 1/500	0,545	0,529	0,432	0,44	0,52	0,447	0,372	0,318	0,608	0,446	0,52	0,375
C 1/100	1,106	0,798	0,749	0,888	1,26	0,872	0,879	0,732	0,744	0,54	0,623	0,447
D 1/500	0,826	0,658	0,579	0,43	0,629	0,529	0,514	0,407	0,447	0,377	0,326	0,3
E 1/100	1,288	1,735	1,269	0,743	1,161	0,8	0,907	0,566	1,215	0,945	0,874	0,714
F 1/500	0,702	0,757	0,607	0,565	0,627	0,606	0,453	0,382	0,744	0,532	0,509	0,441
G 1/100	1,607	1,274	1,154	1,152	0,592	0,515	0,438	0,396	0,849	0,646	0,766	0,539
H 1/500	0,827	0,618	0,599	0,497	0,383	0,306	0,264	0,223	0,517	0,357	0,317	0,248

PLACA 2	1 blanco	2 GM1	3 GD1b	4 GQ1b	5 blanco	6 GM1	7 GD1b	8 GQ1b	9 blanco	10 GM1	11 GD1b	12 GQ1b
A 1/100	0,858	1,142	1,113	0,795	0,696	0,619	0,638	0,633	0,702	0,632	0,541	0,575
B 1/500	0,694	0,68	0,605	0,468	0,616	0,518	0,519	0,441	0,548	0,476	0,503	0,477
C 1/100	0,969	1,115	1,011	0,657	1,183	1,24	0,98	0,797	1,031	0,798	0,789	0,691
D 1/500	0,649	0,712	0,504	0,484	0,928	0,743	0,839	0,54	0,706	0,57	0,477	0,507
E 1/100	0,57	0,497	0,496	0,402	0,643	0,575	0,469	0,638	0,927	0,701	0,766	0,88
F 1/500	0,444	0,43	0,418	0,418	0,625	0,401	0,482	0,337	0,521	0,642	0,493	0,501
G 1/100	0,457	0,405	0,348	0,237	0,404	0,439	0,315	0,312	1,622	3,899	3,777	3,681
H 1/500	0,405	0,421	0,424	0,295	0,347	0,448	0,346	0,298	1,159	3,846	3,354	2,464

ICC Perfil (muestras EM vacunas)

Objetivo: testar las muestras del estudio "Efficacy and neurological adverse effects of COVID-19 vaccination in patients immunocompromised for multiple sclerosis" → confirmar la positividad de las muestras que han dado 2 veces positivo por ELISA de alguna proteína nodo/paranodal.

Muestras: (céls fijadas)

- NF155:
 1. 70054333 (179)
 2. 4256262 (202)
- NF140:
 4. 80005335 (100)
 5. 70170685 (104)
 6. 4983277 (263)
- CNTN1:
 1. 70170685 (104)

Uso 1 porta de Perfil (en vez de NF186 hay NF140):

2. arriba (en orden): 104, 100, 179, 263
3. abajo (en orden): CNTN1+ , 104, 202, NF140+

Resultado: todas las muestras de EM se ven negativas

ELISA NF140, NF155, CNTN1, NF186 (screening EM vacunes y otros)

Objetivo: testar las muestras del estudio "*Efficacy and neurological adverse effects of COVID-19 vaccination in patients immunocompromised for multiple sclerosis*" → confirmar la positividad de las muestras que han dado 2 veces positivo por ELISA de alguna proteína nodo/paranodal.

Muestras EM vacunas:

- | | |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none">· NF155:<ol style="list-style-type: none">1. 70054333 (179)2. 4256262 (202)3. 1553320 (320)· CNTN1:<ol style="list-style-type: none">1. 70170685 (104)2. 1615358 (322) | <ul style="list-style-type: none">· NF140:<ol style="list-style-type: none">4. 1153091 (29)5. 229342 (73)6. 80005335 (100)7. 70170685 (104)8. 4983277 (263)9. 22-37535910. 22-364944 |
|--|---|

Otras muestras:

- 22-375359 → NF140 y NF186 (muestra dudosa por ICC, aunque la dimos por negativa)
- 22-364944 → NF140 y NF186 (muestra claramente positiva por ICC de NF186)
- 22-2-950 → CASPR1 (screening)
- 22-376503 (Saludes Martí) → titulación NF155 (IgG4)
 1. 22-2-482 Box 297 (muestra anterior Saludes Martí 22-237421 28/02/2022 Título 1/900): título 1/300 (IgG4)

Protocolo:

- Bloquear con leche 5% en PBS-tween 0'1% → 200 ul pozo (incubar 1h a temp. ambiente)
- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
- Diluir los **sueros**:
 - Screening: diluir sueros 1/100 en leche 5% en PBS-tween 0'1%
 - 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 (a: 1/100, b:1/300, c:1/900, d: 1/2700, e: 1/8100 i f: 1/24300)
- 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 **H₂SO₄** 25%
- Leer a 450-570 nm

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	Cneg	376503 1/900	237421 1/100	237421 1/8100	179	Cneg	Cneg	100	364944	Cneg	Cneg	
B blanc	Cneg	376503 1/900	237421 1/100	237421 1/8100	179	Cneg	Cneg	100	364944	Cneg	Cneg	
C prot	Cpos NF155	376503 1/2700	237421 1/300	237421 1/24300	202	Cpos CNTN1	Cpos NF140	104		Cpos NF186	Cpos CASPR1	
D blanc	Cpos NF155	376503 1/2700	237421 1/300	237421 1/24300	202	Cpos CNTN1	Cpos NF140	104		Cpos NF186	Cpos CASPR1	
E prot	376503 1/100	376503 1/8100	237421 1/900		320	104	29	263		375359	22-2- 950	
F blanc	376503 1/100	376503 1/8100	237421 1/900		320	104	29	263		375359	22-2- 950	
G prot	376503 1/300	376503 1/24300	237421 1/2700			322	73	375359		364944		
Hblanc	376503 1/300	376503 1/24300	237421 1/2700			322	73	375359		364944		

NF155 **CNTN1** **NF140** **NF186** **CASPR1**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	0,1	0,196	0,576	0,08	0,79	0,154	0,104	0,372	0,235	0,141	0,187	0
B blanc	0,107	0,107	0,096	0,08	0,258	0,176	0,186	0,277	0,336	0,164	0,176	0
C prot	1,265	0,139	0,303	0,085	0,3	1,438	1,054	1,034	0	0,365	1,211	0
D blanc	0,103	0,095	0,1	0,08	0,15	0,299	0,138	0,181	0	0,293	0,158	0
E prot	0,579	0,107	0,189	0	0,163	0,48	0,1	0,226	0	0,116	0,184	0
F blanc	0,113	0,099	0,114	0	0,153	0,186	0,083	0,111	0	0,12	0,239	0
G prot	0,316	0,089	0,132	0	0	0,153	0,112	0,147	0	0,245	0	0
Hblanc	0,097	0,087	0,114	-0,001	0	0,279	0,112	0,151	-0,001	0,22	0	0

Resultados:

- **NF155:**
 1. 70054333 (179): **positivo**
 2. 4256262 (202): **positivo**
 3. 1553320 (320): neg
- **CNTN1:**
 1. 70170685 (104): **positivo**
 2. 1615358 (322): neg
- **NF140:**
 2. 1153091 (29): neg
 3. 229342 (73): neg
 4. 80005335 (100): neg
 5. 70170685 (104): **positivo**
 6. 4983277 (263): **positivo**
 7. 22-375359: neg
 8. 22-364944: neg
- 22-375359: NF140 neg, NF186 repetir
- 22-364944: NF140 neg, NF186 repetir
- 22-2-950: CASPR1 neg
- 22-376503 (Saludes Martí): título 1/300 (titulado con IgG4)

ICC Perfil (muestras BD y prueba CS Milteny)

Objetivo: testar una muestra de la base de datos, y probar 1 culture slide nuevo para probar (son más baratos) → Imaging chamber 8wells (130-098-272 Milteny), transfectado día 25/10/2022.

Muestras:

- 22-2-950: todo negativo

El culture slide de Milteny funciona bien!!! (me gusta más que los que usamos habitualmente).

03/11/2022

Maxiprep plàsmid CASPR1

Seguir el protocolo del kit **HiSpeed Plasmid Maxi Kit**: en el erlenmeyer de NCAM2 no ha crecido nada!!!

- 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'espectrofotòmetre i guardar el tub a la nevera 4°C.

Resultat:

- [CASPR1] = 400 ng/ul (EX-M0417-M02 Genecopoeia)

Cambiar medio co-cultivos (rata 20/10/22)

- D14 → cambiar el medio (poner medio mielinización nuevo) → cambio 200 ul (la mitad)

04/11/2022

ICC Perfil (muestras EM vacunas)

Objetivo: testar las muestras del estudio "*Efficacy and neurological adverse effects of COVID-19 vaccination in patients immunocompromised for multiple sclerosis*" → confirmar la positividad de las muestras que han dado 3 veces positivo por ELISA de alguna proteína nodo/paranodal.

Muestras: (céls vivas)

- NF155:
 1. 70054333 (179)
 2. 4256262 (202)
- NF140:
 1. 70170685 (104)
 2. 4983277 (263)
 3. Cneg
 4. Cpos
- CNTN1:
 1. 70170685 (104)

Protocolo: no incubo con Ac. comercial para evitar que haya cruce de canales

- Incubar con **suero** 1/50 en medio HEK293 : 1h a 37°C
- 1 lavado con PBS1x
- Fijar 10 min con PFA 4%
- 1 lavado con PBS1x
- Bloquear 30 min con Goat serum 5%
- Incubar 1h con **Ac. secundario** diluídos en Goat serum 5%: GAH594 IgG 1/500
- 3 lavados con PBS1x
- Montar con Fluoromount

Resultado: el Cneg se ve un poco positivo aunque no se haya puesto anticuerpo comercial (no es cruce de canales!! Revisar bien el procotolo). Aun así, se ve diferente que el Cpos de NF140 y ninguna de las muestras de EM se ven así de positivas.

07/11/2022

Cambiar medio co-cultivos (rata 20/10/22)

- D18 → cambiar el medio (poner medio mielinización nuevo) → cambio 200 ul (la mitad)

Coating y transfección placas 12w (inmunoabsorción LIF)

- Coating 4 placas de 12w con Poly-D 1/40 en PBS1x (de stock poly-d 1 mg/ml) → mínimo 1h a 37°C
- Coating HEK293: 200.000 cels/pozo + 1ml de medio
- Preparar mezclas transfección → cada pozo (preparo 2 placas transfectadas con LIF y 2 sin transfectar):
 - 2 ug DNA + 62,5 ul Optimem
 - 3 ul lipofectamina2000 + 62,5 ul Optimem
- Juntar y dejar reposar mínimo 5 minutos
- Poner 125 ul de mezcla de transfección a cada pozo

ELISA NF140, NF155, CNTN1, NF186 (screening EM vacunes y otros)

Objetivo: testar las muestras del estudio "*Efficacy and neurological adverse effects of COVID-19 vaccination in patients immunocompromised for multiple sclerosis*" → ver si son positivas las muestras T1 de los pacientes que dieron positivo por ELISA en T3.

