

# CUANTIFICACIÓN MULTIPLEX DE HASTA 100 PROTEÍNAS POR MUESTRA EN PLACA ELISA DE 96 MUESTRAS MEDIANTE TECNOLOGÍA XMAP-LUMINEX

---

Unidad Científico-Técnica: Laboratorios de Investigación

Área de Proteómica

[www.ibsgranada.es](http://www.ibsgranada.es)



ibs.GRANADA  
INSTITUTO DE  
INVESTIGACIÓN  
BIOSANITARIA

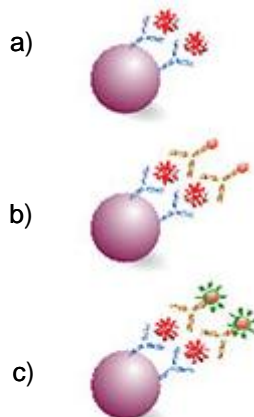
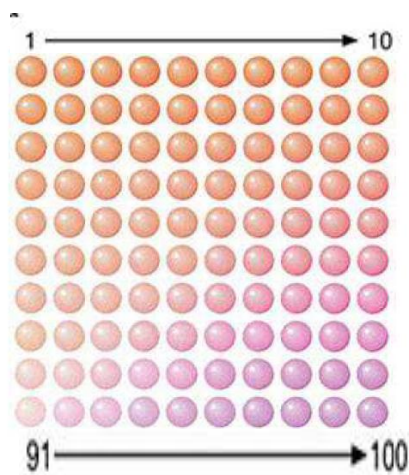
## Cuantificación multiplex de hasta 100 proteínas por muestra en placa ELISA de 96 muestras mediante tecnología Xmap-Luminex

### 1. Fundamentos del método y ventajas.

Los ensayos tradicionales de inmunoabsorción enzimática (ensayos ELISA) detectan y miden un único analito por placa. Los inmunoensayos basados en la tecnología xMAP de Luminex utilizan bolitas magnéticas rellenas con dos fluorocromos y están conjugadas con anticuerpos específicos. Se pueden detectar simultáneamente hasta 100 proteínas por muestra en cada pocillo de placa ELISA (Figura 1).

Esta tecnología de alto rendimiento produce resultados comparables a los ensayos ELISA, pero con mayor eficacia, velocidad y rango dinámico. Los datos obtenidos son de mejor calidad, sin interferencias del muestreo, pipeteos, etc ya que todos los parámetros se ensayan en la misma muestra a la vez. La cuantificación del ensayo mediante fluorescencia y las incubaciones en suspensión con la muestra permiten mayor sensibilidad y rango dinámico que en el ELISA, donde la detección se hace colorimétricamente y con el anticuerpo primario anclado en el fondo del pocillo. Además, el multiplexing necesita menor volumen de muestra, menor mano de obra, y es más económico por analito analizado. (Figura 2).

Existen paneles multiplex preconfigurados (apartado 3: menú de ensayos). También se pueden seleccionar algunas proteínas de los paneles o combinar proteínas de los paneles para crear ensayos multiplex personalizados. Si lo desea, crearemos un panel específico para ajustarse a las necesidades de sus ensayos



**Fig 1. Tecnología de inmunoensayo multiplex Luminex.** Las bolas están rellenas con dos diferentes fluorocromos (rojo e infrarrojo). Se utilizan diferentes concentraciones de cada fluorocromo para generar hasta 100 bolas distintas. El protocolo es equivalente a un ELISA tipo sándwich. a) Cada bola se conjuga a un anticuerpo contra un analito específico. b) Se realiza una segunda ronda de detección del analito con un anticuerpo específico biotinilado c) que es detectado a su vez con estreptavidina conjugada con el fluorocromo verde ficoeritrina. Un láser rojo identifica qué tipo de bola es – por la fluorescencia del relleno de la bola – y, por lo tanto, qué ensayo es (qué anticuerpo hemos unido a la bola). El láser verde cuantifica la cantidad de ficoeritrina unida a la bola, es decir, cuantifica cuánto analito hay detectado.

	ELISA	Bio-Plex
<b>Número de citocinas a analizar</b>	27	27
<b>Número de muestras</b>	80 (16 pocillos son para la curva patrón)	80 (16 pocillos son para la curva patrón)
<b>Número de placas de 96 pocillos necesarias</b>	27 	1 
<b>Datos obtenidos por placa</b>	80	2,160
<b>Tiempo requerido total</b>	>60 hr	3 hr
<b>Volumen de muestra</b>	Suero o plasma >1 ml* Sobrenadantes de cultivos celulares >1 ml*	Suero o plasma 12.5 µl Sobrenadantes de cultivos celulares 50 µl

**Fig 2. Protocolo de comparación entre ELISA tradicional y sistema Luminex en análisis de 27 citocinas en 80 muestras.\*** Basado en 50 µl de muestra por pocillo

## 2. Descripción de los equipos ofertados y tipo de muestras analizadas.

- *Equipo de Luminex y software: Bio-Plex 200 (Bio-rad) y Xponent v3.1*
- *Tipo de Muestra: Suero, Plasma, sobrenadantes de cultivos celulares y otros fluidos biológicos.*
- *Especies: Humano, ratón, rata, primate, perro, felinos, equinos, porcinos.*
- *Volumen requerido: 12,5 µl-50 µl*

## 3. Menú de ensayos en humanos.

Algunos paneles no están disponibles en otras especies. Pregunten.

