

02/01/2023

Cambiar medio co-cultivos

- D19 : cambiar el medio (poner medio mielinización nuevo) : cambio sólo 200ul (la mitad)

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 19 - rata 15/12/2022)

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

Protocolo:

- Fijar 20 min con PFA 4%
- 1 lavado con PBS1x
- Bloquear con Goat serum 5% y 0'5% tritón (en PBS): 1h a RT
- Incubar con anticuerpos primarios diluídos en Goat serum 5% y 0'5% tritón (en PBS):
 - **MBP y NFh**
 - anti-Myelin basic protein SMI99, 808401 (Biolegend). Dil. **1/500** (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 0'5% tritón (todos a 1/750)
 - MBP y NFh: GAM594 + GAC488
- 3 lavados con PBS1x
- Montar con Fluoromount

Resultado: El NFh se ve muy bien. Todavía no hay mielina (no marca nada el MBP).

03/01/2023

✓ Coating células + transfección Culture slides

18 culture slides:

- 10 Perfil (Transfecto 2 con MACSfectin)
- 4 LRP4
- 2 LRP4/CASPR2
- 2 NF155/CNTN1

Protocolo: cambio un poco el protocolo : pruebo unos cuantos con **MACSfectin (Milteny)** y otros con lipofectamina2000 (ajustando igual las medidas)

- Preparar mezclas transfección cada culture slide (8 pozos)**
 - 1,6 ug DNA + 40 ul Optimem
 - 3,2 ul lipofectamina2000 o MACSfectin + 40 ul Optimem
- Juntar y dejar reposar 20 minutos
- Poner 300 ul de medio HEK a cada pozo
- Poner 120.000 cels (HEK293) a cada pozo
- Poner 10 ul de mezcla de transfección a cada pozo

Para el cálculo de las cantidades de DNA, Optimem y MACSfectin me he basado en el siguiente cuadro del Datasheet, teniendo en cuenta que una placa de 60mm tiene un área de **21'5 cm², y un pozo de un 8-well culture slide de falcon tiene un área de **0'7 cm²**.

*Para el futuro, tener en cuenta que los culture slide (Imaging chamber) de Milteny tienen 0'88 cm² de área.

Cell culture vessel	DNA quantity (µg)	Final volume of DNA diluted in medium (µL)	MACSfectin Reagent (µL)	Final volume of diluted MACSfectin Reagent in medium (µL)	Cell culture volume (mL)
96 well	0.25	25	0.5	25	0.1
24 well	1	50	2	50	0.5
12 well	2	50	4	50	1
6 well	3	100	6	100	2
60 mm dish	6	150	12	150	3
100 mm dish	12	250	24	250	8
T75 flask	20	350	40	350	10

Table 2: Examples of MACSfectin Reagent requirements for DNA transfection of adherent cells using a DNA : MACSfectin Reagent ratio of 1:2.

04/01/2023

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

*La transfección ha salido perfecta tanto con lipofectamina como con MACSfectin : a partir de ahora usar esas cantidades.

05/01/2023

Cambiar medio co-cultivos

- D22 : cambiar el medio (poner medio mielinización nuevo) : cambio sólo 200ul (la mitad)

09/01/2023

Cambiar medio co-cultivos

- D26 : cambiar el medio (poner medio mielinización nuevo) : cambio sólo 200ul (la mitad)

✓ ICC co-cultivos (día 26 - rata 15/12/2022)

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

Protocolo:

- Fijar 20 min con PFA 4%
- 1 lavado con PBS1x
- Bloquear con Goat serum 5% y 0'5% tritón (en PBS): 1h a RT
- Incubar con anticuerpos primarios diluídos en Goat serum 5% y 0'5% tritón (en PBS): overnight 4°C
 - **MBP y NFh**
 - anti-Myelin basic protein SMI99, 808401 (Biolegend). Dil. **1/500** (mouse) : overnight 4°C
 - anti-Neurofilament H, AB5539 (Merck) **Dil. 1/500** (chicken) : 1h RT
- 3 lavados con PBS1x

- Incubar 1h con Ac. secundarios diluïdos en Goat serum 5% y 0'5% tritón (todos a 1/750)
 - MBP y NFh: GAM594 + GAC488
- 3 lavados con PBS1x
- Montar con Fluoromount

Resultado: Igual que día 19 NFh se ve muy bien. Todavía no hay mielina (no marca nada el MBP) : quizás no se formará mielina porque me parece que las cels de Schwann no están bien alineadas.

Hacer con explantes a partir de ahora!!

Coating Poly-D.Lys (culture slides)

Coating 15 culture slides con Poly-D 1/40 en PBS1x (de stock poly-d 1 mg/ml) : aprox 300 ul por pocillo

9 CS Milteny, 6 CS Thermofisher (los 6 de Thermofisher son para Marta)

11/01/2023

Coating células + transfección Culture slides

9 culture slides:

- 8 Perfil
- 1 LGI4 (x2 pozos) / ADAM22 (x2 pozos) / LGI4-ADAM22 (x4 pozos)

Protocolo: cambio un poco el protocolo

- Preparar mezclas transfección cada culture slide (8 pozos)
 - 1,6 ug DNA + 40 ul Optimem
 - 3,2 ul lipofectamina2000 + 40 ul Optimem
- Juntar y dejar reposar 20 minutos
- Poner 300 ul de medio HEK a cada pozo
- Poner 120.000 cels (HEK293) a cada pozo
- Poner 10 ul de mezcla de transfección a cada pozo

12/01/2023

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

13/01/2023

✓ ICC Perfil nodales/paranodales (BD)

CNTN1, NF140, NF155, NF186 (cels fijadas, suero 1/100)

Muestras y resultado: 5 portas perfil

1. 22-2-1177 Box 316 : neg
2. 22-2-1178 Box 316 : neg
3. 22-2-1179 Box 316 : neg
4. 22-2-1180 Box 316 : neg
5. 22-2-1181 Box 316 : neg
6. 22-2-1182 Box 316 : neg
7. 23-2-12 Box 317 : neg
8. 23-2-13 Box 317 : neg

✓ ICC LGI4/ADAM22 (prueba)

CS transfectado día 11/01/2023 LGI4 (x2 pozos) / ADAM22 (x2 pozos) / LGI4-ADAM22 (x4 pozos)

Sólo para comprobar que la transfección ha salido bien. (Plásmido LGI4 no tiene tag, plásmido ADAM22 tiene HA-tag)

Protocolo:

- Bloquear 1h con Goat serum 5%
- Incubar 1h con anticuerpos primarios diluídos en Goat serum 5%
 - **LGI4:** anti-LGI4, ab115305 (Abcam). Dil.**1/200** (rabbit)
 - **HA:** anti-HA Dil. **1/1000** (rat) se suele usar a 1/2000 (libreta electrónica - Ana Siles)

- 3 lavados con PBS1x
- Incubar 1h con **Ac. secundarios** diluídos 1/500 en Goat serum 5%
 - Anti-LGI4: GAR488
 - Anti-HA: GARat 488
- 3 lavados con PBS1x
- Montar con Fluoromount

Resultado: el LGI4 se transfecta, pero ADAM22 no. LGI4 marca en el interior, no en la membrana. Volver a transformar ADAM22 para cotransfectarlo.

✓ ICC NCAM2

CS transfectado día 11/01/2023 (6 pozos)

Muestras:

- CIDP1
- CIDP2
- CIDP3
- CIDP4
- CIDP9
- CIDP10

Protocolo:

- Bloquear 1h con Goat serum 5%
- Incubar 1h con anticuerpos primarios diluídos en Goat serum 5%
 - **NCAM2:** anti-NCAM2, ab115305 (abcam). Dil. **1/200** (rabbit)
- 3 lavados con PBS1x
- Incubar 1h con **Ac. secundarios** diluídos 1/500 en Goat serum 5% : GAR488 + GAH594 IgG
- 3 lavados con PBS1x
- Montar con Fluoromount

Resultado: se transfectan muy muy pocas células.

✓ ICC ANO2 (HEKs no transfectadas - revisión)

2 pozos con HEKs transfectadas

Objetivo: hacer fotos de ICC en HEKs no transfectadas para la revisión del paper.

Muestras:

1. EM-153 1/100
2. Cneg

Protocolo:

- Bloquear 1h con Goat serum 5%
- Incubar 1h con suero diluído 1/100 en Goat Serum 5%
- 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: negativo, hago las fotos para la revisión

12/01/2023

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

17/01/2023

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

18/01/2023

Coating células + transfección Culture slides

18 culture slides:

- 10 Perfil
- 5 LRP4
- 2 LRP4/CASPR2
- 1 NCAM2 (dejar hasta el día 20/01) : para Marta

Protocolo: cambio un poco el protocolo

- Preparar mezclas transfección cada culture slide (8 pozos)
 - 2 ug DNA + 40 ul Optimem
 - 3,2 ul lipofectamina2000 + 40 ul Optimem
- Juntar y dejar reposar 20 minutos
- Poner 300 ul de medio HEK a cada pozo
- Poner 120.000 cels (HEK293) a cada pozo
- Poner 10 ul de mezcla de transfección a cada pozo

Coating ELISA CASPR1

[CASPR1]_i = 0,789 mg/ml

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

- CASPR1: 48 pozos (1 placa) : [CASPR1]_f = 5 ug/ml : 2,5 ml buffer + 15'8 ul

19/01/2023

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

20/01/2023

✓ ELISA CASPR1 (screening BD)

Muestras y resultado:

1. 22-2-1177 Box 316 : neg
2. 22-2-1178 Box 316 : neg
3. 22-2-1179 Box 316 : neg
4. 22-2-1180 Box 316 : neg
5. 22-2-1181 Box 316 : neg
6. 22-2-1182 Box 316 : neg
7. 23-2-12 Box 317 : neg
8. 23-2-13 Box 317 : neg
9. 23-2-82 Box 318 : neg
10. 23-2-83 Box 318 : neg
11. 23-2-84 Box 318 : neg
12. 23-2-85 Box 318 : 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

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	Cneg	22-2-1179	23-2-12	23-2-84								
B blanc	Cneg	22-2-1179	23-2-12	23-2-84								
C prot	Cpos CASPR1	22-2-1180	23-2-13	23-2-85								
D blanc	Cpos CASPR1	22-2-1180	23-2-13									
E prot	22-2-1177	22-2-1181	23-2-82									
F blanc	22-2-1177	22-2-1181	23-2-82									
G prot	22-2-1178	22-2-1182	23-2-83									
Hblanc	22-2-1178	22-2-1182	23-2-83									

25/01/2023

✓ ICC Perfil nodales/paranodales (BD)

Muestras y resultado: 2 portas perfil

1. 23-2-0082 : panNF+ (NF40, NF155, NF186+)
2. 23-2-0083 : neg
3. 23-2-0084 : neg
4. 23-2-0085 : NF155+

26/01/2023

✓ ELISA NF155, NF140, NF186 (titulación)

Muestras:

- 22- 419965 (22-2-1175): Jaume Marcet Lucas (22/12/2022) : titulación NF155 (IgG totales)
- 22-323877 (23-2-109): Jaume Marcet Lucas muestra previa (14/07/2022) : titulación NF155 (IgG totales)
- 23-2-85: Nasser Wael (Bélgica) (16/01/2023) : titulación NF155 (IgG totales)
- 22-2-830: Nasser Wael muestra previa (24/08/2022) : titulación NF155 (IgG totales)
- 23-2-82: Vervecken, Hugo Jozef (16/01/2023) : confirmar positividad con NF140 y NF186, titular y subclases con NF155 (no tengo pozos suficientes del resto)

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	2022-323877 1/900	2022-419965 1/100	2022-419965 1/8100	22-2-830 1/100	22-2-830 1/8100	23-2-85 1/900	23-2-82 1/100	23-2-82 1/8100	23-2-82 IgG1	Cneg	Cpos NF186
B blanc	Cneg	2022-323877 1/900	2022-419965 1/100	2022-419965 1/8100	22-2-830 1/100	22-2-830 1/8100	23-2-85 1/900	23-2-82 1/100	23-2-82 1/8100	23-2-82 IgG1	Cneg	Cpos NF186
C prot	Cpos NF155	2022-323877 1/2700	2022-419965 1/300	2022-419965 1/24300	22-2-830 1/300	22-2-830 1/24300	23-2-85 1/2700	23-2-82 1/300	23-2-82 1/24300	23-2-82 IgG2	Cpos NF140	23-2-82 1/100
D blanc	Cpos NF155	2022-323877 1/2700	2022-419965 1/300	2022-419965 1/24300	22-2-830 1/300	22-2-830 1/24300	23-2-85 1/2700	23-2-82 1/300	23-2-82 1/24300	23-2-82 IgG2	Cpos NF140	23-2-82 1/100
E prot	2022-323877 1/100	2022-323877 1/8100	2022-419965 1/900		22-2-830 1/900	23-2-85 1/100	23-2-85 1/8100	23-2-82 1/900		23-2-82 IgG3	23-2-82 1/100	
F blanc	2022-323877 1/100	2022-323877 1/8100	2022-419965 1/900		22-2-830 1/900	23-2-85 1/100	23-2-85 1/8100	23-2-82 1/900		23-2-82 IgG3	23-2-82 1/100	
G prot	2022-323877 1/300	2022-323877 1/24300	2022-419965 1/2700		22-2-830 1/2700	23-2-85 1/300	23-2-85 1/24300	23-2-82 1/2700		23-2-82 IgG4		
Hblanc	2022-323877 1/300	2022-323877 1/24300	2022-419965 1/2700		22-2-830 1/2700	23-2-85 1/300	23-2-85 1/24300	23-2-82 1/2700		23-2-82 IgG4		

NF155 **NF140** **NF186**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	0,051	0,072	0,617	0,058	0,155	0,033	0,033	0,353	0,054	0,027	0,122	0,457
B blanc	0,071	0,011	0,028	0,036	0,022	0,015	0,012	0,035	0,036	0,009	0,04	0,029
C prot	0,627	0,026	0,343	0,039	0,05	0,017	0,02	0,143	0,048	0,01	0,21	0,679
D blanc	0,064	0,012	0,017	0,028	0,017	0,016	0,018	0,022	0,042	0,01	0,022	0,075
E prot	0,61	0,05	0,222		0,069	0,151	0,022	0,059		0,028	0,263	
F blanc	0,035	0,026	0,023		0,025	0,023	0,016	0,019		0,018	0,035	
G prot	0,174	0,038	0,099		0,029	0,076	0,026	0,053		0,583		
Hblanc	0,053	0,046	0,035		0,042	0,059	0,037	0,037		0,056		

Resultado:

- 22-323877 (**23-2-109**): Jaume Marcet Lucas muestra previa (14/07/2022) : título NF155 1/2700 (IgG)
- 22- 419965 (**22-2-1175**): Jaume Marcet Lucas (22/12/2022) : título NF155 1/900 (IgG totales)
- **22-2-830**: Nasser Wael muestra previa (24/08/2022) : título NF155 1/100 (IgG totales) : en el ELISA que se le hizo en septiembre dio 1/8100!!!! Puede ser que los títulos hayan bajado por la descongelación???
- **23-2-85**: Nasser Wael (Bélgica) (16/01/2023) : título NF155 1/100 (IgG totales)
- **23-2-82**: Vervecken, Hugo Jozef (16/01/2023) : título NF155 1/900 (IgG totales), NF140 y NF186 positivos. Subclases NF155 IgG4

31/01/2023

✓ Extracción DNA (HLA)

Muestras:

- DNA CNTN1-1 (antiguo CNTN1-1) : Maria Rosa Soldati (EDTA)
- DNA CNTN1-6 (antiguo CNTN1-6) : BIO040 (EDTA)
- DNA CNTN1-7 (antiguo CNTN1-7) : BIO050 (EDTA)
- DNA CNTN1-15 (antiguo CNTN1-39) : Manfred Eduard Nadolph (pellet leucocitos)
- DNA CNTN1-16 (antiguo CNTN1-40) : Josef Rathgeb (pellet leucocitos)
- DNA CASPR1-2 : Helmut Willnauer (pellet leucocitos)
- DNA CNTN1-CASPR1 – 3 : Helmut Beza (pellet leucocitos)

Protocolo: QIAamp Blood Mini Kit (Qiagen), protocol DNA purification from blood or body fluids (spin protocol) : protocol para purificar DNA de sangre, plasma, suero, linfocitos y otros fluidos corporales.

Cosas a hacer antes de empezar:

- Equilibrar muestras a temperatura ambiente (15-25 °C)
- Calentar el baño o el bloque seco a 56°C
- Equilibrar el Buffer AE a temperatura ambiente
- Si hay precipitado en el Buffer AL, disolver incubándolo a 56°C.

Protocolo:

- Poner 20 ul de Qiagen Protease en un eppendorf vacío
- Añadir 200 ul de muestra al eppendorf (si la muestra son leucocitos, añadir 200 ul de PBS1x a las células)

- Añadir 200 ul de Buffer AL. Mezclar con vórtex 15s.
- Incubar a 56°C 10 min
- Centrifugar brevemente los tubos para eliminar las burbujas
- Añadir 200 ul de etanol (96-100%) y mezclar con vórtex 15s.
- Pasar toda la mezcla a una QIAamp Mini spin column y centrifugar 1min a 6000g. Poner la columna en un nuevo collection tube y descartar el tubo anterior.
- Añadir 500 ul de Buffer AW1 a la columna. Centrifugar 1min a 6000g. Poner la columna en un nuevo collection tube y descartar el tubo anterior.
- Añadir 500 ul de Buffer AW2, y centrifugar 3min a máxima velocidad.
- Eliminar el líquido del collection tube y volver a centrifugar 1min a máxima velocidad.
- Poner la columna en un eppendorf y añadir 50 ul de Buffer AE a la columna.
- Incubar a temperatura ambiente 5min y centrifugar 1min a 6000g
- Cuantificar el DNA.

Resultado:

- DNA CNTN1-1 (antiguo CNTN1-1) : 40,1 ng/ul
- DNA CNTN1-6 (antiguo CNTN1-6) : 22,6 ng/ul
- DNA CNTN1-7 (antiguo CNTN1-7) : 20,3 ng/ul
- DNA CNTN1-15 (antiguo CNTN1-39) : 12,3 ng/ul
- DNA CNTN1-16 (antiguo CNTN1-40) : 53,6 ng/ul
- DNA CASPR1-2 : 55,5 ng/ul
- DNA CNTN1-CASPR1 – 3 : 57,8 ng/ul

02/02/2023

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

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

Se piden ratas E15 pero se utilizan pasadas 24horas : 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%)
- 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

Co-cultivos

- **4 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 medium) 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

- 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) : **en este caso cambio la mitad por medio NG directamente (en el paper de Faivre-Sarrahilh 2011 ponen directamente NG)**
 - 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
- D4 : **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)
 - 0,5 uM Forskolin: 1,5ul del stock 10mM (1/20000 en el medio)

***En una de las placas pongo un medio de mielinización un poco distinto (medio NG + ácido ascórbico, también lo he visto en el paper de Faivre-Sarrahilh 2011)**

 - 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
 - 50 ug/ml de ácido ascórbico: 300 ul del stock 5mg/ml (1/100 en el medio)
- D8 : cambiar el medio (poner medio de mielinización nuevo) : a partir de aquí ir cambiando un día sí uno no (cada 2 días).

Coating ELISA NF140, NF155 y NF186

[NF140]_i = 0,25 mg/ml

[NF155]_i = 0,20 mg/ml

[NF186]_i = 0,2 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
- NF155: 48 pozos (1 placa) : [NF155]_f = 1 ug/ml : 2,5 ml buffer + 12,5 ul
- NF186: 24 pozos (media placa) : [NF186]_f = 3 ug/ml : aprox 1,2 ml buffer + 18 ul

03/02/2023

✓ ELISA NF155, NF140, NF186 (titulación)

Muestras:

- 22- 395541 (**23-2-133**): Victor González González 14/11/2022 (NF155 titulada previamente 1/8100) : titulación NF155
- **22-2-1176**: Víctor González González 20/12/2022 (sólo llega por recerca, muestra justo pre-Rituximab) : titulación NF155
- **23-215730**: muestra NF155 y NF140+ por ICC (Reference) : titulación y subclases NF155, comprobar 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**:
 - 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	23-2-133 1/900	22-2-1176 1/100	22-2-1176 1/8100	23-215730 1/900	23-215730 IgG1	Cneg	Cneg				
B blanc	Cneg	23-2-133 1/900	22-2-1176 1/100	22-2-1176 1/8100	23-215730 1/900	23-215730 IgG1	Cneg	Cneg				
C prot	Cpos NF155	23-2-133 1/2700	22-2-1176 1/300	22-2-1176 1/24300	23-215730 1/2700	23-215730 IgG2	Cpos NF140	Cpos NF186				
D blanc	Cpos NF155	23-2-133 1/2700	22-2-1176 1/300	22-2-1176 1/24300	23-215730 1/2700	23-215730 IgG2	Cpos NF140	Cpos NF186				
E prot	23-2-133 1/100	23-2-133 1/8100	22-2-1176 1/900	23-215730 1/100	23-215730 1/8100	23-215730 IgG3	23-215730 1/100	23-215730 1/100				
F blanc	23-2-133 1/100	23-2-133 1/8100	22-2-1176 1/900	23-215730 1/100	23-215730 1/8100	23-215730 IgG3	23-215730 1/100	23-215730 1/100				
G prot	23-2-133 1/300	23-2-133 1/24300	22-2-1176 1/2700	23-215730 1/300	23-215730 1/24300	23-215730 IgG4	23-215730 1/300	23-215730 1/300				
Hblanc	23-2-133 1/300	23-2-133 1/24300	22-2-1176 1/2700	23-215730 1/300	23-215730 1/24300	23-215730 IgG4	23-215730 1/300	23-215730 1/300				

NF155 **NF140** **NF186**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	0,133	0,17	0,493	0,026	0,033	0,022	0,107	0,021	0	0	0	0
B blanc	0,106	0,017	0,096	0,011	0,032	0,022	0,103	0,062	0	0	0	0
C prot	0,36	0,076	0,311	0,017	0,021	0,029	0,162	0,153	0	0	0	0
D blanc	0,119	0,012	0,032	0,008	0,015	0,023	0,057	0,037	0	0	0	0
E prot	0,546	0,048	0,192	0,139	0,03	0,028	0,075	0,071	0	0	0	0
F blanc	0,12	0,062	0,03	0,154	0,02	0,021	0,155	0,114	0	0	0	0
G prot	0,473	0,073	0,177	0,09	0,028	0,085	0,025	0,052	0	0	0	0
Hblanc	0,185	0,149	0,092	0,131	0,052	0,216	0,11	0,109	0	0	0	0

Resultado: en general ha salido todo el ELISA muy bajito : **repetir!!!**

- 22- 395541 (**23-2-133**) : título NF155 1/2700
- **22-2-1176** : título NF155 1/900
- **23-215730** : todo negativo: comprobar otra vez por ICC y por teasing

Cambio medio co-cultivos (d1) : rata 02/02/2023

- D1 : cambiar el medio (poner medio C nuevo) : cambio sólo 200ul (la mitad) : **en este caso cambio la mitad por medio NG directamente (en el paper de Faivre-Sarrailh 2011 ponen directamente NG)**
 - 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

06/02/2023

Cambio medio co-cultivos (d1) : rata 02/02/2023

- D4 : **cambiar el medio (poner medio NG nuevo)** : cambio 200 ul (la mitad)

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

07/02/2023

Coating células + transfección Culture slides

18 culture slides:

- 8 Perfil
- 2 LRP4/CASPR2
- 2 NF155/CNTN1
- 5 NCAM2
- 1 LGI4 / ADAM22 / LGI4-ADAM22 / LIF : para Marta

Protocolo: cambio un poco el protocolo

- Preparar mezclas transfección cada culture slide (8 pozos)
 - 2 ug DNA + 40 ul Optimem
 - 3,2 ul lipofectamina2000 + 40 ul Optimem
- Juntar y dejar reposar 20 minutos
- Poner 300 ul de medio HEK a cada pozo

- Poner 120.000 cels (HEK293) a cada pozo
- Poner 10 ul de mezcla de transfección a cada pozo

✓ Congelación PBMC (NHC 1677062)

6 tubos CPT de **Sixto Herrero Escrich (1677062)** : 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: 56 millones de células
- Centrifugar 300g 5min
- Congelar en FBS+10%DMSO: 11 viales de aprox 5 millones/vial (1 ml de FBS+DMSO)

08/02/2023

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 NF155 (titulación IMM)

Se repite la titulación del día 03/02/2023, con algunos cambios (Quantalyser):

Muestras:

- **22- 395541 (23-2-133)**: Victor González González 14/11/2022 (NF155 titulada previamente 1/8100) : titulación NF155
- **22-2-1176**: Víctor González González 20/12/2022 (sólo llega por recerca, muestra justo pre-Rituximab) : titulación NF155
- **23-215730**: muestra dudosa NF155 y NF140+ por ICC (Reference) : repito la ICC ese mismo día y es claramente negativa. Comprovar positividad NF155.

Resultado:

- 22- 395541 (**23-2-133**) : título NF155 1/2700
- **22-2-1176** : título NF155 1/2700
- **23-225062**: título NF15 1/300
- **23-215730** : negativo

Cambio medio co-cultivos (d6) : rata 02/02/2023

- D6 : cambiar el medio por **Medio de mielinización co-cultivos**:
 - Medio C: 50 ml
 - DMEM (con D-glucosa y Glutamax): 44,5 ml
 - 10% FBS: 5 ml
 - 1% Pen-Str: 0,5ml
 - 50 ng/ml NGF: 25 ul
 - 50 ug/ml de ácido ascórbico: 500 ul del stock 5mg/ml (1/100 en el medio)
 - 0,5 uM Forskolin: 2,5ul del stock 10mM (1/20000 en el medio)

10/02/2023

✓ ELISA CASPR1 (screening BD)**Muestras:**

1. 23-2-233
2. 23-2-234
3. 23-2-235
4. 23-2-236

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 n

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	Cneg	22-2-235										
B blanc	Cneg	22-2-235										
C prot	Cpos CASPR1	22-2-236										
D blanc	Cpos CASPR1	22-2-236										
E prot	22-2-233											
F blanc	22-2-233											
G prot	22-2-234											
Hblanc	22-2-234											

Resultado:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	0,185	0,122										
B blanc	0,261	0,151										
C prot	1,697	0,138										
D blanc	0,294	0,179										
E prot	0,167	0										
F blanc	0,188	0										
G prot	0,157	0										
Hblanc	0,144	0										

- 23-2-233 : neg
- 23-2-234 : neg
- 23-2-235 : neg
- 23-2-236 : neg

✓ ICC Perfil nodales/paranodales (BD)

Muestras y resultado: 3 portas perfil

1. 23-2-233 : neg
2. 23-2-234 : panNF+
3. 23-2-235 : neg
4. 23-2-236 : neg
5. CIDP 5 : sólo veo la NF186+. Hacer ELISA?
6. Cpos

✓ IHC Monkey peripheral nerve (BD)

Muestras:

1. 22-2-848 Box 305
2. 22-2-50 Box 309
3. 23-2-223 Box 321
4. 22-5-1136 Box 315
5. Cneg

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. 22-2-848 Box 305 : negativo (IgG, IgM)
2. 22-2-950 Box 309 : IgG: axones 1 (grandes y pequeños). IgM negativo
3. 23-2-223 Box 321 : IgG: Schwann amielínicas 2, Mielina 2, Axones 1. IgM: mielina 3, axones 2
4. 22-5-1136 Box 315 : negativo (IgG, IgM)
5. Cneg 204-10 : IgG: axones 1 / 2. IgM: negativo

Cambio medio co-cultivos (d8) : rata 02/02/2023

D8 : cambiar el medio por **Medio de mielinización co-cultivos**:

- 2 placas : poner **Medio de mielinización co-cultivos 1**:
 - Medio C: 50 ml
 - DMEM (con D-glucosa y Glutamax): 44,5 ml
 - 10% FBS: 5 ml
 - 1% Pen-Str: 0,5ml
 - 50 ng/ml NGF: 25 ul
 - 50 ug/ml de ácido ascórbico: 500 ul del stock 5mg/ml (1/100 en el medio)
 - 0,5 uM Forskolin: 2,5ul del stock 10mM (1/20000 en el medio)
- 2 placas : poner **Medio de mielinización co-cultivos 2** (basado en el paper de Faivre-Sarrailh 2011)
 - Medio NG: 50 ml
 - 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
 - 50 ug/ml de ácido ascórbico: 500 ul del stock 5mg/ml (1/100 en el medio)

13/02/2023

Cambio medio co-cultivos (d11) : rata 02/02/2023

D11 : cambiar el medio por Medio de mielinización co-cultivos nuevo (cambio sólo 200 ul):

- 2 placas y 1 CS : poner Medio de mielinización co-cultivos 1 (base medio C)
- 2 placas y 1 CS : poner Medio de mielinización co-cultivos 2 (base medio NG)
- ✓ **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 + 100 ul Optimem

- 6 ul lipofectamina2000 + 100 ul Optimem
- Juntar y dejar reposar mínimo 5 minutos
- Poner 200 ul de mezcla de transfección a cada pozo

*También preparo una placa 6w de NF155 para comprobar que la inmunoabsorción funciona correctamente.

*Marta hace inmunoabs de LIF y de NF155 el día 14.02.23 : LIF no se inmunoabsorbe pero NF155 sí.

✓ IHC teasing nervio ciático cerdo

Muestras:

- 23-2-233 (confirmar negatividad CASPR1)
- 23-2-234 (confirmar positividad panNF)
- Control CASPR1+
- Control panNF+

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 sale bien!! No se ven los paranodos con el anticuerpo comercial.

✓ IHC Monkey peripheral nerve (vacunas EM - Resto de muestras H.SantPau)

Muestras: todas son tiempo T3

- | | |
|-----------------|--------------------------|
| 1. 98722 (1) | 14. 591615 (14) |
| 2. 111955 (2) | 15. 597217 (15) |
| 3. 147303 (3) | 16. 631193 (16) |
| 4. 190943 (4) | 17. 814329 (17) |
| 5. 219804 (5) | 18. 901936 (18) |
| 6. 266178 (6) | 19. 927164 (19) |
| 7. 304320 (7) | 20. 950931 (20) |
| 8. 344185 (8) | 21. 1004410 (21) |
| 9. 422044 (9) | 22. 1021881 (22) |
| 10. 461265 (10) | 23. 1598702 (C+ B2 box2) |
| 11. 472720 (11) | 24. 217975 (C+ B6 box2) |
| 12. 493713 (12) | 25. Cneg 204-10 |
| 13. 505343 (13) | |

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

- Bloquear 30 min - 1h con Goat serum 5%
- Incubar 1h con 40 ul de suero diluido 1/10 en Goat serum 5% (4 ul suero + 36 ul goat 5%)
- 3 lavados con PBS1x
- Incubar 45min 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: FOTOS HECHAS (si en la tabla no pone nada, es todo negativo)

Muestra	Mielina fibras pequeñas		Mielina fibras grandes		Cels Schwann amielínicas		Axones fibras pequeñas		Axones fibras grandes		Otros
	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	
98722 (1)											
111955 (2)							1		1		
147303 (3)		3		3			1		1		Mielina parte interna
190943 (4)											
219804 (5)							1		1		Fibros IgM
266178 (6)											
304320 (7)											
344185 (8)			1								
422044 (9)											
461265 (10)									2		
472720 (11)							1		1		
493713 (12)									1		
505343 (13)											
591615 (14)											
597217 (15)											
631193 (16)							2				
814329 (17)											
901936 (18)											
927164 (19)											
950931 (20)							2	2		2	
1004410 (21)											
1021881 (22)											
1598702 (C+ B2 box2)			2								
217975 (C+ B6 box2)			1								
Cneg 204-10											

14/02/2023

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 células + transfección Culture slides

18 culture slides:

- 12 Perfil
- 3LRP4
- 2 NF155/CNTN1
- 1 LIF (6 pozos) – NF155 (2 pozos)

Protocolo:

- Preparar mezclas transfección : cada culture slide (8 pozos)
 - 2 ug DNA + 40 ul Optimem
 - 3,2 ul lipofectamina2000 + 40 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 10 ul de mezcla de transfección a cada pozo

15/02/2023

✓ IHC Monkey peripheral nerve (vacunas EM - Resto de muestras H.SantPau)

Muestras: todas son tiempo T3

1. 1063758 (23)	16. 1519499 (38)
2. 1097811 (24)	17. 1534001 (39)
3. 1113212 (25)	18. 1556291 (40)
4. 1115327 (26)	19. 1562083 (41)
5. 1122921 (27)	20. 1566039 (42)
6. 1124890 (28)	21. 1643200 (43)
7. 1153091 (29)	22. 1668802 (44)
8. 1166296 (30)	23. 1673967 (45)
9. 1175686 (31)	24. Cneg 204-11
10. 1215478 (32)	25. Cneg 21-2-1608
11. 1217671 (33)	26. 1718374 (46)
12. 1248466 (34)	27. 1724109 (47)
13. 1398484 (35)	28. 1760298 (48)
14. 1432202 (36)	29. 1774129 (49)
15. 1454038 (37)	

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 45min 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 HECHAS (si en la tabla no pone nada, es todo negativo)

Muestra	Mielina fibras pequeñas		Mielina fibras grandes		Cels Schwann amielínicas		Axones fibras pequeñas		Axones fibras grandes		Otros
	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	
1063758 (23)											Fibros IgM
1097811 (24)											Fibros IgM
1113212 (25)									1		Fibros IgM
1115327 (26)											
1122921 (27)											
1124890 (28)								1		1	
1153091 (29)											Fibros IgM
1166296 (30)											Fibros IgM
1175686 (31)											
1215478 (32)											
1217671 (33)											Fibros IgM
1248466 (34)			1								
1398484 (35)											
1432202 (36)											
1454038 (37)											
1519499 (38)											Fibros IgM
1534001 (39)											
1556291 (40)											
1562083 (41)											
1566039 (42)	2		2								Fibros IgG, IgM
1643200 (43)											
1668802 (44)	2??	2??									Nose si es mielina o CS amielínicas
1673967 (45)											
Cneg 204-11											
Cneg 21-2-1608											Fibros IgM
1718374 (46)											
1724109 (47)									2		Fibros IgM
1760298 (48)											
1774129 (49)			1								Mucho marcaje (IgG y IgM)

16/02/2023

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

17/02/2023

Cambio medio co-cultivos (d15) : rata 02/02/2023

D15: cambiar el medio por Medio de mielinización co-cultivos nuevo (cambio sólo 200 ul):

- 2 placas y 1 CS : poner Medio de mielinización co-cultivos 1 (base medio C)
- 2 placas y 1 CS : poner Medio de mielinización co-cultivos 2 (base medio NG)

20/02/2023

Cambio medio co-cultivos (d18) : rata 02/02/2023

D18: cambiar el medio por Medio de mielinización co-cultivos nuevo (cambio sólo 200 ul):

- 2 placas y 1 CS : poner Medio de mielinización co-cultivos 1 (base medio C)
- 2 placas y 1 CS : poner Medio de mielinización co-cultivos 2 (base medio NG)

21/02/2023

✓ **Congelación PBMC (NHC 11924022)**

6 tubos CPT de **Soledad Sainz Sainz (1924022)** : CIDP sin tratar : EXTRAÍDOS DÍA 20/02/2023

6 tubos CPT de **Tomás Pérez Pérez (1274346)** : CIDP sin tratar : EXTRAÍDOS DÍA 20/02/2023

- 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:

- 1924022: aprox 12 millones
- 1274346: aprox 12 millones
- Centrifugar 300g 5min
- Congelar en FBS+10%DMSO:
 - 1924022 : 4 viales de 3 millones cels/vial (1 ml de FBS+DMSO) : 23-7-274 Box PBMC 1
 - 1274346 : 4 viales de 3 millones cels/vial (1 ml de FBS+DMSO) : 23-7-275 Box PBMC 1

22/02/2023

Coating ELISA CASPR1

[CASPR1]_i = 0,789 mg/ml

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

- CASPR1: 48 pozos (una placa) : [CASPR1]_f = 5 ug/ml : 2,5 ml buffer + 15'8 ul

*Al día siguiente hago ELISA en immuno y no sale bien! (control muy bajo) , el día 28/02 hago otra prueba y también sale bajo el control : no usar esa placa

23/02/2023

Cambio medio co-cultivos (d21) : rata 02/02/2023

D21 : cambiar el medio por Medio de mielinización co-cultivos nuevo (cambio sólo la mitad):

- 2 placas y 1 CS : poner Medio de mielinización co-cultivos 1 (base medio C)
- 2 placas y 1 CS : poner Medio de mielinización co-cultivos 2 (base medio NG)

✓ ICC co-cultivos (día 21)

Cojo 2 cubres de los co-cultivos para ir viendo como va la diferenciación (uno de placa medio mielinización 1, y otro de placa medio de mielinización 2)

Protocolo:

- Fijar 20 min con PFA 4%
- 1 lavado con PBS1x
- Bloquear con Goat serum 5% y 0'5% tritón (en PBS): 1h a RT
- Incubar con anticuerpos primarios diluídos en Goat serum 5% y 0'5% tritón (en PBS):
 - **MBP y NFh** : 1h RT (los pongo los dos juntos)
 - anti-Myelin basic protein SMI99, 808401 (Biolegend). Dil. **1/300** (mouse)

- anti-Neurofilament H, AB5539 (Merck) **Dil. 1/500** (chicken)
- 3 lavados con PBS1x
- Incubar 1h con Ac. secundarios diluídos en Goat serum 5% y 0'5% tritón (todos a 1/500) : **GAM488** (NfH) + **GAC594** (MBP)
- 3 lavados con PBS1x
- Montar con Fluoromount

Resultado: Todavía no se ve mielina, pero se ven muy bien las neuronas.

27/02/2023

Cambio medio co-cultivos (d25) : rata 02/02/2023

D25 : cambiar el medio por Medio de mielinización co-cultivos nuevo (cambio todo el medio):

- 2 placas y 1 CS : poner Medio de mielinización co-cultivos 1 (base medio C)
- 2 placas y 1 CS : poner Medio de mielinización co-cultivos 2 (base medio NG)

✓ ICC co-cultivos (día 25)

Cojo 2 cubres de los co-cultivos para ir viendo cómo va la diferenciación (uno de placa medio mielinización 1, y otro de placa medio de mielinización 2)

Protocolo:

- Fijar 20 min con PFA 4%
- 1 lavado con PBS1x
- Bloquear con Goat serum 5% y 0'5% tritón (en PBS): 1h a RT
- Incubar con anticuerpos primarios diluídos en Goat serum 5% y 0'5% tritón (en PBS):
 - **MBP y NFh:** 1 h a Tamb
 - anti-Myelin basic protein SMI99, 808401 (Biolegend). Dil. **1/300** (mouse)
 - anti-Neurofilament H, AB5539 (Merck) **Dil. 1/500** (chicken)
 - **Anti-CASPR1**, ab133634 (abcam). Dil. **1/100** (rabbit) ☞ overnight 4°C
- 3 lavados con PBS1x
- Incubar 1h con Ac. secundarios diluídos en Goat serum 5% y 0'5% tritón (todos a 1/500) : **GAM647** (MBP) + **GAC488** (NfH) + **GAR594** (Caspr1)
- 3 lavados con PBS1x
- Montar con Fluoromount

Resultado: Todavía no se ve mielina ni marcaje de Caspr1, pero se ven muy bien las neuronas.

Coating ELISA CASPR1

[CASPR1]_i = 0,789 mg/ml

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

- CASPR1: 48 pozos (una placa) : [CASPR1]_f = 5 ug/ml : 2,5 ml buffer + 15'8 ul

28/02/2023

✓ ICC co-cultivos (día 26)

Cojo 2 cubres de los co-cultivos para ir viendo cómo va la diferenciación (uno de placa medio mielinización 1, y otro de placa medio de mielinización 2)

Protocolo:

- Fijar 20 min con PFA 4%
- 1 lavado con PBS1x
- Bloquear con Goat serum 5% y 0'5% tritón (en PBS): 1h a RT
- Incubar con anticuerpos primarios diluídos en Goat serum 5% y 0'5% tritón (en PBS):
 - **MBP y NFh:** 1 h a Tamb
 - anti-Myelin basic protein SMI99, 808401 (Biolegend). Dil. **1/300** (mouse)
 - anti-Neurofilament H, AB5539 (Merck) **Dil. 1/500** (chicken)
- 3 lavados con PBS1x
- Incubar 1h con Ac. secundarios diluídos en Goat serum 5% y 0'3% tritón (todos a 1/500) : **GAM488** (NfH) + **GAC594** (MBP)
- 3 lavados con PBS1x
- Montar con Fluoromount

Resultado: Todavía no se ve mielina, pero se ven muy bien las neuronas.

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

01/03/2023

Coating células + transfección Culture slides

18 culture slides:

- 12 Perfil
- 2 LRP4
- 2 LRP4/CASPR2
- 2 NF155/CNTN1

Protocolo:

- Preparar mezclas transfección : cada culture slide (8 pozos)
 - 2 ug DNA + 40 ul Optimem
 - 3,2 ul lipofectamina2000 + 40 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 10 ul de mezcla de transfección a cada pozo

✓ IHC Monkey peripheral nerve (vacunas EM - Resto de muestras H.SantPau)

Muestras: todas son tiempo T3

- | | |
|------------------|--|
| 1. 1806805 (52) | 6. 1347111 (57) |
| 2. 1053831 (53) | 7. 1388963 (58) |
| 3. 10607401 (54) | 8. 1435237 (59) |
| 4. 1090182 (55) | 9. Cpos: 1598702 (B2 box2 primera tanda) |
| 5. 1335436 (56) | 10. Cneg |

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 45min 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 HECHAS (si en la tabla no pone nada, es todo negativo)

Muestra	Mielina fibras pequeñas		Mielina fibras grandes		Cels Schwann amielínicas		Axones fibras pequeñas		Axones fibras grandes		Otros
	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	
1806805 (52)											Fibros IgM
1053831 (53)											repetir
10607401 (54)											
1090182 (55)							1		1		Fibros IgM
1335436 (56)							1		1		
1347111 (57)											
1388963 (58)											
1435237 (59)											

02/03/2023

Cambio medio co-cultivos (d28) : rata 02/02/2023

D28: cambiar el medio por Medio de mielinización co-cultivos nuevo (cambio la mitad del medio) : preparo nuevo ácido ascórbico y nuevos medios porque igual no está funcionando.

- 2 placas y 1 CS : poner Medio de mielinización co-cultivos 1 (base medio C)
- 2 placas y 1 CS : poner Medio de mielinización co-cultivos 2 (base medio NG)

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

06/03/2023

✓ ICC co-cultivos (día 32 - 1)

Cojo 2 cubres de los co-cultivos para ir viendo cómo va la diferenciación (uno de placa medio mielinización 1, y otro de placa medio de mielinización 2)

Protocolo:

- Fijar 20 min con PFA 4%
- 1 lavado con PBS1x
- Bloquear con Goat serum 5% y 0'5% tritón (en PBS): 1h a RT
- Incubar con anticuerpos primarios diluídos en Goat serum 5% y 0'5% tritón (en PBS):
 - **MBP y NFh:** 1 h a Tamb
 - anti-Myelin basic protein SMI99, 808401 (Biolegend). Dil. **1/300** (mouse)
 - anti-Neurofilament H, AB5539 (Merck) **Dil. 1/500** (chicken)
- 3 lavados con PBS1x
- Incubar 1h con Ac. secundarios diluídos en Goat serum 5% y 0'3% tritón (todos a 1/500) : **GAM488** (NFh) + **GAC594** (MBP)
- 3 lavados con PBS1x
- Montar con Fluoromount

Resultado: En el cubre de la placa con medio de mielinización 1 se ve muchísima mielina. En el otro cubre no se ve nada de mielina : pruebo a hacer otra ICC sólo en dos cubres del medio 2 para ver si hay mielina o no.

✓ ICC co-cultivos (día 32 - 2)

Cojo 2 cubres de los co-cultivos para ir viendo cómo va la diferenciación (los dos de la placa con medio mielinización 2)

Protocolo:

- Fijar 20 min con PFA 4%
- 1 lavado con PBS1x
- Bloquear con Goat serum 5% y 0'5% tritón (en PBS): 1h a RT
- Incubar con anticuerpos primarios diluídos en Goat serum 5% y 0'5% tritón (en PBS):
 - **MBP y NFh:** 1 h a Tamb
 - anti-Myelin basic protein SMI99, 808401 (Biolegend). Dil. **1/300** (mouse)
 - anti-Neurofilament H, AB5539 (Merck) **Dil. 1/500** (chicken)
- 3 lavados con PBS1x

- Incubar 1h con Ac. secundarios diluídos en Goat serum 5% y 0'3% tritón (todos a 1/500) : **GAM488** (NfH) + **GAC594** (MBP)
- 3 lavados con PBS1x
- Montar con Fluoromount

Resultado: en uno de los cubres no veo mielina, en el otro se ve poquita y todavía no están los nodos juntos: creo que el medio de mielinización 1 funciona mejor y han mielinizado antes. Mantener unos días más los cubres con medio 2.

Cambio medio co-cultivos (d32) : rata 02/02/2023

D32 : cambiar el medio por Medio de mielinización co-cultivos nuevo (cambio todo el medio)

- 2 placas y 1 CS : poner Medio de mielinización co-cultivos 1 (base medio C)
- 2 placas y 1 CS : poner Medio de mielinización co-cultivos 2 (base medio NG)
- ✓ **Coating y transfección LIF (inmunoabsorción LIF en suspensión)**
 - Coating 2 placas de 100mm (Corning) con Poly-D 1/40 en PBS1x (de stock poly-d 1 mg/ml) : 1h a 37°C (una placa transfectada con LIF y otra con HEKs sin transfectar)
 - Coating HEK293: 2,6 millones cels/placa + 8ml de medio
 - Preparar mezclas transfección:
 - **LIF:** una placa de 100mm (superficie 58cm²)
 - 21 ug DNA LIF + 650 ul Optimem
 - 31 ul lipofectamina2000 + 650 ul Optimem
 - Juntar y dejar reposar mínimo 5 minutos
 - Poner 1,3 ml de mezcla de transfección a la placa

07/03/2023

- ✓ **Inmunoabsorción LIF en suspensión**
 - Permeabilizar 5 min con PBS-tritón 0,3% las dos placas de 100mm plantadas el día anterior (24 horas antes)
 - Recoger células con scrapper y poner cels transfectadas en un eppendorf y cels no transfectadas en otro eppendorf (con 200 ul de PBS1x)
 - Incubar con suero CIDP15 1/100 overnight a 4°C en agitación

*Al permeabilizar sin fijar se me han despegado todas las células y al aspirar el tritón las he perdido todas. REPETIR FIJANDO ANTES!!!

✓ ICC co-cultivos (día 33)

Objetivo: pasar los pacientes positivos que tengamos para ver cómo es el marcaje.

Uso 22 cubres de las placas con medio de mielinización 1:

Muestras:

- | | |
|---|---|
| 1. CIDP15 (GDP1, LIF+) | 12. CIDP18 (ESG, NF155+) |
| 2. CIDP15 (GDP1, LIF+) | 13. CIDP21 (RDP, panNF+) |
| 3. 151-21 (GDP2) | 14. CIDP44 (TMF, CNTN1+) |
| 4. 151-21 (GDP2) | 15. Cneg 21-2-1608 |
| 5. CIDP78 (MRVM 1ª muestra , LIF+
CASPR1+) | 16. Cneg 204-10 |
| 6. CIDP78 (MRVM 1ª muestra
21/11/11 , LIF+ CASPR1+) | 17. Cneg 204-11 |
| 7. 179-06 (MRVM 26/08/15) | 18. CIDP50 (JMG, NF155+) |
| 8. 179-06 (MRVM 26/08/15) | 19. 21-2-94 (X4069 CNTN1+) |
| 9. 22-3-414 Box 295 (Bocanegra 1ª
muestra Plasma, CASPR1+) | 20. CIDP80 (JMSM, NF155+) |
| 10. 23-234205 (Bocanegra 20/02/23
CASPR1neg) | 21. Triple ICC: NFh (antiguo), MBP,
CASPR1 (caspr1 en vivo overnight
1/100) |
| 11. CIDP16 (JCDHM, NF155+) | 22. Tripe ICC:
neurofilament200(nuevo), MBP,
panNF (panNF en vivo overnight
1/100) |

Protocolo:

- Incubar con **suero** 1/100 en medio de mielinización 1 :**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% (1h RT)
 - 1-20: **MBP** anti-Myelin basic protein SMI99, 808401 (Biolegend). Dil. **1/300** (mouse)
 - 21: **MBP y NFh**
 - anti-Myelin basic protein SMI99, 808401 (Biolegend). Dil. **1/300** (mouse)
 - anti-Neurofilament H, AB5539 (Merck) **Dil. 1/500** (chicken)
 - 22: **MBP y NF200**
 - anti-Myelin basic protein SMI99, 808401 (Biolegend). Dil. **1/300** (mouse)

- anti-Neurofilament200, N4142 (Merck). Dil. **1/50** (rabbit)
- 3 lavados con PBS1x
- Incubar 1h con Ac. secundarios diluídos en Goat serum 5% tritón 0'5%(todos a 1/500)
 - 1-20 : **GAH488 IgG** (suero) + **GAM594** (MBP)
 - 21 : **GAM647** (MBP) + **GAC488** (NfH) + **GAR594** (Caspr1)
 - 22 : **GAM647** (MBP) + **GAC488** (panNF) + **GAR594** (NF200)
- 3 lavados con PBS1x
- Montar con Fluoromount

Resultado:

- Prácticamente no se ve la mielina : sin embargo sí que está porque en algunos cubres se ve muy muy débil : algo sucede con la ICC con anti-MBP
- En las ICC triples no se ve nada con el anticuerpo GAM647
- El neurofilament200 se ve mucho peor que el neurofilament H.

✓ **Congelación PBMC (NHC 1570697)**

6 tubos CPT de **Jaume Marcet Lucas (1924022)** : CIDP NF155+ en rebrote : Extraídos y centrifugados día 06/03/2023

- 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:
 - 1570697: 15 millones
- Centrifugar 300g 5min
- Congelar en FBS+10%DMSO:
 - 1570697 : 5 viales de 3 millones cels/vial (1 ml de FBS+DMSO) : **23-7-297 Box PBMC 2 A1-A5**

08/03/2023

Coating Poly-D.Lys (culture slides)

Coating 2 culture slides con Poly-D 1/40 en PBS1x (de stock poly-d 1 mg/ml) : aprox 300 ul por pocillo

*Días 9 y 10 de marzo me pongo enferma y no voy a trabajar!!

Cambio medio co-cultivos (d34) : rata 02/02/2023

D34 : cambiar el medio por Medio de mielinización co-cultivos nuevo (cambio la mitad del medio)

- 1 CS : poner Medio de mielinización co-cultivos 1 (base medio C)
- 2 placas y 1 CS : poner Medio de mielinización co-cultivos 2 (base medio NG)

12/03/2023

Coating células + transfección Culture slides

2 culture slides: NF155 con tag / LRP4 (4 pozos de cada)

Protocolo:

- Preparar mezclas transfección : cada culture slide (8 pozos)
 - 2 ug DNA + 40 ul Optimem
 - 3,2 ul lipofectamina2000 + 40 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 10 ul de mezcla de transfección a cada pozo

Cambio medio co-cultivos (d38) : rata 02/02/2023

D38 : cambiar el medio por Medio de mielinización co-cultivos nuevo (cambio la mitad del medio)

- 1 CS : poner Medio de mielinización co-cultivos 1 (base medio C)
- 2 placas y 1 CS : poner Medio de mielinización co-cultivos 2 (base medio NG)

✓ ICC co-cultivos (día 38)

Cojo 2 cubres de los co-cultivos para ir viendo cómo va la diferenciación (los dos de la placa con medio mielinización 2)

Protocolo:

- Fijar 20 min con PFA 4%
- 1 lavado con PBS1x
- Bloquear con Goat serum 5% y 0'5% tritón (en PBS): 1h a RT
- Incubar con anticuerpos primarios diluïdos en Goat serum 5% y 0'5% tritón (en PBS):
 - **MBP y NFh:** 1 h a Tamb
 - anti-Myelin basic protein SMI99, 808401 (Biolegend). Dil. **1/300** (mouse)
 - anti-Neurofilament H, AB5539 (Merck) **Dil. 1/500** (chicken)
- 3 lavados con PBS1x
- Incubar 1h con Ac. secundarios diluïdos en Goat serum 5% y 0'3% tritón (todos a 1/500) : **GAM488** (NfH) + **GAC594** (MBP)
- 3 lavados con PBS1x
- Montar con Fluoromount

Resultado: Prácticamente no se ve la mielina : sin embargo sí que está porque en algunos cubres se ve muy muy débil : algo sucede con la ICC con anti-MBP

✓ ICC co-cultivos (día 38)

Objetivo: pasar los pacientes positivos que tengamos para ver cómo es el marcaje.

Uso 22 cubres de las placas con medio de mielinización 2:

Muestras:

- | | |
|---|--|
| 1. CIDP15 (GDP1, LIF+) | 9. 22-3-414 Box 295 (Bocanegra 1ª muestra Plasma, CASPR1+) |
| 2. CIDP15 (GDP1, LIF+) | 10. 23-234205 (Bocanegra 20/02/23 CASPR1neg) |
| 3. 151-21 (GDP2) | 11. CIDP16 (JCDHM, NF155+) |
| 4. 151-21 (GDP2) | 12. CIDP18 (ESG, NF155+) |
| 5. CIDP78 (MRVM 1ª muestra , LIF+ CASPR1+) | 13. CIDP21 (RDP, panNF+) |
| 6. CIDP78 (MRVM 1ª muestra 21/11/11 , LIF+ CASPR1+) | 14. CIDP44 (TMF, CNTN1+) |
| 7. 179-06 (MRVM 26/08/15) | 15. Cneg 21-2-1608 |
| 8. 179-06 (MRVM 26/08/15) | 16. Cneg 204-10 |
| | 17. Cneg 204-11 |

- | | |
|---|---|
| <p>18. CIDP50 (JMG, NF155+)</p> <p>19. 21-2-94 (X4069 CNTN1+)</p> <p>20. CIDP80 (JM5M, NF155+)</p> <p>21. Triple ICC: NFh (antiguo), MBP, CASPR1 (caspr1 en vivo overnight 1/100)</p> | <p>22. Tripe ICC:
neurofilament200(nuevo), MBP, panNF (panNF en vivo overnight 1/100)</p> |
|---|---|

Protocolo:

- Incubar con **suero** 1/100 en medio de mielinización 1 : **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 1%**
- Incubar con anticuerpos primarios diluidos en **Goat serum 5% tritón 0'5%** (1h RT)
 - **MBP** anti-Myelin basic protein SMI99, 808401 (Biolegend). Dil. **1/100** (mouse)
- 3 lavados con PBS1x
- Incubar 1h con Ac. secundarios diluidos en Goat serum 5% tritón 0'5%(todos a 1/500)
 - 1-20 : **GAH488 IgG** (suero) + **GAM594** (MBP)
 - 21 : **GAM488** (MBP) + **GAR594** (Caspr1)
 - 22 : **GAM488** (MBP) + **GAC594** (panNF)
- 3 lavados con PBS1x
- Montar con Fluoromount

Resultado: ha salido bien el MBP, aunque es raro que en algunos cubres hay mucha mielina y en otros no hay. **FOTOS CARPETA**

1. CIDP15 (GDP1, LIF+): no hay mielina
2. CIDP15 (GDP1, LIF+): no hay mielina
3. 151-21 (GDP2): negativo
4. 151-21 (GDP2): negativo
5. CIDP78 (MRVM 1ª muestra , LIF+ CASPR1+): no hay mielina
6. CIDP78 (MRVM 1ª muestra 21/11/11 , LIF+ CASPR1+): no hay mielina
7. 179-06 (MRVM 26/08/15): negativo
8. 179-06 (MRVM 26/08/15): negativo

9. 22-3-414 Box 295 (Bocanegra 1ª muestra Plasma, CASPR1+): no hay mielina
10. 23-234205 (Bocanegra 20/02/23 CASPR1neg): parece contaminada. No hay mielina
11. CIDP16 (JCDHM, NF155+): + mielina, + axones
12. CIDP18 (ESG, NF155+): + mielina, + axones
13. CIDP21 (RDP, panNF+): parece contaminada
14. CIDP44 (TMF, CNTN1+): ++ axones, + paranodo??
15. Cneg 21-2-1608: no hay mielina
16. Cneg 204-10: negativo
17. Cneg 204-11: parece contaminada
18. CIDP50 (JMG, NF155+) : no hay mielina
19. 21-2-94 (X4069 CNTN1+): no hay células
20. CIDP80 (JMSM, NF155+): no hay células
21. Triple ICC: NFh (antiguo), MBP, CASPR1 (caspr1 en vivo overnight 1/100): no se ve el Caspr1. No hacer en vivo
22. Tripe ICC: neurofilament200(nuevo), MBP, panNF (panNF en vivo overnight 1/100): no se ven los paranodos y se marcan todos los axones. No hacer en vivo

13/03/2023

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

ELISA NF155 (titulación)

Muestras y resultado: (Quantalyser)

- 23-243904 (06/03/23): título NF155 1/2700
- 22-49965 (22/12/22): título NF155 1/2700
- 22-323877 (14/07/22): título NF155 1/300-1/900

14/03/2023

Coating células + transfección Culture slides

18 culture slides:

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

Protocolo:

- Preparar mezclas transfección : cada culture slide (8 pozos)
 - 2 ug DNA + 40 ul Optimem
 - 3,2 ul lipofectamina2000 + 40 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 10 ul de mezcla de transfección a cada pozo

✓ ICC co-cultivos (día 40)

Objetivo: pasar las pacientes LIF+ (GDP y MRVM) para hacer fotos para el paper de Retrogenix.

Uso 6 cubres de las placas con medio de mielinización 2:

Muestras:

1. CIDP15 (GDP1)
2. CIDP78 (MRVM)
3. CIDP78 (MRVM)
4. Cneg 204-11
5. 151-21 (GDP2)

Protocolo:

- Incubar con **suero** 1/100 en medio de mielinización 1 : **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%** (2h RT)

- **MBP** anti-Myelin basic protein SMI99, 808401 (Biolegend). Dil. **1/100** (mouse)
- 3 lavados con PBS1x
- Incubar 1h con Ac. secundarios diluídos en Goat serum 5% tritón 0'5%(todos a 1/500) : **GAH488 IgG** (suero) + **GAM594** (MBP)
- 3 lavados con PBS1x
- Montar con Fluoromount

Resultado: no hay mielina!!!! Sólo se ve un poco en el cubre 5 (negativo)

✓ ICC co-cultivos (día 40-2)

Objetivo: probar cómo se ven los co-cultivos en culture slides.

Uso 1 culture slide crecido con medio de mielinización 1.

Muestras/anticuerpos:

1. NF200 - MBP
2. NF200 - MBP
3. Caspr1 - MBP
4. panNF – MBP
5. suero CIDP15 (GDP) – MBP
6. suero CIDP78 (MRVM) – MBP
7. LCR GDP – MBP
8. suero Cneg 204-11 - MBP

Protocolo:

- Fijar 20 min con PFA 4%
- 1 lavado con PBS1x
- Bloquear 30 min con **Goat serum 5% tritón 0,5%**
- Incubar con anticuerpos primarios o suero diluídos en Goat serum 5% tritón 0'5%
 - 1-2:
 - **NF200:** anti-Neurofilament200, N4142 (Merck). Dil. **1/50** (rabbit) : 1h RT
 - **MBP** anti-Myelin basic protein SMI99, 808401 (Biolegend). Dil. **1/100** (mouse) : 1h RT
 - 3:
 - **Caspr1:** anti-Caspr1, abcam. Dil. **1/100** (rabbit) : 1h RT
 - **MBP** anti-Myelin basic protein SMI99, 808401 (Biolegend). Dil. **1/100** (mouse) : 1h RT

- 4:
 - **panNF**: anti-panNeurofascin. Dil. 1/100 (chicken) : 1h RT
 - **MBP** anti-Myelin basic protein SMI99, 808401 (Biolegend). Dil. **1/100** (mouse) : 1h RT
- 5-8:
 - Sueros dil. 1/60 o LCR dil. 1/100 : 1h RT
 - **MBP** anti-Myelin basic protein SMI99, 808401 (Biolegend). Dil. **1/100** (mouse) : 1h RT
- 3 lavados con PBS1x
- Incubar 1h con Ac. secundarios diluídos en Goat serum 5% tritón 0'5%(todos a 1/500)
 - 1-2: **GAR488** (NF200) + **GAM594** (MBP)
 - 3: **GAR488** (Caspr1) + **GAM594** (MBP)
 - 4: **GAC488** (panNF) + **GAM594** (MBP)
 - 5-8: **GAH488 IgG** (suero) + **GAM594** (MBP)
- 3 lavados con PBS1x
- Montar con Fluoromount

Resultado: en general hay demasiadas células y no hay mielina... El anticuerpo NF200 nuevo funciona bien, aunque sigue funcionando mucho mejor el NfH chicken.

15/03/2023

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

23/03/2023

✓ Co-cultivo de neuronas DRG i células de Schwann (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%)
- 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

Co-cultivos

- 4 placas de 24wells con 1 cubre de 12mm en cada pozo, y 6 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 medium) 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
- **Poner un DRG en cada pozo/cubre e incubar a 37°C**
- D3 : cambiar el medio (poner **medio NG**) 500 ul/pozo
 - 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
- D5 : **cambiar el medio (poner medio NG nuevo)** : cambio 250 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)
 - 0,5 uM Forskolin: 1,5ul del stock 10mM (1/20000 en el medio)
- D8 : cambiar el medio (poner medio de mielinización nuevo) : a partir de aquí ir cambiando un día sí uno no (cada 2 días).

26/03/2023

Cambio medio co-cultivos (d3) : rata 23/03/2023

- D3 : cambiar el medio (poner **medio NG**) 500 ul/pozo
 - 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

27/03/2023

✓ **ELISA NF155 (titulación IMM)**

Muestras: (Quantalyser)

- **22-2-1176:** Víctor González González 20/12/2022 (sólo llega por recerca, muestra justo pre-Rituximab) : titulación NF155 IgG totales
- **23-253278:** Víctor González González 20/03/2023 : titulación NF155 IgG totales
- **23-251182:** muestra nueva NF155+ : titulación IgG totales y subclases NF155

Resultado:

- **22-2-1176** : título NF155
- **23-253278** : título NF155 Título NF155 1/900 (IgG totales). Títulos ligeramente inferiores a muestra 20/12/2022 (repetido: título 1/2700).
- **23-251182** : título NF155 Título de NF155 1/8100 (IgG totales). Subclase predominante: IgG4

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 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

28/03/2023

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 ug DNA + 40 ul Optimem
 - 3,2 ul lipofectamina2000 + 40 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 10 ul de mezcla de transfección a cada pozo

Coating células + transfección Culture slides

6 culture slides : doble LGI4/ADAMS22

Protocolo:

- Preparar mezclas transfección : cada culture slide (8 pozos)
 - 2 ug DNA (1ug LGI4 + 1 ug ADAMS22) + 40 ul Optimem
 - 3,2 ul lipofectamina2000 + 40 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 10 ul de mezcla de transfección a cada pozo

Cambio medio co-cultivos (d5) : rata 23/03/2023

- D4 : cambiar el medio (poner medio NG nuevo) : cambio 250 ul (la mitad)

29/03/2023

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

31/03/2023

Cambio medio co-cultivos (d8) : rata 23/03/2023

D8 : cambiar el medio por **Medio de mielinización co-cultivos** (500 ul/pozo):

- Medio C: 50 ml
 - DMEM (con D-glucosa y Glutamax): 44,5 ml
 - 10% FBS: 5 ml

- 1% Pen-Str: 0,5ml
- 50 ng/ml NGF: 25 ul
- 50 ug/ml de ácido ascórbico: 500 ul del stock 5mg/ml (1/100 en el medio)
- 0,5 uM Forskolin: 2,5ul del stock 10mM (1/20000 en el medio)

03/04/2023

Cambio medio co-cultivos (d11) : rata 23/03/2023

D11 : cambiar la mitad del medio por **Medio de mielinización co-cultivos** nuevo (250 ul/pozo)

04/04/2023

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

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

05/04/2023

Coating células + transfección Culture slides

12 culture slides:

- 10 Perfil
- 2 NF155/CNTN1

Protocolo:

- Preparar mezclas transfección : cada culture slide (8 pozos)
 - 2 ug DNA + 40 ul Optimem
 - 3,2 ul lipofectamina2000 + 40 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 10 ul de mezcla de transfección a cada pozo

Coating células + transfección Culture slides

6 culture slides : doble LGI4/ADAMS22

Protocolo:

- Preparar mezclas transfección : cada culture slide (8 pozos)
 - 2 ug DNA (1ug LGI4 + 1 ug ADAMS22) + 40 ul Optimem
 - 3,2 ul lipofectamina2000 + 40 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 10 ul de mezcla de transfección a cada pozo

06/04/2023

Cambio medio co-cultivos (d14) : rata 23/03/2023

D14 : cambiar todo el medio por **Medio de mielinización co-cultivos** nuevo (500 ul/pozo)

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

11/04/2023

Cambio medio co-cultivos (d19) : rata 23/03/2023

D19: cambiar todo el medio por **Medio de mielinización co-cultivos** nuevo (500 ul/pozo)

Coating Poly-D.Lys (culture slides)

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

12/04/2023

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 ug DNA + 40 ul Optimem
 - 3,2 ul lipofectamina2000 + 40 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 10 ul de mezcla de transfección a cada pozo

13/04/2023

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

14/04/2023

Cambio medio co-cultivos (d22) : rata 23/03/2023

D22 : cambiar todo el medio por **Medio de mielinización co-cultivos** nuevo (500 ul/pozo)

17/04/2023

Cambio medio co-cultivos (d25) : rata 23/03/2023

D25 : cambiar todo el medio por **Medio de mielinización co-cultivos** nuevo (500 ul/pozo)

✓ ICC co-cultivos (día 25 - rata 23/03/2023)

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

Protocolo:

- Fijar 20 min con PFA 4%
- 1 lavado con PBS1x
- Bloquear con Goat serum 5% y 0'5% tritón (en PBS): 1h a RT
- Incubar con anticuerpos primarios diluïdos en Goat serum 5% y 0'5% tritón (en PBS):
 - **MBP y NF200:** 1 h a Tamb
 - **MBP:** anti-Myelin basic protein SMI99, 808401 (Biolegend). Dil. **1/100** (mouse)
 - **NF200:** anti-Neurofilament200, N4142 (Merck). Dil. **1/50** (rabbit)
- 3 lavados con PBS1x
- Incubar 1h con Ac. secundarios diluïdos en Goat serum 5% y 0'5% tritón (todos a 1/500) : **GAR488** (Nf200) + **GAM594** (MBP)
- 3 lavados con PBS1x
- Montar con Fluoromount

Resultado: se ve un poco de mielina pero todavïa demasiado poca.

19/04/2023

✓ Extracción GRD ratones

Extraemos ganglios raquídeos dorsales de ratones adultos:

- Cortar hasta dejar sólo la parte medular
- Introducir unas tijeras por el agujero de la médula y cortar para ir abriendo la columna
- Estirar de las raíces para extraer los ganglios
- Se hacen varias condiciones de fijació:
 1. PFA 2% 1h + Sucrosa 30% 24h
 2. PFA 2% 1h + sucrosa 30% 24h (antes del PFA estuvo un rato en sucrosa sin querer)
 3. Formalina 10% 1h + sucrosa 30% 24h
 4. PFA 4% 1h + sucrosa 30% 24h (contiene una raíz grande)
 5. PFA 2% 1h (sin sucrosa)
 6. PFA 4% 1h (sin sucrosa)
 7. Formalina 10% 1h (sin sucrosa)

- Congelar en metilbutano y nitrógeno
- Pasar directamente al criostato
- Un rato después, desmoldar cada uno de los “bloques” de OCT, poner en un eppendorf y congelar a -80°C

20/04/2023

Coating ELISA CASPR1 y CNTN1

[CASPR1]_i = 0,789 mg/ml

[CNTN1]_i = 0,25 mg/ml

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

- CASPR1: 48 pozos (una placa) : [CASPR1]_f = 5 ug/ml : 2,5 ml buffer + 15'8 ul
- CNTN1: 48 pozos (una placa) : [CNTN1]_f = 1 ug/ml : 2,5 ml buffer + 10 ul

21/04/2023

Cambio medio co-cultivos (d29) : rata 23/03/2023

D29 : cambiar todo el medio por **Medio de mielinización co-cultivos** nuevo (500 ul/pozo)

24/04/2023

Cambio medio co-cultivos (d32) : rata 23/03/2023

D32 : cambiar la mitad del medio por **Medio de mielinización co-cultivos** nuevo (250 ul/pozo)

✓ ICC co-cultivos (día 32 - rata 23/03/2023)

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

Protocolo:

- Fijar 20 min con PFA 4%
- 1 lavado con PBS1x
- Bloquear con Goat serum 5% y 0'5% tritón (en PBS): 1h a RT
- Incubar con anticuerpos primarios diluídos en Goat serum 5% y 0'5% tritón (en PBS):
 - **MBP y NF200:** 1 h a Tamb
 - **MBP:** anti-Myelin basic protein SMI99, 808401 (Biolegend). Dil. **1/100** (mouse)
 - **NF200:** anti-Neurofilament200, N4142 (Merck). Dil. **1/50** (rabbit)

- 3 lavados con PBS1x
- Incubar 1h con Ac. secundarios diluïdos en Goat serum 5% y 0'5% tritón (todos a 1/500) : **GAR488** (Nf200) + **GAM594** (MBP)
- 3 lavados con PBS1x
- Montar con Fluoromount

Resultado: no se ve mielina!!!

✓ ICC Perfil nodales/paranodales (BD)

Muestras y resultado: 3 portas perfil

1. 23-2-480 Box 328 : neg
2. 23-2-493 Box 329 : neg
3. 23-2-502 Box 329 : neg
4. 23-2-503 Box 329 : neg
5. 23-2-509 Box 329 : neg

✓ ELISA CASPR1 (screening BD)

Muestras y resultado:

1. 23-2-493 Box 329 : neg
2. 23-2-502 Box 329 : neg
3. 23-2-503 Box 329 : neg
4. 23-2-509 Box 329 : 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

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	Cneg	23-2-503										
B blanc	Cneg	23-2-503										
C prot	Cpos CASPR1	23-2-509										
D blanc	Cpos CASPR1	23-2-509										
E prot	23-2-493											
F blanc	23-2-493											
G prot	23-2-502											
Hblanc	23-2-502											

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	0,032	0,039										
B blanc	0,051	0,157										
C prot	0,686	0,031										
D blanc	0,073	0,056										
E prot	0,043	0										
F blanc	0,102	0										
G prot	0,043	0										
Hblanc	0,108	0										

IHC Monkey peripheral nerve (vacunas EM - Resto de muestras H.SantPau)

Muestras: todas son tiempo T3

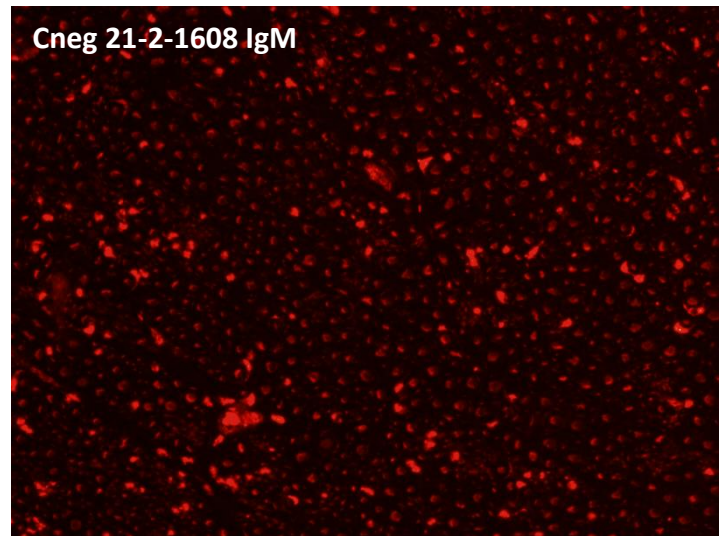
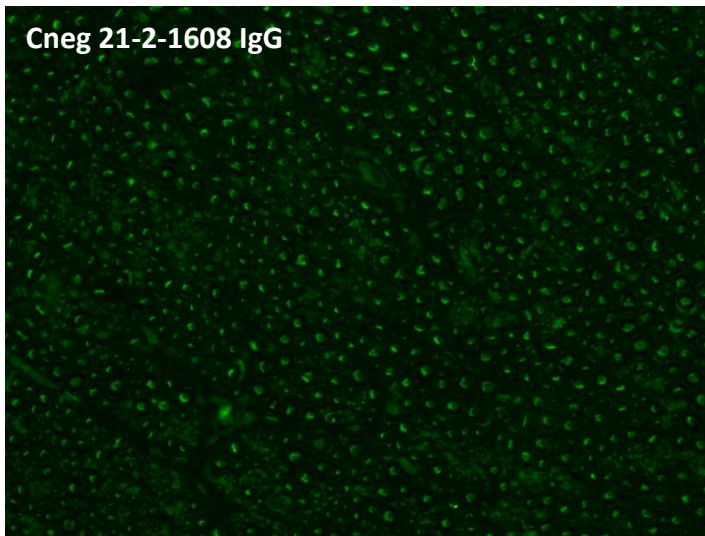
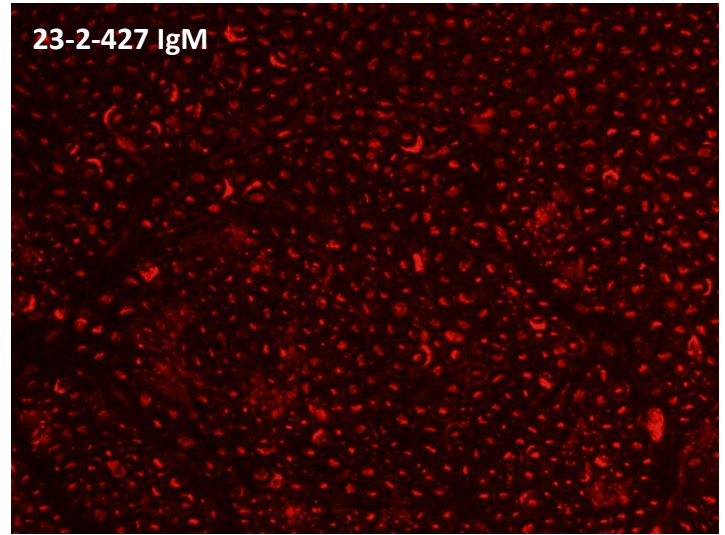
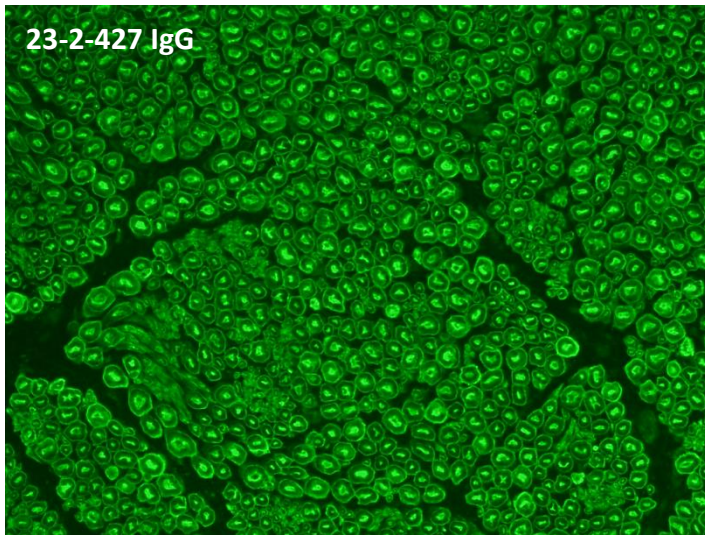
- | | |
|------------------|---|
| 1. 1460652 (60) | 14. 229342 (73) |
| 2. 1492808 (61) | 15. 352797 (74) |
| 3. 1496265 (62) | 16. 379372 (75) |
| 4. 1502610 (63) | 17. 47690 (76) |
| 5. 1518208 (64) | 18. 532468 (77) |
| 6. 1555633 (65) | 19. 616940 (78) |
| 7. 157282 (66) | 20. 66440 (79) |
| 8. 1614932 (67) | 21. 837590 (80) |
| 9. 1668530 (68) | 22. 896114 (81) |
| 10. 1730429 (69) | 23. 23-2-427 Box 327 |
| 11. 1744031 (70) | 24. Cpos: 1598702 (B2 box2 primera tanda) |
| 12. 1797029 (71) | 25. Cneg 21-2-1608 |
| 13. 1820271 (72) | |

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 45min 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: (si en la tabla no pone nada, todo es negativo)

Muestra	Mielina fibras pequeñas		Mielina fibras grandes		Cels Schwann amielínicas		Axones fibras pequeñas		Axones fibras grandes		Otros
	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	
1460652 (60)											Fibros IgG, IgM
1492808 (61)											Fibros IgG, IgM
1496265 (62)					2						Fibros IgM
1502610 (63)					2						
1518208 (64)											Fibros IgM
1555633 (65)											Fibros IgG, IgM
157282 (66)											Fibros IgM
1614932 (67)											
1668530 (68)	2		2								
1730429 (69)							1		1		Fibros IgM
1744031 (70)											
1797029 (71)											
1820271 (72)							1	2	1	2	
229342 (73)											
352797 (74)											
379372 (75)		2		2							Fibros IgG, IgM
47690 (76)											
532468 (77)											
616940 (78)											
66440 (79)											
837590 (80)							2	2	2	2	
896114 (81)					1			2		2	
23-2-427 Box 327		3		3							FOTO



25/04/2023

ELISA CASPR1 (titulación)

Muestras y resultado: (Quantalyser, IgG totales)

- 23-267498 (NHC E2115082): negativo (revisar muestras testadas la semana anterior, falso positivo)

✓ ELISA CNTN1 (titulación)

Muestras y resultado: (Quantalyser, IgG totales)

- 23-264159 (NHC E2115047, 13/04/2023): título CNTN1 1/8100
- 23-267572 (NHC E2115129, 19/04/2023): título CNTN1 1/8100

✓ ELISA CNTN1 (subclases)

Muestras y resultado: (manual)

- 23-264159 (NHC E2115047, 13/04/2023): repetir subclases, no han salido bien
- 23-267572 (NHC E2115129, 19/04/2023): subclase CNTN1 predominante IgG4

26/04/2023

Coating ELISA NF155

[NF155]_i = 0,505 mg/ml

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

- NF155: 48 pozos (una placa) : [NF155]_f = 5 ug/ml : 2,5 ml buffer + 5 ul

27/04/2023

✓ ELISA titulación NF155

Muestras y resultado: Víctor González González NHC 1843661 (título todas sus muestras con IgG4 para la comunicación oral de Elyonor)

1. 19-230 (2019-376530, 29/11/2019) : 1/2700
2. 20-2-322 (2020-335426, 14/09/2020) : 1/2700
3. 21-2-1207 (recerca, 06/05/2021) : 1/100
4. 22-2-458 (2021-348444, 06/09/2021) : negativo
5. 22-2-483 (2022-246471, 14/03/2022) : 1/100
6. 23-2-133 (2022-395541, 14/11/2022) : 1/2700
7. 22-2-1176 (recerca, 20/12/2022) : 1/2700
8. 23-2-415 (2023-253278, 20/03/2023) : 1/300

28/04/2023

✓ ICC co-cultivos (día 36 - rata 23/03/2023)

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

Protocolo:

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

- Incubar con anticuerpos primarios diluídos en Goat serum 5% y 0'5% tritón (en PBS):
 - **MBP y NF200:** 1 h a Tamb
 - **MBP:** anti-Myelin basic protein SMI99, 808401 (Biolegend). Dil. **1/100** (mouse)
 - **NF200:** anti-Neurofilament200, N4142 (Merck). Dil. **1/50** (rabbit)
- 3 lavados con PBS1x
- Incubar 1h con Ac. secundarios diluídos en Goat serum 5% y 0'5% tritón (todos a 1/500) :
 - 1: **GAR488** (Nf200) + **GAM594** (MBP)
 - 2: **GAR594** (Nf200) + **GAM488** (MBP)
- 3 lavados con PBS1x
- Montar con Fluoromount

Resultado: no se ve mielina, aunque las neuronas se ven muy bien. Probar ICC overnight, probar per meabilizando más, y testar con suero LIF+ para saber si realmente no hay mielina o es que no funciona el anti-MBP.