Muestras EM vacunas:

- **NF155:**
 1. 70054333 T1 (179) → Caja SantPau 1 C1 (cajas iniciales envío H.Clinic 13/10/21)
 2. 4256262 TZ (202) → no hay muestra T1 y cojo muestra TZ!! Caja 3 B4 últimas cajas recibidas.
- **CNTN1:**
 1. 70170685 T1 (104) → Caja SantPau 1 G7 (cajas iniciales envío H.Clinic 13/10/21)
- **NF140:**
 2. 80005335 T1 (100) → Caja SantPau 1 G3 (cajas iniciales envío H.Clinic 13/10/21)
 3. 70170685 T1 (104) → Caja SantPau 1 G7 (cajas iniciales envío H.Clinic 13/10/21)
 4. 4983277 T1 (263) → Caja SantPau 3 B2 (cajas iniciales envío H.Clinic 13/10/21)
 5. 22-389717 (M^aDolores De Haro Hernández, NHC 1150213) → screening NF140 (sospecha de pan-NF)

Otras muestras:

- 22-2-975 → CASPR1 (screening)
- 22-2-976 → CASPR1 (screening)
- 22-389717 (M^aDolores De Haro Hernández, NHC 1150213) → CASPR1 (screening)

Protocolo:

- Bloquear con leche 5% en PBS-tween 0'1% → 200 ul pozo (incubar 1h a temp. ambiente)
- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
- Diluir los **sueros**:
 - Screening: diluir sueros 1/100 en leche 5% en PBS-tween 0'1%
- 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 **H₂SO₄** 25%
- Leer a 450-570 nm

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	Cneg	Cpos CNTN1	22- 389717	263 T1	Cneg	22- 389717						
B blanc	Cneg	Cpos CNTN1	22- 389717	263 T1	Cneg	22- 389717						
C prot	Cpos NF155	104 T1	Cpos NF140		Cpos CASPR1							
D blanc	Cpos NF155	104 T1	Cpos NF140		Cpos CASPR1							
E prot	179 T1		100 T1		22-2-975							
F blanc	179 T1		100 T1		22-2-975							
G prot	202 TZ		104 T1		22-2-976							
Hblanc	202 TZ		104 T1		22-2-976							

NF155 **CNTN1** **NF140** **CASPR1** *De CNTN1 sólo me quedaban 4 pozos y no pongo Cneg

Resultado:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	0,128	1,339	0,121	0,211	0,085	0,135						
B blanc	0,117	0,189	0,159	0,073	0,141	0,184						
C prot	0,803	0,184	0,783	0	1,163							
D blanc	0,103	0,108	0,103	0	0,113	0						
E prot	0,48	-0,02	0,349	0	0,1	0						
F blanc	0,141	0	0,144	0	0,105	0						
G prot	0,118	0	0,667	0	0,087	0						
Hblanc	0,071	0	0,113	0	0,087	0						

- **NF155:**

1. 70054333 T1 (179) → **positivo**
2. 4256262 TZ (202) → **negativo**

- **CNTN1:**

1. 70170685 T1 (104) → **negativo**

- **NF140:**

1. 80005335 T1 (100) → **positivo**
2. 70170685 T1 (104) → **positivo**
3. 4983277 T1 (263) → **positivo**
4. 22-389717 (M^aDolores De Haro Hernández, NHC 1150213) → **negativo**

Otras muestras:

- 22-2-975 → CASPR1 negativo
- 22-2-976 → CASPR1 negativo
- 22-389717 (M^aDolores De Haro Hernández, NHC 1150213) → CASPR1 negativo

ICC Perfil (muestras BD)

Muestras:

- 22-2-975 → negativo
- 22-2-976 → negativo
- 22-389717 (M^aDolores De Haro Hernández, NHC 1150213) → negativo
- Cpos

Transformació plàsmids NCAM2, ADAM22 i ADAM23

Plàsmid NCAM2 → OHu59215C (GenScript) [= 100 ng/ul (es reconstitueixen 10 ug de DNA en 100 ul d'aigua), resistència a ampicil·lina

Plàsmids ADAM22 i ADAM23 → nos ha dado el DNA Eugenia Martínez (H. Clínic). Resistencia a ampicilina

*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 5 tubs falcon de bacteris (amb doble tancament) → control positiu, control negatiu, NCAM2, ADAM22, ADAM23
- Descongelar les cèl·lules competents en gel (es troben a -80°C)
- Treure del congelador (del kit) el β mercaptoetanol (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 μ L de cèl·lules a cada tub
- Afegir 4 μ L de β ME 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 μ L
 - **NCAM2**: afegir 0'1 – 50 ng → afegixo 0,5 ul de plàsmid (50 ng).
 - **ADAM22**: afegir 0'1 – 50 ng → [=1680 ng/ul. Faig dilució 1/100 amb H2O: [= 16,8 ng/ul. Afegixo 3 ul
 - **ADAM23**: afegir 0'1 – 50 ng → [=1140 ng/ul. Faig dilució 1/100 amb H2O: [= 11,4 ng/ul. Afegixo 5 ul
- 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 μ L de la solució i escampar amb una nansa
En aquest cas, es fan 8 plaques (s'han d'atemperar una estona a Tambient):
 - Control **positiu**: 100 μ L

- Control **negatiu**: 100 µL
 - **NCAM2**: 50 µL, 100 µL
 - **ADAM22**: 50 µL, 100 µL
 - **ADAM23**: 50 µL, 100 µL
- Incubar tota la nit a 37°C (a l'estufa, plaques boca abaix)

08/11/2022

Starter plàsmids NCAM2, ADAM22 i ADAM23

A primera hora: picar algunes colònies de les plaques amb NCAM2, ADAM22 i ADAM23 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 + ampil·lina 1/1000 → deixar anar la punta dins del tub i deixar-la allà.
- Deixar unes hores a 37°C agitant a 225-250 rpm (agitador orbital)
- Preparar un erlenmeyer de 250 mL de medi LB amb ampil·lina 1/1000
- A última hora de la tarda abocar l'*starter* prèviament seleccionat a l'erlenmeyer.
- Incubar overnight a 37 °C en agitació (agitador orbital)

Inmunoabsorció LIF

LO HACE MARTA! Placas 12w transfectadas día 07/11/2022 (2 placas con HEKs no transfectadas y 2 placas con HEKs transfectadas con LIF)

Muestras:

- GDP1 (CIDP15, 134-17) 1/20
- MRVM (CIDP78) 1/20
- 1598702 (paciente con EM que marca mucho mielina IgG) 1/20
- Cneg 1/20

Protocolo:

- Fijar pozos con PFA4% 10min
- 1 lavado con PBS1x
- Permeabilizar con tritón 0'3% 5min
- Diluir muestras en Goat serum 5 % → preparar 300 ul/condición (HEKs transfectadas con LIF, HEKs no transfectadas)

- Incubar 45 min en cada uno de los 6 pozos de cada condición
- Congelar el suero inmunoabsorbido a -20°C

Resultado: Marta hace la ICC en HEKs transfectadas con LIF y ha desaparecido un poco el marcaje en las muestras GDP1 y MRVM inmunoabsorbidas con LIF pero la diferencia no es muy grande → en esta ocasión nos hemos quedado cortas de inmunoabsorción → volver a inmunoabsorber las mismas muestras (ya diluïdas) en 3 pozos más de cada condición. Ver resultados nervio de mono 09/11/2022.

09/11/2022

Maxiprep plàsmids NCAM2, ADAM22 i ADAM23

Amb una part del cultiu continuar amb el protocol per a maxi-preps, i amb l'altra preparar un glicerolat:

- 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 QIAprecipitador de la xeringa i treure l'èmbol.
- Tornar a posar el QIAprecipitador i afegir 2ml d'etanol 70% a la xeringa.
- Rentar el DNA posant l'èmbol i fent passar l'etanol pel QIAprecipitador.
- Treure el QIAprecipitador de la xeringa i treure l'èmbol. Posar el QIAprecipitador un altre cop i posar l'èmbol. Assecar la membrana fent passar aire a través del QIAprecipitador enèrgicament. Repetir aquest pas diverses vegades.
- Assecar la punta del QIAprecipitador amb paper adsorvent.
- Treure l'èmbol d'una xeringa nova de 5ml i posa-hi el QIAprecipitador.
- 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'espectofotòmetre i guardar el tub a la nevera 4°C.

Resultat: Algo ha salido mal en la maxi porque es muy baja la concentración de DNA!!!

- [NCAM2] = 55 ng/ul
- [ADAM22] = 57 ng/ul
- [ADAM23] = 250 ng/ul

Congelación PBMC (NHC 1150213)

2 tubos CPT de M.Dolores de Haro Hernández (NHC 1150213) → SGB

- Centrifugar 20min a 1650g sin freno a 18-25°C (los tubos se deben centrifugar en las 24h posteriores a la extracción de la sangre). En este caso se centrifugan el mismo día.
- Invertir los tubos para resuspender las células en el plasma (después de este proceso se puede mantener la muestra un máximo de 48h en la nevera o a Ambiente) → en este caso se dejan en la nevera hasta el día 11/11/2022.
- Decantar el sobrenadante a un tubo y lavar con suero fisiológico 1:1
- Centrifugar 300g 5min
- Resuspender en PBS1x y contar las células → 3 millones
- Centrifugar 300g 5min
- Congelar en FBS+10%DMSO → 2 viales de 1'5 millones/vial (1 ml de FBS+DMSO)

IHC Monkey peripheral nerve (inmunoabsorciones LIF)

Objetivo: ver si las inmunoabsorciones hechas el día 08/11/2022 (Marta) han hecho que desaparezca el marcaje en la mielina del nervio de mono.

Muestras:

1. GDP1 (CIDP15) 1/20
2. GDP1 (CIDP15) inmunoabs. HEKs no transfectadas
3. GDP1 (CIDP15) inmunoabs. HEKs transf con LIF
4. MRVM (CIDP78) inmunoabs. HEKs no transfectadas
5. MRVM (CIDP78) inmunoabs. HEKs transf con LIF
6. 1598702 1/20
7. 1598702 inmunoabs. HEKs no transfectadas
8. 1598702 inmunoabs. HEKs transf con LIF
9. Cneg inmunoabs. HEKs no transfectadas
10. Cneg inmunoabs. HEKs transf con LIF

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

- Bloquear 30 min - 1h con Goat serum 5%
- Incubar 1h con 40 ul de suero diluido 1/20 en Goat serum 5% (las inmunoabsorciones se ponen sin diluir, ya están diluidas previamente)
- 3 lavados con PBS1x
- Incubar 1h con 30-40 ul de Ac. secundario: GAH488 IgG monkey absorbed 1/500
- 3 lavados con PBS1x
- Montar con fluoromount

Resultado: en ninguna de las muestras desaparece el marcaje de mielina (GDP, MRVM, 1598702) → como no se ha inmunoabsorbido del todo (visto en ICC en HEKs transfectadas), todavía no podemos confirmar si el marcaje de mielina se debe a los anticuerpos anti-LIF o no.

Repetir inmunoabsorción en 3 pozos más (con las mismas muestras ya inmunoabsorbidas).

IHC Monkey peripheral nerve (muestras ATP4A/B+ y Alcaraz Pons)

Objetivo: ver si todas las muestras positivas por ATP4A/B tienen anticuerpos anti-mucosa gástrica (como se ha descrito previamente) → estudio Retrogenix.

Ver si las nuevas muestras de Alcaraz Pons (NHC 1793894) marcan el cerebelo igual que las de 2020.

Muestras:

1. 207-2 (Cneg ATP4A/B+) 1/80 IgG

2. 187-11 (Cneg ATP4A/B+) 1/80 IgG
3. EM-102 (EM ATP4A/B+) 1/80 IgG
4. 15-187 (FMM CIDP49 ATP4A/B+) 1/80 IgG
5. Cneg 204-5 (Cneg real) 1/80 IgG
6. 22-373222 LCR (Alcaraz 11/10/2022) 1/2 IgM
7. 22-373222 suero (Alcaraz 11/10/2022) 1/10 IgM
8. 20-030 LCR (Alcaraz 14/02/2020) 1/2 IgM
9. 20-017 suero (Alcaraz 14/02/2020) 1/10 IgM
10. LFAC (CIDP3 ATP4A/B+) 1/80 IgG

Protocolo: Monkey cerebellum / cerebrum / mouse stomach slide → 504225 Werfen

- Bloquear 30 min - 1h con Goat serum 5%
- Incubar 1h con 40 ul de suero diluído en Goat serum 5%
- 3 lavados con PBS1x
- Incubar 1h con 30-40 ul de Ac. secundario: GAH488 IgG monkey absorbed o GAH488 IgM 1/500
- 3 lavados con PBS1x
- Montar con fluoromount

Resultado:

- Todas las muestras ATP4A/B+ tienen anticuerpos anti-mucosa gástrica (207-2, 187-11, EM102, CIDP3).
- Sorprendentemente la muestra 15-187 (FMM) es negativa (no marca mucosa gástrica) → tiene que ser un error porque anteriormente ya se había confirmado su positividad, quizás me he equivocado de muestra.
- Las muestras de Alcaraz Pons de 2022 marcan igual que las de 2020 → el suero marca todos los núcleos de la capa granular del cerebelo, y todos los núcleos del estómago (IgM)

10/11/2022

[Cambiar medio co-cultivos \(rata 20/10/22\)](#)

- D21 → cambiar el medio (poner medio mielinización nuevo) → cambio 200 ul (la mitad)

Extracción y cultivo de neuronas DRG (rata)

*Se van a crecer neuronas para IP de Elba (5 placas 100cc) + 1 placa de 60cc con cubres. A parte, hago prueba de co-cultivos con los ganglios disgregados vs ganglios no disgregados (ver protocolo siguiente) → uso 2 embriones para los co-cultivos

Se extraen a partir de embriones de rata. Ratas Sprague-Dawley embarazadas.

