

Oct 19, 2017

Version 2

## Evaluación la producción de TNF alfa por PBMCs estimulados con LPS tratados con péptidos V.2

DOI

[dx.doi.org/10.17504/protocols.io.kdkcs4w](https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.kdkcs4w)

Lily Johanna Toro<sup>1</sup>, Germán Alberto Téllez Ramírez<sup>2</sup>, Diana Carolina Henao<sup>2</sup>, Jhon Carlos Castaño Osorio<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigaciones Biomédicas - Universidad del Quindío;

<sup>2</sup>Centro de investigaciones biomédicas. Universidad del Quindío.

Grupo de inmunología m...



Lily Johanna Toro

Centro de Investigaciones Biomédicas - Universidad del Quind...

### Create & collaborate more with a free account

Edit and publish protocols, collaborate in communities, share insights through comments, and track progress with run records.

Create free account

OPEN  ACCESS



DOI: <https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.kdkcs4w>

**Protocol Citation:** Lily Johanna Toro, Germán Alberto Téllez Ramírez, Diana Carolina Henao, Jhon Carlos Castaño Osorio 2017. Evaluación la producción de TNF alfa por PBMCs estimulados con LPS tratados con péptidos. **protocols.io**

<https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.kdkcs4w>

**Manuscript citation:**

Murugan RN, Jacob B, Ahn M, Hwang E, Sohn H, et al. (2013) *De Novo* Design and Synthesis of Ultra-Short Peptidomimetic Antibiotics Having Dual Antimicrobial and Anti-Inflammatory Activities. PLoS ONE 8(11): e80025. doi: 10.1371/journal.pone.0080025.

**License:** This is an open access protocol distributed under the terms of the **Creative Commons Attribution License**, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited

**Protocol status:** Working

**Created:** October 19, 2017

**Last Modified:** March 11, 2018

**Protocol Integer ID:** 8332

**Keywords:** Lipopolisacarido (LPS), Péptidos sintéticos, Factor de Necrosis Tumoral Alfa (TNFalfa), Células Mononucleares de Sangre Periférica (PBMCs). , tnf alfa por pbmc's estimulados con lp, la producción de factor de necrosis tumoral, evaluación la producción

## Abstract

Evaluación de la capacidad de neutralización del efecto del Lipopolisacarido (LPS) de inducir la producción de Factor de Necrosis Tumoral (TNFalfa) en Células Mononucleares de Sangre Periférica (PBMCs) tratadas con peptidos cationicos.

La realizacion de este protocolo fue posible gracias al apoyo del departamento administrativo de ciencia tecnología e innovacion, Colciencias a traves del proyecto 111356933173 convocatoria569-2012.

## Guidelines

La capacidad de los peptidos para neutralizar o inhibir la producción de Lipopolisacarido (LPS) es medida a traves de la capacidad de los mismos de inhibir la producción de TNF alfa en Células Mononucleares de Sangre Periferica (PBMCs). El cultivo de PBMCs fue realizado con 250.000 células por pozo en un plato de cultivo de 96 pozos (Cellstar, greiner bio-one, cat-N°655180), las celulas fueron tratadas por triplicado con 10 ng/mL de LPS (*Escherichia coli*, LPS 026:B6, Sigma Aldrich L2654), se utilizan controles por triplicado con medio de cultivo y los tratamientos con diferentes concentraciones del péptido a evaluar con LPS y sin LPS.

Se incuban las células por 12 horas (este tiempo se debe estandarizar) a 37 °C y 5 %CO<sub>2</sub>; el sobrenadante es colectado y reemplazado con medio de cultivo celular con 44 µM de Rezaurin con el fin de evaluar la viabilidad celular. Posterior a esto los sobrenadantes colectados se les mide la producción de TNFalfa por ELISA (Human TNF-α ELISA MAX, BioLegend), siguiendo las instrucciones del fabricantes.