Cambio medio co-cultivos (d36) : rata 23/03/2023

D36 : cambiar la mitad del medio por **Medio de mielinización co-cultivos** nuevo (250 ul/pozo)

02/05/2023

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 40 - rata 23/03/2023)

Cojo 3 cubres de los co-cultivos para ir viendo cómo va la diferenciación

Protocolo cubre 1:

- Fijar 20 min con PFA 4%
- 1 lavado con PBS1x
- Bloquear con Goat serum 5% y 0'5% tritón (en PBS): 1h a RT
- Incubar con anticuerpos primarios diluídos en Goat serum 5% y 0'5% tritón (en PBS):
 - **MBP y NF200:** 1 h a Tamb
 - **MBP:** anti-Myelin basic protein SMI99, 808401 (Biolegend). Dil. **1/100** (mouse)

- **NF200:** anti-Neurofilament200, N4142 (Merck). Dil. **1/50** (rabbit)
- 3 lavados con PBS1x
- Incubar 1h con Ac. secundarios diluídos en Goat serum 5% y 0'5% tritón (todos a 1/500) : **GAR488** (Nf200) + **GAM594** (MBP)
- 3 lavados con PBS1x
- Montar con Fluoromount

Protocolo cubres 2 y 3:

- Incubar con **suero** 1/100 en medio de mielinización : 1h 37°C
 - Suero LIF+ (GDP)
 - Suero CNTN1+ (AL)
- 1 lavado con PBS1x
- Fijar 20 min con PFA 4%
- 1 lavado con PBS1x
- Bloquear con Goat serum 5% y 0'5% tritón (en PBS): 1h a RT
- Incubar con anticuerpos primarios diluídos en Goat serum 5% y 0'5% tritón (en PBS):
 - **MBP:** 1 h a Tamb
 - **MBP:** anti-Myelin basic protein SMI99, 808401 (Biolegend). Dil. **1/100** (mouse)
- 3 lavados con PBS1x
- Incubar 1h con Ac. secundarios diluídos en Goat serum 5% y 0'5% tritón (todos a 1/500) : **GAH488** (suero) + **GAM594** (MBP)
- 3 lavados con PBS1x
- Montar con Fluoromount

Resultado: no se ve mielina, aunque las neuronas se ven muy bien tanto con NF200 como con el suero CNTN1+.

✓ [ICC co-cultivos 2 \(día 40 - rata 23/03/2023\)](#)

Cojo 1 culture slide de co-cultivos para ir viendo cómo va la diferenciación.

Protocolo:

- Fijar 20 min con PFA 4%
- 1 lavado con PBS1x
- Bloquear con Goat serum 5% y 0'3% tritón (en PBS): 1h a RT
 - Pozo 6: rabbit serum 1/40 y 0,3% tritón

- Incubar con anticuerpos primarios diluídos en Goat serum 5% y 0'3% tritón (en PBS):
 - **1) MBP y NF200**
 - anti-Myelin basic protein SMI99, 808401 (Biolegend). Dil. **1/100** (mouse): overnight 4°C
 - anti-Neurofilament200, N4142 (Merck). Dil. **1/100** (rabbit): 2 h RT
 - **2) MBP (Genetex) y NF200:**
 - anti-Myelin basic protein GTX 11159 (Genetex) Dil. **1/100** (mouse): overnight 4°C
 - anti-Neurofilament200, N4142 (Merck). Dil. **1/100** (rabbit): 2 h RT
 - **3) S100 y panNF**
 - anti-S100, ab52642 (abcam). Dil. **1/100** (rabbit): overnight 4°C
 - anti-panNeurofascin, AF3235 (R&D systems). Dil.**1/200** (chicken): 2h RT
 - **4) MBP y suero LIF+**
 - anti-Myelin basic protein SMI99, 808401 (Biolegend). Dil. **1/100** (mouse): overnight 4°C
 - suero LIF+ dil **1/100**: 2h RT
 - **5) NF155**
 - anti-NF155, 15035 (Cell signalling). Dil. **1/100** (rabbit): overnight 4°C
 - **6) CNTN1**
 - Anti-CNTN1 AF904 (R&D systems). Dil.**1/100** (goat): overnight 4°C
- 3 lavados con PBS1x
- Incubar 1h con Ac. secundarios diluídos en Goat serum 5% y 0'3% tritón (todos a 1/500)
 - 1) GAM594 (MBP) + GAR488 (NF200)
 - 2) GAM488 (MBP) + GAR594 (NF200)
 - 3) GAR488 (S100) + GAC594 (panNF)
 - 4) GAM594 (MPB) + GAH488 IgG (suero)
 - 5) GAR488 (NF155)
 - 6) RAG488 (CNTN1)
- 3 lavados con PBS1x
- Montar con Fluoromount

Resultado: no veo nada interesante... no se ve mielina

Cambio medio co-cultivos (d40) : rata 23/03/2023

D40: cambiar la mitad del medio por **Medio de mielinización co-cultivos** nuevo (250 ul/pozo)

03/05/2023

Coating células + transfección Culture slides

18 culture slides:

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

Protocolo:

- Preparar mezclas transfección cada culture slide (8 pozos)
 - 2 ug DNA + 40 ul Optimem
 - 3,2 ul lipofectamina2000 + 40 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 10 ul de mezcla de transfección a cada pozo

✓ ELISA NF140, NF155 y NF186 (titulación y subclases)

Muestras y resultado: (manual)

- 23-271685 (NHC E2115226, Emilio Llaveró Rengel): título NF155 1/900 (IgG totales), no salen subclases

*Se hace la titulación y subclases con NF155, NF140 y NF186 : sólo sale la titulación con NF155, repetir todo!

04/05/2023

Cambio medio co-cultivos (d42) : rata 23/03/2023

D42: cambiar todo el medio por **Medio de mielinización co-cultivos** nuevo (500 ul/pozo)

08/05/2023

Cambio medio co-cultivos (d46) : rata 23/03/2023

D46: cambiar todo el medio por **Medio de mielinización co-cultivos** nuevo (500 ul/pozo) (ROSI)

Del 05/05/2023 al 10/05/2023 estoy de vacaciones

11/05/2023

✓ **Co-cultivo de neuronas DRG i células de Schwann (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%)
- 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.
 - En este caso pongo 4 embriones en un tubo de 15 con 10 ml de MACS Tissue Storage Solution (130-100-008, Milteny) : lo dejo en horizontal en la nevera, para que cubra todos los embriones y se mantengan bien los tejidos.
- 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

Co-cultivos

- **3 placas de 24wells con 1 cubre de 12mm en cada pozo, 6 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 medium) 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
- Poner un DRG en cada pozo/cubre e incubar a 37°C
- D1: cambiar la mitad del medio (medio C): 200 ul/pozo
- D4 : cambiar el medio (poner **medio NG**) 400 ul/pozo
 - 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
- 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)
- D8: cambiar mitad del medio de mielinización: a partir de aquí ir cambiando un día sí uno no (cada 2 días).

Neuronas DRG

- **3 placas de 60cc con cubres:**
 - 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
- **Por la tarde saco los ganglios de los 4 embriones que había dejado en Tissue storage solution (tienen muy buena consistencia!!!)**
- Pasar los DRG a un tubo de 15 ml : con pipeta Pasteur de cristal y tetina
- Centrifugar a 300 rpm 5 min
- Eliminar el sobrenadante (con pasteur cristal+ tetina) e ir tirando a una placa, para no perder ningún DRG.
- Poner 5 ml de PBS1x y centrifugar a 300 rpm 5 min
- Eliminar el sobrenadante y añadir 4,5 ml PBS + 500 ul de tripsina 2,5% sin bromophenol
- Incubar 15min a 37°C (en el baño). Homogeneizar suavemente cada 5 minutos.
- Añadir 5 ml de medio L15 con FBS para inactivar la tripsina
- Centrifugar a 300 rpm 10min
- Pasar el pellet a un eppendorf con 1 ml de medio NG, disgregar con pipetas Pasteur de vidrio finas (se hacen finas con el bunsen y se autoclavan).

Medio NG:

- 48 ml de medio Neurobasal
- 1 ml de suplement B27
- 500 µl de glutamax
- 500 µl de Pen-Str
- 25 µl de NGF
- Dividir el ml de células entre las 3 placas.
- D1: cambiar la mitad de medio por **medio NGF**
 - 50 ml de medio NG
 - 10 µl de 5-fluorodesoxiuridina (1)
 - 10 µl de uridina (2)
 - 5 µl de AraC 10 mM
- D4: cambiar la mitad de medio por medio NG : a partir de aquí ir cambiando un día sí uno no (cada 2 días).

Neuronas medulares

- **1 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
- Voy poniendo algunas médulas (sin DRG) en una placa de L15.
- Corto las médulas a trozos muy pequeños con las tijeras pequeñas
- Pongo un trozo de médula en cada pozo con cubre.
- Mantengo exactamente igual que los co-cultivos (mismos medios)

12/05/2023

Cambio medio co-cultivos, neuronas DRG, médula (d1) : rata 11/05/2023

- Co-cultivos y médula : D1: cambiar la mitad del medio (medio C): 200 ul/pozo
- Neuronas DRG : D1: cambiar la mitad de medio por **medio NGF**
 - 50 ml de medio NG
 - 10 µl de 5-fluorodesoxiuridina (1)
 - 10 µl de uridina (2)
 - 5 µl de AraC 10 mM

Cambio medio co-cultivos (d50) : rata 23/03/2023

D46: cambiar todo el medio por **Medio de mielinización co-cultivos** nuevo (500 ul/pozo)

✓ ICC co-cultivos (día 50 - rata 23/03/2023)

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

Protocolo:

- Fijar 20 min con PFA 4%
- 1 lavado con PBS1x
- Bloquear con Goat serum 5% y 0'5% tritón (en PBS): 1h a RT
- Incubar con anticuerpos primarios diluïdos en Goat serum 5% y 0'5% tritón (en PBS):
 - **MBP y NF200: 1 h a Tamb**
 - **MBP:** anti-Myelin basic protein SMI99, 808401 (Biolegend). Dil. **1/100** (mouse)

- **NF200**: anti-Neurofilament200, N4142 (Merck). Dil. **1/50** (rabbit)
- 3 lavados con PBS1x
- Incubar 1h con Ac. secundarios diluídos en Goat serum 5% y 0'5% tritón (todos a 1/500) : **GAR488** (Nf200) + **GAM594** (MBP)
- 3 lavados con PBS1x
- Montar con Fluoromount

Resultado: no se ve mielina!!!

15/05/2023

Cambio medio co-cultivos, neuronas DRG, médula (d4) : rata 11/05/2023

- Co-cultivos y médula : D4: cambiar el medio (poner **medio mielinización**) 500 ul/pozo
 - 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
- Neuronas DRG : D4: cambiar la mitad de medio por **medio NG**

✓ ICC co-cultivos (día 53 - rata 23/03/2023)

Cojo 1 culture slide de co-cultivos para ir viendo cómo va la diferenciación.

Protocolo:

- 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):
 - **1 y 2) MBP y NF200**
 - anti-Myelin basic protein SMI99, 808401 (Biolegend). Dil. **1/60** (mouse): overnight 4°C
 - anti-Neurofilament200, N4142 (Merck). Dil. **1/60** (rabbit): 2 h RT
 - **3 y 4) NF200 y MBP**
 - anti-Neurofilament200, N4142 (Merck). Dil. **1/60** (rabbit): overnight 4°C

- anti-Myelin basic protein SMI99, 808401 (Biolegend). Dil. **1/60** (mouse): 2h a RT
- **5) suero CNTN1+:** dil **1/75:** overnight 4°C
- **6) suero LIF+:** dil **1/75:** overnight 4°C
- **7 y 8) suero Caspr1+:** dil **1/75:** overnight 4°C
- 3 lavados con PBS1x
- Día siguiente: Incubar 1h con Ac. secundarios diluïdos en Goat serum 5% y 0'3% tritón (todos a 1/500)
 - 1) GAM488 (MBP) + GAR594 (NF200)
 - 2) GAM594 (MBP) + GAR488 (NF200)
 - 3) GAM488 (MBP) + GAR594 (NF200)
 - 4) GAM594 (MBP) + GAR488 (NF200)
 - 5-8) GAH 488 IgG
- 3 lavados con PBS1x
- Montar con Fluoromount

Resultado: no veo nada interesante... no se ve mielina

16/05/2023

✓ Congelación PBMC (NHC 1570697)

6 tubos CPT de **Antonio García Gómez (1811055)**: CIDP. Extraïdos, centrifugados y células congeladas el mismo día.

- Centrifugar 20min a 1650g sin freno a 18-25°C
- Invertir los tubos para resuspender las células en el plasma
- Decantar el sobrenadante a un tubo y lavar con suero fisiológico 1:1
- Centrifugar 300g 5min
- Resuspender en PBS1x y contar las células:
 - 1811055: 17 millones
- Centrifugar 300g 5min
- Congelar en FBS+10%DMSO:
 - 1811055 : 6 viales de aprox 3 millones cels/vial (1 ml de FBS+DMSO) : **23-7-568**
Box PBMC 2 A6-B2

18/05/2023

Cambio medio co-cultivos, neuronas DRG, médula (d7) : rata 11/05/2023

- Co-cultivos y médula : D7: cambiar el medio (poner **medio mielinización**) 500 ul/pozo
 - Medio C: 50 ml
 - 50 ug/ml de ácido ascórbico: 500 ul del stock 5mg/ml (1/100 en el medio)
 - 0,5 uM Forskolin: 2,5ul del stock 10mM (1/20000 en el medio)
- Neuronas DRG : D7: cambiar la mitad de medio por **medio NG**

✓ **ICC co-cultivos (dia 56) y neuronas DRG (dia 7)**

Cojo 3 cubres de co-cultivos rata 23/03, y 3 cubres de neuronas DRG rata 11/05 : testar en co-cultivos el paciente Juan Pablo Lugo (20-2-632), porque tiene mucho marcaje en neuronas DRG normales.

Protocolo:

- Incubar con **suero** 1/100 en medio NG: 1h 37°C
 1. 20-2-632
 2. CNTN1+
 3. Cneg
- 1 lavado con PBS1x
- Fijar 15 min con PFA 4%
- 1 lavado con PBS1x
- Incubar 1h con GAH488 IgG diluído 1/500 en Goat serum 5%
- 3 lavados con PBS1x
- Montar con Fluoromount

Resultado:

- Neuronas DRG: En el cubre de neuronas DRG de 20-2-632 justo no se ven neuronas. En el cubre CNTN1+ se ven muy bien las neuronas.
- Co-cultivos: no se ven especialmente positivas las neuronas en el paciente 20-2-632, y el control negativo también parece positivo : testar más controles negativos.

19/05/2023

Cambio medio co-cultivos, neuronas DRG, médula (d8) : rata 11/05/2023

- Co-cultivos y médula : D8: cambiar la mitad del medio (**medio mielinización**)

- Neuronas DRG : D7: cambiar la mitad de medio por **medio NG**

✓ ICC co-cultivos (día 57 - rata 23/03/2023)

Cojo algunos cubres de los co-cultivos sólo para ver cómo se ven los controles negativos y algunos controles positivos (el resto de cubres que queden los tiro)

Protocolo:

- Incubar con **suero** 1/100 en medio C: 1h 37°C (sueros 1-12 Cneg)
 - 206-06
 - 206-07
 - 207-02
 - 217-25
 - 217-26
 - 217-27
 - 217-28
 - 217-32
 - 217-33
 - 204-7
 - 220-21
 - 220-22
 - NF155+ (212-14)
 - panNF+
 - CNTN1+ (1) 21-2-94
 - CNTN1+ (2) 22-2-854
 - Caspr1+ 136-8
 - LIF+
 - 20-2-632 (en teoría positivo por neuronas DRG)
 - 20-2-632
- 1 lavado con PBS1x
- Fijar 15 min con PFA 4%
- 1 lavado con PBS1x
- Incubar 1h con GAH488 IgG diluído 1/750 en Goat serum 5%
- 3 lavados con PBS1x
- Montar con Fluoromount

Resultado:

- 206-06: neg
- 206-07: neg
- 207-02: neg
- 217-25: neg
- 217-26: neg
- 217-27: neg
- 217-28: neg
- 217-32: neg
- 217-33: neg
- 204-7: neg
- 220-21: neg
- 220-22: neg
- NF155+ (212-14) : neg
- panNF+: neg

- CNTN1+ (1) 21-2-94: neuronas + +
- CNTN1+ (2) 22-2-854: neuronas + + +
- Caspr1+ 136-8: neuronas +
- LIF+: no había cubre
- 20-2-632: casi no se ve marcaje
- 20-2-632: casi no se ve marcaje

22/05/2023

Cambio medio co-cultivos, neuronas DRG, médula (d11) : rata 11/05/2023

- Co-cultivos y médula : D11: cambiar la mitad del medio (**medio mielinización**)
- Neuronas DRG : D11: cambiar la mitad de medio por **medio NG**
- ✓ **Coating Células Schwann primarios**
- Planto 500.000 cels en 2 placas 60cc con neuronas DRG ya crecidas (para hacer co-cultivos)
- Las deixo en medio NG, mañana cambiaré el medio y pondré el de mielinización de co-cultivos.
- Congelo 1 vial con 1 millón de células

✓ **Congelación PBMC (NHC 1879777)**

6 tubos CPT de **Pedro Brio Llop (1879777)**: Extraídos, centrifugados y células congeladas el mismo día.

- Centrifugar 20min a 1650g sin freno a 18-25°C
- Invertir los tubos para resuspender las células en el plasma
- Decantar el sobrenadante a un tubo y lavar con suero fisiológico 1:1
- Centrifugar 300g 5min
- Resuspender en PBS1x y contar las células:
 - 1879777: 65 millones
- Centrifugar 300g 5min
- Congelar en FBS+10%DMSO:
 - 1879777 : 11 viales de aprox 6 millones cels/vial (1 ml de FBS+DMSO) : **23-7-583 Box PBMC 2 B3-C3**

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

23/05/2023

✓ IHC Monkey sciatic nerve (prueba nuevos slides!!)

Muestras: 4 slides

- | | |
|--------------------------------------|--|
| 1. Caja HNK – 2 (Disialosil) | 9. Zika 004 (CS amielínicas IgG y IgM) |
| 2. Caja HNK – 3 (MAG) | 10. 206-04 (ELA, CS amielínicas IgG) |
| 3. Caja HNK – 34 (MAG títulos bajos) | 11. CNTN1+ |
| 4. Caja HNK – 36 (Sulfátidos) | 12. NF155+ |
| 5. Caja HNK – 43 (Mielina IgM) | 13. Cneg 198-03 |
| 6. 1598702 EM vacunas (mielina IgG) | 14. Cneg 202-03 |
| 7. 514508 EM vacunas (mielina IgG) | 15. Anti-S100 (1/50, rabbit) |
| 8. 960770 EM vacunas (mielina IgG) | 16. Anti-NCAM (1/50, mouse) |

Protocolo: Monkey sciatic nerve slides (44685, Biosystems, Palex)

- 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 :
 - 1-14: GAH monkey absorbed IgG 488 + GAH IgM 594 diluídos 1/750 en goat serum 5%
 - 15: GAR488
 - 16: GAM488
- 3 lavados con PBS1x
- Montar con fluoromount

Resultado: FOTOS. En general es casi igual que los nervios anteriores (de Werfen), aunque el marcaje de mielina IgG de las EM no es igual.

1. Caja HNK – 2 (Disialosil): mielina IgM
2. Caja HNK – 3 (MAG): mielina IgM
3. Caja HNK – 34 (MAG títulos bajos): Schwann cells amielínicas IgG, Fibras IgM
4. Caja HNK – 36 (Sulfátidos): mielina IgM
5. Caja HNK – 43 (Mielina IgM): mielina IgM
6. 1598702 EM vacunas (mielina IgG): mielina IgG
7. 514508 EM vacunas (mielina IgG): negativo!!!

8. 960770 EM vacunas (mielina IgG): mielina IgG débil
9. Zika 004 (CS amielínicas IgG y IgM): Schwann cells amielínicas IgG y IgM
10. Zika ZN004A: Schwann cells amielínicas IgG y IgM
11. CNTN1+: Schwann cells amielínicas IgG
12. NF155+: negativo (no veo paranodos)
13. Cneg 198-03: Schwann cells amielínicas IgG débil
14. Cneg 202-03: negativo IgG, fibros IgM
15. Anti-S100 (1/50, rabbit): no marca nada, no he puesto el S100 correcto
16. Anti-NCAM (1/50, mouse): marca muy bien las CS amielínicas

Coating células + transfección Culture slides

18 culture slides:

- 12 Perfil
- 2 NF155/CNTN1
- 4 LRP4

Protocolo:

- Preparar mezclas transfección cada culture slide (8 pozos)
 - 2 ug DNA + 40 ul Optimem
 - 3,2 ul lipofectamina2000 + 40 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 10 ul de mezcla de transfección a cada pozo

24/05/2023

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

25/05/2023

Coating ELISA NF140, NF155, NF186, CASPR1

[CASPR1]i = 0,789 mg/ml

[NF140]i = 0,25 mg/ml

[NF155]i = 0,5 mg/ml

[NF186]i = 0,56 mg/ml

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

- CASPR1: 10 pozos : [CASPR1]f = 5 ug/ml : 0,5 ml buffer + 3'8 ul
- NF140: 4 pozos : [NF140]f = 5 ug/ml : 210 ul buffer + 4'2 ul
- NF155: 4 pozos : [NF155]f = 1 ug/ml : 210 ul buffer + 0'42 ul
- NF186: 4 pozos : [NF186]f = 5 ug/ml : 210 ul buffer + 1'9 ul

26/05/2023

Cambio medio co-cultivos, neuronas DRG, médula (d15) : rata 11/05/2023

- Co-cultivos y médula : D15: cambiar la mitad del medio (**medio mielinización**)
- Neuronas DRG : D15: cambiar la mitad de medio por **medio NG**

✓ **Descongelar mioblastos control inmortalizados**

Descongeló 1 vial de mioblastos control inmortalizados en 1 T75 con gelatina 0,15%, en medio Skeletal muscle (oro, Promocell) : AB1079C38Q C115 54'7 div + DEx + 3.85 pdl 1M 07/06/2022 (congelados por Ana)

*Tener en cuenta que se han cambiado 3 veces de congelador -80°C y que puede haber mucha mortalidad : efectivamente están casi todas muertas.

✓ **Coating Células Schwann primarios**

- Planto 500.000 cels más en las 2 placas 60cc con neuronas DRG ya crecidas (para hacer co-cultivos) : parecía que no hubiera cels de Schwann.
- Las dejo en medio de mielinización co-cultivos

✓ ELISA NF140, NF155, NF186, CASPR1 (BD)

Muestras:

- NF140:
 - 2023-271685: muestra panNF+ ICC (Immuno)
 - 23-2-554: muestra panNF+ ICC (Recerca)
- NF155:
 - 2023-271685: muestra panNF+ ICC (Immuno)
 - 23-2-554: muestra panNF+ ICC (Recerca)
- NF186:
 - 2023-271685: muestra panNF+ ICC (Immuno)
 - 23-2-554: muestra panNF+ ICC (Recerca)
- CASPR1:
 - 23-2-540
 - 23-2-553
 - 23-2-554
 - 23-2-587
 - 23-2-588

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	Cneg	23-2-554							
B blanc	Cneg	Cneg	Cneg	Cneg	23-2-554							
C prot	Cpos panNF	Cpos panNF	Cpos panNF	Cpos CASPR1	23-2-587							
D blanc	Cpos panNF	Cpos panNF	Cpos panNF	Cpos CASPR1	23-2-587							
E prot	23-271685	23-271685	23-271685	23-2-540	23-2-588							
F blanc	23-271685	23-271685	23-271685	23-2-540	23-2-588							
G prot	23-2-554	23-2-554	23-2-554	23-2-553								
H blanc	23-2-554	23-2-554	23-2-554	23-2-553								

NF140

NF155

NF186

CASPR1

Resultado:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	0,105	0,089	0,083	0,09	0,51	0	0	0	0	0	0	0
B blanc	0,096	0,094	0,098	0,106	0,135	0	0	0	0	0	0	0
C prot	0,272	0,316	0,593	0,478	0,115	0	0	0	0	0	0	0
D blanc	0,088	0,09	0,093	0,092	0,113	0	0	0	0	0	0	0
E prot	0,083	0,313	0,146	0,098	0,088	0	0	0	0	0	0	0
F blanc	0,106	0,102	0,105	0,098	0,116	0	0	0	0	0	0	0
G prot	0,097	0,116	0,102	0,094	0	0	0	0	0	0	0	0
H blanc	0,118	0,097	0,111	0,115	0	0	0	0	0	0	0	0

- 23-271685: sólo NF155+
- 23-2-554: NF140, NF155 y NF186 negativas. CASPR1 positiva!!!
- 23-2-540: CASPR1 neg
- 23-2-553: CASPR1 neg
- 23-2-587: CASPR1 neg
- 23-2-588: CASPR1 neg

29/05/2023

Cambio medio co-cultivos, neuronas DRG, médula (d18) : rata 11/05/2023

- Co-cultivos y médula : D18: cambiar la mitad del medio (**medio mielinización**)
- Neuronas DRG – Cels Schwann: D18: cambiar la mitad de medio por **medio mielinización**

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

30/05/2023

✓ IHC Monkey peripheral nerve (vacunas EM)

Muestras: (todas de EM SantPau)

- | | |
|--------------------------------------|--------------------------------------|
| 1. 147303 (3) T3 | 17. 1802061 (51) T3 |
| 2. 147303 muestra previa (230-119) | 18. 1496265 (62) T3 |
| 3. 344185 (8) T3 | 19. 1496265 T1 21-2-1308 |
| 4. 344185 T2 (no hay T1) 21-2-1301 | 20. 1502610 (63) T3 |
| 5. 1166296 (30) T3 | 21. 1502610 muestra previa (240-301) |
| 6. 1166296 T6 (no hay T1 ni T2) | 22. 1668530 (68) T3 |
| 7. 1248466 (34) T3 | 23. 1668530 muestra previa (240-307) |
| 8. Cneg 204-12 | 24. 379372 (75) T3 |
| 9. 1566039 (42) T3 | 25. 379372 T1 21-2-1303 |
| 10. 1566039 T1 21-2-1343 | 26. 917368 (82) T3 |
| 11. 1668802 (44) T3 IgG | 27. 1598702 T3 C+ |
| 12. 1668802 (44) T3 IgM | 28. 1598702 T1 C+ |
| 13. 1668802 T2 (no hay T1) 21-2-1310 | 29. 514508 T3 C+ |
| 14. 1774129 (49) T3 | 30. 514508 T1 C+ |
| 15. 1774129 T6 (no hay T1 ni T2) | 31. Cneg 204-11 |
| 16. 1781650 (50) T3 | 32. Prueba MBP (1/30) |

Protocolo: Monkey sciatic nerve slides (44685, Biosystems, Palex)

- 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 45min 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: no marca igual que marcaban los nervios anteriores (mielina, etc). No incluyo esto en el poster de la PNS, dejo solo el screening inicial de 100 muestras.

1. **147303** (3) **T3:** neg IgG, mielina IgM
2. **147303** muestra previa (230-119): neg
3. **344185** (8) **T3:** no lo veo claro en IgG, neg IgM
4. **344185 T2** (no hay T1) 21-2-1301: no lo veo claro en IgG, neg IgM
5. **1166296** (30) **T3:** neg
6. **1166296 T6** (no hay T1 ni T2): neg
7. **1248466** (34) **T3:** neg
8. **Cneg 204-12:** neg
9. **1566039** (42) **T3:** mielina IgG, neg IgM
10. **1566039 T1** 21-2-1343: mielina IgG, neg IgM
11. **1668802** (44) **T3** IgG: SC amielínicas IgG y IgM
12. **1668802** (44) **T3** IgM: SC amielínicas IgG y IgM
13. **1668802 T2** (no hay T1) 21-2-1310: SC amielínicas IgG y IgM
14. **1774129** (49) **T3:** ??
15. **1774129 T6** (no hay T1 ni T2): ??
16. **1781650** (50) **T3:** neg
17. **1802061** (51) **T3:** neg
18. **1496265** (62) **T3:** SC amielínicas IgG, neg IgM
19. **1496265 T1** 21-2-1308: SC amielínicas IgG, neg IgM
20. **1502610** (63) **T3:** SC amielínicas IgG, neg IgM
21. **1502610** muestra previa (240-301) : SC amielínicas IgG, neg IgM
22. **1668530** (68) **T3:** SC amielínicas IgG, neg IgM
23. **1668530** muestra previa (240-307): neg (fibros IgG)
24. **379372** (75) **T3:** neg (fibros IgG IgM)

25. **379372 T1** 21-2-1303: neg (fibros IgG IgM)
26. **917368 (82) T3**: neg (fibros IgM)
27. **1598702 T3** C+: mielina IgG débil
28. **1598702 T1** C+: mielina IgG débil
29. **514508 T3** C+: neg
30. **514508 T1** C+: neg
31. **Cneg 204-11**: neg
32. Prueba **MBP** (1/30): marcaje muy difuso

Coating células + transfección Culture slides

24 culture slides:

- 14 Perfil
- 2 NF155/CNTN1
- 6 LRP4
- 2 LRP4/CASPR2

Protocolo:

- Preparar mezclas transfección cada culture slide (8 pozos)
 - 2 ug DNA + 40 ul Optimem
 - 3,2 ul lipofectamina2000 + 40 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 10 ul de mezcla de transfección a cada pozo

Coating ELISA CASPR1

[CASPR1]_i = 0,789 mg/ml

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

- CASPR1: 48 pozos (una placa) : [CASPR1]_f = 5 ug/ml : 2,5 ml buffer + 15'8 ul

31/05/2023

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 NF155 (titulación)

Muestras y resultado: (Quantalyser, IgG totales)

- 23-289775 (NHC 1744206, Josep Moron García, 15/05/2023): título NF155 1/300

✓ ICC NF140, NF155, NF186 vivas (BD y inmuno)

Muestras:

- 23-271685
- 23-2-554

Protocolo: cels transfectadas día anterior. Uso el protocolo de Simon un poco adaptado!!!!
Culture slide (CNTN1, NF140, NF155, NF186):

Cneg	Cneg	23-271685	23-271685
Cpos CNTN1	Cpos NF140	23-2-554	23-2-554

- Lavar cada pozo con DMEM
- Incubar 1h a TA con 300 ul de suero diluído:
 - CNTN1: 1/40 en DMEM
 - NF140, NF155, NF186: 1/100 en DMEM con anticuerpo anti-panNF 1/1000
- 3 lavados con PBS1x
- Fijar con PFA4% 5 min
- 3 lavados con PBS1x
- Quitar pieza del culture slide
- Incubar 45min a TA con 30-40 ul de Ac. secundarios 1/750:
 - CNTN1: GAH 594

- NF140, NF155, NF186: GAH 594 + GAC 488 en PBS1x
- 3 lavados con PBS1x
- Montar con fluoromount

Resultado: no se ve demasiado bien!!!

***Protocolo original Simon Rinaldi:**

2.1 Recommended protocol for live CBA (from TC1)

2.1.1 Materials

DMEM only

DMEM with 10% FCS

DMEM/HEPES (2.3 g HEPES in 500 ml DMEM)

PBS

DMEM/HEPES/BSA (add 1% BSA to the DMEM/HEPES solution)

HEK293 cells

Poly-L-Lysine (prepare stock at 1 mg/ml – dilute to 20 mg/ml in PBS for coating)

Jet PEI

4% PFA

Antibodies

Antibody	Source	Cat no
Human/Mouse/Rat Neurofascin Antibody	R&D	AF3235
Mouse anti-human IgG1 (unconjugated)	Sigma	I2513-.2ML
Mouse anti-human IgG2 (unconjugated)	Sigma	I5635-.2ML
Mouse anti-human IgG3 (unconjugated)	Sigma	I7260-.2ML
Mouse anti-human IgG4 (unconjugated)	Sigma	I7385-.2ML
Human Contactin-1 Affinity Purified Polyclonal Ab	R&D Systems	AF904-SP
F(ab') ₂ -Goat anti-Human IgG Fc Secondary Antibody, Alexa Fluor 488	Thermo Fisher	h10120
Goat anti-Mouse IgG (H+L) AF488	Life Tech	A11029
Goat anti-Chicken IgY (H+L) AF546	Life Tech	A11040

Plasmids

Target	Vector	Sequence ref	Source	Cat no
NF155	pCMV6- NFASC-Myc-DDK	NM_001160331	Origene	RC228652
NF186	pcDNA3.1 –Nfasc186-Myc	NM_001005388	Jerome Devaux, University of Marseille	n/a
CNTN1	pReceiver-MO2-CNTN1	NM_001843.3	GeneCopoeia	EX-A1153-M02
Caspr1	pReceiver-MO2-CNTNAP1	NM_003632.2	GeneCopoeia	EX-M0417-M02

2.2.2 Method

1. Day 1 – place air dried, acid-treated, ethanol washed, 13mm coverslips into a 24 well plate and coat coverslips only with 70 ml 20 mg/ml PLL. Leave for 15 min. Aspirate and leave to air dry.
2. Lift stock HEK293 cells with TrypLe, spin down 500 g / 5 mins, resuspend in 1 ml DMEM with 10% FCS. Count.
3. Plate 5×10^4 cells/well in total 70 ml media / well (DMEM, 10% FCS). Top up to 250 ml by end of day and leave to grow o/n in 37°C incubator with 5% CO₂.
4. Day 2 – When cells reach 60%-80% confluence transfect with DNA of choice.
 - a. 1 mg DNA + 2 ml JetPEI / well (NF155, NF186, or NF140)
 - b. 0.5 mg CNTN1 DNA, 0.5 ug Caspr1 DNA + 3 ml JetPEI (for CNTN1/Caspr1 co-transfection)
 - c. 1 ug DNA + 3 ml JetPEI (CNTN1 or Caspr1 if singly transfected)
 - Prepare DNA and PEI separately in 150 mM NaCl to 50 ml/well total volume each. Vortex and spin down briefly.
 - Add PEI to DNA dropwise. Vortex and spin down briefly.
 - Incubate 15 minutes room temperature (RT)
 - Add 100ml complex mix / well dropwise (distributing around coverslip).
 - Homogenise by gentle swirling.
 - Incubate overnight (NF155, 186, 140) or 6 h (CNTN1, Caspr1 – CNTN1 especially appears toxic to the cells with prolonged transfection times).
5. Wash cells with 250 ml medium/well and add 250 ml fresh medium.
6. Day 4 (at least 24 h after transfection) - Dilute serum 1:100 (NF155, NF186) in DMEM/HEPES/BSA with 1:1000 CK anti-NF or 1:40 (CNTN1, Caspr1) in DMEM/HEPES/BSA and add to the wells (250 ul) for 1 hr at RT.
7. Wash x 3 with DMEM-HEPES
8. Fix with 4% Formaldehyde in PBS for 5 min at RT.
9. Rinse in PBS x3
10. Incubate with secondaries for 45 min, RT.
 - a. NF155/186: goat anti-human IgG Fc AF488 (1:750) and anti-CK AF546 (1:1000) in DMEM/HEPES/BSA
 - b. CNTN1/Caspr1: goat anti-human IgG Fc AF488 (1:750) in DMEM/HEPES/BSA
11. Wash x3 DMEM/HEPES and x2 in PBS
12. Incubate with DAPI (1:50,000) for 5 minutes. Rinse 2x PBS.

13. Read assay in plates using fluorescent microscopy or alternatively/additionally mount on slides with mounting medium for imaging. Human IgG binding is scored on a 5 point scale taking into account fluorescence intensity and co-localisation with the commercial antibody (0 – negative, 1 – low positive, 2-4 positive with fluorescence intensity below, equivalent or greater than that seen with the commercial).

✓ **ELISA CASPR1 (BD)**

Muestras:

- 23-2-540
- 23-2-553
- 23-2-554
- 23-2-587
- 23-2-588

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	23-2-554										
B blanc	Cneg	23-2-554										
C prot	Cpos CASPR1	23-2-587										
D blanc	Cpos CASPR1	23-2-587										
E prot	23-2-540	23-2-588										
F blanc	23-2-540	23-2-588										
G prot	23-2-553											
H blanc	23-2-553											

Resultado:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	0,019	0,441										
B blanc	0,014	0,023										
C prot	1,149	0,012										
D blanc	0,04	0,009										
E prot	0,016	0,006										
F blanc	0,01	0,017										
G prot	0,048											
H blanc	0,105											

- 23-2-540: CASPR1 neg
- 23-2-553: CASPR1 neg
- 23-2-554: CASPR1 pos : CONFIRMAR!!!
- 23-2-587: CASPR1 neg
- 23-2-588: CASPR1 neg

✓ **Coating placas para co-cultivos y otros**

- Coating con Poly-D-lys 1/40 : incubar overnight a 37°C
- Día siguiente: lavar pozos y hacer coating con Laminina 2'5 ul/ml : incubar mínimo 1h a 37°C
 - Explantes DRG: 3 placas de 24wells con 1 cubre de 12mm en cada pozo, y 1 placa 60 cc con 14 cubres 12mm
 - Explantes médula: 1 placa de 24wells con 1 cubre de 12mm en cada pozo, y 1 placa 60 cc con 14 cubres 12mm
 - Neuronas DRG para IP: 4 placas 100 cc

01/06/2023

✓ Co-cultivo de neuronas DRG i células de Schwann (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%)
- 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.
 - En este caso pongo los embriones en un tubo de 15 con 10 ml de MACS Tissue Storage Solution (130-100-008, Milteny) : lo dejo en horizontal en la nevera, para que cubra todos los embriones y se mantengan bien los tejidos.
- 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

Co-cultivos (explantes DRG y explantes médula)

- DO : Añadir 400 ul de medio C (co-culture medium) 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
- Poner un DRG o trocito de médula en cada pozo/cubre e incubar a 37°C
- *En una placa de 60 cc con cubres pongo varios DRG, y en otra pongo varios trozos de médula.
- D1: cambiar la mitad del medio (medio C): 200 ul/pozo
- D4 : cambiar el medio (poner **medio NG**) 400 ul/pozo
 - 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
- 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)
- D8: cambiar mitad del medio de mielinización: a partir de aquí ir cambiando un día sí uno no (cada 2 días).

Neuronas DRG

- **Por la tarde saco los ganglios de 5 embriones que había dejado en Tissue storage solution (tienen muy buena consistencia!!!)**
- Pasar los DRG a un tubo de 15 ml : con pipeta Pasteur de cristal y tetina
- Centrifugar a 300 rpm 5 min
- Eliminar el sobrenadante (con pasteur cristal+ tetina) e ir tirando a una placa, para no perder ningún DRG.
- Poner 5 ml de PBS1x y centrifugar a 300 rpm 5 min
- Eliminar el sobrenadante y añadir 4,5 ml PBS + 500 ul de tirpsina 2,5% sin bromophenol
- Incubar 15min a 37°C (en el baño). Homogeneizar suavemente cada 5 minutos.

- Añadir 5 ml de medio L15 con FBS para inactivar la tripsina
- Centrifugar a 300 rpm 10min
- Pasar el pellet a un eppendorf con 1 ml de medio NG, disgregar con pipetas Pasteur de vidrio finas (se hacen finas con el bunsen y se autoclavan).

Medio NG:

- 48 ml de medio Neurobasal
- 1 ml de suplement B27
- 500 µl de glutamax
- 500 µl de Pen-Str
- 25 µl de NGF
- Dividir el ml de células entre las 4 placas de 100 cc
- D1: cambiar la mitad de medio por **medio NGF**
 - 50 ml de medio NG
 - 10 µl de 5-fluorodesoxiuridina (1)
 - 10 µl de uridina (2)
 - 5 µl de AraC 10 mM
- D4: cambiar la mitad de medio por medio NG : a partir de aquí ir cambiando un día sí uno no (cada 2 días).

***GUARDO EN TISSUE STORAGE SOLUTION TODAS LAS MÉDULAS QUE SACO DE LOS 5 EMBRIONES QUE HAGO POR LA TARDE, Y LAS DEJO A 4°C HASTA EL DÍA SIGUIENTE.**

02/06/2023

✓ **Disgregar médulas (Adult brain dissociation Kit - Milteny)**

Disgrego las médulas guardadas en Tissue Storage Solution el día anterior (sacadas de embriones E16 de rata.

Uso un kit que me deja Xavi: Adult brain dissociation kit (130-107-677, Milteny), y uso la máquina GentleMACS.

Protocolo kit:

Reagent and instrument preparation

▲ For subsequent cultivation it is recommended to dissociate at least 800 mg of adult neural tissue.

▲ Volumes given below are for one adult mouse brain (max. 500 mg) in 1980 μ L enzyme mix. When working with less than 500 mg, use the same volumes as indicated. When working with neural tissue from adult rats or distinct brain regions, determine the weight and scale up all reagent volumes and total volumes accordingly. A maximum of 500 mg neural tissue per C Tube can be processed.

1. Enzyme P is ready to use. Prepare aliquots of appropriate volume to avoid repeated freeze-thaw-cycles. Store aliquots at -20°C . This solution is stable for 6 months. Resuspend the lyophilized powder in the vial labeled Enzyme A with 1 mL Buffer A. Do not vortex. This solution should then be aliquoted and stored at -20°C for later use. Avoid repeated freeze-thaw-cycles: **en este caso las enzimas ya estaban alicuotadas.**

2. Prepare enzyme mix 1 and enzyme mix 2 according to the table below (**las enzimas están a -20°C y los buffers a 4°C**)

- Enzyme mix 1: 50 μ L Enzyme P + 1900 μ L Buffer Z
- Enzyme mix 2: 20 μ L Buffer Y + 10 μ L Enzyme A

Dissociation protocol

▲ 20 mg up to 500 mg of rodent neural tissue in 2 mL enzyme mix can be processed in one C Tube.

▲ For cell culture experiments subsequent to tissue dissociation, all steps should be performed under sterile conditions.

1. Remove the rodent neural tissue. Wash neural tissue in cold D-PBS.

2. Prepare the appropriate volume of enzyme mix 1 (refer to table in section 1) and transfer it into a gentleMACS C Tube.

3. Cut larger tissue (e.g. whole brain or spinal cord) into approximately 8 sagittal slices or 0.5 cm pieces using a scalpel. In case of smaller tissue, e.g., hippocampus continue directly with step 4: **en este caso no corto las médulas porque ya son suficientemente pequeñas.**

4. Transfer the tissue pieces into the C Tube containing 1950 μ L of enzyme mix 1.

5. Transfer 30 μ L of enzyme mix 2 into the C Tube.

6. Tightly close C Tube and attach it upside down onto the sleeve of the gentleMACS Octo Dissociator with Heaters.

7. Run the appropriate gentleMACS Program:

- 20–100 mg: 37C_ABDK_02
- >100 mg: 37C_ABDK_01.

***Uso el programa 37C_ABDK_02 porque no hay mucha cantidad: poner el tubo boca abajo en el GentleMACS con la parte plana hacia adelante, poner el Heater (pieza amarilla), seleccionar programa (dura 30min).**

8. After termination of the program, detach C Tube from the gentleMACS Octo Dissociator with Heaters.

9. Centrifuge briefly to collect the sample at the bottom of the tube.

10. Resuspend sample and apply it to a MACS SmartStrainer (70 μ m) placed on a 50 mL tube.

▲ Note: Moisten MACS SmartStrainer with buffer before use.

▲ Note: When upscaling the reagent volume and total volumes, increase also the number of MACS SmartStrainers (70 μ m). One MACS SmartStrainer (70 μ m) can be used for one adult mouse brain.

▲ Note: Cells with a diameter >70 μ m may be lost. To obtain these cells within the flow through, use a cell strainer with an appropriate mesh size.

11. Add 10 mL of cold D-PBS to the C Tube, close C Tube, shake gently and apply the D-PBS onto the MACS SmartStrainer (70 μ m).

12. Discard MACS SmartStrainer (70 μ m) and centrifuge cell suspension at 300 \times g for 10 minutes at 4 °C. Aspirate supernatant completely: **en este caso no lo he centrifugado a 4°C porque la centrifuga de cultivos no tieneregulador de temperatura.**

13. Proceed to 2.3 for debris removal: **no hago este paso!!!**

***Después de aspirar el sobrenadante, resuspendo las células en 1 ml de medio C (co-culture médium), y las planto en 2 placas de 60cc con 14 cubres 12mm (previamente he hecho coating con Poly-D 1/40 overnight, y laminina 2'5 ul/ml 1h):**

- 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

Cambio medio co-cultivos, neuronas DRG, médula (d22) : rata 11/05/2023

- Co-cultivos y médula : D22: cambiar la mitad del medio (**medio mielinización**)
- Neuronas DRG – Cels Schwann : cambiar la mitad de medio por **medio mielinización**
-

Cambio medio co-cultivos, neuronas DRG, médula (d1) : rata 01/06/2023

- Co-cultivos DRG y médula : no cambio ningún medio!!
- Neuronas DRG : D1: cambiar la mitad de medio por **medio NGF**

04/06/2023

Cambio medio co-cultivos, neuronas DRG, médula (d24) : rata 11/05/2023

- Co-cultivos y médula : D24: cambiar la mitad del medio (**medio mielinización**)
- Neuronas DRG – Cels Schwann: cambiar la mitad de medio por **medio mielinización**

Cambio medio co-cultivos, neuronas DRG, médula (d3) : rata 01/06/2023

- Co-cultivos DRG y médula : D3: cambiar todo el medio por **medio NG**
- Neuronas DRG : D3: cambiar todo el medio por **medio NG** : HAY MUCHA MORTALIDAD, AUNQUE EL VIERNES ESTABAN PERFECTAS

06/06/2023

Cambio medio co-cultivos, neuronas DRG, médula (d26) : rata 11/05/2023

- Co-cultivos y médula : D26: cambiar la mitad del medio (**medio mielinización**)
- Neuronas DRG – Cels Schwann: TODAS LAS CÉLULAS HAN MUERTO, TENGO QUE TIRAR LAS PLACAS

Cambio medio co-cultivos, neuronas DRG, médula (d5) : rata 01/06/2023

- Co-cultivos DRG y médula : D5: cambiar la mitad del medio por **medio NG**
 - En una de las placas de médula disgregada con GentleMACS pongo **medio NGF** para matar a la glía.
- Neuronas DRG : D5: no les cambio el medio porque no están tirando mucho, y para no “molestarlas”

✓ ICC co-cultivos (día 26 - rata 11/05/2023)

Cojo cubres de los co-cultivos para ir viendo cómo va la diferenciación:

- 1 cubre explantes DRG
- 1 cubre explantes médula

Protocolo:

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

- **MBP y NFh**
 - anti-Myelin basic protein SMI99, 808401 (Biolegend). Dil. **1/100** (mouse) : (overnight 4°C)
 - anti-Neurofilament H, AB5539 (Merck) **Dil. 1/500** (chicken) : 1h RT
- 3 lavados con PBS1x
- Incubar 1h con Ac. secundarios diluidos en Goat serum 5% y 0'5% tritón (todos a 1/500)
 - MBP y NFh: GAM488 + GAC594
- 3 lavados con PBS1x
- Montar con Fluoromount

Resultado: Perfecto!!! Hay mucha mielina en el explante de DRG. En el explante de médula no pero se ven muy bien las neuronas.

✓ IHC teasing nervio ciático rata

Teasing hecho por Elba y Marta día 01/06/2023

Muestras:

- 23-271685
- 23-2-554
- Control CNTN1+
- Control panNF+

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) , overnight 4°C
- Ac secundarios: GAC488 + GAH594 IgG 1/1000 (en bloqueo) 1h
- Montar con Fluoromount

Resultado:

- 23-271685: marcaje Nodo
- 23-2-554: nose si marca el nodo o el paranodo
- Control CNTN1+: marcaje paranodo
- Control panNF+: no se ve claro

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

Coating ELISA NF155

[NF155]_i = 0,505 mg/ml

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

- NF155: 48 pozos (una placa) : [NF155]_f = 5 ug/ml : 2,5 ml buffer + 5 ul

07/06/2023

ELISA NF155 (titulación)

Muestras y resultado: (Quantalyser, IgG4)

- 23-353683
- 23-289775

Repetir!!

08/06/2023

Coating células + transfección Culture slides

24 culture slides:

- 14 Perfil
- 2 NF155/CNTN1
- 6 LRP4
- 2 CASPR1/Doble CNTN1-CASPR1

Protocolo:

- Preparar mezclas transfección cada culture slide (8 pozos)
 - 2 ug DNA + 40 ul Optimem
 - CNTN1/CASPR1: 1,4 ug CNTN1 y 0,8 ug CASPR1
 - 3,2 ul lipofectamina2000 + 40 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 10 ul de mezcla de transfección a cada pozo

✓ ICC Perfil nodales/paranodales (BD)

Muestras y resultado: 3 portas perfil

1. 23-2-554 1/50 (en pozo CNTN1 pongo 23-2-524): 23-2-554 panNF neg (aunque hay mucho fondo!), 23-2-524 CNTN1 pos
2. 23-271685 23-2-698 1/50 (en pozo CNTN1 pongo 23-2-600): 23-271685 panNF muy débil, 23-2-600 CNTN1 neg
3. 23-2-605: neg
4. 23-2-606: neg
5. 23-5-607: neg
6. Cpos: pos

✓ ELISA CASPR1 y NF155 (BD)

Muestras:

- CASPR1:
 - 23-554
 - 23-2-605
 - 23-2-606
 - Muestras MRVM encontradas en caja-20°C
- NF155:
 - 23-298589

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 H_2SO_4 25%
- Leer a 450-570 nm

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	Cneg	23-2-606	Cneg									
B blanc	Cneg	23-2-606	Cneg									
C prot	Cpos CASPR1	MRVM	Cpos NF155									
D blanc	Cpos CASPR1	MRVM	Cpos NF155									
E prot	23-2-554		23-298589 1/100									
F blanc	23-2-554		23-298589 1/100									
G prot	23-2-605		23-298589 1/300									
H blanc	23-2-605		23-298589 1/300									

CASPR1

NF155

Resultado:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	0,062	0,058	0,054									
B blanc	0,044	0,052	0,085									
C prot	1,099	0,176	1,008									
D blanc	0,171	0,126	0,083									
E prot	0,715		0,86									
F blanc	0,097		0,053									
G prot	0,097		0,537									
H blanc	0,132		0,057									

· **CASPR1:**

- 23-554: pos
- 23-2-605: neg
- 23-2-606: neg
- Muestras MRVM encontradas en caja-20°C: neg

· **NF155:**

- 23-298589: pos

ICC co-cultivos (día 28 - rata 11/05/2023)

Objetivo: pasar los pacientes positivos que tengamos para ver cómo es el marcaje.

Muestras:

- | | |
|--|------------------------------------|
| 1. CIDP15 (GDP1, LIF+) | 11. 21-2-94 (X4069 CNTN1+) |
| 2. 151-21 (GDP2) | 12. Cneg 21-2-1608 |
| 3. CIDP78 (MRVM 1ª muestra , LIF+ CASPR1+) | 13. Cneg 204-10 |
| 4. 179-06 (MRVM 26/08/15) | 14. Cneg 204-11 |
| 5. 22-3-414 Box 295 (Bocanegra 1ª muestra Plasma, CASPR1+) | 15. CIDP100 IgM |
| 6. 23-234205 (Bocanegra 20/02/23 CASPR1neg) 23-2-271 Box 323 | 16. CIDP100 anti-Kappa |
| 7. CIDP16 (JCDHM, NF155+) | 17. Pulido (sulfátidos) IgM |
| 8. CIDP16 IgG Purificada | 18. Pulido (sulfátidos) anti-Kappa |
| 9. CIDP21 (RDP, panNF+) | 19. Triple ICC: Caspr1, MBP, NFh |
| 10. CIDP44 (TMF, CNTN1+) | 20. Tripe ICC: panNF, MBP, NF200 |
| | 21. Tripe ICC: Nav, MBP, NFh |
| | 22. Triple ICC: MAP2, MBP, Nav |

Protocolo (cubres 1-18):

- 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 30min con Goat serum 5% tritón 0,5%
- Incubar con anticuerpo primario diluido en **Goat serum 5% tritón 0'5%** (2h RT)
 - **MBP** anti-Myelin basic protein SMI99, 808401 (Biolegend). Dil. **1/100** (mouse)
- 3 lavados con PBS1x
- Incubar 1h con Ac. secundarios diluidos en Goat serum 5% tritón 0'5% (todos a 1/500):
 - 1-14: **GAH488 IgG** (suero) + **GAM594** (MBP)
 - 15, 17: GAH488 IgM (suero) + GAM594 (MBP)
 - 16, 18: GAH anti-Kapa biot (suero) + GAM594 (MBP)
 - En estos dos últimos cubres añadir un paso extra de Streptavidina 594 1/1000

- 3 lavados con PBS1x
- Montar con fluoromount

Protocolo (cubres 19-22):

- Fijar 20 min con PFA 4%
 - 1 lavado con PBS1x
 - Bloquear con Goat serum 5% y 0'5% tritón (en PBS): 1h a RT
 - Incubar con anticuerpos primarios diluídos en Goat serum 5% y 0'5% tritón:
 - **19: CASPR1, MBP, NFh**
 - Anti-CASPR1ab133634 (abcam). Dil. **1/100** (rabbit): overnight 4°C
 - anti-Myelin basic protein SMI99, 808401 (Biolegend). Dil. **1/100** (mouse): 2h RT
 - anti-Neurofilament H, AB5539 (Merck) Dil. **1/500** (chicken): 1h RT
 - **20: panNF, MBP, NF200**
 - anti-panNeurofascin. Dil. **1/100** (chicken) : overnight 4°C
 - anti-Myelin basic protein SMI99, 808401 (Biolegend). Dil. **1/100** (mouse): 2h RT
 - anti-Neurofilament200, N4142 (Merck). Dil. **1/50** (rabbit): 1h RT
 - **21: Nav, suero, NFh**
 - Anti-NAv, S8809 (Sigma). Dil. **1/500** (mouse): overnight 4°C
 - Suero anti-LIF+ Dil. 1/100: 2h RT
 - anti-Neurofilament H, AB5539 (Merck) Dil. **1/500** (chicken): 1h RT
 - **22: MAP2, MBP, Nav**
 - Anti-MAP2, 188004 Synaptic systems Dil. **1/500** (guinea pig): overnight 4°C : anticuerpo cedido por Oriana (marcador de neuronas)
 - anti-Myelin basic protein SMI99, 808401 (Biolegend). Dil. **1/100** (mouse): 2h RT
 - Anti-NAv, S8809 (Sigma). Dil. **1/500** (mouse): 1h RT
- *soy tonta porque MBP y Nav son mouse los dos...
- 3 lavados con PBS1x
 - Incubar 1h con Ac. secundarios diluídos en Goat serum 5% y 0'5% tritón (todos a 1/500)
 - 19: GAR594 (Caspr1) + GAM647 (MBP) + GAC488 (NFh)
 - 20: GAC488 (panNF) + GAM647 (MBP) + GAR594 (NF200)
 - 21: GAM647 (Nav) + GAH488 IgG (suero) + GAC594 (NFh)

- 22: DAguineapig647 (MAP2) + GAM488 (MBP y Nav) : el Donkey anti-guinea pig me lo ha dejado Oriana
- 3 lavados con PBS1x
- Montar con Fluoromount

Resultado:

- | | |
|--|------------------------------------|
| 1. CIDP15 (GDP1, LIF+) : no hay mielina | 11. 21-2-94 (X4069 CNTN1+) |
| 2. 151-21 (GDP2) | 12. Cneg 21-2-1608 |
| 3. CIDP78 (MRVM 1ª muestra , LIF+ CASPR1+) : no hay mielina | 13. Cneg 204-10 |
| 4. 179-06 (MRVM 26/08/15) | 14. Cneg 204-11 |
| 5. 22-3-414 Box 295 (Bocanegra 1ª muestra Plasma, CASPR1+) | 15. CIDP100 IgM |
| 6. 23-234205 (Bocanegra 20/02/23 CASPR1neg) 23-2-271 Box 323 | 16. CIDP100 anti-Kappa |
| 7. CIDP16 (JCDHM, NF155+) | 17. Pulido (sulfátidos) IgM |
| 8. CIDP16 IgG Purificada | 18. Pulido (sulfátidos) anti-Kappa |
| 9. CIDP21 (RDP, panNF+) | 19. Triple ICC: Caspr1, MBP, NFh |
| 10. CIDP44 (TMF, CNTN1+) | 20. Tripe ICC: panNF, MBP, NF200 |
| | 21. Tripe ICC: Nav, MBP, NFh |
| | 22. Triple ICC: MAP2, MBP, Nav |

09/06/2023

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

Cambio medio co-cultivos, neuronas DRG, médula (d29) : rata 11/05/2023

- Co-cultivos y médula : D29: cambiar la mitad del medio (**medio mielinización**)

Cambio medio co-cultivos, neuronas DRG, médula (d8) : rata 01/06/2023

- Co-cultivos DRG y médula : D8: cambiar todo el medio por **medio mielinización**
- Una de las placas de médula disgregada : cambiar la mitad de medio por **medio NG**
- Neuronas DRG : D8: cambiar la mitad de medio por **medio NG**

✓ ICC CASPR1 y Doble CNTN1/CASPR1

Muestras:

1. 23-2-554
2. 22-3-414 (Bocanegra)
3. Cneg 204-11
4. CIDP78 (Vinuesa)

Protocolo: fijadas igual que siempre. Todo con ac. anti-Caspr1

Resultado: NO SALE BIEN!! LA TRANSFECCIÓN HA SALIDO MUY CHUNGA. REPETIR

14/06/2023

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

15/06/2023

Coating células + transfección Culture slides

12 culture slides:

- 11 Perfil
- 1 CASPR1/Doble CNTN1-CASPR1

Protocolo:

- Preparar mezclas transfección cada culture slide (8 pozos)
 - 2 ug DNA + 40 ul Optimem
 - CNTN1/CASPR1: 1,4 ug CNTN1 y 0,8 ug CASPR1
 - 3,2 ul lipofectamina2000 + 40 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 10 ul de mezcla de transfección a cada pozo

✓ ICC co-cultivos DRG (día 35 - rata 11/05/2023)

HACER EXACTAMENTE LO MISMO EN CUBRES Y EN PORTAS (USO 24 CUBRES, Y 3 CULTURE SLIDES)

Muestras:

- | | |
|--|------------------------------------|
| 1. CIDP15 (GDP1, LIF+) | 12. 23-2-554 (panNF vs Caspr1) |
| 2. 151-21 (GDP2) | 13. CIDP44 (TMF, CNTN1+) |
| 3. CIDP78 (MRVM 1ª muestra , LIF+ CASPR1+) | 14. 21-2-94 (X4069 CNTN1+) |
| 4. 179-06 (MRVM 26/08/15) | 15. 20-2-632 (Juan Pablo Lugo) IgG |
| 5. 21-2-374 Box 295 (Bocanegra 1ª muestra Plasma, CASPR1+) | 16. CIDP1 |
| 6. 23-234205 (Bocanegra 20/02/23 CASPR1neg) 23-2-271 Box 323 | 17. CIDP2 |
| 7. CIDP16 (JCDHM, NF155+) | 18. CIDP3 |
| 8. CIDP16 IgG Purificada | 19. CIDP4 |
| 9. CIDP41 (JML, NF155+) | 20. Cneg 202-2 |
| 10. CIDP21 (RDP, panNF+) | 21. Cneg 202-3 |
| 11. 23-271685 (panNF+) | 22. Cneg 202-16 |
| | 23. Doble ICC: panNF (vivas), MBP |
| | 24. Doble ICC: MBP, NFh (fijadas) |

Protocolo:

- Incubar con **suero 1/70** en medio de mielinización (5 ul e 350 ul) : overnight 37°C
 - Cubre 23: panNF 1/350
- Fijar 20 min con PFA 4% (no he hecho lavado con PBS antes de fijar)
- 1 lavado con PBS1x
- Bloquear 30min con Goat serum 5% tritón 0,5%
- Incubar con anticuerpo primario diluído en **Goat serum 5% tritón 0'5%** (2h RT)
 - **1-23: MBP** anti-Myelin basic protein SMI99, 808401 (Biolegend). Dil. **1/100** (mouse)
- 3 lavados con PBS1x
- Incubar 1h con Ac. secundarios diluídos en Goat serum 5% tritón 0'5% (todos a 1/500):
 - 1-22: **GAH488 IgG** (suero) + **GAM594** (MBP)
 - 23 y 24: **GAM488** (MBP) + **GAC594** (panNF)
- 3 lavados con PBS1x
- Montar con fluoromount

Organización portaobjetos:

Porta 1: cubres 1,2,3

Porta 2: cubres 4,5,6

Porta 3: cubres 7,8,9

Porta 4: cubres 10,11,12

Porta 5: cubres 13,14,15

Porta 6: cubres 16,17,18

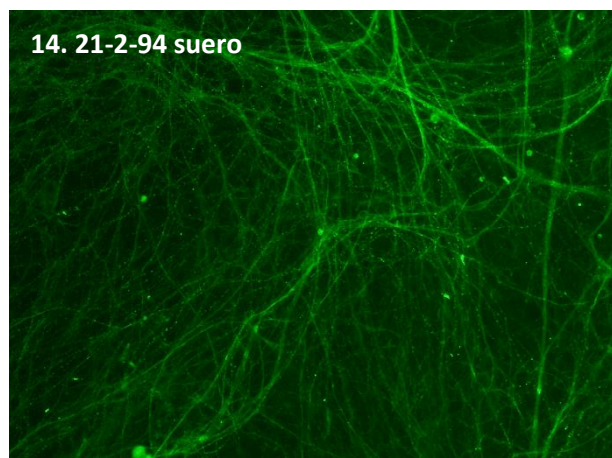
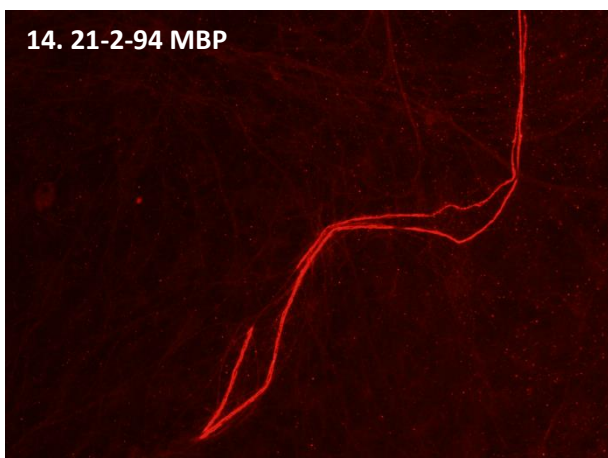
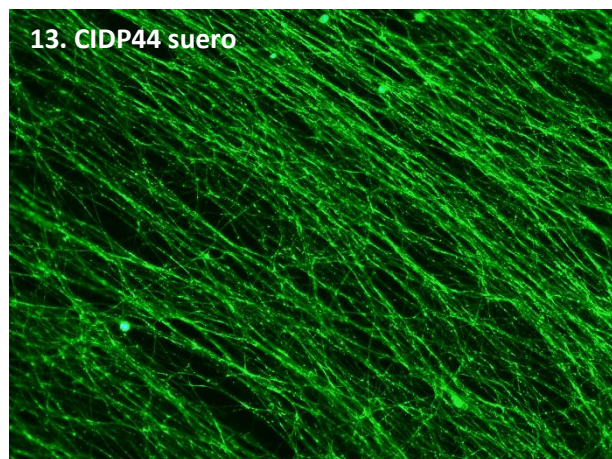
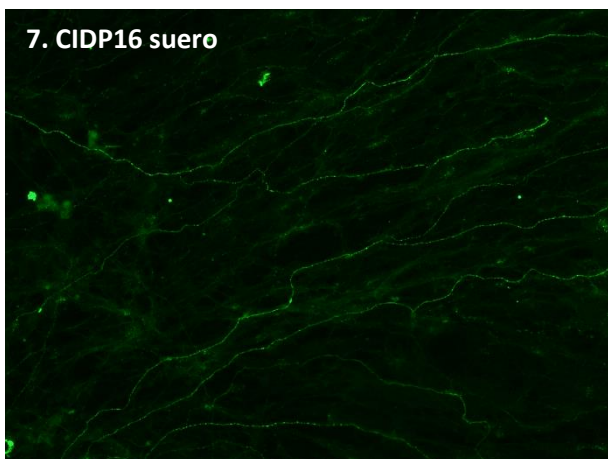
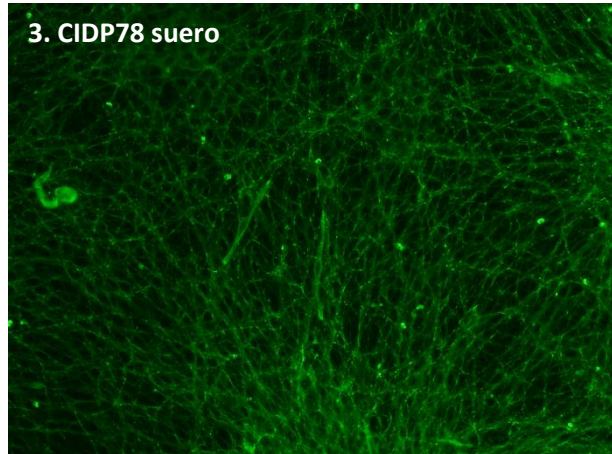
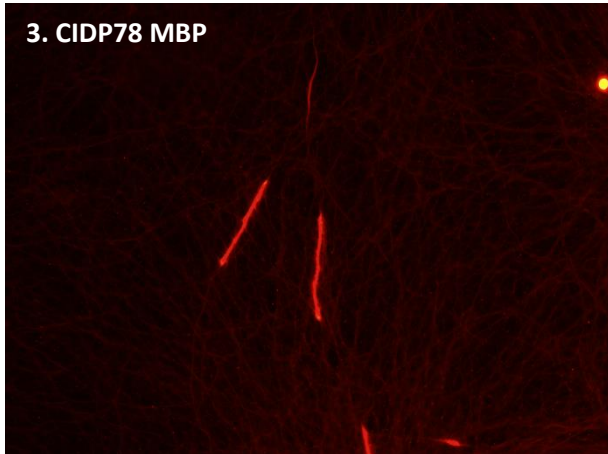
Porta 7: cubres 19,20,21

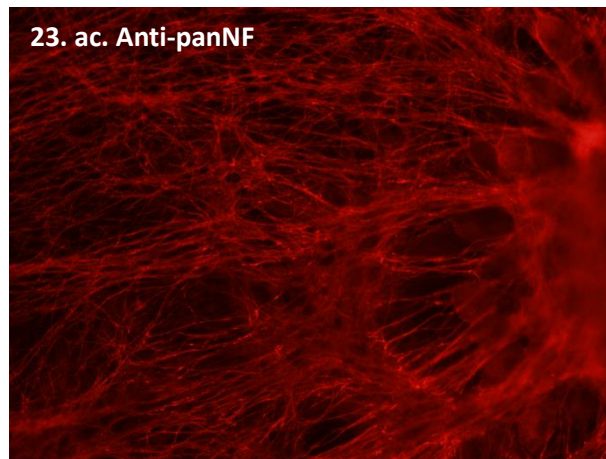
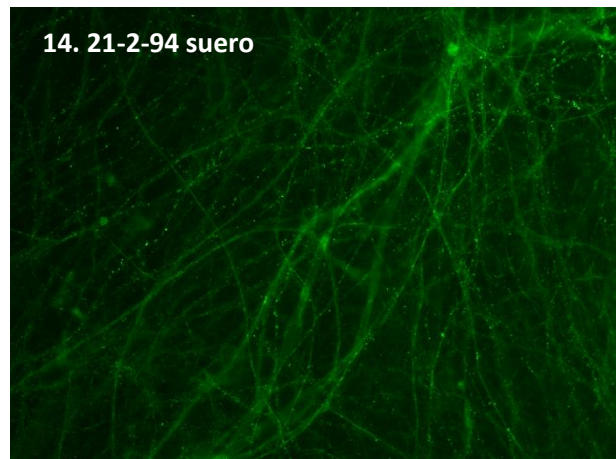
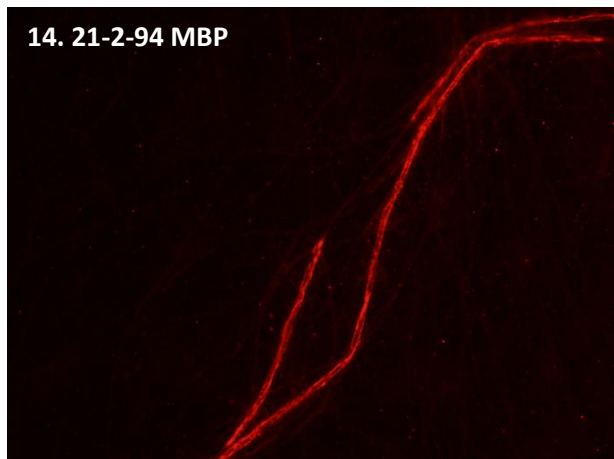
Porta 8: cubres 22,23,24

Resultado: como siempre, en algunos cubres hay mielina (poca) y en otros no. En general en los culture slides hay muy poca mielina, y veo lo mismo que en los cubres. n=neuronas (axones), m=mielina

1. **CIDP15 (GDP1, LIF+):** n++, m+++ (aunque hay poca mielina). Parece que marque el núcleo de las cels de Schwann mielínicas
2. **151-21 (GDP2):** n-, m-
3. **CIDP78 (MRVM 1ª muestra , LIF+ CASPR1+):** n++, m++
4. **179-06 (MRVM 26/08/15):** n-, m-
5. **21-2-374 Box 295 (Bocanegra 1ª muestra Plasma, CASPR1+):** n+, m no hay
6. **23-234205 (Bocanegra 20/02/23 CASPR1neg) 23-2-271 Box 323:** n-, m-
7. **CIDP16 (JCDHM, NF155+):** n++ (marca algunos axones, no todos), m no hay
8. **CIDP16 IgG Purificada:** n-, m++
9. **CIDP41 (JML, NF155+):** n-/+, no veo claro si marca mielina
10. **CIDP21 (RDP, panNF+):** n++, m no hay
11. **23-271685 (panNF+):** n-/+, no veo bien si marca el nodo
12. **23-2-554 (panNF vs Caspr1):** repetir
13. **CIDP44 (TMF, CNTN1+):** n+++ , m-, imposible ver el paranodo
14. **21-2-94 (X4069 CNTN1+):** n+++ , m-, hago alguna foto en que se ve el paranodo
15. **20-2-632 (Juan Pablo Lugo) IgG:** n+/++ , m-
16. **CIDP1:** n+, m no hay
17. **CIDP2:** n-, m-
18. **CIDP3:** repetir
19. **CIDP4:** n-, m-

- 20. Cneg 202-2: n-, m no hay
- 21. Cneg 202-3: n-, m no hay
- 22. Cneg 202-16: repetir
- 23. Doble ICC: panNF (vivas), MBP: no hay mielina, panNF marca ++ axones
- 24. Doble ICC: MBP, NFh (fijadas): repetir





- ✓ [ICC médula](#) (día 35 - rata 11/05/2023, y día 14 - rata 01/06/2023)

Uso 4 tipos diferentes de cubres:

- Cubres placa 24w rata 11/05/2023 (explantes médula)
- Cubres placa 60cc rata 01/06/2023 (explantes médula)
- Cubres placa 60 cc rata 01/06/2023 (neuronas disgregadas sin glía – crecidas como neuronas DRG)
- Cubres placa 60 cc rata 01/06/2023 (neuronas disgregadas, con glía – crecidas como co-cultivos)

Muestras: (cubres neuronas médula disgregadas, con glía y sin glía)

- | | |
|--|---------------------------|
| 1. CIDP78 (MRVM 1ª muestra , LIF+ CASPR1+) | 5. CIDP21 (RDP, panNF+) |
| 2. 21-2-374 Box 295 (Bocanegra 1ª muestra Plasma, CASPR1+) | 6. 23-271685 (panNF+) |
| 3. CIDP16 (JCDHM, NF155+) | 7. CIDP44 (TMF, CNTN1+) |
| 4. CIDP41 (JML, NF155+) | 8. 21-2-94 (X4069 CNTN1+) |
| | 9. Cneg 202-2 |
| | 10. Cneg 202-3 |

11. Cneg 202-16

13. Doble ICC: MBP, NFh

12. Doble ICC: panNF, MBP

14. Doble ICC: CHAT

Muestras: (cubres explantes)

1. CIDP78 (MRVM 1ª muestra , LIF+ CASPR1+)
2. CIDP16
3. CIDP21
4. CIDP44
5. Cneg 202-2

Protocolo (cubres 1-11 disgregadas y 1-5 explantes)

- Incubar con **suero** 1/70 en medio de mielinización: overnight 37°C
 - No he hecho lavado con PBS
- Fijar 20 min con PFA 4%
- 1 lavado con PBS1x
- Bloquear 30min con Goat serum 5% tritón 0,5%
- Incubar con anticuerpo primario diluido en Goat serum 5% tritón 0'5% (2h RT)
 - Cubres 1-6 disgregadas y 1-3 explantes: NFh 1/500
 - Cubres 7-11 disgregadas y 4-5 eplantes: MBP 1/100
 - Cubres 12: panNF 1/200, y después MBP 1/100
 - Cubres 13: MBP 1/100 y después NFh 1/500
 - Cubres 14: CHAT : AB144P Millipore, 1/100 (goat: hacer todo con rabbit serum)
- 3 lavados con PBS1x
- Incubar 1h con Ac. secundarios diluidos en Goat serum 5% tritón 0'5% (todos a 1/500):
 - Cubres 1-6 disgregadas y 1-3 explantes: GAH488 IgG + GAC594
 - Cubres 7-11 disgregadas y 4-5 eplantes: GAH488 IgG + GAM594
 - Cubres 12: GAM488 + GAC594
 - Cubres 13: GAM44 + GAC594
 - Cubres 14: RAG488
- 3 lavados con PBS1x
- Montar con fluoromount

Organización portaobjetos:

Porta 9: cubres 1,2,3 disgregadas sin glia

Porta 10: cubres 4,5,6 disgregadas sin glia
Porta 11: cubres 7,8,9 disgregadas sin glia
Porta 12: cubres 10,11,12 disgregadas sin glia
Porta 13: cubres 13,14 disgregadas sin glia (último hueco es cubre 7 disgregadas con glia)
Porta 14: cubres 1,2,3 disgregadas con glia
Porta 15: cubres 4,5,6 disgregadas con glia
Porta 16: cubres 8,9 disgregadas con glia
Porta 17: cubres 10,11,12 disgregadas con glia
Porta 18: cubres 13,14 disgregadas con glia
Porta 19: cubres 1,2,3 explantes 11/05/23
Porta 20: cubres 4,5 explantes 11/05/23
Porta 21: cubres 1,2,3 explantes 01/06/23
Porta 22: cubres 4,5 explantes 01/06/23

Resultado:

- Las neuronas de médula disgregadas sin glía se ven muy bien
- Las neuronas de médula disgregadas con glía no se ven bien... el NFh marca cosas raras, parece que no sirven (no anoto el resultado porque no distingo nada)
- Los explantes de médula del 11/05 (crecidos en placa de 24w) se ven muy bien y hay mucha mielina
- Los explantes de médula del 01/06 (crecidos todos juntos en placa 60cc) no se ven tan bien porque hay muchas células