Se piden ratas E15 pero se utilizan pasadas 24 horas → el cultivo se inicia en E16.

Extracción de DRGs

➤ Estabulario

- Llevar al estabulario un tubo falcon de 50 ml con medio L15 (en hielo) y material instrumental (tijeras, bisturí, pinzas...).

Medio L15:

- 45 ml de medio Leibovitz's
- 5 ml de FBS (10%)
 - 50 µl de DNasa (stock a 10 µg/ml) *La DNasa no se añade directamente al medio L15 total, sólo se añaden 5 ul de stock de DNasa a los 5 mL que se usan para inactivar la tripsina.
- Poner el animal a la cámara de CO₂ → abrir la llave hasta el número 2, subir el O₂ hasta el 2, y poner el isofluorano al 5.
- Sacar la rata de la cámara y ponerla encima de un corcho. Pinchar 1ml de TP41 (Solución inyectable para eutanasia) en el corazón.
- Mojar la rata con alcohol y abrir por debajo (ponerla boca arriba). Tirar de las bolsas de los fetos y ponerlos en una placa con L15.
- Sacar todos los fetos de las bolsas y ponerlos en un tubo con medio L15 (en hielo).

➤ Cultivos

- Poner todos los fetos en una placa con el medio L15 y mantenerla sobre el hielo.
- Coger un feto, ponerlo sobre la placa con Agar y mojarlo con PBS (estéril y frío, mantenerlo en hielo). Es importante ir mojando el feto con PBS, no puede quedarse seco en ningún momento.
- Cortar la cabeza con unas tijeras y clavar el feto boca abajo con 4 puntas de aguja en las extremidades.
- Sacar las dos capas que envuelven la médula espinal y sacar la médula procurando que no se rompa.
- Sacar los ganglios que se hayan quedado pegados a la médula y pasarlos a una placa pequeña con L15.

- Con una aguja de insulina sacar para fuera los DRG de la columna e irlos pasando a la placa con L15

Disgregación de los DRGs

- Pasar todos los DRG a un tubo de 15 ml → con pipeta Pasteur de cristal + *xumet*
- Centrifugar a 300 rpm 5 min
- Eliminar el sobrenadante (con pipeta+xumet e ir tirando a una placa, para no perder ningún DRG).
- Poner PBS1x y centrifugar a 300 rpm 5 min.
- Eliminar el sobrenadante y añadir 5 ml de → 4'5ml PBS1x + 500 ul de tripsina 2.5% sin bromophenol.
- Incubar 15min en el baño a 37°C. Homogeneizar suavemente cada 5 min
- Añadir 5 ml de medio L15 (con DNasa) para inactivar la tripsina.
- Centrifugar a 300 rpm 10 min
- Pasar el pellet a un eppendorf con 1ml de medio NG, y disgregar con una pipeta pasteur de cristal fina (*se hace más fina la punta con el bunsen, preparar unos días antes y autoclavar*). Procurar no hacer mucha espuma. Antes de homogeneizar, pasar la pipeta por FBS para que no se queden pegados los DRG a las paredes.
 - En este caso, para los co-cultivos paso el pellet a 1ml de medio C (co-culture medium)

Co-cultivo de neuronas DRG i células de Schwann (rata - prueba cels disgregadas / cels no disgregadas)

Protocolo mixto entre paper "DRG neuron/Schwann cells Myelinating Cocultures" de Taveggia (2018), paper pan-NF de Appelthausen, y paper "A reliable in vitro model for studying peripheral nerve myelination in mouse" de Stettner (2013).

- 1 placa de 24wells con 1 cubre de 12mm en cada pozo, y 1 culture slide Milteny:
 - Día anterior: coating con Poly-D-lys 1/40 → incubar overnight a 37°C
 - Mismo día: lavar pozos y hacer coating con Laminina 2'5 ul/ml → incubar mínimo 1h a 37°C
- DO → Añadir 400 ul de medio C (co-culture medium) a cada pozo:
 - **Medio C (co-culture medium):**
 - DMEM (con D-glucosa y Glutamax): 44,5 ml (ref. 10569-010 ThermoFisher)
 - 10% FBS: 5 ml
 - 1% Pen-Str: 0,5ml
 - 50 ng/ml NGF: 25 ul

*según el protocolo original, se usaría MEM en vez de DMEM, y también habría que añadir 1% de L-glutamina y 4mg/ml de D-glucosa → como nuestro DMEM ya lleva glutamina y glucosa, no le añado más.

- Pongo 10.000 cels en cada pozo (12 pozos placa 24w + 8 pozos culture slide). En 6 pozos de la placa de 24w pongo un DRG en el centro (sin disgregar).
- Incubar a 37°C
- D1 → cambiar el medio (poner medio C nuevo) → cambio sólo 200ul (la mitad)
- D4 → cambiar el medio por **medio NG** → cambio 300 ul
 - Neurobasal: 48 ml
 - 2% B27: 1 ml
 - 1% L-glutamina (en este caso, Glutamax): 0,5 ml
 - 1% Pen-Str: 0,5 ml
 - 50 ng/ml NGF:25 ul

*según el protocolo original, también habría que añadir 4mg/ml de D-glucosa → como nuestro Neurobasal ya lleva glucosa, no le añado más.

- D6 → cambiar el medio (poner medio NG nuevo) → cambio 200 ul (la mitad)
- D7 → cambiar el medio por **Medio de mielinización co-cultivos**:
 - Medio C: 30 ml
 - 50 ug/ml de ácido ascórbico: 300 ul del stock 5mg/ml (1/100 en el medio)
 - *Preparación previa ácido ascórbico (A4403, Merck): disolver los 100mg en 20ml de DMEM (para hacer 5mg/ml) → congelar en alícuotas de 400 ul tapado con papel de plata*
 - 0,5 uM Forskolin: 1,5ul del stock 10mM (1/20000 en el medio)
 - *En el paper de Appelthauser pone 0,05uM, pero creo que en realidad es 0,5um porque es lo que ponen en el paper de Stettner 2013 (en el que ella se basa). Normalmente en las células de Schwann lo usamos a 20um, pero según el paper de Stettner 2013, el forskolin provoca desmielinización (el efecto contrario al deseado).*
- D8 → cambiar el medio (poner medio de mielinización nuevo) → a partir de aquí ir cambiando (cada 2 -3 días).

11/11/2022

Cambiar medio co-cultivos (rata 10/11/22)

- D1 → cambiar el medio (poner medio C nuevo) → cambio sólo 200ul (la mitad)

14/11/2022

Cambiar medio co-cultivos (rata 20/10/22)

- D25 → cambiar el medio (poner medio mielinización nuevo) → cambio 200 ul (la mitad)

Cambiar medio co-cultivos (rata 10/11/22)

- D4 → cambiar el medio por **medio NG** → cambio 400 ul
 - Neurobasal: 48 ml
 - 2% B27: 1 ml
 - 1% L-glutamina (en este caso, Glutamax): 0,5 ml
 - 1% Pen-Str: 0,5 ml
 - 50 ng/ml NGF: 25 ul

*según el protocolo original, también habría que añadir 4mg/ml de D-glucosa → como nuestro Neurobasal ya lleva glucosa, no le añado más.

Coating ELISA NF186

[NF186]i = 0,2 mg/ml

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

- NF186: 24 pozos (media placa) → [NF186]f = 5 ug/ml → aprox 1,2 ml buffer + 30 ul

Coating y transfección placas 12w (inmunoabsorción LIF)

- Coating 4 placas de 12w con Poly-D 1/40 en PBS1x (de stock poly-d 1 mg/ml) → mínimo 1h a 37°C
- Coating HEK293: **150.000** cels/pozo + 1ml de medio
- Preparar mezclas transfección → cada pozo (preparo 2 placas transfectadas con LIF y 2 sin transfectar):
 - 2 ug DNA + 62,5 ul Optimem → 48 ug (90 ul) + 1,5 ml Optimem
 - 3 ul lipofectamina2000 + 62,5 ul Optimem → 72 ul lipo + 1,5ml
- Juntar y dejar reposar mínimo 5 minutos
- Poner 125 ul de mezcla de transfección a cada pozo

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

15/11/2022

Coating células + transfección Culture slides

18 culture slides:

- 10 Perfil
- 4 LRP4
- 2 LRP4/CASPR2
- 2 NF155/CNTN1
- Recerca:
 - 1 → 2 pozos NCAM2, 2 pozos LCI4, 2 pozos LGI4-ADAM22 y 4 pozos LGI4-ADAM23
 - 2 LIF
 - 1 NF140 (para ICC vivas EM vacunas)
 - 1 NF155 (para ICC vivas EM vacunas)
 - 1 CNTN1 (5 pozos) y NF140 (3 pozos) (para ICC vivas EM vacunas)

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 NF140 / NF155 / NF186 (muestras Immuno)

Muestras:

- 22-364944: positiva sólo por ICC NF186
- 22-390835: positiva débil por ICC NF140, NF155, NF186 (aunque Laura no lo ve positivo)

Protocolo:

- Bloquear con leche 5% en PBS-tween 0'1% → 200 ul pozo (incubar 1h a temp. ambiente)
- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
- Diluir los **sueros**:
 - Screening: diluir sueros 1/100 en leche 5% en PBS-tween 0'1%
- 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 **H₂SO₄** 25%
- Leer a 450-570 nm

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	Cneg	Cneg	Cneg									
B blanc	Cneg	Cneg	Cneg									
C prot	Cpos NF155	Cpos NF140	Cpos NF186									
D blanc	Cpos NF155	Cpos NF140	Cpos NF186									
E prot	22-364944	22-364944	22-364944									
F blanc	22-364944	22-364944	22-364944									
G prot	22-390835	22-390835	22-390835									
Hblanc	22-390835	22-390835	22-390835									

NF140 **NF155** **NF186**

Resultado:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	0,12	0,167	0,072	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B blanc	0,145	0,115	0,103	0	0	0,001	0	0	0	0	0	0,001
C prot	0,942	0,701	1,051	0	0	0	0	0,001	0	0	0	0
D blanc	0,141	0,104	0,09	0	0	0	0	0	0	0	0,001	0
E prot	0,16	0,199	0,452	0	0	0	0,001	0	0,001	0	0	0
F blanc	0,208	0,142	0,136	0,001	0	0	0	0	0	0	0	0
G prot	0,372	0,228	0,471	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hblanc	0,146	0,132	0,096	0	0	0	0	0	0	0	0	0

- 22-364944: NF186+ → titular y hacer subclases
- 22-390835: NF140+, NF186+, NF155 límite de positividad → titular y hacer subclases

Coating ELISA NF140, CNTN1, CASPR1

[NF140]i = 0,25 mg/ml

[CNTN1]i = 0,25 mg/ml

[CASPR1]i = 0,789 mg/ml

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

- NF140: 24 pozos (media placa) → [NF140]f = 3 ug/ml → 1,25 ml buffer + 15 ul
- CNTN1: 24 pozos (media placa) → [CNTN1]f = 1 ug/ml → 1,25 ml buffer + 5 ul
- CASPR1: 48 pozos (una placa) → [CASPR1]f = 5 ug/ml → 2,5 ml buffer + 15'8 ul

16/11/2022

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

ELISA NF140, NF155, CNTN1, NF186, CASPR1 (screening EM vacunes y otros)

Objetivo: testar las muestras del estudio "*Efficacy and neurological adverse effects of COVID-19 vaccination in patients immunocompromised for multiple sclerosis*" → ver si son positivas las muestras T1 de los pacientes que dieron positivo por ELISA en T3.