## Materials

### MATERIALS

✕ micropipettors; Sterile tips and serological pipettes

✕ 96 well plates with lids **Catalog # FISHER SCIENTIFIC #087722C**

✕ 1.5 mL Eppendorf tubes

✕ Lipopolysaccharides from Escherichia coli O26:B6 **Merck MilliporeSigma (Sigma-Aldrich) Catalog #L2654**

✕ RPMI 1640 Medium **Thermo Fisher Scientific Catalog #11875093**

✕ Antibiotic-Antimycotic (100X) **Thermo Fisher Scientific Catalog #15240062**

### STEP MATERIALS

✕ Antibiotic-Antimycotic (100X) **Thermo Fisher Scientific Catalog #15240062**

✕ RPMI 1640 Medium **Thermo Fisher Scientific Catalog #11875093**

✕ 5 Plates Well-Coated™ Biotin, 96 well plate, White **G-Biosciences Catalog #786-763**

✕ Lipopolysaccharides from Escherichia coli O26:B6 **Merck MilliporeSigma (Sigma-Aldrich) Catalog #L2654**

✕ 1.5 mL Eppendorf tubes

✕ Human TNF- $\alpha$  ELISA **BioLegend Catalog #430204**

✕ resazurin **Acros Organics Catalog # 189900050**

✕ Antibiotic-Antimycotic (100X) **Thermo Fisher Scientific Catalog #15240062**

✕ RPMI 1640 Medium **Thermo Fisher Scientific Catalog #11875093**

✕ 5 Plates Well-Coated™ Biotin, 96 well plate, White **G-Biosciences Catalog #786-763**

✕ Lipopolysaccharides from Escherichia coli O26:B6 **Merck MilliporeSigma (Sigma-Aldrich) Catalog #L2654**

✕ 1.5 mL Eppendorf tubes

✕ Human TNF- $\alpha$  ELISA **BioLegend Catalog #430204**

✕ resazurin **Acros Organics Catalog # 189900050**

## Protocol materials

✕ 1.5 mL Eppendorf tubes

✕ Human TNF- $\alpha$  ELISA **BioLegend Catalog #430204**

✕ Lipopolysaccharides from Escherichia coli O26:B6 **Merck MilliporeSigma (Sigma-Aldrich) Catalog #L2654**

✕ 96 well plates with lids **Catalog # FISHER SCIENTIFIC #087722C**

✕ resazurin **Acros Organics Catalog # 189900050**

✕ Antibiotic-Antimycotic (100X) **Thermo Fisher Scientific Catalog #15240062**

✕ 1.5 mL Eppendorf tubes

✕ micropipettors; Sterile tips and serological pipettes

✕ Human TNF- $\alpha$  ELISA **BioLegend Catalog #430204**

✕ RPMI 1640 Medium **Thermo Fisher Scientific Catalog #11875093**

✕ 5 Plates Well-Coated™ Biotin, 96 well plate, White **G-Biosciences Catalog #786-763**

✕ RPMI 1640 Medium **Thermo Fisher Scientific Catalog #11875093**

✕ RPMI 1640 Medium **Thermo Fisher Scientific Catalog #11875093**

✕ Lipopolysaccharides from Escherichia coli O26:B6 **Merck MilliporeSigma (Sigma-Aldrich) Catalog #L2654**

✕ 1.5 mL Eppendorf tubes

✕ resazurin **Acros Organics Catalog # 189900050**

✕ Lipopolysaccharides from Escherichia coli O26:B6 **Merck MilliporeSigma (Sigma-Aldrich) Catalog #L2654**

✕ Antibiotic-Antimycotic (100X) **Thermo Fisher Scientific Catalog #15240062**

✕ Antibiotic-Antimycotic (100X) **Thermo Fisher Scientific Catalog #15240062**

✕ 5 Plates Well-Coated™ Biotin, 96 well plate, White **G-Biosciences Catalog #786-763**

✕ Antibiotic-Antimycotic (100X) **Thermo Fisher Scientific Catalog #15240062**

✕ RPMI 1640 Medium **Thermo Fisher Scientific Catalog #11875093**

✕ 5 Plates Well-Coated™ Biotin, 96 well plate, White **G-Biosciences Catalog #786-763**

✕ Lipopolysaccharides from Escherichia coli O26:B6 **Merck MilliporeSigma (Sigma-Aldrich) Catalog #L2654**

✕ 1.5 mL Eppendorf tubes

✕ resazurin **Acros Organics Catalog # 189900050**

✕ Human TNF- $\alpha$  ELISA **BioLegend Catalog #430204**

## Troubleshooting



## Safety warnings

⚠ Se debe tener mucho cuidado en el momento de hacer la extracción de PBMCs en cuanto a la manipulación de la sangre de un individuo sano (ver protocolo).

## Before start


Preparar todos los reactivos y soluciones de trabajo con un día de anticipación.

Se recomienda realizar el ELISA de los sobrenadantes inmediatamente despues de colectados; para esto se debe tener en cuenta que la placa debe sensibilizarse un día antes del desarrollo del ELISA.