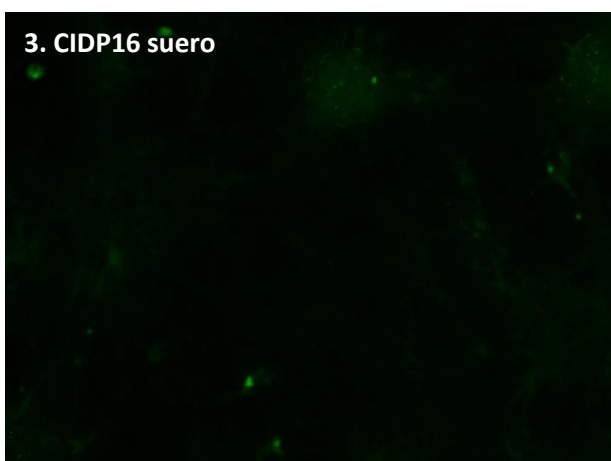
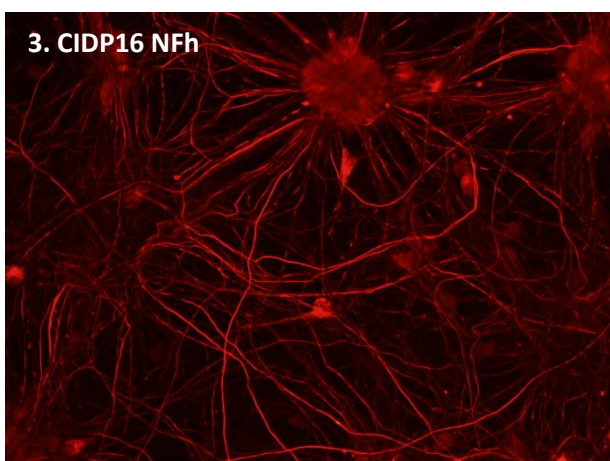
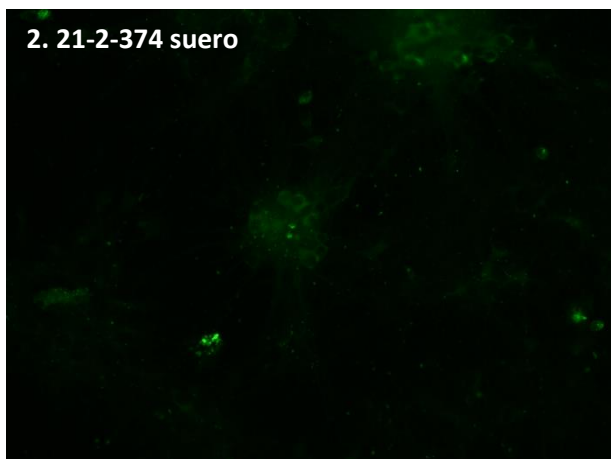
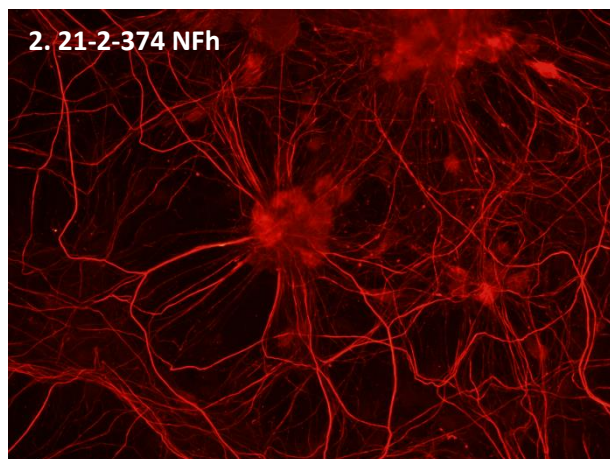
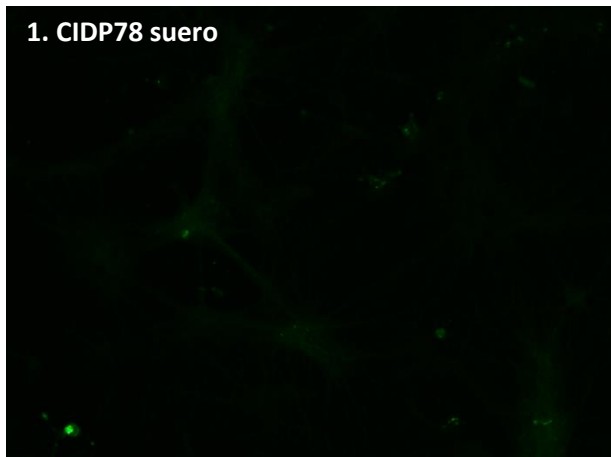
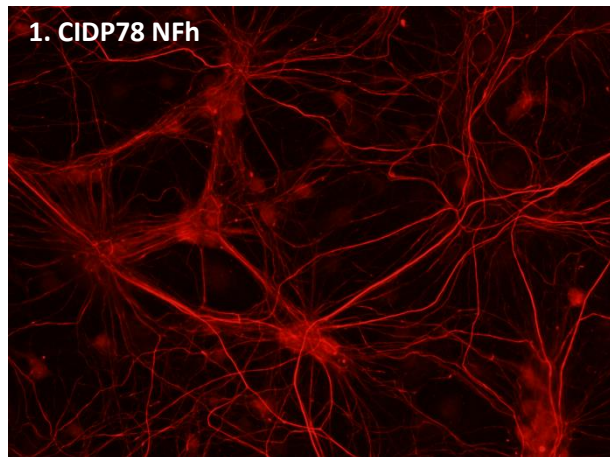
Resultado neuronas de médula disgregadas sin glía (FALTAN FOTOS!! (no las encuentro en ningún sitio!!)):

1. **CIDP78** (MRVM 1ª muestra , LIF+ CASPR1+): n-
2. **21-2-374** Box 295 (Bocanegra 1ª muestra Plasma, CASPR1+): n-
3. **CIDP16** (JCDHM, NF155+): n-
4. **CIDP41** (JML, NF155+): n-
5. **CIDP21** (RDP, panNF+): repetir
6. **23-271685** (panNF+): repetir
7. **CIDP44** (TMF, CNTN1+): n++
8. **21-2-94** (X4069 CNTN1+): n++
9. **Cneg 202-2**: n-
10. **Cneg 202-3**: n-
11. **Cneg 202-16**: n-

12. Doble ICC: panNF, MBP: no veo nada

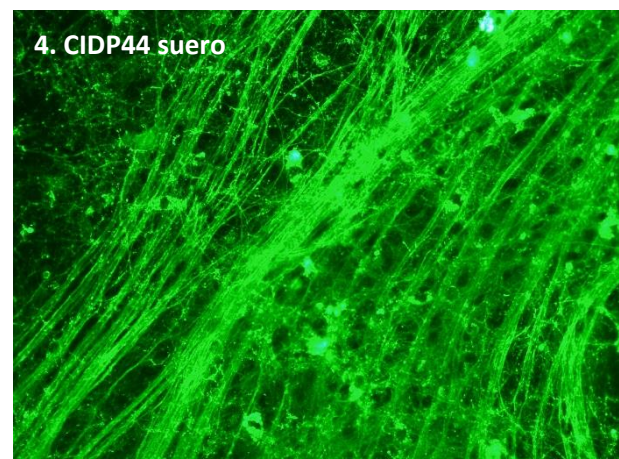
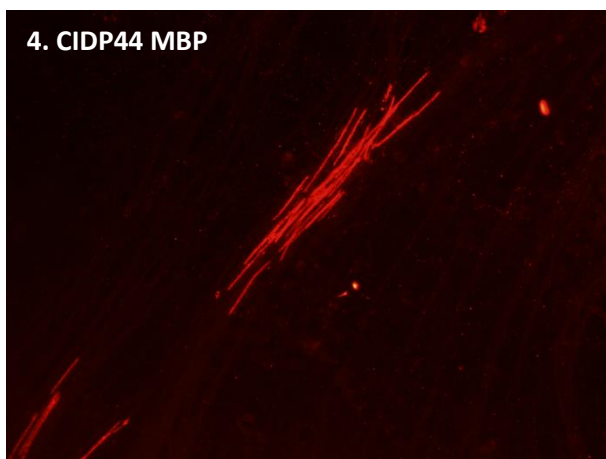
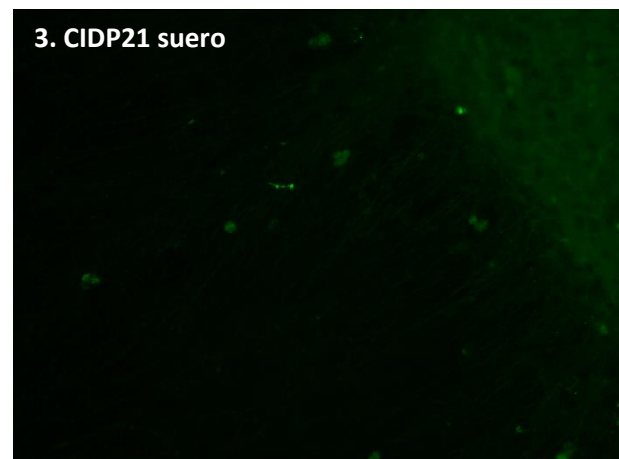
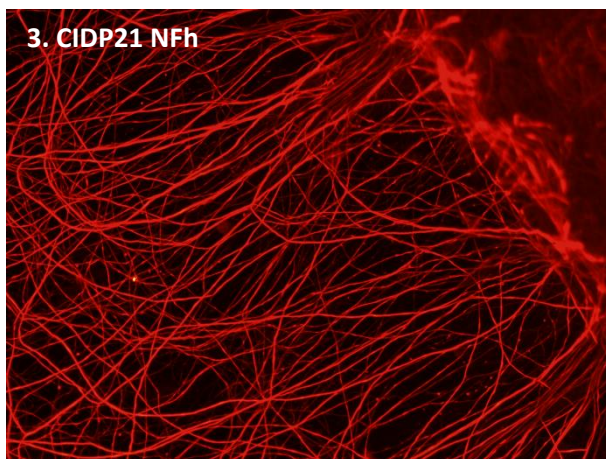
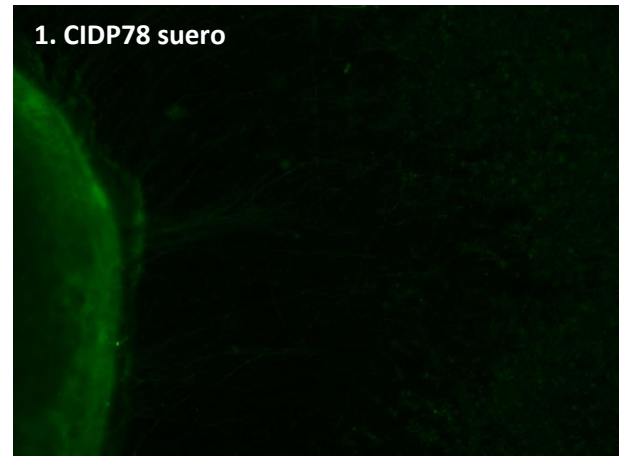
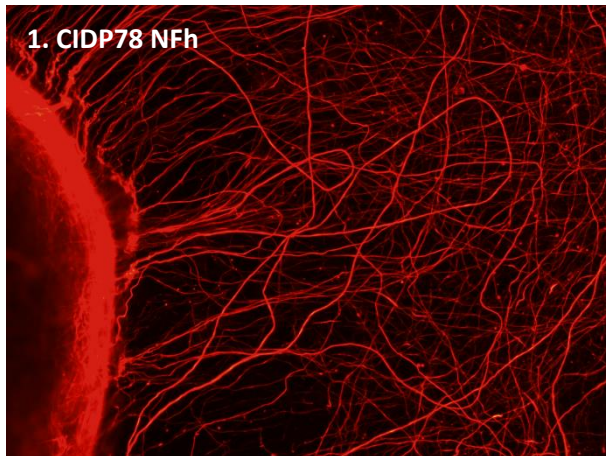
13. Doble ICC: MBP, NFh: no veo nada

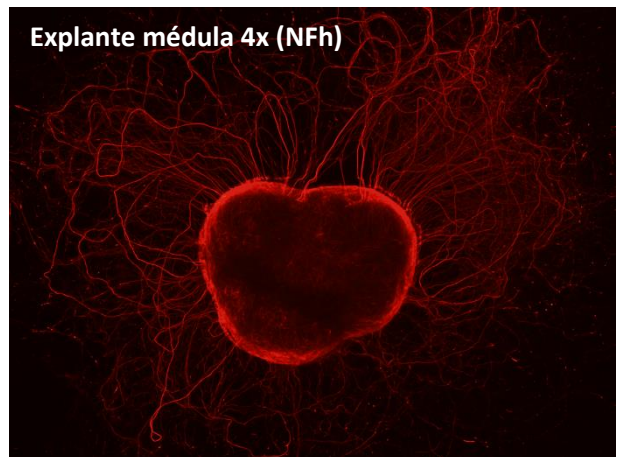
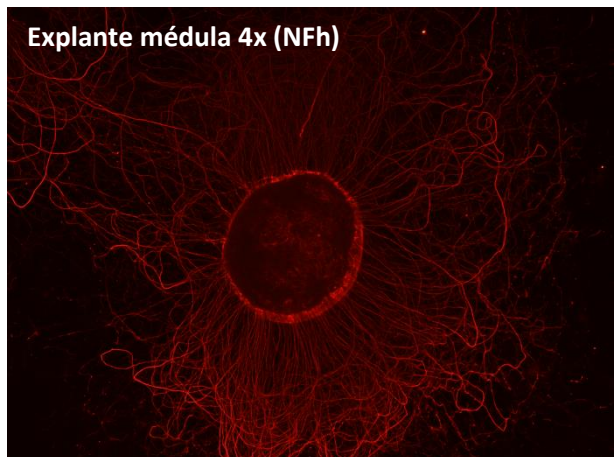
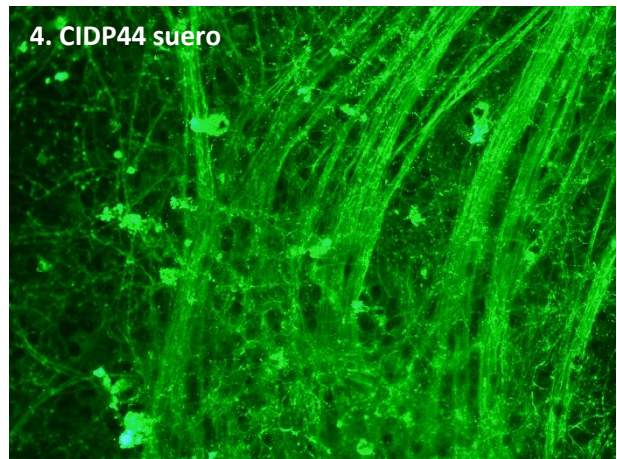
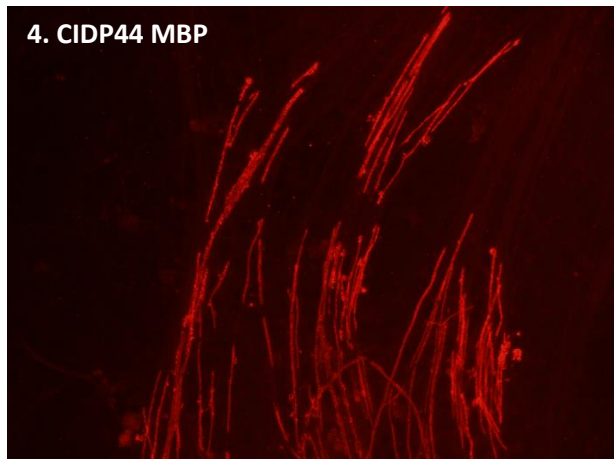
14. Doble ICC: CHAT: n++



Resultado explantes médula 11/05:

1. CIDP78 (MRVM 1ª muestra , LIF+ CASPR1+): n-
2. CIDP16: repetir
3. CIDP21: n-
4. CIDP44: n+++ (hay mucha mielina!)
5. Cneg 202-2: repetir





Resultado explantes médula 01/06:

1. CIDP78 (MRVM 1ª muestra , LIF+ CASPR1+): n-
2. CIDP16: n- (creo que marca las cels de Schwann)
3. CIDP21: n-
4. CIDP44: n+++ , no se ve bien la mielina
5. Cneg 202-2: repetir

21/06/2023

Coating Poly-D.Lys (culture slides)

Coating 8 culture slides con Poly-D 1/40 en PBS1x (de stock poly-d 1 mg/ml) : aprox 300 ul por pocillo

22/06/2023

Coating células + transfección Culture slides

8 culture slides:

- 6 Perfil
- 2 LRP4/CASPR2

Protocolo:

- Preparar mezclas transfección cada culture slide (8 pozos)
 - 2 ug DNA + 40 ul Optimem
 - 3,2 ul lipofectamina2000 + 40 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 10 ul de mezcla de transfección a cada pozo

23/06/2023

✓ ICC CASPR1 y Doble CNTN1/CASPR1

Muestras:

1. 23-2-554 immunoabsorbida
2. 22-2-374 (Bocanegra)
3. Cneg 204-11
4. CIDP78 (Vinuesa)

Protocolo: fijadas igual que siempre. Todo con ac. anti-Caspr1.

Absorción: resuspendo un pellet de HEKs (congelado a -20°C) en 200 ul de PBS1x, y le pongo 2 ul de suero 23-2-554. Dejar en rotación a Ambiente durante 2 horas

Resultado: aunque esta vez las células se han transfectado bien (almenos el comercial de Caspr1 se ve bien), no se ve positivo ni el control positivo. Hacerlas vivas???

✓ ICC Perfil nodales/paranodales (BD)

Muestras y resultado: 1 porta perfil

1. 23-2-641: neg : le hago el ELISA de screening de Caspr1 en Immuno y también es negativo
2. Cpos: pos

✓ IHC teasing nervio ciático rata

Teasing hecho por Elba y Marta día 01/06/2023

Muestras:

- 23-2-554 immunoabsorbida
- Control 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 1/100 (en bloqueo) 1h
- Ac comercial anti-NF 1/500 (en bloqueo) , 1h 4°C
- Ac secundarios: GAC488 + GAH594 IgG 1/1000 (en bloqueo) 1h
- Montar con Fluoromount

Resultado:

- 23-2-554 immunoabsorbida: justo en este trozo de tejido no se ven los paranodos!!
Repetir
- Control CNTN1+: marcaje paranodos

✓ Congelación PBMC (NHC E2115906)

6 tubos CPT de **Eduardo Carlos Quijano (H. Navarra, NHC Immuno E2115906)**: NF155+
pretratamiento

- 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)
- 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)
- Decantar el sobrenadante a un tubo y lavar con suero fisiológico 1:1
- Centrifugar 300g 5min
- Resuspender en suero fisiológico y contar las células: 25 millones
- Centrifugar 300g 5min
- Congelar en FBS+10%DMSO: 7 viales de aprox 3 millones/vial (1 ml de FBS+DMSO) :
23-7-926, Box PBMC 2- C4 a D1

23/06/2023

✓ **ELISA NF155 (subclases)**

Muestras y resultado: (manual)

- 23-298589: subclase NF155 predominante IgG4

✓ **ELISA NF155 (titulación)**

Muestras y resultado: (Quantalyser, IgG totales)

- 23-289775 (NHC 1744206, J.Moron García, 15/05/2023): título NF155 1/300
- 22-353683 (NHC 1744206, J.Moron García, 12/09/2022): título NF155 1/100 – 1/300
- 23-298589 (NHC E2115906, Eduardo Carlos Quijano, 01/06/2023): título NF155 1/300
- 23-308427 (NHC 1804526, JM Saludes Martí, 12/06/2023): título NF155 1/100
- 22-376503 (NHC 1804526, JM Saludes Martí, 17/10/2022): título NF155 1/300
- 23-308741 (NHC 1677062, Sixto Herrero, 12/06/2023): título NF155 1/300
- 23-225062 (NHC 1677062, Sixto Herrero, 07/02/2023): título NF155 1/300
- 23-307313: NF155 negativo

Del 28/06 al 11/07 estoy de vacaciones

12/072023

✓ Congelación PBMC (NHC 1976899)

6 tubos CPT de **Antonia Blanco Manzano (1976899)**: CASPR1+ pretratamiento

- 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)
- 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)
- Decantar el sobrenadante a un tubo y lavar con suero fisiológico 1:1
- Centrifugar 300g 5min
- Resuspender en suero fisiológico y contar las células: 25 millones
- Centrifugar 300g 5min
- Congelar en FBS+10%DMSO: 8 viales de aprox 3 millones/vial (1 ml de FBS+DMSO) : **23-7-927, Box PBMC 2 – D2 a D9**

Coating ELISA NF140, NF186

[NF140]_i = 0,25 mg/ml

[NF186]_i = 0,56 mg/ml

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

- NF140: 4 pozos : [NF140]_f = 5 ug/ml : 210 ul buffer + 4'2 ul
- NF186: 4 pozos : [NF186]_f = 5 ug/ml : 210 ul buffer + 1'9 ul

IMPORTANTE! DEJO EL COATING 2 NOCHES Y EL ELISA SALE MEJOR!!!

14/072023

✓ ELISA NF155, NF140, NF186, CASPR1, CNTN1 (titulación)

Muestras:

- 23-322355 (23-2-671) : panNF+. Titulación y subclases NF155. Confirmación NF140 y NF186
- 23-325449 (23-2-656) : CASPR1+. Titulación y subclases CASPR1
- 23-326657 (23-2-672) : CNTN1+. Titulación y subclases CNTN1

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)
 - 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%
- Ac secundarios:
 - Titulación / screening / confirmación: Incubar con **RAH IgG HRP** 1/3000 en leche 5% en PBS-tween 0'1% : 100 ul/pozo, 45 min
 - Subclases: Incubar con **MAH HRP** IgG1 o IgG2 o IgG3 o IgG4 1/1000 en leche 5% en PBS-tween 0'1% : 100 ul/pozo, 45 min
- 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	1 2
A prot	Cneg	322355 1/900	322355 IgG1	Cneg	Cneg	Cneg	325449 1/900	325449 IgG1	Cpos CNTN1	326657 1/8100	326657 IgG3	
B blanc	Cneg	322355 1/900	322355 IgG1	Cneg	Cneg	Cneg	325449 1/900	325449 IgG1	Cpos CNTN1	326657 1/8100	326657 IgG3	
C prot	Cpos NF155	322355 1/2700	322355 IgG2	Cpos NF140	Cpos NF186	Cpos CASPR1	325449 1/2700	325449 IgG2	326657 1/300	326657 1/24300	326657 IgG4	
D blanc	Cpos NF155	322355 1/2700	322355 IgG2	Cpos NF140	Cpos NF186	Cpos CASPR1	325449 1/2700	325449 IgG2	326657 1/300	326657 1/24300	326657 IgG4	
E prot	322355 1/100	322355 1/8100	322355 IgG3	322355 1/100	322355 1/100	325449 1/100	325449 1/8100	325449 IgG3	326657 1/900	326657 IgG1		
F blanc	322355 1/100	322355 1/8100	322355 IgG3	322355 1/100	322355 1/100	325449 1/100	325449 1/8100	325449 IgG3	326657 1/900	326657 IgG1		
G prot	322355 1/300	322355 1/24300	322355 IgG4	322355 1/300	322355 1/300	325449 1/300	325449 1/24300	325449 IgG4	326657 1/2700	326657 IgG2		
Hblanc c	322355 1/300	322355 1/24300	322355 IgG4	322355 1/300	322355 1/300	325449 1/300	325449 1/24300	325449 IgG4	326657 1/2700	326657 IgG2		

NF155 **NF140** **NF186** **CASPR1** **CNTN1**

Resultado

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	0,095	0,223	0,089	0,103	0,081	0,076	0,243	0,121	0,71	0,059	0,04	0
B blanc	0,128	0,077	0,086	0,099	0,086	0,122	0,09	0,07	0,193	0,085	0,043	0
C prot	0,385	0,146	0,042	0,754	0,847	1,05	0,107	0,029	0,41	0,062	1,228	0
D blanc	0,088	0,072	0,029	0,086	0,077	0,092	0,094	0,029	0,098	0,046	0,102	0
E prot	0,508	0,101	0,09	1,153	1,32	0,527	0,088	0,101	0,208	0,068	0	0
F blanc	0,093	0,13	0,046	0,1	0,067	0,138	0,07	0,028	0,097	0,061	0	0
G prot	0,331	0,092	0,653	0,984	1,135	0,395	0,054	0,149	0,099	0,032	0	0
Hblanc	0,076	0,075	0,137	0,078	0,053	0,089	0,039	0,112	0,057	0,018	0	0

- **23-322355 (23-2-671)** : Título NF155 1/2700. Subclases: IgG4 >> IgG3. Confirmando positividad de NF140 y NF186. El control positivo de NF155 ha salido demasiado bajo...
- **23-325449 (23-2-656)** : Título CASPR1 1/900. Subclases: no salen bien.
- **23-326657 (23-2-672)** : Título CNTN1 1/900. Subclase IgG4

17/072023

✓ ICC co-cultivos (día 46 - rata 01/06/2023)

Cojo cubres de los co-cultivos para ir viendo cómo va la diferenciación:

- 1 cubre explantes DRG
- 1 cubre explantes médula

Protocolo:

- Fijar 20 min con PFA 4%
- 1 lavado con PBS1x
- Bloquear con Goat serum 5% y 0'5% tritón (en PBS): 1h a RT
- Incubar con anticuerpos primarios diluídos en Goat serum 5% y 0'5% tritón (en PBS):
 - **MBP y NFh**: los 2 juntos overnight 4°C (cubres boca arriba en cajita puntas)
 - anti-Myelin basic protein SMI99, 808401 (Biolegend). Dil. **1/100** (mouse)
 - anti-Neurofilament H, AB5539 (Merck) **Dil. 1/500** (chicken)
- 3 lavados con PBS1x
- Incubar 1h con Ac. secundarios diluídos en Goat serum 5% y 0'5% tritón (todos a 1/500)
 - MBP y NFh: GAM488 + GAC594

- 3 lavados con PBS1x
- Montar con Fluoromount

Resultado: no se ve mielina!!!

✓ ELISA CASPR1 (screening BD) -Gemma-

Muestras:

- 23-2-642
- 23-2-643
- 23-2-668
- 23-2-669

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	23-2-668										
B blanc	Cneg	23-2-668										
C prot	Cpos CASPR1	23-2-669										
D blanc	Cpos CASPR1	23-2-669										
E prot	23-2-642	23-2-670										
F blanc	23-2-642	23-2-670										
G prot	23-2-643											
Hblanc	23-2-643											

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	0,005	0,009										
B blanc	0,005	0,005										
C prot	0,655	0,007										
D blanc	0,005	0,007										
E prot	0,005	0,019										
F blanc	0,018	0										
G prot	0,004											
Hblanc	0,005											

Resultado:

- 23-2-642: neg
- 23-2-643: neg
- 23-2-668: neg
- 23-2-669: neg

19/072023

✓ **Coating placas para co-cultivos y neuronas**

- Coating con Poly-D-lys 1/40 : incubar overnight a 37°C
- Día siguiente: lavar pozos y hacer coating con Laminina 2'5 ul/ml : incubar mínimo 1h a 37°C
 - Explantes DRG: 1 placa de 24 wells con 1 cubre de 12mm en cada pozo, y 6 culture slides
 - Neuronas DRG: 4 placas 100 cc (para IP) y 1 placa 60 cc con 26 cubres 9mm
 - Neuronas médula: 2 placas 60 cc con 26 cubres 9mm : una placa la hago con sólo neuronas (tratadas como neuronas DRG), y otra con todas las células (tratadas como co-cultivos)

*Hago una prueba haciendo coating overnight con **Matrigel 1/20**

- Explantes DRG: 1 placa de 24 wells con 1 cubre de 12mm en cada pozo : hago 12w con DRG disgregadas, y 12w con explantes

✓ ELISA CASPR1 (titulación y subclases, Gemma)

Muestras:

- 23-2-554: titular Caspr1 y subclases
- CIDP78: subclases Caspr1 (prueba anticuerpos secundarios nuevos)
- Regine: subclases Caspr1 (prueba anticuerpos secundarios nuevos)

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%
- Ac secundarios:
 - Titulación / screening / confirmación: Incubar con **RAH IgG HRP** 1/3000 en leche 5% en PBS-tween 0'1% : 100 ul/pozo, 45 min
 - Subclases: Incubar con **MAH HRP** IgG1 o IgG2 o IgG3 o IgG4 1/1000 en leche 5% en PBS-tween 0'1% (**Las subclases IGg2 e IgG3 son nuevas!!!**): 100 ul/pozo, 45 min
- 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	23-2-554 1/900	23-2-554 IgG1	CiDP78 IgG1	CiDP78 IgG2 nuevo	Regine IgG3						
B blanc	Cneg	23-2-554 1/900	23-2-554 IgG1	CiDP78 IgG1	CiDP78 IgG2 nuevo	Regine IgG3						
C prot	Cpos CASPR1	23-2-554 1/2700	23-2-554 IgG2	CiDP78 IgG2	CiDP78 IgG3 nuevo	Regine IgG4						
D blanc	Cpos CASPR1	23-2-554 1/2700	23-2-554 IgG2	CiDP78 IgG2	CiDP78 IgG3 nuevo	Regine IgG4						
E prot	23-2-554 1/100	23-2-554 1/8100	23-2-554 IgG3	CiDP78 IgG3	Regine IgG1	Regine IgG2 nuevo						
F blanc	23-2-554 1/100	23-2-554 1/8100	23-2-554 IgG3	CiDP78 IgG3	Regine IgG1	Regine IgG2 nuevo						
G prot	23-2-554 1/300	23-2-554 1/24300	23-2-554 IgG4	CiDP78 IgG4	Regine IgG2	Regine IgG3 nuevo						
Hblanc	23-2-554 1/300	23-2-554 1/24300	23-2-554 IgG4	CiDP78 IgG4	Regine IgG2	Regine IgG3 nuevo						

Resultado:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	0,041	0,103	0,156	0,09	0,146	0,027						
B blanc	0,046	0,034	0,025	0,037	0,157	0,024						
C prot	1,077	0,079	0,023	0,029	0,17	1,078						
D blanc	0,042	0,033	0,02	0,023	0,136	0,032						
E prot	0,555	0,041	0,026	0,085	0,078	0,948						
F blanc	0,069	0,032	0,018	0,06	0,036	0,11						
G prot	0,244	0,031	0,06	0,136	0,064	0,034						
Hblanc	0,074	0,026	0,027	0,025	0,02	0,037						

- 23-2-554: título Caspr1 1/2700, subclases un poco IgG1
- CIDP78:
 - Anticuerpos secundarios antiguos: un poco IgG1 y un poco IgG4
 - Anticuerpos secundarios nuevos (IgG2, IgG3): no salen!
- Regine:
 - Anticuerpos secundarios antiguos: sólo IgG4
 - Anticuerpos secundarios nuevos (IgG2, IgG3): sale muy alto IgG2.

20/07/2023

✓ Co-cultivo de neuronas DRG i células de Schwann (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%)
- 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

Co-cultivos (explantes DRG)

- DO : Añadir 400 ul de medio C (co-culture medium) 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
- Poner un DRG o trocito de médula en cada pozo/cubre e incubar a 37°C

Neuronas DRG

- Pasar los DRG a un tubo de 15 ml : con pipeta Pasteur de cristal y tetina
- Centrifugar a 300 rpm 5 min
- Eliminar el sobrenadante (con pasteur cristal+ tetina) e ir tirando a una placa, para no perder ningún DRG.
- Poner 5 ml de PBS1x y centrifugar a 300 rpm 5 min
- Eliminar el sobrenadante y añadir 4,5 ml PBS + 500 ul de tripsina 2,5% sin bromophenol
- Incubar 15min a 37°C (en el baño). Homogeneizar suavemente cada 5 minutos.
- Añadir 5 ml de medio L15 con FBS para inactivar la tripsina
- Centrifugar a 300 rpm 10min
- Pasar el pellet a un eppendorf con 1 ml de medio NG, disgregar con pipetas Pasteur de vidrio finas (se hacen finas con el bunsen y se autoclavan).

Medio NG:

- 48 ml de medio Neurobasal
 - 1 ml de suplement B27
 - 500 µl de glutamax
 - 500 µl de Pen-Str
 - 25 µl de NGF
- Dividir el ml de células entre **las 4 placas de 100 cc, la placa de 60cc con cubres, y los 12w que usaré para co-cultivos disgregados.**

***Guardo en MACS Tissue Storage Solution (130-100-008, Milteny) las médulas de 4 embriones y las dejo en 4°C hasta el día siguiente.**

21/07/2023

✓ Disgregar médulas (Adult brain dissociation Kit - Milteny)

Disgrego las médulas guardadas en Tissue Storage Solution el día anterior (sacadas de embriones E16 de rata).

Uso un kit que me deja Xavi: Adult brain dissociation kit (130-107-677, Milteny), y uso la máquina GentleMACS.

Protocolo kit:

Reagent and instrument preparation

▲ For subsequent cultivation it is recommended to dissociate at least 800 mg of adult neural tissue.

▲ Volumes given below are for one adult mouse brain (max. 500 mg) in 1980 μ L enzyme mix. When working with less than 500 mg, use the same volumes as indicated. When working with neural tissue from adult rats or distinct brain regions, determine the weight and scale up all reagent volumes and total volumes accordingly. A maximum of 500 mg neural tissue per C Tube can be processed.

1. Enzyme P is ready to use. Prepare aliquots of appropriate volume to avoid repeated freeze-thaw-cycles. Store aliquots at -20°C . This solution is stable for 6 months. Resuspend the lyophilized powder in the vial labeled Enzyme A with 1 mL Buffer A. Do not vortex. This solution should then be aliquoted and stored at -20°C for later use. Avoid repeated freeze-thaw-cycles: **en este caso las enzimas ya estaban alicuotadas.**

2. Prepare enzyme mix 1 and enzyme mix 2 according to the table below (**las enzimas están a -20°C y los buffers a 4°C**)

- Enzyme mix 1: 50 μ L Enzyme P + 1900 μ L Buffer Z
- Enzyme mix 2: 20 μ L Buffer Y + 10 μ L Enzyme A

Dissociation protocol

▲ 20 mg up to 500 mg of rodent neural tissue in 2 mL enzyme mix can be processed in one C Tube.

▲ For cell culture experiments subsequent to tissue dissociation, all steps should be performed under sterile conditions.

1. Remove the rodent neural tissue. Wash neural tissue in cold D-PBS.

2. Prepare the appropriate volume of enzyme mix 1 (refer to table in section 1) and transfer it into a gentleMACS C Tube.

3. Cut larger tissue (e.g. whole brain or spinal cord) into approximately 8 sagittal slices or 0.5 cm pieces using a scalpel. In case of smaller tissue, e.g., hippocampus continue directly with step 4: **en este caso no corto las médulas porque ya son suficientemente pequeñas.**

4. Transfer the tissue pieces into the C Tube containing 1950 μ L of enzyme mix 1.
5. Transfer 30 μ L of enzyme mix 2 into the C Tube.
6. Tightly close C Tube and attach it upside down onto the sleeve of the gentleMACS Octo Dissociator with Heaters.
7. Run the appropriate gentleMACS Program:
 - 20–100 mg: 37C_ABDK_02
 - >100 mg: 37C_ABDK_01.

*Uso el programa 37C_ABDK_02 porque no hay mucha cantidad: poner el tubo boca abajo en el GentleMACS con la parte plana hacia adelante, poner el Heater (pieza amarilla), seleccionar programa (dura 30min).

8. After termination of the program, detach C Tube from the gentleMACS Octo Dissociator with Heaters.
9. Centrifuge briefly to collect the sample at the bottom of the tube.
10. Resuspend sample and apply it to a MACS SmartStrainer (70 μ m) placed on a 50 mL tube.

▲ Note: Moisten MACS SmartStrainer with buffer before use.

▲ Note: When upscaling the reagent volume and total volumes, increase also the number of MACS SmartStrainers (70 μ m). One MACS SmartStrainer (70 μ m) can be used for one adult mouse brain.

▲ Note: Cells with a diameter >70 μ m may be lost. To obtain these cells within the flow through, use a cell strainer with an appropriate mesh size.

11. Add 10 mL of cold D-PBS to the C Tube, close C Tube, shake gently and apply the D-PBS onto the MACS SmartStrainer (70 μ m).

12. Discard MACS SmartStrainer (70 μ m) and centrifuge cell suspension at 300 \times g for 10 minutes at 4 °C. Aspirate supernatant completely: en este caso no lo he centrifugado a 4°C porque la centrifuga de cultivos no tieneregulador de temperatura.

13. Proceed to 2.3 for debris removal: no hago este paso!!!

*Después de aspirar el sobrenadante, resuspendo las células en 1 ml de **medio C** (co-culture médium), y las planto en 2 placas de 60cc con 26 cubres 9mm (previamente he hecho coating con Poly-D 1/40 overnight, y laminina 2'5 ul/ml 2h):

- 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

✓ Cambios medios co-cultivos, neuronas DRG y neuronas médula: rata
20/07/2023

Pongo el protocolo general para no tener que ir poniendo cada vez que cambio los medios:

- **Explantos DRG:** 1 placa de 24 wells con 1 cubre de 12mm en cada pozo, y 6 culture slides
 - D0 : Añadir 400 ul de medio C (co-culture medium) a cada pozo con cubre:
 - 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
 - D1: cambiar la mitad del medio (medio C)
 - D4 : cambiar el medio por medio NG:
 - 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
 - D7 : cambiar el medio por Medio de mielinización co-cultivos **SIN FBS:**
 - DMEM (con D-glucosa y Glutamax): 44,5 ml (ref. 10569-010 ThermoFisher)
 - 10% FBS: 5 ml
 - 1% Pen-Str: 0,5ml
 - 50 ug/ml de ácido ascórbico: 500 ul del stock 5mg/ml (1/100 en el medio)
 - 0,5 uM Forskolin: 2,5ul del stock 10mM (1/20000 en el medio)
 - D8: cambiar mitad del medio de mielinización: a partir de aquí ir cambiando la mitad del medio de mielinización sin FBS cada 3 días
- **Explantos DRG MATRIGEL:** 1 placa de 24 wells con 1 cubre de 12mm en cada pozo : hago 12w con DRG disgregadas, y 12w con explantes
 - Se tratan igual que los explantes DRG normales
 - Voy mirando los cultivos y me parece que están más bonitos los del coating de matrigel (células más pegadas, axones más largos): a medida que pasan los días, las células de DRG disgregadas crecen demasiado y es imposible ver nada en las inmunos)

- **Neuronas DRG:** 4 placas 100 cc (para IP) y 1 placa 60 cc con 26 cubres 9mm
 - DO : Añadir medio NG
 - 48 ml de medio Neurobasal
 - 1 ml de suplement B27
 - 500 µl de glutamax
 - 500 µl de Pen-Str
 - 25 µl de NGF
 - D1: cambiar la mitad de medio por medio NGF
 - 50 ml de medio NG
 - 10 µl de 5-fluorodesoxiuridina (1)
 - 10 µl de uridina (2)
 - 5 µl de AraC 10 mM
 - D4: cambiar la mitad de medio por medio NG : a partir de aquí ir cambiando cada 2-3 días
- **Neuronas médula:** 2 placas 60 cc con 26 cubres 9mm : una placa la hago con sólo neuronas (tratadas como neuronas DRG), y otra con todas las células (tratadas como co-cultivos)

21/07/2023

Coating Poly-D.Lys (culture slides)

Coating 8 culture slides con Poly-D 1/40 en PBS1x (de stock poly-d 1 mg/ml) : aprox 300 ul por pocillo

24/07/2023

Coating células + transfección Culture slides

12 culture slides:

- 7 Perfil
- 5 LRP4

Protocolo:

- Preparar mezclas transfección cada culture slide (8 pozos)
 - 2 ug DNA + 40 ul Optimem
 - 3,2 ul lipofectamina2000 + 40 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 10 ul de mezcla de transfección a cada pozo

Congelación HEK293

Congello 2 viales de p7 con 3 millones de cels/vial : en medio HEK293 con 10%DMSO

25/07/2023

✓ ICC Perfil nodales/paranodales (BD)

Muestras y resultado: 4 portas perfil (culture slides, fijado)

- 23-2-642: neg
- 23-2-643: neg
- 23-2-668: neg
- 23-2-669: neg
- ROB008 (muestra de Rotterdam del Interlab validation): neg
- Muestra LGI4+ Japón: neg (mucho fondo)

27/07/2023

✓ ELISA NF186, NF155, CASPR1 (titulación y subclases)

Muestras:

- 23-2-671 (23-322355) : panNF+. Titulación y subclases NF186
- 23-2-698 (23-271695) 25/04/2023: panNF+. Titulación y subclases NF186
- 23-2-725 (mismo paciente que 698 pero del día 30/06/2023) : panNF+. Titulación y subclases NF186
- 23-2-554 (Box 331) : confirmar NF186 (no se sabe si es panNF o CASPR1)
- 23-2-656 (23-325449) : CASPR1+. Titulación y subclases CASPR1 (LA TITULACIÓN LA HAGO CON QUANTALYSER)
- 23-2-554 : subclases CASPR1 (ya se hizo la titulación el día 19/07/23)
- ROB008 : NF155+. Confirmar positividad

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%
- Ac secundarios:
 - Titulación / screening / confirmación: Incubar con **RAH IgG HRP** 1/3000 en leche 5% en PBS-tween 0'1% : 100 ul/pozo, 45 min
 - Subclases: Incubar con **MAH HRP** IgG1 o IgG2 o IgG3 o IgG4 1/1000 en leche 5% en PBS-tween 0'1% (**Las subclases IGg2 e IgG3 son nuevas!!!**): 100 ul/pozo, 45 min
- 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	322355 1/900	23-2-698 1/100	23-2-698 1/8100	23-2-725 1/900	322355 IgG1	23-2-698 IgG1	23-2-725 IgG1	23-2-554 1/100	325449 IgG1	23-2-554 IgG1	Cneg
B blanc	Cneg	322355 1/900	23-2-698 1/100	23-2-698 1/8100	23-2-725 1/900	322355 IgG1	23-2-698 IgG1	23-2-725 IgG1	23-2-554 1/100	325449 IgG1	23-2-554 IgG1	Cneg
C prot	Cpos NF186	322355 1/2700	23-2-698 1/300	23-2-698 1/24300	23-2-725 1/2700	322355 IgG2	23-2-698 IgG2	23-2-725 IgG2	Cneg	325449 IgG2	23-2-554 IgG2	Cpos CASPR1
D blanc	Cpos NF186	322355 1/2700	23-2-698 1/300	23-2-698 1/24300	23-2-725 1/2700	322355 IgG2	23-2-698 IgG2	23-2-725 IgG2	Cneg	325449 IgG2	23-2-554 IgG2	Cpos CASPR1
E prot	322355 1/100	322355 1/8100	23-2-698 1/900	23-2-725 1/100	23-2-725 1/8100	322355 IgG3	23-2-698 IgG3	23-2-725 IgG3	Cpos NF155	325449 IgG3	23-2-554 IgG3	
F blanc	322355 1/100	322355 1/8100	23-2-698 1/900	23-2-725 1/100	23-2-725 1/8100	322355 IgG3	23-2-698 IgG3	23-2-725 IgG3	Cpos NF155	325449 IgG3	23-2-554 IgG3	
G prot	322355 1/300	322355 1/24300	23-2-698 1/2700	23-2-725 1/300	23-2-725 1/24300	322355 IgG4	23-2-698 IgG4	23-2-725 IgG4	ROB008 1/100	325449 IgG4	23-2-554 IgG4	
Hblanc	322355 1/300	322355 1/24300	23-2-698 1/2700	23-2-725 1/300	23-2-725 1/24300	322355 IgG4	23-2-698 IgG4	23-2-725 IgG4	ROB008 1/100	325449 IgG4	23-2-554 IgG4	

NF186 **NF155** **CASPR1**

Resultado:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	0,025	0,58	0,147	0,006	0,017	0,177	0,021	0,016	0,028	0,201	0,057	0,049
B blanc	0,019	0,014	0,067	0,009	0,01	0,017	0,006	0,004	0,047	0,047	0,009	0,025
C prot	0,742	0,191	0,051	0,005	0,009	0,034	0,017	0,013	0,102	0,009	0,072	1,819
D blanc	0,028	0,008	0,027	0,005	0,008	0,013	0,017	0,016	0,123	0,202	0,008	0,086
E prot	1,697	0,07	0,021	0,083	0,041	0,164	0,01	0,02	0,815	0,087	0,022	
F blanc	0,06	0,004	0,01	0,046	0,009	0,01	0,021	0,036	0,355	0,014	0,011	
G prot	1,354	0,034	0,015	0,07	0,05	1,782	0,006	0,018	0,092	0,123	0,012	
Hblanc	0,027	0,027	0,028	0,03	0,023	0,023	0,014	0,021	0,137	0,015	0,026	

- **23-2-671 (23-322355)** : panNF+. Título NF186 1/2700 (IgG totales). Subclases: IgG4>>IgG1, IgG3
- **23-2-698 (23-271695)** 25/04/2023: panNF+. Título NF186 1/100 (IgG totales). Subclases negativas!!!
- **23-2-725** (mismo paciente que 698 pero del día 30/06/2023) : panNF+. NF186 negativa, subclases negativas
- **23-2-554** (Box 331) : confirmar NF186 (no se sabe si es panNF o CASPR1) : NF186 negativa
- **23-2-656 (23-325449)** : CASPR1+. Título CASPR1 entre 1/900 y 1/2700 (muy límite en 1/2700). Subclases CASPR1 IgG1 y IgG4 (débiles las dos)
- **23-2-554** : subclases CASPR1 (ya se hizo la titulación el día 19/07/23). subclases CASPR1 negativas
- **ROB008** : NF155 negativo

✓ ELISA NF155

Muestras y resultado: (Quantalyser, IgG totales)

- 23-334068 (Jaume Marcet Lucas, NHC: 1570697, 17/7/23): título de NF155 1/300
- 23-243904 (Jaume Marcet Lucas, NHC 1570697, 06/03/23): título de NF155 1/900-1/2700

28/07/2023

✓ ICC co-cultivos DRG (día 77 - rata 11/05/2023)

1 culture slide

Muestras:

- | | |
|--|--|
| 1. CIDP15 (GDP1, LIF+) | 5. CIDP78 (MRVM 1ª muestra , LIF+ CASPR1+) |
| 2. CIDP15 (GDP1, LIF+) | 6. 179-06 (MRVM 26/08/15) |
| 3. 151-21 (GDP2) | 7. 179-06 (MRVM 26/08/15) |
| 4. CIDP78 (MRVM 1ª muestra , LIF+ CASPR1+) | 8. Cneg |

Protocolo:

- Incubar con **suero 1/50** en medio de mielinización (6 ul en 300 ul) : 2h 37°C
- 1 lavado con PBS1x
- Fijar 20 min con PFA 4%
- 1 lavado con PBS1x

- Bloquear 30min con Goat serum 5% tritón 0,5%
- Incubar con anticuerpo primario diluído en **Goat serum 5% tritón 0'5%** (2h RT): **MBP** anti-Myelin basic protein SMI99, 808401 (Biolegend). Dil. **1/100** (mouse)
- 3 lavados con PBS1x
- Incubar 1h con Ac. secundarios diluídos en Goat serum 5% tritón 0'5% (todos a 1/500): **GAH488 IgG** (suero) + **GAM594** (MBP)
- 3 lavados con PBS1x
- Montar con fluoromount

Resultado: no salen bien. Las células ya están muy crecidas y no se ve la mielina

✓ [ICC co-cultivos \(día 56 - rata 01/06/2023\)](#)

Cojo 2 cubres de los co-cultivos para ver cómo va la diferenciación:

Protocolo:

- Fijar 20 min con PFA 4%
- 1 lavado con PBS1x
- Bloquear con Goat serum 5% y 0'5% tritón (en PBS): 1h a RT
- Incubar con anticuerpos primarios diluídos en Goat serum 5% y 0'5% 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
- 3 lavados con PBS1x
- Incubar 1h con Ac. secundarios diluídos en Goat serum 5% y 0'5% tritón (todos a 1/500)
 - MBP y NFh: GAM488 + GAC594
- 3 lavados con PBS1x
- Montar con Fluoromount

Resultado: no se ve mielina!!!

[Congelación HEK293](#)

Congello 6 viales de p7 con 3 millones de cels/vial : en medio HEK293 con 10%DMSO

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

31/07/2023

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 ug DNA + 40 ul Optimem
 - 3,2 ul lipofectamina2000 + 40 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 10 ul de mezcla de transfección a cada pozo

03/08/2023

✓ ELISA CASPR1 (screening BD) -Gemma-

Muestras y resultado final:

- | | |
|-----------------|-----------------|
| · 23-2-670: neg | · 23-2-814: neg |
| · 23-2-727: neg | · 23-2-815: neg |
| · 23-2-743: neg | · 23-2-816: neg |
| · 23-2-813: neg | · 23-2-817: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

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	Cneg	23-2-743	23-2-816									
B blanc	Cneg	23-2-743	23-2-816									
C prot	Cpos CASPR1	23-2-813	23-2-817									
D blanc	Cpos CASPR1	23-2-813	23-2-817									
E prot	23-2-670	23-2-814										
F blanc	23-2-670	23-2-814										
G prot	23-2-727	23-2-815										
Hblanc	23-2-727	23-2-815										

Resultado:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	0,037	0,08	0,099									
B blanc	0,05	0,072	0,131									
C prot	1,015	0,076	0,064									
D blanc	0,042	0,063	0,044									
E prot	0,07	0,049										
F blanc	0,033	0,041										
G prot	0,004											
Hblanc	0,005											

04/08/2023

✓ [ICC GlialCAM en células vivas \(Gemma\)](#)

Objetivo: pasar 50 muestras de LCR de pacientes EM en HEKs transfectadas con GlialCAM vivas.

Protocolo cels vivas (sin fijar):

- Incubar con suero 1/100 o LCR 1/10 en medio HEK293 (1h a 37°C) : preparar 250 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 anti-CMYC diluído 1/200 en goat serum 5% (1h a RT)
- 3 lavados con PBS1x
- Incubar con Ac.secundarios GAM488 + GAH594 diluídos 1/750 en goat serum 5% (1h a RT)
- 3 lavados PBS1x
- Montar con Fluoromount

Resultado: no se ve nada con el c-myc!!! Ha faltado permeabilizar

✓ [ICC Perfil nodales/paranodales BD \(Gemma\)](#)

CNTN1, NF140, NF155, NF186 (cels fijadas, suero 1/100)

Muestras y resultado:

- 23-2-743: neg
- 23-2-813: NF155 pos (ya conocido) : titular!!

07/08/2023

✓ [ICC Perfil nodales/paranodales BD \(Gemma\)](#)

CNTN1, NF140, NF155, NF186 (cels fijadas, suero 1/100)

Muestras y resultado:

- 23-2-814: neg
- 23-2-815: neg
- 23-2-816: neg
- 23-2-817: neg

[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

✓ Extracción DNA (HLA)

Muestras:

- DNA CNTN1-25: Helmut Stangassinger (pellet leucocitos)

*Del resto de DNAs que faltaban por extraer bajo los EDTAs que tenía congelados para que se extraigan y se procesen en immuno

- DNA CNTN1-23: Luga-001 10/09/2021 baseline (EDTA congelado)
- DNA CNTN1-24: Luga-004 04/11/2021 (EDTA congelado)
- DNA CNTN1-26: Erika Josmary Cedeño Clavijo (EDTA congelado)
- DNA CASPR1-6: Gerardo Pérez Herrera (EDTA congelado)
- Bajramovski (EDTA congelado)
- Dumitru (EDTA congelado)

Protocolo: QIAamp Blood Mini Kit (Qiagen), protocol DNA purification from blood or body fluids (spin protocol) : protocol para purificar DNA de sangre, plasma, suero, linfocitos y otros fluidos corporales.

Cosas a hacer antes de empezar:

- Equilibrar muestras a temperatura ambiente (15-25 °C)
- Calentar el baño o el bloque seco a 56°C
- Equilibrar el Buffer AE a temperatura ambiente
- Si hay precipitado en el Buffer AL, disolver incubándolo a 56°C.

Protocolo:

- Poner 20 ul de Qiagen Protease en un eppendorf vacío
- Añadir 200 ul de muestra al eppendorf (si la muestra son leucocitos, añadir 200 ul de PBS1x a las células)
- Añadir 200 ul de Buffer AL. Mezclar con vórtex 15s.
- Incubar a 56°C 10 min
- Centrifugar brevemente los tubos para eliminar las burbujas
- Añadir 200 ul de etanol (96-100%) y mezclar con vórtex 15s.
- Pasar toda la mezcla a una QIAamp Mini spin column y centrifugar 1min a 6000g. Poner la columna en un nuevo collection tube y descartar el tubo anterior.
- Añadir 500 ul de Buffer AW1 a la columna. Centrifugar 1min a 6000g. Poner la columna en un nuevo collection tube y descartar el tubo anterior.
- Añadir 500 ul de Buffer AW2, y centrifugar 3min a máxima velocidad.
- Eliminar el líquido del collection tube y volver a centrifugar 1min a máxima velocidad.
- Poner la columna en un eppendorf y añadir 50 ul de Buffer AE a la columna.

- Incubar a temperatura ambiente 5min y centrifugar 1min a 6000g
- Cuantificar el DNA.

Resultado:

- DNA CNTN1-25: Helmut Stangassinger : **106 ng/ul**

✓ IHC teasing nervio ciático cerdo

Muestras:

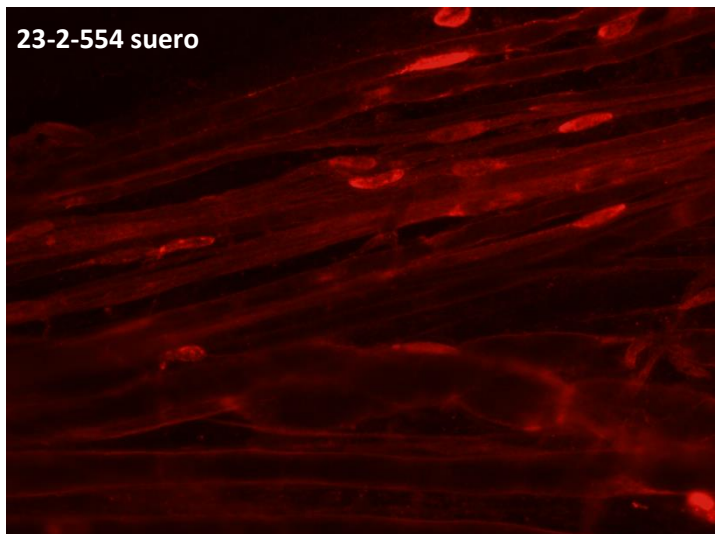
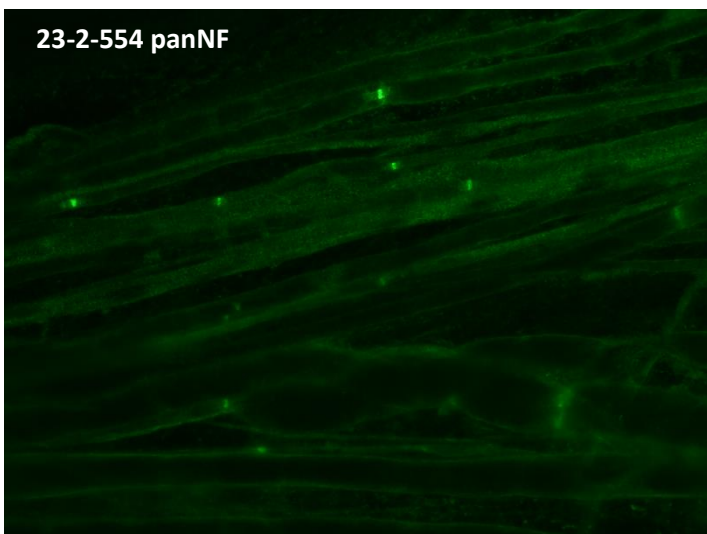
- 23-2-554 (confirmar positividad CASPR1)
- Cpos CNTN1+

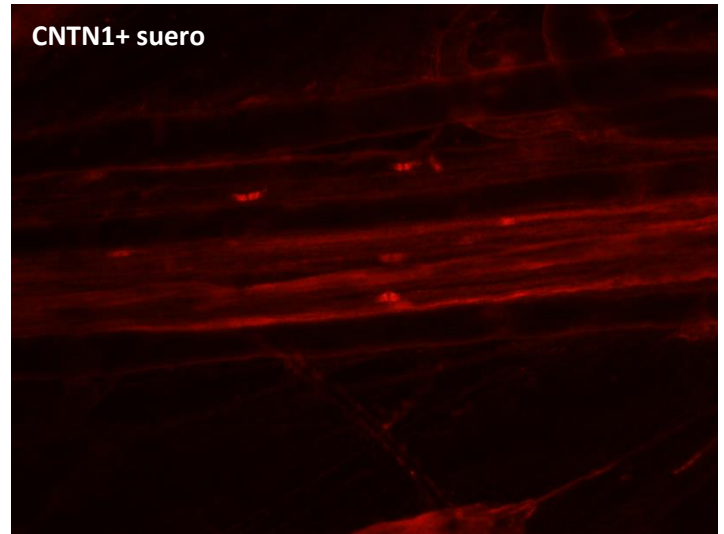
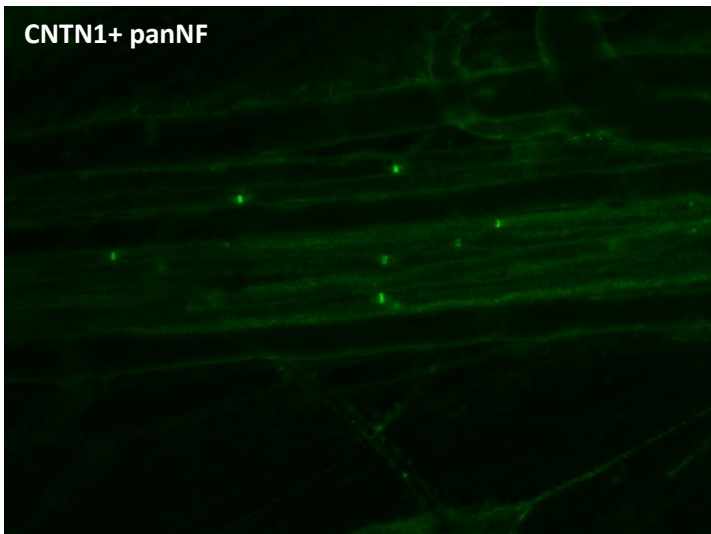
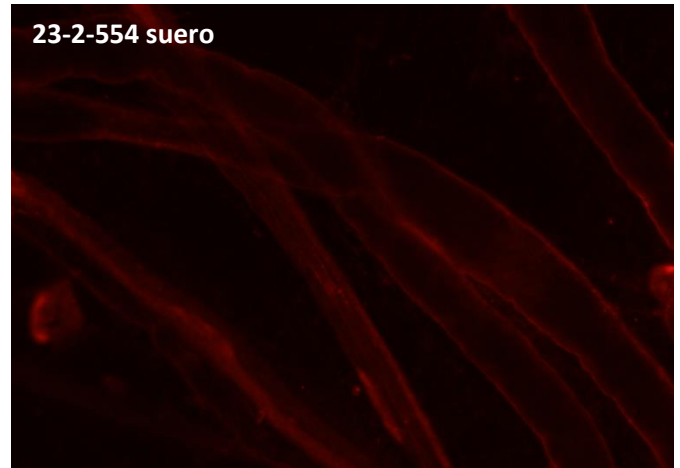
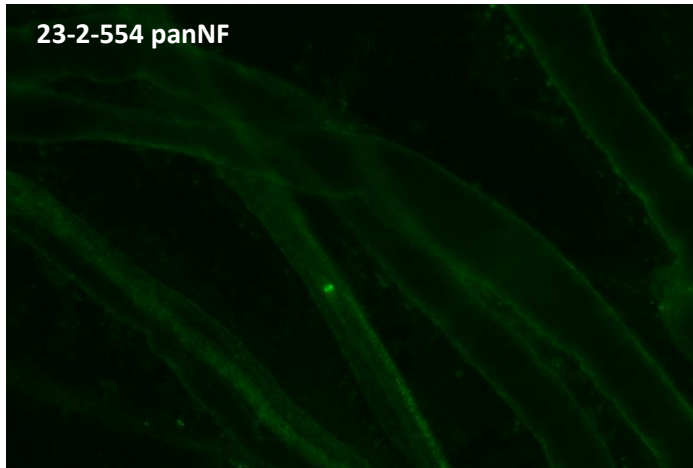
Protocolo: (entre cada paso hacer 3 lavados con PBS1x)

- 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:

- 23-2-554: marca el paranodo, aunque el marcaje no es tan claro como en el control positivo : inmuoabsorber muestra y repetir teasing (también hacer ICC en perfil, caspr1 y doble)





08/08/2023

Coating células + transfección Culture slides

18 culture slides:

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

Protocolo:

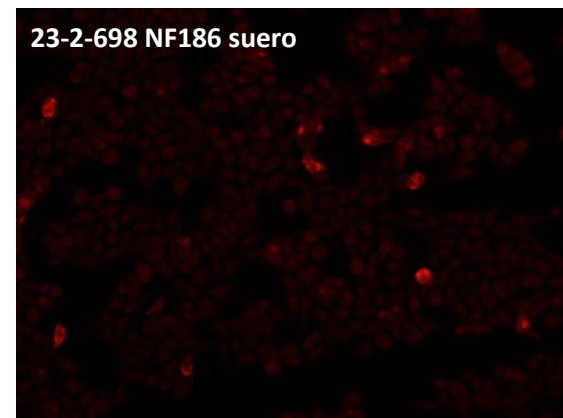
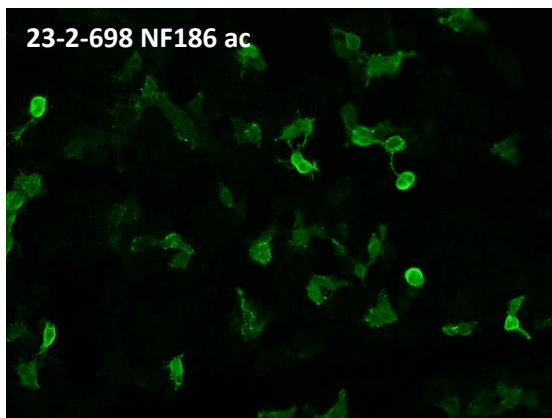
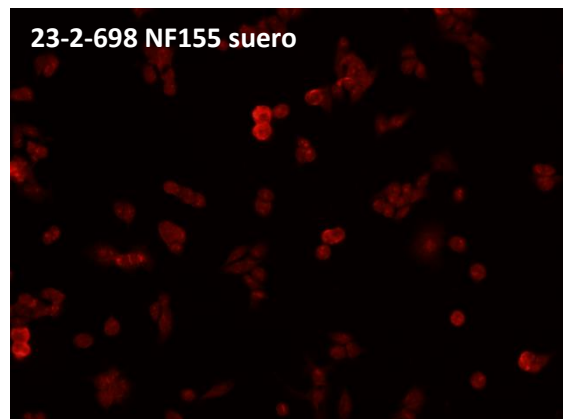
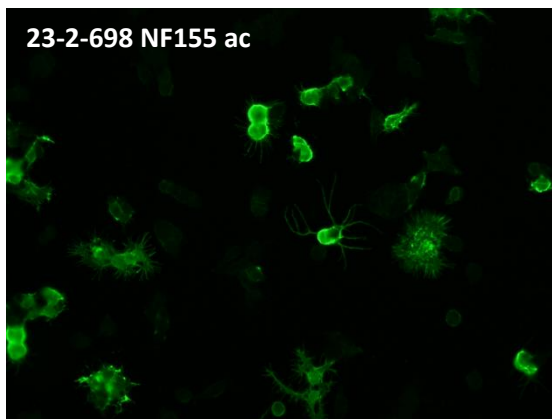
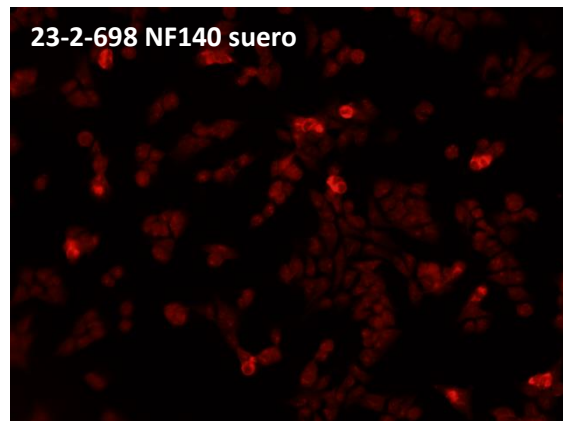
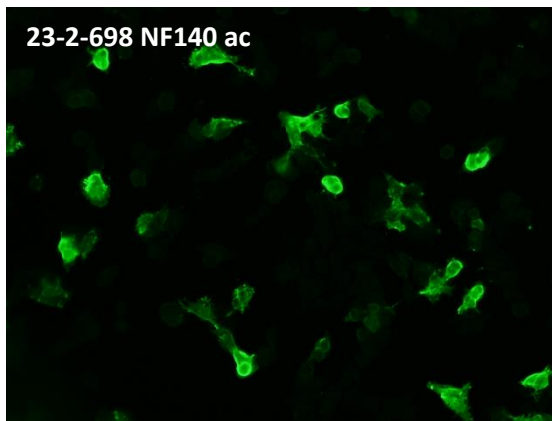
- Preparar mezclas transfección cada culture slide (8 pozos)
 - 2 ug DNA + 40 ul Optimem
 - 3,2 ul lipofectamina2000 + 40 ul Optimem
- Juntar y dejar reposar mínimo 5 minutos
- Poner 300 ul de medio HEK a cada pozo
- Poner 120.000 cels (HEK293) a cada pozo

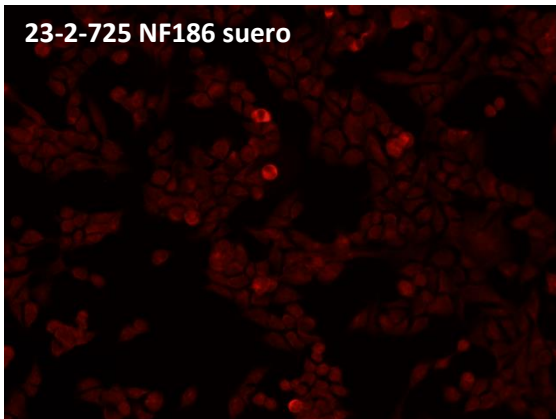
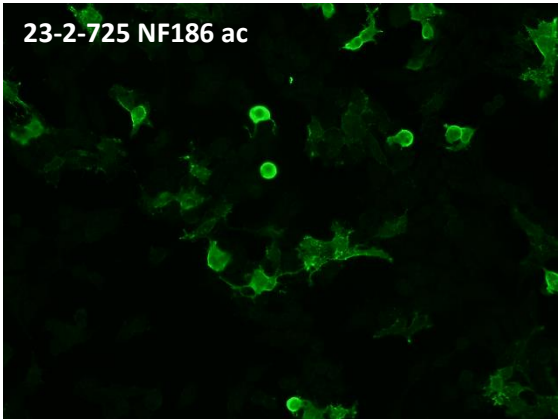
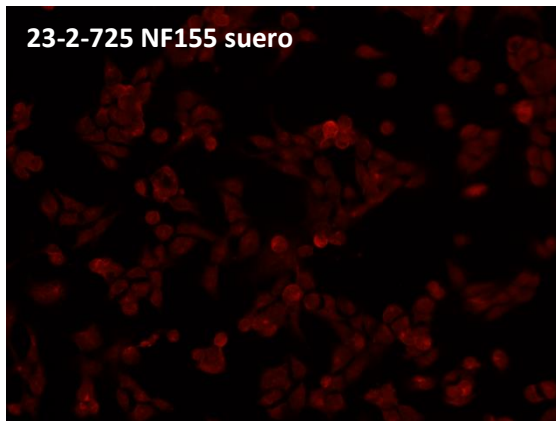
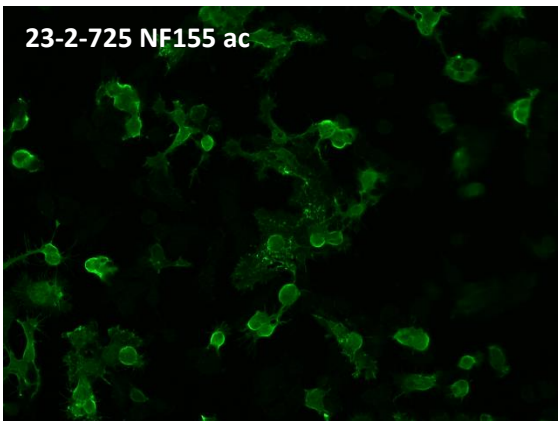
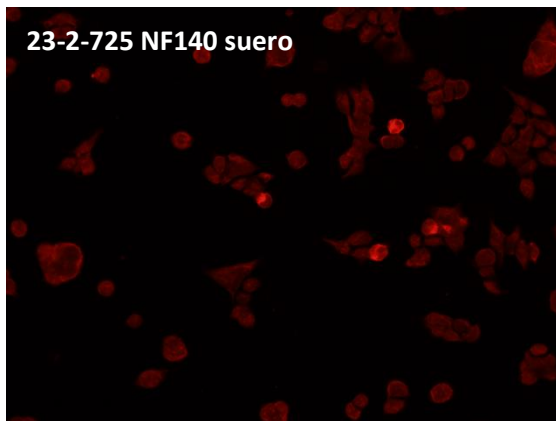
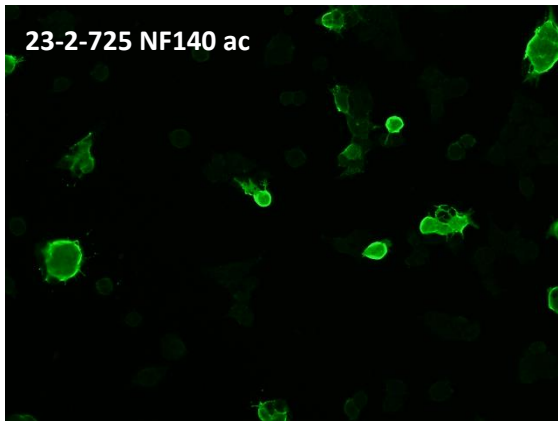
✓ ICC Perfil nodales/paranodales BD (Gemma)

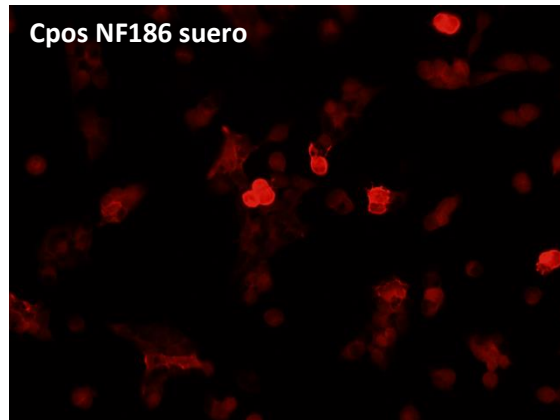
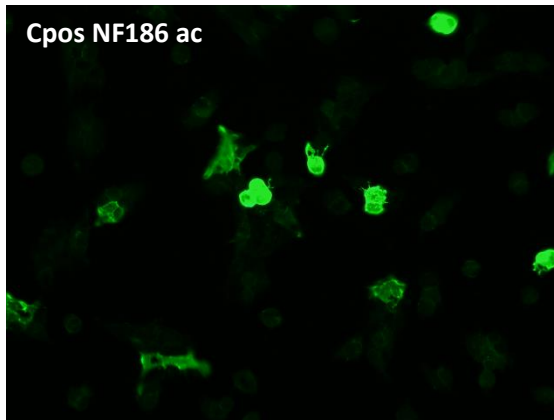
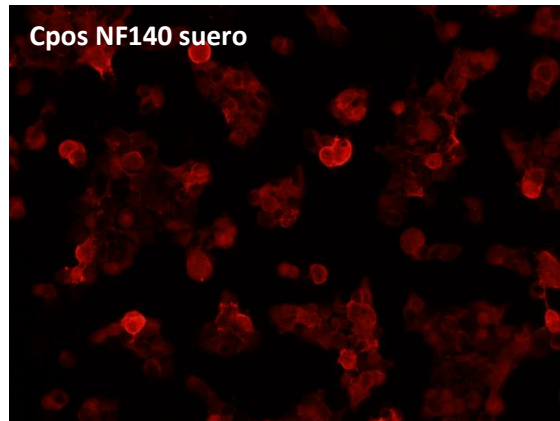
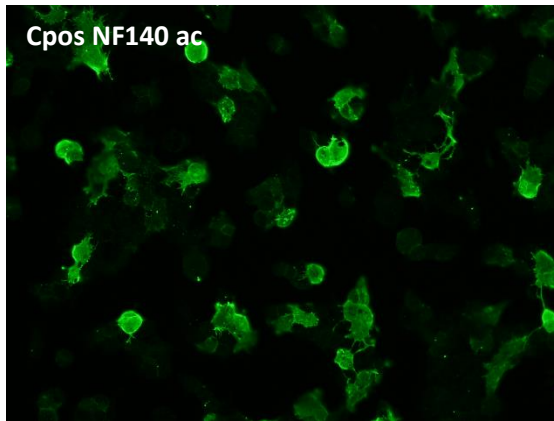
CNTN1, NF140, NF155, NF186 (cels fijadas, suero 1/100)

Muestras y resultado:

- 23-2-874: neg
- 23-2-875: neg
- 23-2-698: NF140, NF155, NF186 +: Marcaje diferente al C+
- 23-2-725: NF140, NF155, NF186 +: Marcaje diferente al C+







✓ [ICC médula disgregada \(sin glía\) \(día 19 - rata 20/07/2023\)](#)

Muestras: a partir del cubre 2 hago doble con NFh

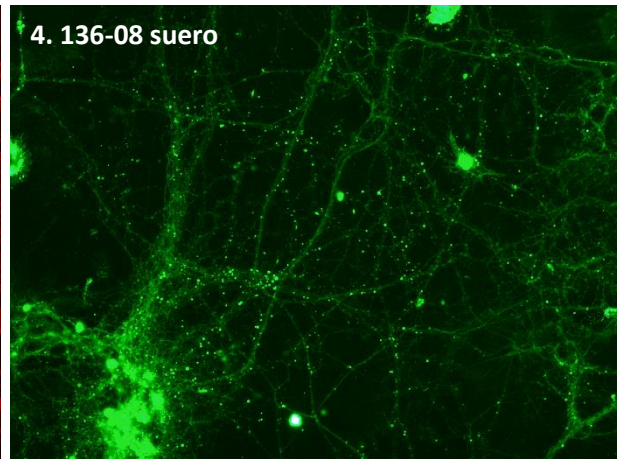
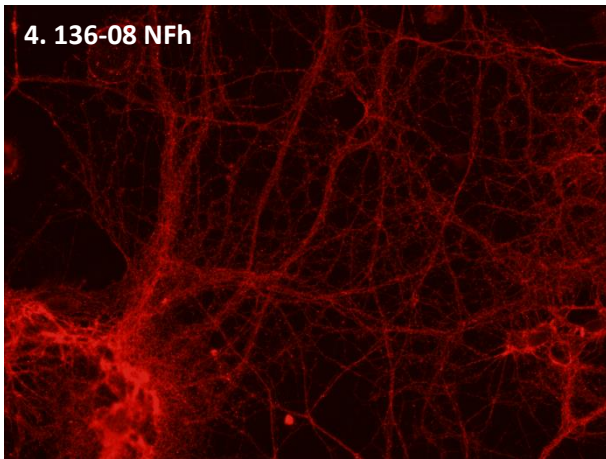
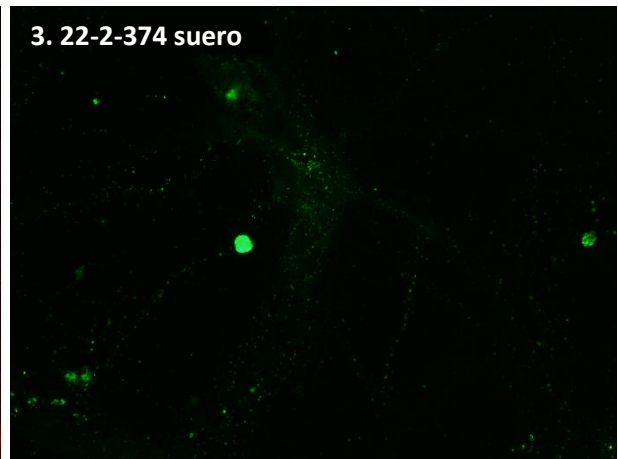
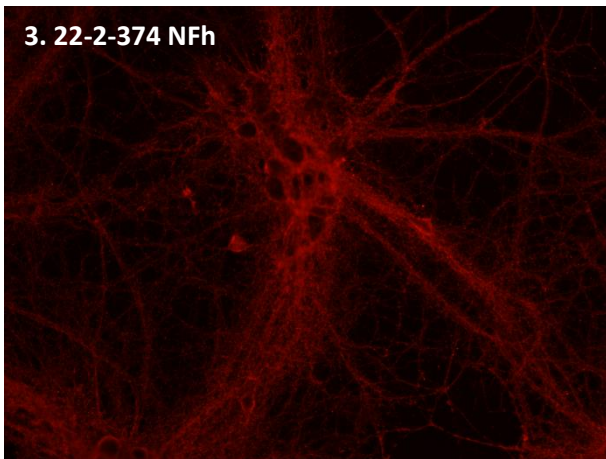
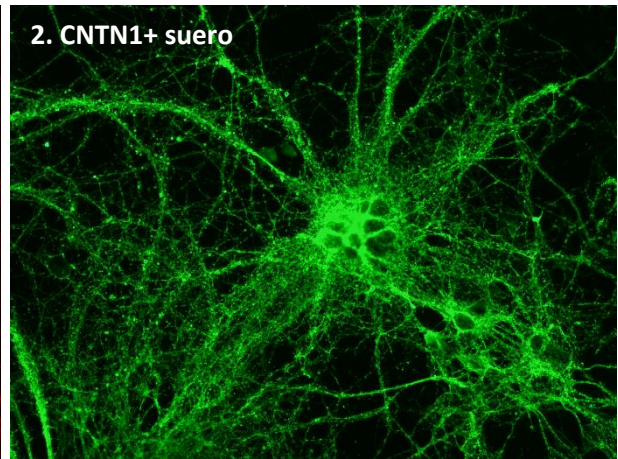
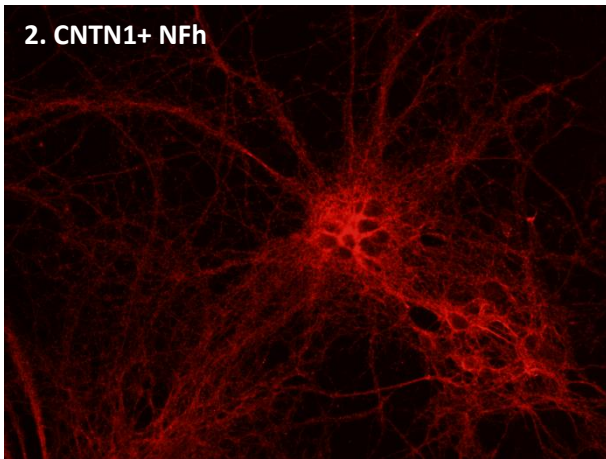
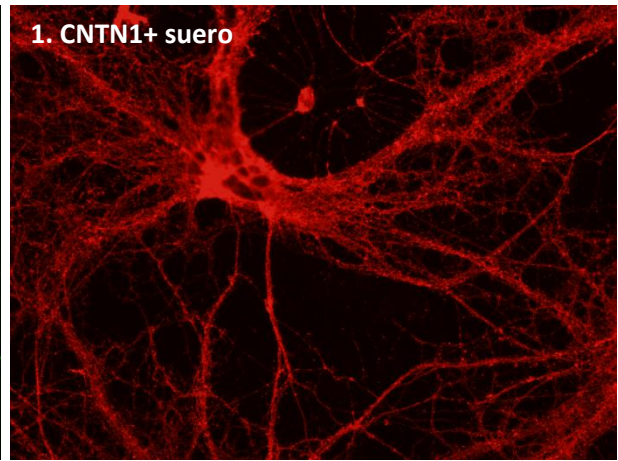
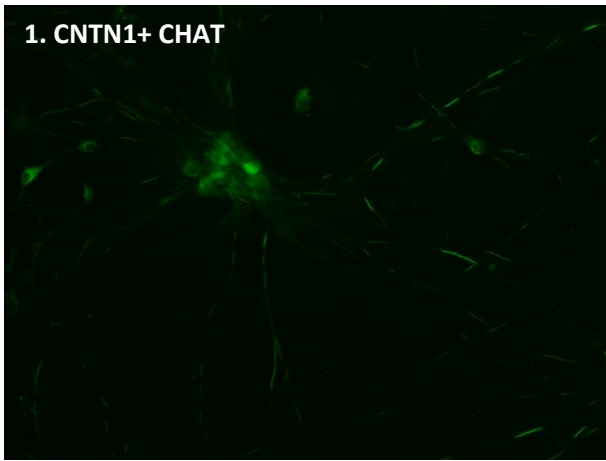
- | | |
|--------------------------------|---------------------|
| 1. CNTN1+ (21-2-94) doble CHAT | 14. CIDP4 IgG |
| 2. CNTN1+ (21-2-94, CNTN1+) | 15. CIDP4 IgM |
| 3. 22-2-374 (Caspr1+) | 16. CIDP5 IgG |
| 4. 136-08 (Caspr1+) | 17. CIDP5 IgM |
| 5. 23-2-656 (Caspr1+) | 18. CIDP6 IgG |
| 6. NF155+ | 19. CIDP6 IgM |
| 7. NF140/NF186+ | 20. CIDP7 IgG |
| 8. CIDP1 IgG | 21. CIDP7 IgM |
| 9. CIDP1 IgM | 22. CIDP8 IgG |
| 10. CIDP2 IgG | 23. CIDP8 IgM |
| 11. CIDP2 IgM | 24. Cneg 204-05 IgG |
| 12. CIDP3 IgG | 25. Cneg 204-05 IgM |
| 13. CIDP3 IgM | 26. Cneg 204-06 IgG |