Muestras EM vacunas:

- **NF155:**

1. 70054333 (179) T1	5. 4256262 (202) T3
2. 70054333 (179) T3	6. 4256262 (202) TZ
3. 70054333 (179) T6 → Box 2 l5 cajas finales	7. Cneg
4. 4256262 (202) T1 (recibida 15/11/22 H.Clinic)	8. Cpos

· **CNTN1:**

- | | |
|------------------------------------|---------|
| 1. 70170685 (104) T1 | 4. Cneg |
| 2. 70170685 (104) T3 | 5. Cpos |
| 3. 70170685 (104) TZ → Box
3 F2 | |

· **NF140 y NF186:**

- | | |
|------------------------------------|--|
| 1. 80005335 (100) T1 | 7. 4983277 (263) T1 |
| 2. 80005335 (100) T3 | 8. 4983277 (263) T3 |
| 3. 80005335 (100) TZ → Box
3 H2 | 9. 4983277 (263) Post 3 ^a
vacuna |
| 4. 70170685 (104) T1 | 10. Cneg |
| 5. 70170685 (104) T3 | 11. Cpos |
| 6. 70170685 (104) TZ → Box
3 F2 | |

Otras muestras:

- 22-2-1009 → CASPR1 (screening)
- 22-2-1015 → CASPR1 (screening)
- 22-2-1016 → CASPR1 (screening)

Protocolo:

- Bloquear con leche 5% en PBS-tween 0'1% → 200 ul pozo (incubar 1h a temp. ambiente)
- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
- Diluir los **sueros**:
 - Screening: diluir sueros 1/100 en leche 5% en PBS-tween 0'1%
- 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 **H₂SO₄** 25%
- Leer a 450-570 nm

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	Cneg	3	Cneg	3	Cneg	3	7	Cneg	3	7	Cneg	1016
B blanc	Cneg	3	Cneg	3	Cneg	3	7	Cneg	3	7	Cneg	1016
C prot	Cpos NF155	4	Cpos CNTN1		Cpos NF140	4	8	Cpos NF186	4	8	Cpos CASPR1	
D blanc	Cpos NF155	4	Cpos CNTN1		Cpos NF140	4	8	Cpos NF186	4	8	Cpos CASPR1	
E prot	1	5	1		1	5	9	1	5	9	1009	
F blanc	1	5	1		1	5	9	1	5	9	1009	
G prot	2	6	2		2	6		2	6		1015	
H blanc	2	6	2		2	6		2	6		1015	

NF155 **CNTN1** **NF140** **NF186** **CASPR1**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	0,064	0,44	0,051	0,375	0,041	0,227	0,148	0,027	0,04	0,036	0,034	0,041
B blanc	0,065	0,123	0,03	0,043	0,054	0,089	0,041	0,028	0,058	0,031	0,031	0,042
C prot	0,659	0,076	1,39	0	0,75	0,623	0,073	0,876	0,025	0,029	0,943	0
D blanc	0,057	0,038	0,072	0	0,044	0,074	0,034	0,032	0,044	0,032	0,033	0
E prot	0,399	0,096	0,408	0	0,228	0,564	0,09	0,04	0,034	0,036	0,042	0
F blanc	0,129	0,046	0,045	0	0,085	0,068	0,045	0,035	0,041	0,034	0,049	0
G prot	0,385	0,118	0,192	0	0,139	0,441	0,021	0,036	0,031	0	0,07	0
H blanc	0,12	0,053	0,048	0	0,098	0,066	0	0,026	0,041	0	0,094	0

Resultados: (las OD que pongo son OD pozo proteína menos OD pozo blanco)

· **NF155:**

1. 70054333 (179) T1 → OD 0,27
2. 70054333 (179) T3 → OD 0,265
3. 70054333 (179) T6 → OD 0,317
4. 4256262 (202) T1 → OD 0,038
5. 4256262 (202) T3 → OD 0,05
6. 4256262 (202) TZ → OD 0,065
7. Cneg → OD -0,001
8. Cpos → OD 0,602

· **CNTN1:**

1. 70170685 (104) T1 → OD 0,363
2. 70170685 (104) T3 → OD 0,144
3. 70170685 (104) TZ → OD 0,332

4. Cneg → OD 0,021

5. Cpos → OD 1,318

· **NF140 y NF186:**

1. 80005335 (100) T1 → OD 0,143

2. 80005335 (100) T3 → OD 0,041

3. 80005335 (100) TZ → OD 0,138

4. 70170685 (104) T1 → OD 0,549

5. 70170685 (104) T3 → OD 0,496

6. 70170685 (104) TZ → OD 0,375

7. 4983277 (263) T1 → OD 0,107

8. 4983277 (263) T3 → OD 0,039

9. 4983277 (263) Post 3ª vacuna → OD 0,045

10. Cneg → OD -0,013

11. Cpos → OD 0,706

Otras muestras:

· 22-2-1009 → CASPR1 (screening) → negativo

· 22-2-1015 → CASPR1 (screening) → negativo

· 22-2-1016 → CASPR1 (screening) → negativo

ICC Perfil (muestras EM vacunas - cels vivas)

Objetivo: testar las muestras del estudio "*Efficacy and neurological adverse effects of COVID-19 vaccination in patients immunocompromised for multiple sclerosis*" → confirmar la positividad de las muestras que han dado 3 veces positivo por ELISA de alguna proteína nodo/paranodal.

Muestras EM vacunas:

· **NF155:**

1. 70054333 (179) T1

2. 70054333 (179) T3

3. 70054333 (179) T6 → Box
2 I5 cajas finales

4. 4256262 (202) T1 (recibida
15/11/22 H.Clinic)

5. 4256262 (202) T3

6. 4256262 (202) TZ

7. Cneg

8. Cpos

· **CNTN1:**

1. 70170685 (104) T1

2. 70170685 (104) T3

3. 70170685 (104) TZ → Box
3 F2

4. Cneg

5. Cpos

· **NF140:**

1. 80005335 (100) T1

7. 4983277 (263) T1

2. 80005335 (100) T3

8. 4983277 (263) T3

3. 80005335 (100) TZ → Box
3 H2

9. 4983277 (263) Post 3ª
vacuna

4. 70170685 (104) T1

10. Cneg

5. 70170685 (104) T3

11. Cpos

6. 70170685 (104) TZ → Box
3 F2

Protocolo: no incubo con Ac. comercial para evitar que haya cruce de canales

- Incubar con **suero** 1/100 en medio HEK293 : 1h a 37°C
- 1 lavado con PBS1x
- Fijar 10 min con PFA 4%
- 1 lavado con PBS1x
- Bloquear 30 min con Goat serum 5%
- Incubar 1h con **Ac. secundario** diluïdos en Goat serum 5%: GAH594 IgG 1/750
- 3 lavados con PBS1x
- Montar con Fluoromount

Resultado: todo negativo. Los controles positivos se ven muy bien, y los controles negativos se ven claramente negativos.

Hay una muestra que parece un poco positiva (4256262 TZ).

Cambiar medio co-cultivos (rata 20/10/22)

- D27 → cambiar el medio (poner medio mielinización nuevo) → cambio 200 ul (la mitad)

Cambiar medio co-cultivos (rata 10/11/22)

- D6 → cambiar el medio (poner medio NG nuevo) → cambio 200 ul (la mitad)

17/11/2022

Cambiar medio co-cultivos (rata 10/11/22)

- D7 → cambiar el medio por **Medio de mielinización co-cultivos**:
 - Medio C: 30 ml
 - 50 ug/ml de ácido ascórbico: 300 ul del stock 5mg/ml (1/100 en el medio)
 - 0,5 uM Forskolin: 1,5ul del stock 10mM (1/20000 en el medio)

ELISA NF140, NF186 (titulaciones IMM)

Muestras:

- 22-2-1028 (22-390835) → titulación NF140 y NF186, subclases NF140 y NF186
- 22-2-1027 (22-364944) → titulación NF186 y subclases NF186
- 22-2-1025 (22-229857) → titulación NF140 y NF186, subclases NF140 y NF186

Protocolo:

- Bloquear con leche 5% en PBS-tween 0'1% → 200 ul pozo (incubar 1h a temp. ambiente)
- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
- Diluir los **sueros**:
 - Screening: diluir sueros 1/100 en leche 5% en PBS-tween 0'1%
- 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 **H₂SO₄** 25%
- Leer a 450-570 nm

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	Cneg	390835 1/900	390835 IgG1	Cneg	390835 1/900	364944 1/900	364944 IgG1	390835 IgG1	229857 1/100	229857 IgG1	229857 1/100	229857 IgG1
B blanc	Cneg	390835 1/900	390835 IgG1	Cneg	390835 1/900	364944 1/900	364944 IgG1	390835 IgG1	229857 1/100	229857 IgG1	229857 1/100	229857 IgG1
C prot	Cpos NF140	390835 1/2700	390835 IgG2	Cpos NF186	390835 1/2700	364944 1/2700	364944 IgG2	390835 IgG2	229857 1/300	229857 IgG2	229857 1/300	229857 IgG2
D blanc	Cpos NF140	390835 1/2700	390835 IgG2	Cpos NF186	390835 1/2700	364944 1/2700	364944 IgG2	390835 IgG2	229857 1/300	229857 IgG2	229857 1/300	229857 IgG2
E prot	390835 1/100		390835 IgG3	390835 1/100	364944 1/100		364944 IgG3	390835 IgG3	229857 1/900	229857 IgG3	229857 1/900	229857 IgG3
F blanc	390835 1/100		390835 IgG3	390835 1/100	364944 1/100		364944 IgG3	390835 IgG3	229857 1/900	229857 IgG3	229857 1/900	229857 IgG3
G prot	390835 1/300		390835 IgG4	390835 1/300	364944 1/300		364944 IgG4	390835 IgG4	229857 1/2700	229857 IgG4	229857 1/2700	229857 IgG4
Hblanc	390835 1/300		390835 IgG4	390835 1/300	364944 1/300		364944 IgG4	390835 IgG4	229857 1/2700	229857 IgG4	229857 1/2700	229857 IgG4

NF140 NF186

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	0,051	0,071	0,051	0,053	0,075	0,15	0,073	0,064	0,061	0,036	0,213	0,04
B blanc	0,048	0,032	0,03	0,044	0,033	0,044	0,042	0,038	0,053	0,041	0,074	0,045
C prot	0,527	0,044	0,029	0,632	0,051	0,072	0,042	0,043	0,047	0,044	0,11	0,048
D blanc	0,042	0,04	0,034	0,049	0,038	0,042	0,039	0,045	0,069	0,043	0,061	0,053
E prot	0,28	0	0,075	0,259	0,341	0	0,043	0,082	0,046	0,071	0,063	0,088
F blanc	0,071	0	0,034	0,058	0,083	0	0,058	0,043	0,045	0,043	0,054	0,062
G prot	0,087	0	0,297	0,137	0,247	0	0,05	0,349	0,046	0,071	0,061	0,176
Hblanc	0,052	0	0,054	0,049	0,064	0	0,046	0,058	0,044	0,088	0,059	0,22

Resultado:

- 22-2-1028 (22-390835):
 - título NF140 no sale muy bien (1/100), subclase predominante IgG4
 - título NF186 1/900, subclase predominante IgG4 (decidimos que las panNF se titularán con NF186, y por tanto este es el resultado que les enviamos).
- 22-2-1027 (22-364944) → título NF186 1/900, no salen las subclases
- 22-2-1025 (22-229857):
 - Titulación NF140 no sale (y tampoco las subclases)
 - Título NF186 1/100 (no salen las subclases)

18/11/2022

IHC teasing nervio ciático rata (screening EM vacunas)

Muestras:

- | | |
|----------------------|----------------------------------|
| 1. 70054333 (179) T1 | 8. 80005335 (100) TZ |
| 2. 70054333 (179) T6 | 9. 4983277 (263) T1 |
| 3. 4256262 (202) T1 | 10. 4983277 (263) Post 3ª vacuna |
| 4. 4256262 (202) TZ | 11. Cneg |
| 5. 70170685 (104) T1 | 12. Cpos NF140 |
| 6. 70170685 (104) TZ | 13. Cpos NF155 |
| 7. 80005335 (100) T1 | 14. Cpos CNTN1 |

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 1/50 (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

Resultado: todas las muestras de EM son negativas. Los controles positivos salen bien. Se confirma que los positivos observados por ELISA son falsos positivos.