## Cultivo de Células Mononucleares de Sangre Periférica (PBMCs).


- 1 Cultivar en una caja de cultivo celular de 96 pozos 250.000cel/pozo a un volumen final de 100  $\mu$ L/pozo en RPMI 1640 suplementado con antibiótico antimicótico (ampicilina/estreptomicina) 1X .

Dejar incubando por 12 horas, hasta que las células se estabilicen.

 Antibiotic-Antimycotic (100X) **Thermo Fisher Scientific Catalog #15240062**

 RPMI 1640 Medium **Thermo Fisher Scientific Catalog #11875093**

 5 Plates Well-Coated™ Biotin, 96 well plate, White G-  
**Biosciences Catalog #786-763**

 12:00:00

## Preparación de soluciones de trabajo

- 2 Realizar diluciones de proteína, péptido o compuesto a evaluar.  
Calculando un volumen de 10  $\mu$ L por pozo de la proteína/péptido a evaluar a una concentración 10X con respecto a la concentración final en el pozo.

Preparar la solución de trabajo de Lipopolisacarido (LPS) a 10X (100ng/mL).


Preparación de las alícuotas de LPS (según el inserto del LPS O26:B6).

1. Stock 1: tomar 1mg de LPS y re-suspenderlo en 1mL de SIn salina estéril (repartir en 10 tubos con alícuotas de 100 $\mu$ L). (Queda a una concentración de 1mg/mL)
2. Stock 2: tomar un tubo del stock 1 y sacar 1 $\mu$ L en un tubo nuevo y aforar hasta 1mL (repartir en 10 tubos con alícuotas de 100 $\mu$ L). (Queda a una concentración de 0,001mg/mL=1 $\mu$ g/mL)
3. SIn de trabajo 10X: A partir de un tubo del stock 2, tomar 1 $\mu$ L por pozo (100 $\mu$ L de volumen final) y lleve a 10 $\mu$ L para concentración de 100ng/mL o 10X.

Marque tubos de 1,5mL correspondientes a cada control y tratamiento.

Mezcle las soluciones de muestra, control y LPS en tubos de 1,5mL. ((10 $\mu$ L LPS 10X + 10 $\mu$ L tratamiento o control 10X +80 $\mu$ L medio de cultivo)/pozo)

Mezclar por vortex 1 min y dejar incubar los tratamientos a 37°C por 30 minutos.

 Lipopolysaccharides from Escherichia coli O26:B6 **Merck MilliporeSigma (Sigma-Aldrich) Catalog #L2654**

 1.5 mL Eppendorf tubes

00:30:00

## Adicionar los tratamientos a los PBMCs

- 3 Remueva el sobrenadante lentamente de cada uno de los pozos con PBMCs inclinando la placa 45° hacia usted.

Adicione 100 µL por pozo de cada uno de los tratamientos (mencionados en el paso 2) lentamente cambiando de punta.

Se recomienda adicionar de izquierda a derecha en el siguiente orden:

1. Medio de cultivo.
2. Muestras sin LPS.
3. Muestras con LPS.

		Medio de cultivo	Muestra	Muestra + LPS	LPS									
			1	2	3	4	5	1	2	3	4	5		
	A													
	B													
	C													

El tiempo de incubación se debe estandarizar, sin embargo para realizar una primera evaluación recomendamos, dejar incubar por 12 horas a 37 °C 5 % de CO<sub>2</sub>.

### Note

NO confundir los pozos que contienen LPS con los que no tienen, además no pase con la punta por encima de los pozos que ya tienen los tratamientos

12:00:00

## Recolección de sobrenadantes

- 4 Prepare tubos de 1,5mL correspondientes a cada tratamiento.

Recoja los sobrenadantes por cada tubo.

Centrifuge a 9000g por 2 minutos, colecte los sobrenadantes y se recomienda realizar el ELISA para la detección de TNFalfa de forma inmediata, ya que hemos observado una disminución en las concentraciones de la citoquina en muestras despues de haber sido almacenadas a -30 °C.

Si va almacenar los sobrenadantes para medir las citoquinas posteriormente, hagalo a -80°C y evite la descongelación.

Con el fin de verificar la viabilidad de los PBMCs se recomienda adicionar Rezasurin (Indicador de metabolismo celular) a cada uno de los pozos 100µL/pozo a una concentración final de 44 uM, deje incubar la placa 2 hrs a 37 °C y 5 % CO<sub>2</sub> y posteriormente leer la placa por espectrofotometria a 570 y 450 nm. o por fluorescencia a ext/emisión: 579/584

Prepare solucion de trabajo con medio e cultivo a una concentracion final 1X (440 µM).