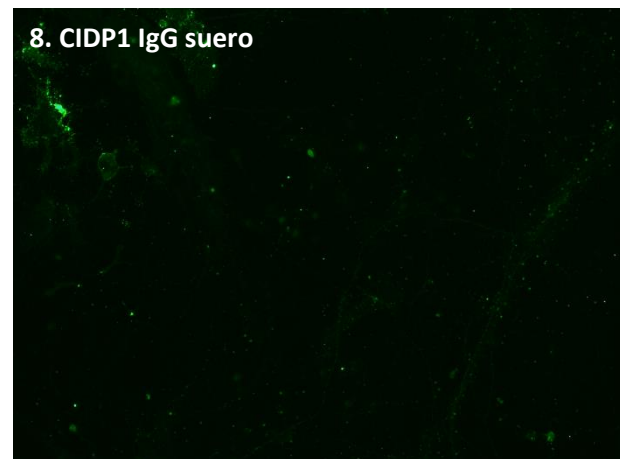
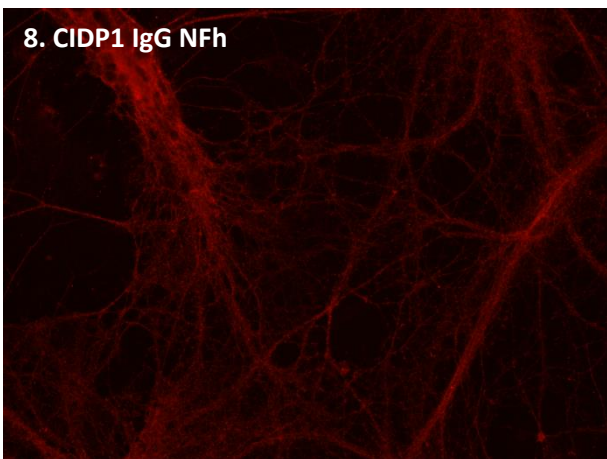
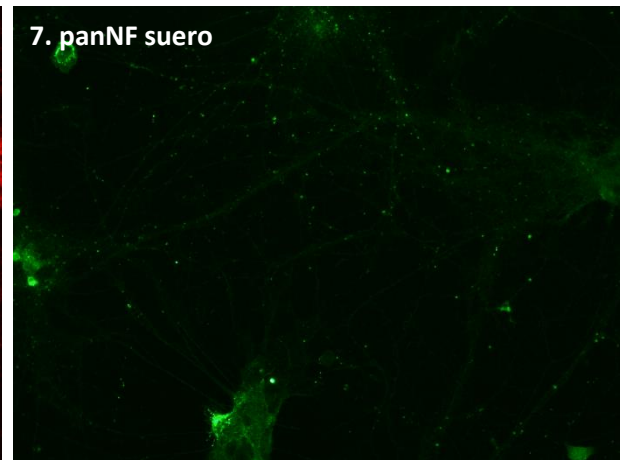
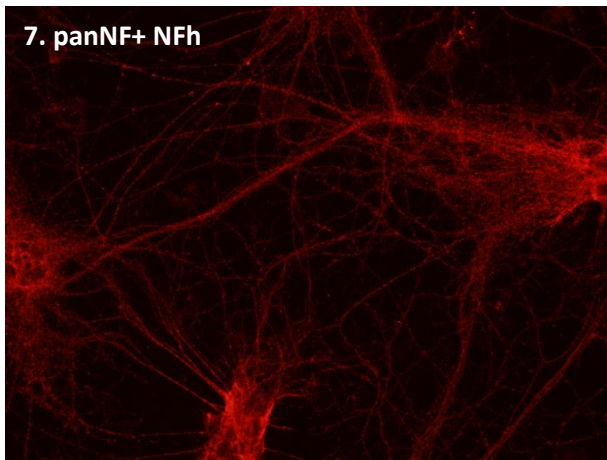
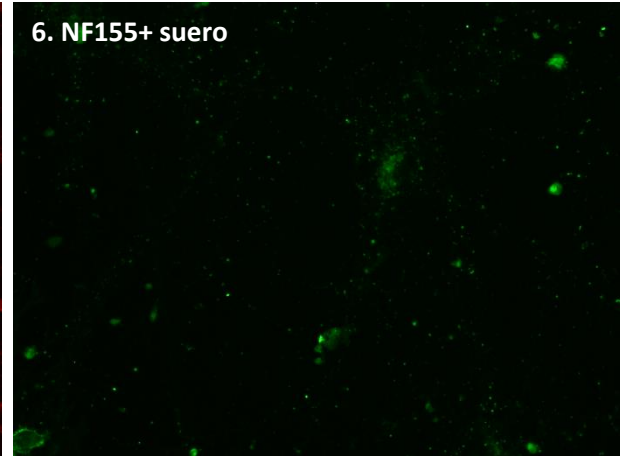
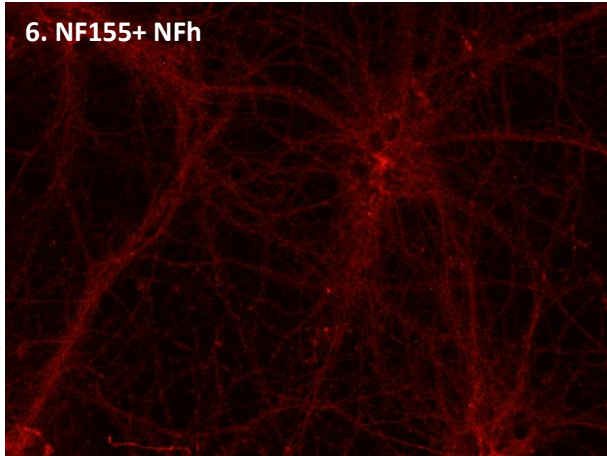
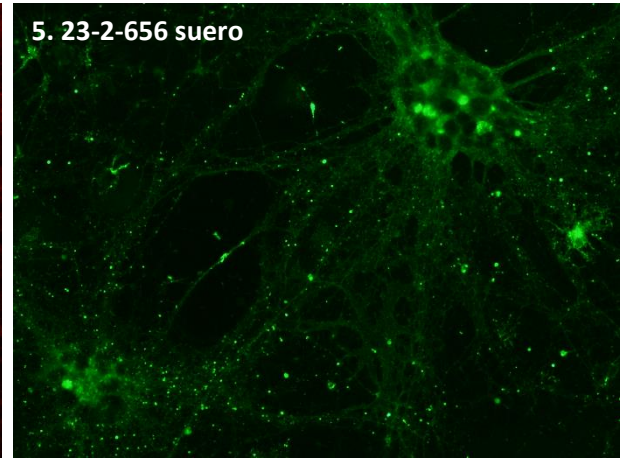
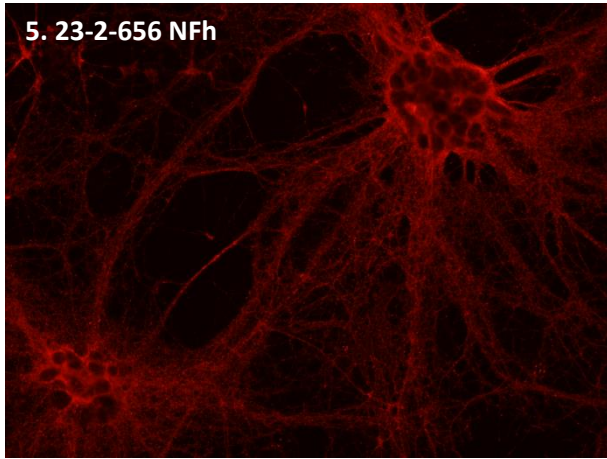
Protocolo:

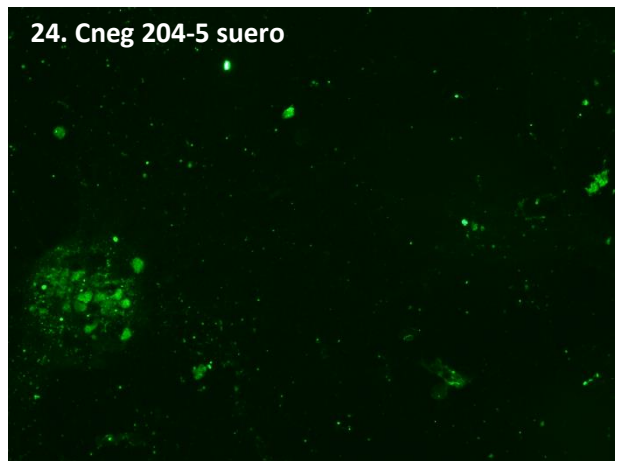
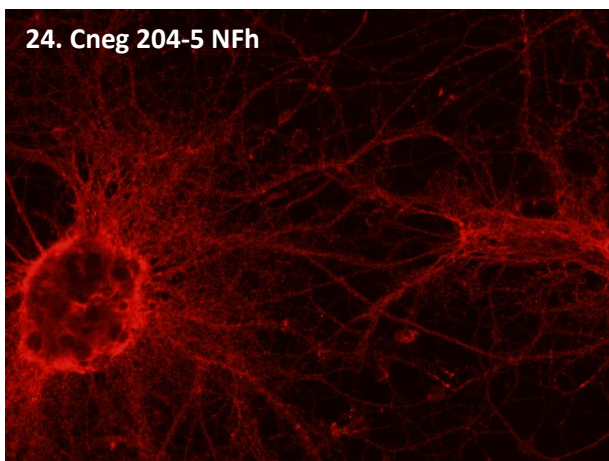
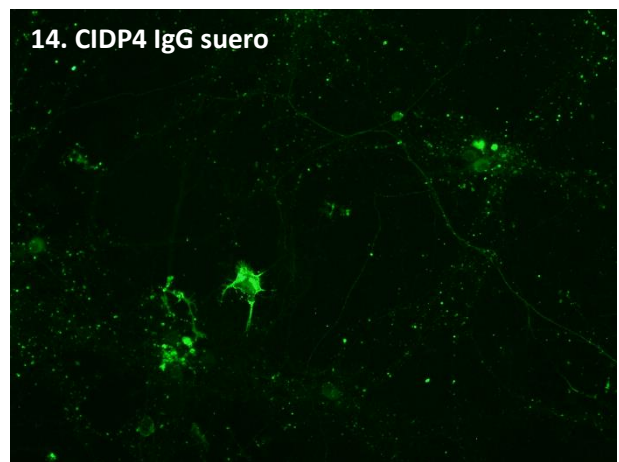
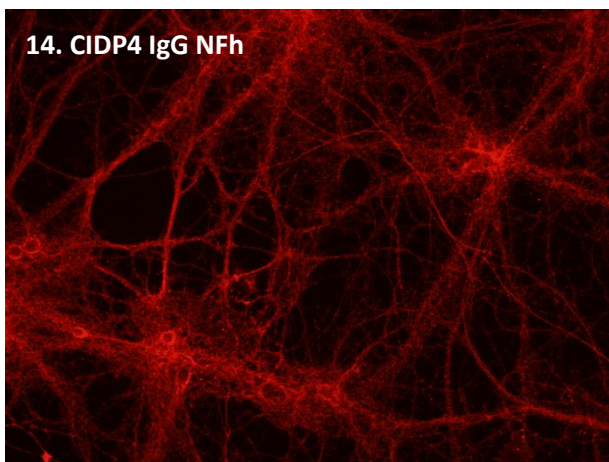
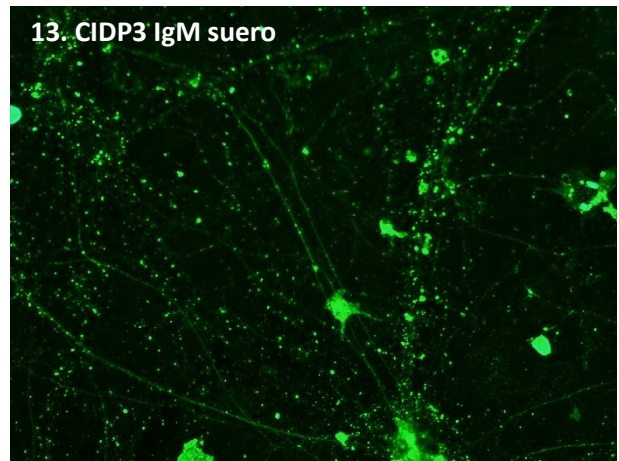
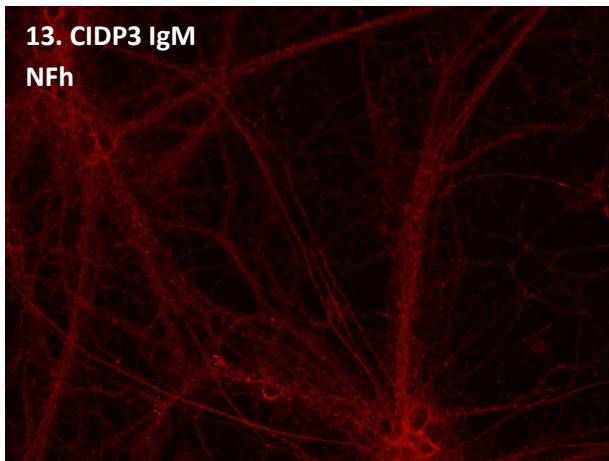
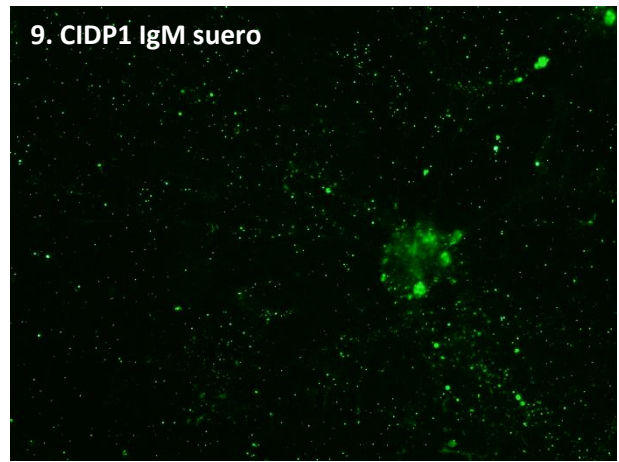
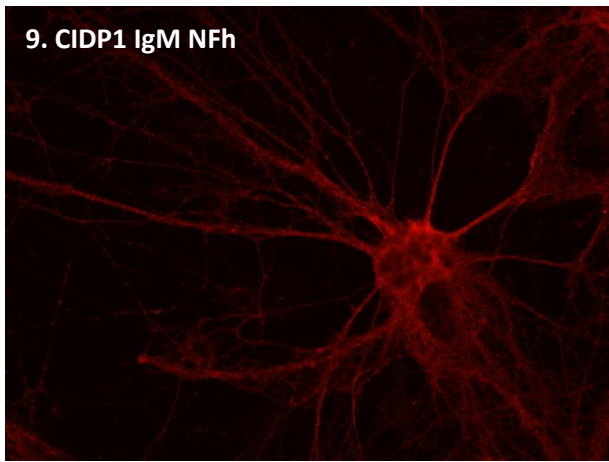
- Incubar con **suero** 1/100 (IgG) o 1/40 (IgM) en medio NG: 1h 37°C
- 1 lavado con PBS
- Fijar 10 min con PFA 4%
- 1 lavado con PBS1x
- Incubar con anticuerpo primario diluído en Goat serum 5% (1h RT)
 - NFh 1/500
 - CHAT : AB144P Millipore, 1/50 (hacer todo con rabbit serum)
- 3 lavados con PBS1x
- Incubar 1h con Ac. secundarios diluídos en Goat serum 5% tritón 0'5% (todos a 1/750):
 - Doble suero - NFh: GAH488 IgG o IgM + GAC594
 - Doble suero - CHAT: RAH594 IgG + RAG488
- 3 lavados con PBS1x
- Montar con fluoromount

Resultado: el NFh se ve muy bien!! **FOTOS HECHAS** (las tengo todas en una carpeta, aquí sólo pego las interesantes)

- | | |
|---|--|
| 1. CNTN1+ (21-2-94) doble CHAT: +++
(el CHAT se ve a trozos) | 14. CIDP4 IgG: neg/+ débil |
| 2. CNTN1+ (21-2-94, CNTN1+): +++ | 15. CIDP4 IgM: neg |
| 3. 22-2-374 (Caspr1+): neg | 16. CIDP5 IgG: neg |
| 4. 136-08 (Caspr1+): ++ | 17. CIDP5 IgM: neg (marca algo
punteado pero parece inespecífico) |
| 5. 23-2-656 (Caspr1+): ++ | 18. CIDP6.2 IgG: neg |
| 6. NF155+ 212-14 (Morón): neg | 19. CIDP6.2 IgM: neg |
| 7. NF140/NF186+ (RDP): + muy débil | 20. CIDP7 IgG: neg |
| 8. CIDP1 IgG: neg | 21. CIDP7 IgM: neg |
| 9. CIDP1 IgM: neg | 22. CIDP8 IgG: neg (mucho fondo) |
| 10. CIDP2.2 IgG: neg | 23. CIDP8 IgM: repetir |
| 11. CIDP2.2 IgM: neg | 24. Cneg 204-05 IgG: neg |
| 12. CIDP3.2 IgG: neg | 25. Cneg 204-05 IgM: neg |
| 13. CIDP3.2 IgM: + | 26. Cneg 204-06 IgG: neg |







✓ ICC médula disgregada (con glía) (día 19 - rata 20/07/2023)

Cojo 2 cubres de médula disgregada con glía, para ver si están diferenciando

Protocolo cubre 1:

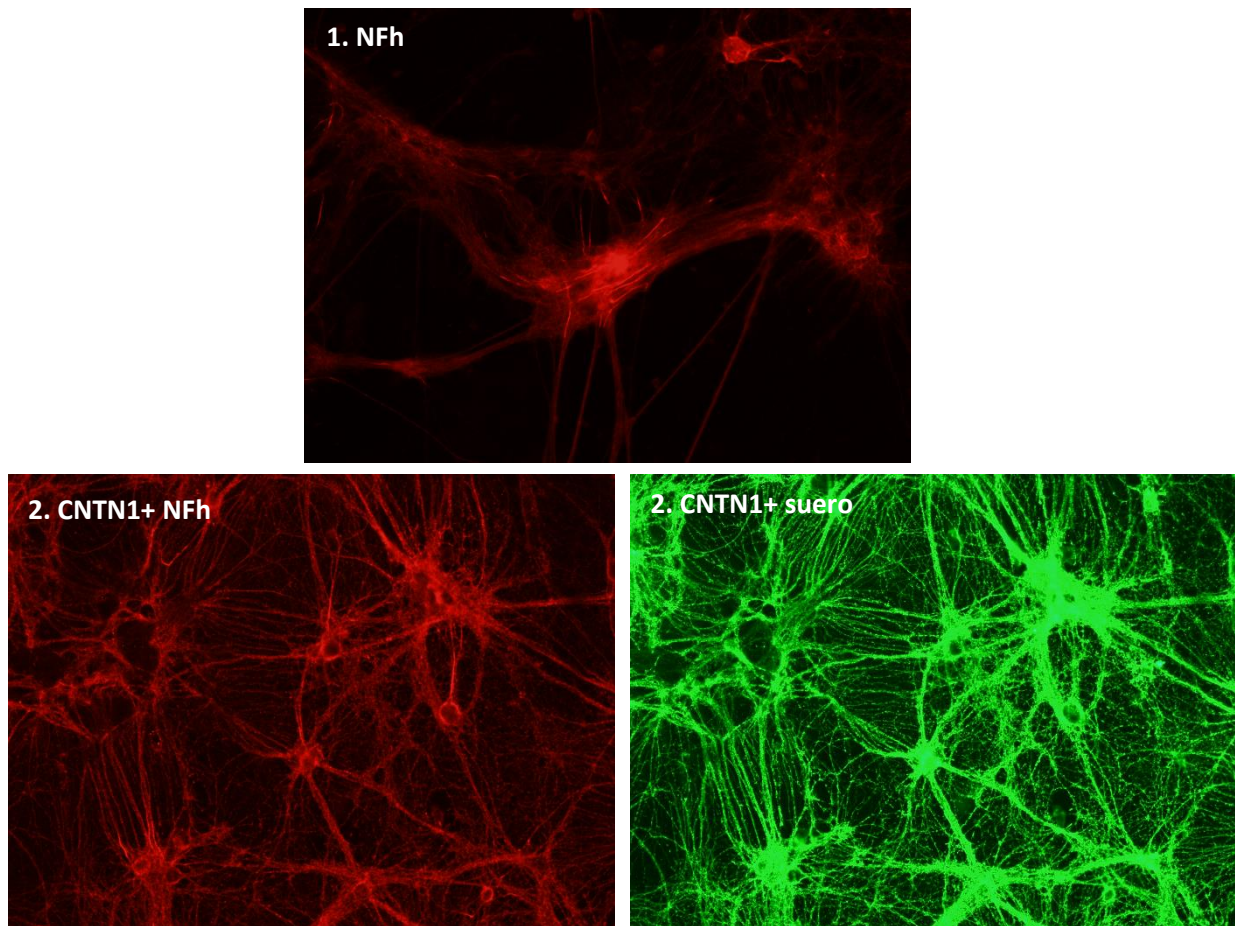
- Fijar 20 min con PFA 4%
- 1 lavado con PBS1x
- Bloquear con Goat serum 5% y 0'5% tritón (en PBS): 1h a RT
- Incubar con anticuerpos primarios diluïdos en Goat serum 5% y 0'5% tritón (en PBS):
 - **MBP y NFh**
 - anti-Myelin basic protein SMI99, 808401 (Biolegend). Dil. **1/100** (mouse) : (overnight 4°C)
 - anti-Neurofilament H, AB5539 (Merck) **Dil. 1/500** (chicken) : 1h RT
- 3 lavados con PBS1x
- Incubar 1h con Ac. secundarios diluïdos en Goat serum 5% y 0'5% tritón (todos a 1/500)
 - MBP y NFh: GAM488 + GAC594
- 3 lavados con PBS1x
- Montar con Fluoromount

Protocolo cubre 2:

- Incubar con **suero CNTN1+** 1/100 (IgG) en medio NG: 2h 37°C
- 1 lavado con PBS
- Fijar 10 min con PFA 4%
- 1 lavado con PBS1x
- Incubar con anticuerpo primario diluïdo en Goat serum 5% (1h RT) : NFh 1/500
- 3 lavados con PBS1x
- Incubar 1h con Ac. secundarios diluïdos en Goat serum 5% tritón 0'5% (todos a 1/500):
 - Doble suero - NFh: GAH488 IgG + GAC594
- 3 lavados con PBS1x
- Montar con fluoromount

Resultado:

- Cubre 1: el NFh sólo se ve a trozos. No hay mielina
- Cubre 2: el suero CNTN1+ es muy +++. El NFh se ve muy bien (quizás pasó algo con la immuno del cubre 1 y por eso no se ve tan bien).



✓ ICC co-cultivos (día 19 - rata 20/07/2023)

Cojo 1 cubre de explante DRG coating habitual, 1 cubre de explante DRG matrigel y 1 cubre de DRG disgregadas matrigel para ver cómo va la diferenciación

*También cojo 1 cubre de los co-cultivos del 01/06/2023, para acabar de determinar si los uso o no.

Protocolo:

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

- **MBP y NFh**

- anti-Myelin basic protein SMI99, 808401 (Biolegend). Dil. **1/100** (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 0'5% tritón (todos a 1/500)
 - MBP y NFh: GAM488 + GAC594
- 3 lavados con PBS1x
- Montar con Fluoromount

Resultado:

2. **Explante DRG coating habitual (Poly-D/laminina):** el NFh se ve flojo pero bien. La mielina no se ve pero parece que se esté empezando a formar (los núcleos de las cels de Schwann están alineados)
3. **Explante DRG matrigel:** el NFh se ve muy bien. Hay un poco de mielina (muy poquita)
4. **DRG cels disgregadas matrigel:** el NFh se ve muy bien. No hay mielina.
5. **Explante DRG 01/06/23:** el NFh se ve muy bien. No hay mielina

09/08/2023

✓ [ICC GlialCAM en células vivas \(Gemma\)](#)

Objetivo: pasar 50 muestras de LCR de pacientes EM en HEKs transfectadas con GlialCAM vivas.

Muestras: LCR de EM, y sueros control

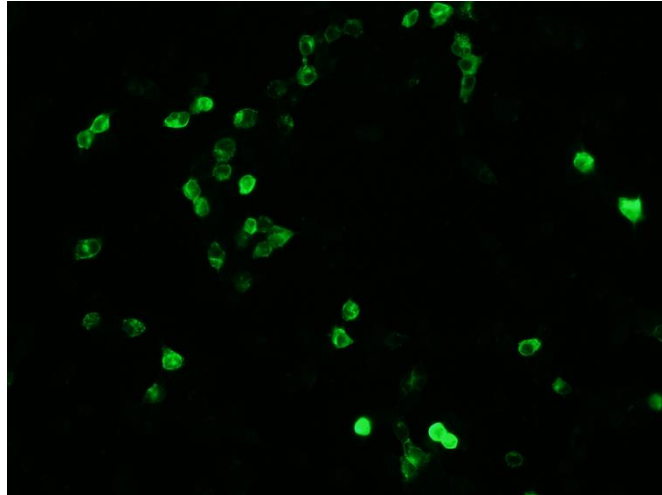
- | | |
|----------|---------------|
| · EM-325 | · Cneg 201-9 |
| · EM-394 | · Cneg 202-2 |
| · EM-405 | · Cneg 202-3 |
| · EM-411 | · Cneg 202-16 |

Protocolo cels vivas (sin fijar):

- Incubar con suero 1/100 o LCR 1/10 en medio HEK293 (1h a 37°C) : preparar 250 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
- Permeabilizar 5min con tritón 0,3% (en PBS1x)
- 1 lavado con PBS1x
- Bloquear con Goat serum 5%
- Incubar con anticuerpo comercial anti-CMYC diluído 1/200 en goat serum 5% (1h a RT)
- 3 lavados con PBS1x

- Incubar con Ac.secundarios GAM488 + GAH594 diluídos 1/750 en goat serum 5% (1h a RT)
- 3 lavados PBS1x
- Montar con Fluoromount

Resultado: Se ve bien el C-MYC. Hay un poco de cruce de canal con el LCR, pero todos son negativos.



✓ ELISA NF155 y CASPR1 (Gemma)

Muestras:

- 23-2-813: Titulación NF155
- 23-2-874: Screening CASPR1
- 23-2-875: Screening CASPR1
- 22-2-374: CASPR1+. Hacer CASPR1 con IgG totales y con subclases.
- 136-08: CASPR1+. Hacer CASPR1 con IgG totales y con subclases.
- 23-2-656: CASPR1+. Hacer CASPR1 con IgG totales y con subclases.

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%
- Ac secundarios:
 - Titulación / screening / confirmación: Incubar con **RAH IgG HRP** 1/3000 en leche 5% en PBS-tween 0'1% : 100 ul/pozo, 45 min
 - Subclases: Incubar con **MAH HRP** IgG1 o IgG2 o IgG3 o IgG4 1/1000 en leche 5% en PBS-tween 0'1% (**Las subclases IgG2 e IgG3 son nuevas!!!**): 100 ul/pozo, 45 min
- 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	23-2-813 1/900	Cneg	22-2-374 IgG tot	22-2-374 IgG4	136-8 IgG3	23-2-656 IgG2					
B blanc	Cneg	23-2-813 1/900	Cneg	22-2-374 IgG tot	22-2-374 IgG4	136-8 IgG3	23-2-656 IgG2					
C prot	Cpos NF155	23-2-813 1/2700	Cpos CASPR1	22-2-374 IgG1	136-8 IgGtot	136-8 IgG4	23-2-656 IgG3					
D blanc	Cpos NF155	23-2-813 1/2700	Cpos CASPR1	22-2-374 IgG1	136-8 IgGtot	136-8 IgG4	23-2-656 IgG3					
E prot	23-2-813 1/100	23-2-813 1/8100	23-2-874 1/100	22-2-374 IgG2	136-8 IgG1	23-2-656 IgGtot	23-2-656 IgG4					
F blanc	23-2-813 1/100	23-2-813 1/8100	23-2-874 1/100	22-2-374 IgG2	136-8 IgG1	23-2-656 IgGtot	23-2-656 IgG4					
G prot	23-2-813 1/300	23-2-813 1/24300	23-2-875 1/100	22-2-374 IgG3	136-8 IgG2	23-2-656 IgG1						
Hblanc	23-2-813 1/300	23-2-813 1/24300	23-2-875 1/100	22-2-374 IgG3	136-8 IgG2	23-2-656 IgG1						

NF155 **CASPR1**

Resultado:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	0,114	0,093	0,077	0,436	0,068	0,458	0,088					
B blanc	0,169	0,163	0,141	0,141	0,071	0,245	0,188					
C prot	0,131	0,154	0,824	0,425	0,558	0,162	0,14					
D blanc	0,13	0,138	0,155	0,083	0,118	0,077	0,116					
E prot	0,101	0,151	0,137	0,088	0,147	0,367	0,059					
F blanc	0,135	0,129	0,145	0,098	0,08	0,147	0,078					
G prot	0,122	0,132	0,206	0,206	0,164	0,056						
Hblanc	0,076	0,106	0,07	0,073	0,05	0,053						

El ELISA de NF155 no ha salido bien, y el de CASPR1 ha salido un poco bajo, pero lo doy por bueno.

- **23-2-813:** No sale bien el ELISA de NF155 (no sale ni el control!!)
- **23-2-874:** CASPR1 neg
- **23-2-875:** Repetir CASPR1.
- **22-2-374:** CASPR1+. Subclases IgG1>>IgG3 (resultado diferente al que salió anteriormente, que era IgG1, IgG4>IgG3)
- **136-08:** CASPR1+. Subclases no salen bien (sólo IgG2 débil)
- **23-2-656:** CASPR1+. Subclases no salen!!!!

10/08/2023

✓ ICC Perfil nodales/paranodales BD (Gemma)

CNTN1, NF140, NF155, NF186 (cels fijadas, suero 1/100)

Muestras y resultado:

- 23-2-877: neg
- 23-2-878: neg
- 23-2-881: neg

14/08/2023

✓ [ICC co-cultivos \(día 24 - rata 20/07/2023\)](#)

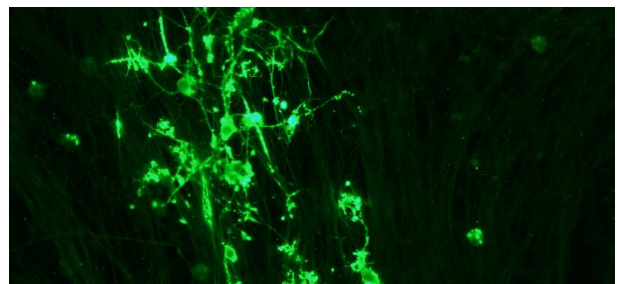
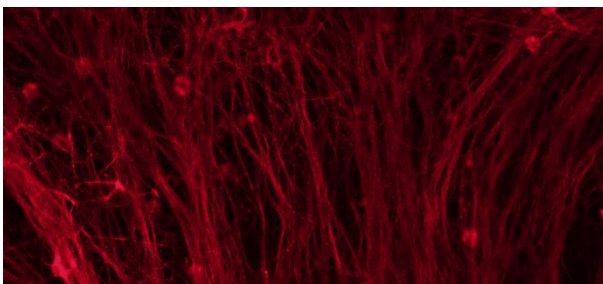
Cojo cubres de todas las condiciones para ir viendo cómo va la diferenciación.

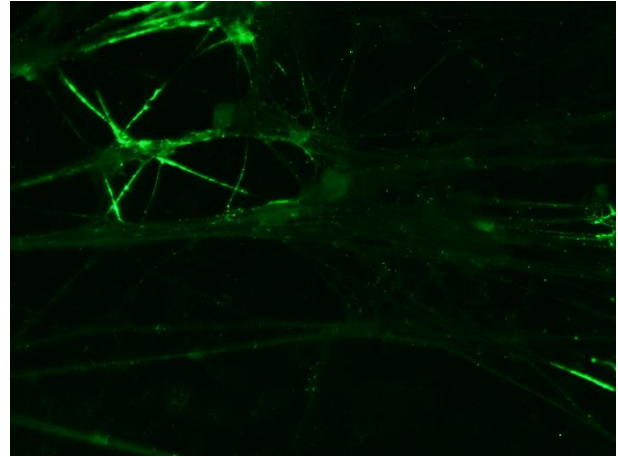
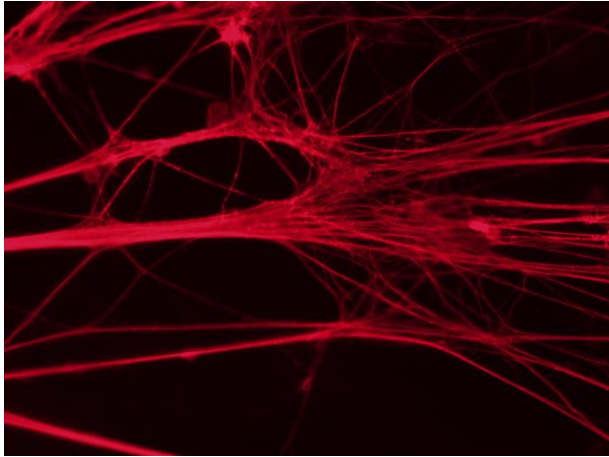
Protocolo:

- Fijar 20 min con PFA 4%
- 1 lavado con PBS1x
- Bloquear con Goat serum 5% y 0'5% tritón (en PBS): 1h a RT (**no me ha dado tiempo de bloquear y he hecho un bloqueo/tritón 5 min, y he puesto primero el NFh y después el MBP**)
- Incubar con anticuerpos primarios diluídos en Goat serum 5% y 0'5% tritón (en PBS):
 - **MBP y NFh**
 - anti-Neurofilament H, AB5539 (Merck) **Dil. 1/500** (chicken) : 1h RT
 - anti-Myelin basic protein SMI99, 808401 (Biolegend). Dil. **1/100** (mouse) : (1h RT)
- 3 lavados con PBS1x
- Incubar 1h con Ac. secundarios diluídos en Goat serum 5% y 0'5% tritón (todos a 1/500)
 - MBP y NFh: GAM488 + GAC594
- 3 lavados con PBS1x
- Montar con Fluoromount

Resultado:

1. **Explante DRG 01/06/23:** marca todas las cels de Schwann... no se ve la mielina como siempre.
2. **Explante médula 01/06/23:** hay mielina
3. **Médula disgregada 20/07/23** (tratada como co-cultivos): hay un poco de mielina
4. **Explante DRG coating habitual 20/07/23** (Poly-D/laminina): hay un poco de mielina
5. **Explante DRG matrigel 20/07/23:** no hay mielina
6. **DRG cels disgregadas matrigel 20/07/23:** no se ve bien porque hay demasiadas capas de células!!! No hago foto





16/08/2023

✓ ICC Perfil nodales/paranodales BD (Gemma)

Muestras:

- 23-2-554 absorbido (descartar positividad panNF)
 - Absorción: con extracto de HELA (congelado a -20°C) : añadido 50 ul de PBS1x a los 50 ul del extracto y le pongo 1 ul de suero 23-2-554. Dejar en rotación a Ambiente durante 2 horas
- Cpos

Resultado: 23-2-554 negativo

✓ ICC co-cultivos (día 26 - rata 20/07/2023)

Cojo cubres de todas las condiciones para ir viendo cómo va la diferenciación.

Protocolo:

- Fijar 20 min con PFA 4%
- 1 lavado con PBS1x
- Bloquear con Goat serum 5% y 0'5% tritón (en PBS): 1h a RT
- Incubar con anticuerpos primarios diluïdos en Goat serum 5% y 0'5% tritón (en PBS):
 - **MBP y NFh**
 - anti-Myelin basic protein SMI99, 808401 (Biolegend). Dil. **1/100** (mouse): overnight 4°C
 - anti-Neurofilament H, AB5539 (Merck) **Dil. 1/500** (chicken): 1h RT
- 3 lavados con PBS1x
- Incubar 1h con Ac. secundarios diluïdos en Goat serum 5% y 0'5% tritón (todos a 1/500)

- MBP y NFh: GAM488 + GAC594
- 3 lavados con PBS1x
- Montar con Fluoromount

Resultado: en general el NFh marca muy bien. MBP marca cosas que no son mielina. Creo que el GAM488 tiene precipitados. No hago fotos porque se ve todo muy mal.

1. **Explante DRG** 01/06/23
2. **Explante médula** 01/06/23
3. **Médula disgregada** 20/07/23 (tratada como co-cultivos): quizás sí que hay un poco de mielina
4. **Explante DRG coating habitual** 20/07/23 (Poly-D/laminina)
5. **Explante DRG matrigel** 20/07/23
6. **DRG cels disgregadas matrigel** 20/07/23: no se ve nada porque hay muchas capas de células

17/08/2023

✓ Starter NF186

- Glicerolat NF186: 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 + ampicilina 1/1000
- 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
- A última hora de la tarda abocar l'*starter* prèviament seleccionat a l'erlenmeyer.
- Incubar overnight a 37 °C en agitació (agitador orbital)

✓ ICC GlialCAM en células vivas (Gemma)

Objetivo: pasar 50 muestras de LCR de pacientes EM en HEKs transfectadas con GlialCAM vivas.

Muestras: LCR de EM

- | | |
|----------|----------|
| · EM-328 | · EM-386 |
| · EM-363 | · EM-388 |
| · EM-382 | · EM-389 |
| · EM-384 | · EM-400 |

Protocolo cels vivos (sin fijar):

- Incubar con suero 1/100 o LCR 1/10 en medio HEK293 (1h a 37°C) : preparar 250 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
- Permeabilizar 5min con tritón 0,3% (en PBS1x)
- 1 lavado con PBS1x
- Bloquear con Goat serum 5%
- Incubar con anticuerpo comercial anti-CMYC diluído 1/200 en goat serum 5% (1h a RT)
- 3 lavados con PBS1x
- Incubar con Ac.secundarios GAM488 + GAH594 diluídos 1/750 en goat serum 5% (1h a RT)
- 3 lavados PBS1x
- Montar con Fluoromount

Resultado: Se ve bien el C-MYC. Hay un poco de cruce de canal con el LCR. A Gemma le parece positivo el LCR EM-386, pero a mi no. REPETIR SIN HACER DOBLE CON C-MYC PARA EVITAR CRUCE DE CANAL.

18/08/2023

✓ [Maxiprep NF186](#)

Hago 2 maxis de NF186.

Seguir el protocolo 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'espectofotòmetre i guardar el tub a la nevera 4°C.

Resultat:

- [NF186] = 1,14 ug/ul
- [NF186] = 0,93 ug/ul

✓ [ICC GlialCAM en células vivas \(Gemma\)](#)

Objetivo: pasar 50 muestras de LCR de pacientes EM en HEKs transfectadas con GlialCAM vivas.

Muestras: LCR de EM

- | | |
|----------|----------|
| · EM-381 | · EM-396 |
| · EM-391 | · EM-398 |
| · EM-394 | · EM-399 |

· EM-401

· EM-409

Protocolo cels vivos (sin fijar):

- Incubar con suero 1/100 o LCR 1/10 en medio HEK293 (1h a 37°C) : preparar 250 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
- Permeabilizar 5min con tritón 0,3% (en PBS1x)
- 1 lavado con PBS1x
- Bloquear con Goat serum 5%
- Incubar con anticuerpo comercial anti-CMYC diluído 1/200 en goat serum 5% (1h a RT)
- 3 lavados con PBS1x
- Incubar con Ac.secundarios GAM488 + GAH594 diluídos 1/750 en goat serum 5% (1h a RT)
- 3 lavados PBS1x
- Montar con Fluoromount

Resultado: Se ve bien el C-MYC. Hay un poco de cruce de canal con el LCR. A Gemma le parece positivo el LCR EM-401, pero a mi no. REPETIR SIN HACER DOBLE CON C-MYC PARA EVITAR CRUCE DE CANAL.

✓ **IHC teasing nervio ciático cerdo** (Gemma)

Muestras:

1. 23-2-554 absorbido (confirmar positividad CASPR1)
 - Absorción: con extracto de HELA (congelado a -20°C) : añado 150 ul de PBS1x a los 50 ul del extracto y le pongo 4 ul de suero 23-2-554 (para hacer concentración final de 1/50). Dejar en rotación a Tambiente durante 2 horas
2. Cpos CNTN1+

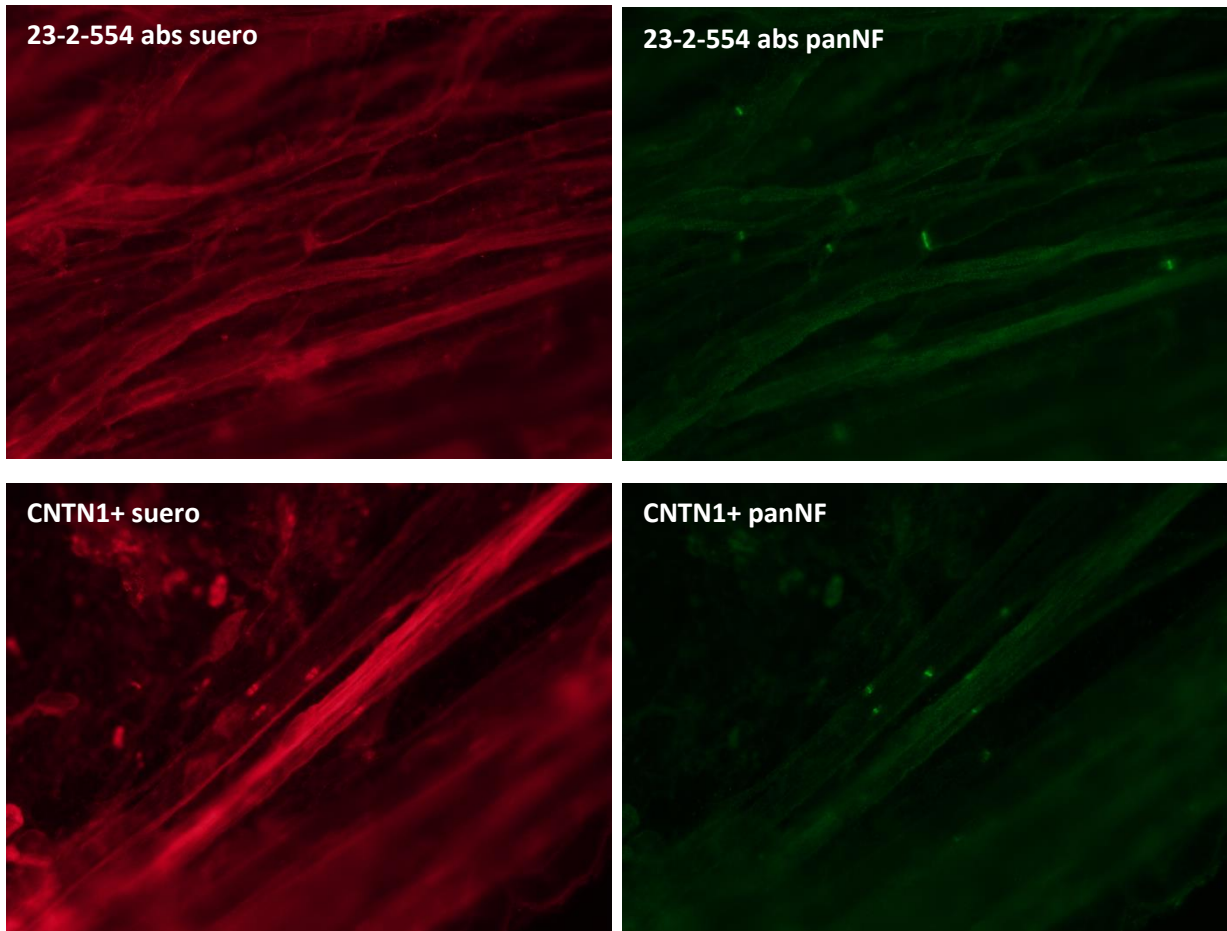
Protocolo: (entre cada paso hacer 3 lavados con PBS1x)

- 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:

1. 23-2-554: No se ve muy claro pero creo que sí que marca el paranodo : titular CASPR1 y subclases!!! (ya se hizo anteriormente y el título dio 1/2700, pero las subclases no salieron)



21/08/2023

- ✓ [ICC co-cultivos \(día 31 - rata 20/07/2023\)](#)

Cojo cubres de todas las condiciones para ir viendo cómo va la diferenciación.

Protocolo:

- Fijar 20 min con PFA 4%
- 1 lavado con PBS1x
- Bloquear con Goat serum 5% y 0'5% tritón (en PBS): 1h a RT
- Incubar con anticuerpos primarios diluidos en Goat serum 5% y 0'5% tritón (en PBS):
 - **MBP y NFh:** los pongo los 2 a la vez 2h a RT

- anti-Myelin basic protein SMI99, 808401 (Biolegend). Dil. **1/100** (mouse)
- anti-Neurofilament H, AB5539 (Merck) **Dil. 1/500** (chicken)
- 3 lavados con PBS1x
- Incubar 1h con Ac. secundarios diluídos en Goat serum 5% y 0'5% tritón (todos a 1/500)
 - MBP y NFh: **GAM594 + GAM488**
- 3 lavados con PBS1x
- Montar con Fluoromount

Resultado: aunque el NFh se ve muy bien, en ninguno de los cubres hay mielina (en el cubre de médula disgregada igual sí que hay un poco, pero es confuso)

✓ ICC co-cultivos (2) (día 31 - rata 20/07/2023)

Cojo cubres de co-cultivos DRG 1/06/23, 1 Culture Slide de co-cultivos 20/07/23, y cubres de médula disgregada con glía 20/7/23 para ver cómo marcan algunos sueros.

Muestras:

- | | |
|------------------------|--|
| 1. CIDP15 (GDP1, LIF+) | 5. 23-2-656 (Caspr1+) |
| 2. 151-21 (GDP2) | 6. 23-2-554 (Caspr1+) |
| 3. 22-2-374 (Caspr1+) | 7. 23-2-540 Box 331 (suero Alemania buscar antígeno) |
| 4. 136-08 (Caspr1+) | 8. Cneg 204-5 |

Protocolo:

- Incubar con **suero** 1/100 en medio de mielinización (6 ul en 300 ul) : 2h 37°C
- 1 lavado con PBS1x
- Fijar 20 min con PFA 4%
- 1 lavado con PBS1x
- Bloquear 30min con Goat serum 5% tritón 0,5%
- Incubar con anticuerpo primario diluído en **Goat serum 5% tritón 0'5%** (2h RT): **MBP** anti-Myelin basic protein SMI99, 808401 (Biolegend). Dil. **1/100** (mouse)
- 3 lavados con PBS1x
- Incubar 1h con Ac. secundarios diluídos en Goat serum 5% tritón 0'5% (1/750): **GAH488 IgG** (suero) + **GAM594** (MBP)
- 3 lavados con PBS1x
- Montar con fluoromount

Resultado: no hay mielina en ninguno de los cubres ni en el culture slide. En los cubres de médula disgregada se observan varios tipos de células.

Analizo sólo el patrón de tinción en las neuronas DRG (nDRG) y neuronas médula (nMed):

1. CIDP15 (GDP1, LIF+): nDRG +, nMed -
2. 151-21 (GDP2): nDRG -, nMed -
3. 22-2-374 (Caspr1+): nDRG ++, nMed repetir
4. 136-08 (Caspr1+): nDRG ++, nMed ++
5. 23-2-656 (Caspr1+): nDRG ++, nMed repetir
6. 23-2-554 (Caspr1+): nDRG ++, nMed repetir
7. 23-2-540 Box 331 (suero Alemania buscar antígeno): nDRG ++, nMed repetir
8. Cneg 204-5: nDRG -, nMed repetir

22/08/2023

✓ ICC GlialCAM en células vivas (Gemma)

Objetivo: pasar 50 muestras de LCR de pacientes EM en HEKs transfectadas con GlialCAM vivas.

Muestras: LCR de EM

- | | | |
|----------|----------|----------|
| · EM-325 | · EM-386 | · EM-396 |
| · EM-394 | · EM-388 | · EM-378 |
| · EM-405 | · EM-389 | · EM-399 |
| · EM-328 | · EM-400 | · EM-401 |
| · EM-363 | · EM-381 | · EM-409 |
| · EM-382 | · EM-391 | · EM-411 |
| · EM-384 | · EM-398 | · EM-373 |

Protocolo cels vivas (sin fijar):

- Incubar con suero 1/100 o LCR 1/10 en medio HEK293 (1h a 37°C): preparar 250 ul de cada muestra para cubrir el pozo (en el primer pozo poner solamente medio, en los otros 7 normal)
- 3 lavados con PBS1x
- Fijar 10 min con PFA4%
- 1 lavado con PBS1x y quitar la pieza de los culture slides
- Permeabilizar 5min con tritón 0,3% (en PBS1x)
- 1 lavado con PBS1x

- Incubar con anticuerpo comercial anti-CMYC diluído 1/200 en goat serum 5% (1h a RT) (solamente añadiremos el anticuerpo comercial en el primer pozo y en los otros pondremos solamente goat serum 5%)
- 3 lavados con PBS1x
- Incubar con Ac.secundarios GAM488 + GAH594 diluídos 1/750 en goat serum 5% (1h a RT) (el GAM488 solamente en el primer pozo, en los otros solo GAH594)
- 3 lavados PBS1x
- Montar con Fluoromount

Resultado: todas las muestras son negativas. GlialCAM bien transfectado.

23/08/2023

✓ ICC Perfil nodales/paranodales BD (Gemma)

CNTN1, NF140, NF155, NF186 (cels fijadas, suero 1/100)

Muestras y resultado:

- 23-2-905: neg
- 23-2-906: neg
- 23-2-907: neg

✓ ELISA CASPR1 (screening BD y subclases) -Gemma-

Muestras:

- | | |
|---|-----------------------|
| · 23-2-875: screening | · 23-2-877: screening |
| · 22-2-374: IgG tot y subclases (CASPR1+) | · 23-2-878: screening |
| · 136-08: IgGtot y subclases (CASPR1+) | · 23-2-881: screening |
| · 23-2-656: IgG tot y subclases (CASPR1+) | · 23-2-905: 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	22-2-374 IgG1	136-08 IgGtot	136-08 IgG4	23-2-656 IgG3	23-2-881						
B blanc	Cneg	22-2-374 IgG1	136-08 IgGtot	136-08 IgG4	23-2-656 IgG3	23-2-881						
C prot	Cpos CASPR1	22-2-374 IgG2	136-08 IgG1	23-2-656 IgGtot	23-2-656 IgG4	23-2-905						
D blanc	Cpos CASPR1	22-2-374 IgG2	136-08 IgG1	23-2-656 IgGtot	23-2-656 IgG4	23-2-905						
E prot	23-2-875	22-2-374 IgG3	136-08 IgG2	23-2-656 IgG1	23-2-877							
F blanc	23-2-875	22-2-374 IgG3	136-08 IgG2	23-2-656 IgG1	23-2-877							
G prot	22-2-374 IgGtot	22-2-374 IgG4	136-08 IgG3	23-2-656 IgG2	23-2-878							
Hblanc	22-2-374 IgGtot	22-2-374 IgG4	136-08 IgG3	23-2-656 IgG2	23-2-878							

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	0,09	0,073	0,872	0,407	0,235	0,082						
B blanc	0,105	0,046	0,117	0,08	0,075	0,102						
C prot	0,971	0,203	0,167	0,712	0,083	0,117						
D blanc	0,075	0,084	0,044	0,11	0,096	0,123						
E prot	0,077	0,197	0,162	0,072	0,089							
F blanc	0,086	0,071	0,108	0,054	0,078							
G prot	0,948	0,472	0,358	0,296	0,079							
Hblanc	0,12	0,052	0,084	0,076	0,088							

Resultado:

- **23-2-875**: sneg
- **22-2-374**: OD IgGtot 0,828. Subclases: IgG2 (OD 0,119), IgG3 (OD 0,126), IgG4 (OD 0,42)
- **136-08**: OD IgGtot 0,755. Subclases: IgG1 (OD 0,123), IgG3 (OD 0,274), IgG4 (0,327)

- **23-2-656:** OD IgGtot 0,602. Subclases: IgG2 (OD 0,22), IgG3 (OD 0,16)
- **23-2-877:** neg
- **23-2-878:** neg
- **23-2-881:** neg
- **23-2-905:** neg

24/08/2023

✓ **ICC GlialCAM en células vivas (Gemma)**

Objetivo: pasar 50 muestras de LCR de pacientes EM en HEKs transfectadas con GlialCAM vivas.

Muestras: LCR de EM

- | | | |
|----------|----------|----------|
| · EM-330 | · EM-355 | · EM-368 |
| · EM-338 | · EM-356 | · EM-369 |
| · EM-341 | · EM-359 | · EM-370 |
| · EM-343 | · EM-360 | · EM-475 |
| · EM-348 | · EM-361 | · EM-376 |
| · EM-349 | · EM-365 | · EM-377 |
| · EM-351 | · EM-367 | · EM-380 |

Protocolo cels vivas (sin fijar):

- Incubar con suero 1/100 o LCR 1/10 en medio HEK293 (1h a 37°C): preparar 250 ul de cada muestra para cubrir el pozo (en el primer pozo poner solamente medio, en los otros 7 normal)
- 3 lavados con PBS1x
- Fijar 10 min con PFA4%
- 1 lavado con PBS1x y quitar la pieza de los culture slides
- Permeabilizar 5min con tritón 0,3% (en PBS1x)
- 1 lavado con PBS1x
- Incubar con anticuerpo comercial anti-CMYC diluído 1/200 en goat serum 5% (1h a RT) (solamente añadiremos el anticuerpo comercial en el primer pozo y en los otros pondremos solamente goat serum 5%)
- 3 lavados con PBS1x
- Incubar con Ac.secundarios GAM488 + GAH594 diluídos 1/750 en goat serum 5% (1h a RT) (el GAM488 solamente en el primer pozo, en los otros solo GAH594)

- 3 lavados PBS1x
- Montar con Fluoromount

Resultado: todas las muestras son negativas. GialCAM bien transfectado (fotos)

25/08/2023

✓ ELISA CASPR1 (screening) -Gemma-

Muestras y resultado:

- 23-2-906: neg
- 23-2-907: neg
- 23-2-908: 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

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	Cneg	23-2-908										
B blanc	Cneg	23-2-908										
C prot	Cpos CASPR1											
D blanc	Cpos CASPR1											
E prot	23-2-906											
F blanc	23-2-906											
G prot	23-2-907											
Hblanc	23-2-907											

Resultado:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	0,093	0,084										
B blanc	0,074	0,087										
C prot	0,566	0										
D blanc	0,077	0										
E prot	0,082	0										
F blanc	0,066	0										
G prot	0,069	0										
Hblanc	0,073	0										

31/08/2023

✓ ICC Perfil nodales/paranodales BD (Gemma)

CNTN1, NF140, NF155, NF186 (cels fijadas, suero 1/100)

Muestras y resultado:

- 23-2-908: neg
- 23-2-917: neg
- 23-2-918: neg
- 23-2-919: neg
- 23-2-920: neg

01/09/2023

✓ ICC GlialCAM en células vivas (Gemma)

Objetivo: pasar 50 muestras de LCR de pacientes EM en HEKs transfectadas con GlialCAM vivas. REPETICIÓN DE DÍA 29/08/23

Muestras: LCR de EM

- EM-339
- EM-349
- EM-353
- EM-354
- EM-357
- EM-358
- EM-336
- EM-363
- EM-364
- EM-373
- EM-332
- EM-333
- EM-335
- EM-340
- EM-405
- EM-382
- EM-384
- EM-411

Protocolo cels vivas (sin fijar):

- Incubar con suero 1/100 o LCR 1/10 en medio HEK293 (1h a 37°C): preparar 250 ul de cada muestra para cubrir el pozo (en el primer pozo poner solamente medio, en los otros 7 normal)
- 3 lavados con PBS1x
- Fijar 10 min con PFA4%
- 1 lavado con PBS1x y quitar la pieza de los culture slides
- Permeabilizar 5min con tritón 0,3% (en PBS1x)
- 1 lavado con PBS1x
- Incubar con anticuerpo comercial anti-CMYC diluído 1/200 en goat serum 5% (1h a RT) (solamente añadiremos el anticuerpo comercial en el primer pozo y en los otros pondremos solamente goat serum 5%)
- 3 lavados con PBS1x
- Incubar con Ac.secundarios GAM488 + GAH594 diluídos 1/750 en goat serum 5% (1h a RT) (el GAM488 solamente en el primer pozo, en los otros solo GAH594)
- 3 lavados PBS1x
- Montar con Fluoromount

Resultado: no se ven células!!! REPETIR

*Descubro que Gemma ha lavado las células vivas con agua destilada y no con PBS1x (no le han añadido el PBS10x al agua de cultivos)

04/09/2023

✓ IHC teasing nervio ciático cerdo

Muestras:

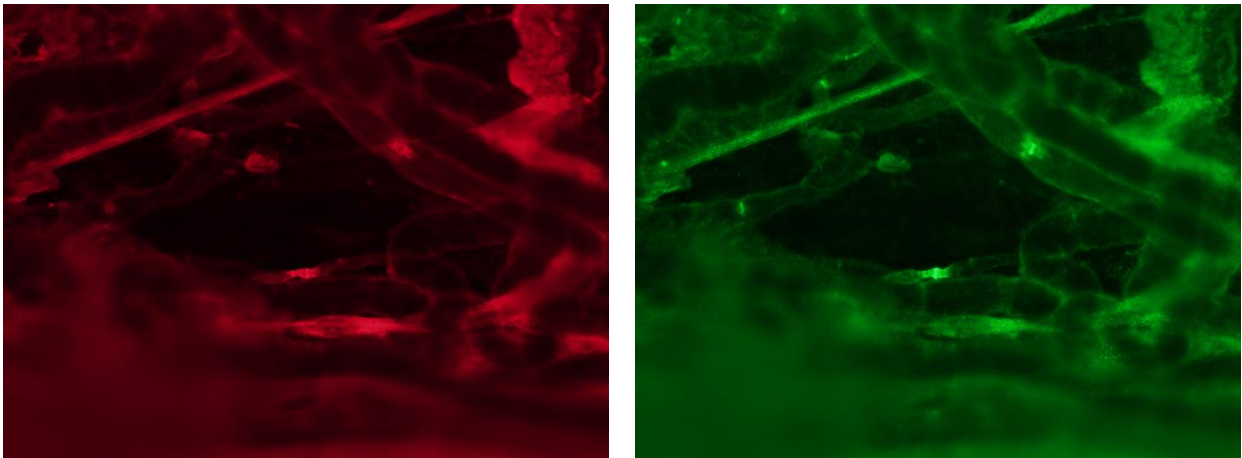
2. 23-349163: CNTN1+ nuevo (confirmar positividad)
3. Cpos CNTN1+

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 1/100 (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: 23-349163 es claramente CNTN1+ (fotos)



✓ ICC co-cultivos (día 45 - rata 20/07/2023)

Cojo cubres de todas las condiciones para ir viendo cómo va la diferenciación.

Protocolo:

- Fijar 20 min con PFA 4%
- 1 lavado con PBS1x
- Bloquear con Goat serum 5% y 0'5% tritón (en PBS): 1h a RT
- Incubar con anticuerpos primarios diluídos en Goat serum 5% y 0'5% tritón (en PBS):
 - **MBP y NFh:**
 - anti-Myelin basic protein SMI99, 808401 (Biolegend). Dil. **1/100** (mouse) : 3h 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 0'5% tritón (todos a 1/500)
 - MBP y NFh: GAM594 + GAC488
- 3 lavados con PBS1x
- Montar con Fluoromount

Resultado: aunque el NFh se ve muy bien, en ninguno de los cubres hay mielina: tiro los explantes de DRG del día 01/06/2023!!

Tengo que comprobar que el anticuerpo anti-MBP funcione correctamente.

✓ **Descongelar C2C12**

- Descongelado 1 vial de células C2C12 (mioblastos) en 1 placa de 100mm con gelatina 0,15% : vial p6 (Contenedor 4, Rack 6, Caja 9G6)
- Medio proliferación: DMEM, 10%FBS, 1%Pen-Str (igual que medio HEKs)

05/09/2023

✓ **Descongelar células de Schwann**

- Descongelado 1 vial de **células de Schwann humanas** (línea comercial 1700, ScienceCell) en 1 placa de 100mm con gelatina 0,15% : vial p3 congelado el día 03/06/2022 por mi
 - **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)
- Descongelado 1 vial de **células de Schwann de rata** (cultivo primari) en 1 placa de 100mm con gelatina 0,15% : vial p4 congelado el día 21/12/2022 por Elba.
 - **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 células + transfección Culture slides

24 culture slides:

- 14 Perfil
- 6 LRP4
- 2 LRP4/CASPR2
- 1 NF155/CNTN1
- 1 MBP/GliaCAM

Protocolo:

- Preparar mezclas transfección cada culture slide (8 pozos)
 - 2 ug DNA + 40 ul Optimem
 - 3,2 ul lipofectamina2000 + 40 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 10 ul de mezcla de transfección a cada pozo

07/09/2023

✓ **Coating placas para co-cultivos y neuronas**

Placas:

- **Explantos DRG:** 2 placas de 24 wells con 1 cubre de 12mm en cada pozo:
 - 24w con coating Poly-D-lys/laminina
 - 24w con coating matrigel :
- **Explantos médula:** 2
- **Neuronas DRG:** 3 placas 60 cc con 26 cubres 9mm, y 1 placa de 35cc con 6 cubres 9mm. Las usaremos para:
 - Neuronas DRG solas
 - Neuronas DRG + cels Schwann humanas (las CS se plantarán más adelante)
 - Neuronas DRG + cels Schwann rata (las CS se plantarán más adelante)
 - Neuronas DRG + cels C2C12 (línea mioblastos ratón): placa 35 cc (las C2C12 se plantarán más adelante)
- **Neuronas médula:** 6 placas 60 cc con 26 cubres 9mm (el coating de estas placas se hace el día 8/9/23). Las usaremos para:
 - Neuronas médula solas (2 placas)
 - Co-cultivos médula disgregada
 - Neuronas médula + cels Schwann humanas (las CS se plantarán más adelante)
 - Neuronas médula + cels Schwann rata (las CS se plantarán más adelante)
 - Neuronas médula + cels C2C12 (línea mioblastos ratón): las C2C12 se plantarán más adelante

Protocolo coating Poly-D-lys/laminina:

- Coating con Poly-D-lys 1/40 : incubar 1h a 37°C
- Lavar 1 vez con PBS1x

- Coating con laminina 4 ul/ml: incubar 1h a 37°C (he aumentado la concentración de laminina)
 - *descongelar la laminina en la nevera o en hielo

- Lavar 1 vez con PBS1x

Protocolo coating Matrigel:

- Preparar el Matrigel 1/10 en DMEM: preparo sólo 1 ml de la dilución (900ul de DMEM y 100ul de Matrigel)
 - *descongelar el matrigel en la nevera o en hielo
- Poner en un pozo y rápidamente quitar la solución para dejar sólo una capa fina.
- Ir pasando el matrigel diluído de un pozo al otro
- No dejar secar los pozos después de pasar el matrigel : añadir medio NG rápidamente

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

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

Se piden ratas E15 pero se utilizan pasadas 24horas : 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%)
- 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 inyetable 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

Co-cultivos (explantes DRG)

- DO : Añadir 400 ul de **medio NG** (co-culture medium) a cada pozo con cubre:
 - **Medio NG:**
 - 48 ml de medio Neurobasal
 - 1 ml de suplement B27
 - 500 µl de glutamax
 - 500 µl de Pen-Str
 - 25 µl de NGF
- Poner un DRG o trocito de médula en cada pozo/cubre e incubar a 37°C

Neuronas DRG

- Pasar los DRG a un tubo de 15 ml : con pipeta Pasteur de cristal y tetina
- Centrifugar a 300 rpm 5 min
- Eliminar el sobrenadante (con pasteur cristal+ tetina) e ir tirando a una placa, para no perder ningún DRG.
- Poner 5 ml de PBS1x y centrifugar a 300 rpm 5 min
- Eliminar el sobrenadante y añadir 4,5 ml PBS + 500 ul de tripsina 2,5% sin bromophenol
- Incubar 15min a 37°C (en el baño). Homogeneizar suavemente cada 5 minutos.
- Añadir 5 ml de medio L15 con FBS para inactivar la tripsina
- Centrifugar a 300 rpm 10min
- Pasar el pellet a un eppendorf con 1 ml de **medio NG**, disgregar con pipetas Pasteur de vidrio finas (se hacen finas con el bunsen y se autoclavan).
- Dividir el ml de células entre **3 placas 60 cc con 26 cubres 9mm, y 1 placa de 35cc con 6 cubres 9mm.**

*Guardo en **MACS Tissue Storage Solution (130-100-008, Milteny)** las médulas de 10 embriones y las dejo en 4°C hasta el día siguiente.

08/09/2023

✓ Disgregar médulas (Adult brain dissociation Kit - Milteny)

Disgrego las 10 médulas guardadas en Tissue Storage Solution el día anterior (sacadas de embriones E16 de rata).

Uso un kit que me deja Xavi: Adult brain dissociation kit (130-107-677, Milteny), y uso la máquina GentleMACS.

Protocolo kit:

Reagent and instrument preparation

▲ For subsequent cultivation it is recommended to dissociate at least 800 mg of adult neural tissue.

▲ Volumes given below are for one adult mouse brain (max. 500 mg) in 1980 μ L enzyme mix. When working with less than 500 mg, use the same volumes as indicated. When working with neural tissue from adult rats or distinct brain regions, determine the weight and scale up all reagent volumes and total volumes accordingly. A maximum of 500 mg neural tissue per C Tube can be processed.

1. Enzyme P is ready to use. Prepare aliquots of appropriate volume to avoid repeated freeze-thaw-cycles. Store aliquots at -20°C . This solution is stable for 6 months. Resuspend the lyophilized powder in the vial labeled Enzyme A with 1 mL Buffer A. Do not vortex. This solution should then be aliquoted and stored at -20°C for later use. Avoid repeated freeze-thaw-cycles: **en este caso las enzimas ya estaban alicuotadas.**

2. Prepare enzyme mix 1 and enzyme mix 2 according to the table below (**las enzimas están a -20°C y los buffers a 4°C**)

- Enzyme mix 1: 50 μ L Enzyme P + 1900 μ L Buffer Z
- Enzyme mix 2: 20 μ L Buffer Y + 10 μ L Enzyme A

Dissociation protocol

▲ 20 mg up to 500 mg of rodent neural tissue in 2 mL enzyme mix can be processed in one C Tube.

▲ For cell culture experiments subsequent to tissue dissociation, all steps should be performed under sterile conditions.

1. Remove the rodent neural tissue. Wash neural tissue in cold D-PBS.

2. Prepare the appropriate volume of enzyme mix 1 (refer to table in section 1) and transfer it into a gentleMACS C Tube.

3. Cut larger tissue (e.g. whole brain or spinal cord) into approximately 8 sagittal slices or 0.5 cm pieces using a scalpel. In case of smaller tissue, e.g., hippocampus continue directly with step 4: **en este caso no corto las médulas porque ya son suficientemente pequeñas.**

4. Transfer the tissue pieces into the C Tube containing 1950 μ L of enzyme mix 1.
5. Transfer 30 μ L of enzyme mix 2 into the C Tube.
6. Tightly close C Tube and attach it upside down onto the sleeve of the gentleMACS Octo Dissociator with Heaters.
7. Run the appropriate gentleMACS Program:
 - 20–100 mg: 37C_ABDK_02
 - >100 mg: 37C_ABDK_01.

*Uso el programa 37C_ABDK_01 porque hay bastante cantidad: poner el tubo boca abajo en el GentleMACS con la parte plana hacia adelante, poner el Heater (pieza amarilla), seleccionar programa (dura 30min).

8. After termination of the program, detach C Tube from the gentleMACS Octo Dissociator with Heaters.
9. Centrifuge briefly to collect the sample at the bottom of the tube.
10. Resuspend sample and apply it to a MACS SmartStrainer (70 μ m) placed on a 50 mL tube.

▲ Note: Moisten MACS SmartStrainer with buffer before use.

▲ Note: When upscaling the reagent volume and total volumes, increase also the number of MACS SmartStrainers (70 μ m). One MACS SmartStrainer (70 μ m) can be used for one adult mouse brain.

▲ Note: Cells with a diameter >70 μ m may be lost. To obtain these cells within the flow through, use a cell strainer with an appropriate mesh size.

11. Add 10 mL of cold D-PBS to the C Tube, close C Tube, shake gently and apply the D-PBS onto the MACS SmartStrainer (70 μ m).

12. Discard MACS SmartStrainer (70 μ m) and centrifuge cell suspension at 300 \times g for 10 minutes at 4 °C. Aspirate supernatant completely: en este caso no lo he centrifugado a 4°C porque la centrifuga de cultivos no tieneregulador de temperatura.

13. Proceed to 2.3 for debris removal: no hago este paso!!!

*Después de aspirar el sobrenadante, resuspendo las células en 6 ml de medioNG y las planto en 6 placas de 60cc con 26 cubres 9mm : cuento las células y hay 12millones

✓ Cambios medios co-cultivos, neuronas DRG y neuronas médula: rata
07/09/2023

- **Explantos DRG:** 2 placas de 24 wells con 1 cubre de 12mm en cada pozo (1 placa con Poly-D-lys/laminina, y otra con Matrigel)
 - D0 (07/09): Añadir 400 ul de **medio NG** a cada pozo con cubre:
 - Neurobasal: 48 ml
 - 2% B27: 1 ml
 - 1% Glutamax: 0,5 ml
 - 1% Pen-Str: 0,5 ml
 - 50 ng/ml NGF:25 ul
 - D1 (8/9): añadido 150ul de **medio NG** (no quito nada del anterior)
 - D4 (11/9): quito 300ul de cada pozo y añadido 400ul de **medio NG** nuevo
 - D6 (13/9) : quito 300ul de cada pozo y añadido 400ul de **medio de mielinización NG:**
 - 50 ml de medio NG
 - 50 ug/ml de ácido ascórbico: 500 ul del stock 5mg/ml (1/100 en el medio)
 - D8 (15/9): cambiar mitad del medio de mielinización
 - A partir de aquí ir cambiando la mitad del medio de mielinización cada 3 días
- **Explantos médula:** 1 placa de 24 wells con 1 cubre de 12mm en cada pozo (12w con Poly-D-lys/laminina, y 12w con Matrigel)
 - Mismo tratamiento que explantes DRG
- **Neuronas DRG:** 3 placas 60 cc con 26 cubres 9mm, y 1 placa de 35cc con 6 cubres 9mm.
 - D0 (7/9) : Añadir **medio NG**
 - D1 (8/9): cambiar la mitad de medio por **medio NGF**
 - 50 ml de medio NG
 - 10 µl de 5-fluorodesoxiuridina (1)
 - 10 µl de uridina (2)
 - 5 µl de AraC 10 mM
 - D4 (11/9): cambiar la mitad de medio por **medio NG** (las células se han quedado un poco chungas)
 - D5 (12/9): cambiar la mitad de medio por medio NG (para eliminar los restos de medio NGF que puedan haber)
 - Ir cambiando la mitad del medio NG cada 2/3 días

- El día 19/09 tiro las neuronas porque no están creciendo
- **Células médula disgregadas (con glía)**: 1 placa 60cc con 26 cubres 9mm:
 - Tratadas como explantes de DRG y médula
- **Neuronas médula**: 2 placas 60 cc con 26 cubres 9mm (tratadas como neuronas DRG con alguna variación)
 - D0 (8/9) : Añadir **medio NG**
 - D3 (11/9): cambiar la mitad de medio por **medio NGF**
 - D5 (13/9): cambiar la mitad de medio por medio NG
 - D6 (14/9): cambiar la mitad de medio por medio NG (para eliminar los restos de medio NGF que puedan haber)
 - Ir cambiando la mitad del medio NG cada 2/3 días
- **Neuronas médula + cels Schwann/C2C12**: 3 placas 60 cc con 26 cubres 9mm
 - D0 (8/9) : Añadir **medio NG**
 - D3 (11/9): cambiar la mitad de medio por **medio NGF**
 - D5 (13/9): cambiar la mitad de medio por medio NG
 - D6 (14/9): cambiar la mitad de medio por medio NG (para eliminar los restos de medio NGF que puedan haber)
 - D7 (15/9): planto células de Schwann y C2C12 en placas de neuronas de médula. Todas con **medio C** (DMEM, 1%Pen-Str, 10%FBS, 25ul NGF)
 - CS humanas: 1 millón de cels en 1 placa de neuronas médula.
 - CS primarios rata: 1 millón de cels en 1 placa de neuronas médula. Medio C
 - C2C12: 0'1millones cels en 1 placa de neuronas médula (aprox 5000c/cm2)
 - D14 (21/9):
 - Médula + cels Schwann: cambio la mitad del medio por **medio de mielinización NG**
 - Médula + C2C12: cambio la mitad del medio por **medio de diferenciación C2C12 + NGF** (DMEM, 1%Pen-Str, 5% Horse serum, 25ul NGF)
 - A partir de aquí ir cambiando la mitad del medio de mielinización/diferenciación cada 3 días

✓ Descongelar C2C12

- Descongelar 1 vial de células C2C12 (mioblastos) en 1 placa de 100mm con gelatina 0,15% : vial p7 congelado por Xavi en 2015 (Contenedor 4, Rack 5, caja 3H6)
- Medio proliferación: DMEM, 10%FBS, 1%Pen-Str (igual que medio HEKs)

✓ ICC MBP y GlialCAM

1 culture slide transfectado día 05/09 (fijado con PFA 4% 10min, y congelado a -80°C)

- Pozos 1-4: transfectados con MBP (para probar si el ac.anti-MBP que uso en los co-cultivos funciona bien)
- Pozos 5-8: transfectados con GlialCAM (para probar si el ac.anti-cmyc funciona bien)

Protocolo:

- Descongelar culture slide con PBS1x
- Permeabilizar 5min con tritón 0,3% en PBS1x
- 1 lavado con PBS1x
- Bloquear con Goat serum 5%: 1h a RT
- Incubar con anticuerpos primarios diluidos en Goat serum 5%:
 - Pozos 1 y 2: **MBP** (anti-Myelin basic protein SMI99, 808401 Biolegend) Dil. 1/100 (mouse): 1h RT
 - Pozos 3 a 8: **c-myc** dil. 1/100 (mouse): 1h RT
- 3 lavados con PBS1x
- Incubar 1h con Ac. secundarios diluidos en Goat serum 5%: **GAM488** 1/500
- 3 lavados con PBS1x
- Montar con Fluoromount

Resultado: tanto el MBP como el c-myc se ven muy bien (glialCAM se transfecta perfectamente)

12/09/2023

✓ Congelación Cels Schwann primarios rata

Congelo 2 viales de p5 con 0,5 millones de cels/vial : en medio proliferación CS rata + 10%DMSO:

- **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)

✓ ICC co-cultivos (día 53 - rata 20/07/2023)

Cojo cubres de todas las condiciones y 1 culture slide para ir viendo cómo va la diferenciación.