Cambiar medio co-cultivos (rata 20/10/22)

- D29 → cambiar el medio (poner medio mielinización nuevo) → cambio 200 ul (la mitad)

Cambiar medio co-cultivos (rata 10/11/22)

- D8 → cambiar el medio (poner medio mielinización nuevo) → cambio 200 ul (la mitad)

ICC co-cultivos (día 29)

Cojo 2 cubres de los co-cultivos para ir viendo como va la diferenciación.

Protocolo: se hace todo en placa de 24 wells

- Fijar 20 min con PFA 4%
- 1 lavado con PBS1x
- Bloquear con Goat serum 5% y 0'3% tritón (en PBS): 1h a RT
- Incubar con anticuerpos primarios diluídos en Goat serum 5% y 0'3% tritón (en PBS):
 - **MBP y NFh**
 - anti-Myelin basic protein SMI99, 808401 (Biolegend). Dil. **1/300** (mouse) → overnight 4°C
 - anti-Neurofilament H, AB5539 (Merck) **Dil. 1/500** (chicken) → 1h RT
- 3 lavados con PBS1x
- Incubar 1h con Ac. secundarios diluídos en Goat serum 5% y 0'3% tritón (todos a 1/500)
 - MBP y NFh: GAM488 + GAC594
- 3 lavados con PBS1x
- Montar con Fluoromount

Resultado:

- La mielinización está funcionando → se ve muy bien la mielina y las interrupciones de los nodos.

21/11/2022

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

22/11/2022

Cambiar medio co-cultivos (rata 20/10/22)

- D32 → cambiar el medio (poner medio mielinización nuevo) → cambio 200 ul (la mitad)

Cambiar medio co-cultivos (rata 10/11/22)

- D11 → cambiar el medio (poner medio mielinización nuevo) → cambio 200 ul (la mitad)

Coating y transfección placas 12w (inmunoabsorción LIF)

- Coating 2 placas de 12w con Poly-D 1/40 en PBS1x (de stock poly-d 1 mg/ml) → mínimo 1h a 37°C
- Coating HEK293: 150.000 cels/pozo + 1ml de medio
- Preparar mezclas transfección → cada pozo (preparo 1 placa transfectada con LIF y 1 sin transfectar):
 - 2 ug DNA + 62,5 ul Optimem
 - 3 ul lipofectamina2000 + 62,5 ul Optimem
- Juntar y dejar reposar mínimo 5 minutos
- Poner 125 ul de mezcla de transfección a cada pozo

Coating y transfección placas 12w (inmunoabsorción ANO2)

- Coating 1 placa de 12w con Poly-D 1/40 en PBS1x (de stock poly-d 1 mg/ml) → mínimo 1h a 37°C (6w ANO2, 6w no transf)
- Coating HEK293: 150.000 cels/pozo + 1ml de medio
- Preparar mezclas transfección → cada pozo (6w ANO2, 6w no transf):
 - 2 ug DNA ANO2 + 62,5 ul Optimem
 - 3 ul lipofectamina2000 + 62,5 ul Optimem
- Juntar y dejar reposar mínimo 5 minutos
- Poner 125 ul de mezcla de transfección a cada pozo
- Al día siguiente: fijar y congelar la placa (no necesito hacer inmunoabsorción porque tenemos las muestras inmunoabsorbidas y con eso ya podemos hacer la ICC)

Coating células + transfección Culture slides

18 culture slides:

- 2 --> 4 pozos FLOT1/2, 4 pozos HEKs no transf (x2) RECOGER día 24/11/2022
- 12 Perfil
- 2 LRP4
- 2 NF155/CNTN1

Protocolo:

- Preparar mezclas transfección → cada culture slide (8 pozos)
 - 2,2ug DNA + 68 ul Optimem

- FLOT1/2: 1,44ug DNA FLOT1 + 0,72ug DNA FLOT2 + 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 NCAM2, LGI4

CS transfectado día 15/11/2022 (2 pozos NCAM2, 2 pozos LCI4, 2 pozos LGI4-ADAM22 y 4 pozos LGI4-ADAM23)

Sólo para comprobar que la transfección ha salido bien. (plásmidos LGI4 no tienen tag)

Protocolo:

- Bloquear 1h con Goat serum 5%
- Incubar 1h con anticuerpos primarios diluídos en Goat serum 5%
 - **NCAM2:** anti-NCAM2, ab115305 (abcam). Dil. **1/50** (rabbit)
 - **LGI4:** anti-LGI4, ab115305 (Abcam). Dil. **1/100** (rabbit)
- 3 lavados con PBS1x
- Incubar 1h con **Ac. secundario** diluído 1/500 en Goat serum 5% → GAR488
- 3 lavados con PBS1x
- Montar con Fluoromount

Resultado:

- NCAM2 se transfecta bien → hay pocas cels transfectadas (quizás porque el DNA está muy diluído: hacer nueva Maxi)
- LGI4 se transfecta tanto sólo como con ADAM22 y con ADAM23

ICC co-cultivos (día 33)

Todo se hace en las placas de 24w.

Muestras IgG e IgM:

- | | |
|----------|----------|
| 1. CIDP1 | 5. CIDP5 |
| 2. CIDP2 | 6. CIDP6 |
| 3. CIDP3 | 7. CIDP7 |
| 4. CIDP4 | 8. CIDP8 |

- | | |
|-------------|--|
| 9. CIDP9 | 18. Zika003 |
| 10. CIDP10 | 19. Zika004 |
| 11. CIDP15 | 20. Cneg 1 21-2-1607 |
| 12. CIDP43 | 21. Cneg 2 204-11 |
| 13. CIDP44 | 22. CIDP21 sólo IgG |
| 14. CIDP70 | 23. CIDP80 sólo IgG |
| 15. CIDP78 | 24. CIDP80 sólo IgG 72h (cambiar medio+suero cada 24h) |
| 16. CIDP85 | 25. Cneg sólo IgG 72h (cambiar medio+suero cada 24h) |
| 17. CIDP100 | |

Protocolo:

- Incubar con **suero** 1/100 (IgG) o 1/50 (IgM) en medio de mielinización : 24h 37°C
- 1 lavado con PBS1x
- Fijar 20 min con PFA 4%
- 1 lavado con PBS1x
- Bloquear 30 min con Goat serum 5% tritón 0'5%
- Incubar con anticuerpos primarios diluídos en Goat serum 5% tritón 0'5%:
 - **MBP** anti-Myelin basic protein SMI99, 808401 (Biolegend). Dil. **1/300** (mouse) → 2h RT
 - **panNF**: (solo muestras 21 y 22 IgG) anti-panNeurofascin, AF3235 (R&D systems). Dil.**1/500** (chicken) → overnight a 4°C
- 3 lavados con PBS1x
- Incubar 1h con **Ac. secundarios** diluídos en Goat serum 5% tritón 0'5%(todos a 1/500)
 - suero y MBP: GAH488 + GAM594
 - suero y panNF: GAH488 + GAC594
- 3 lavados con PBS1x
- Montar con Fluoromount

Resultado: FOTOS guardadas. Casi todas las muestras marcan unas células punteadas (nose si son cels de Schwann amielínicas o no. En general no hay mucha mielina.

Muestra	Resultado IgG	Resultado IgM
1. CIDP1	Repetir	+ axones
2. CIDP2	-	-
3. CIDP3	Repetir	+ axones
4. CIDP4	+ cels schwann	-

	amielínicas??	
5. CIDP5	Repetir	-
6. CIDP6	-	++ mielina
7. CIDP7	+ schwann amielínicas??	-
8. CIDP8	Repetir	Marcaje inespecífico
9. CIDP9	-	repetir
10. CIDP10	-	repetir
11. CIDP15	++ axones (no hay mielina, no puedo ver si la marca)	Núcleos??
12. CIDP43	Repetir	-
13. CIDP44	Repetir	++ axones
14. CIDP70	Repetir	repetir
15. CIDP78	+ mielina, axones	repetir
16. CIDP85	Repetir	++ axones (sólo una zona)
17. CIDP100	Repetir	repetir
18. Zika003	++ axones	repetir
19. Zika004	++ axones	+++ axones
20. Cneg 1 21-2-1607	-	repetir
21. Cneg 2 204-11	Repetir	repetir
22. CIDP21	repetir	No hecho
23. CIDP80	+ mielina	No hecho
24. CIDP80 72h	repetir	No hecho
25. Cneg 72h	repetir	No hecho

23/11/2022

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

24/11/2022

Recoger culture slides FLOT1/2

- Quitar medio
- Fijar PFA4% 10 min
- Quitar PFA y lavar con PBS1x
- Quitar los pozos del culture slide (con piezas negra y blanca)
- NO HAY CÉLULAS!!!! NO SOBREVIVEN TANTAS HORAS A LA TRANSFECCIÓN EN LOS CULTURE SLIDES → HACER CON CUBRES

25/11/2022

Congelación PBMC (NHC 1793894 y 1238386)

4 tubos CPT de **Joan Alcaraz Pons (NHC 1793894)** y 4 tubos CPT de **Genoveva Canal Pey (NHC 1238386)** → CIDP

- Centrifugar 20min a 1650g sin freno a 18-25°C (los tubos se deben centrifugar en las 24h posteriores a la extracción de la sangre). En este caso se centrifugan el mismo día.
- Invertir los tubos para resuspender las células en el plasma (después de este proceso se puede mantener la muestra un máximo de 48h en la nevera o a Ambiente)
- Decantar el sobrenadante a un tubo y lavar con suero fisiológico 1:1
- Centrifugar 300g 5min
- Resuspender en PBS1x y contar las células:
 - 1793894: 10 millones
 - 1238386: 20 millones
- Centrifugar 300g 5min
- Congelar en FBS+10%DMSO:
 - 1793894: 5 viales de 2 millones/vial (1 ml de FBS+DMSO)
 - 1238386: 6 viales de aprox 3 millones/vial (1 ml de FBS+DMSO)

Cambiar medio co-cultivos (rata 10/11/22)

- D14 → TIRO LOS CO-CULTIVOS PORQUE ESTÁN DEMASIADO LLENOS Y PARECE INCLUSO QUE ESTÉ CONTAMINADO... LA PRÓXIMA VEZ PONER MENOS CÉLULAS (EN ESTE CASO PUSE 10.000/POZO)

29/11/2022

Congelación PBMC (NHC 547797)

4 tubos CPT de **Concepción Castro Mestre (NHC 547797)**

- Centrifugar 20min a 1650g sin freno a 18-25°C (los tubos se deben centrifugar en las 24h posteriores a la extracción de la sangre). En este caso se centrifugan el mismo día (28/11/2022).
- Invertir los tubos para resuspender las células en el plasma (después de este proceso se puede mantener la muestra un máximo de 48h en la nevera o a Ambiente) → en este caso se procesan al día siguiente (29/11/2022)
- Decantar el sobrenadante a un tubo y lavar con suero fisiológico 1:1
- Centrifugar 300g 5min
- Resuspender en PBS1x y contar las células: X millones
- Centrifugar 300g 5min
- Congelar en FBS+10%DMSO: 3 viales de 1 millones/vial (1 ml de FBS+DMSO)

ICC Perfil nodales/paranodales (BD)

Muestras y resultado: (9 portas perfil)

- | | |
|-----------------------------|------------------------------|
| 1. 22-2-1009: neg | 9. 22-2-1117: NF155+ |
| 2. 22-2-1015: neg | 10. 22-2-1118: CNTN1+ |
| 3. 22-2-1016: neg | 11. 22-2-1119: panNF+ |
| 4. 22-2-1112: NF155+ | 12. 22-2-1120: neg |
| 5. 22-2-1113: neg | 13. 22-2-1121: neg |
| 6. 22-2-1114: CNTN1+ | 14. 22-2-1122: neg |
| 7. 22-2-1115: panNF+ | 15. 22-2-1124: neg |
| 8. 22-2-1116: CNTN1+ | 16. 22-2-1127: neg |

ELISA NF155, CNTN1, CASPR1 (screening BD, titulación IMM)

Muestras:

- **NF155**
 - 22-395541 NHC 1843661 (V.González González 14/11/2022) → titular NF155 con IgG4
 - 22-246471 NHC 1843661 (22-2-483 BOX 297, muestra previa 14/03/2022) → titular NF155 con IgG4
- **CASPR1**
 - 22-395690 NHC 1108585 (Bocanegra 14/11/2022) → titular CASPR1 con IgGtotales