 Human TNF-α ELISA **BioLegend Catalog #430204**

 resazurin **Acros Organics Catalog # 189900050**

#### Note

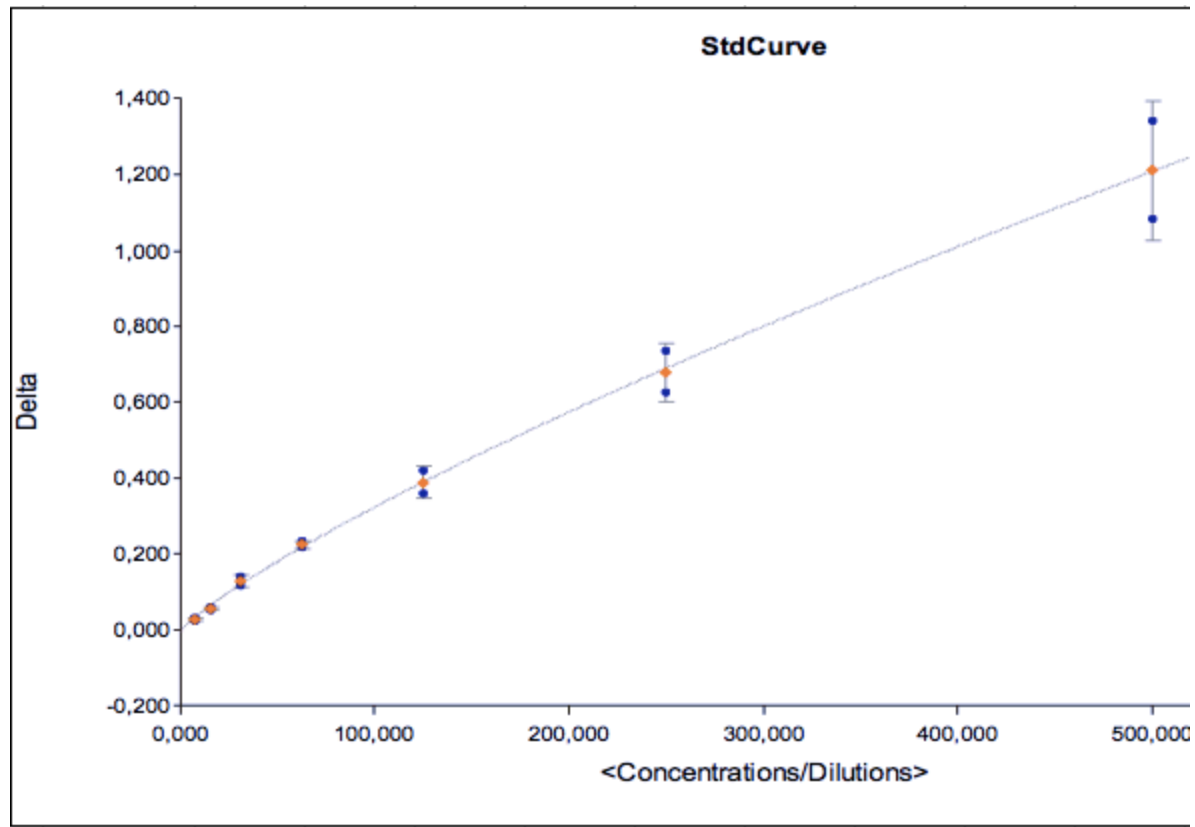
El protocolo del ELISA se deberia iniciar con un día de anticipación para sensibilizar la placa.

## Análisis de los resultados

- 5 Se obtendran dos lecturas por pozo de 570 y 450 nm.  
Como blanco se tomara los pozos en los cuales hemos adicinado unicamente células y medio de cultivo celular (blanco).  
Al blanco calcularle la mediana, y restarla a todos los pozos.  
Posteriormente, calcular el delta a cada uno de los pozos (450-570nm).  
Calcular la curva estandar de la curva de TNFalfa que viene en el kit, donde relacione en el eje X: concentraciones y en el eje Y: delta.

Asi:





Con la formula de la curva aplicar para cada uno de los tratamientos evaluados.

$$Y = (A-D)/(1+(X/C)^B) + D$$

Finalmente graficar Tratamientos Vs Concentraciones de TNF alfa (pg/mL) obtenidas.