- 1) DRG explante P/L : MBP y NFh
- 2) DRG explante matrigel : MBP y NFh
- 3) Cubre médula disgregada co-cultivo : MBP y NFh
- Culture slide (explantes DRG P/L)
 - Pozos 1,2) MBP y NFh
 - Pozos 3,4) S100 y NFh
 - Pozos 5,6) NCAM2 y NFh
 - Pozos 7,8) Caspr1 y NFh

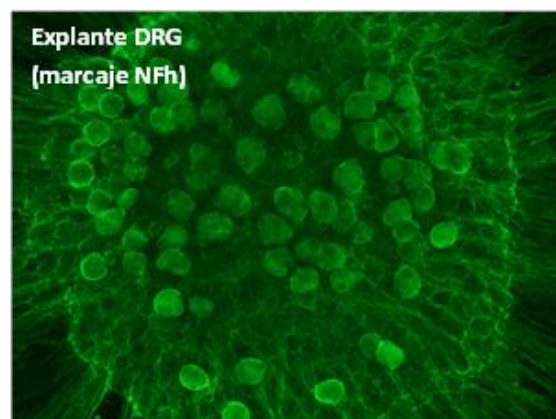
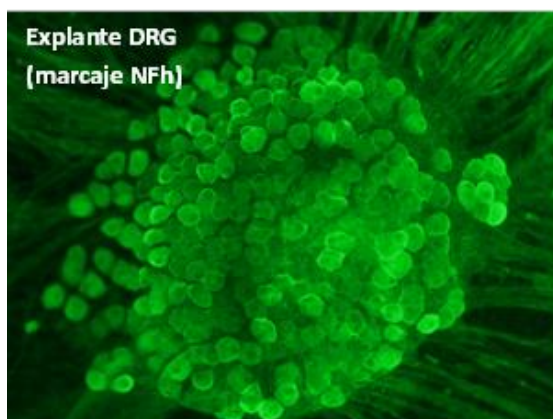
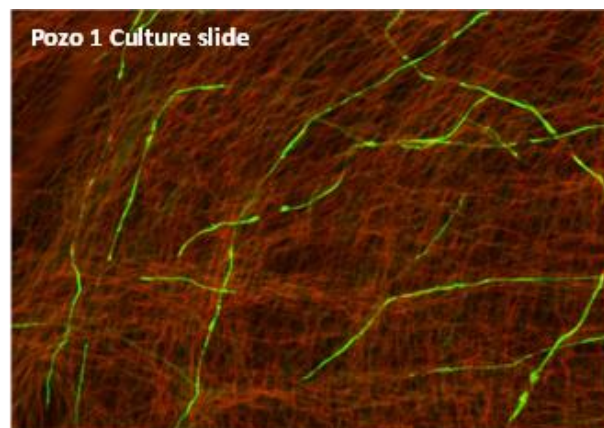
Protocolo:

- Fijar 20 min con PFA 4%
- 1 lavado con PBS1x
- Bloquear con Goat serum 5% y 0'5% tritón (en PBS): 1h a RT
- Incubar con anticuerpos primarios diluídos en **PBS -0,3% tritón** (overnight 4°C)
 - **MBP:** anti-Myelin basic protein SMI99, 808401 (Biolegend). Dil. **1/100** (mouse)
 - **S100:** ab66041 (Abcam). Dil. 1/100 (rabbit)
 - **NCAM2:** ab173297 (Abcam). Dil. 1/100 (rabbit)
 - **Caspr1:** ab133634 (abcam). Dil. 1/100 (rabbit)
- 3 lavados con PBS1x
- Incubar con anticuerpos primarios diluídos en **Goat serum 5%** (1h RT)
 - **NFh:** anti-Neurofilament H, AB5539 (Merck) Dil. 1/500 (chicken)
- 3 lavados con PBS1x
- Incubar 1h con Ac. secundarios diluídos en **Goat serum 5%** (todos a 1/500)
 - MBP y NFh: GAM488 + GAC594

- S100 y NFh: GAR488 + GAC594
- NCAM2 y NFh: GAR488 + GAC594
- Caspr1 y NFh: GAR488 + GAC594
- 3 lavados con PBS1x
- Montar con Fluoromount

Resultado:

- 1) DRG explante P/L: hay mielina pero se ve flojito el MBP
- 2) DRG explante matrigel: hay mielina pero se ve flojito el MBP
- 3) Cubre médula disgregada co-cultivo: hay mucha mielina
- Culture slide (explantes DRG P/L)
 - Pozos 1,2) MBP y NFh: hay mucha mielina
 - Pozos 3,4) S100 y NFh: S100 no marca nada
 - Pozos 5,6) NCAM2 y NFh: NCAM2 no marca nada
 - Pozos 7,8) Caspr1 y NFh: no veo si el Caspr1 marca los paranodos (tengo que hacer doble con MBP)



13/09/2023

✓ ELISA NF155 y CASPR1

Muestras:

- 23-2-917: screening CASPR1
- 23-2-918: screening CASPR1
- 23-2-919: screening CASPR1
- 23-2-920: screening CASPR1
- 23-2-921: screening CASPR1
- 23-2-925: screening CASPR1
- 23-2-554: titulación y subclases CASPR1 (las subclases se hacen a 1/50)
- 23-2-813: titulación NF155 (Nasser Wael 01/08/2023)
- 23-2-85 (Box 318): titulación NF155 (Nasser Wael 16/01/2023)

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%
- Ac secundarios:
 - Titulación / screening / confirmación: Incubar con **RAH IgG HRP** 1/3000 en leche 5% en PBS-tween 0'1% : 100 ul/pozo, 45 min
 - Subclases: Incubar con **MAH HRP** IgG1 o IgG2 o IgG3 o IgG4 1/1000 en leche 5% en PBS-tween 0'1% : 100 ul/pozo, 45 min
- 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	23-2-554 1/900	23-2-554 IgG1	23-2- 917	23-2- 921	Cneg	23-2-813 1/900	23-2-85 1/100				
B blanc	Cneg	23-2-554 1/900	23-2-554 IgG1	23-2- 917	23-2- 921	Cneg	23-2-813 1/900	23-2-85 1/100				
C prot	Cpos CASPR1	23-2-554 1/2700	23-2-554 IgG2	23-2- 918	23-2- 925	Cpos NF155	23-2-813 1/2700	23-2-85 1/300				
D blanc	Cpos CASPR1	23-2-554 1/2700	23-2-554 IgG2	23-2- 918	23-2- 925	Cpos NF155	23-2-813 1/2700	23-2-85 1/300				
E prot	23-2-554 1/100	23-2-554 1/8100	23-2-554 IgG3	23-2- 919		23-2-813 1/100	23-2-813 1/8100	23-2-85 1/900				
F blanc	23-2-554 1/100	23-2-554 1/8100	23-2-554 IgG3	23-2- 919		23-2-813 1/100	23-2-813 1/8100	23-2-85 1/900				
G prot	23-2-554 1/300	23-2-554 1/24300	23-2-554 IgG4	23-2- 920		23-2-813 1/300	23-2-813 1/24300					
Hblanc	23-2-554 1/300	23-2-554 1/24300	23-2-554 IgG4	23-2- 920		23-2-813 1/300	23-2-813 1/24300					

CASPR1 **NF155**

Resultado:

ELISA leído el mismo día

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	0,104	0,172	0,195	0,183	0,111	0,077	0,117	0,252	0	0	0	0
B blanc	0,076	0,073	0,055	0,077	0,083	0,069	0,062	0,08	0	0	0	0
C prot	1,275	0,109	0,221	0,097	0,089	0,633	0,081	0,139	0	0	0	0
D blanc	0,084	0,061	0,106	0,064	0,084	0,071	0,067	0,071	0	0	0	0
E prot	0,719	0,073	0,074	0,084	0	0,411	0,069	0,078	0	0	0	0
F blanc	0,062	0,055	0,066	0,072	0	0,07	0,05	0,067	0	0	0	0
G prot	0,295	0,061	0,182	0,073	0	0,224	0,067	0	0	0	0	0
Hblanc	0,07	0,059	0,136	0,059	0	0,066	0,069	0	0	0	0	0

El mismo ELISA leído al día siguiente:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	0,025	0,098	0,104	0,094	0,023	0,006	0,031	0,199	0	0	0	0
B blanc	0,004	0,006	0,004	0,006	0,007	0,003	0,003	0,012	0	0	0	0
C prot	0,967	0,03	0,122	0,017	0,01	0,539	0,009	0,062	0	0	0	0
D blanc	0,006	0,005	0,03	0,004	0,008	0,005	0,004	0,005	0	0	0	0
E prot	0,511	0,006	0,007	0,01	0	0,32	0,003	0,009	0	0	0	0
F blanc	0,006	0,006	0,004	0,005	0	0,004	0,003	0,003	0	0	0	0
G prot	0,186	0,004	0,088	0,005	0	0,128	0,003	0	0	0	0	0
Hblanc	0,006	0,004	0,056	0,004	0	0,003	0,003	0	0	0	0	0

- 23-2-917: CASPR1 neg
- 23-2-918: CASPR1 neg
- 23-2-919: CASPR1 neg
- 23-2-920: CASPR1 neg
- 23-2-921: CASPR1 neg
- 23-2-925: CASPR1 neg
- 23-2-554: titulación y subclases CASPR1 : título 1/900 (ya se hizo anteriormente y dio 1/2700, probablemente por la congelación-descongelación se han perdido títulos).
Subclases: IgG1 y IgG2 (muy débiles)
- 23-2-813: titulación NF155 (Nasser Wael 01/08/2023) : 1/300
- 23-2-85 (Box 318): titulación NF155 (Nasser Wael 16/01/2023) : 1/100

✓ ICC co-cultivos (día 54 - rata 20/07/2023)

Cojo 1 Culture Slide de co-cultivos 20/07/23, y 4 cubres de médula disgregada con glía 20/7/23 para ver cómo marcan los sueros Caspr1+

Muestras:

1. 22-2-374 (Caspr1+)
2. 136-8 (Caspr1+)
3. 23-2-656 (Caspr1+)
4. 23-2-725 (panNF+)

Protocolo:

- Incubar con **suero** 1/50 en medio de mielinización (7 ul en 350 ul) : overnight 37°C

- Al día siguiente (14/09) vuelvo a a añadir 7 ul de suero a los pozos (en el mismo medio, añado directamente el suero que corresponda a cada pozo): overnight 37°C
- 1 lavado con PBS1x
- Fijar 20 min con PFA 4%
- 1 lavado con PBS1x
- Bloquear 30min con Goat serum 5% tritón 0,5%
- Incubar con anticuerpo primario diluído en Goat serum 5% (3h RT): **MBP** anti-Myelin basic protein SMI99, 808401 (Biolegend). Dil. 1/100 (mouse)
- 3 lavados con PBS1x
- Incubar 1h con Ac. secundarios diluídos en Goat serum 5% (1/500): **GAH594 IgG** (suero) + **GAM488** (MBP)
- 3 lavados con PBS1x
- Montar con fluoromount

Resultado: hay mucha mielina pero creo que es mejor hacer la ICC de MBP overnight. Los sueros marcan mucho todas las neuronas y no se puede ver bien el marcaje del paranodo. En los cubres de médula no se ve mielina. Próximas cosas a hacer:

- Separar las IgG de los sueros CASPR1+ y ver si así disminuye el marcaje de los axones
- Hacer fotos en confocal

✓ ICC Perfil nodales/paranodales BD

CNTN1, NF140, NF155, NF186 (cels fijadas, suero 1/100)

Muestras y resultado:

- 23-2-921: neg
- 23-2-925: neg
- 23-2-930: NF140, NF155, NF186+ : titular!!
- 23-2-923: CNTN1 neg (muestra previamente CNTN1+)

15/09/2023

✓ Congelación Cels Schwann primarios rata

Congelo 5 viales de p6 con 1,3 millones de cels/vial : en medio proliferación CS rata + 10%DMSO

- 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)

✓ Congelación Cels Schwann humanas (línea celular)

Congelo 4 viales de p4 con 1 millón de cels/vial : en medio proliferación CS humanas + 10%DMSO

- 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)

✓ Congelación C2C12

Congelo 2 viales de p7 con 1 millón de cels/vial : en medio proliferación C2C12 + 10%DMSO

Congelo 1 vial de p8 con 1 millón de cels/vial : en medio proliferación C2C12 + 10%DMSO

- Medio proliferación:
 - DMEM
 - 10%FBS
 - 1%Pen-Str

19/09/2023

✓ Separación IgG

Muestras: 4 muestras Caspr1+

- 136-08
- 22-2-374
- 23-2-656
- 23-2-554

Protocolo: kit Melon gel IgG Spin purification kit (ref 45206 ThermoFisher)

1. Equilibrar kit a temperatura ambiente (~15 minutos).
2. Agitar la botella que contiene el Purification suport (sin agitar) para obtener una suspensión uniforme. Para garantizar una dispensación adecuada de la suspensión de gel, utilizar una punta de pipeta cortada para dispensar 500 µl de suspensión en una Spin column colocada en un tubo de microcentrífuga.
3. Centrifugar el conjunto columna/tubo sin tapar durante 1 minuto a 5000 g, luego desechar el flow-through
4. Añadir 300 µl de Purification buffer a la columna, centrifugar a 5000 g durante 10 segundos y desechar el flow-through. Repetir este lavado una vez. Colocar la tapa inferior en la columna.
5. Diluir los sueros 1/10 con purification buffer : en este caso preparo **1ml 1/10** (900 ul buffer + 100ul suero), por lo que hago los pasos 6-8.
6. Añadir 500µL de suero diluido a la columna. Tapar la columna e incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente.
7. Retirar la tapa inferior de la columna, aflojar la tapa superior y volver a insertar la columna de centrifugación en el tubo de recogida.
8. Centrifugar durante 1 minuto a 5000g para recoger el anticuerpo purificado en el tubo de microcentrífuga.

✓ ELISA CASPR1

Hago ELISA de CASPR1 en las muestras CASPR1+ en que he separado las IgG para ver si se han separado bien. Hago dilución 1/10 porque durante la separación ya se han diluído 1/10.

Muestras:

- | | |
|---------------------|---------------------|
| · Cneg 1/100 | · IgG 23-2-554 1/10 |
| · IgG 136-08 1/10 | · 136-08 1/100 |
| · IgG 22-2-374 1/10 | · 22-2-374 1/100 |
| · IgG 23-2-656 1/10 | · 23-2-656 1/100 |

- 23-2-554 1/100
- 23-2-931 1/100

- 23-2-932 1/100

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%
- Ac secundarios:
 - Screening: Incubar con **RAH IgG HRP** 1/3000 en leche 5% en PBS-tween 0'1% : 100 ul/pozo, 45 min
- 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	IgG 23-2-554	23-2-554									
B blanc	Cneg	IgG 23-2-554	23-2-554									
C prot	IgG 136-08	136-08	23-2-931									
D blanc	IgG 136-08	136-08	23-2-931									
E prot	IgG 22-2-374	22-2-374	23-2-932									
F blanc	IgG 22-2-374	22-2-374	23-2-932									
G prot	IgG 23-2-656	23-2-656										
Hblanc	IgG 23-2-656	23-2-656										

Resultado:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	0,05	0,428	0,477									
B blanc	0,032	0,035	0,055									
C prot	1,204	1,158	0,035									
D blanc	0,036	0,048	0,036									
E prot	1,369	1,435	0,066									
F blanc	0,032	0,023	0,035									
G prot	0,927	0,683										
Hblanc	0,037	0,06										

- 136-08: OD IgG 1,168 / OD serum 1,11
- 22-2-374: OD IgG 1,337 / OD serum 1,412
- 23-2-656: OD IgG 0,89 / OD serum 0,623
- 23-2-554: OD IgG 0,393 / OD serum 0,422
- 23-2-931: neg
- 23-2-932: neg

✓ **ICC co-cultivos (día 60 - rata 20/07/2023)**

Cojo 1 Culture Slide de co-cultivos 20/07/23, y 9 cubres de explantes DRG co-cultivos 20/7/23 para ver cómo marcan las IgG separadas de sueros Caspr1+

Muestras:

- Culture slide 20/07
 1. 1,2) 136-8 IgG 1/5 (70ul suero + 280ul medio)
 2. 3,4) 22-2-374 IgG 1/5
 3. 5,6) 23-2-656 IgG 1/5
 4. 7,8) C+ panNF 1/50 (7ul suero + 350 ul medio)
- Cubres explantes DRG 20/07
 1. 136-8 IgG 1/5 (70ul suero + 280ul medio)
 2. 22-2-374 IgG 1/5
 3. 23-2-656 IgG 1/5
 4. 23-2-554 IgG 1/5
 5. C+ panNF 1/50 (7ul suero + 350 ul medio)

6. CIDP15 LIF+ 1/50: no hay mielina
7. CIDP78 LIF+ 1/50
8. LGI4+ 1/50: neg
9. Cneg 206-1 1/50

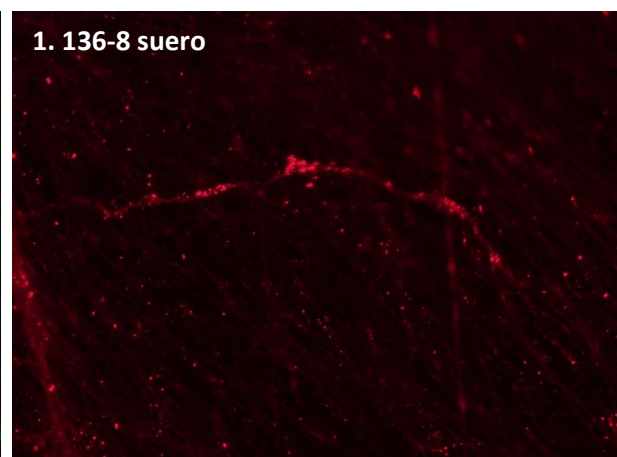
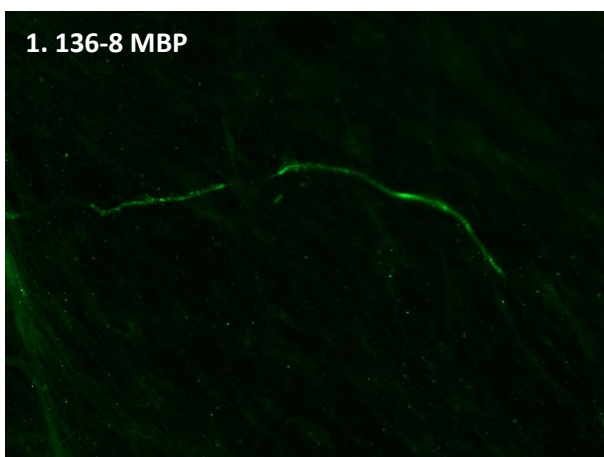
Protocolo:

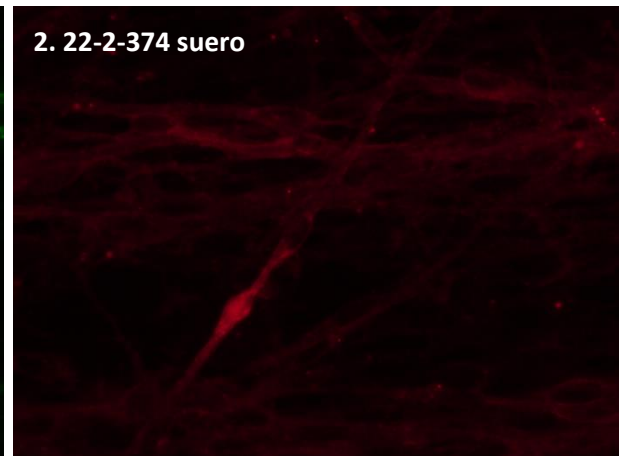
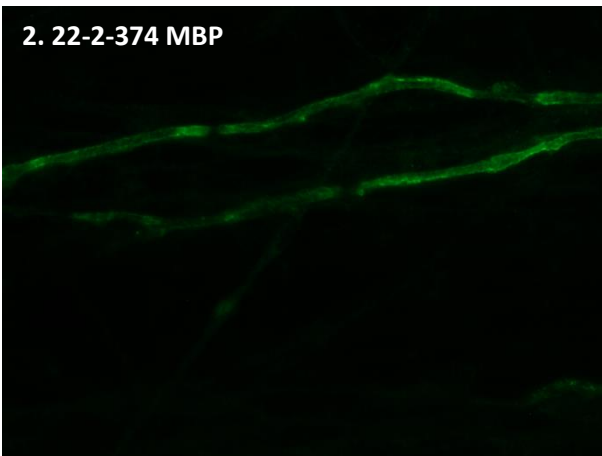
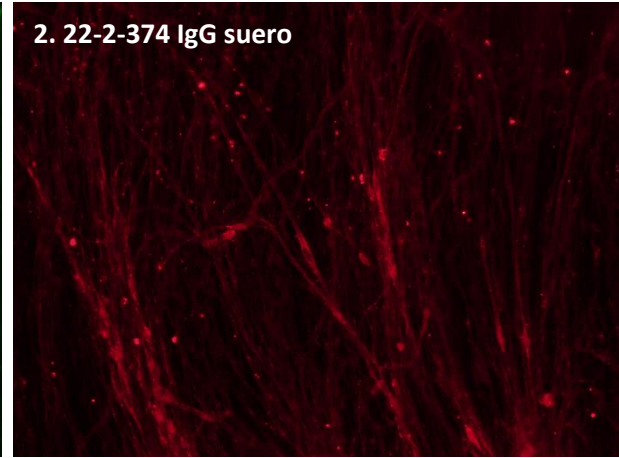
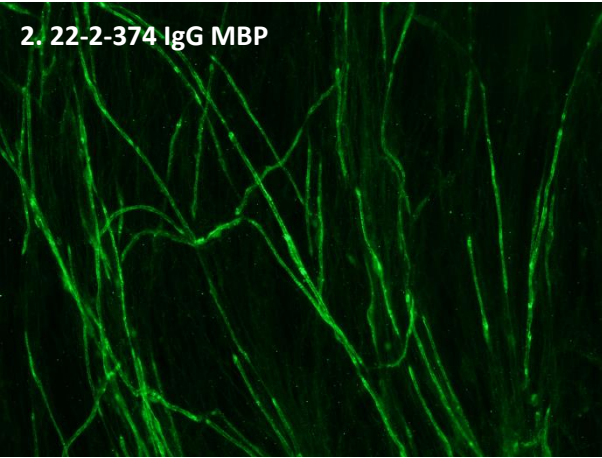
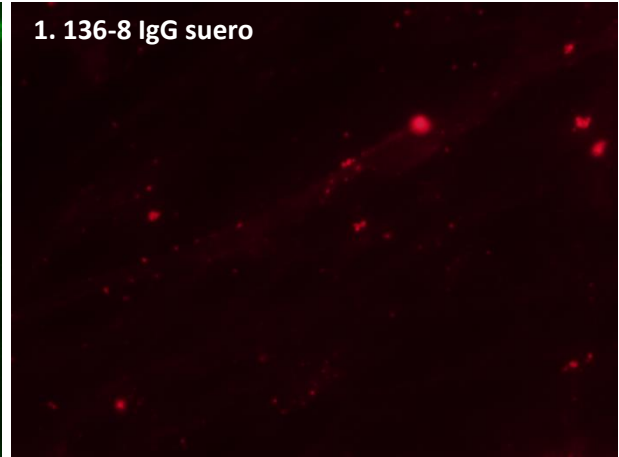
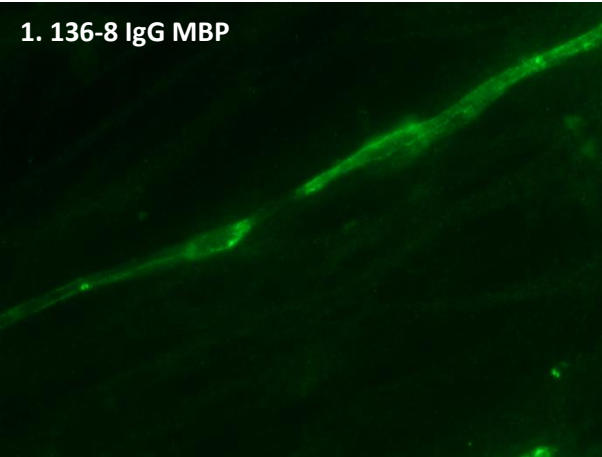
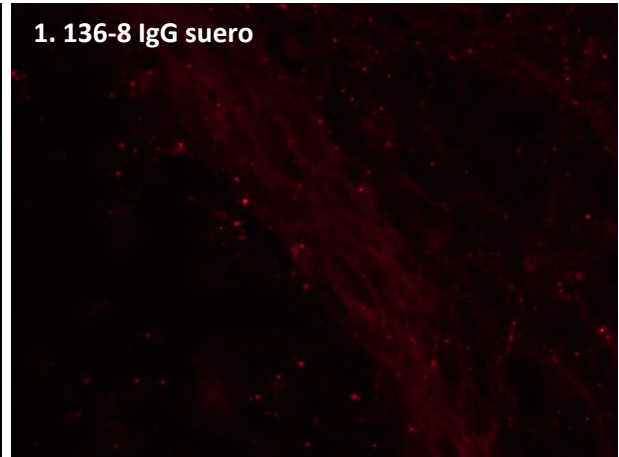
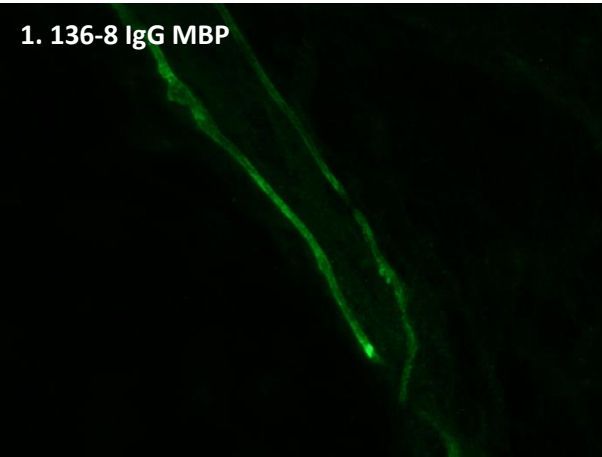
- Incubar con **suero** 1/50 en medio de mielinización: overnight 37°C
- 1 lavado con PBS1x
- Fijar 20 min con PFA 4%
- 1 lavado con PBS1x
- Bloquear 30min con Goat serum 5% tritón 0,3%
- Incubar con anticuerpo primario diluído en Goat serum 5% (3h RT): **MBP** anti-Myelin basic protein SMI99, 808401 (Biolegend). Dil. 1/100 (mouse)
- 3 lavados con PBS1x
- Incubar 1h con Ac. secundarios diluídos en Goat serum 5% (1/500): **GAH594 IgG** (suero) + **GAM488** (MBP)
- 3 lavados con PBS1x
- Montar con fluoromount

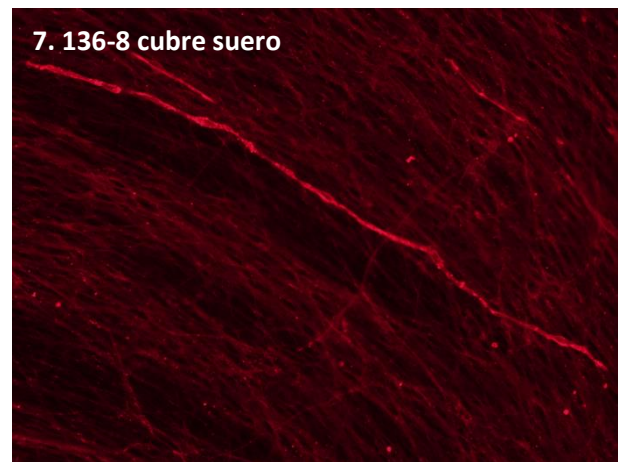
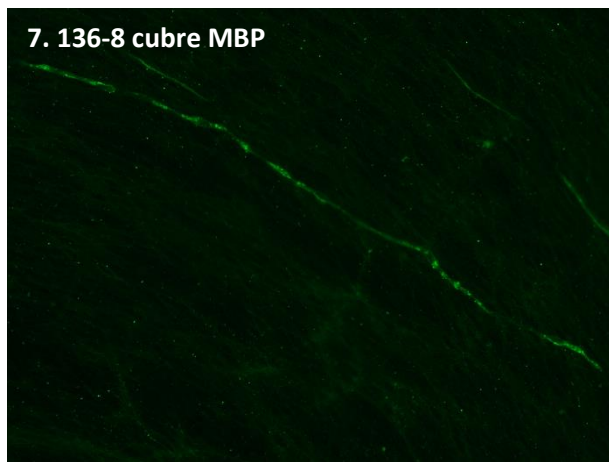
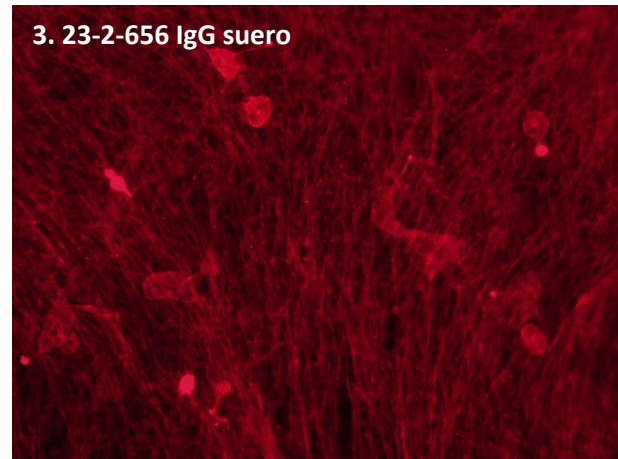
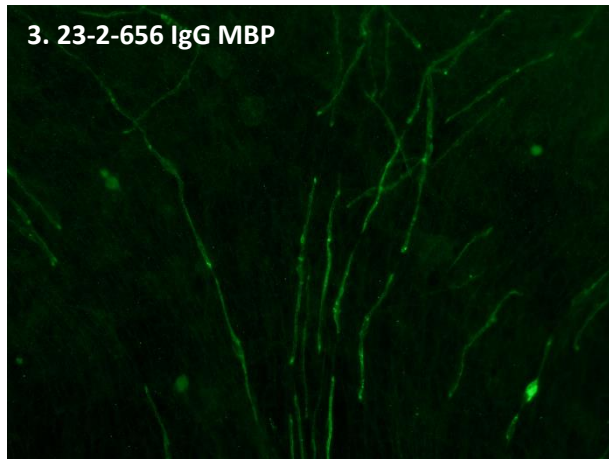
Resultado: aunque hay mucha mielina, no se ven los paranodos... las IgG de los Caspr1+ tienen mucho marcaje general. En los Caspr1+ se ve el GAH594 punteado.

La muestra 136-08/CIDP78 marca bastante la mielina (cuando incubo sólo con las IgG, el marcaje es punteado). 23-2-554 también marca punteado en la mielina

Igual no se ven los paranodos porque al poner los sueros overnight a 37°C se han roto parte de los paranodos: hacer la ICC igual pero incubando 1h en vez de overnight.







20/09/2023

✓ ICC Perfil nodales/paranodales BD

CNTN1, NF140, NF155, NF186 (cels fijadas, suero 1/100)

Muestras y resultado:

- 23-2-931: neg
- 23-2-932: neg

21/09/2023

✓ Congelación PBMC (NHC E2117615)

3 tubos CPT de **Juan María Talavera Canarias (E2117615)**: CNTN1+ pretratamiento. Los tubos se extraen el 19/09, llegan y se centrifugan el día 20/09.

- 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)

- 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)
- Decantar el sobrenadante a un tubo y lavar con suero fisiológico 1:1
- Centrifugar 300g 5min
- Resuspender en suero fisiológico y contar las células: 4 millones
- Centrifugar 300g 5min
- Congelar en FBS+10%DMSO: 4 viales de aprox 4 millones/vial (1 ml de FBS+DMSO) :
23-7-1033, Box PBMC 2 – E1 a E4

27/09/2023

✓ IHC Monkey peripheral nerve (BD)

Muestras:

1. 23-2-427 Box 327
2. 23-2-540 Box 331
3. 23-2-727 Box 339
4. Cneg

Protocolo: Monkey sciatic nerve slides (44685, Biosystems, Paalex)

- 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 45min 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. 23-2-427 Box 327: mielina IgG +++
2. 23-2-540 Box 331: mucho fondo (está muy hemolisado el suero)
3. 23-2-727 Box 339: negativo (envío informe)
4. Cneg

28/09/2023

✓ ICC co-cultivos Ac comerciales (día 69 - rata 20/07/2023)

Cojo 4 cubres de los explantes DRG co-cultivos P/L:

1. Doble MBP – panNF
2. Doble MBP – Caspr1
3. Triple MBP – panNF – NF200
4. Triple MBP – Caspr1 – NFh

Protocolo:

- 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 y secundarios diluídos en Goat serum 5% (sólo diluyo con GS5% tritón 0,3% el MBP). Hacer lavados entre cada paso:
 - **Cubre 1:**
 - MBP: SMI99, 808401 (Biolegend). Dil. **1/100** (mouse) : overnight 4°C
 - panNF: AF3235 (R&D systems). Dil. **1/500** (chicken) : 2h RT
 - GAM488 + GAC594: 1/500 : 1h RT
 - **Cubre 2:**
 - MBP: SMI99, 808401 (Biolegend). Dil. **1/100** (mouse) : overnight 4°C
 - Caspr1: ab133634 (abcam). Dil. **1/100** (rabbit) : 2h RT
 - GAM488 + GAR594: 1/500 : 1h RT
 - **Cubre 3:**
 - MBP: SMI99, 808401 (Biolegend). Dil. **1/100** (mouse) : overnight 4°C
 - panNF: AF3235 (R&D systems). Dil. **1/500** (chicken) : 2h RT
 - NF200: anti-Neurofilament200, N4142 (Merck). Dil. **1/50** (rabbit): 1h RT
 - GAM647 + GAR488 + GAC594: 1/500 : 1h RT
 - **Cubre 4:**
 - MBP: SMI99, 808401 (Biolegend). Dil. **1/100** (mouse) : overnight 4°C
 - Caspr1: ab133634 (abcam). Dil. **1/100** (rabbit) : 2h RT
 - NFh: anti-Neurofilament H, AB5539 (Merck) Dil. **1/500** (chicken) : 1h RT
 - GAM647 + GAR488 + GAC594: 1/500 : 1h RT
- 3 lavados con PBS1x
- Montar con Fluoromount

Resultado:

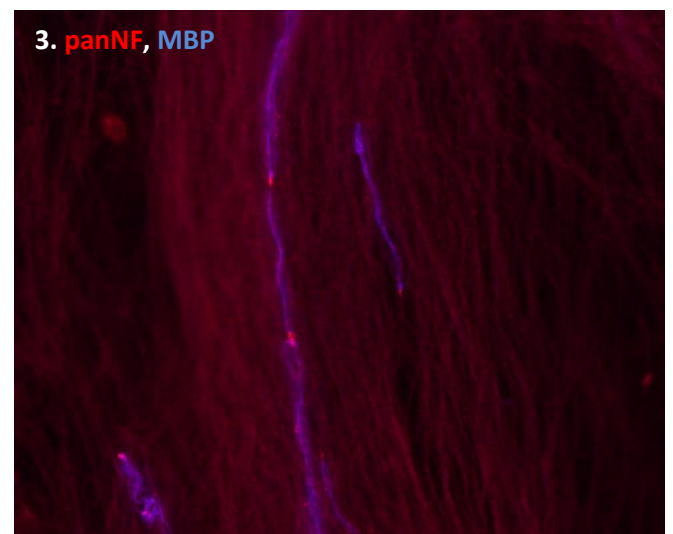
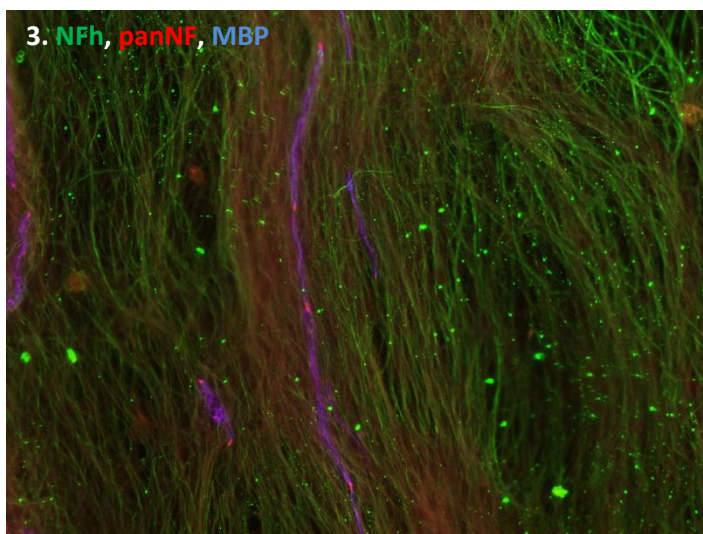
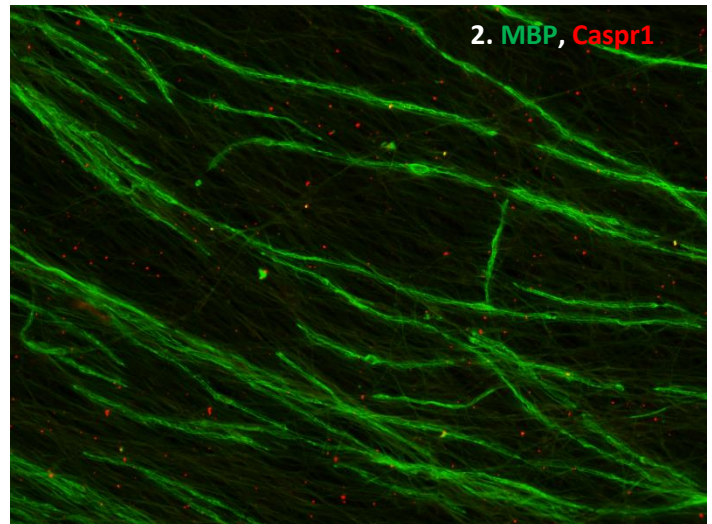
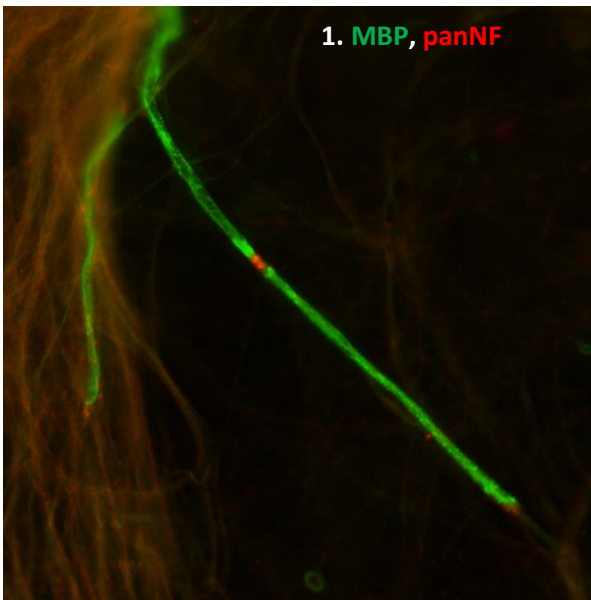
1. Doble MBP – panNF: mucha mielina y panNF marca paranodos
2. Doble MBP – Caspr1: Mucha mielina, pero Caspr1 no marca paranodos
3. Triple MBP – panNF – NF200: La triple ICC ha salido perfecta: se ve mielina, paranodos y neuronas
4. Triple MBP – Caspr1 – NFh: nose porque el 647 marcan los paranodos!!

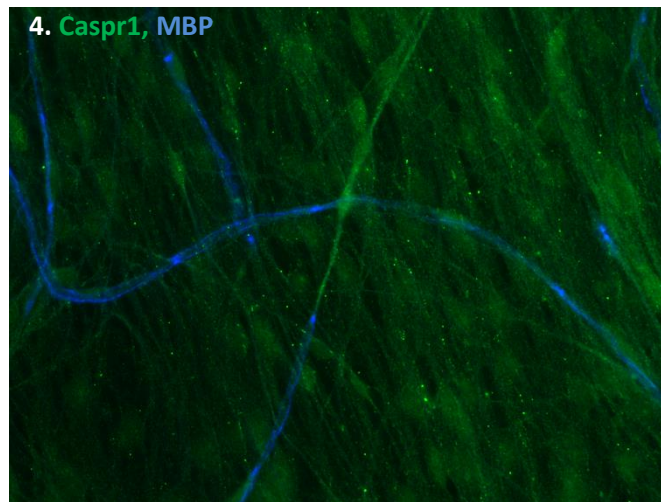
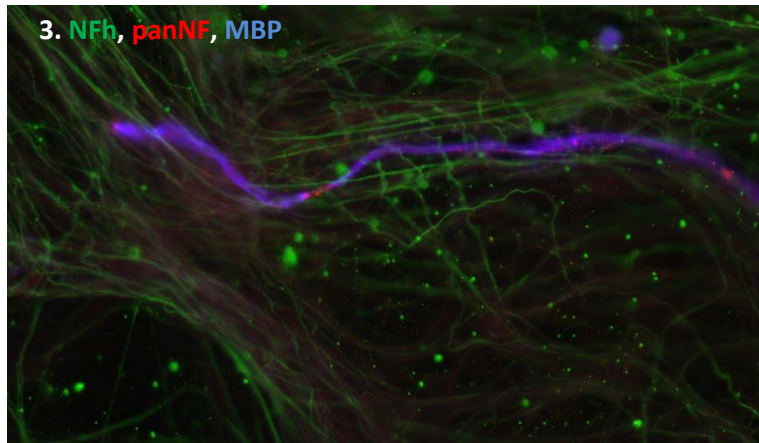
En el microscopio de fluorescencia normal hay mucho cruce entre 594 y 647 (el 647 se cuela en el 594).

Intento hacer fotos a 100x con el microscopio normal y el marcaje 647 se va muy rápido: usar medio Prolong Gold antifade, y signal enhancer.

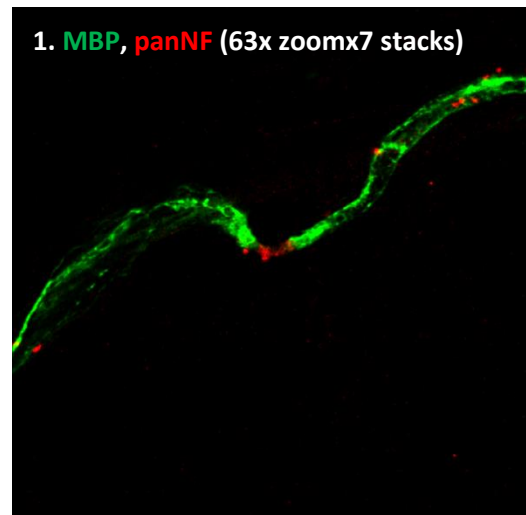
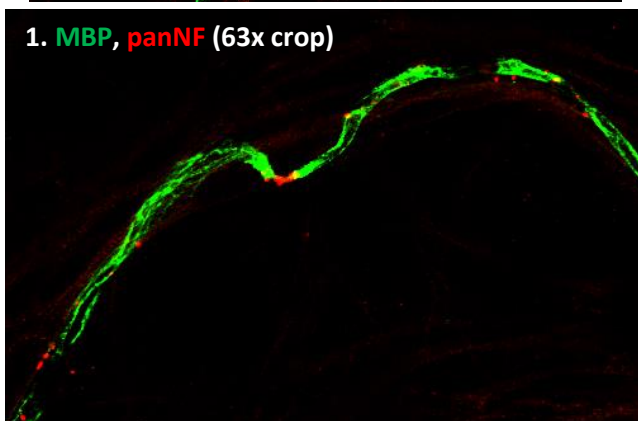
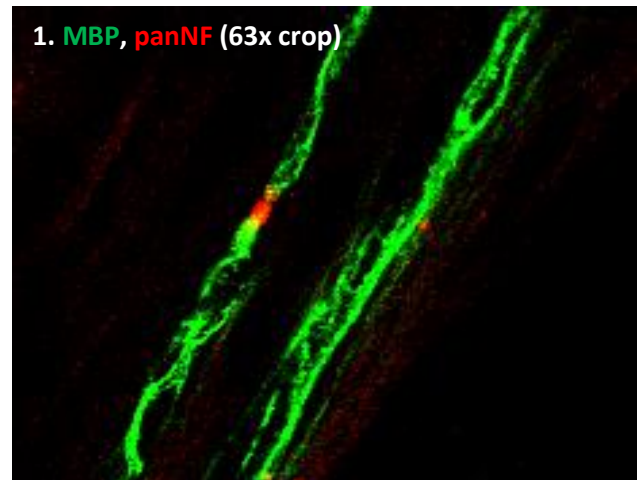
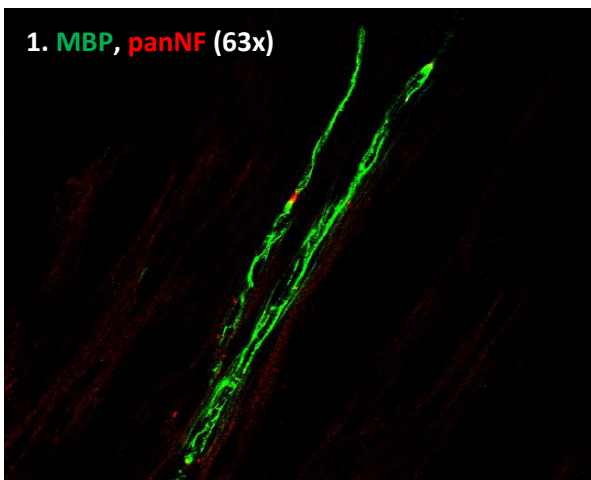
Las fotos del nodo en el confocal se hicieron a 63x y zoom x7

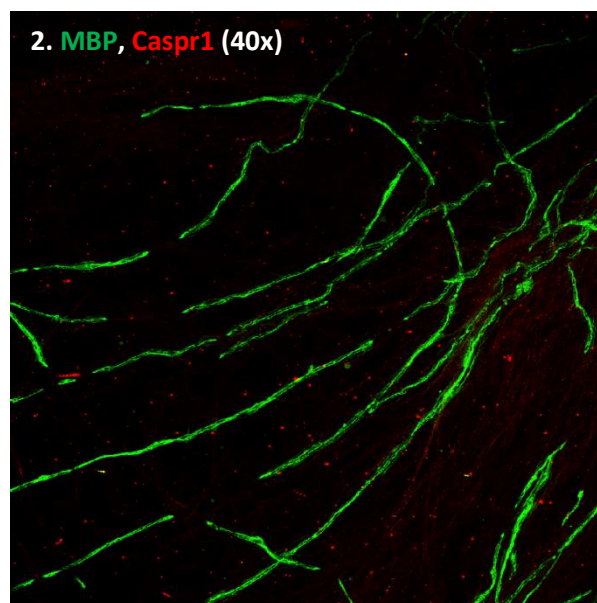
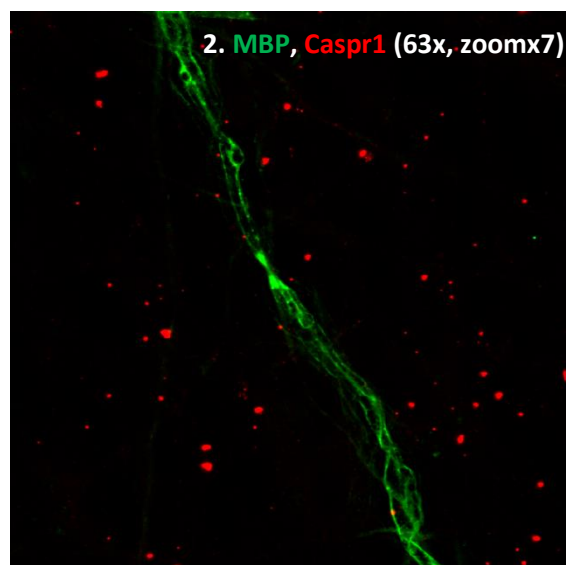
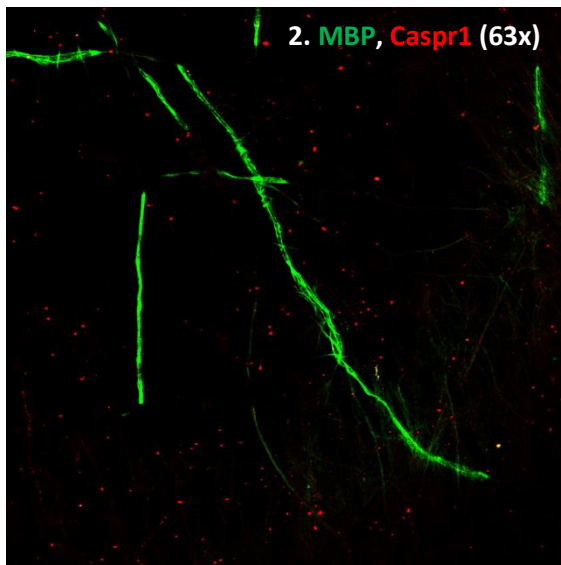
Fotos microscopio normal:





Fotos microscopio confocal:





✓ [ICC co-cultivos Sueros IgG \(día 69 - rata 20/07/2023\)](#)

Cojo 1 Culture Slide de co-cultivos 20/07/23 para ver cómo marcan las IgG separadas de sueros Caspr1+

Protocolo: uso el mismo protocolo que el paper de Labasque 2014

- Fijar 10min con PFA4%
- 1 lavado con PBS2x
- Bloquear con Goat serum 5% con tritón 0,1%
- Incubar con IgG de pacientes diluídos en Goat serum 5% (en el paper las hacen a 1/500, yo hago 1/500 y 1/100). Tener en cuenta que las IgG ya están diluídas 1/10 (por lo tanto, las diluyo 1/10 o 1/50) :2h RT:

1. IgG 22-2-374 1/500

3. IgG 136-8 1/500

2. IgG 22-2-374 1/100

4. IgG 136-8 1/100

5. IgG 23-2-656 1/500

7. IgG 23-2-554 1/500

6. IgG 23-2-656 1/100

8. IgG 23-2-554 1/100

- 3 lavados con PBS1x
- Incubar con anticuerpo primario diluído en Goat serum 5% (2h RT): **MBP** anti-Myelin basic protein SMI99, 808401 (Biolegend). Dil. 1/100 (mouse)
- 3 lavados con PBS1x
- Incubar 1h con Ac. secundarios diluídos en Goat serum 5% (1/500): **GAH594 IgG** (suero) + **GAM488** (MBP)
- 3 lavados con PBS1x
- Montar con fluoromount

Resultado: no se ve la mielina... puede que la permeabilización con tritón 0,1% no sea suficiente?? No puedo ver si las IgG de los pacientes Caspr1+ marcan los paranodos.

✓ ICC co-cultivos normales (día 21 - rata 07/09/2023)

Cojo cubres de todas las condiciones para ir viendo cómo va la diferenciación:

1. Explante DRG P/L
2. Explante DRG Matrigel
3. Explante médula P/L
4. Explante médula Matrigel
5. Médula disgregada con glía P/L

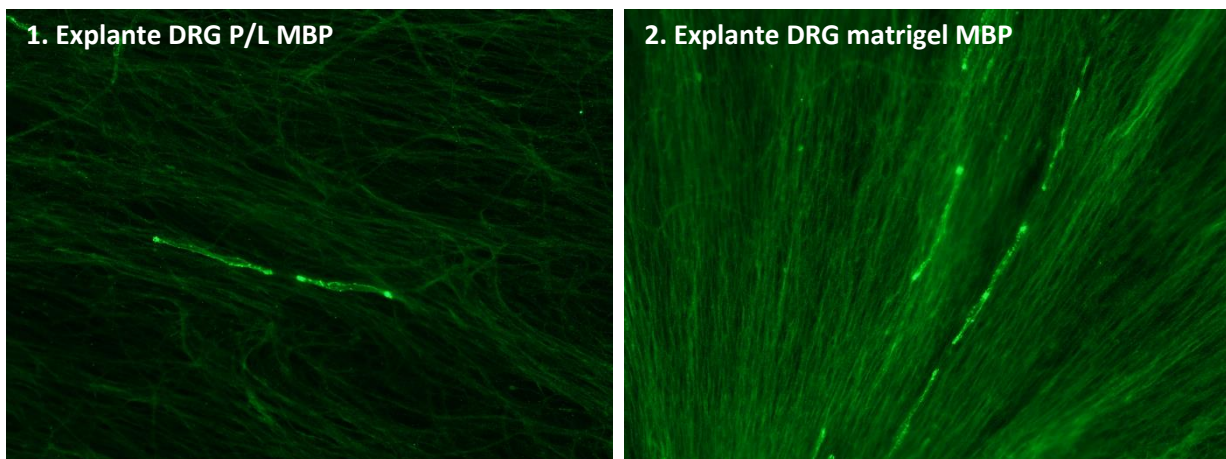
Protocolo:

- 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% (en PBS):
 - **MBP y NFh:**
 - anti-Myelin basic protein SMI99, 808401 (Biolegend). Dil. **1/100** (mouse) : 3h 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 0'5% tritón (todos a 1/500)
 - MBP y NFh: GAM594 + GAC488
- 3 lavados con PBS1x

- Montar con Fluoromount

Resultado:

1. Explante DRG P/L: ya hay mielina, aunque es mejor cultivarlos más días para que se vea más
2. Explante DRG Matrigel: ya hay mielina, lo veo igual que en el explante con P/L
3. Explante médula P/L: aún no hay mielina (se marca algo pero no parece mielina, puede que sean células de Schwann que la están produciendo??)
4. Explante médula Matrigel: se ha roto el cubre y no he podido ver nada
5. Médula disgregada con glía P/L: aún no hay mielina (se marca algo pero no parece mielina, puede que sean células de Schwann que la están produciendo??)



✓ [ICC co-cultivos diferentes \(día 21 - rata 07/09/2023\)](#)

Cojo cubres de todas las condiciones para ir viendo cómo va la diferenciación:

1. Neuronas médula + Cels Schwann humanas
2. Neuronas médula + Cels Schwann rata
3. Neuronas médula + C2C12

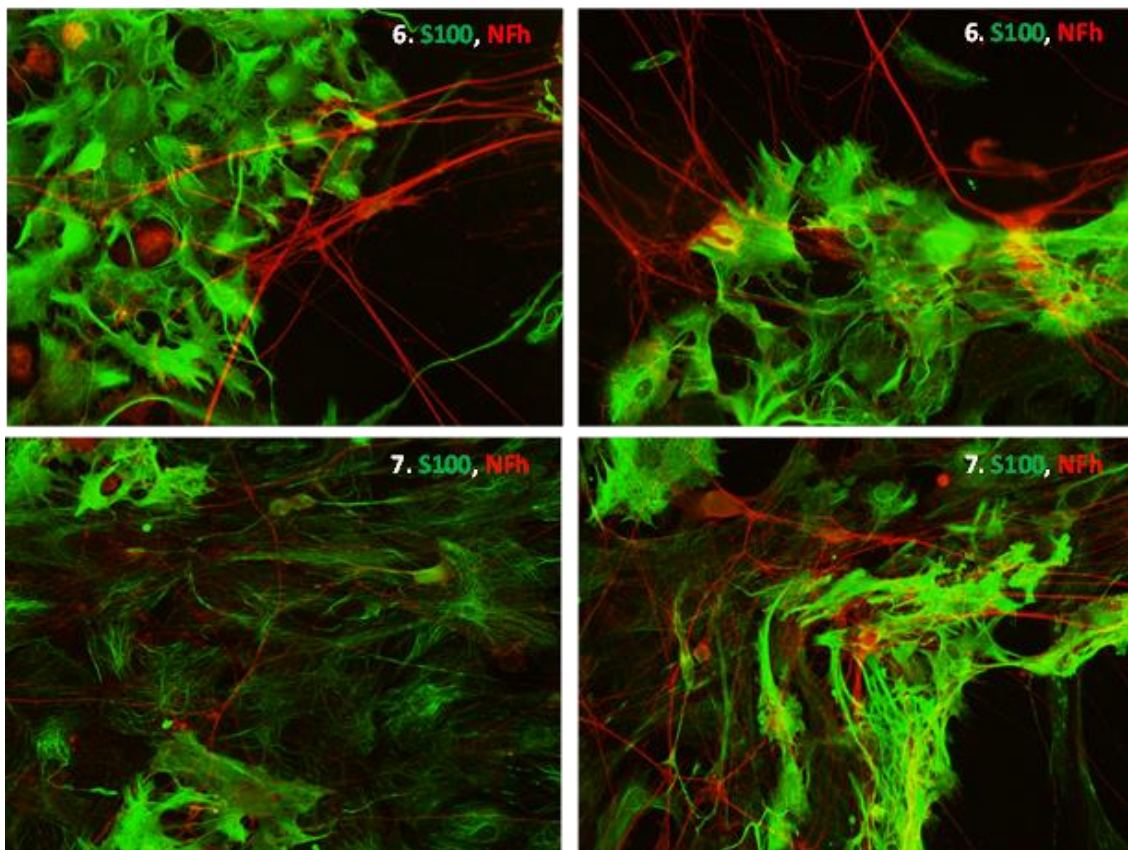
Protocolo:

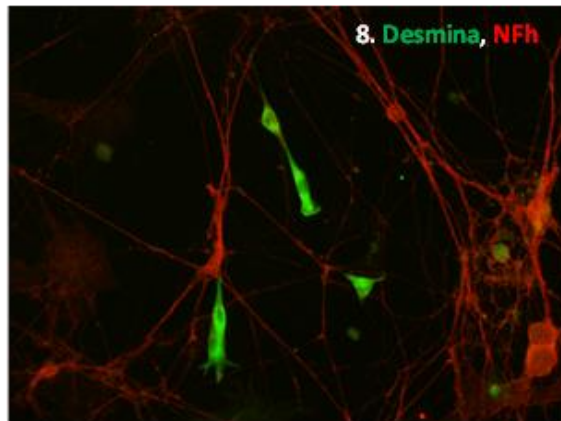
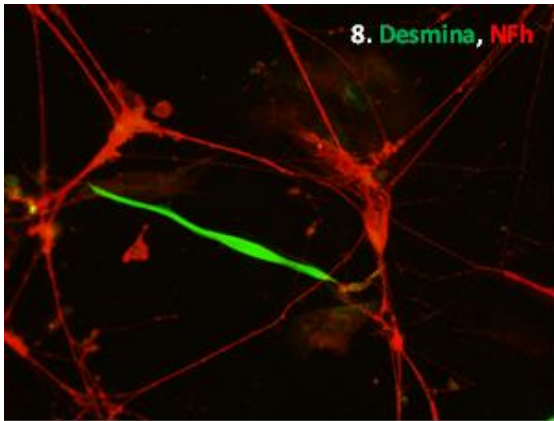
- Fijar 20 min con PFA 4%
- 1 lavado con PBS1x
- Bloquear con Goat serum 5% y 0'3% tritón (en PBS): 1h a RT
- Incubar con anticuerpos primarios y secundarios diluídos en Goat serum 5% (en PBS).
Hacer 3 lavados con PBS1x entre cada paso:
 - Neuronas - cels schwann:
 - S100: ab52642 (abcam). Dil. 1/50 (rabbit) : 2h RT
 - NFh: AB5539 (Merck) Dil. 1/500 (chicken) : 1h RT

- GAR488 + GAC594 1/500 : 1h RT
- Neuronas - C2C12:
 - Desmina: Novocastra.. Dil. 1/50 (mouse) : 2h RT
 - NFh: AB5539 (Merck) Dil. 1/500 (chicken) : 1h RT
 - GAM488 + GAC594 1/500 : 1h RT
- 3 lavados con PBS1x
- Montar con Fluoromount

Resultado:

6. Neuronas médula + Cels Schwann humanas: marcan S100 pero no se ve organizado
7. Neuronas médula + Cels Schwann rata: marcan S100 pero no se ve organizado
8. Neuronas médula + C2C12: hay muy pocas cels C2C12





✓ ICC médula disgregada (sin glía) (día 20 - rata 07/09/2023)

Muestras: todas las ICC dobles con NFh

- | | |
|--|--------------------------|
| 1. CNTN1+ (21-2-94, CNTN1+) doble Caspr1 | 13. CIDP13 IgG |
| 2. 22-2-374 (Caspr1+) IgG 1/10 | 14. CIDP13 IgM |
| 3. 136-08 (Caspr1+) IgG 1/10 | 15. CIDP14 IgG |
| 4. 23-2-656 (Caspr1+) IgG 1/10 | 16. CIDP14 IgM |
| 5. CIDP9 IgG | 17. CIDP15 IgG |
| 6. CIDP9 IgM | 18. CIDP15 IgM |
| 7. CIDP10 IgG: no queda | 19. CIDP16 IgG |
| 8. CIDP10 IgM: no queda | 20. CIDP16 IgM |
| 9. CIDP11 IgG | 21. CIDP17 IgG |
| 10. CIDP11 IgM: no queda | 22. CIDP17 IgM: no queda |
| 11. CIDP12 IgG | 23. Cneg 206-1 IgG |
| 12. CIDP12 IgM | 24. Cneg 206-1 IgM |

Protocolo:

- Incubar con **suero** 1/100 (IgG) o 1/40 (IgM) en medio NG: 2h 37°C
- 1 lavado con PBS
- Fijar 10 min con PFA 4%
- 1 lavado con PBS1x
- Incubar con anticuerpo primario diluído en Goat serum 5% (1h RT)
 - Cubre 1: Caspr1 1/100
 - Cubres 2-24: NFh 1/500
- 3 lavados con PBS1x

- Incubar 1h con Ac. secundarios diluídos en Goat serum 5% tritón 0'5% (todos a 1/750:
 - Cubre 1:Doble suero – Caspr1: GAH488 IgG + GAR594
 - Cubres 2-24: Doble suero - NFh: GAH488 IgG o IgM + GAC594
- 3 lavados con PBS1x
- Montar con fluoromount

Resultado: todos los sueros tienen bastante fondo... no tengo en cuenta estos inmunos. Las IgG de los sueros Caspr1 marcan punteado. El ac.comercial anti-Caspr1 marca bastante las neuronas.

Dejar de pasar sueros CIDP.

29/09/2023

✓ **ELISA NF155 y NF186**

Muestras:

- 23-2-698: titulación y subclases (NF155 y NF186)
- 23-2-725: titulación y subclases (NF155 y NF186)
- 23-2-930: titulación y subclases (NF155 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**:
 - 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%
- Ac secundarios:
 - Titulación / screening / confirmación: Incubar con **RAH IgG HRP** 1/3000 en leche 5% en PBS-tween 0'1% : 100 ul/pozo, 45 min
 - Subclases: Incubar con **MAH HRP** IgG1 o IgG2 o IgG3 o IgG4 1/1000 en leche 5% en PBS-tween 0'1% : 100 ul/pozo, 45 min
- 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	23-2-698 1/100	23-2-725 1/100	23-2-930 1/100	23-2-698 IgG1	23-2-725 IgG1	23-2-930 IgG1	Cneg					
B blanc	23-2-698 1/100	23-2-725 1/100	23-2-930 1/100	23-2-698 IgG1	23-2-725 IgG1	23-2-930 IgG1	Cneg					
C prot	23-2-698 1/300	23-2-725 1/300	23-2-930 1/300	23-2-698 IgG2	23-2-725 IgG2	23-2-930 IgG2	Cpos NF155					
D blanc	23-2-698 1/300	23-2-725 1/300	23-2-930 1/300	23-2-698 IgG2	23-2-725 IgG2	23-2-930 IgG2	Cpos NF155					
E prot	23-2-698 1/900	23-2-725 1/900	23-2-930 1/900	23-2-698 IgG3	23-2-725 IgG3	23-2-930 IgG3						
F blanc	23-2-6981/900	23-2-725 1/900	23-2-930 1/900	23-2-698 IgG3	23-2-725 IgG3	23-2-930 IgG3						
G prot	23-2-698 1/2700	23-2-725 1/2700	23-2-930 1/2700	23-2-698 IgG4	23-2-725 IgG4	23-2-930 IgG4						
Hblanc	23-2-698 1/2700	23-2-725 1/2700	23-2-930 1/2700	23-2-698 IgG4	23-2-725 IgG4	23-2-930 IgG4						

NF155 1 ug/ml **NF186 3 ug/ml**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	23-2-698 1/100	23-2-725 1/100	23-2-930 1/100	23-2-698 IgG1	23-2-725 IgG1	23-2-930 IgG1	Cneg					
B blanc	23-2-698 1/100	23-2-725 1/100	23-2-930 1/100	23-2-698 IgG1	23-2-725 IgG1	23-2-930 IgG1	Cneg					
C prot	23-2-698 1/300	23-2-725 1/300	23-2-930 1/300	23-2-698 IgG2	23-2-725 IgG2	23-2-930 IgG2	Cpos NF186					
D blanc	23-2-698 1/300	23-2-725 1/300	23-2-930 1/300	23-2-698 IgG2	23-2-725 IgG2	23-2-930 IgG2	Cpos NF186					
E prot	23-2-698 1/900	23-2-725 1/900	23-2-930 1/900	23-2-698 IgG3	23-2-725 IgG3	23-2-930 IgG3						
F blanc	23-2-6981/900	23-2-725 1/900	23-2-930 1/900	23-2-698 IgG3	23-2-725 IgG3	23-2-930 IgG3						
G prot	23-2-698 1/2700	23-2-725 1/2700	23-2-930 1/2700	23-2-698 IgG4	23-2-725 IgG4	23-2-930 IgG4						
Hblanc	23-2-698 1/2700	23-2-725 1/2700	23-2-930 1/2700	23-2-698 IgG4	23-2-725 IgG4	23-2-930 IgG4						

Resultado: ELISA NF155 no ha salido bien... estará mal la proteína???

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	0,098	0,259	0,151	0,05	0,037	0,041	0,149					
B blanc	0,145	0,244	0,156	0,062	0,05	0,051	0,124					
C prot	0,114	0,156	0,115	0,304	0,336	0,26	0,167					
D blanc	0,11	0,15	0,154	0,205	0,186	0,251	0,141					
E prot	0,118	0,187	0,248	0,057	0,042	0,047	0					
F blanc	0,146	0,199	0,079	0,07	0,045	0,061	0					
G prot	0,08	0,184	0,127	0,039	0,033	0,103	0					
Hblanc	0,094	0,085	0,058	0,032	0,023	0,035	0					

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	0,234	0,243	0,605	0,06	0,07	0,073	0,172					
B blanc	0,109	0,124	0,338	0,077	0,1	0,063	0,145					
C prot	0,112	0,166	0,623	0,255	0,127	0,282	0,913					
D blanc	0,093	0,085	0,124	0,126	0,108	0,193	0,138					
E prot	0,075	0,109	0,374	0,067	0,054	0,073	0					
F blanc	0,071	0,11	0,118	0,08	0,053	0,06	0					
G prot	0,079	0,127	0,179	0,065	0,069	0,693	0					
Hblanc	0,106	0,084	0,1	0,071	0,062	0,057	0					

- **23-2-698:** título NF186 1/100, subclase IgG2
- **23-2-725:** título NF186 1/100, subclases no salen
- **23-2-930:** título NF186 1/900, subclase IgG4

03/10/2023

- ✓ [ICC co-cultivos Sueros IgG \(día 74 - rata 20/07/2023\)](#)

Cojo 1 Culture Slide de DRG co-cultivos 20/07/23 para ver si puedo mejorar el marcaje de los paranodos, también cojo el único cubre que quedaba.

Protocolo: uso el mismo protocolo que el paper de Labasque 2014

- Fijar 20min con PFA4%
- 2 lavados con PBS1x
- Bloquear 30 min con (el cubre con GS5% tritón 0,3%):

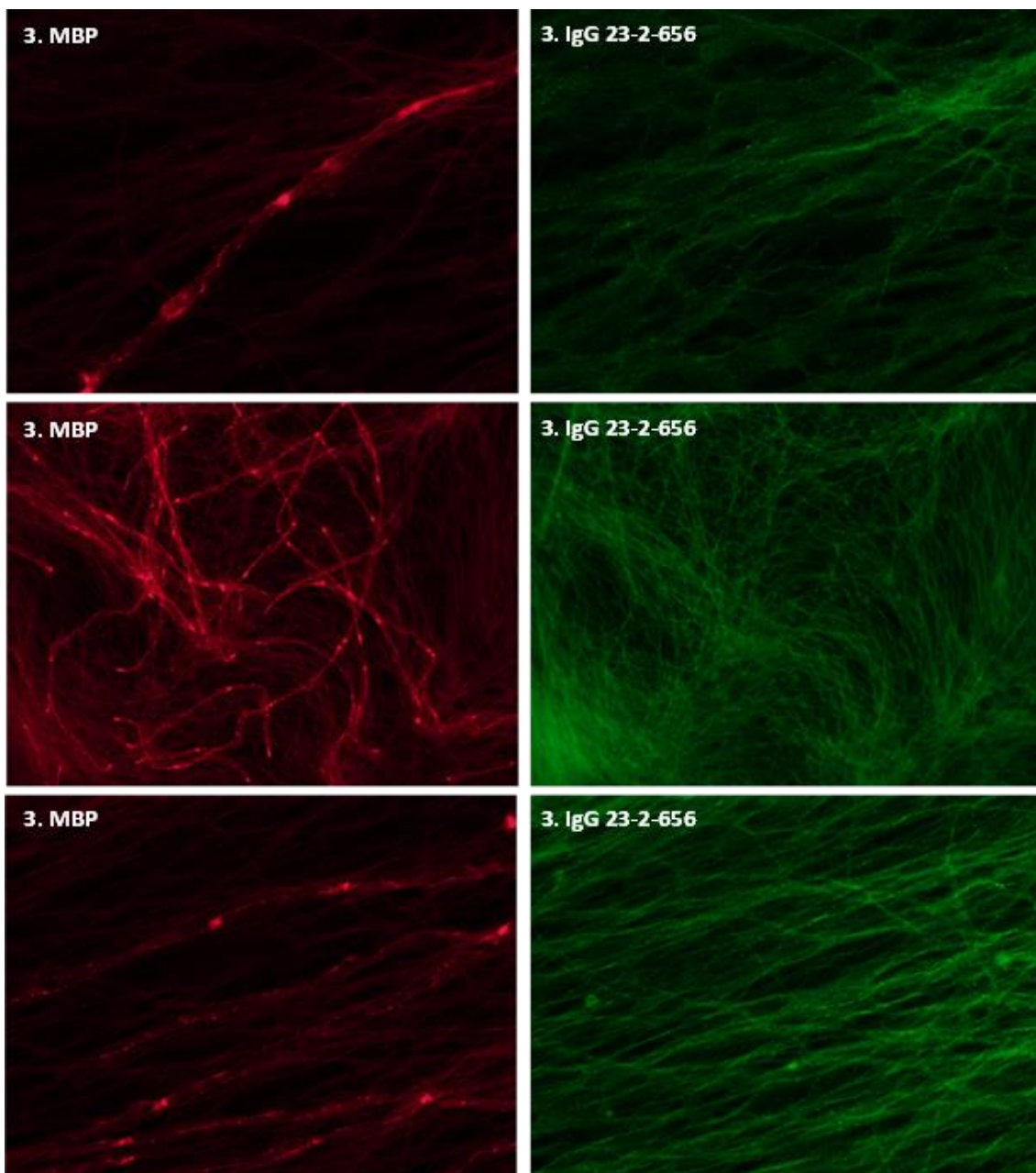
1) Goat serum 5% con tritón 0,1%	2) Goat serum 5% con tritón 0,1%	3) Goat serum 5% con tritón 0,3%	4) Goat serum 5% con tritón 0,3%
5) Goat serum 5% con tritón 0,1%	6) Bloqueo universal con tritón 0,1%	7) Goat serum 5% con tritón 0,3%	8) Bloqueo universal con tritón 0,3%

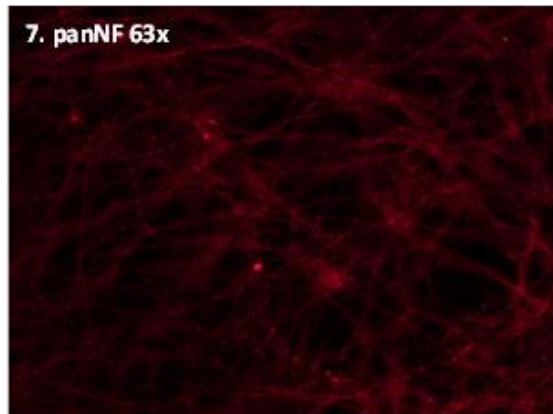
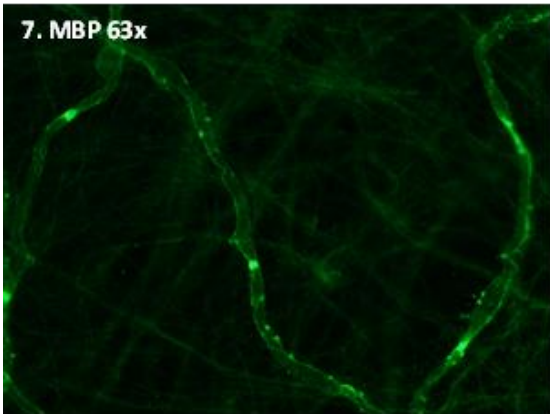
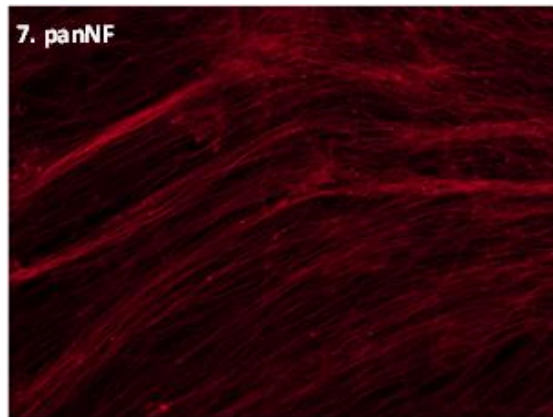
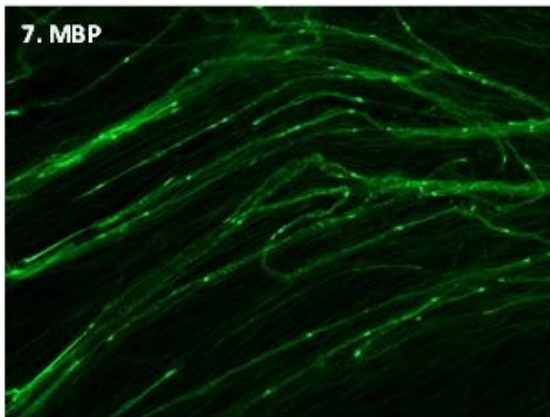
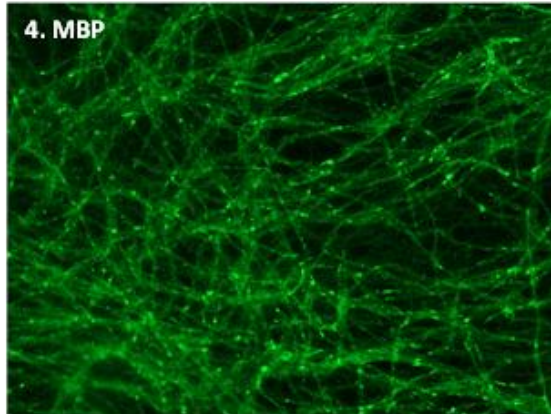
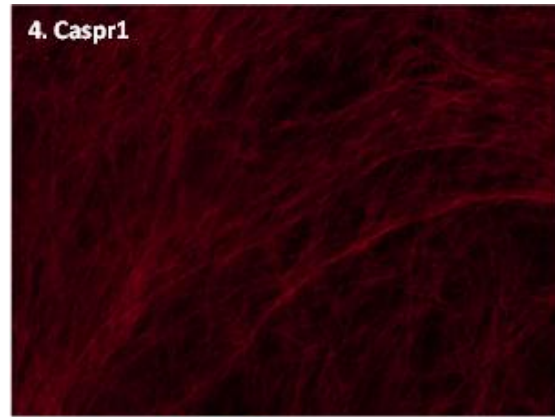
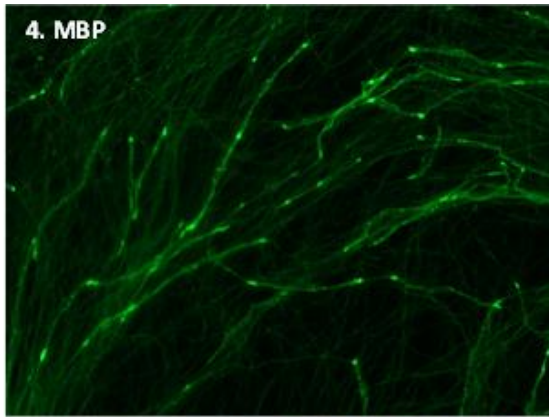
- Incubar diluyendo en lo que vaya cada pozo:
 1. IgG 136-8 1/10 : 1h RT, MBP 1/100 : 3h RT
 2. MBP 1/100 , Caspr1 1/100 : 3h RT
 3. IgG 23-2-656 1/10 : 1h RT, MBP 1/100 : 3h RT
 4. MBP 1/100, Caspr1 1/100 : 3h RT
 5. MBP 1/100, panNF 1/100 : 3h RT
 6. MBP 1/100, CNTN1 1/100 : 3h RT
 7. MBP 1/100, panNF 1/100 : 3h RT
 8. MBP 1/100, CNTN1 1/100 : 3h RT
 9. CUBRE: IgG 136-8 1/10 : 1h RT, MBP 1/100, Caspr1 1/100 : 3h RT
- 3 lavados con PBS1x
- Incubar 1h con Ac. secundarios diluidos en Goat serum 5% o Bloqueo universal sin tritón (1/500):
 - GAH488 IgG (suero) + GAM594 (MBP)
 - GAM488 (MBP) + GAR594 (Caspr1)
 - GAH488 IgG (suero) + GAM594 (MBP)
 - GAM488 (MBP) + GAR594 (Caspr1)
 - GAM488 (MBP) + GAC594 (panNF)
 - RAM488 (MBP) + RAG594 (CNTN1)
 - GAM488 (MBP) + GAC594 (panNF)
 - RAM488 (MBP) + RAG594 (CNTN1)
 - CUBRE: GAH488 IgG (suero) + GAR594 (Caspr1) + GAM647 (MBP)
- 3 lavados con PBS1x
- Montar con fluoromount

Resultado: siempre permeabilizar con tritón 0,3% para ver el marcaje de MPB (con tritón 0,1% no se ve nada!!)