- 22-340128 NHC 1108585 (Bocanegra muestra previa 18/8/2022) → titular CASPR1 con IgG totales
- Screening (BD):
 - 22-2-1112
 - 22-2-1113
 - 22-2-1114
 - 22-2-1115
 - 22-2-1116
 - 22-2-1117
 - 22-2-1118
 - 22-2-1119
 - 22-2-1120
 - 22-2-1121
 - 22-2-1122
 - 22-2-1124
 - 22-2-1127
- **CNTN1**
 - 20-2-90 (Malathi Sivam, muestra CNTN1+ no titulada previamente) → titulación CNTN1 con IgG totales, y subclases

Protocolo:

Protocolo:

- Bloquear con leche 5% en PBS-tween 0'1% → 200 ul pozo (incubar 1h a temp. ambiente)
- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
- Diluir los **sueros**:
 - Titulación: 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 (a: 1/100, b:1/300, c:1/900, d: 1/2700, e: 1/8100 i f: 1/24300)
 - Screening y subclases: diluir sueros 1/100 en leche 5% en PBS-tween 0'1%
- Incubar con los sueros 1h
- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
- Incubar 45min con **RAH IgG HRP** 1/3000 o **MAH HRP** IgG1 o IgG2 o IgG3 o IgG4 1/1000 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 **H₂SO₄** 25%
- Leer a 450-570 nm

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	Cneg	395541 1/900	246471 1/300	395690 1/100	340128 1/100	Cneg	22-2- 1114	22-2- 1118	22-2- 1122	Cneg	20-2-90 1/900	22-2-90 IgG1
B blanc	Cneg	395541 1/900	246471 1/300	395690 1/100	340128 1/100	Cneg	22-2- 1114	22-2- 1118	22-2- 1122	Cneg	20-2-90 1/900	22-2-90 IgG1
C prot	Cpos NF155	395541 1/2700	246471 1/900	395690 1/300	340128 1/300	Cpos CASPR1	22-2- 1115	22-2- 1119	22-2- 1124	Cpos CNTN1	20-2-90 1/2700	22-2-90 IgG2
D blanc	Cpos NF155	395541 1/2700	246471 1/900	395690 1/300	340128 1/300	Cpos CASPR1	22-2- 1115	22-2- 1119	22-2- 1124	Cpos CNTN1	20-2-90 1/2700	22-2-90 IgG2
E prot	395541 1/100	395541 1/8100		395690 1/900	340128 1/900	22-2- 1112	22-2- 1116	22-2- 1120	22-2- 1127	20-2-90 1/100	20-2-90 1/8100	22-2-90 IgG3
F blanc	395541 1/100	395541 1/8100		395690 1/900	340128 1/900	22-2- 1112	22-2- 1116	22-2- 1120	22-2- 1127	20-2-90 1/100	20-2-90 1/8100	22-2-90 IgG3
G prot	395541 1/300	246471 1/100		395690 1/2700	340128 1/2700	22-2- 1113	22-2- 1117	22-2- 1121		20-2-90 1/300	20-2-90 1/24300	22-2-90 IgG4
Hblanc	395541 1/300	246471 1/100		395690 1/2700	340128 1/2700	22-2- 1113	22-2- 1117	22-2- 1121		20-2-90 1/300	20-2-90 1/24300	22-2-90 IgG4

NF155 CASPR1 CNTN1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	0,086	0,307	0,092	0,102	0,595	0,082	0,074	0,127	0,073	0,074	0,077	0,044
B blanc	0,069	0,056	0,059	0,101	0,084	0,089	0,081	0,105	0,081	0,07	0,078	0,048
C prot	0,719	0,125	0,067	0,103	0,257	1,241	0,111	0,2	0,076	1,552	0,061	0,053
D blanc	0,064	0,059	0,064	0,111	0,071	0,073	0,098	0,093	0,072	0,112	0,079	0,064
E prot	0,938	0,079	0	0,078	0,139	0,074	0,104	0,087	0,071	0,105	0,07	0,062
F blanc	0,089	0,068	0	0,081	0,068	0,069	0,09	0,093	0,081	0,124	0,083	0,074
G prot	0,827	0,12	0	0,082	0,083	0,136	0,089	0,152	0	0,085	0,071	0,109
Hblanc	0,32	0,082	0	0,086	0,066	0,149	0,097	0,165	0	0,11	0,106	0,121

Resultado:

· NF155

- **22-395541** NHC 1843661 (V.González González 14/11/2022) → título NF155 1/2700 (IgG4) → SE REPITE EN IMMUNO Y DA 1/8100
- **22-246471** NHC 1843661 (22-2-483 BOX 297, muestra previa 14/03/2022) → título NF155 menos de 1/100 (en su día salió 1/100, puede que haya perdido título por congelar- descongelar). Claramente el título ha subido.

· CASPR1

- **22-395690** NHC 1108585 (Bocanegra 14/11/2022) → título CASPR1 menos de 1/100 (repetir porque en el screening en Immuno salió + a 1/100)
- **22-340128** NHC 1108585 (Bocanegra muestra previa 18/8/2022) → título 1/900 (IgG totales) (repetir!)
- Screening (BD):
 - 22-2-1112: neg
 - 22-2-1113: neg

- 22-2-1114: neg
 - 22-2-1115: neg
 - 22-2-1116: neg
 - 22-2-1117: neg
 - 22-2-1118: neg
 - 22-2-1119: **repetir**
 - 22-2-1120: neg
 - 22-2-1121: neg
 - 22-2-1122: neg
 - 22-2-1124: neg
 - 22-2-1127: neg
- **CNTN1**
 - **20-2-90** (Malathi Sivam, muestra CNTN1+ no titulada previamente) → negativo (hubo un error al comunicarle el resultado en 2020)

Coating Poly-D.Lys (culture slides)

Coating 5 culture slides con Poly-D 1/40 en PBS1x (de stock poly-d 1 mg/ml) → aprox 300 ul por pocillo (PARA MARTA)

Starter plàsmids NCAM2, LGI4, LIF, CNTN1

Plàsmid **NCAM2** → OHu59215C (GenScript). Resistència a **ampicil·lina**

Plàsmid **LGI4** → SC313909 (Origene). Resistència a **kanamicina**.

Plàsmid **LIF** → EX-G0101-M02 (Genecopoeia). Resistència a **ampicil·lina**

Plàsmid **CNTN1** → EX-A1153-M02 (Genecopoeia). Resistència a **ampicil·lina**

- A primera hora: 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 (amb una punta).
- Posar la punta a un tub falcon de bacteris amb 5 mL de LB + ampicil·lina 1/1000 o kanamicina 1/2000 → deixar anar la punta dins del tub i deixar-la allà.
- 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 o 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)

30/11/2022

Maxiprep plàsmids NCAM2, LGI4, LIF, CNTN1

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:

- [NCAM2] = 890,4 ng/ul

- [LGI4] = 1562 ng/ul
- [LIF] = 390,3 ng/ul
- [CNTN1] = 1001 ng/ul

Coating HEKs y transfección (FLOT1/2)

2 placas 60mm con 14 cubres de 12mm → coating Poly-D 1/40 1h a 37°C → planto 1 millón de cels

Transfección: lo hago por la tarde a última hora!

- Preparar mezclas transfección
 - Placa 60 mm (**FLOT1/2**):
 - 6 ug FLOT1 + 3 ug FLOT2 + 250 ul Optimem
 - 12 ul lipofectamina2000 + 250 ul Optimem
- Juntar y dejar reposar mínimo 5 minutos
- Añadir la mezcla de transfección a las células (placa 60mm: 500 ul)

Coating y transfección placas 6w (inmunoabsorción LIF)

- Coating 4 placas de 6w con Poly-D 1/40 en PBS1x (de stock poly-d 1 mg/ml) → mínimo 1h a 37°C
- Coating HEK293: 400.000 cels/pozo + 2ml de medio
- Preparar mezclas transfección → cada pozo (preparo 2 placas transfectadas con LIF y 2 sin transfectar):
 - 3,5 ug DNA + 110 ul Optimem
 - 5,2 ul lipofectamina2000 + 110 ul Optimem
- Juntar y dejar reposar mínimo 5 minutos
- Poner 220 ul de mezcla de transfección 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

01/12/2022

Coating células + transfección Culture slides

12 culture slides:

- 10 Perfil
- 2 LRP4

Protocolo:

- Preparar mezclas transfección → cada culture slide (8 pozos)
 - 2,2ug 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

02/12/2022

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

ICC FLOT1/2 (cels vivas)

Cubres transfectados 30/11

Objetivo: Probar si la positividad se confirma haciendo la ICC en HEKS transfectadas vivas (revisión paper)

Muestras:

1. EM-223 1/50 – doble FLOT1
2. EM-316 1/50 – doble FLOT1
3. Cneg 1/50 – doble FLOT1
4. EM-223 1/100 – doble FLOT2
5. EM-316 1/100 – doble FLOT2
6. Cneg 1/100 – doble FLOT2

Protocolo:

- Incubar 1h con suero 1/100 diluído en medio HEK → a 37°C
- 2 lavados con PBS1x
- Fijar 10min con PFA4%
- 1 lavado con PBS1x
- Bloquear 30min con Goat serum 5%
- Incubar 1h con anticuerpo anti-FLOT1 o anti-FLOT2 diluídos 1/100 en Goat serum 5%
- 3 lavados con PBS1x
- Incubar 1h con Ac. secundarios GAH594 IgG + GAR488 diluídos 1/500 en Goat serum 5%
- 3 lavados con PBS1x
- Montar con Fluoromount

Resultado: no se ven positivos los positivos (almenos no veo diferencias entre los controles negativos y los positivos)... el verde se ve demasiado fuerte, hay que diluir más los Ac.primarios.

05/12/2022

Teasing nervio ciático de cerdo

Extraigo nervio ciático de cerdo para hacer teasing y IP.

Protocolo teasing:

- Fijar 1h con PFA2% en agitación y hielo
- Lavar 3x15min con PBS1x (en agitación y hielo)
- Hacer teasing (2 grupos de tejido por portaobjetos) durante 1 hora → en este caso hago 10 portaobjetos.

Immunoprecipitación - Pierce Classic Magnetic IP Kit (dynabeads)

Muestras:

- 2023-1: Control NF155+
- 2023-2: CIDP15 (Guillermina Dach Pujol)
- 2023-3: 22-2-374 (Bocanegra)

Tejido: Nervio ciático de cerdo

Incubación con suero y lisis del tejido

- Sacar el nervio ciático del cerdo y poner entre dos gasas mojadas con PBS1x.
- Desfilas el nervio en la lupa como si hiciéramos teasing
- Poner una parte del nervio en cada eppendorf (3 en total)
- Incubar con las muestras 2 horas a temperatura ambiente (en agitación): 1/50 en PBS1x
- Centrifugar 2 min a 200g y tirar el sobrenadante
- Lavar con PBS1x 2 veces (entre cada lavado centrifugar 2 min a 200g y tirar el sobrenadante)
- Añadir 800 µl de IP Lysis/Wash buffer + inhibidores de proteasas 1x a cada eppendorf
- Triturar con TissueDisruptor en hielo: 3 veces x5 segundos
- Triturar con PelletPestle (también en hielo)
- Centrifugar 10 min a 13000g
- Hacer IP con el sobrenadante

Preparación de las bolas magnéticas

- Poner 25 µl de Pierce Protein A/G Magnetic Beads a un eppendorf
- Añadir 175 µl de IP Lysis/Wash Buffer y hacer vórtex (suave)
- Poner el tubo en el soporte magnético. Eliminar el sobrenadante (sin retirar el eppendorf)
- Añadir 1 ml de IP Lysis/Wash Buffer y hacer vórtex (suave). Poner de nuevo en el soporte magnético y eliminar el sobrenadante.

Immunoprecipitación

- Añadir la mezcla antígeno-anticuerpo (primera parte) al eppendorf con las bolas magnéticas lavadas e incubar a temperatura ambiente 1 hora en agitación (rotación).
- Poner el eppendorf en el soporte magnético y eliminar el sobrenadante.
- Añadir 500 µl de IP Lysis/Wash buffer (con inhibidores de proteasas 1x) y mezclar. Poner en el soporte magnético y eliminar el sobrenadante.
- Volver a repetir el lavado
- Añadir 500 µl de agua destilada ultrapura y mezclar. Poner en el soporte magnético y eliminar el sobrenadante.
- Añadir 100 µl de Elution Buffer.
- Incubar en agitación a Tamb 10 minutos
- Poner en el soporte magnético para que las bolas magnéticas se separen.