1. IgG 136-8, MBP: no se ve mielina
2. MBP, Caspr1: no se ve mielina

3. IgG 23-2-656, MBP: se ve bien la mielina pero la IgG de 23-2-656 no marca los paranodos
4. MBP, Caspr1: se ve bien la mielina pero el Caspr1 no marca los paranodos
5. MBP, panNF: no se ve mielina
6. MBP, CNTN1: no se ve mielina
7. MBP, panNF: se ve bien la mielina, y el panNF marca los nodos. Nose porque el verde también marca mucho los nodos!!!
8. MBP, CNTN1: no se ve mielina
9. CUBRE: se ha roto





✓ IHC teasing nervio ciático cerdo

Muestras:

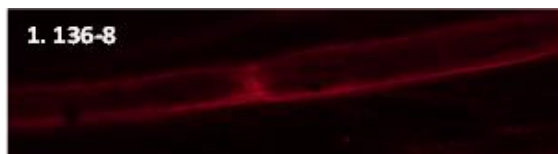
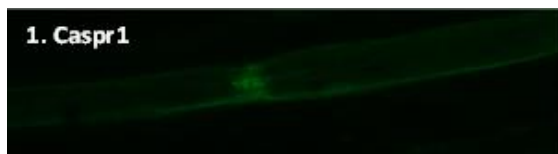
1. IgG 136-8 1/10
2. IgG 23-2-656 1/10

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 1h RT con:
 - Goat serum 5% + 0'1% tritón
 - Bloqueo universal + 0,1% tritón
- IgG de suero 1/10 (en bloqueo) 1h
- Ac comercial:
 - anti-Caspr1 1/100
 - anti-CNTN1 1/100
- Ac secundarios (1/500):
 - GAH594 IgG + GAR488
 - RAH594 IgG + RAG488
- Montar con Fluoromount

Resultado:

- IgG 136-8: tanto la IgG como el Caspr1 marcan los paranodos (aunque flojo)
- IgG 23-2-656: no marcan los paranodos ni las IgG ni la CNTN1



✓ IHC Monkey peripheral nerve (BD)

Muestras: ICO – Bellvitge (muestras neuropatía post-Brentuximab)

- | | |
|-------------------------|--------------------------|
| 1. 23-2-527: 963740600 | 9. 23-2-535: 1928359622 |
| 2. 23-2-528: 1134032031 | 10. 23-2-536: 1782493001 |
| 3. 23-2-529: 2136374956 | 11. 23-2-537: 1618471432 |
| 4. 23-2-530: 1550313070 | 12. 23-2-538: 330528499 |
| 5. 23-2-531: 1367792913 | 13. 23-2-539: 1640161082 |
| 6. 23-2-532: 1947289429 | 14. 23-2-427 Box 327 |
| 7. 23-2-533: 1615191458 | 15. Cneg 202-2 |
| 8. 23-2-534: 745048561 | 16. Cneg 202-3 |

Protocolo: Monkey sciatic nerve slides (44685, Biosystems, Palex)

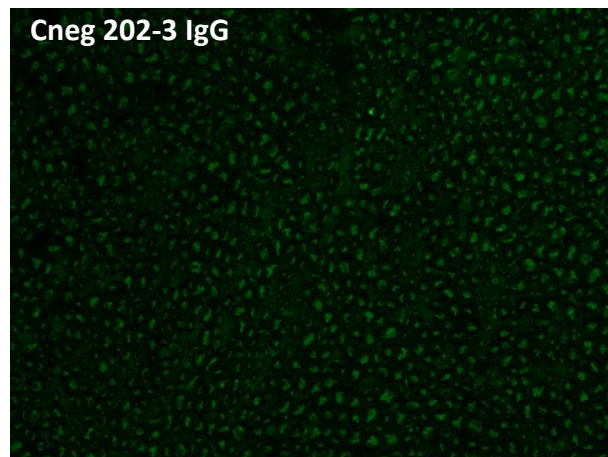
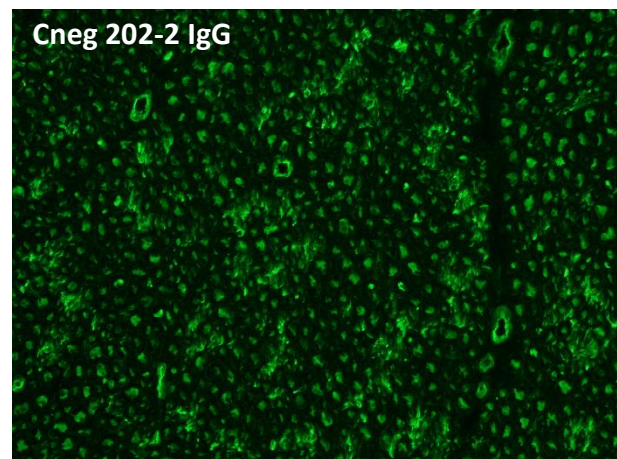
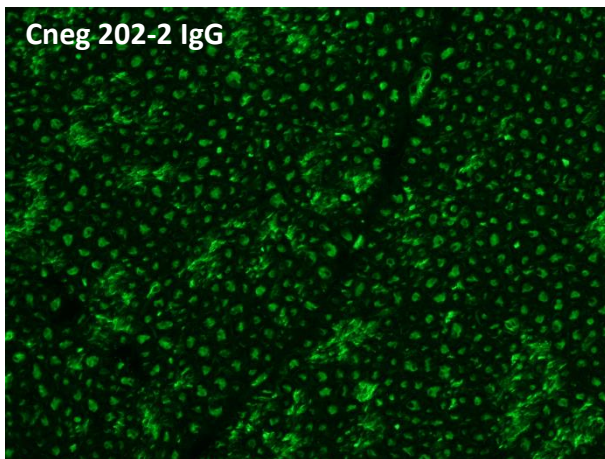
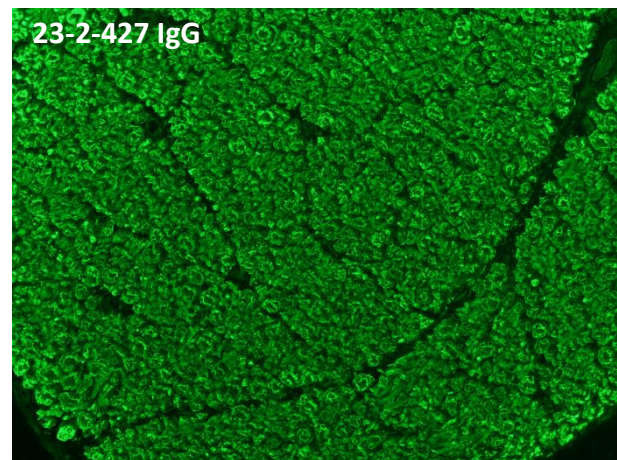
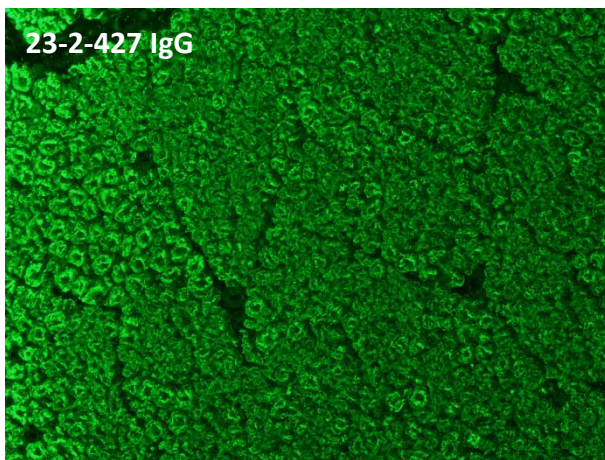
- Bloquear 30 min - 1h con Goat serum 5%
- Incubar 1h con 40 ul de suero diluído 1/10 en Goat serum 5% (4 ul suero + 36 ul goat 5%)
- 3 lavados con PBS1x
- Incubar 45min con 30-40 ul de Ac. secundarios : GAH monkey absorbed IgG 488 + GAH IgM 594 diluídos 1/500 en goat serum 5%
- 3 lavados con PBS1x
- Montar con fluoromount

Resultado: hay varios sueros que parece que marcan las cels de Schwann amielínicas , pero también se ve en uno de los controles negativos y no parece muy específico. Además, todas las que marcan las CS amielínicas, tienen marcaje en vasos... puede que el marcaje sea en realidad de capilares y no de CS amielínicas???

Los marcajes de axones y de fibras son inespecíficos.

1. 23-2-527 (963740600): axones + IgG, neg IgM
2. 23-2-528 (1134032031): neg IgG, neg IgM
3. 23-2-529 (2136374956): axones + IgG, fibras IgM
4. 23-2-530 (1550313070): axones + IgG, fibras IgM
5. 23-2-531 (1367792913): axones + IgG, axones + IgM
6. 23-2-532 (1947289429): SC amielínicas ++ IgG y IgM
7. 23-2-533 (1615191458): neg IgG, fibras IgM
8. 23-2-534 (745048561): SC amielínicas ++ IgG y IgM

9. 23-2-535 (1928359622): SC amielínicas 2 IgG y IgM
10. 23-2-536 (1782493001): neg IgG, fibros IgM
11. 23-2-537 (1618471432): neg IgG, axones IgM
12. 23-2-538 (330528499): SC amielínicas 2 IgG, neg IgM
13. 23-2-539 (1640161082): axones + IgG, fibros IgM
14. 23-2-427 Box 327: mielina +++ IgG
15. Cneg 202-2: SC amielínicas 2 IgG, fibros IgM
16. Cneg 202-3: neg IgG, neg IgM



Coating ELISA LRP4 (prueba!!)

Proteína LRP4: 5948-LR, R&D systems (Bio-technie) : resuspender a 300 ug/ml (0,3 mg/ml) en PBS (hay 25 ug así que pongo 83,3 ul PBS)

[LRP4]_i = 0,3 mg/ml

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

- [LRP4]_f = 1 ug/ml 4 pozos: 210 ul buffer + 0,7 ul
- [LRP4]_f = 3 ug/ml 4 pozos: 210 ul buffer + 2,1 ul
- [LRP4]_f = 5 ug/ml 4 pozos: 210 ul buffer + 3,5 ul

Coating ELISA CASPR1

[CASPR1]_i = 0,789 mg/ml

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

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

04/10/2023

ELISA LRP4 (prueba)

Muestras:

- Cneg 2
- Cneg 3
- 2022-393243: muestra LRP4+ por ICC
- 2022-406947: muestra LRP4+ 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**:
 - Screening: diluir sueros 1/50 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 H_2SO_4 25%
- Leer a 450-570 nm

	1 1 ug/ml	2 3 ug/ml	3 5 ug/ml	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	Cneg 2	Cneg 2	Cneg 2									
B blanc	Cneg 2	Cneg 2	Cneg 2									
C prot	Cneg 3	Cneg 3	Cneg 3									
D blanc	Cneg 3	Cneg 3	Cneg 3									
E prot	2022-393243	2022-393243	2022-393243									
F blanc	2022-393243	2022-393243	2022-393243									
G prot	2022-406947	2022-406947	2022-406947									
Hblanc	2022-406947	2022-406947	2022-406947									

Resultado: ha salido mal. Todo negativo!!! Probar otros controles +?? Probar anticuerpo comercial LRP4

	1 1 ug/ml	2 3 ug/ml	3 5 ug/ml	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	0,104	0,19	0,221									
B blanc	0,105	0,118	0,126									
C prot	0,004	0,004	0,015									
D blanc	0,002	0,005	0,005									
E prot	0,068	0,063	0,072									
F blanc	0,065	0,032	0,051									
G prot	0,022	0,029	0,07									
Hblanc	0,019	0,021	0,059									

06/10/2023

✓ IHC teasing nervio ciático rata

Muestras:

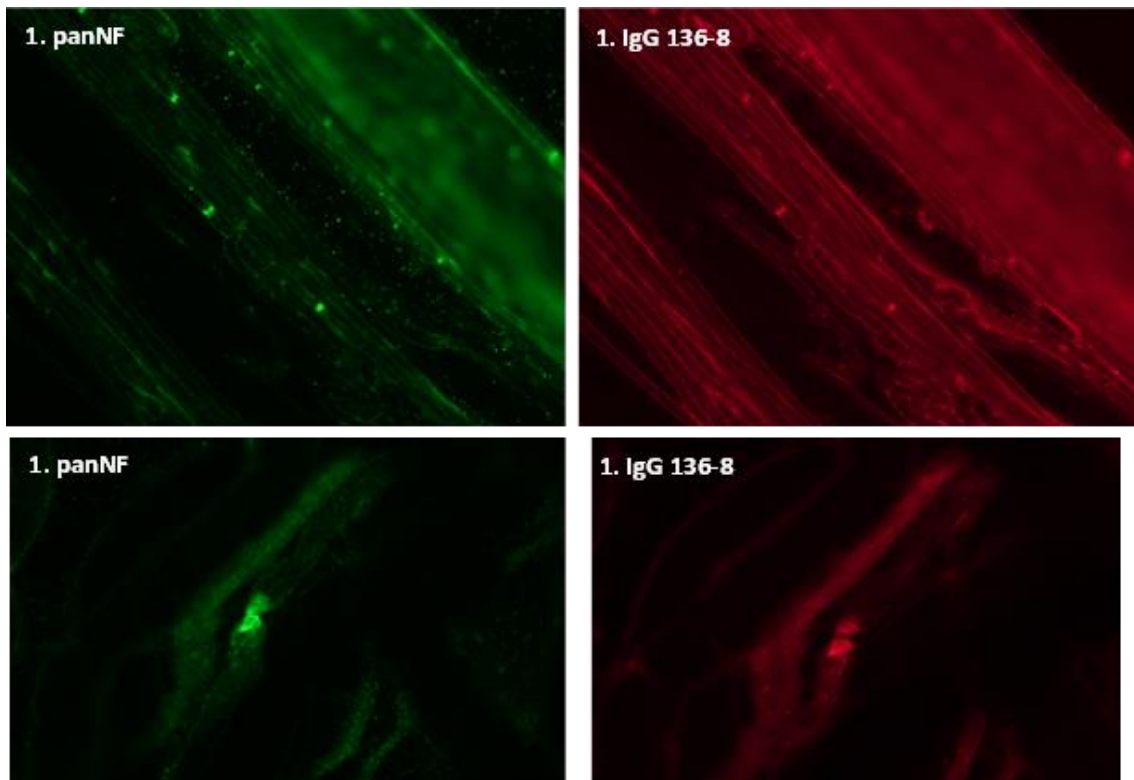
1. IgG 136-8 1/10 – doble panNF
2. Suero 136-8 1/100 – doble panNF
3. IgG 23-2-656 1/10 – doble panNF
4. Suero 23-2-656 1/100 – doble panNF
5. IgG 23-2-374 - doble CASPR1

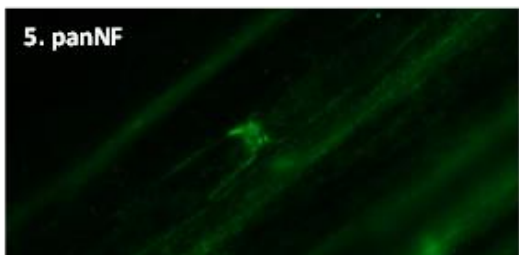
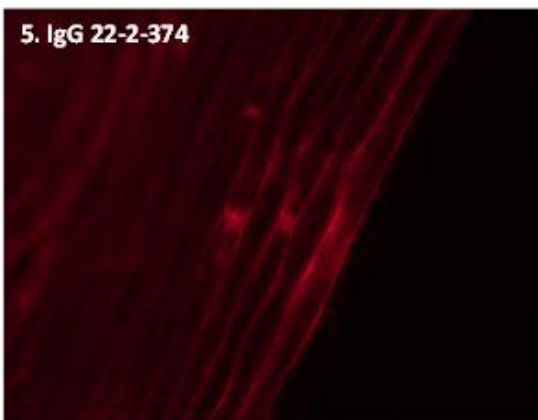
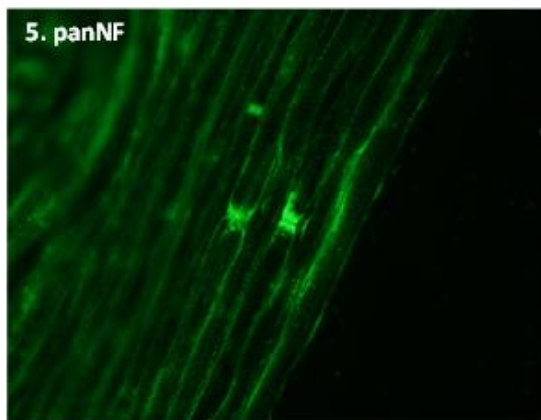
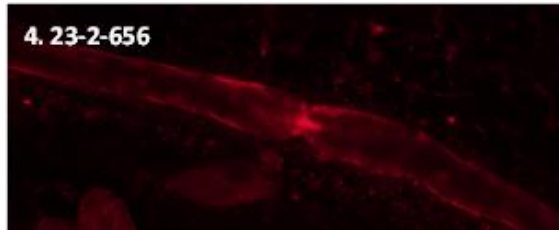
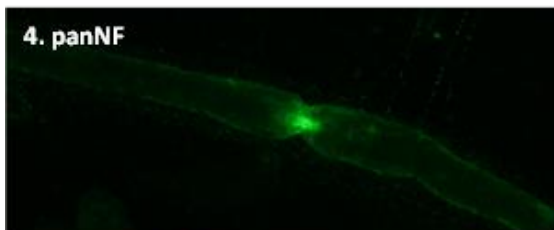
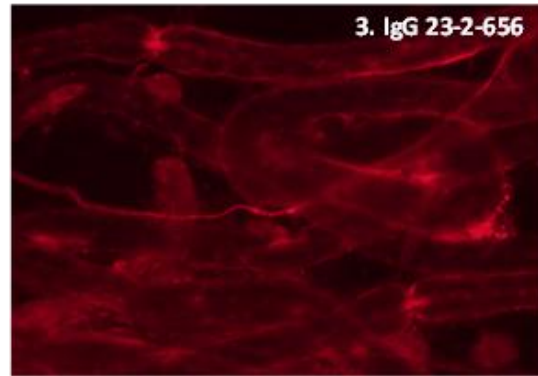
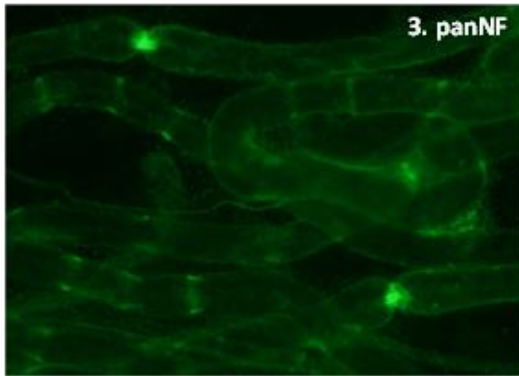
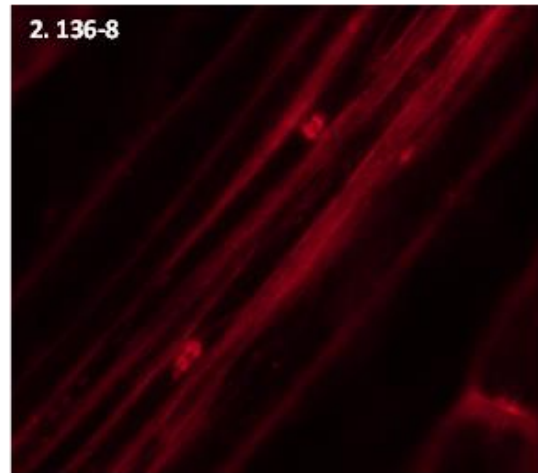
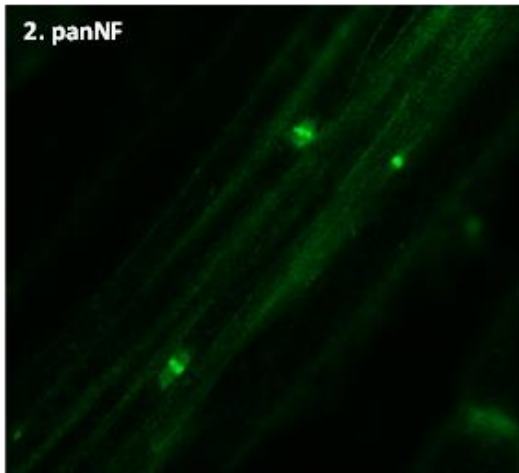
6. Suero CNTN1+ - doble CASPR1

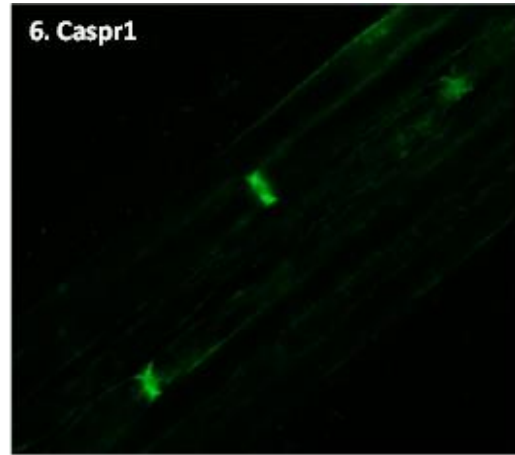
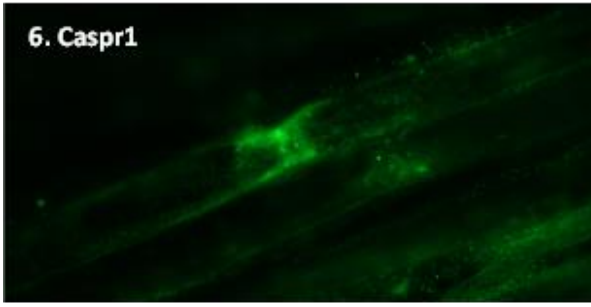
Protocolo: (entre cada paso hacer 3 lavados con PBS1x)

- Fijar con acetona (-20°C) 10 min
- Separar los dos grupos de tejido con Dakopen
- Bloquear 1h RT con Goat serum 5% + 0'1% tritón
- Incubar con suero/IgG diluído en Goat serum 5% + 0'1% tritón (según diluciones anteriores) 1h RT
- Incubar con ac comercial diluídos en Goat serum 5% + 0'1% tritón 1h RT
 - anti-panNF 1/200
 - anti-CASPR1 1/10
- Incubar con ac secundarios diluídos 1/500 en Goat serum 5% + 0'1% tritón 1h RT
 - 1-4) GAH594 IgG + GAC488
 - 5-6) GAH594 IgG + GAR488
- Montar con Fluoromount

Resultado: se ven muy bien los paranodos con todas las muestras, incluso con la muestra 22-2-374 (Bocanegra)!!! El anticuerpo comercial anti-Caspr1 más concentrado marca bien los paranodos.







10/10/2023

✓ ICC co-cultivos (día 33 - rata 07/09/2023)

Cojo cubres de todas las condiciones para ir viendo cómo va la diferenciación:

1. Explante DRG P/L (prueba Caspr1 nuevo)
2. Explante DRG P/L (prueba Caspr1 antiguo)
3. Explante DRG Matrigel
4. Explante médula P/L
5. Explante médula Matrigel
6. Médula disgregada con glía P/L
7. Neuronas médula + Cels Schwann humanas
8. Neuronas médula + Cels Schwann rata
9. Neuronas médula + C2C12

Protocolo:

- 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% (MBP y Caspr1 los diluyo en Goat serum 5% y 0,3% tritón):
 - **Cubre 1:** MBP y Caspr1 nuevo:
 - anti-Myelin basic protein SMI99, 808401 (Biolegend). Dil. 1/100 (mouse) : 2h RT
 - anti-Caspr1, ab34151 (abcam). Dil. 1/100 (rabbit): 2h RT
 - **Cubre 2:** Caspr1 antiguo y MBP
 - Anti-Caspr1: ab133634 (abcam). Dil 1/10 (rabbit)
 - anti-Myelin basic protein SMI99, 808401 (Biolegend). Dil. 1/100 (mouse) : 2h RT
 - **Cubres 3-8:** MBP y NFh
 - anti-Myelin basic protein SMI99, 808401 (Biolegend). Dil. 1/100 (mouse) : 3h RT
 - anti-Neurofilament H, AB5539 (Merck) Dil. 1/500 (chicken) : 1h RT
 - **Cubre 9:** Desmina y NFh
 - Anti-desmina: Novocastra.. Dil. 1/50 (mouse) : 2h RT
 - anti-neurofilament H, AB5539 (Merck) Dil. 1/500 (chicken) : 1h RT

- 3 lavados con PBS1x
- Incubar 1h con Ac. secundarios diluïdos en Goat serum 5% (todos a 1/500)
 - Cubres 1 y 2: GAM488 (MBP) + GAR594 (Caspr1)
 - Cubres 3-8: GAM488 (MBP) + GAC594 (NFh)
 - Cubre 9: GAM488 (desmina) + GAC594 (NFh)
- 3 lavados con PBS1x
- Montar con Fluoromount

Resultado:

1. Explante DRG P/L: hay mucha mielina, pero no se ve el Caspr1
2. Explante DRG P/L (prueba Caspr1): hay mucha mielina, pero no se ve el Caspr1
3. Explante DRG Matrigel: hay mucha mielina
4. Explante médula P/L: todavïa no hay mielina
5. Explante médula Matrigel: todavïa no hay mielina
6. Médula disgregada con glïa P/L: hay mielina pero poca
7. Neuronas médula + Cels Schwann humanas: no hay mielina (tirar!)
8. Neuronas médula + Cels Schwann rata: no hay mielina (tirar!)
9. Neuronas médula + C2C12: no hay casi células C2C12 (tirar!!)

✓ [IHC teasing nervio ciático rata](#)

Objetivo: ver si las IgG de la Bocanegra (22-2-374) marca el paranodo, tal y como vimos en el teasing del día 06/10/2023

Muestras:

1. IgG 22-2-374 1/10
2. Suero 22-2-374 1/100
3. IgG 22-2-374 1/10 – doble panNF
4. Suero CNTN1+ 1/100 - doble panNF

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 1h RT con Goat serum 5% + 0'1% tritón
- Incubar con suero/IgG diluïdo en Goat serum 5% + 0'1% tritón (según diluciones anteriores) 1h RT
- Incubar con ac anti-panNF diluïdo 1/300 en Goat serum 5% + 0'1% tritón 1h RT

- Incubar con ac secundarios GAH594 IgG + GAC488 diluídos 1/500 en Goat serum 5% + 0'1% tritón 1h RT
- Montar con Fluoromount

Resultado: la muestra 22-2-374 (Bocanegra) marca claramente diferente a cómo marcaba anteriormente (esas estructuras helicoidales posiblemente bandas de Cajal). Puede ser que me haya equivocado de suero??? Repetir teasing con una alícuota nueva!!!

*Elba repite el teasing con una alícuota nueva y vuelve a marcar sólo los paranodos.

Coating ELISA LRP4 (prueba!!)

Proteína LRP4: 5948-LR, R&D systems (Bio-technie) : resuspendida el día 03/10/2023 a 300 ug/ml (0,3 mg/ml) en PBS (hay 25 ug así que pongo 83,3 ul PBS)

[LRP4]i = 0,3 mg/ml

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

- [LRP4]f = 3 ug/ml 8 pozos: 410 ul buffer + 4,1 ul

*Mañana usaré 3 pozos, los otros 5 los congelo a -80°C después de bloquearlos.

11/10/2023

ELISA LRP4 (prueba)

Muestras:

- Ac comercial anti-LRP4
- Control LRP4+ 5
- Cneg 3

Protocolo:

- Bloquear con leche 5% en PBS-tween 0'1% : 200 ul pozo (incubar 1h a RT)
- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
- Diluir los **sueros:** 1/25 en leche 5% en PBS-tween 0'1%, diluir el **Ac.anti-LRP4** 1/100 en leche 5% en PBS-tween 0'1%
- Incubar 1h a RT
- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
- Incubar 45min a RT con:
 - **RAH IgG HRP** 1/3000 en leche 5% en PBS-tween 0'1% : 100 ul/pozo
 - **DAR IgG HRP** (perox) 1/500 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: el anticuerpo comercial anti-LRP4 sale muy positivo. El Cpos y el Cneg salen prácticamente igual y bastante sucios (los he puesto diluídos a 1/25 así que supongo que es demasiado). Este mismo día hago la ICC de LRP4 del C+ a 1/25 y sale muy bajita.

Plan: buscar todos los sueros LRP4+ que tengamos y hacer ICC de todos a 1/25. El mismo día, poner en el ELISA los sueros que hayan dado claramente positivos por ICC, y probar varias diluciones (1/25, 1/50, 1/100...). Incubar los sueros overnight en el ELISA.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	1,8											
B blanc	0,183											
C prot	0,284											
D blanc	0,148											
E prot	0,256											
F blanc	0,169											
G prot												
Hblanc												

✓ ICC Perfil nodales/paranodales BD

CNTN1, NF140, NF155, NF186 (cels fijadas, suero 1/100)

Muestras y resultado:

- 23-2-1083: neg. Hago el ELISA de CASPR1 el mismo día en Inmuno y sale negativo.

13/10/2023

✓ Congelación PBMC (NHC E2116928)

3 tubos CPT de **Rosa M. González Vélez (E2116928)**: CNTN1+ pretratamiento del Hospital Clínico San Carlos (los tubos llegan el día 11/10/2023).

- 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)
- 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)

- Decantar el sobrenadante a un tubo y lavar con suero fisiológico 1:1
- Centrifugar 300g 5min
- Resuspender en suero fisiológico y contar las células: 17millones
- Centrifugar 300g 5min
- Congelar en FBS+10%DMSO: 6 viales de aprox 3 millones/vial (1 ml de FBS+DMSO): **23-7-1086, Box PBMC 2-E5 a F1**

16/10/2023

✓ ICC co-cultivos (día 39 - rata 07/09/2023)

Cojo cubres de explantes DRG P/L para tratar de ver marcaje con el ac.comercial anti-Caspr1 nuevo (ab34151, abcam):

1. Caspr1 (cels vivas, sin permeabilizar)
2. Caspr1 (cels fijadas, permeab. tritón 0,3%)
3. Doble Caspr1 – MBP (cels fijadas, permeab. metanol)
4. Doble Caspr1 – MBP (cels fijadas, permeab. tritón 0,3%)
5. Doble Caspr1 – panNF (cels fijadas, permeab. metanol)
6. Doble Caspr1 – panNF (cels fijadas, permeab. tritón 0,3%)
7. Doble MRGPRD - NFh (cels fijadas, permeab. tritón 0,3%)

Protocolo: se hacen lavados con PBS1x entre cada uno de los pasos

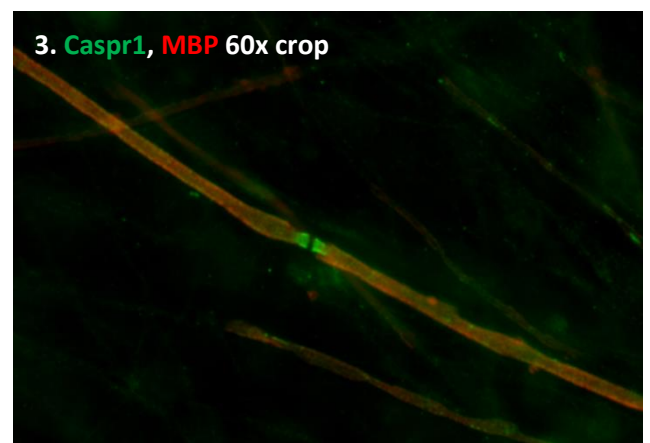
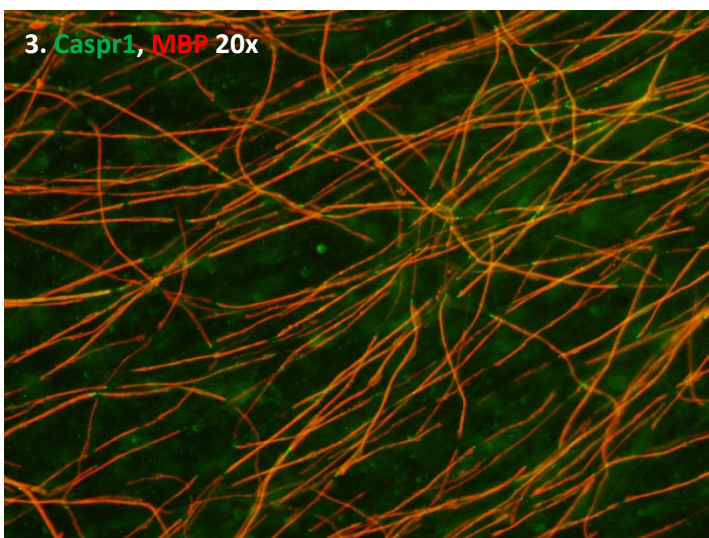
- **Cubre 1:**
 - Incubar con anticuerpo **anti-Caspr1** (ab34151) 1/200 diluído en medio NG mielinización: 1h a 37°C
 - Fijar 20min con PFA 4%
 - Incubar con anticuerpo secundario **GAR488** diluído 1/500 en Goat serum 5%: 1h RT
 - Montar con FLuoromount
- **Cubre 2:**
 - Fijar 20min con PFA 4%
 - Bloquear con Goat serum 5% y 0,3% tritón: 30min RT
 - Incubar con anticuerpo **anti-Caspr1** (ab34151) 1/200 diluído en Goat serum 5%: overnight 4°C
 - Incubar con anticuerpo secundario **GAR488** diluído 1/500 en Goat serum 5%: 1h RT
 - Montar con FLuoromount

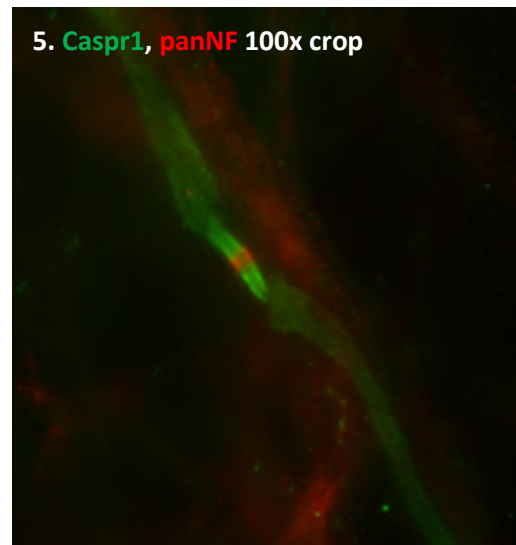
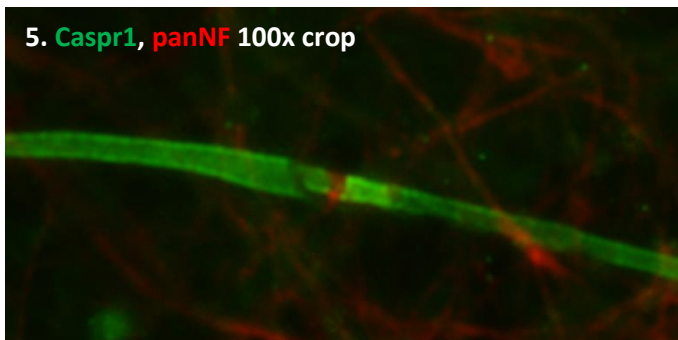
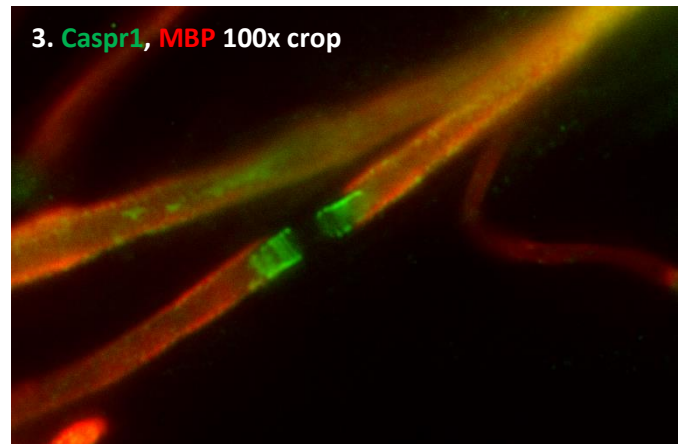
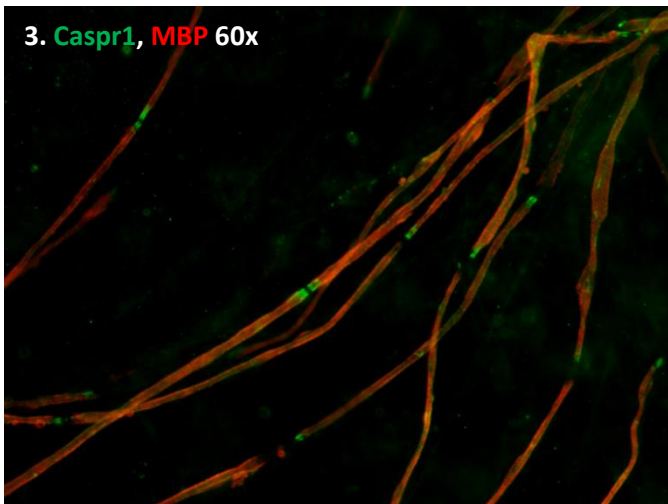
- **Cubre 3:**
 - Fijar 20min con PFA 4%
 - Permeabilizar 10min con metanol -20°C
 - Bloquear con Goat serum 5%: 30min RT
 - Incubar con anticuerpo **anti-Caspr1** (ab34151) 1/200 diluído en Goat serum 5%: overnight 4°C
 - Incubar con anticuerpo **anti-MBP** (808401) 1/200 diluído en Goat serum 5%: 1h RT
 - Incubar con anticuerpos secundarios **GAR488 + GAM594** diluídos 1/500 en Goat serum 5%: 1h RT
 - Montar con FLuoromount
- **Cubre 4:**
 - Fijar 20min con PFA 4%
 - Bloquear con Goat serum 5% y 0,3% tritón: 30min RT
 - Incubar con anticuerpo **anti-Caspr1** (ab34151) 1/200 diluído en Goat serum 5%: overnight 4°C
 - Incubar con anticuerpo **anti-MBP** (808401) 1/200 diluído en Goat serum 5%: 1h RT
 - Incubar con anticuerpos secundarios **GAR488 + GAM594** diluídos 1/500 en Goat serum 5%: 1h RT
 - Montar con FLuoromount
- **Cubre 5:**
 - Fijar 20min con PFA 4%
 - Permeabilizar 10min con metanol -20°C
 - Bloquear con Goat serum 5%: 30min RT
 - Incubar con anticuerpo **anti-Caspr1** (ab34151) 1/200 diluído en Goat serum 5%: overnight 4°C
 - Incubar con anticuerpo **anti-panNF** 1/200 diluído en Goat serum 5%: 1h RT
 - Incubar con anticuerpos secundarios **GAR488 + GAC594** diluídos 1/500 en Goat serum 5%: 1h RT
 - Montar con FLuoromount
- **Cubre 6:**
 - Fijar 20min con PFA 4%
 - Bloquear con Goat serum 5% y 0,3% tritón: 30min RT

- Incubar con anticuerpo **anti-Caspr1** (ab34151) 1/200 diluído en Goat serum 5%: overnight 4°C
 - Incubar con anticuerpo **anti-panNF** 1/200 diluído en Goat serum 5%: 1h RT
 - Incubar con anticuerpos secundarios **GAR488 + GAC594** diluídos 1/500 en Goat serum 5%: 1h RT
 - Montar con FLuoromount
- **Cubre 7:**
 - Fijar 20min con PFA 4%
 - Bloquear con Goat serum 5% y 0,3% tritón: 30min RT
 - Incubar con anticuerpo **anti-MRGPRD** (HPA031346, Sigma) 1/100 diluído en Goat serum 5%: overnight 4°C
 - Incubar con anticuerpo **anti-NFh** (AB5539) 1/500 diluído en Goat serum 5%: 1h RT
 - Incubar con anticuerpos secundarios **GAR488 + GAC594** diluídos 1/500 en Goat serum 5%: 1h RT
 - Montar con FLuoromount

Resultado:

- Las mejores condiciones son el cubre 3 y 5 (permeabilización con metanol): el marcaje de los anticuerpos es perfecto.
- El anticuerpo anti-Caspr1 (ab34151) marca también la mielina, aunque se ven claramente los paranodos (Elba lo prueba también en el teasing y se ven perfectos los paranodos).
- Aunque haya puesto las fotos de PN maduros, la mayoría de los nodos todavía no están maduros (los PN están muy separados).
- Cubre 7: el anticuerpo anti-MRGPRD no marca nada





17/10/2023

✓ IHC Monkey peripheral nerve (BD)

Muestras:

1. 23-2-1083 (IgG y IgM)
2. Cneg (IgG y IgM)
3. GDP1 (CIDP15) IgG – doble MBP*
4. MRVM (CIDP78) IgG – doble LIF (invitrogen)

*Quería hacer doble con el anticuerpo anti-LIF de abcam pero no quedaba

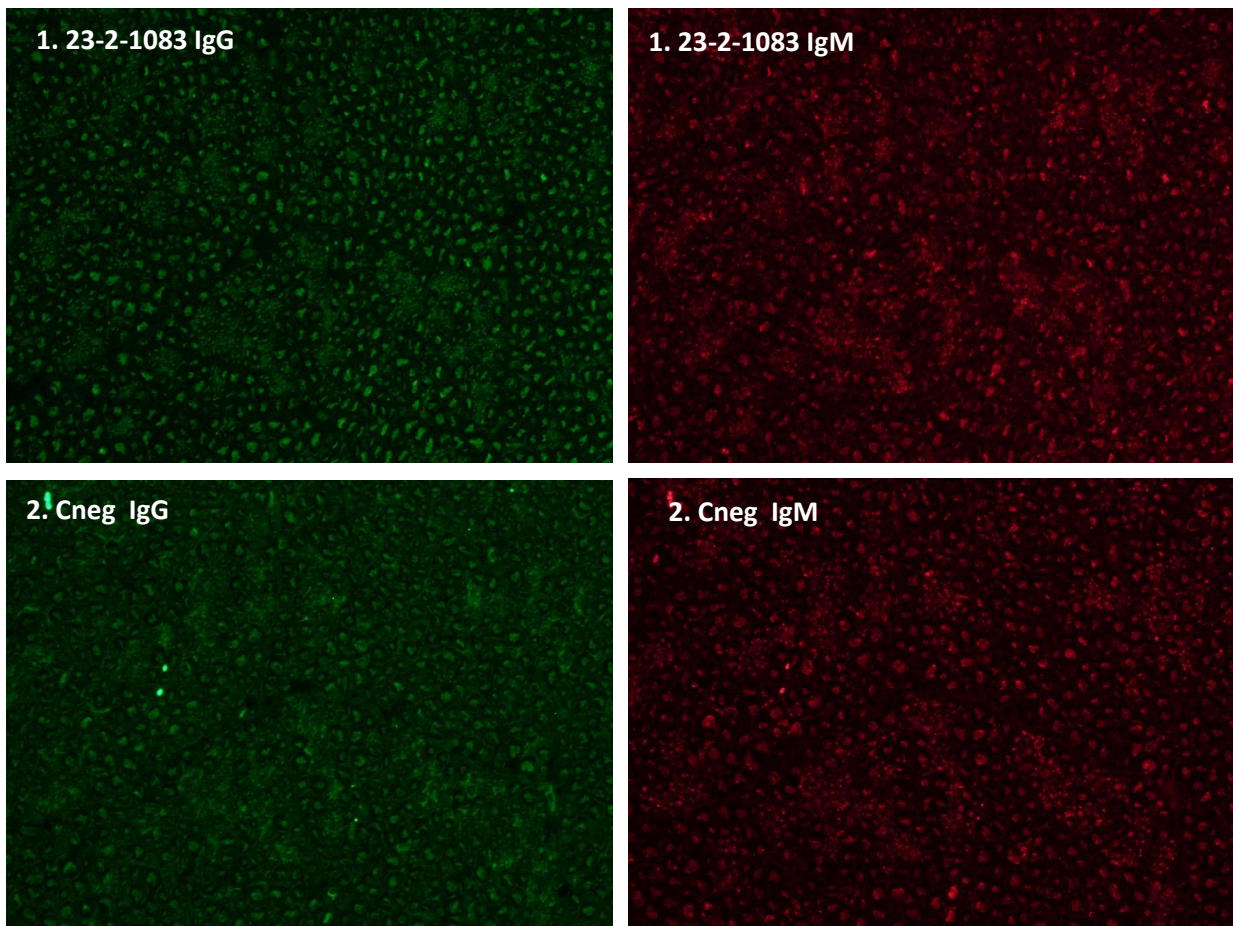
Protocolo: Monkey sciatic nerve slides (44685, Biosystems, Palex)

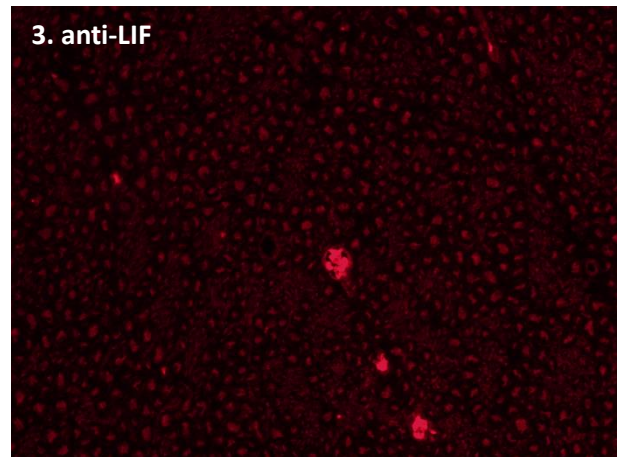
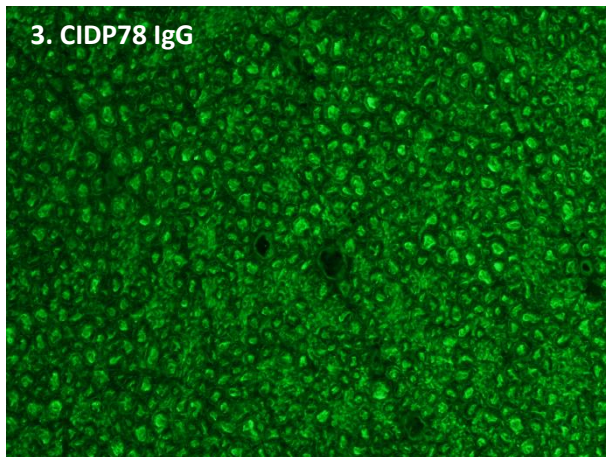
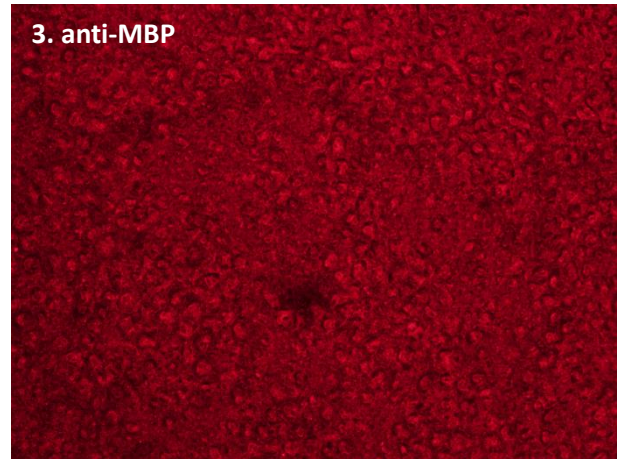
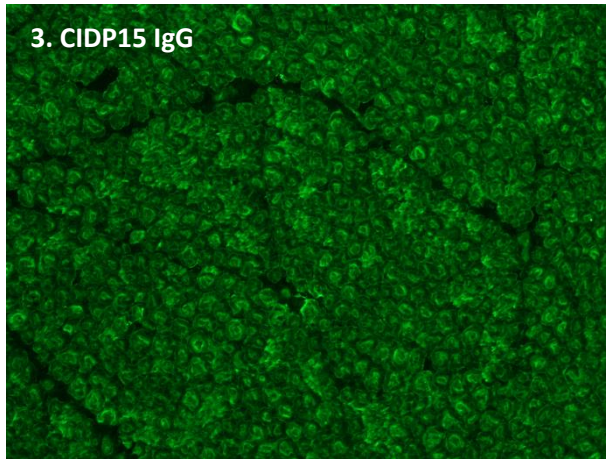
- Bloquear 30 min – 1h con Goat serum 5%
- Incubar 1h con 40 ul de suero diluído 1/10 en Goat serum 5% (4 ul de suero + 36 ul de bloqueo)

- 3 lavados con PBS1x
- Pozos 3-4: incubar con anticuerpo primario:
 - Pozo 3: anti-MBP (808401, Biolegend) 1/20 (mouse)
 - Pozo 4: anti-LIF (PA579600, Invitrogen) 1/20 (rabbit)
- 3 lavados con PBS1x
- Incubar 45min con 30-40 ul de Ac.secundarios (diluídos 1/500 en Goat serum 5%):
 - Pozos 1-2: GAH monkey absorbed IgG 488 + GAH IgM 594
 - Pozos 3-4: GAH monkey absorbed IgG 488 + GAR 594
- 3 lavados con PBS1x
- Montar con fluoromount

Resultado:

1. 23-2-1083: negativo (IgG, IgM)
2. Cneg: negativo (IgG, IgM)
3. GDP1 (CIDP15) IgG – doble MBP: el suero marca la mielina. El MBP tiene un marcaje difuso horrible
4. MRVM (CIDP78) IgG – doble LIF (invitrogen): el suero marca la mielina. El LIF no marca nada (sólo unas estructuras dentro de los vasos, que no colocalizan con el suero)





18/10/2023

✓ [ICC co-cultivos](#) (día 41 - rata 07/09/2023)

Muestras:

1. GDP1 (CIDP15) suero – ICC vivas
2. MRVM (136-8) suero – ICC vivas
3. MRVM (136-8) IgG – ICC vivas
4. GDP1 (CIDP15) suero – ICC fijadas
5. MRVM (136-8) suero – ICC fijadas
6. MRVM (136-8) IgG – ICC fijadas

Protocolo cels vivas: se hacen lavados con PBS1x entre cada paso

- Incubar con **suero** 1/100 o **IgG** 1/10 diluídos en medio NG mielinización: 2h a 37°C
- Fijar 20min con PFA 4%
- Permeabilizar 10min con metanol -20°C
- Bloquear con Goat serum 5%: 30min RT
- Incubar con anticuerpos primarios diluídos en Goat serum 5%: 2h a RT (los pongo juntos)

- **anti-Caspr1** (ab34151) 1/200
- **anti-MBP** (808401) 1/200
- Incubar con anticuerpos secundarios **GAH488 IgG + GAR594 + GAM647** diluídos 1/500 en Goat serum 5%: 1h RT
- Montar con Fluoromount

Protocolo cels fijadas:

- Fijar 20min con PFA 4%
- Permeabilizar 10min con metanol -20°C
- Bloquear con Goat serum 5%: 30min RT
- Incubar con **suero** 1/100 o **IgG** 1/10 diluídos en Goat serum 5%: 2h a RT
- Incubar con anticuerpos primarios diluídos en Goat serum 5%: 2h a RT (los pongo juntos)
 - **anti-Caspr1** (ab34151) 1/200
 - **anti-MBP** (808401) 1/200
- Incubar con anticuerpos secundarios **GAH488 IgG + GAR594 + GAM647** diluídos 1/500 en Goat serum 5%: 1h RT
- Montar con Fluoromount

Resultado: en las céls incubadas con los sueros en vivo no hay tanto marcaje general (es más limpio). El marcaje de MBP y de Caspr1 han salido muy bien!!

1. GDP1 (CIDP15) suero – ICC vivas: mielina +++ (hay muchas células “contaminantes” y no salen demasiado bien las fotos). Creo que en realidad el marcaje es de las cels de Schwann mielinizantes y no en la mielina en sí.
2. MRVM (136-8) suero – ICC vivas: no marcan los paranodos, marca débilmente las cels de Schwann mielinizantes (mismo patrón que GDP1 pero muy débil).
3. MRVM (136-8) IgG –ICC vivas: no marcan los paranodos, marca débilmente las cels de Schwann mielinizantes (mismo patrón que GDP1 pero muy débil).
4. GDP1 (CIDP15) suero – ICC fijadas: mielina +++ y axones ++
5. MRVM (136-8) suero – ICC fijadas: marca todo en general... es muy complicado ver los paranodos, aunque creo que un poco sí que se marcan.
6. MRVM (136-8) IgG –ICC fijadas: marca todo en general... es muy complicado ver los paranodos, aunque creo que un poco sí que se marcan.

FOTOS: <http://s811335031.mialojamiento.es/lab/blog/2023/10/18/2023-10-18-icc-co-cultivos-dia-41-rata-07-09-2023/>

20/10/2023

Descongelar células de Schwann

Descongeló 1 vial de **células de Schwann de rata** (cultivo primari) en 1 placa de 100mm con gelatina 0,15%: vial p7 congelado el día 15/09/2023 por Cinta

- **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)

23/10/2023

Coating ELISA CASPR1

[CASPR1]_i = 0,789 mg/ml

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

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

24/10/2023

✓ ICC co-cultivos DRG -1- (día 47 - rata 07/09/2023)

Muestras:

1. 136-8 (coger CIDP78 cajas -80°C)
2. 22-2-374
3. 23-2-656
4. 23-2-554
5. Cneg 21-2-1608

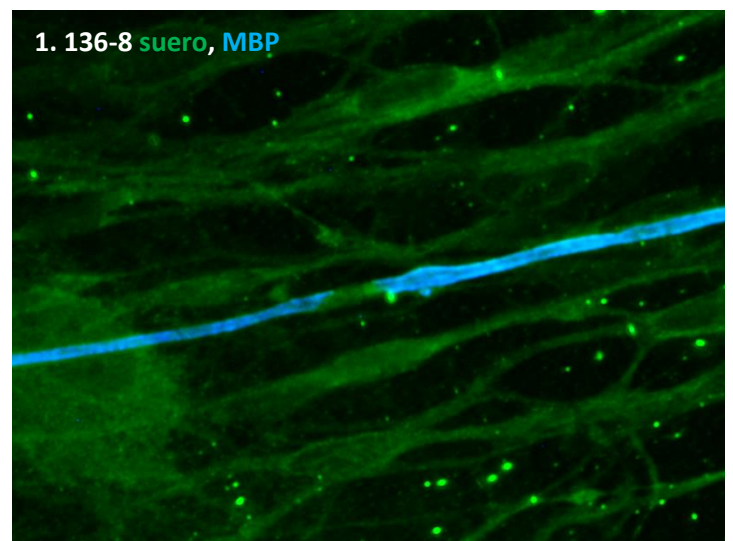
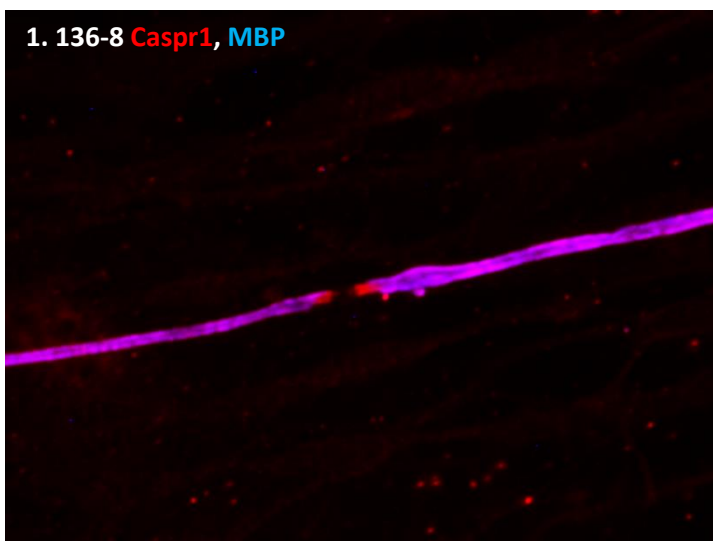
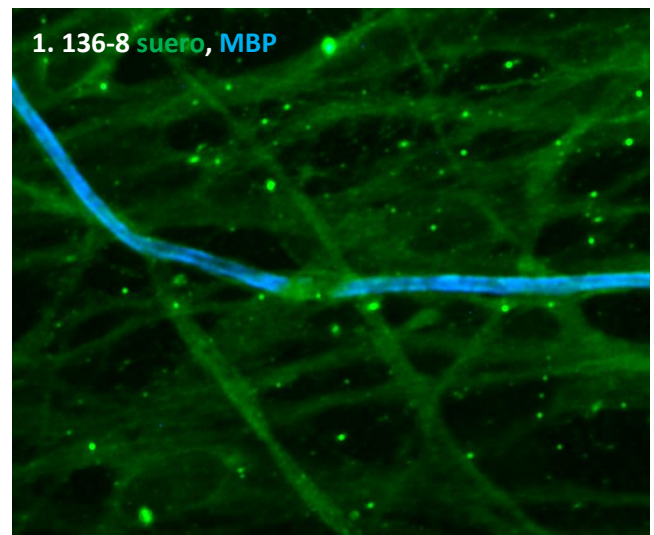
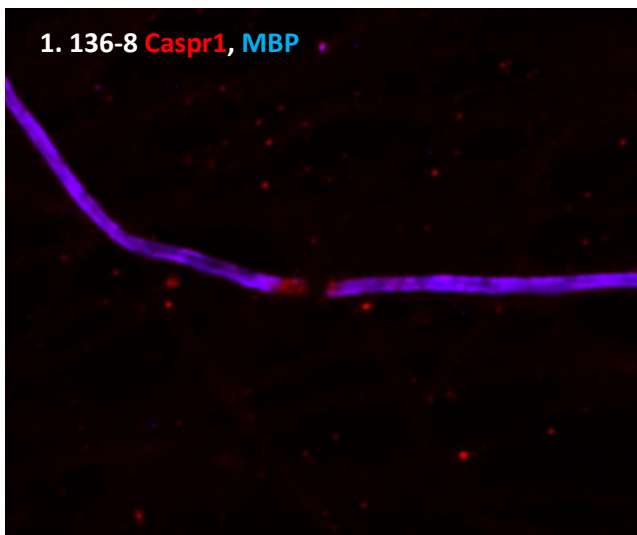
Protocolo cels fijadas:

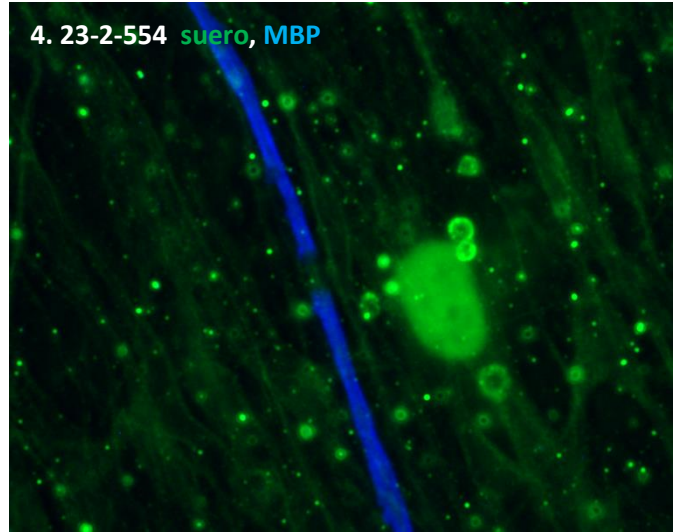
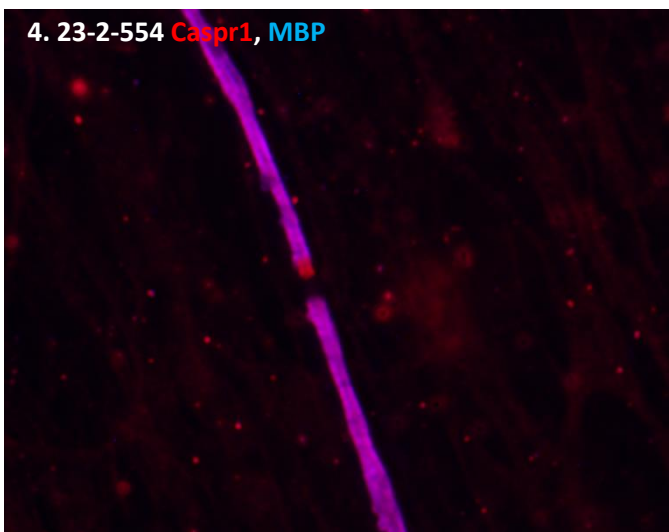
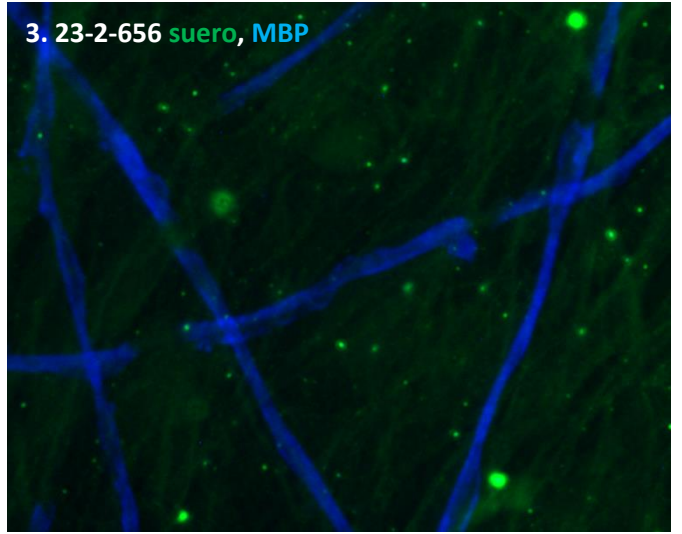
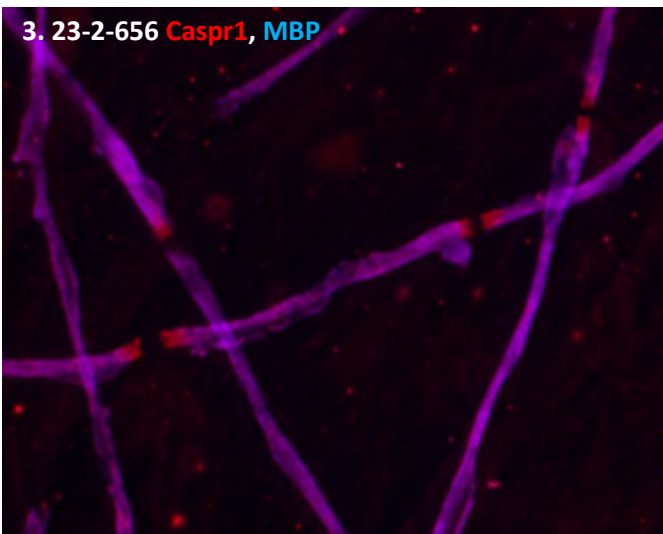
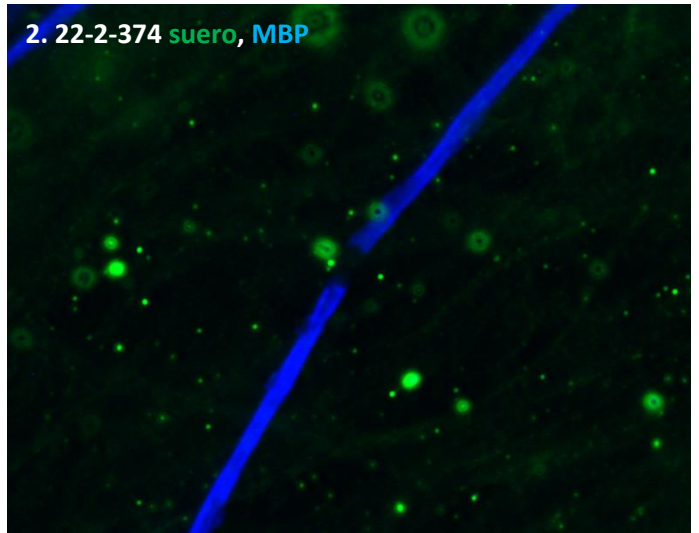
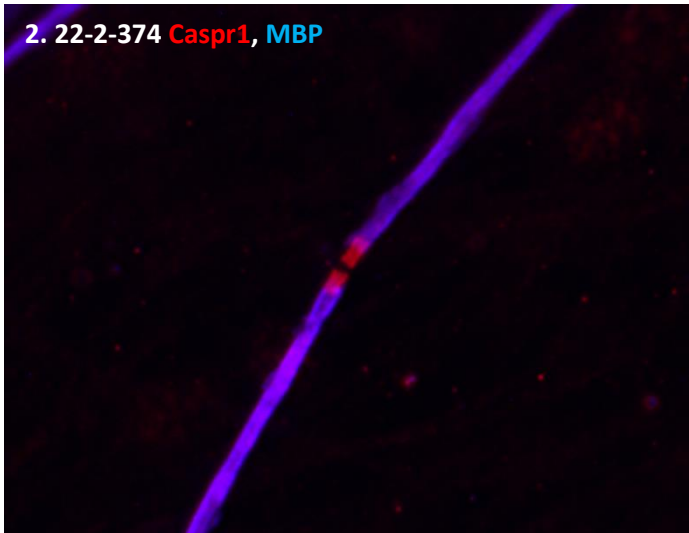
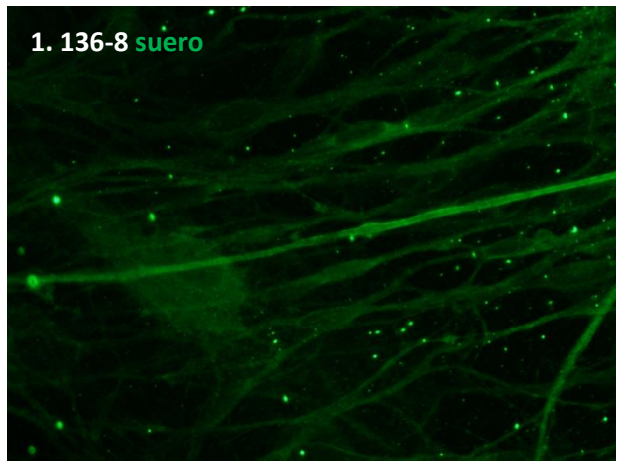
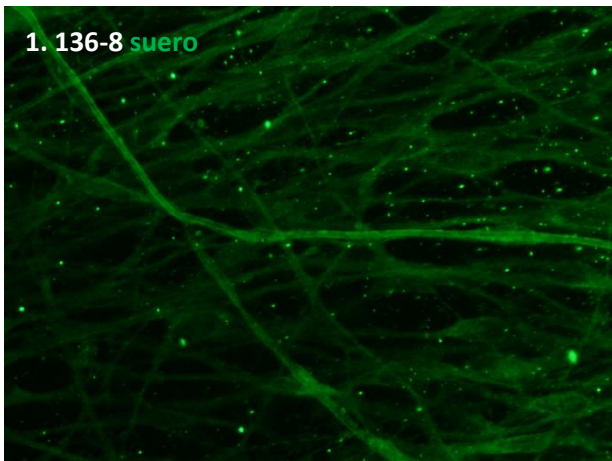
- Fijar 20min con PFA 4%
- Permeabilizar 10min con metanol -20°C
- Bloquear con Goat serum 5%: 30min RT
- Incubar con **suero** 1/50 diluído en Goat serum 5%: 2h a RT

- Incubar con anticuerpos primarios diluïdos en Goat serum 5%: 2h a RT (los pongo juntos)
 - **anti-Caspr1** (ab34151) 1/200
 - **anti-MBP** (808401) 1/200
- Incubar con anticuerpos secundarios **GAH488 IgG + GAR594 + GAM647** diluïdos 1/500 en Goat serum 5%: 1h RT
- Montar con Fluoromount

Resultado: las ICC han salido muy bien (mielina y Caspr1), pero ninguno de los pacientes Caspr1+ marca los paranodos... (la 136-8 puede parecer un poco).

La muestra 136-8 marca bastante los axones y la mielina (o las cels Schwann mielinizantes).





✓ ICC co-cultivos DRG -2- (día 47 - rata 07/09/2023)

Muestras:

6. GDP1 (CIDP15)
7. MRVM (136-8, coger CIDP78 cajas -80°C)
8. Cneg

Protocolo cels vivas:

- Incubar con suero 1/100 diluído en medio NG mielinización: 2h a 37°C
- Fijar 20min con PFA 4%
- Permeabilizar 10min con metanol -20°C
- Bloquear con Goat serum 5%: 30min RT
- Incubar con anticuerpos primarios diluídos en Goat serum 5%: 2h a RT (los pongo juntos)
 - **anti-Caspr1** (ab34151) 1/200
 - **anti-MBP** (808401) 1/200
- Incubar con anticuerpos secundarios **GAH488 IgG + GAR594 + GAM647** diluídos 1/500 en Goat serum 5%: 1h RT
- Montar con Fluoromount

Resultado: CIDP15 marca mucho los axones y la mielina, CIDP78 marca bastante los axones y la mielina pero mucho menos (y no marca los paranodos).

✓ ICC co-cultivos médula (día 47 - rata 07/09/2023)

Prueba co-cultivos médula:

1. Explante médula P/L
2. Explante médula matrigel
3. Médula disgregada con glía

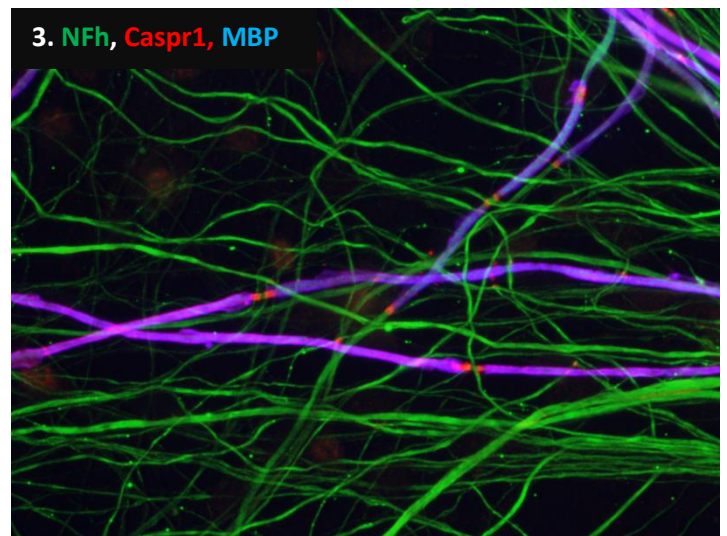
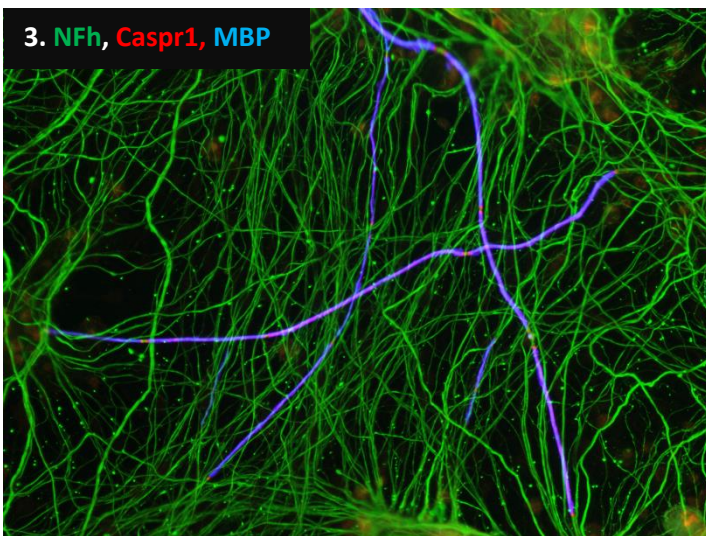
Protocolo cels fijadas:

- Fijar 20min con PFA 4%
- Permeabilizar 10min con metanol -20°C
- Bloquear con Goat serum 5%: 30min RT
- Incubar con anticuerpos primarios diluídos en Goat serum 5%: 2h a RT (los pongo juntos)
 - **anti-Caspr1** (ab34151, abcam) 1/300
 - **anti-MBP** (808401, Biolegend) 1/300

- anti-NFh (AB5539, Merck) 1/500
- Incubar con anticuerpos secundarios **GAC488 IgG + GAR594 + GAM647** diluïdos 1/500 en Goat serum 5%: 1h RT
- Montar con Fluoromount

Resultado:

1. Explante médula P/L: no hay mielina
2. Explante médula matrigel: no hay mielina
3. Médula disgregada con glía: hay mucha mielina, y se ve muy bien el Caspr1 (paranodos formados)



✓ **ELISA CASPR1 (titulación, subclases y screening BD)**

Muestras:

- 23-2-1111: titulación CASPR1 y subclases
- 23-2-554: titulación CASPR1 y subclases
- 23-2-1110: screening 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 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)

- Subclases* y screening: diluir sueros 1/100 en leche 5% en PBS-tween 0'1%

*En este caso hago las subclases a 1/50

- Incubar con los sueros 1h a RT
- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
- Ac secundarios:
 - Titulación / screening / confirmación: Incubar con **RAH IgG HRP** 1/3000 en leche 5% en PBS-tween 0'1% : 100 ul/pozo, 45 min
 - Subclases: Incubar con **MAH HRP*** IgG1 o IgG2 o IgG3 o IgG4 1/1000 en leche 5% en PBS-tween 0'1%: 100 ul/pozo, 45 min

*En este caso pongo los Ac.secundarios de subclases a 1/500

- 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	23-2-554 1/900	23-2-1111 1/100	23-2-1111 1/8100	23-2-554 IgG1	23-2-1111 IgG1						
B blanc	Cneg	23-2-554 1/900	23-2-1111 1/100	23-2-1111 1/8100	23-2-554 IgG1	23-2-1111 IgG1						
C prot	Cpos CASPR1	23-2-554 1/2700	23-2-1111 1/300	23-2-1111 1/24300	23-2-554 IgG2	23-2-1111 IgG2						
D blanc	Cpos CASPR1	23-2-554 1/2700	23-2-1111 1/300	23-2-1111 1/24300	23-2-554 IgG2	23-2-1111 IgG2						
E prot	23-2-554 1/100	23-2-554 1/8100	23-2-1111 1/900	23-2-1110 1/100	23-2-554 IgG3	23-2-1111 IgG3						
F blanc	23-2-554 1/100	23-2-554 1/8100	23-2-1111 1/900	23-2-1110 1/100	23-2-554 IgG3	23-2-1111 IgG3						
G prot	23-2-554 1/300	23-2-554 1/24300	23-2-1111 1/2700		23-2-554 IgG4	23-2-1111 IgG4						
Hblanc	23-2-554 1/300	23-2-554 1/24300	23-2-1111 1/2700		23-2-554 IgG4	23-2-1111 IgG4						

Resultado:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	0,041	0,104	0,756	0,054	0,123	0,165						
B blanc	0,085	0,038	0,105	0,04	0,044	0,063						
C prot	1,432	0,055	0,284	0,049	0,157	0,191						
D blanc	0,029	0,046	0,055	0,035	0,113	0,126						
E prot	0,535	0,049	0,168	0,391	0,053	0,075						
F blanc	0,104	0,04	0,051	0,075	0,047	0,049						
G prot	0,119	0,047	0,062	0	0,042	0,082						
Hblanc	0,068	0,039	0,047	0	0,029	0,041						

Resultado:

- 23-2-1111: título CASPR1 1/900. Subclase IgG1 (muy débil!!). Misma muestra que 23-2-554 pero enviada tiempo más tarde.
- 23-2-554: título CASPR1 1/900. Subclase IgG1 (muy débil!!).
- 23-2-1110: CASPR1 positivo: titular y subclases

✓ **ICC Perfil nodales/paranodales (interlab validation)**

Llegan alícuotas nuevas de Oxford: nos envían 12 sueros (no sabemos cuál es cuál).

El objetivo era retestar las muestras SR485 y SR946, que sólo las dimos por NF155+ nosotros.

Muestras y resultado: 7 culture slides (transfectados en Immuno día 19/10/2023)

- SB1: NF155+
- SB2: neg
- SB3: neg
- SB4: neg
- SB5: NF155+
- SB6: neg
- SB7: neg
- SB8: neg
- SB9: neg
- SB10: neg
- SB11: neg
- SB12: neg

26/10/2023

✓ IHC teasing nervio ciático rata

Muestras:

1. 23-2-1110 (comprobar positividad Caspr1)
2. 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 1h RT con Goat serum 5% + 0'1% tritón
- Incubar con suero diluído 1/100 en Goat serum 5% + 0'1% tritón: 1h RT
- Incubar con ac anti-panNF diluído 1/300 en Goat serum 5% + 0'1% tritón 1h RT
- Incubar con ac secundarios GAH594 IgG + GAC488 diluídos 1/500 en Goat serum 5% + 0'1% tritón 1h RT
- Montar con Fluoromount

Resultado: parece que 23-2-1110 sí que marca los paranodos (repetir para reconfirmar)

✓ ELISA CASPR1 (screening interlab validation)

Muestras:

- SB1
- SB2
- SB3
- SB4
- SB5
- SB6
- SB7
- SB8
- SB9
- SB10
- SB11
- SB12
- 23-2-1110

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 a RT
- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%

- Ac secundarios:
 - Screening / confirmación: Incubar con **RAH IgG HRP 1/3000** en leche 5% en PBS-tween 0'1% : 100 ul/pozo, 45 min
- 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	SB3	SB7	SB11								
B blanc	Cneg	SB3	SB7	SB11								
C prot	Cpos CASPR1	SB4	SB8	SB12								
D blanc	Cpos CASPR1	SB4	SB8	SB12								
E prot	SB1	SB5	SB9	23-2-1110								
F blanc	SB1	SB5	SB9	23-2-1110								
G prot	SB2	SB6	SB10									
Hblanc	SB2	SB6	SB10									

Resultado:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	0,066	0,048	0,045	0,039								
B blanc	0,074	0,097	0,082	0,064								
C prot	1,243	0,06	0,035	0,048								
D blanc	0,038	0,108	0,051	0,091								
E prot	0,04	0,037	0,036	0,299								
F blanc	0,054	0,05	0,061	0,079								
G prot	0,038	0,042	0,032									
Hblanc	0,061	0,077	0,034									

- SB1: negativo
- SB2: negativo
- SB3: negativo
- SB4: negativo
- SB5: negativo
- SB6: negativo
- SB7: negativo
- SB8: negativo
- SB9: negativo
- SB10: negativo
- SB11: negativo
- SB12: negativo
- 23-2-1110: CASPR1 pos

27/10/2023

✓ Coating placas para co-cultivos y neuronas

Placas: coating Poly-D-lys/laminina (el coating con matrigel que usé el día 07/09/2023 también funciona muy bien)

- **Explantos DRG:** 5 placas de 24 wells con 1 cubre de 12mm en cada pozo → coating Poly-D-lys/laminina
- **Neuronas DRG:** 1 placa 60 cc con 26 cubres 9mm
- **Médula disgregada (co-cultivos):** 3 placas 60 cc con 26 cubres 9mm

Protocolo coating Poly-D-lys/laminina:

- Coating con Poly-D-lys 1/40 : incubar 2h a 37°C
- Lavar 1 vez con PBS1x
- Coating con laminina 3 ul/ml: incubar 1h a 37°C
 - *descongelar la laminina en la nevera o en hielo
- Lavar 1 vez con PBS1x

✓ Co-cultivo de neuronas DRG i células de Schwann (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%)
- 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

Co-cultivos (explantes DRG)

- DO : Añadir 400 ul de **medio NG** (co-culture medium) a cada pozo con cubre:
 - **Medio NG:**
 - 48 ml de medio Neurobasal
 - 1 ml de suplement B27
 - 500 µl de glutamax
 - 500 µl de Pen-Str
 - 25 µl de NGF
- Poner un DRG o trocito de médula en cada pozo/cubre e incubar a 37°C

✓ **Disgregar médulas y DRG** (Adult brain dissociation Kit - Milteny)

Disgrego:

- 5 médulas guardadas en Tissue Storage Solution unas horas antes (sacadas de embriones E16 de rata).
- DRG de 1-2 embriones

Uso este kit: Adult brain dissociation kit (130-107-677, Milteny), y uso la máquina GentleMACS.

Protocolo kit:

Reagent and instrument preparation

▲ For subsequent cultivation it is recommended to dissociate at least 800 mg of adult neural tissue.

▲ Volumes given below are for one adult mouse brain (max. 500 mg) in 1980 µL enzyme mix. When working with less than 500 mg, use the same volumes as indicated. When working with

neural tissue from adult rats or distinct brain regions, determine the weight and scale up all reagent volumes and total volumes accordingly. A maximum of 500 mg neural tissue per C Tube can be processed.

1. Enzyme P is ready to use. Prepare aliquots of appropriate volume to avoid repeated freeze-thaw-cycles. Store aliquots at -20°C . This solution is stable for 6 months. Resuspend the lyophilized powder in the vial labeled Enzyme A with 1 mL Buffer A. Do not vortex. This solution should then be aliquoted and stored at -20°C for later use. Avoid repeated freeze-thaw-cycles: **en este caso las enzimas ya estaban alicuotadas.**

2. Prepare enzyme mix 1 and enzyme mix 2 according to the table below (**las enzimas están a -20°C y los buffers a 4°C**)

- Enzyme mix 1: 50 μL Enzyme P + 1900 μL Buffer Z
- Enzyme mix 2: 20 μL Buffer Y + 10 μL Enzyme A

Dissociation protocol

▲ 20 mg up to 500 mg of rodent neural tissue in 2 mL enzyme mix can be processed in one C Tube.