- Añadir 10 ul de Neutralization buffer
- Guardar a -20°C

09/12/2022

IHC teasing nervio ciático cerdo (CIDP15, 22-2-374)

Muestras:

- CIDP15 (Guillermina Dach)
- 22-2-374 (Bocanegra)
- Control CNTN1+
- Control NF155+

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

Resultado:

- CIDP15 (Guillermina Dach): marca mucho la mielina
- 22-2-374 (Bocanegra): sigue marcando igual que marcaba (estructuras raras en espiral)
- Control CNTN1+: paranodos
- Control NF155+: paranodos

13/12/2022

Coating HEKs y transfección (FLOT1/2 y ANO2)

2 placas 60mm con 14 cubres de 12mm → coating Poly-D 1/40 1h a 37°C → planto 1millon de cels

Transfección: lo hago por la tarde a última hora!

- Preparar mezclas transfección
 - **FLOT1/2:**
 - 6 ug FLOT1 + 3 ug FLOT2 + 250 ul Optimem

- 12 ul lipofectamina2000 + 250 ul Optimem
- **ANO2:**
 - 8 ug ANO2 + 250 ul Optimem
 - 12 ul lipofectamina2000 + 250 ul Optimem
- Juntar y dejar reposar mínimo 5 minutos
- Añadir la mezcla de transfección a las células (placa 60mm: 500 ul)

14/12/2022

ICC ANO2 (cels vivas)

Cubres transfectados 13/12/22

Objetivo: Probar si la positividad se confirma haciendo la ICC en HEKS transfectadas vivas (revisión paper)

Muestras:

1. EM-153 1/100
2. EM-153 1/50
3. Cneg 204-10 1/100
4. Cneg 204-10 1/100

Protocolo:

- Incubar 1h con suero 1/100 diluído en medio HEK → a 37°C
- 2 lavados con PBS1x
- Fijar 10min con PFA4%
- 1 lavado con PBS1x
- Bloquear 30min con Goat serum 5%
- Incubar 1h con anticuerpo anti-ANO2 diluído 1/500 en Goat serum 5%
- 3 lavados con PBS1x
- Incubar 1h con Ac. secundarios GAH594 IgG + GAR488 diluídos 1/500 en Goat serum 5%
- 3 lavados con PBS1x
- Montar con Fluoromount

Resultado: todo negativo... no entiendo porque no sale la ICC en cels vivas.

ICC FLOT1/2 (inmunoabsorciones)

Cubres transfectados 30/11, fijados 02/12

Objetivo: hacer fotos de ICC inmunoabsorciones para la revisión del paper.

Muestras:

1. EM-307 1/100 – doble FLOT1
2. EM-307 abs. HEKs no transf (09/10/20) – doble FLOT1
3. EM-307 abs. FLOT 1/2 (09/10/20) – doble FLOT1
4. EM-307 abs. FLOT1 (09/10/20) – doble FLOT1
5. EM-307 abs. FLOT2 (09/10/20) – doble FLOT1
6. EM-158 1/50 – doble FLOT2
7. EM-158 abs. HEKs no transf (21/5/20) – doble FLOT2
8. EM-158 abs. FLOT1/2 (21/5/20) – doble FLOT2
9. EM-158 abs. FLOT1 (21/5/20) – doble FLOT2
10. EM-158 abs. FLOT2 (21/5/20) – doble FLOT2
11. Cneg 1/100 – doble FLOT2

Protocolo:

- Incubar 1h con suero diluído en Goat Serum 5% (las inmunoabsorciones se ponen directamente)
- 3 lavados con PBS1x
- Incubar 1h con anticuerpo anti-FLOT1 o anti-FLOT2 diluídos 1/500 en Goat serum 5%
- 3 lavados con PBS1x
- Incubar 1h con Ac. secundarios GAH594 IgG + GAR488 diluídos 1/500 en Goat serum 5%
- 3 lavados con PBS1x
- Montar con Fluoromount

Resultado: no se ve positiva ninguna de las inmunoabsorciones!! Repetir inmunoabsorciones

15/12/2022

Extracción y cultivo de neuronas DRG (rata)

*Se van a crecer neuronas para IP de Elba (5 placas 100cc) + 3 placas 24w con cubres y 4 culture slides de milteny para co-cultivos.

Se extraen a partir de embriones de rata. Ratas Sprague-Dawley embarazadas.

Se piden ratas E15 pero se utilizan pasadas 24 horas → el cultivo se inicia en E16.

Extracción de DRGs

➤ Estabulario

- Llevar al estabulario un tubo falcon de 50 ml con medio L15 (en hielo) y material instrumental (tijeras, bisturí, pinzas...).

Medio L15:

- 45 ml de medio Leibovitz's
- 5 ml de FBS (10%)
 - 50 µl de DNasa (stock a 10 µg/ml) *La DNasa no se añade directamente al medio L15 total, sólo se añaden 5 ul de stock de DNasa a los 5 mL que se usan para inactivar la tripsina.
- Poner el animal a la cámara de CO₂ → abrir la llave hasta el número 2, subir el O₂ hasta el 2, y poner el isofluorano al 5.
- Sacar la rata de la cámara y ponerla encima de un corcho. Pinchar 1ml de TP41 (Solución inyectable para eutanasia) en el corazón.
- Mojar la rata con alcohol y abrir por debajo (ponerla boca arriba). Tirar de las bolsas de los fetos y ponerlos en una placa con L15.
- Sacar todos los fetos de las bolsas y ponerlos en un tubo con medio L15 (en hielo).

➤ Cultivos

- Poner todos los fetos en una placa con el medio L15 y mantenerla sobre el hielo.
- Coger un feto, ponerlo sobre la placa con Agar y mojarlo con PBS (estéril y frío, mantenerlo en hielo). Es importante ir mojando el feto con PBS, no puede quedarse seco en ningún momento.
- Cortar la cabeza con unas tijeras y clavar el feto boca abajo con 4 puntas de aguja en las extremidades.
- Sacar las dos capas que envuelven la médula espinal y sacar la médula procurando que no se rompa.
- Sacar los ganglios que se hayan quedado pegados a la médula y pasarlos a una placa pequeña con L15.
- Con una aguja de insulina sacar para fuera los DRG de la columna e irlos pasando a la placa con L15

Disgregación de los DRGs

- Pasar todos los DRG a un tubo de 15 ml → con pipeta Pasteur de cristal + *xumet*
- Centrifugar a 300 rpm 5 min
- Eliminar el sobrenadante (con pipeta+xumet e ir tirando a una placa, para no perder ningún DRG).

- Poner PBS1x y centrifugar a 300 rpm 5 min.
- Eliminar el sobrenadante y añadir 5 ml de → 4'5ml PBS1x + 500 ul de tripsina 2.5% sin bromophenol.
- Incubar 15min en el baño a 37°C. Homogeneizar suavemente cada 5 min
- Añadir 5 ml de medio L15 (con DNasa) para inactivar la tripsina.
- Centrifugar a 300 rpm 10 min
- Pasar el pellet a un eppendorf con 1ml de medio NG, y disgregar con una pipeta pasteur de cristal fina (*se hace más fina la punta con el bunsen, preparar unos días antes y autoclavar*). Procurar no hacer mucha espuma. Antes de homogeneizar, pasar la pipeta por FBS para que no se queden pegados los DRG a las paredes.
- Paso el ml de cels disgregadas a un tubo de 15 ml con 4 ml de medio NG (total 5 ml)
- Cuento las cels: total 630.000 cels/ml
 - Cultivo DRG: planto 500.000 cels/placa 10cc
 - Co-cultivos DRG-Schwann: planto 3000 cels/pozo

Co-cultivo de neuronas DRG i células de Schwann (rata - prueba cels disgregadas / cels no disgregadas)

Protocolo mixto entre paper "DRG neuron/Schwann cells Myelinating Cocultures" de Taveggia (2018), paper pan-NF de Appelthausen, y paper "A reliable in vitro model for studying peripheral nerve myelination in mouse" de Stettner (2013).

- 3 placas de 24wells con 1 cubre de 12mm en cada pozo, y 4 culture slide Milteny:
 - Día anterior: coating con Poly-D-lys 1/40 → incubar overnight a 37°C
 - Mismo día: lavar pozos y hacer coating con Laminina 2'5 ul/ml → incubar mínimo 1h a 37°C
- DO → Añadir 400 ul de medio C (co-culture medium) a cada pozo:
 - **Medio C (co-culture medium):**
 - DMEM (con D-glucosa y Glutamax): 44,5 ml (ref. 10569-010 ThermoFisher)
 - 10% FBS: 5 ml
 - 1% Pen-Str: 0,5ml
 - 50 ng/ml NGF: 25 ul

*según el protocolo original, se usaría MEM en vez de DMEM, y también habría que añadir 1% de L-glutamina y 4mg/ml de D-glucosa → como nuestro DMEM ya lleva glutamina y glucosa, no le añadido más.
- Pongo 3.000 cels en cada pozo
- Incubar a 37°C

- D1 → cambiar el medio (poner medio C nuevo) → cambio sólo 200ul (la mitad)
- D4 → cambiar el medio por **medio NG** → cambio 300 ul
 - Neurobasal: 48 ml
 - 2% B27: 1 ml
 - 1% L-glutamina (en este caso, Glutamax): 0,5 ml
 - 1% Pen-Str: 0,5 ml
 - 50 ng/ml NGF:25 ul

*según el protocolo original, también habría que añadir 4mg/ml de D-glucosa → como nuestro Neurobasal ya lleva glucosa, no le añado más.
- D6 → cambiar el medio (poner medio NG nuevo) → cambio 200 ul (la mitad)
- D7 → cambiar el medio por **Medio de mielinización co-cultivos**:
 - Medio C: 30 ml
 - 50 ug/ml de ácido ascórbico: 300 ul del stock 5mg/ml (1/100 en el medio)
 - *Preparación previa ácido ascórbico (A4403, Merck): disolver los 100mg en 20ml de DMEM (para hacer 5mg/ml) → congelar en alícuotas de 400 ul tapado con papel de plata*
 - 0,5 uM Forskolin: 1,5ul del stock 10mM (1/20000 en el medio)
 - *En el paper de Appelthauser pone 0,05uM, pero creo que en realidad es 0,5um porque es lo que ponen en el paper de Stettner 2013 (en el que ella se basa). Normalmente en las células de Schwann lo usamos a 20um, pero según el paper de Stettner 2013, el forskolin provoca desmielinización (el efecto contrario al deseado).*
- D8 → cambiar el medio (poner medio de mielinización nuevo) → a partir de aquí ir cambiando (cada 2 -3 días).

16/12/2022

Congelación PBMC (NHC 1768641 y 179022)

6 tubos CPT de **Juan Carlos de Haro Mateo (NHC 1768641)** → CIDP NF155+

4 tubos CPT de **Daniel Asensio Adalid (NHC 179022)** → CIDP en remisión

- Centrifugar 20min a 1650g sin freno a 18-25°C (los tubos se deben centrifugar en las 24h posteriores a la extracción de la sangre). En este caso se centrifugan el mismo día.
- Invertir los tubos para resuspender las células en el plasma (después de este proceso se puede mantener la muestra un máximo de 48h en la nevera o a Ambiente)
- Decantar el sobrenadante a un tubo y lavar con suero fisiológico 1:1
- Centrifugar 300g 5min

- Resuspender en PBS1x y contar las células:
 - 1768641: 25 millones
 - 179022: 15 millones
- Centrifugar 300g 5min
- Congelar en FBS+10%DMSO:
 - 1768641: 8 viales de 3 millones/vial (1 ml de FBS+DMSO)
 - 179022: 5 viales de aprox 3 millones/vial (1 ml de FBS+DMSO)

Cambiar medio co-cultivos

- D1 → cambiar el medio (poner medio C nuevo) → cambio sólo 200ul (la mitad)

19/12/2022

Cambiar medio co-cultivos

- D4 → cambiar el medio por **medio NG** → cambio 300 ul
 - Neurobasal: 48 ml
 - 2% B27: 1 ml
 - 1% L-glutamina (en este caso, Glutamax): 0,5 ml
 - 1% Pen-Str: 0,5 ml
 - 50 ng/ml NGF:25 ul

*según el protocolo original, también habría que añadir 4mg/ml de D-glucosa → como nuestro Neurobasal ya lleva glucosa, no le añadido más.

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

Coating HEKs y transfección (FLOT1/2)

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

Transfección: lo hago por la tarde a última hora!

- Preparar mezclas transfección
 - **FLOT1/2:**
 - 6 ug FLOT1 + 3 ug FLOT2 + 250 ul Optimem

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

Coating y transfección placas 12w (inmunoabsorción FLOT1/2)

- Coating 4 placas de 12w con Poly-D 1/40 en PBS1x (de stock poly-d 1 mg/ml) → mínimo 1h a 37°C (1 placa FLOT1, 1 placa FLOT2, 1 placa FLOT1/2, 1 placa HEKs no transf)
- Coating HEK293: 150.000 cels/pozo + 0,7ml de medio
- Preparar mezclas transfección:
 - **FLOT1/2** → cada pozo:
 - 1,5 ug DNA FLOT1 + 0,5 ug DNA FLOT2 + 62,5 ul Optimem
 - 3 ul lipofectamina2000 + 62,5 ul Optimem
 - **FLOT1** → cada pozo:
 - 2 ug DNA FLOT1 + 62,5 ul Optimem
 - 3 ul lipofectamina2000 + 62,5 ul Optimem
 - **FLOT2** → cada pozo:
 - 2 ug DNA ANO2 + 62,5 ul Optimem
 - 3 ul lipofectamina2000 + 62,5 ul Optimem
- Juntar y dejar reposar mínimo 5 minutos
- Poner 125 ul de mezcla de transfección a cada pozo

Coating y transfección placas 12w (inmunoabsorción LIF)

- Coating 1 placa de 12w con Poly-D 1/40 en PBS1x (de stock poly-d 1 mg/ml) → mínimo 1h a 37°C (6w LIF, 6w HEKs no transf)
- Coating HEK293: 150.000 cels/pozo + 0,7ml de medio
- Preparar mezclas transfección:
 - **LIF** → cada pozo:
 - 2 ug DNA LIF + 62,5 ul Optimem
 - 3 ul lipofectamina2000 + 62,5 ul Optimem
- Juntar y dejar reposar mínimo 5 minutos
- Poner 125 ul de mezcla de transfección a cada pozo

20/12/2022

Coating células + transfección Culture slides

18 culture slides:

- 6 LIF
- 2 ANO2
- 8 Perfil
- 2 LRP4

Protocolo:

- Preparar mezclas transfección → cada culture slide (8 pozos)
 - 2,2ug 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

Inmunoabsorción ANO2

Placa 12w transfectadas día 22/11/2022 y congeladas día 23/11/2022 (6w ANO2, 6w HEKs no transf)

Muestra:

- EM-153 1/200

Protocolo:

- Diluir muestras en Goat serum 5 % → preparar 300 ul/condición
- Incubar 1h en cada uno de los 6 pozos de cada condición
- Congelar el suero inmunoabsorbido a -20°C

*Se ha comprobado la positividad de FLOT1/2 con cubres, y no había muchas células transfectadas.

Inmunoabsorción LIF

Placa 12w transfectadas día 19/12/2022 y congeladas día 20/12/2022 (6w LIF, 6w HEKs no transf)

Muestra:

- CIDP15 (GDP) 1/100

Protocolo:

- Fijar 10min con PFA 4%
- 1 lavado con PBS
- Permeabilizar 5min con PBS-tritón 0,3%
- 1 lavado con PBS
- Diluir muestras en Goat serum 5 % → preparar 400 ul/condición
- Incubar 1h en cada uno de los 6 pozos de cada condición
- Congelar el suero inmunoabsorbido a -20°C

Coating ELISA NF155, CNTN1, CASPR1

[NF155]_i = 0,20 mg/ml

[CNTN1]_i = 0,25 mg/ml

[CASPR1]_i = 0,789 mg/ml

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

- NF155: 48 pozos (1 placa) → [NF155]_f = 1 ug/ml → 2,5 ml buffer + 12,5 ul
- CNTN1: 8 pozos → [CNTN1]_f = 1 ug/ml → 400 ul buffer + 1,6 ul
- CASPR1: 48 pozos (1 placa) → [CASPR1]_f = 5 ug/ml → 2,5 ml buffer + 15'8 ul

21/12/2022

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

Cambiar medio co-cultivos

- D6 → cambiar el medio (poner medio NG nuevo) → cambio sólo 200ul (la mitad)

Inmunoabsorción FLOT1/2

Placas 12w transfectadas día 19/12/2022 y fijadas día 21/12/2022 (1 placa FLOT1, 1 placa FLOT2, 1 placa FLOT1/2, 1 placa HEKs no transf)

Muestras:

- EM-158 1/100
- EM-307 1/100

Protocolo:

- Fijar pozos con PFA4% 10min
- 1 lavado con PBS1x
- Diluir muestras en Goat serum 5 % → preparar 400 ul/condición (x4)
- Incubar 1h en cada uno de los 6 pozos de cada condición
- Congelar el suero inmunoabsorbido a -20°C

*Se ha comprobado la positividad de FLOT1/2 con cubres, y no había muchas células transfectadas.

ICC Perfil nodales/paranodales (BD)

Muestras y resultado: (2 portas perfil)

1. 22-2-1151 Box315: sólo hacer CNTN1 (en C+) → positivo muy débil
2. 22-2-1152 Box 315: negativo
3. 22-2-1153 Box 315: negativo
4. 22-2-1154 Box 315: negativo

ICC ANO2 (inmunoabsorciones)

CS transfectado día 20/12, y recogido día 21/12

Objetivo: hacer fotos de ICC inmunoabsorciones para la revisión del paper.

Muestras: (x2)

1. EM-153 1/200
2. EM-153 abs. HEKs no transf
3. EM-153 abs. ANO2
4. Cneg 1/200

Protocolo:

- Incubar 1h con suero diluído en Goat Serum 5% (las inmunoabsorciones se ponen directamente)
- 3 lavados con PBS1x
- Incubar 1h con anticuerpo anti-ANO2 1/500 en Goat serum 5%
- 3 lavados con PBS1x
- Incubar 1h con Ac. secundarios GAH594 IgG + GAR488 diluídos 1/500 en Goat serum 5%
- 3 lavados con PBS1x
- Montar con Fluoromount

Resultado: casi no se ha inmunoabsorbido. De momento dejo de intentarlo, en realidad el revisor sólo nos pidió fotos de las inmunoabsorciones de FLOT1/2.

ELISA CNTN1, CASPR1 (screening BD, titulación)

Muestras:

- **CASPR1** → screening BD:
 - 22-2-1134
 - 22-5-1135 (LCR)
 - 22-2-1140
 - 22-2-1141
 - 22-2-1152
 - 22-2-1153
 - 22-2-1154
- **CNTN1**
 - 22-2-1151 → titular CNTN1 con IgG totales (paciente CNTN1+ conocido)

Protocolo:

- Bloquear con leche 5% en PBS-tween 0'1% → 200 ul pozo (incubar 1h a temp. ambiente)
- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
- Diluir los **sueros**:
 - Titulación: 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 (a: 1/100, b:1/300, c:1/900, d: 1/2700, e: 1/8100 i f: 1/24300)
 - Screening: diluir sueros 1/100 en leche 5% en PBS-tween 0'1%
- 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 **H₂SO₄** 25%
- Leer a 450-570 nm

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	Cneg	22-2-1140	22-2-1154	Cneg	22-2-1151 1/900							
B blanc	Cneg	22-2-1140	22-2-1154	Cneg	22-2-1151 1/900							
C prot	Cpos CASPR1	22-2-1141		Cpos CNTN1	22-2-1151 1/2700							
D blanc	Cpos CASPR1	22-2-1141		Cpos CNTN1	22-2-1151 1/2700							
E prot	22-2-1134	22-2-1152		22-2-1151 1/100	22-2-1151 1/8100							
F blanc	22-2-1134	22-2-1152		22-2-1151 1/100	22-2-1151 1/8100							
G prot	22-5-1135	22-2-1153		22-2-1151 1/300	22-2-1151 1/24300							
Hblanc	22-5-1135	22-2-1153		22-2-1151 1/300	22-2-1151 1/24300							

CASPR1 CNTN1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	0,088	0,046	0,064	0,069	0,09							
B blanc	0,084	0,05	0,097	0,053	0,051							
C prot	0,834	0,062		1,252	0,074							
D blanc	0,07	0,057		0,066	0,065							
E prot	0,108	0,062		0,344	0,058							
F blanc	0,076	0,067		0,07	0,054							
G prot	0,064	0,067		0,167	0,064							
Hblanc	0,078	0,087		0,097	0,073							

Resultado:

- **CASPR1** → screening BD:
 - 22-2-1134: negativo

- 22-5-1135 (LCR): negativo
- 22-2-1140: negativo
- 22-2-1141: negativo
- 22-2-1152: negativo
- 22-2-1153: negativo
- 22-2-1154: negativo
- **CNTN1**
 - 22-2-1151 → título CNTN1 1/100 (IgG totales)

22/12/2022

ICC FLOT1/2 (inmunoabsorciones)

Cubres transfectados 19/12, fijados 21/12

Objetivo: hacer fotos de ICC inmunoabsorciones para la revisión del paper.

Muestras:

1. EM-307 1/100 – doble FLOT1
2. EM-307 abs. HEKs no transf (21/12/22) – doble FLOT1
3. EM-307 abs. FLOT 1/2 (21/12/22) – doble FLOT1
4. EM-307 abs. FLOT1 (21/12/22) – doble FLOT1
5. EM-307 abs. FLOT2 (21/12/22) – doble FLOT1
6. EM-158 1/100 – doble FLOT2
7. EM-158 abs. HEKs no transf (21/12/22) – doble FLOT2
8. EM-158 abs. FLOT1/2 (21/12/22) – doble FLOT2
9. EM-158 abs. FLOT1 (21/12/22) – doble FLOT2
10. EM-158 abs. FLOT2 (21/12/22) – doble FLOT2
11. Cneg 1/100 – doble FLOT1
12. Cneg 1/100 – doble FLOT2

Protocolo:

- Incubar 1h con suero diluído en Goat Serum 5% (las inmunoabsorciones se ponen directamente)
- 3 lavados con PBS1x
- Incubar 1h con anticuerpo anti-FLOT1 o anti-FLOT2 diluídos 1/500 en Goat serum 5%
- 3 lavados con PBS1x

- Incubar 1h con Ac. secundarios GAH594 IgG + GAR488 diluídos 1/500 en Goat serum 5%
- 3 lavados con PBS1x
- Montar con Fluoromount

Resultado: No ha salido bien la inmunoabsorción. La inmuno se ve mal... el rojo se ve muy subido.

Cambiar medio co-cultivos

- D7 → cambiar el medio por **Medio de mielinización co-cultivos:**
 - Medio C: 30 ml
 - 50 ug/ml de ácido ascórbico: 300 ul del stock 5mg/ml (1/100 en el medio)
 - 0,5 uM Forskolin: 1,5ul del stock 10mM (1/20000 en el medio)

Congelación PBMC (NHC 1843661)

6 tubos CPT de **Victor González González (1843661)** → CIDP NF155+ rebrote

- Centrifugar 20min a 1650g sin freno a 18-25°C (los tubos se deben centrifugar en las 24h posteriores a la extracción de la sangre). En este caso se centrifugan el mismo día.
- Invertir los tubos para resuspender las células en el plasma (después de este proceso se puede mantener la muestra un máximo de 48h en la nevera o a Ambiente)
- Decantar el sobrenadante a un tubo y lavar con suero fisiológico 1:1
- Centrifugar 300g 5min
- Resuspender en PBS1x y contar las células: 21 millones de células
- Centrifugar 300g 5min
- Congelar en FBS+10%DMSO: 7 viales de 3 millones/vial (1 ml de FBS+DMSO)

27/12/2022

Cambiar medio co-cultivos

- D11 → cambiar el medio (poner medio NG nuevo) → cambio sólo 200ul (la mitad)