▲ For cell culture experiments subsequent to tissue dissociation, all steps should be performed under sterile conditions.

1. Remove the rodent neural tissue. Wash neural tissue in cold D-PBS.

2. Prepare the appropriate volume of enzyme mix 1 (refer to table in section 1) and transfer it into a gentleMACS C Tube.

3. Cut larger tissue (e.g. whole brain or spinal cord) into approximately 8 sagittal slices or 0.5 cm pieces using a scalpel. In case of smaller tissue, e.g., hippocampus continue directly with step 4: **en este caso no corto las médulas porque ya son suficientemente pequeñas.**

4. Transfer the tissue pieces into the C Tube containing 1950 μL of enzyme mix 1.

5. Transfer 30 μL of enzyme mix 2 into the C Tube.

6. Tightly close C Tube and attach it upside down onto the sleeve of the gentleMACS Octo Dissociator with Heaters.

7. Run the appropriate gentleMACS Program:

- 20–100 mg: 37C_ABDK_02
- >100 mg: 37C_ABDK_01.

***Uso el programa 37C_ABDK_02: poner el tubo boca abajo en el GentleMACS con la parte plana hacia adelante, poner el Heater (pieza amarilla), seleccionar programa (dura 30min).**

8. After termination of the program, detach C Tube from the gentleMACS Octo Dissociator with Heaters.

9. Centrifuge briefly to collect the sample at the bottom of the tube.

10. Resuspend sample and apply it to a MACS SmartStrainer (70 μm) placed on a 50 mL tube.

▲ Note: Moisten MACS SmartStrainer with buffer before use.

▲ Note: When upscaling the reagent volume and total volumes, increase also the number of MACS SmartStrainers (70 μm). One MACS SmartStrainer (70 μm) can be used for one adult mouse brain.

▲ Note: Cells with a diameter $>70 \mu\text{m}$ may be lost. To obtain these cells within the flow through, use a cell strainer with an appropriate mesh size.

11. Add 10 mL of cold D-PBS to the C Tube, close C Tube, shake gently and apply the D-PBS onto the MACS SmartStrainer (70 μm).

12. Discard MACS SmartStrainer (70 μm) and centrifuge cell suspension at $300\times g$ for 10 minutes at 4 °C. Aspirate supernatant completely: **en este caso no lo he centrifugado a 4°C porque la centrífuga de cultivos no tiene regulador de temperatura.**

13. Proceed to 2.3 for debris removal: **no hago este paso!!!**

***Después de aspirar el sobrenadante:**

- **Médula: resuspendo las células en 3 ml de medioNG y las planto en 3 placas de 60cc con 26 cubres 9mm**
- **DRG: resuspendo las células en 1 ml de medio NG y las planto en 1 placa de 60cc con 26 cubres 9mm**

✓ **Cambios medios co-cultivos, neuronas DRG y neuronas médula: rata**
27/10/2023

- **Explantos DRG:** 5 placas de 24 wells con 1 cubre de 12mm en cada pozo
 - D0 (27/10): Añadir 500 ul de **medio NG** a cada pozo con cubre:
 - Neurobasal: 48 ml
 - 2% B27: 1 ml
 - 1% Glutamax: 0,5 ml
 - 1% Pen-Str: 0,5 ml
 - 50 ng/ml NGF:25 ul
 - D3 (30/10): quito 200ul de medio NG de cada pozo, y añado 400ul de medio NG nuevo
 - *en teoría tendría que cambiar a medio mielinización el día 2 o 3 de noviembre pero no estoy.

- D5 (01/11): quito 300ul de cada pozo y añado 400ul de **medio de mielinización NG**
 - 50 ml de medio NG
 - 50 ug/ml de ácido ascórbico: 500 ul del stock 5mg/ml (1/100 en el medio)
- D3 (05/10): cambiar mitad del medio de mielinización
- A partir de aquí ir cambiando la mitad del medio de mielinización cada 3 días
- **Células médula disgregadas (con glía)**: 3 placas 60cc con 26 cubres 9mm:
 - Tratadas como explantes de DR
- **Neuronas DRG**: 1 placa 60 cc con 26 cubres 9mm
 - D0 (27/10) : Añadir **medio NG**
 - D3 (30/10): este día debería cambiar la mitad de medio por **medio NGF**, pero no lo hago porque veo que las células están fatal.
 - 50 ml de medio NG
 - 10 µl de 5-fluorodesoxiuridina (1)
 - 10 µl de uridina (2)
 - 5 µl de AraC 10 mM

30/10/2023

✓ **ICC co-cultivos médula (día 53 - rata 07/09/2023)**

Objetivo: tratar de ver marcaje en los paranodos con muestras Caspr1+ (ya que en co-cultivos de explantes DRG no lo veo).

Muestras:

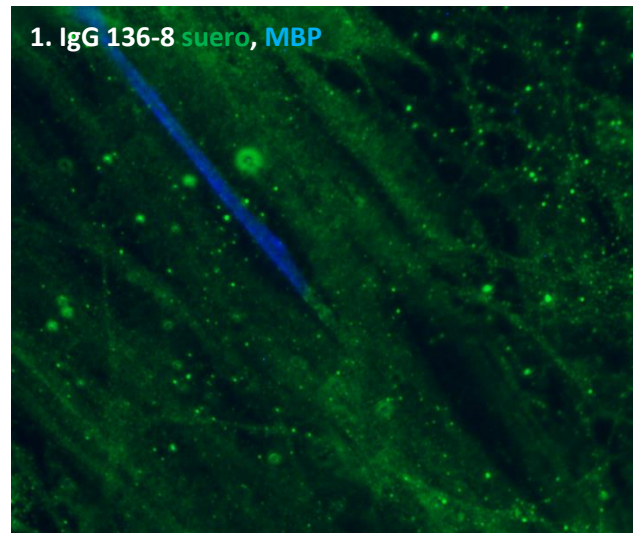
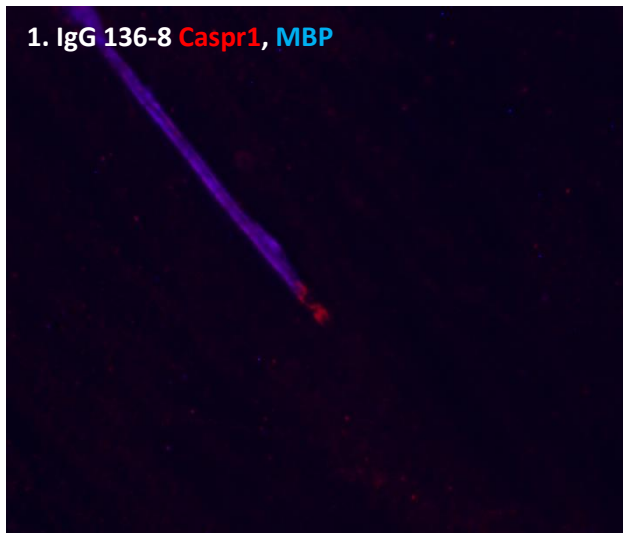
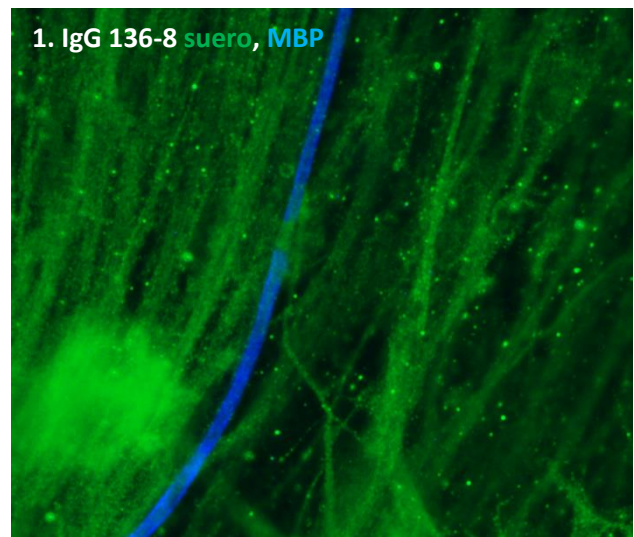
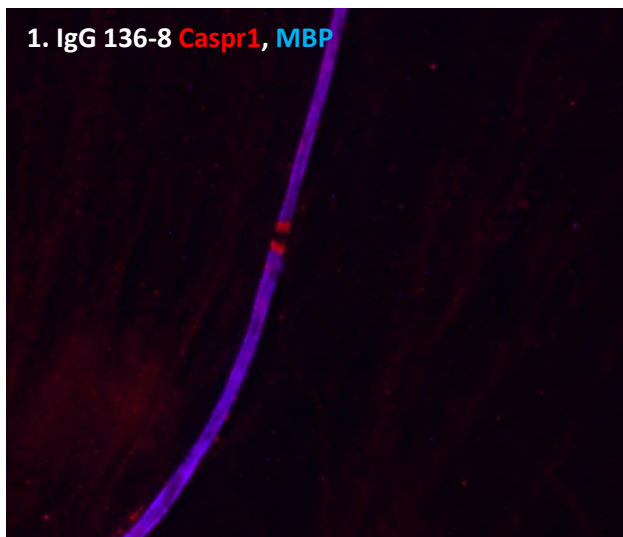
- | | |
|-----------------|-----------------------|
| 1. IgG 136-8 | 5. Suero 136-8 |
| 2. IgG 22-2-374 | 6. Suero GDP (CIDP15) |
| 3. IgG 23-2-554 | 7. Suero Cneg 217-32 |
| 4. IgG 23-2-656 | 8. Suero Cneg 217-33 |

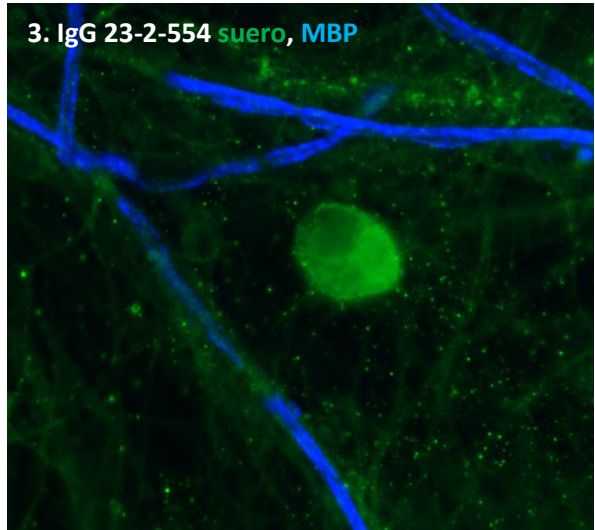
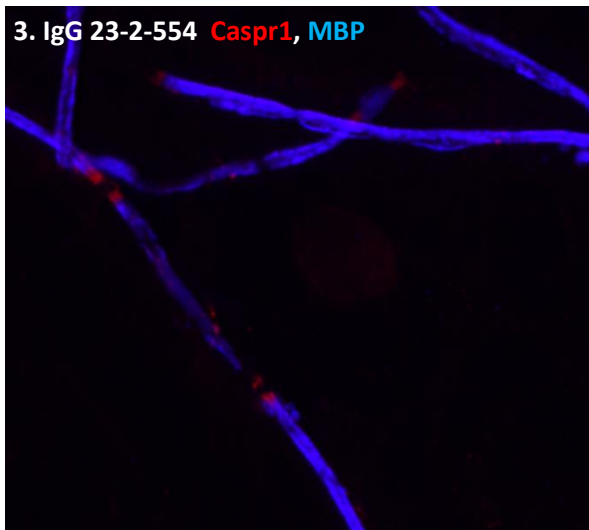
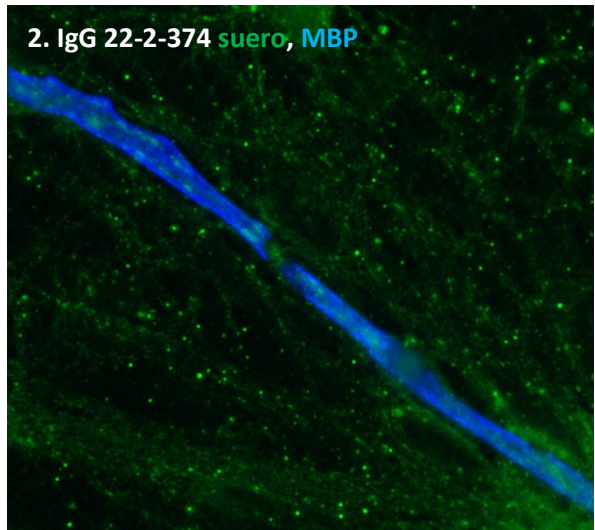
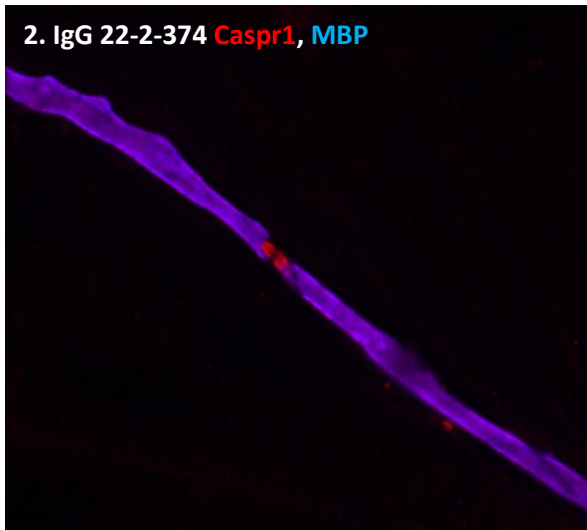
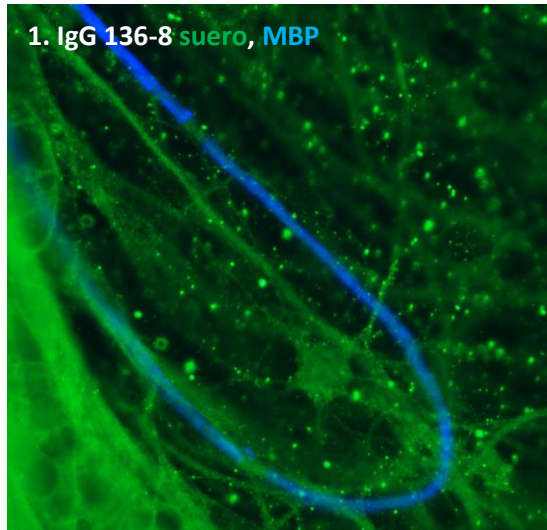
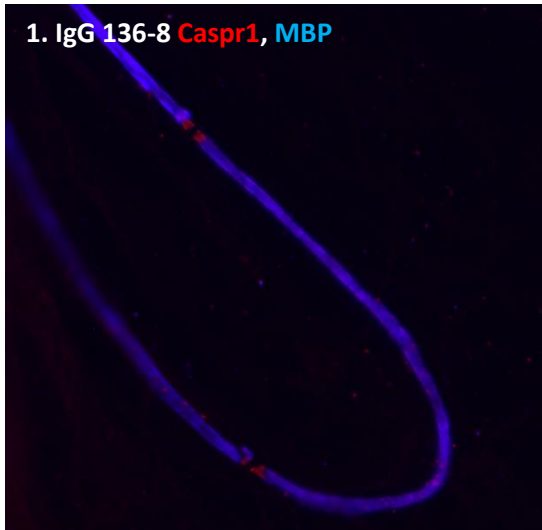
Protocolo cels fijadas:

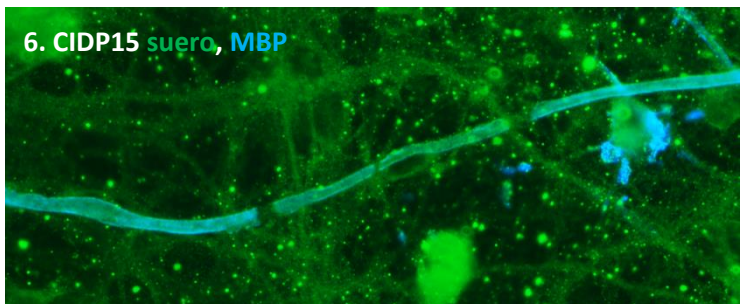
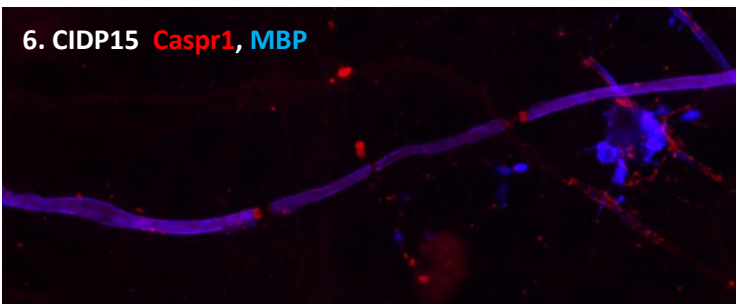
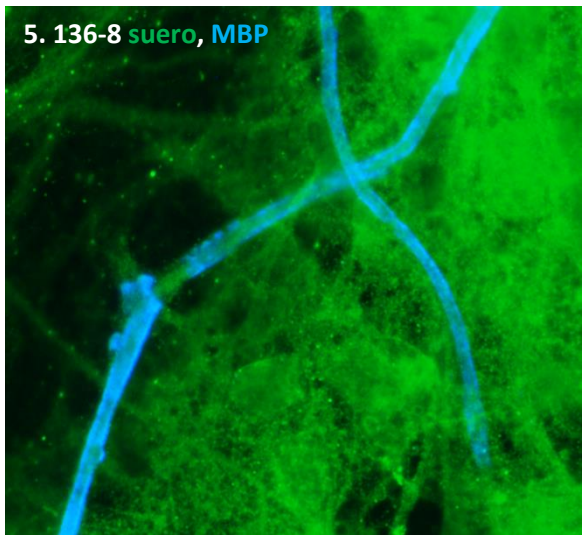
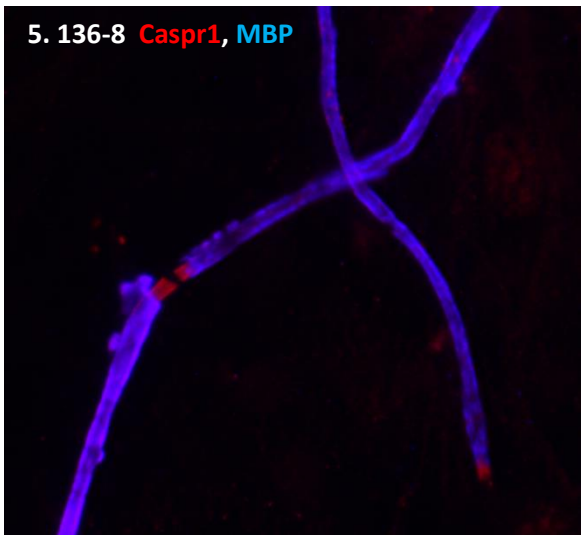
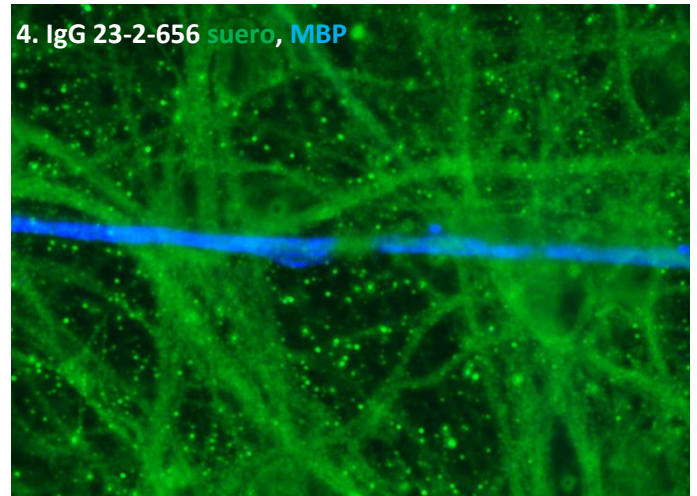
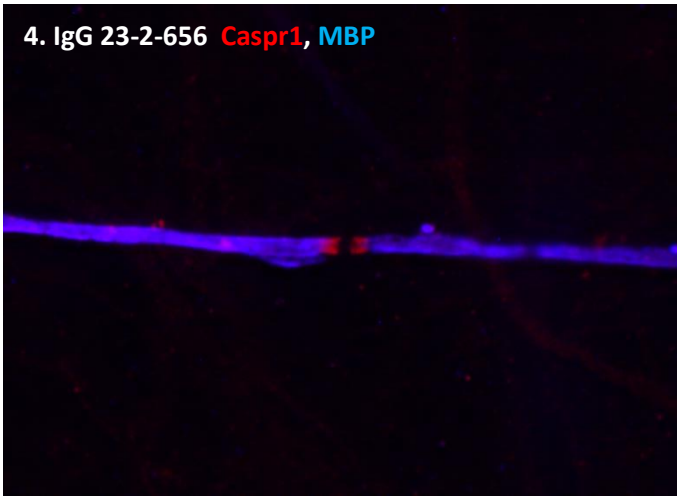
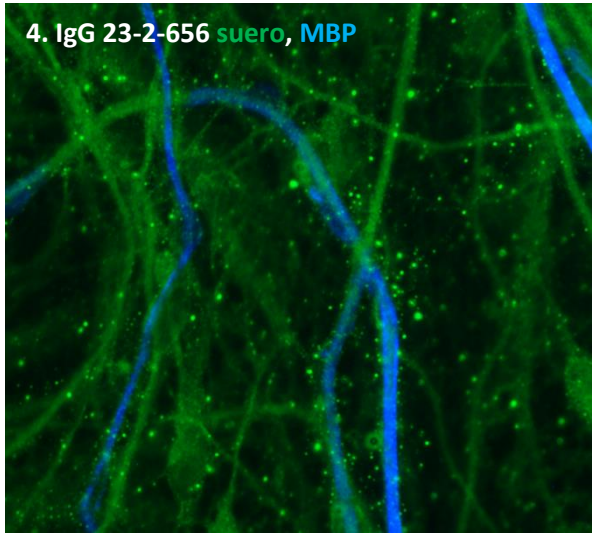
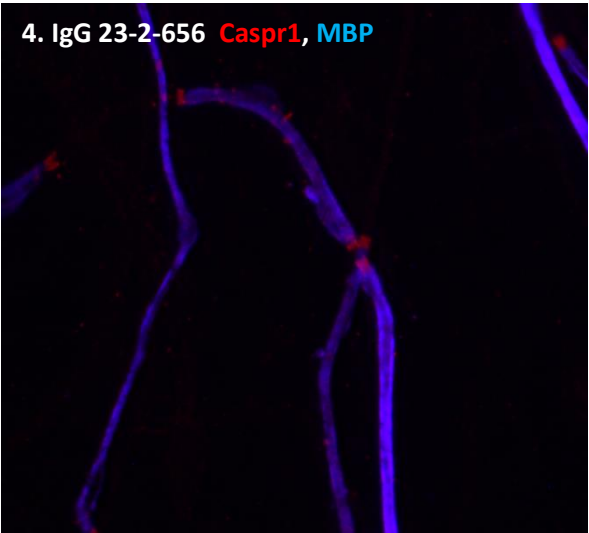
- Fijar 20min con PFA 4%
- Permeabilizar 10min con metanol -20°C
- Bloquear con Goat serum 5%: 30min RT
- Incubar con **suero** 1/100 o **IgG** 1/10 diluído en Goat serum 5%: 2h a RT

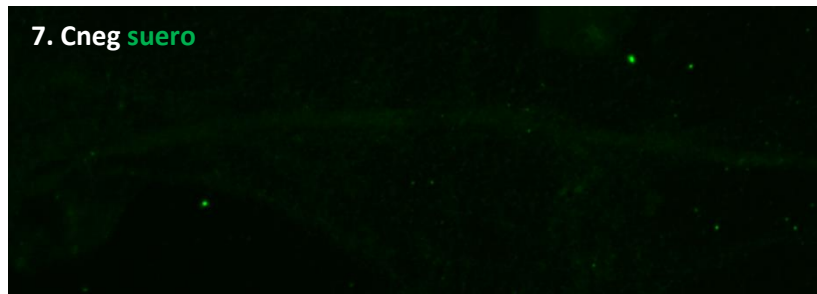
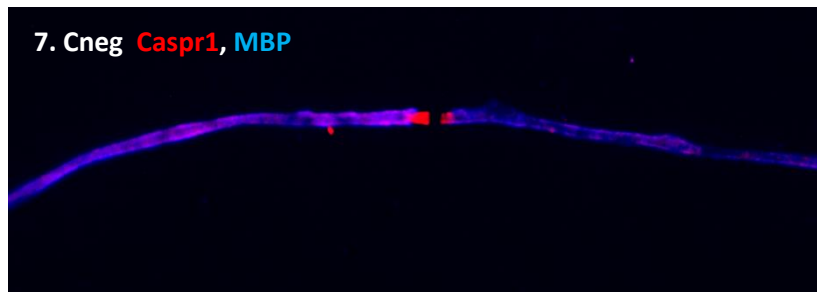
- Incubar con anticuerpos primarios diluídos en Goat serum 5%: 1h a RT (los pongo juntos)
 - **anti-Caspr1** (ab34151) 1/200
 - **anti-MBP** (808401) 1/200
- Incubar con anticuerpos secundarios **GAH488 IgG + GAR594 + GAM647** diluídos 1/500 en Goat serum 5%: 1h RT
- Montar con Fluoromount

Resultado: no se ven los paranodoss!!! Seguir probando









Coating ELISA CASPR1

[CASPR1]_i = 0,789 mg/ml

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

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

Coating ELISA NF155

[NF155]_i = 0,505 mg/ml

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

- NF155: 48 pozos (una placa) : [NF155]_f = 1 ug/ml : 2,5 ml buffer + 5 ul

31/10/2023

✓ ELISA NF155 (titulación IMM)

Muestras: titulación NF155. Se hace con Quantalyser

- **23-383195** (NHC 1677062, 09/10/2023)
- Muestra previa: **23-308741** (NHC 1677062, 12/06/2023, 23-2-620 Box 334)
 - Título anterior: 1/300 (IgG totales)
- **23-387012** (NHC 1570697, 16/10/2023)
- Muestra previa: **23-334068** (NHC 1570697, 17/07/2023, 23-2-679 Box 338)
 - Título anterior: 1/300 (IgG totales)
- **23-387027** (NHC 1843661, 16/10/2023)

- Muestra previa: **23-253278** (NHC 1843661, 20/03/2023, 23-2-415 Box 327)
 - Título anterior: 1/900 (IgG totales)
- **23-389477** (NHC E2115906, 24/10/2023)
- Muestra previa: **23-298589** (NHC E2115906, 01/06/2023, 23-2-978 Box 345)
 - Título anterior: 1/300 (IgG totales)

Resultado:

- 23-383195: 1/300
- 23-308741: 1/900
- 23-387012: 1/900
- 23-334068: 1/900
- 23-387027: repetir
- 23-253278: repetir
- 23-389477: 1/900
- 23-298589: 1/900

✓ [ICC CASPR1 y Doble CNTN1/CASPR1](#)

Se usa un culture slide: 4 pozos transfectados con Caspr1, y 4 pozos transfectados con CNTN1/CASPR1. Se hace la ICC con las células fijadas.

Muestras:

- 23-2-1110
- C+ (Bocanegra)

Resultado: aunque las células están bien transfectadas, no se ve positiva ni la muestra ni el control positivo (tendría que haber puesto otro C+, ya que la Bocanegra no marcaba las células fijadas, sólo las cels vivas).

06/11/2023

✓ [IHC teasing nervio ciático rata](#)

Muestras:

1. 23-2-656 (Cpos CASPR1+)
2. 23-2-1110 (comprobar positividad Caspr1)

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 1h RT con Goat serum 5% + 0'1% tritón
- Incubar con suero diluído 1/100 en Goat serum 5% + 0'1% tritón: 1h RT
- Incubar con ac anti-Caspr1 diluído 1/100 en Goat serum 5% + 0'1% tritón 1h RT
- Incubar con ac secundarios GAH594 IgG + GAR488 diluídos 1/500 en Goat serum 5% + 0'1% tritón 1h RT
- Montar con Fluoromount

Resultado: la muestra 1110 marca los paranodos, se confirma que es CASPR1+

10/11/2023

✓ **ELISA CASPR1 (screening BD y titulación)**

Muestras:

- 23-2-1145: screening CASPR1
- 23-2-1183: screening CASPR1
- 23-2-1184: screening CASPR1
- 23-2-1110: titulación y subclases 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**:
 - Screening: diluir sueros 1/100 en leche 5% en PBS-tween 0'1%
- Incubar con los sueros 1h a RT
- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
- Ac secundarios:
 - Screening / confirmación: Incubar con **RAH IgG HRP** 1/3000 en leche 5% en PBS-tween 0'1% : 100 ul/pozo, 45 min
- 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	23-2-1184	23-2-1110 1/100	23-2-1110 1/8100	23-2-1110 IgG1							
B blanc	Cneg	23-2-1184	23-2-1110 1/100	23-2-1110 1/8100	23-2-1110 IgG1							
C prot	Cpos CASPR1		23-2-1110 1/300		23-2-1110 IgG2							
D blanc	Cpos CASPR1		23-2-1110 1/300		23-2-1110 IgG2							
E prot	23-2-1145		23-2-1110 1/900		23-2-1110 IgG3							
F blanc	23-2-1145		23-2-1110 1/900		23-2-1110 IgG3							
G prot	23-2-1183		23-2-1110 1/2700		23-2-1110 IgG4							
Hblanc	23-2-1183		23-2-1110 1/2700		23-2-1110 IgG4							

Resultado:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	0,072	0,067	0,398	0,026	0,072							
B blanc	0,052	0,042	0,064	0,029	0,044							
C prot	1,111	0	0,174	0	0,101							
D blanc	0,056	0	0,054	0	0,132							
E prot	0,055	0	0,059	0	0,043							
F blanc	0,036	0	0,042	0	0,039							
G prot	0,045	0	0,051	0	0,072							
Hblanc	0,058	0	0,028	0	0,052							

- 23-2-1145: neg
- 23-2-1183: neg
- 23-2-1184: neg
- 23-2-1110: título CASPR1 1/300, subclases todas negativas!! REPETIR

✓ **ICC Perfil nodales/paranodales BD**

CNTN1, NF140, NF155, NF186 (cels fijadas, suero 1/100)

Muestras y resultado:

- 23-2-1045: neg
- 23-2-1183: panNF+
- 23-2-1184: neg

13/11/2023

✓ ICC co-cultivos médula (día 67 - rata 07/09/2023)

Objetivo: tratar de ver marcaje en los paranodos con muestras Caspr1+

Muestras:

1. IgG 136-8
2. IgG 22-2-374
3. IgG 23-2-554
4. IgG 23-2-656
5. Cneg 201-9 suero

Protocolo cels fijadas: entre cada paso hacer lavados con PBS1x

- Fijar 20min con PFA 4%
- Permeabilizar 10min con **acetona** -20°C
- Bloquear con Goat serum 5%: 30min RT
- Incubar con **IgG 1/5** diluído en Goat serum 5%: overnight 4°C
- Incubar con anticuerpos primarios diluídos en Goat serum 5%: 1h a RT (los pongo juntos)
 - **anti-Caspr1** (ab34151) 1/200
 - **anti-MBP** (808401) 1/200
- Incubar con anticuerpos secundarios **GAH594 IgG + GAR488 + GAM647** diluídos 1/500 en Goat serum 5%: 1h RT
- Montar con Fluoromount

Resultado: aunque el marcaje de MBP y Caspr1 se ve muy bien, no se ven los paranodos con los sueros!! La Acetona deshace el plástico de las placas de 24w, así que mejor usar metanol como hasta ahora.

Repetir haciendo las ICC vivas! Directamente fijar con metanol -20°C 10min (no hace falta fijar primero con PFA4%).

✓ Transformación plásmido B3GAT1

Plásmido B3GAT1 []= 100 ng/ul, 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 3 tubs falcon de bacteris (amb doble tancament) → control positiu, control negatiu, control positiu i B3GAT1
- 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
 - **B3GAT1**: 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 4 plaques (s'han d'atemperar una estona a Tambient):
 - Control **positiu**: 100 µL
 - Control **negatiu**: 100 µL
 - **B3GAT1**: 50 µL, 100 µL
- Incubar tota la nit a 37°C (a l'estufa, plaques boca abaix)

14/11/2023

✓ Starter plàsmid B3GAT1

A primera hora: picar algunes colònies de les plaques amb B3GAT1 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)

15/11/2023

✓ **Maxiprep plàsmido B3GAT1**

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:

- [B3GAT1] = 745 ng/ul

Coating ELISA CASPR1

[CASPR1]_i = 0,789 mg/ml

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

- CASPR1: 36 pozos : [CASPR1]_f = 5 ug/ml : 1,87 ml buffer + 12 ul proteïna

*Hago sólo 36 pozos porque no me queda más proteína!!! Está pendiente de llegar.

Coating ELISA NF155

[NF155]_i = 0,505 mg/ml

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

- NF155: 48 pozos (una placa) : [NF155]_f = 1 ug/ml : 2,5 ml buffer + 5 ul

16/11/2023

- ✓ **ICC Perfil nodales/paranodales BD**

CNTN1, NF140, NF155, NF186 (cels fijadas, suero 1/100)

Muestras y resultado:

- 23-2-1326: neg

17/11/2023

✓ ICC co-cultivos médula (día 71 - rata 07/09/2023, día 21 - rata 27/10/2023)

Objetivo: ver cómo marcan los co-cultivos las muestras de MRVM absorbidas con Doble CNTN1/CASPR1 y con HEKs sin transfectar (absorciones hechas por Elba para su paper). Las absorciones se hicieron a dilución 1/800, y por tanto se ponen directamente en las inmunos.

Muestras: Cubres 1-3 médula rata 07/09/2023. Cubres 4-6 médula rata 27/10/2023

1. MRVM absorb. doble CNTN1-Caspr1
2. MRVM absorb. HEKs sin transfectar
3. Cneg 217-33
4. MRVM absorb. doble CNTN1-Caspr1
5. MRVM absorb. HEKs sin transfectar
6. Cneg 217-33

Protocolo cels fijadas: entre cada paso hacer lavados con PBS1x

- Fijar y permeabilizar 10min con metanol -20°C
- Incubar con sueros absorbidos sin diluir, y con suero Control diluído 1/100 en PBS1x: 2h RT
- Incubar con anticuerpos primarios diluídos en Goat serum 5%: 1h a RT (los pongo juntos)
 - **anti-NFh** 1/300 (ME HE EQUIVOCADO, EN REALIDAD QUERÍA PONER CASPR1)
 - **anti-MBP** (808401) 1/300
- Incubar con anticuerpos secundarios **GAH488 IgG + GAC594 + GAM647** diluídos 1/500 en Goat serum 5%: 1h RT
- Montar con Fluoromount

Resultado:

- Cubres 1-2: MRVM absorbida no marca nada, seguramente porque la absorción se hizo a 1/800
- Cubres 4-6: aún no hay mielina

✓ ICC co-cultivos DRG (día 71 - rata 07/09/2023, día 21 - rata 27/10/2023)

Objetivo: ver cómo marcan los pacientes Caspr1+ en los co-cultivos en vivo. Hacer fotos de marcaje de neuronas DRG en paciente CIDP1 (para la revisión del paper de Retrogenix)

Muestras: Cubres 1-6 co-cultivos DRG 07/09/2023. Cubres 7-12 co-cultivos DRG 27/10/2023

1. CIDP1
2. 136-8
3. 22-2-374
4. 23-2-656
5. 23-2-554
6. Cneg 217-33
7. CIDP1: hechas como neuronas DRG (fijadas con PFA4% 10 min, y directamente ac.secundario, no se contratiñen con nada)
8. Cneg 217-33: hechas como neuronas DRG (fijadas con PFA4% 10 min, y directamente ac.secundario, no se contratiñen con nada)
9. 136-8
10. 22-2-374
11. GDP (CIDP15)
12. Cneg 217-33

Protocolo cels vivas: entre cada paso hacer lavados con PBS1x

- Incubar con sueros diluídos 1/50 en medio NG: 2h 37°C
- Fijar y permeabilizar 10min con metanol -20°C (excepto los cubres 7 y 8, que se permeabilizan con PFA4%)
- Incubar con anticuerpos primarios diluídos en Goat serum 5%: 1h a RT (los pongo juntos)
 - **anti-NFh** 1/300 (ME HE EQUIVOCADO, EN REALIDAD QUERÍA PONER CASPR1)
 - **anti-MBP** (808401) 1/300
- Incubar con anticuerpos secundarios **GAH488 IgG + GAC594 + GAM647** diluídos 1/500 en Goat serum 5%: 1h RT
- Montar con Fluoromount

Resultado:

- Los co-cultivos del día 07/09 tienen demasiadas células y ya no se ven demasiado bien.
- En los co-cultivos del día 27/10/2023 todavía hay muy poca mielina.
- La muestra CIDP1 no marca prácticamente nada ni en el cubre 1 ni en el 7. Marca igual que el control negativo.

- Las muestras Caspr1+ marcan mucho todo

✓ Descongelar células de Schwann humanas

Descongeló 1 vial de **células de Schwann humanas** (línea comercial 1700, ScienceCell) en 1 placa de 100mm con gelatina 0,15%

- **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)

20/11/2023

✓ ELISA CASPR1 y NF186 (titulación y subclases)

Muestras:

- 23-2-1110: subclases CASPR1
- 23-2-1183: muestra panNF+. Titulación y subclases NF155, y confirmación 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**:
 - 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 a RT
- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
- Ac secundarios:
 - Titulación / screening / confirmación: Incubar con **RAH IgG HRP** 1/3000 en leche 5% en PBS-tween 0'1% : 100 ul/pozo, 45 min
 - Subclases: Incubar con **MAH HRP*** IgG1 o IgG2 o IgG3 o IgG4 **1/500** en leche 5% en PBS-tween 0'1%: 100 ul/pozo, 45 min
- 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	23-2-1110 IgG1	Cneg IgG4	Cneg	23-2-1183 1/900	23-2-1183 IgG1	Cneg						
B blanc	23-2-1110 IgG1	Cneg IgG4	Cneg	23-2-1183 1/900	23-2-1183 IgG1	Cneg						
C prot	23-2-1110 IgG2	Cpos CASPR1 22-2-374 IgG3	Cpos NF155 IgGtot	23-2-1183 1/2700	23-2-1183 IgG2	Cpos NF186						
D blanc	23-2-1110 IgG2	Cpos CASPR1 22-2-374 IgG3	Cpos NF155 IgGtot	23-2-1183 1/2700	23-2-1183 IgG2	Cpos NF186						
E prot	23-2-1110 IgG3	Cpos CASPR1 22-2-374 IgG4	23-2-1183 1/100	23-2-1183 1/8100	23-2-1183 IgG3	23-2-1183						
F blanc	23-2-1110 IgG3	Cpos CASPR1 22-2-374 IgG4	23-2-1183 1/100	23-2-1183 1/8100	23-2-1183 IgG3	23-2-1183						
G prot	23-2-1110 IgG4		23-2-1183 1/300	23-2-1183 1/24300	23-2-1183 IgG4							
Hblanc	23-2-1110 IgG4		23-2-1183 1/300	23-2-1183 1/24300	23-2-1183 IgG4							

CASPR1

NF155

NF186

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	0,037	0,141	0,053	0,082	0,036	0,057						
B blanc	0,013	0,015	0,011	0,01	0,013	0,043						
C prot	0,018	0,063	1,081	0,016	0,014	0,712						
D blanc	0,025	0,014	0,036	0,009	0,011	0,029						
E prot	0,014	0,214	0,255	0,014	0,013	0,925						
F blanc	0,016	0,042	0,03	0,013	0,011	0,068						
G prot	0,037		0,079	0,011	0,54							
Hblanc	0,041		0,021	0,022	0,039							

Resultado:

- 23-2-1110: subclases CASPR1 no salen!!!: repetir!!
 - Me sorprende que la Bocanegra (22-2-374) sea muy poco positiva por IgG4.
- 23-2-1183: título NF155 1/900, subclase predominante IgG4. NF186 claramente positiva: repetir titulación con NF186!!

23/11/2023

✓ ICC Perfil nodales/paranodales BD

CNTN1, NF140, NF155, NF186 (cels fijadas, suero 1/100)

Muestras y resultado:

- 23-2-1327: neg
- 23-2-1328: neg
- 23-2-1329: neg

También hago ELISA de CASPR1 en Immuno y es todo negativo (muestra 23-2-1326 también)

24/11/2023

✓ Nervio ciático de cerdo

Extraigo nervio ciático de cerdo para hacer teasing:

- Fijar 1h con PFA2% en agitación y hielo
- Lavar 3x15min con PBS1x (en agitación y hielo)
- Hacer teasing durante 1 hora: hacemos 13 portaobjetos

✓ ICC Caspr1 y Doble CNTN1/Caspr1

Muestras:

- 23-409048: muestra CASPR1+ por ELISA
- Cneg
- Cpos 136-8

Protocolo: cels fijada, entre cada paso hacer 3 lavados con PBS1x

- Bloquear 1h RT con Goat serum 5%
- Incubar con sueros diluído 1/100 en Goat serum 5%: 1h RT
- Incubar con ac anti-Caspr1 (ab34151) diluído 1/200 en Goat serum 5%
- Incubar con ac secundarios GAH594 IgG + GAR488 diluídos 1/500 en Goat serum 5%
- Montar con Fluoromount

Resultado: la ICC no sale bien... hay mucho cruce de canal y todas las muestras parecen positivas. Revisar transfección y repetir.

✓ IHC teasing nervio ciático rata y cerdo

Muestras:

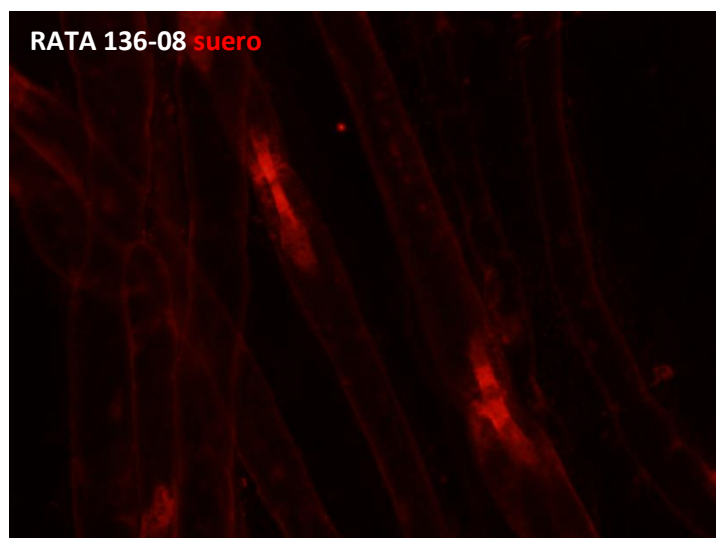
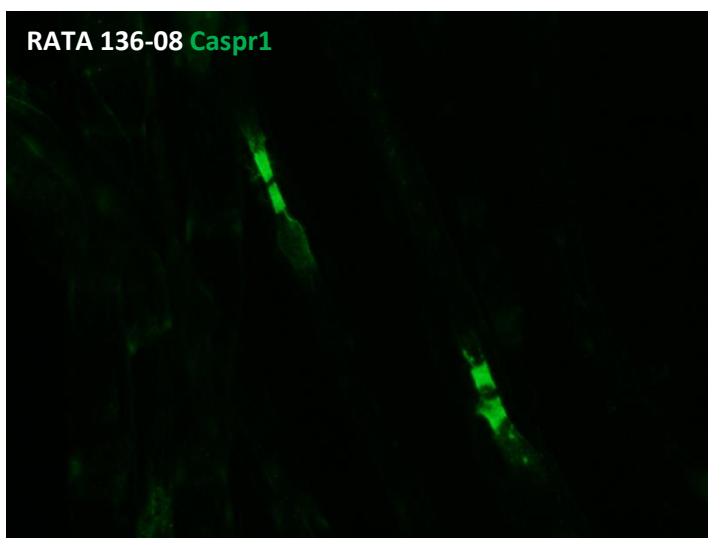
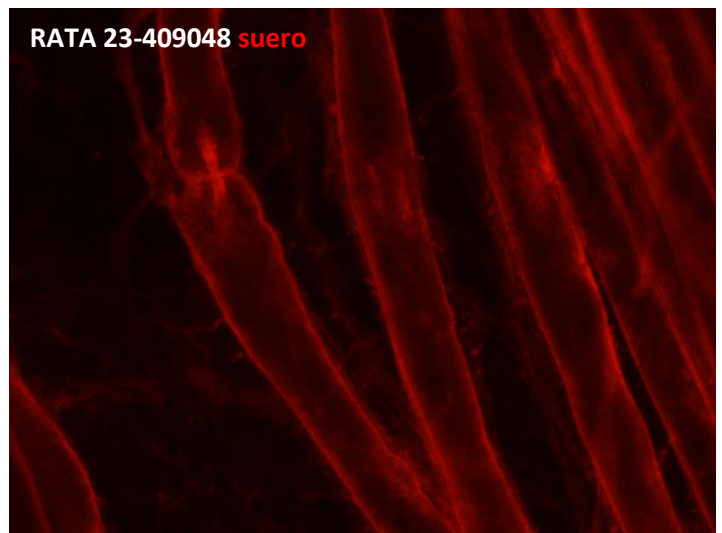
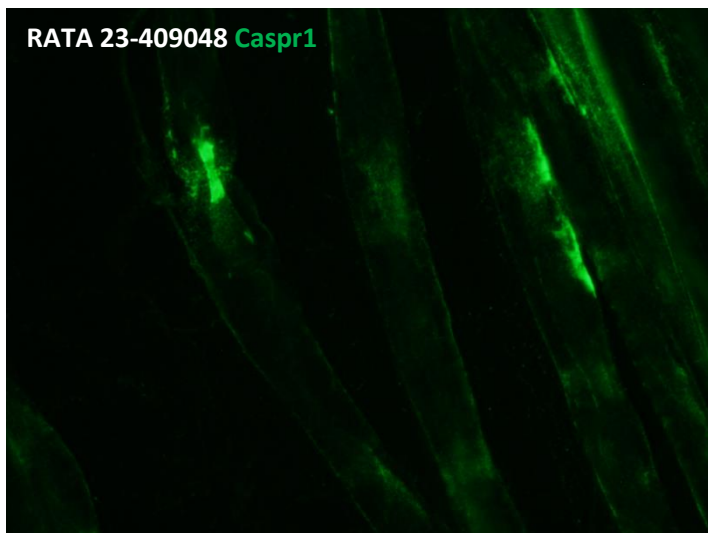
1. Nervio ciático rata: antiguos
 - 23-409048: comprobar positividad CASPR1
 - Cpos 136-8
2. Nervio ciático cerdo: antiguos
 - 23-409048: comprobar positividad CASPR1
 - Cneg

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 1h RT con Goat serum 5% + 0'1% tritón
- Incubar con suero diluído 1/100 en Goat serum 5% + 0'1% tritón: 1h RT
- Incubar con ac anti-Caspr1 (ab34151) diluído 1/200 en Goat serum 5% + 0'1% tritón 1h RT
- Incubar con ac secundarios GAH594 IgG + GAR488 diluídos 1/500 en Goat serum 5% + 0'1% tritón 1h RT
- Montar con Fluoromount

Resultado:

3. Nervio ciático rata:
 - 23-409048: marcaje paranodos
 - Cpos 136-8: marcaje paranodos
4. Nervio ciático cerdo: no está demasiado bien... se ven pocos paranodos y pequeños
 - 23-409048: marcaje paranodos
 - Cneg: no marca nada



27/11/2023

✓ ELISA NF186 (titulación y subclases)

Muestras:

- 23-2-1183: muestra panNF+. Titulación y subclases NF186
- Cneg 217-30
- Cpos RDP

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 a RT
- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
- Ac secundarios:
 - Titulación / screening / confirmación: Incubar con **RAH IgG HRP** 1/3000 en leche 5% en PBS-tween 0'1% : 100 ul/pozo, 45 min
 - Subclases: Incubar con **MAH HRP*** IgG1 o IgG2 o IgG3 o IgG4 **1/500** en leche 5% en PBS-tween 0'1%: 100 ul/pozo, 45 min
- 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	23-2-1183 1/900	23-2-1183 IgG1									
B blanc	Cneg	23-2-1183 1/900	23-2-1183 IgG1									
C prot	Cpos NF186	23-2-1183 1/2700	23-2-1183 IgG2									
D blanc	Cpos NF186	23-2-1183 1/2700	23-2-1183 IgG2									
E prot	23-2-1183 1/100	23-2-1183 1/8100	23-2-1183 IgG3									
F blanc	23-2-1183 1/100	23-2-1183 1/8100	23-2-1183 IgG3									
G prot	23-2-1183 1/300	23-2-1183 1/24300	23-2-1183 IgG4									
Hblanc	23-2-1183 1/300	23-2-1183 1/24300	23-2-1183 IgG4									

Resultado:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	0,075	0,349	0,186									
B blanc	0,092	0,054	0,041									
C prot	0,839	0,165	0,24									
D blanc	0,097	0,048	0,152									
E prot	0,954	0,105	0,091									
F blanc	0,098	0,063	0,067									
G prot	0,984	0,071	0,965									
Hblanc	0,066	0,056	0,058									

- 23-2-1183: título NF186 1/2700. Subclase predominante IgG4 >> IgG1

✓ IHC teasing nervio ciático cerdo

Muestras: uso portaobjetos preparados el día 24/11/2023

1. 23-409048 (23-2-1331)
2. 23-2-554
3. 23-2-1110
4. Cpos CNTN1+
5. Cneg 217-30
6. Cneg 217-31

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 1h RT con Goat serum 5% + 0'1% tritón
- Incubar con suero diluído 1/100 en Goat serum 5% + 0'1% tritón: 1h RT
- Incubar con ac anti-panNF diluído 1/200 en Goat serum 5% + 0'1% tritón 1h RT
- Incubar con ac secundarios GAH594 IgG + GAC488 diluídos 1/500 en Goat serum 5% + 0'1% tritón 1h RT
- Montar con Fluoromount

Resultado: este teasing no está demasiado bien... hay muy pocos paranodos y son muy muy pequeños

1. 23-409048 (23-2-1331): marcaje paranodos
2. 23-2-554: marcaje paranodos
3. 23-2-1110: marcaje paranodos
4. Cpos CNTN1+: marcaje paranodos
5. Cneg 217-30: negativo
6. Cneg 217-31: negativo

Coating ELISA CASPR1

[CASPR1]_i = 0,381mg/ml

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

- CASPR1: 3 placas (144 pozos) : [CASPR1]_f = 5 ug/ml : 7,3 ml buffer + 95,8 ul proteína

1 placa la uso al día siguiente (sin congelar)

2 placas las dejo incubar 2 días en agitación en la cámara fría, el día 29/11 las bloqueo y las congelo. Uso una placa el día 30/11 en Immuno y los controles positivos salen mucho mejor que en la placa incubada con la proteína sólo1 noche.

Coating Poly-D.Lys (culture slides)

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

28/11/2023

✓ ELISA CASPR1 (titulación y subclases)

Muestras:

- 23-2-1110: titulación y subclases CASPR1
- 23-409048 (23-2-1331): titulación y subclases CASPR1
- 136-8: subclases CASPR1
- 22-2-374: subclases 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 a RT
- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
- Ac secundarios:

- Titulación / screening / confirmación: Incubar con **RAH IgG HRP** 1/3000 en leche 5% en PBS-tween 0'1% : 100 ul/pozo, 45 min
- Subclases: Incubar con **MAH HRP*** IgG1 o IgG2 o IgG3 o IgG4 **1/500** en leche 5% en PBS-tween 0'1%: 100 ul/pozo, 45 min
- 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	23-2-1110 1/100	23-2-1110 1/8100	23-2-1331 1/900	23-2-1110 IgG1	23-2-1331 IgG1	136-8 IgG1	22-2-374 IgG1	136-8 IgGtot				
B blanc	23-2-1110 1/100	23-2-1110 1/8100	23-2-1331 1/900	23-2-1110 IgG1	23-2-1331 IgG1	136-8 IgG1	22-2-374 IgG1	136-8 IgGtot				
C prot	23-2-1110 1/300	23-2-1110 1/24300	23-2-1331 1/2700	23-2-1110 IgG2	23-2-1331 IgG2	136-8 IgG2	22-2-374 IgG2	22-2-374 IgGtot				
D blanc	23-2-1110 1/300	23-2-1110 1/24300	23-2-1331 1/2700	23-2-1110 IgG2	23-2-1331 IgG2	136-8 IgG2	22-2-374 IgG2	22-2-374 IgGtot				
E prot	23-2-1110 1/900	23-2-1331 1/100	23-2-1331 1/8100	23-2-1110 IgG3	23-2-1331 IgG3	136-8 IgG3	22-2-374 IgG3	Cneg IgGtot				
F blanc	23-2-1110 1/900	23-2-1331 1/100	23-2-1331 1/8100	23-2-1110 IgG3	23-2-1331 IgG3	136-8 IgG3	22-2-374 IgG3	Cneg IgGtot				
G prot	23-2-1110 1/2700	23-2-1331 1/300	23-2-1331 1/24300	23-2-1110 IgG4	23-2-1331 IgG4	136-8 IgG4	22-2-374 IgG4					
Hblanc	23-2-1110 1/2700	23-2-1331 1/300	23-2-1331 1/24300	23-2-1110 IgG4	23-2-1331 IgG4	136-8 IgG4	22-2-374 IgG4					

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	0,078	0,042	0,136	0,188	0,177	0,596	0,936	0,681				
B blanc	0,036	0,046	0,063	0,108	0,152	0,144	0,148	0,053				
C prot	0,055	0,041	0,099	0,132	0,274	0,129	0,157	0,837				
D blanc	0,069	0,039	0,064	0,092	0,13	0,11	0,158	0,057				
E prot	0,053	0,56	0,067	0,035	-0,02	0,086	0,06	0,064				
F blanc	0,057	0,051	0,049	0,04	0,225	0,038	0,028	0,055				
G prot	0,063	0,272	0,059	0,065	0,143	0,25	0,192					
Hblanc	0,043	0,034	0,051	0,025	0,051	0,03	0,046					

Resultado: El ELISA no ha salido muy alto (en el ELISA del 10/11/2023 el C+ 136-8 salió 1,1 con IgG totales, y en este ha salido 0,681... así que todo estará un poco más bajo). Además, compro un nuevo anticuerpo IgG4 porque sale muy bajo (a partir de ahora alicuotar y guardar a -20, no ir sacando cada vez el mismo tubo)

- 23-2-1110: no salen ni las subclases ni la titulación... envío informe como título 1/300 (titulación hecha el día 10/11/2023), y subclase IgG4 → **REPETIR igualmente**
- 23-409048 (23-2-1331): título CASPR1 1/900, subclases predominantes: IgG2, IgG4

- 136-8: subclases IgG1, IgG4 → debería salir también IgG3!!!
- 22-2-374: subclases IgG1, IgG4 → debería salir también IgG3!!

*Marta ha hecho ELISA de subclases de CNTN1 la semana anterior y le salen dos pacientes claramente IgG3, así que el anticuerpo secundario funciona bien. Repetir todo este ELISA sacando alícuotas nuevas de todos los sueros (probar de hacerlo en las placas antiguas y sin congelar, ya que en el paper de Elba salían las OD de los Caspr1 mucho más altas). Concentrar más el anticuerpo RAHIgGtotales.

Coating células + transfección Culture slides

12 culture slides:

- 10 Perfil
- 2: 4 pocillos Caspr1, y 4 pocillos Doble CNTN1/Caspr1

Protocolo:

- Preparar mezclas transfección cada culture slide (8 pozos)
 - 2 ug DNA + 40 ul Optimem
 - Doble CNTN1/Caspr1: 1,4 ug CNTN1 + 0,8 ug Caspr1
 - 3,2 ul MACSfectin + 40 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 10 ul de mezcla de transfección a cada pozo

30/11/2023

Recoger culture slides

En este caso se han dejado transfectando durante 2 días en vez de 1 día. Se fijan todos los culture slides menos 1 de Caspr1 y doble CNTN1/Caspr1

- Quitar medio
- Fijar PFA4% 10 min
- Quitar PFA y lavar con PBS1x
- Quitar los pozos del culture slide
- Congelar a -80°C

· ICC CASPR1 y doble CNTN1/CASPR1

*Se usan dos portas transfectados durante 2 días (uno para hacer ICC en cels vivas y otro para hacer ICC en cels fijadas)

Muestras:

1. 23-2-1110
2. 23-2-1331
3. 136-8
4. Cneg

Protocolo cels vivas: se hacen lavados con PBS1x entre cada paso. No pongo anticuerpo comercial porque así no hay cruce de canales

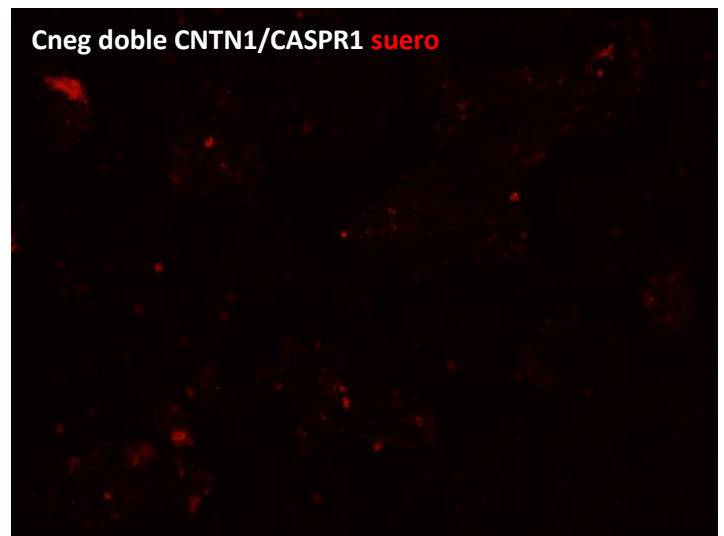
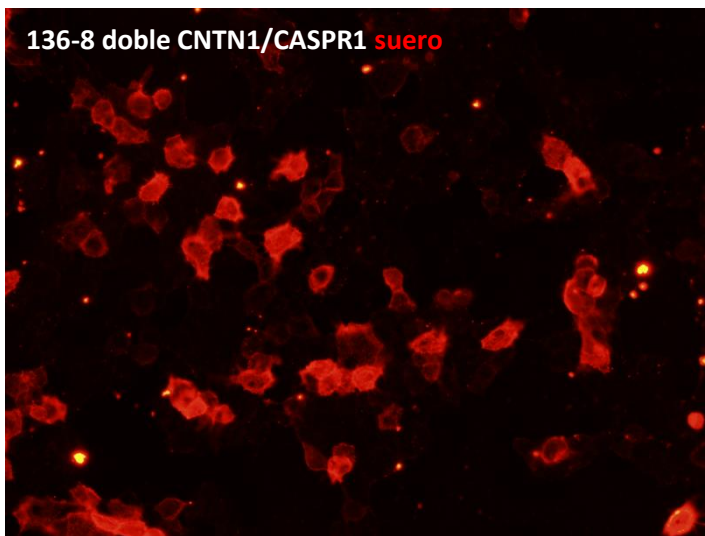
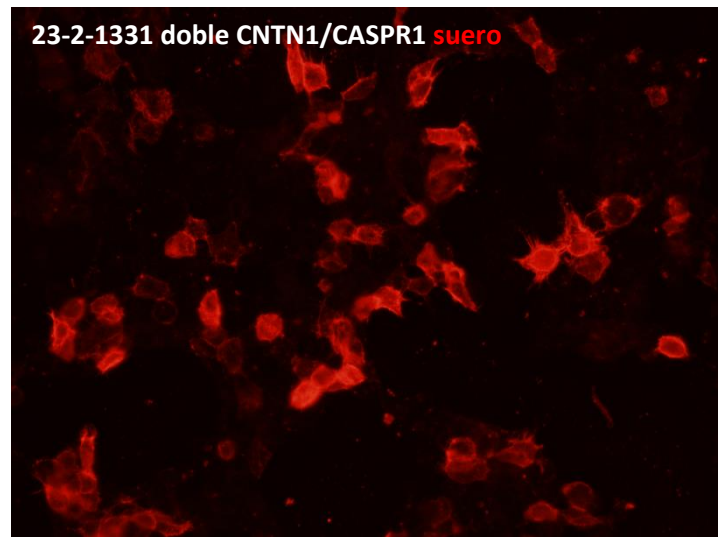
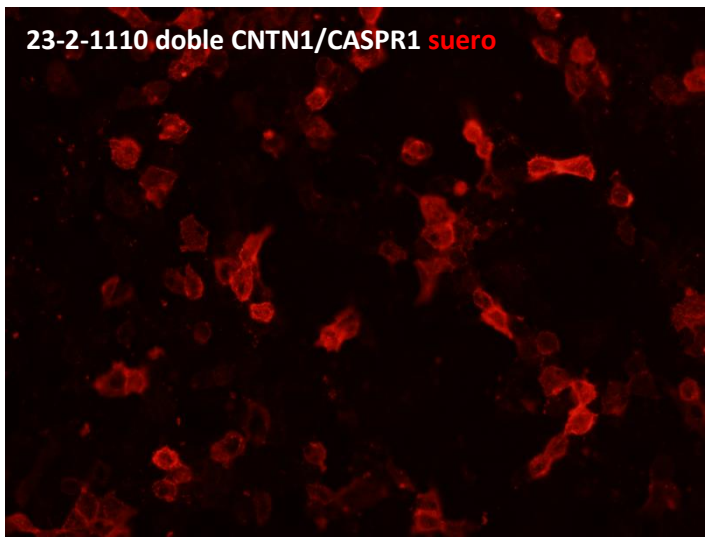
- Incubar con **suero** 1/100 diluïdos en medio HEK293: 1h a 37°C
- Fijar 10min con PFA 4%
- Bloquear con Goat serum 5%: 1h RT
- Incubar con anticuerpos secundario **GAH594IgG** diluïdo 1/500 en Goat serum 5%: 1h RT
- Montar con Fluoromount

Protocolo cels fijadas:

- Fijar 10min con PFA 4%
- Bloquear con Goat serum 5%: 30min RT
- Incubar con **suero** 1/100 diluïdo en Goat serum 5%: 1h a RT
- Incubar con anticuerpo anti-CASPR1(ab34151) diluïdo 1/1000 en Goat serum 5%: 1h a RT
- Incubar con anticuerpos secundarios **GAH594IgG + GAR488** diluïdos 1/500 en Goat serum 5%: 1h RT
- Montar con Fluoromount

Resultado: la immuno en cls vivas ha salido muy bien (importante no poner anticuerpo comercial!!!), se ve muy claramente la positividad. En cambio, en las cels fijadas no se distinguen tan bien los positivos de los negativos (aunque también ha salido)

1. 23-2-1110: Caspr1 neg, doble CNTN1/Caspr1 pos
2. 23-2-1331: Caspr1 neg, doble CNTN1/Caspr1 pos
3. 136-8: Caspr1 neg, doble CNTN1/Caspr1 pos
4. Cneg: todo negativo



01/12/2023

✓ Congelación nervio ciático cerdo

Congelamos nervio ciático de cerdo de 4 maneras diferentes (para hacer cortes):

- 2 eppendorfs sin OCT
 - 1 eppendorf: trozo longitudinal
 - 1 eppendorf: trozo transversal
- 2 trozos con OCT en molde:
 - 1 trozo longitudinal
 - 1 transversal

En los 4 trozos, las condiciones fueron las mismas: congelación con metilbutano (en la máquina que usan en Anatomía Patológica)

04/12/2023

✓ ICC Perfil nodales/paranodales BD

CNTN1, NF140, NF155, NF186 (cels fijadas, suero 1/100)

9 Culture slides transfectados día 28/11/23

Muestras y resultado: muestras Milán (Eduardo Noville-Orazio) para revisión de un paper

- 1) 23-2-1355: **NF155+**
- 2) 23-2-1356: neg
- 3) 23-2-1357: neg
- 4) 23-2-1358: neg
- 5) 23-2-1359: neg
- 6) 23-2-1360: neg
- 7) 23-2-1361: neg
- 8) 23-2-1362: neg
- 9) 23-2-1363: neg
- 10) 23-2-1364: neg
- 11) 23-2-1365: neg
- 12) 23-2-1366: neg
- 13) 23-2-1367: neg
- 14) 23-2-1368: neg
- 15) 23-2-1369: neg
- 16) 23-2-1370: neg
- 17) 23-2-1371: neg
- 18) 23-2-1372: neg

✓ ELISA CASPR1 (screening y prueba subclases)

Muestras: muestras Milán (Eduardo Noville-Orazio) para revisión de un paper

- 1) 23-2-1355
- 2) 23-2-1356
- 3) 23-2-1357
- 4) 23-2-1358
- 5) 23-2-1359
- 6) 23-2-1360
- 7) 23-2-1361
- 8) 23-2-1362
- 9) 23-2-1363
- 10) 23-2-1364
- 11) 23-2-1365
- 12) 23-2-1366
- 13) 23-2-1367
- 14) 23-2-1368
- 15) 23-2-1369
- 16) 23-2-1370
- 17) 23-2-1371
- 18) 23-2-1372
- 136-8 (MRVM Caspr1+ caja Caspr1 Cinta): IgGtot y subclases
- CIDP78 (misma muestra que anterior pero de la caja de CIDP): IgGtot y subclases

Protocolo: uso placa de CASPR1 coating 27/11/2023 dejada 2 días en agitación con la proteína. Congelada día 29/11/2023

- 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**:
 - Subclases y screening: diluir sueros 1/100 en leche 5% en PBS-tween 0'1%
- Incubar con los sueros 1h a RT
- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
- Ac secundarios:
 - Titulación / screening / confirmación: Incubar con **RAH IgG HRP** 1/3000 en leche 5% en PBS-tween 0'1% : 100 ul/pozo, 45 min
 - Subclases: Incubar con **MAH HRP*** IgG1 o IgG2 o IgG3 o IgG4 **1/500** en leche 5% en PBS-tween 0'1%: 100 ul/pozo, 45 min
- 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	23-2-1355	23-2-1359	23-2-1363	23-2-1367	23-2-1371	136-8 IgG1	CIDP78 IgG1					
B blanc	23-2-1355	23-2-1359	23-2-1363	23-2-1367	23-2-1371	136-8 IgG1	CIDP78 IgG1					
C prot	23-2-1356	23-2-1360	23-2-1364	23-2-1368	23-2-1372	136-8 IgG2	CIDP78 IgG2					
D blanc	23-2-1356	23-2-1360	23-2-1364	23-2-1368	23-2-1372	136-8 IgG2	CIDP78 IgG2					
E prot	23-2-1357	23-2-1361	23-2-1365	23-2-1369	136-8 IgG tot	136-8 IgG3	CIDP78 IgG3					
F blanc	23-2-1357	23-2-1361	23-2-1365	23-2-1369	136-8 IgG tot	136-8 IgG3	CIDP78 IgG3					
G prot	23-2-1358	23-2-1362	23-2-1366	23-2-1370	CIDP78 IgG tot	136-8 IgG4	CIDP78 IgG4					
Hblanc	23-2-1358	23-2-1362	23-2-1366	23-2-1370	CIDP78 IgG tot	136-8 IgG4	CIDP78 IgG4					

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	0,006	0,007	0,006	0,006	0,019	0,575	0,475					
B blanc	0,019	0,039	0,013	0,029	0,026	0,007	0,016					
C prot	0,014	0,014	0,007	0,009	0,011	0,13	0,112					
D blanc	0,013	0,049	0,01	0,028	0,012	0,081	0,075					
E prot	0,008	0,026	0,006	0,01	0,882	0,061	0,042					
F blanc	0,011	0,046	0,023	0,058	0,017	0,006	0,007					
G prot	0,009	0,01	0,008	0,018	0,849	0,519	0,448					
Hblanc	0,018	0,008	0,01	0,022	0,039	0,01	0,009					

Resultados:

- Todas las muestras de Milán son CASPR1 negativas
- 136-8 y CIDP78 tienen exactamente los mismos resultados: IgG1, IgG4: es raro porque en el paper de Elba y en el Interlab validation la muestra de MRVM dio también IgG3... y ahora no sale. El anticuerpo secundario IgG3 sí que funciona porque Marta lo ha comprobado con sus CNTN1+, así que debe ser que al congelar-descongelar el suero tantas veces, las IgG3 se pierden. De todos modos, haré ICC de doble CNTN1/Caspr1 con los anticuerpos de subclases.

✓ Coating células + transfección Culture slides (prueba lipofectamina 3000)

2 culture slides perfil: hago una prueba con **Lipofectamina 3000** que tenemos en la nevera (aunque caducada desde 2020).

A la vez hago transfección de perfiles para Immuno (con el protocolo habitual de MACSfectin) y así puedo comparar las dos transfecciones.

Protocolo:

- Preparar mezclas transfección cada culture slide (8 pozos)
 - 2 ug DNA + 40 ul Optimem + 4ul de P3000*
 - *En el protocolo de la lipofectamina 3000 pone que hay que añadir 2ul del producto **P3000** cada ug de DNA.
 - 3,2 ul lipofectamina3000 + 40 ul Optimem
- Juntar y dejar reposar mínimo 15 minutos
- Poner 300 ul de medio HEK a cada pozo
- Poner 120.000 cels (HEK293) a cada pozo
- Poner 10 ul de mezcla de transfección a cada pozo

Coating Poly-D.Lys (culture slides)

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

05/12/2023

Recoger culture slides

- Quitar medio
- Fijar PFA4% 10 min

- Quitar PFA y lavar con PBS1x
- Quitar los pozos del culture slide
- Congelar a -80°C: en este caso uso uno de los dos culture slides en immuno para comprobar que ha salido bien la transfección con lipo3000 → **HA SALIDO BIEN LA TRANSFECCIÓN CON LIPOFECTAMINA 3000**

✓ Coating células + transfección Culture slides

6 culture slides:

- Todos: doble CNTN1/CASPR1

Protocolo:

- Preparar mezclas transfección cada culture slide (8 pozos)
 - 2 ug DNA + 40 ul Optimem
 - Doble CNTN1/Caspr1: 1,4 ug CNTN1 + 0,8 ug Caspr1
 - 3,2 ul MACSfectin + 40 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 10 ul de mezcla de transfección a cada pozo

✓ Congelación PBMC (NHC E2119272)

4 tubos CPT de **Olga Martín Fernández (E2119272)**: CASPR1+ pretratamiento del Hospital de Navarra (los tubos llegan el día 04/12/2023).

- 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 sacaron los tubos el viernes 01/12/2023 y hasta el 04/12/2023 no llegan al laboratorio así que estuvieron varios días sin centrifugar.**
- 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)
- Decantar el sobrenadante a un tubo y lavar con suero fisiológico 1:1
- Centrifugar 300g 5min
- Resuspender en suero fisiológico y contar las células: 60 millones
- Centrifugar 300g 5min
- Congelar en FBS+10%DMSO: 10 viales de aprox 6 millones/vial (1 ml de FBS+DMSO): **23-7-1384, Box PBMC 2-F2 a G2**

07/12/2023

✓ ICC Perfil nodales/paranodales BD

CNTN1, NF140, NF155, NF186 (cels fijadas, suero 1/100, LCR 1/10)

1 culture slide Immuno

Objetivo: comprobar positividad NF155 muestra Milán. Comprobar positividad CNTN1 LCR Immuno.

Muestras y resultado:

- 23-2-1355: NF155 positivo débil
- LCR 23-417002: CNTN1 neg (hago la CNTN1 sin anticuerpo comercial para evitar cruce de canales).

✓ ELISA NF155 (confirmación positividad y subclases)

Muestras:

- 23-2-1355: comprobar positividad NF155 y subclases

Protocolo:

- Bloquear con leche 5% en PBS-tween 0'1% : 200 ul pozo (incubar 1h a temp. ambiente)
 - En este caso se usa placa bloqueada y congelada el día 22/06/2023
- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
- Diluir los **sueros**:
 - Subclases y screening: diluir sueros 1/100 en leche 5% en PBS-tween 0'1%
- Incubar con los sueros 1h a RT
- Lavar 3 veces con PBS-tween 0'1%
- Ac secundarios:
 - Titulación / screening / confirmación: Incubar con **RAH IgG HRP 1/2000** en leche 5% en PBS-tween 0'1% : 100 ul/pozo, 45 min
 - Subclases: Incubar con **MAH HRP IgG1 o IgG2 o IgG3 o IgG4 1/500** en leche 5% en PBS-tween 0'1%: 100 ul/pozo, 45 min
- 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	23-2-1355 IgG1										
B blanc	Cneg	23-2-1355 IgG1										
C prot	Cpos NF155	23-2-1355 IgG2										
D blanc	Cpos NF155	23-2-1355 IgG2										
E prot	23-2-1355 IgGtot	23-2-1355 IgG3										
F blanc	23-2-1355 IgGtot	23-2-1355 IgG3										
G prot		23-2-1355 IgG4										
Hblanc		23-2-1355 IgG4										

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A prot	0,059	0,046										
B blanc	0,043	0,042										
C prot	0,256	0,144										
D blanc	0,101	0,161										
E prot	0,313	0,025										
F blanc	0,142	0,033										
G prot	0,027	0,15										
Hblanc	0	0,065										

Resultado: aunque el ELISA en general ha salido muy bajito (el C+ tiene una OD muy baja), lo damos por bueno por la prisa que hay en entregar los resultados.

- **23-2-1355:** NF155+, Subclase IgG4

✓ IHC teasing nervio ciático rata y cerdo

Muestras:

1. Nervio ciático rata: antiguos
 - 23-2-1355: comprobar positividad NF155
 - Cneg
2. Nervio ciático cerdo: hechos día 01/12/2023
 - 23-2-1355: comprobar positividad NF155
 - 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 1h RT con Goat serum 5% + 0'1% tritón
- Incubar con suero diluído 1/100 en Goat serum 5% + 0'1% tritón: 1h RT
- Incubar con ac anti-panNF diluído 1/500 en Goat serum 5% + 0'1% tritón 1h RT

- Incubar con anticuerpos secundarios:
 - IgG totales: **GAH594IgG** 1/500 en Goat serum 5%: 1h RT
 - Subclases: **MAH488 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4** 1/200 en Goat serum 5%: 1h RT
- Montar con Fluoromount

Resultado:

- Todas las muestras de Italia son negativas
- **IgG totales:**
 - Cneg: neg
 - 22-2-374: pos
 - 23-2-554: pos débil
 - 23-2-656: pos
 - 23-2-1110: pos
 - 23-2-1331: pos
- **Subclases:** en general se ve todo muy bajo, y no se pueden determinar bien las subclases con estos Ac secundarios
 - 23-2-554: no se ve claro
 - 23-2-656: parece IgG3
 - 23-2-1110: no se ve claro
 - 23-2-1331: parece IgG2
 - 136-8: IgG3 clarísimo
 - 22-2-374: parece IgG1

11/12/2023

Coating ELISA CASPR1

[CASPR1]_i = 0,381mg/ml

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

- CASPR1: 2 placas (96 pozos) : [CASPR1]_f = 5 ug/ml : 4,9 ml buffer + 64,3 ul proteína

✓ ICC co-cultivos DRG y médula (día 45 - rata 27/10/2023 - incubación sueros 24h)

Objetivo: Mismas muestras en 4 tipos de experimentos diferentes (se ponen en posts diferentes para que quede más claro)

- a) **Co-cultivos médula: incubación sueros 24h**
- b) **Co-cultivos DRG: incubación sueros 24h**
- c) Co-cultivos DRG: incubación sueros 72h (cada día voy añadiendo suero nuevo)
- d) Co-cultivos DRG: incubación sueros 1 semana (sólo lo hago con las muestras 1 a 6, cada día voy añadiendo suero nuevo)

Muestras:

- | | |
|------------------------------|------------------------------|
| 1. Cneg 200-2 | 7. CNTN1+ 21-2-94 |
| 2. Cneg 204-11 | 8. CNTN1+ 22-2-854 |
| 3. NF155+ 212-14 (Morón) | 9. panNF+ 23-2-82 Box 318 |
| 4. NF155+ 216-17 (De Haro) | 10. panNF+ 23-2-1183 |
| 5. CASPR1+ 136-8 (Vinuesa) | 11. NF186+ 22-2-1027 Box 312 |
| 6. CASPR1+ 23-2-656 (Blanco) | |

Protocolo cels vivos: entre cada paso hacer lavados con PBS1x

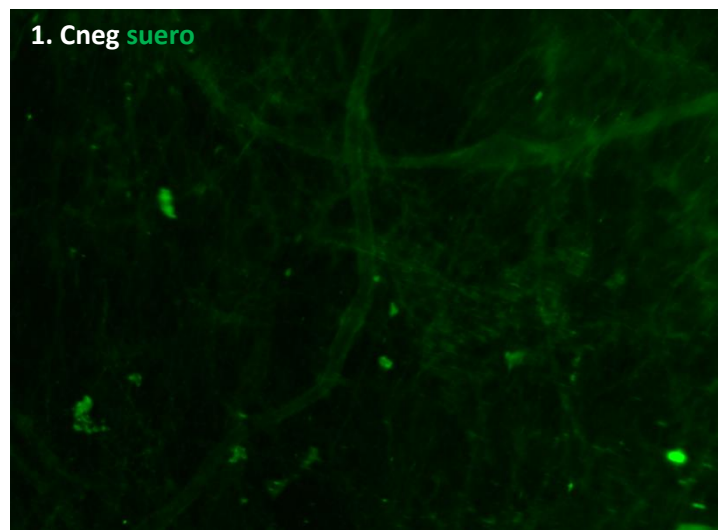
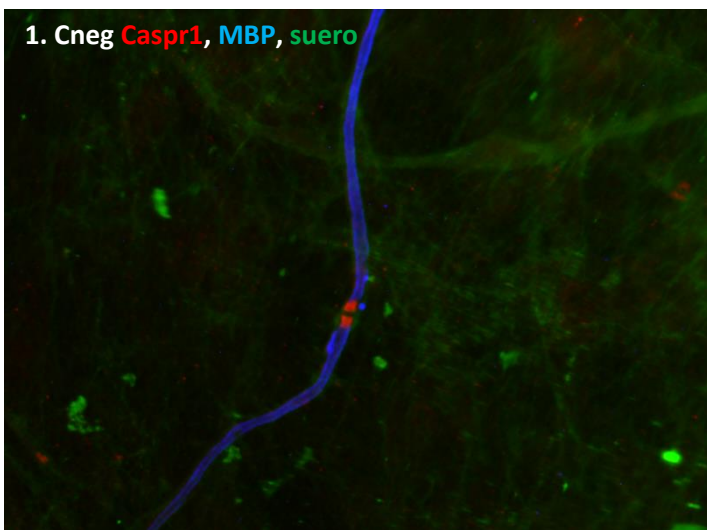
- Incubar con sueros diluídos 1/100 en medio NG a 37°C (preparo 4 en 400 ul)
 - Para añadir suero cada 24h: preparo 4ul de suero en 200ul de medio NG, quito 200ul de medio NG de las células y pongo los nuevos 200ul.
- Fijar con PFA4% 20min
- Permeabilizar 10min con metanol -20°C
- Incubar con anticuerpos primarios diluídos en Goat serum 5%: 2h a RT (los pongo juntos)
 - Muestras impares:
 - **anti-Caspr1** (ab34151) 1/300
 - **anti-MBP** (808401) 1/300

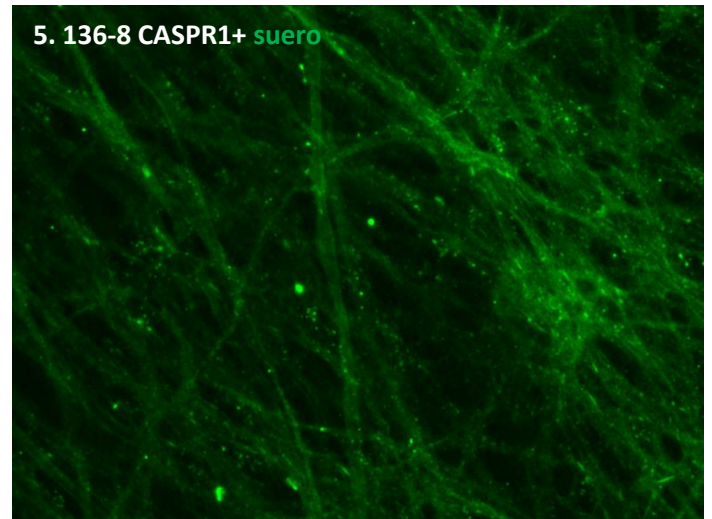
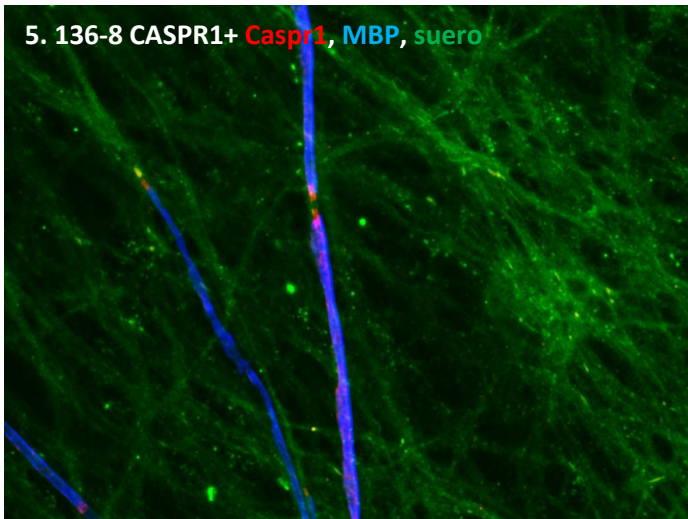
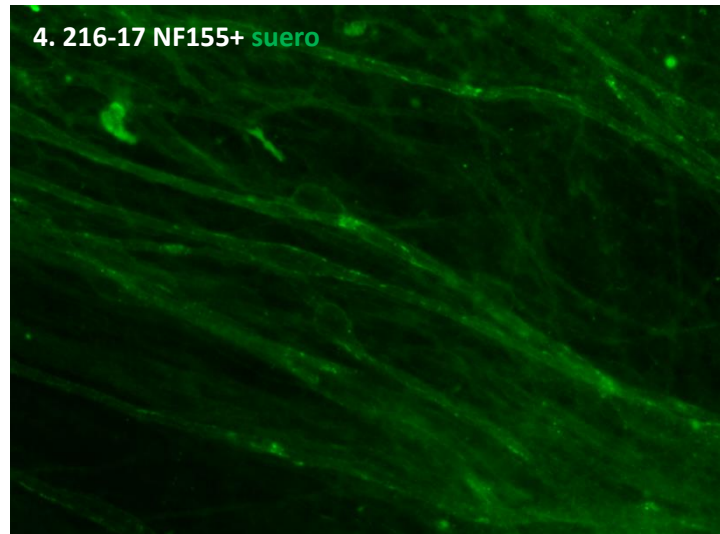
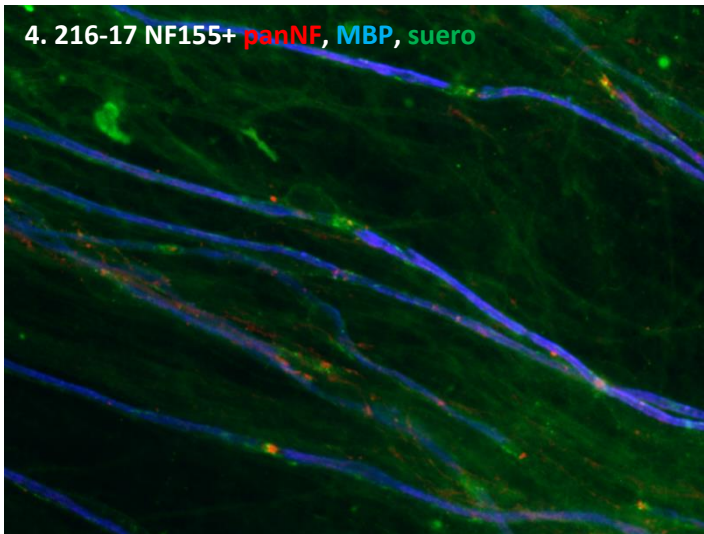
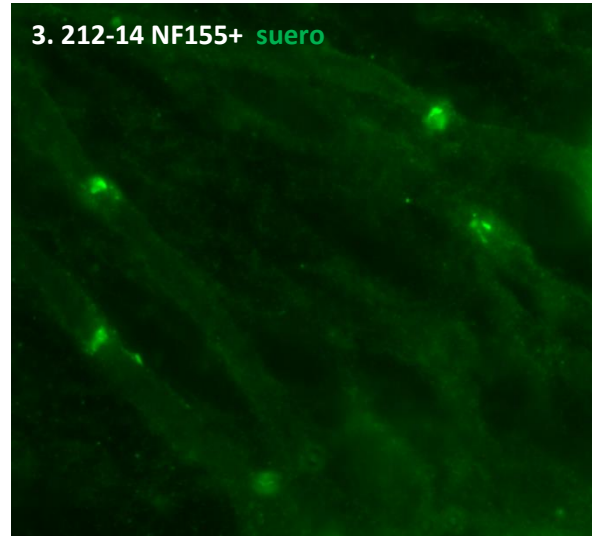
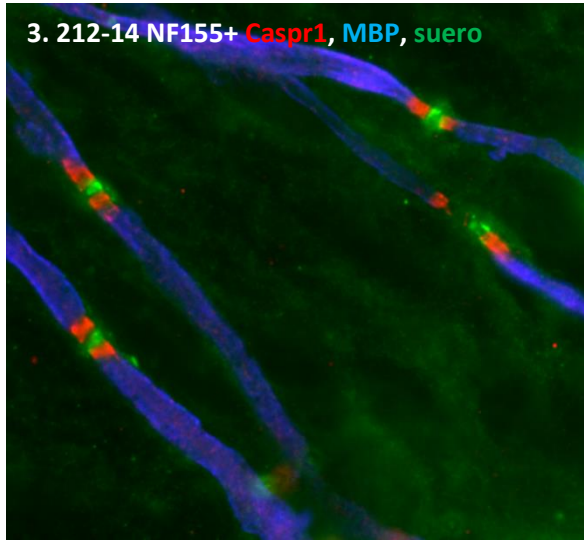
- Muestras pares:
 - **anti-panNF** (AF3235) 1/300
 - **anti-MBP** (808401) 1/300
- Incubar con anticuerpos secundarios: diluídos 1/500 en Goat serum 5%: 1h RT
 - Muestras impares: **GAH488 IgG + GAR594 + GAM647**
 - Muestras pares: **GAH488 IgG + GAC594 + GAM647**
- Montar con Fluoromount

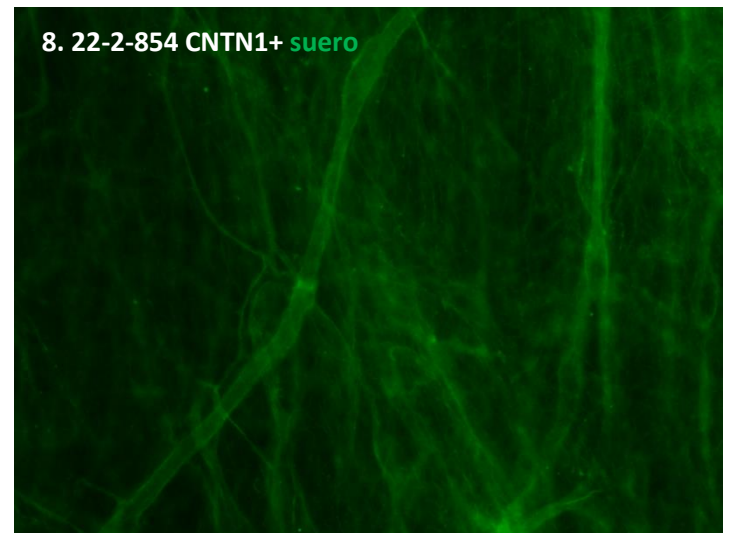
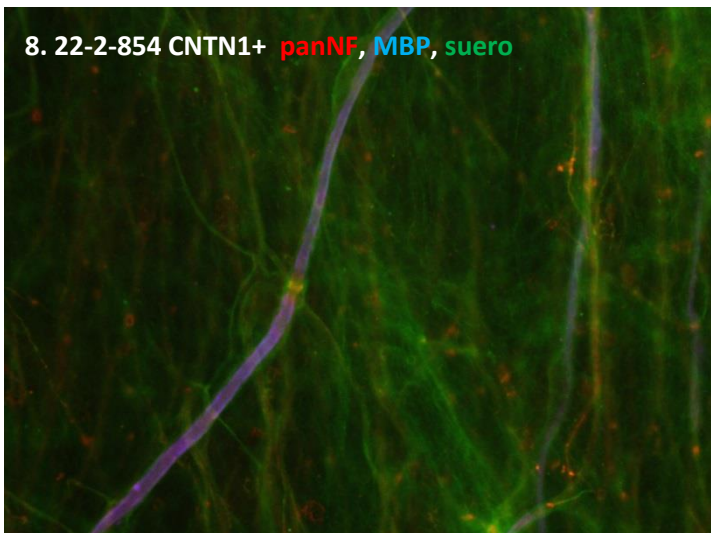
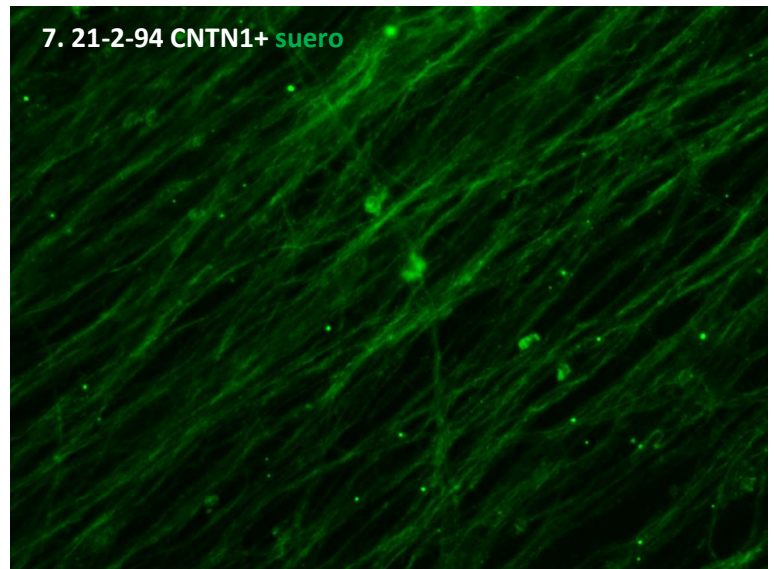
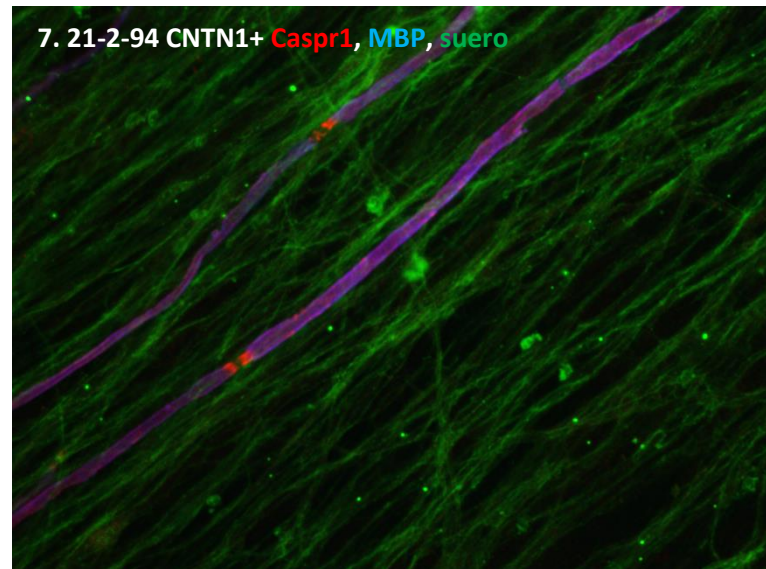
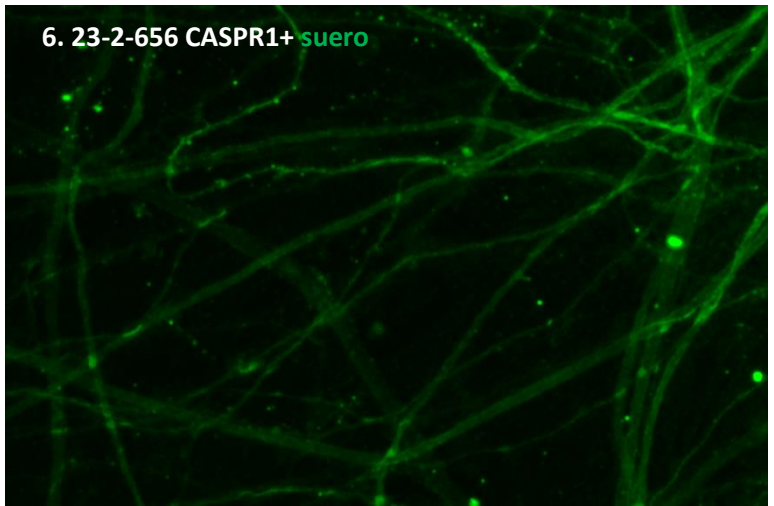
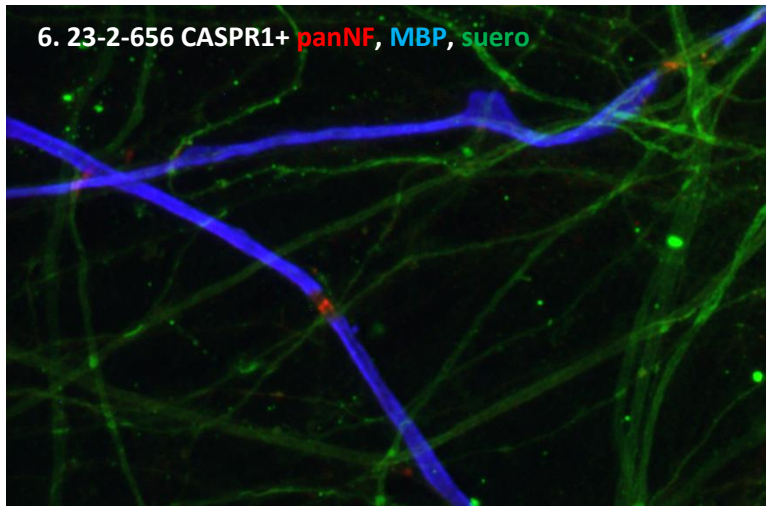
Resultado ICC (a) día 12/12/2023: todavía no hay mielina en los co-cultivos de médula, y por lo tanto no se pueden valorar los resultados.

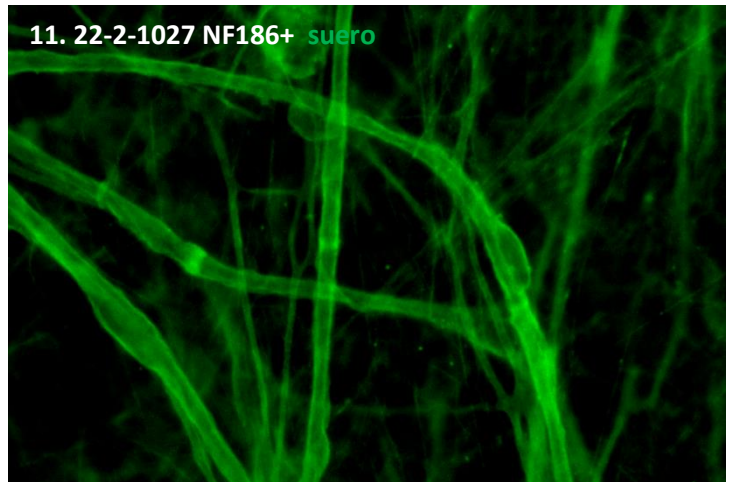
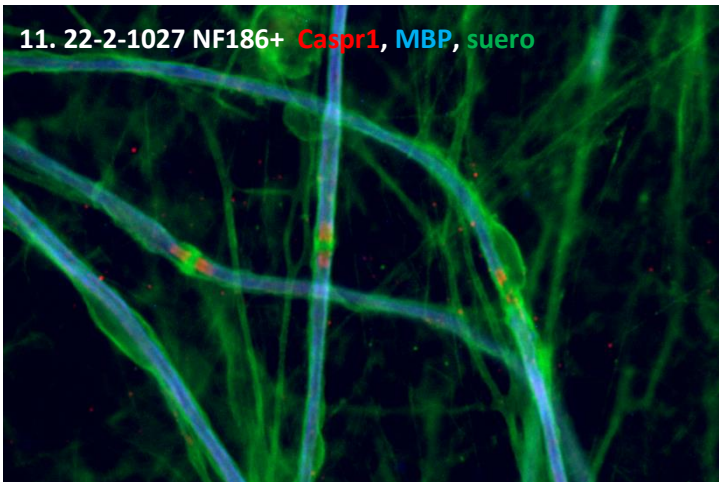
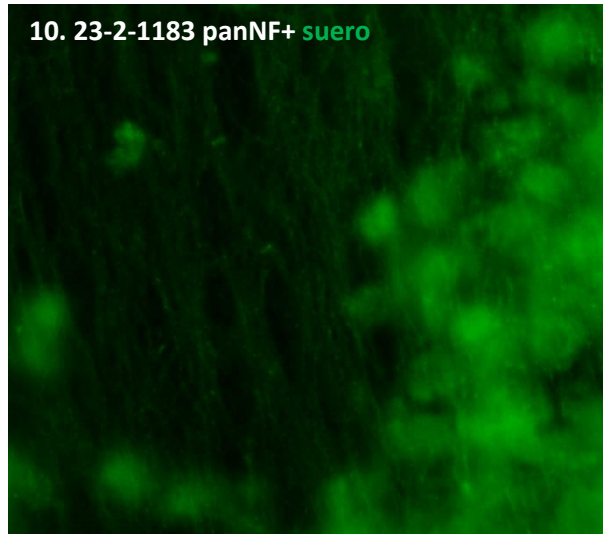
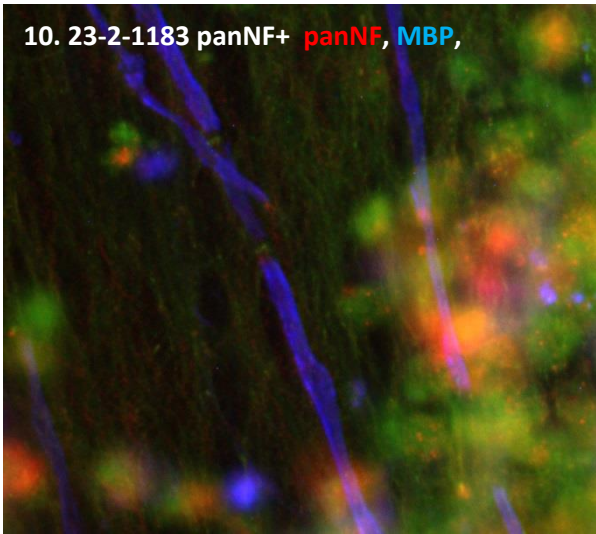
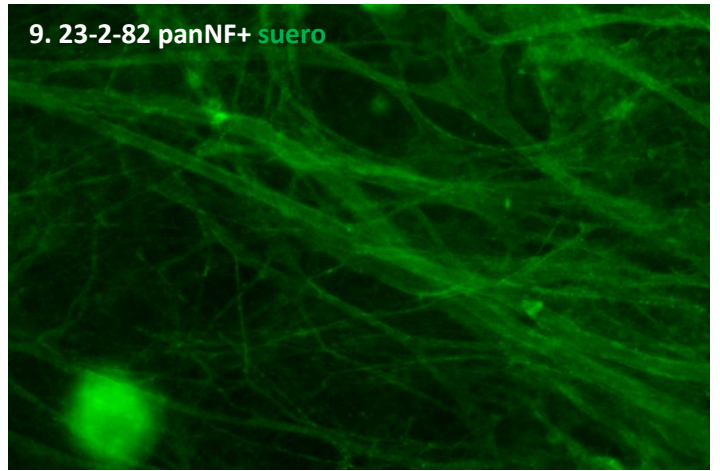
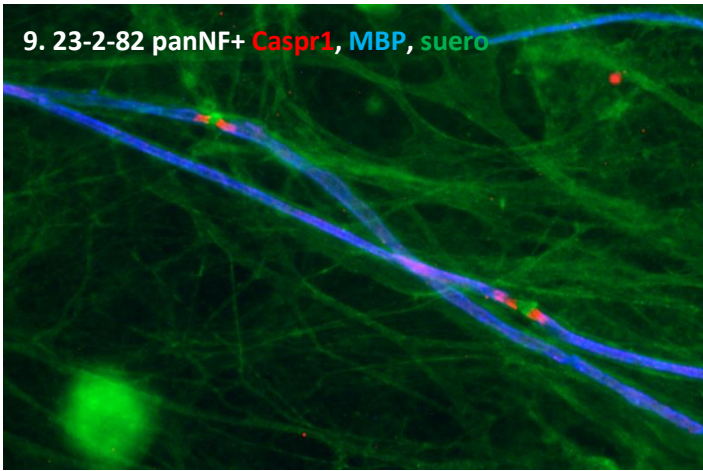
Resultado ICC (b) día 12/12/2023:

1. Cneg 200-2: neg
2. Cneg 204-11: neg
3. NF155+ 212-14 (Morón): marca el nodo y alrededor del PN, también un poco alrededor de la mielina.
4. NF155+ 216-17 (De Haro): marca el nodo y alrededor del PN, también un poco alrededor de la mielina.
5. CASPR1+ 136-8 (Vinuesa): no marca los paranodos
6. CASPR1+ 23-2-656 (Blanco): no marca nada
7. CNTN1+ 21-2-94: no marca los paranodos
8. CNTN1+ 22-2-854: marca un poco algún paranodo
9. panNF+ 23-2-82 Box 318: marca nodos
10. panNF+ 23-2-1183: marca nodos
11. NF186+ 22-2-1027 Box 312: marca los nodos pero no todos









✓ ICC co-cultivos DRG y médula (días 45 a 48 - rata 27/10/2023 - incubación sueros 72h)

Objetivo: Mismas muestras en 4 tipos de experimentos diferentes (se ponen en posts diferentes para que quede más claro)

- a) Co-cultivos médula: incubación sueros 24h
- b) Co-cultivos DRG: incubación sueros 24h
- c) Co-cultivos DRG: incubación sueros 72h (cada día voy añadiendo suero nuevo)**
- d) Co-cultivos DRG: incubación sueros 1 semana (sólo lo hago con las muestras 1 a 6, cada día voy añadiendo suero nuevo)

Muestras:

- | | |
|------------------------------|------------------------------|
| 1. Cneg 200-2 | 7. CNTN1+ 21-2-94 |
| 2. Cneg 204-11 | 8. CNTN1+ 22-2-854 |
| 3. NF155+ 212-14 (Morón) | 9. panNF+ 23-2-82 Box 318 |
| 4. NF155+ 216-17 (De Haro) | 10. panNF+ 23-2-1183 |
| 5. CASPR1+ 136-8 (Vinuesa) | 11. NF186+ 22-2-1027 Box 312 |
| 6. CASPR1+ 23-2-656 (Blanco) | |

Protocolo cels vivos: entre cada paso hacer lavados con PBS1x

- Incubar con sueros diluïdos 1/100 en medio NG a 37°C (preparo 4 en 400 ul)
 - Para añadir suero cada 24h: preparo 4ul de suero en 200ul de medio NG, quito 200ul de medio NG de las células y pongo los nuevos 200ul.
- Fijar con PFA4% 20min
- Permeabilizar 10min con metanol -20°C
- Incubar con anticuerpos primarios diluïdos en Goat serum 5%: 2h a RT (los pongo juntos)
 - Muestras impares:
 - **anti-Caspr1** (ab34151) 1/300
 - **anti-MBP** (808401) 1/300
 - Muestras pares:
 - **anti-panNF** (AF3235) 1/300
 - **anti-MBP** (808401) 1/300
- Incubar con anticuerpos secundarios: diluïdos 1/500 en Goat serum 5%: 1h RT
 - Muestras impares: **GAH488 IgG + GAR594 + GAM647**
 - Muestras pares: **GAH488 IgG + GAC594 + GAM647**

- Montar con Fluoromount

Resultado ICC (c) día 14/12/2023: no se porqué la ICC ha salido en general muy baja... no puedo ver el marcaje de MBP y por tanto no puedo comprobar correctamente los resultados.

✓ ICC co-cultivos DRG y médula (días 45 a 52 - rata 27/10/2023 - incubación sueros 1 semana)

Objetivo: Mismas muestras en 4 tipos de experimentos diferentes (se ponen en posts diferentes para que quede más claro)

- e) Co-cultivos médula: incubación sueros 24h
- f) Co-cultivos DRG: incubación sueros 24h
- g) Co-cultivos DRG: incubación sueros 72h (cada día voy añadiendo suero nuevo)
- h) Co-cultivos DRG: incubación sueros 1 semana (sólo lo hago con las muestras 1 a 6, cada día voy añadiendo suero nuevo menos sábado y domingo)**

Muestras:

- | | |
|--------------------------|------------------------------|
| 1. Cneg 200-2 | 4. NF155+ 216-17 (De Haro) |
| 2. Cneg 204-11 | 5. CASPR1+ 136-8 (Vinuesa) |
| 3. NF155+ 212-14 (Morón) | 6. CASPR1+ 23-2-656 (Blanco) |

Protocolo cels vivos: entre cada paso hacer lavados con PBS1x

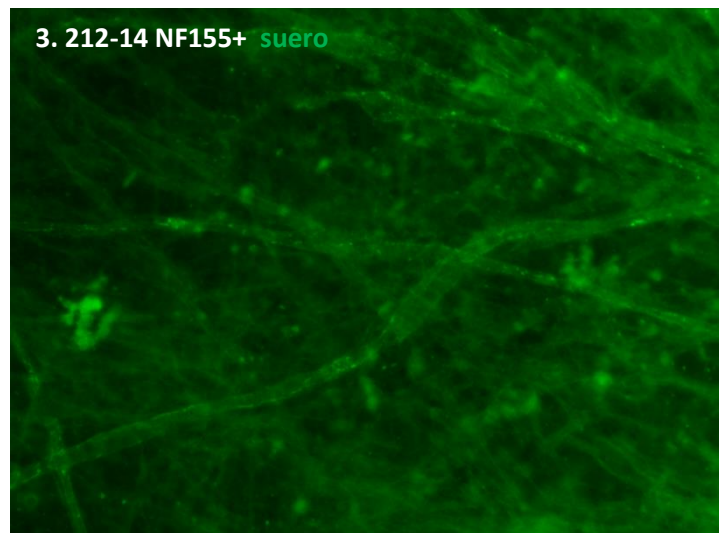
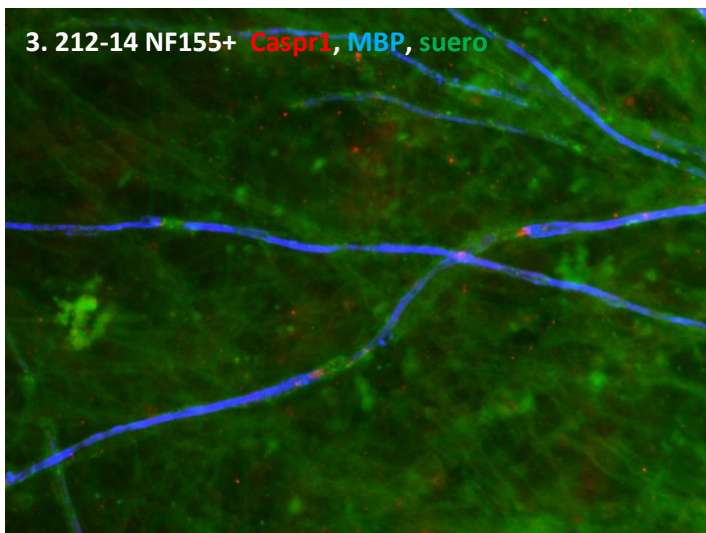
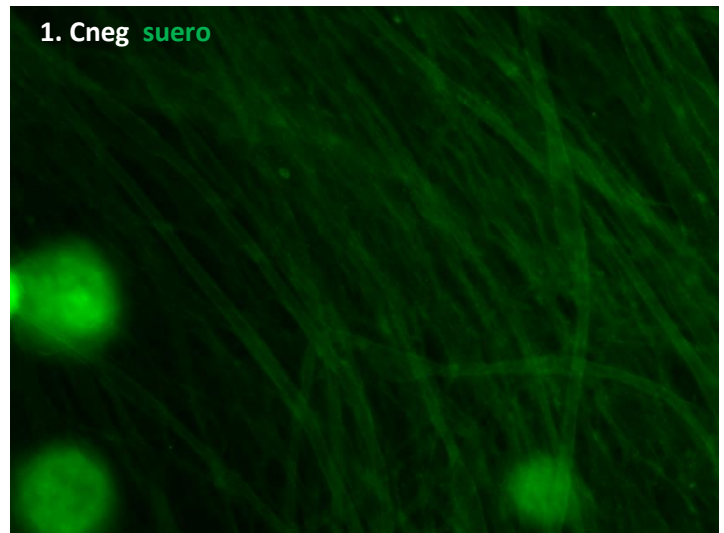
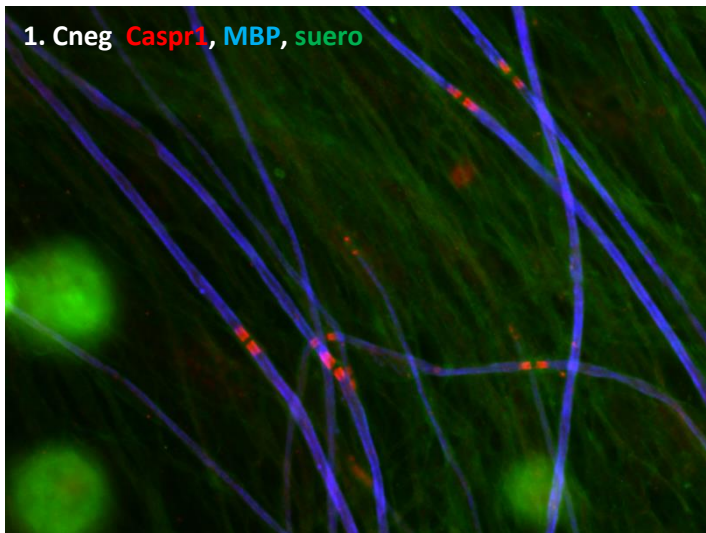
- Incubar con sueros diluïdos 1/100 en medio NG a 37°C (preparo 4 en 400 ul)
 - Para añadir suero cada 24h: preparo 4ul de suero en 200ul de medio NG, quito 200ul de medio NG de las células y pongo los nuevos 200ul. El fin de semana (sábado 16 y domingo 17) no añado sueros porque no puedo venir
- Fijar con PFA4% 20min
- Permeabilizar 10min con metanol -20°C
- Incubar con anticuerpos primarios diluïdos en Goat serum 5%: 2h a RT (los pongo juntos)
 - Muestras impares:
 - **anti-Caspr1** (ab34151) 1/300
 - **anti-MBP** (808401) 1/300
 - Muestras pares:
 - **anti-panNF** (AF3235) 1/300
 - **anti-MBP** (808401) 1/300
- Incubar con anticuerpos secundarios: diluïdos 1/500 en Goat serum 5%: 1h RT
 - Muestras impares: **GAH488 IgG + GAR594 + GAM647**

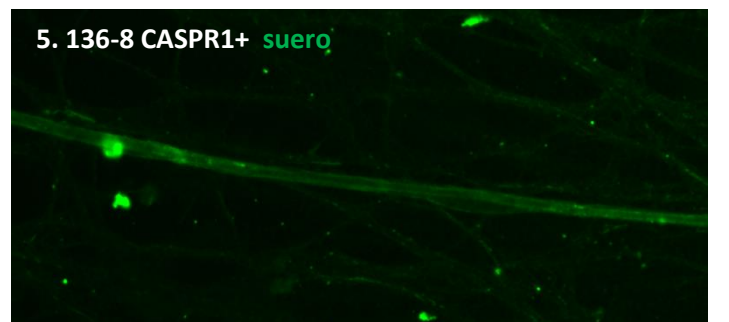
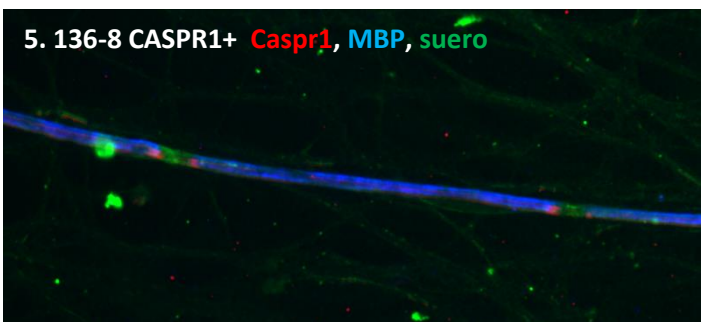
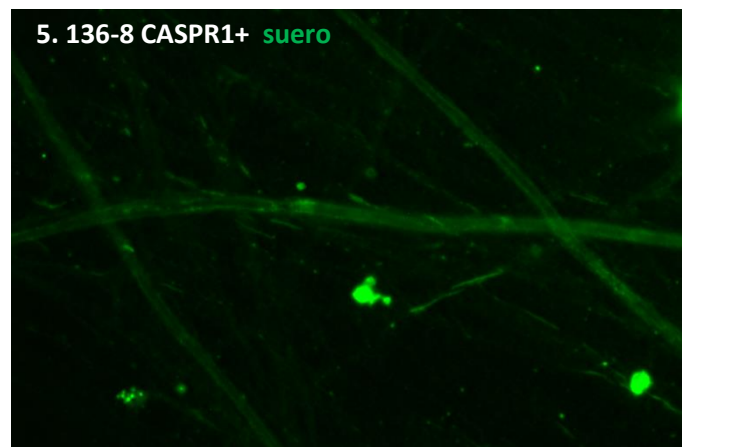
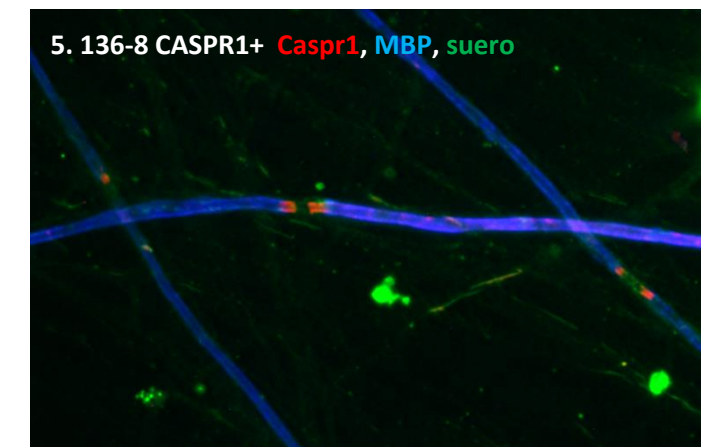
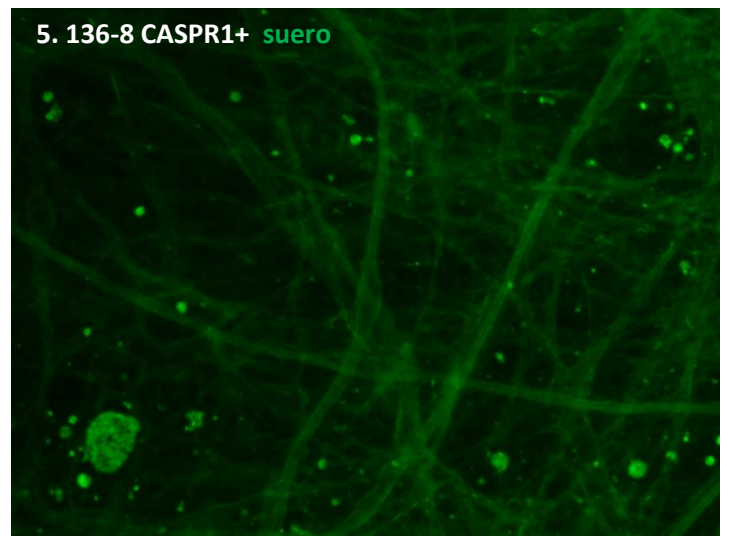
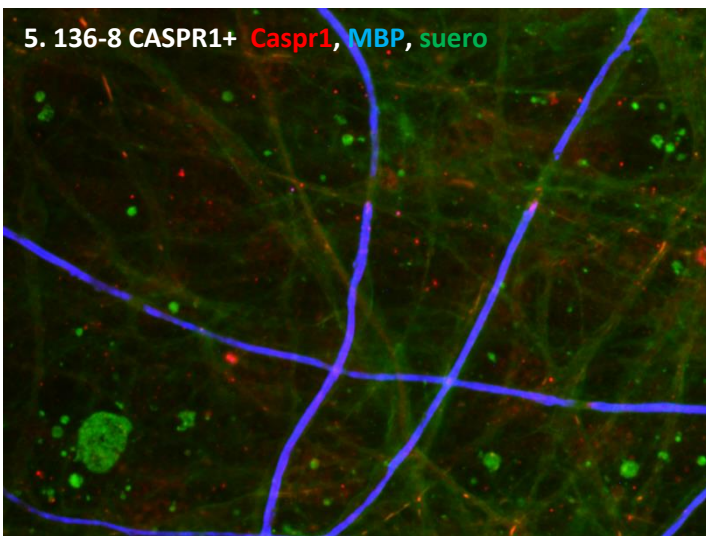
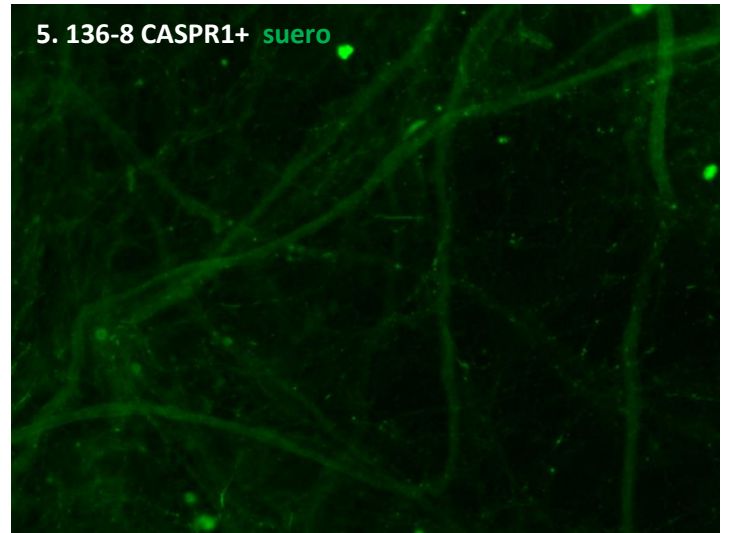
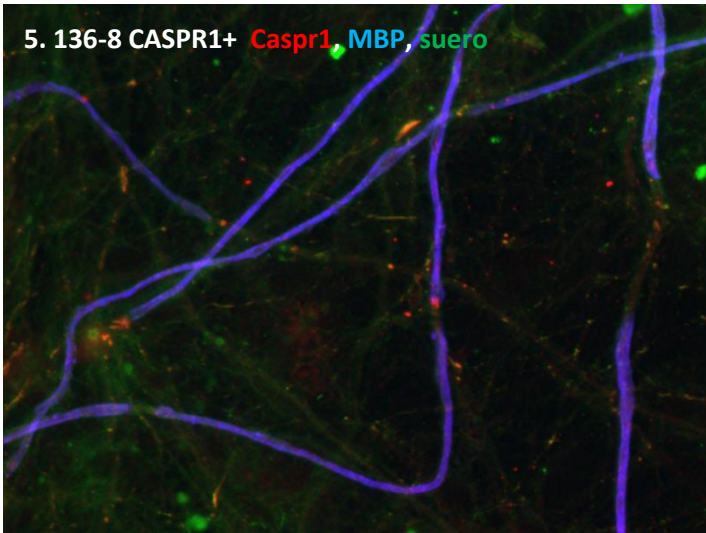
- Muestras pares: **GAH488 IgG + GAC594 + GAM647**

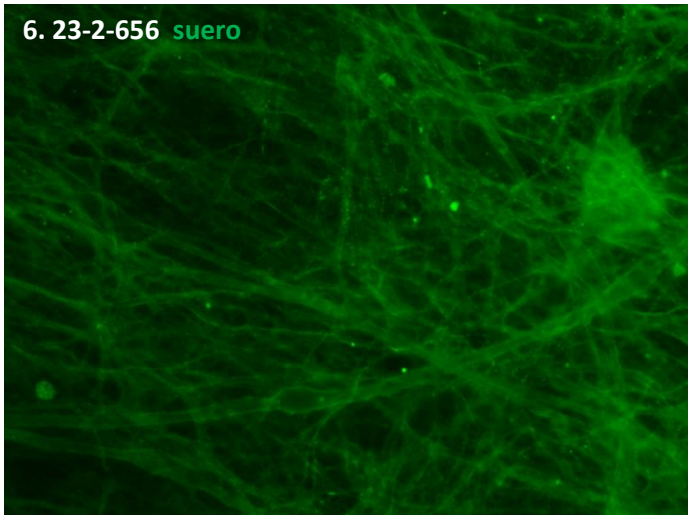
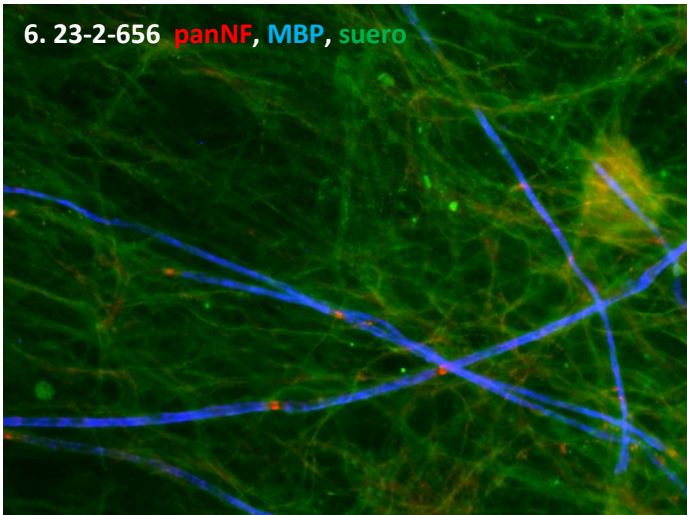
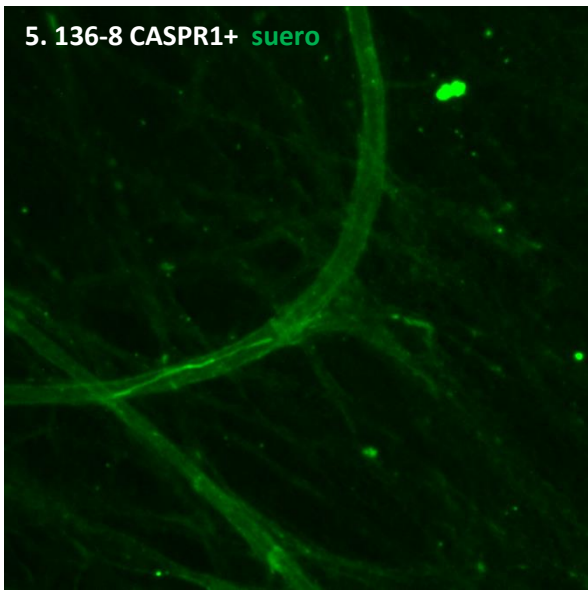
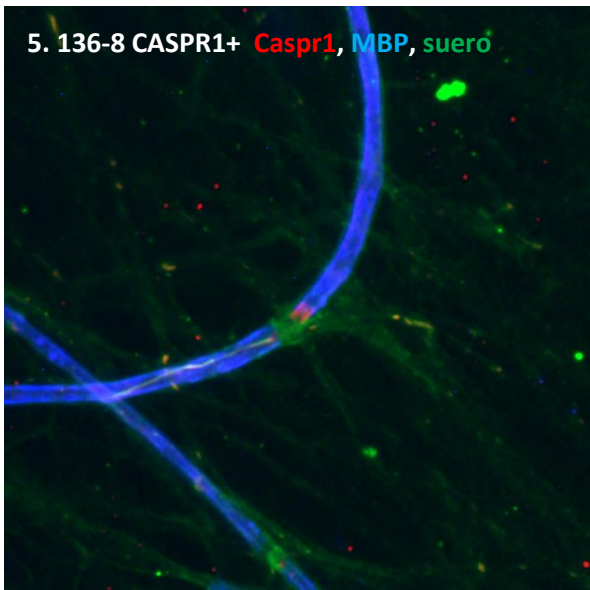
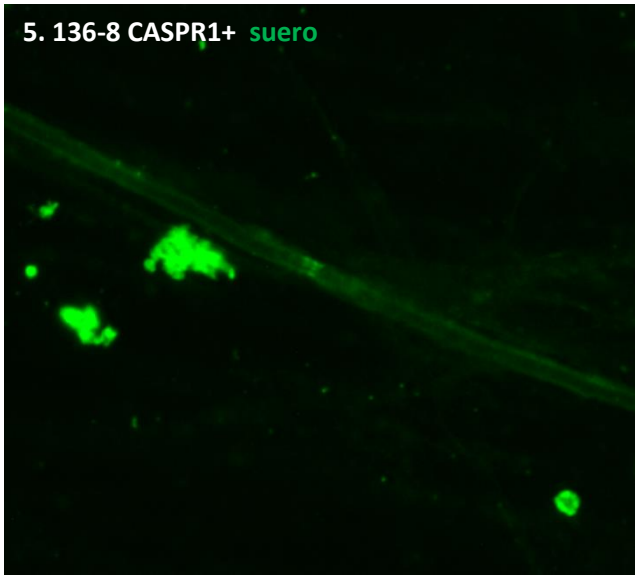
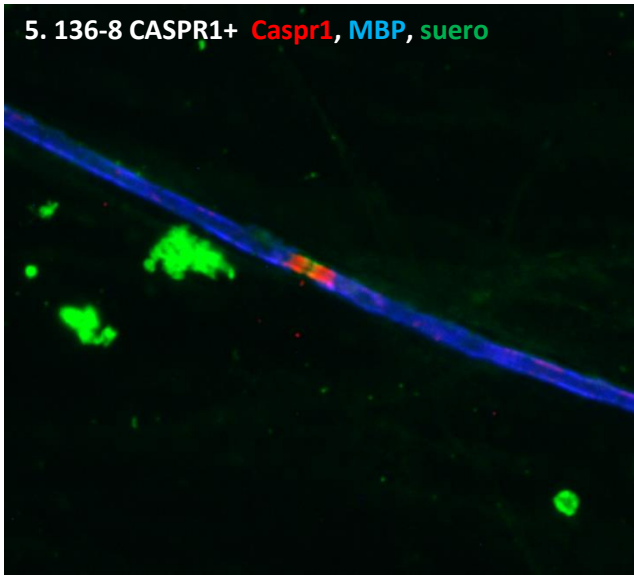
- Montar con Fluoromount

Resultado ICC (d) día 18/12/2023:

1. Cneg 200-2: no hay marcaje. Los paranodos están intactos
2. Cneg 204-11: no hay marcaje. Los paranodos están intactos
3. NF155+ 212-14 (Morón): la mayoría de los paranodos están rotos, se ve un ligero marcaje alrededor de los paranodos y de la mielina.
4. NF155+ 216-17 (De Haro): la mayoría de los paranodos están rotos, se ve un ligero marcaje alrededor de los paranodos y de la mielina.
5. CASPR1+ 136-8 (Vinuesa): la mayoría de los paranodos están rotos (no hay caspr1, o se ve sólo una mitad del paranodo), aunque no se ve el propio marcaje del suero.
6. CASPR1+ 23-2-656 (Blanco): no puedo determinar si los paranodos están rotos o no porque he puesto panNF, que marca principalmente los nodos.







19/12/2023

✓ **ICC co-cultivos DRG** (días 53 a 56 rata 27/10/2023, incubación sueros 72h)

Objetivo: incubar las células con los sueros 72h e ir añadiendo cada día suero nuevo (repetición de experimento C del día 11/12/23)

Muestras:

- | | |
|------------------------------|---------------------------------|
| 1. Cneg 217-32 | 7. CASPR1+ 22-2-374 (Bocanegra) |
| 2. Cneg 217-33 | 8. CNTN1+ 21-2-94 |
| 3. NF155+ 212-14 (Morón) | 9. CNTN1+ 22-2-854 |
| 4. NF155+ 216-17 (De Haro) | 10. panNF+ 23-2-82 Box 318 |
| 5. CASPR1+ 136-8 (Vinuesa) | 11. panNF+ 23-2-1183 |
| 6. CASPR1+ 23-2-656 (Blanco) | |

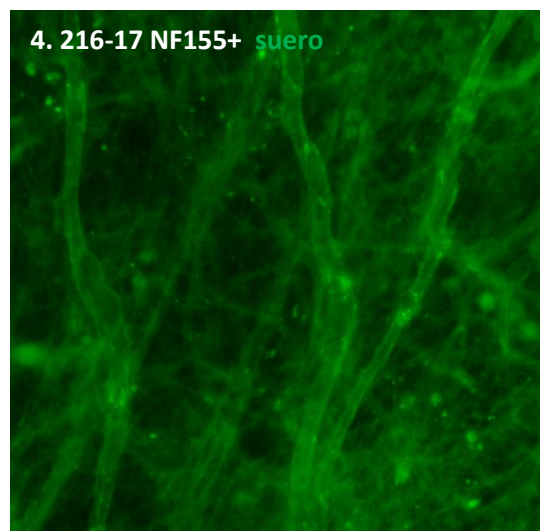
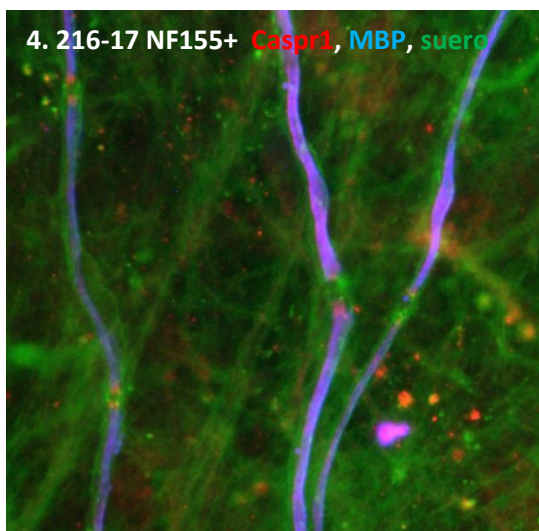
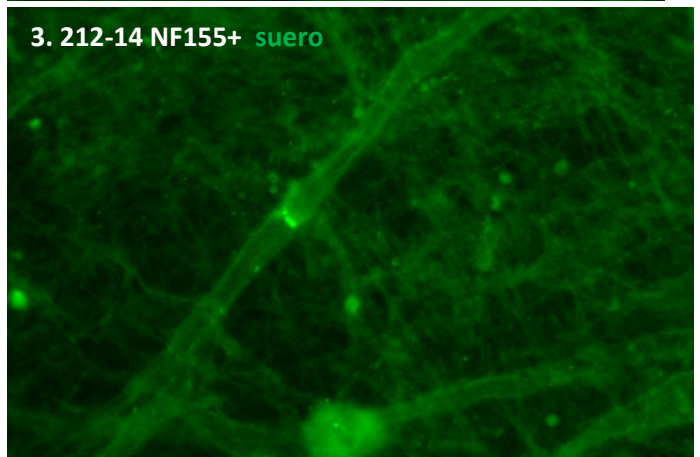
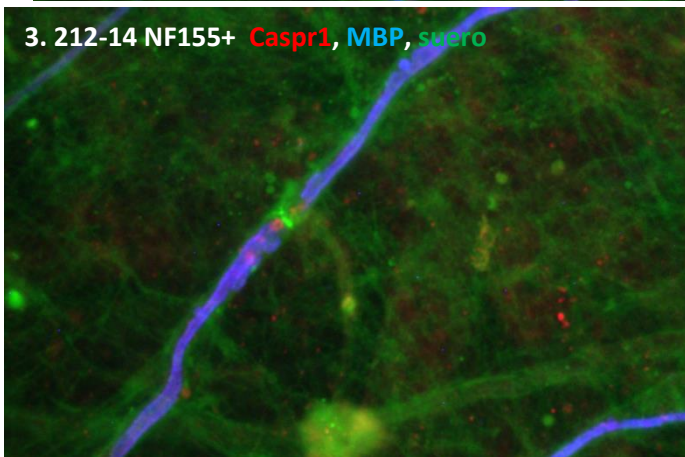
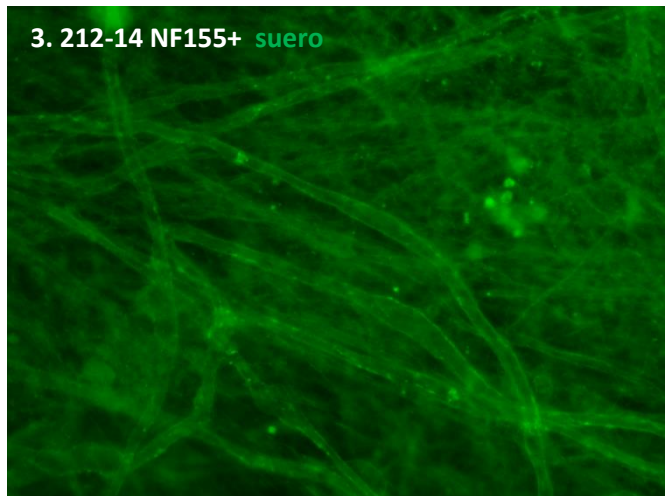
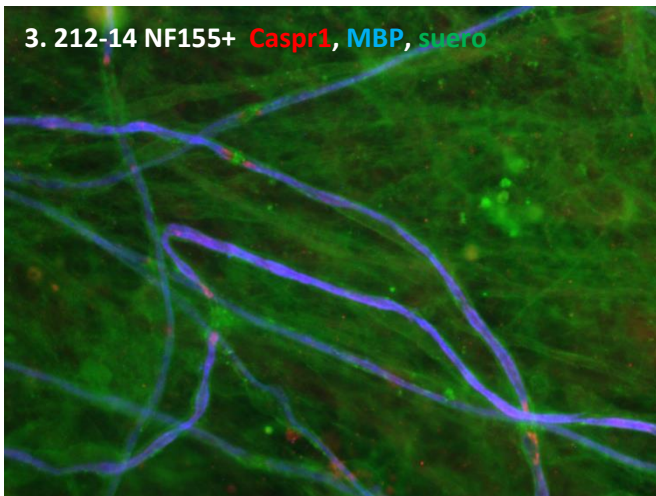
Protocolo ICC cels vivas (día 22/12/23): entre cada paso hacer lavados con PBS1x

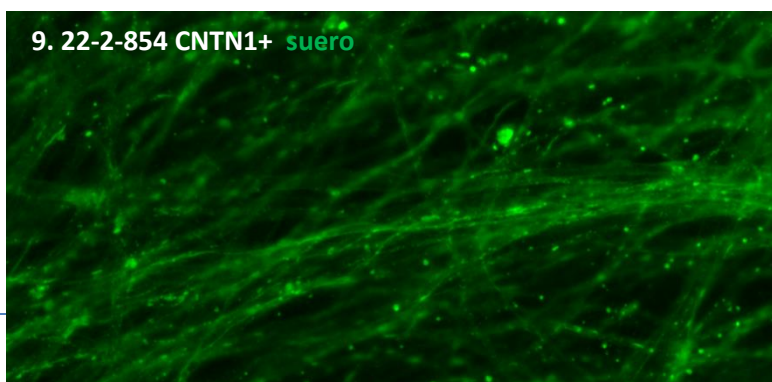
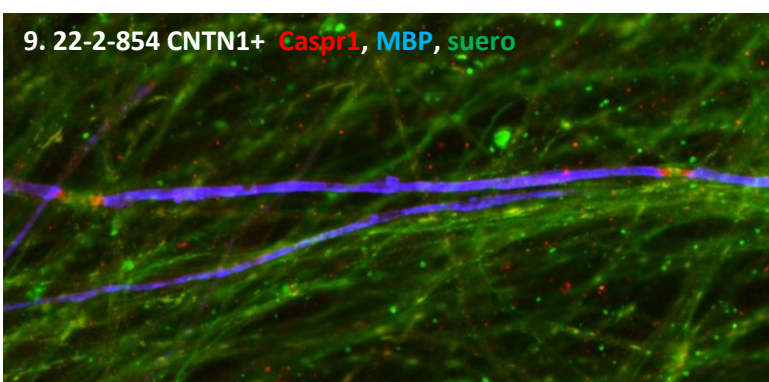
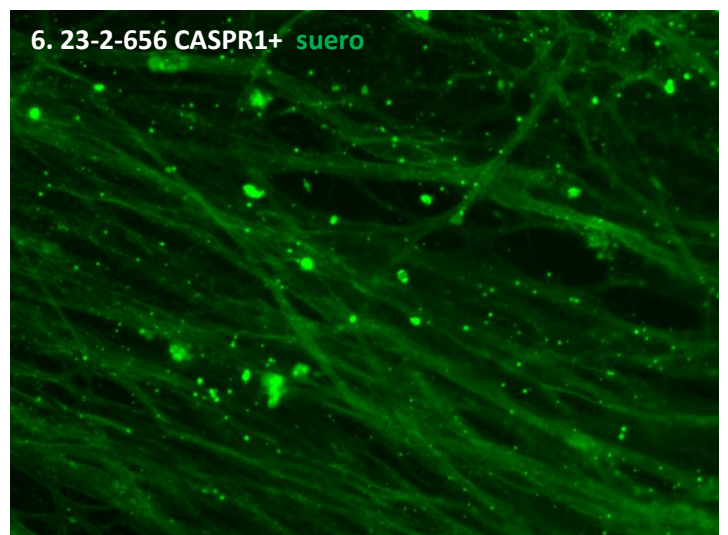
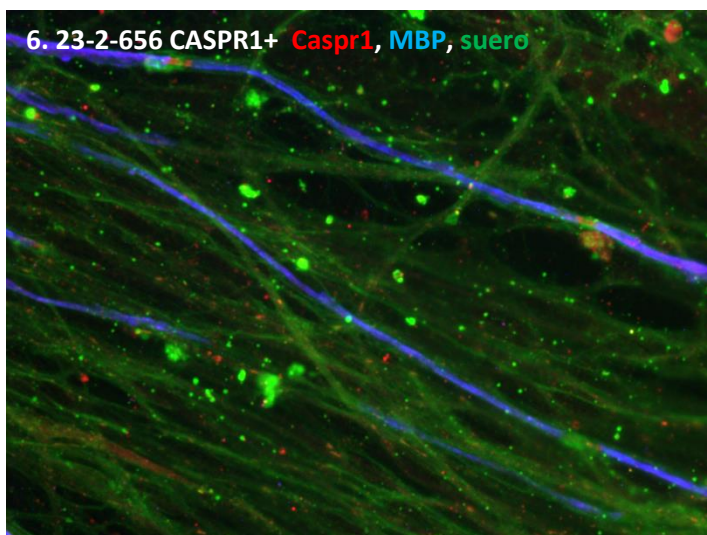
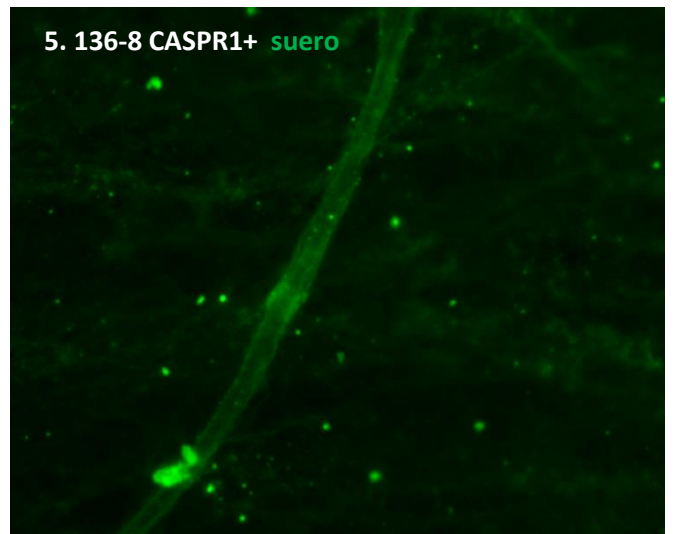
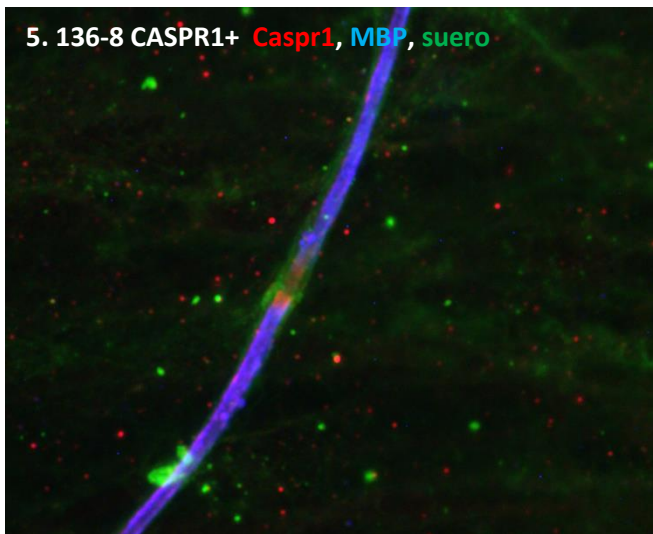
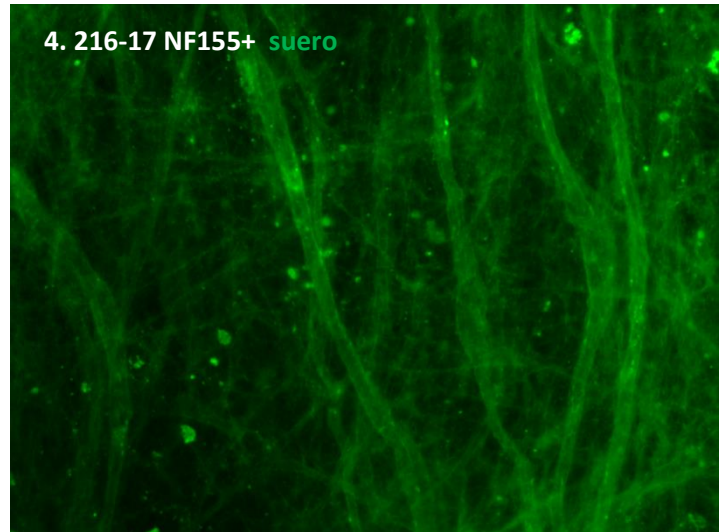
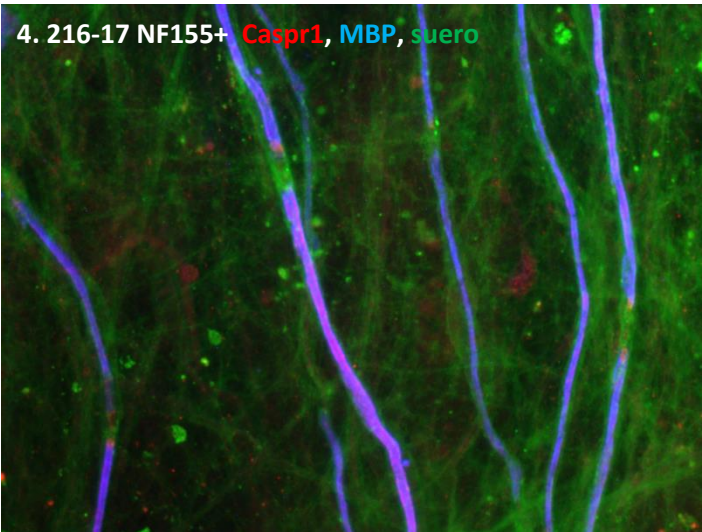
- Incubar con sueros diluïdos 1/100 en medio NG mielinización a 37°C (preparo 5 en 500 ul)
 - Para añadir suero cada 24h: preparo 3ul de suero en 300ul de medio NG, quito 300ul de medio NG de las células y pongo los nuevos 300ul.
- Fijar con PFA4% 20min
- Permeabilizar 10min con metanol -20°C
- Incubar con anticuerpos primarios diluïdos en Goat serum 5%: overnight a 4°C (los pongo juntos)
 - **anti-Caspr1** (ab34151) 1/300
 - **anti-MBP** (808401) 1/300
- Incubar con anticuerpos secundarios **GAH488 IgG + GAR594 + GAM647** diluïdos 1/500 en Goat serum 5%: 1h RT.
- Montar con Fluoromount

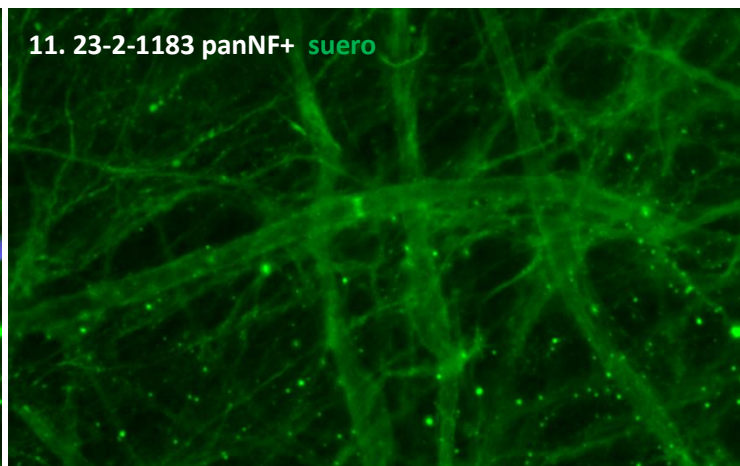
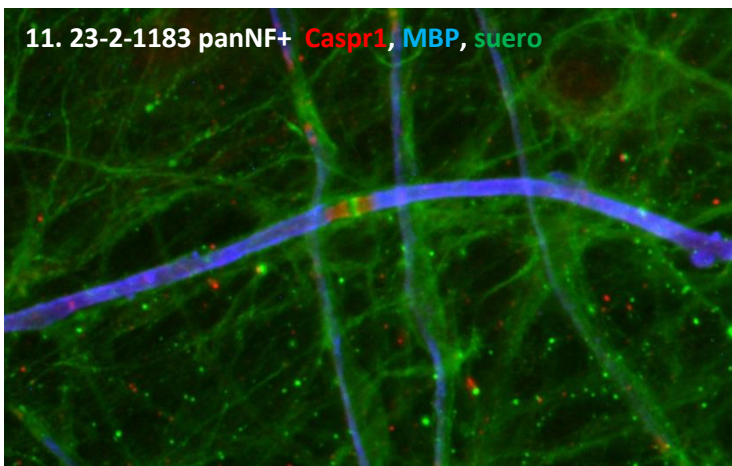
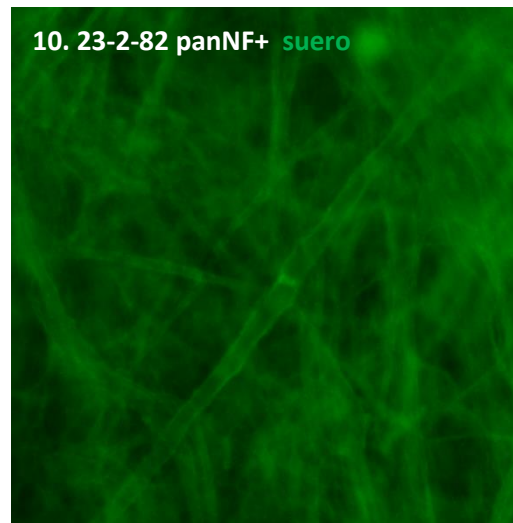
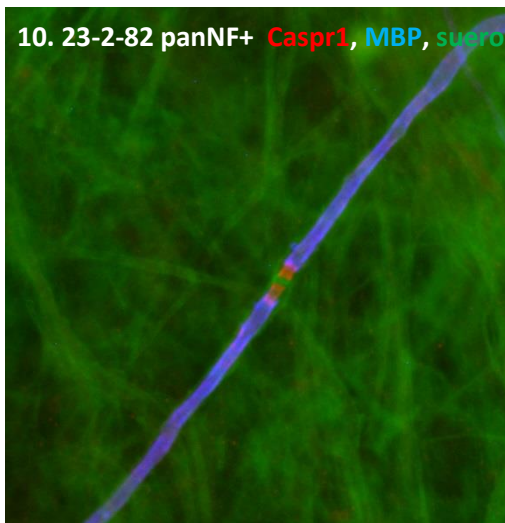
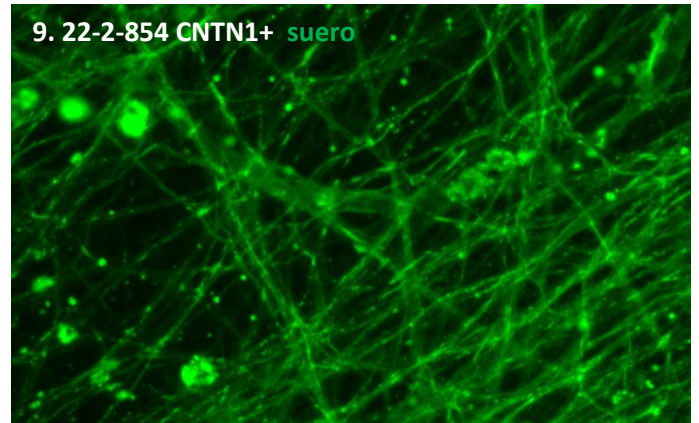
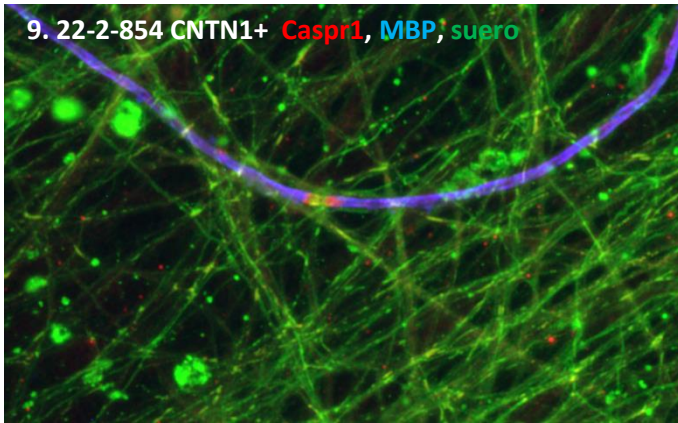
Resultado (ICC 22-23/12/2023): los controles marcan mucho la mielina. La ICC de CASPR1 no ha salido demasiado bien. En general los paranodos están mucho más intactos que en la incubación de sueros durante 1 semana (en todas las condiciones los paranodos están prácticamente intactos).

1. Cneg 217-32
2. Cneg 217-33
3. NF155+ 212-14 (Morón): marcaje de paranodos
4. NF155+ 216-17 (De Haro): marcaje de paranodos
5. CASPR1+ 136-8 (Vinuesa): hay un ligero marcaje en algunos paranodos

6. CASPR1+ 23-2-656 (Blanco): hay un ligero marcaje en algunos paranodos. Hay muchas capas de células y mucho marcaje en general, difícil de analizar.
7. CASPR1+ 22-2-374 (Bocanegra): no veo ningún marcaje de paranodo. Hay marcaje de mielina
8. CNTN1+ 21-2-94: no hay marcaje de paranodos, marcaje mielina
9. CNTN1+ 22-2-854: marca algunos paranodos
10. panNF+ 23-2-82 Box 318: marcaje de nodos. Paranodos casi intactos
11. panNF+ 23-2-1183: marcaje de nodos. Paranodos casi intactos







20/12/2023

✓ ICC co-cultivos médula (día 54 - rata 27/10/2023)

Objetivo: ver cómo de diferenciados están los co-cultivos de médula para compararlos con cómo estén más adelante (a partir de hoy las células van a crecer con sueros de pacientes en el medio)

Protocolo cels fijadas: entre cada paso hacer lavados con PBS1x

- Fijar con PFA4% 20min
- Permeabilizar 10min con metanol -20°C
- Incubar con anticuerpos primarios diluídos en Goat serum 5%: 2h a RT (los pongo juntos)
 - anti-Caspr1 (ab34151) 1/300
 - anti-MBP (808401) 1/300
- Incubar con anticuerpos secundarios **GAR488 + GAM594** diluídos 1/500 en Goat serum 5%: 1h RT
- Montar con Fluoromount

Resultado: hay muy poca mielina, aunque los cultivos están mielinizando correctamente.

✓ Incubación sueros co-cultivos médula (a partir de día 54 - rata 27/10/2023)

Objetivo: como en estos co-cultivos todavía no se observaba prácticamente nada de mielina, añadir a partir de ahora a cada cambio de medio suero de pacientes Caspr1 y controles para ver si se ve afectada la formación de los paranodos. También incubo con suero de pacientes panNF, que sabemos que sí afectan a la formación de PN.

Muestras: hago cada muestra por duplicado

- | | |
|----------------------------|---------------------------------|
| 1. Cneg 217-32 | 5. CASPR1+ 23-2-656 (Blanco) |
| 2. Cneg 217-33 | 6. CASPR1+ 22-2-374 (Bocanegra) |
| 3. Cneg 204-11 | 7. NF155+ 212-14 (Morón) |
| 4. CASPR1+ 136-8 (Vinuesa) | 8. panNF+ 23-2-1183 |

Protocolo:

- Pasar los 24 cubres a placa de 24w y poner 500ul de medio NG mielinización con 5 ul de cada suero.
- Para añadir suero cada vez que cambie el medio: preparo 2,5ul de suero en 250ul de medio NG, quito 250ul de medio NG de las células y pongo los nuevos 250ul

✓ **ICC co-cultivos DRG** (días 54 a 61 - rata 27/10/2023, incubación sueros 1 semana)

Objetivo: incubar las células con los sueros durante 1 semana e ir añadiendo cada día suero nuevo (repetición similar a experimento D del día 11/12/23)

Muestras:

- | | |
|----------------------------|---------------------------------|
| 1. Cneg 217-32 | 6. CASPR1+ 23-2-656 (Blanco) |
| 2. Cneg 217-33 | 7. CASPR1+ 22-2-374 (Bocanegra) |
| 3. NF155+ 212-14 (Morón) | 8. panNF+ 23-2-82 Box 318 |
| 4. NF155+ 216-17 (De Haro) | 9. panNF+ 23-2-1183 |
| 5. CASPR1+ 136-8 (Vinuesa) | |

Protocolo ICC cels vivas (día 27/12/23): entre cada paso hacer lavados con PBS1x

- Incubar con sueros diluídos 1/100 en medio NG mielinización a 37°C (preparo 5 en 500 ul)
 - Para añadir suero cada 24h: preparo 3ul de suero en 300ul de medio NG, quito 250ul de medio NG de las células y pongo los nuevos 300ul.
- Fijar con PFA4% 20min
- Permeabilizar 10min con metanol -20°C
- Incubar con anticuerpos primarios diluídos en Goat serum 5%: 2h a RT (los pongo juntos)
 - **anti-Caspr1** (ab34151) 1/300
 - **anti-MBP** (808401) 1/300
- Incubar con anticuerpos secundarios:
 - Muestras 1, 3, 5, 7, 8: **GAH Kappa biot + GAR594 + GAM647** diluídos 1/500 en Goat serum 5%: 1h RT.
 - Muestras 2, 4, 6, 9: **GAH Lambda biot + GAR594 + GAM647** diluídos 1/500 en Goat serum 5%: 1h RT.
- Incubar con **Streptavidina 488** diluída 1/1000 en Goat serum 5% 1h RT
- Montar con Fluoromount

Resultado (ICC día 27/12/2023): aumentar la concentración de anticuerpo MBP, ya que se ve flojo. En esta ocasión no veo tanta diferencia entre lo que ocurre en los Cneg y en los pacientes, hay que hacer contage de los paranodos intactos vs rotos para ver diferencias. No hago fotos para no perder el tiempo.

1. Cneg 217-32: casi todos los paranodos intactos. Verde negativo (K)
2. Cneg 217-33: casi todos los paranodos intactos. Verde negativo (L)
3. NF155+ 212-14 (Morón): muchos paranodos rotos. Verde marcaje mielina (K)

4. NF155+ 216-17 (De Haro): muchos paranodos rotos. Verde muy poco marcaje (L)
5. CASPR1+ 136-8 (Vinuesa): muchos paranodos rotos. Verde poco marcaje (K)
6. CASPR1+ 23-2-656 (Blanco): muchos paranodos rotos. En verde se ven precipitados (o se pega el suero a ciertos sitios de los co-cultivos) (L)
7. CASPR1+ 22-2-374 (Bocanegra): muchos paranodos rotos y nodos alargados. Verde no hay marcaje (K)
8. panNF+ 23-2-82 Box 318: muchos paranodos rotos y nodos alargados. Verde no hay marcaje (K)
9. panNF+ 23-2-1183: muchos paranodos rotos y nodos alargados. Verde marca algunos nodos (L)