### Inmunología:

#### -Panel de citocinas y chemocinas:

**-Panel 1:** sCD40L,EGF,Eotaxin/CCL11,FGF-2/FGF-basic,Flt3 Ligand,Fractalkine /CX3CL1,G-CSF,GM-CSF,GRO,IFN $\alpha$ 2,IFN $\gamma$ ,IL-1a,IL-1b,IL1Ra,IL-2,IL-3,IL-4,IL-5,IL-6,IL-7,IL-8/CXCL8,IL-9,IL-10,IL-12 (p40),IL-12 (p70),IL-13,IL-15,IL-17A/CTLA8,IP-10/CXCL10,MCP/CCL2,MCP3/CCL7,MDC/CCL22,MIP1 $\alpha$ /CCL3,MIP1 $\beta$ /CCL4,PDGFAA,PDGF-AB/BB,RANTES/CCL5,TGF $\alpha$ ,TNF $\alpha$ ,TNF $\beta$  / Lymphotoxina a(LTA),VEGF-A.

**-Panel 2:** 6Ckine/CCL21/Exodus-2,BCA-1/CXCL13,CTACK/CCL27,ENA-78/CXCL5,Eotaxin-2/CCL24/MPIF-2,Eotaxin-3/CCL26,IL-16,IL-20,IL-21,IL-23,IL-28A/IFN $\lambda$ 2,IL-33/NF-HEV (mature),I-309/CCL1,LIF,MCP-2/CCL8,MCP-4/CCL13,MIP-1 $\delta$ /MIP-5/CCL15,SCF,SDF-1/CXCL12,TARC/CCL17,TPO,TRAIL/TNFSF10,TSLP.

**-Panel 3:** HCC-1/CCL14,IL-11,IL-29/IFN $\lambda$ 1,I-TAC/CXCL11,LIX/CXCL6/GCP-2,Lymphotactin/XCL1,M-CSF,MIG/CXCL9,MIP-3 $\alpha$ /CCL20,MIP-3 $\beta$ /CCL19,NAP2/CXCL7.

**-Panel 4:** APRIL/TNFSF13,IL-14/ $\alpha$ -Taxilin,BAFF/Blys,BRAK/CXCL14,CXCL16,CCL28,HCC-4/CCL16,HMGB1,MPIF/CCL23,IFN $\beta$ ,MIP-4/PARC/CCL18,IL-19,IL-24,IL-28B/IFN $\lambda$ 3,IL-32 $\alpha$ ,IL-34,IL-35,IL-36/IL-1F8,IL-37/IL-1F7,IL-38/IL-1F10,YKL40/1CHI3L1

<b>-Células T. Alta sensibilidad:</b>
Fractalkine/CX3CL1,GM-CSF,IFN $\gamma$ ,IL-1b,IL-2,IL-4,IL-5,IL-6,IL-7,IL-8/CXCL8,IL-10,IL-12 (p70),IL-13,IL-17A/CTLA8,IL-21,IL-23,ITAC/CXCL11,MIP-1 $\alpha$ /CCL3,MIP-1 $\beta$ /CCL4,MIP-3 $\alpha$ /CCL20,TNF $\alpha$ .
<b>-Receptores solubles de citocinas:</b>
sCD30,sEGFR,sgp130,sIL-1RI,sIL-1RII,sIL-2R $\alpha$ ,sIL4R,sIL-6R,sRAGE,sTNF RI,sTNF RII,sVEGFR1/sFlt-1,sVEGFR2/sKDR/sFlk-1,sVEGFR3/sFlt-4
<b>-Th17:</b>
GM-CSF,IFN $\gamma$ , IL-1b,IL-2,IL-4,IL-5,IL-6,IL-9,IL-10,IL-12 (p70),IL-13,IL-15,IL-17A/CTLA8,IL-17E/IL-25,IL-17F,IL-21,IL-22,IL-23,IL-27,IL-28A/IFN $\gamma$ 2, IL-31,IL-33/NF-HEV (mature),MIP-3a/CCL20,TNF $\alpha$ ,TNb / Lymphotoxin $\alpha$ (LTA)
<b>-Células T CD8+:</b>
sCD137/4-1BB/TNFRSF9,sFas,sFasL/TNFRSF6,GM-CSF,Granzyme A,Granzyme B,IFN $\gamma$ ,IL-2,IL-4,IL-5,IL-6,IL-10, IL-13,MIP-1a/CCL3,MIP-1b/CCL4,Perforin,TNF $\alpha$ .
<b>-Complemento humano:</b>
-Panel 1: Adipson/Factor D,C2,C4b,C5,C5a,C9,Factor I,Mannose-binding lectin,(MBL). -Panel 2: C1q,C3,C3b,C4,Factor B,Factor H,Properdin
<b>-MMP:</b>
-Panel 1:MMP-3,MMP-12,MMP-13 -Panel 2:MMP-1,MMP-2,MMP-7,MMP-9,MMP-10
<b>-TIMP:</b>
-Panel 1: TIMP-1 TIMP-2 -Panel 2: TIMP-1,TIMP-2,TIMP-3,TIMP-4
<b>-Isotipos de inmunoglobulinas:</b>
-Panel 1: IgA,IgG1,IgG2,IgG3,IgG4,IgM -Panel 2: IgE
<b>-Sepsis:</b>
-Panel 1: sFas,sFasL/TNFRSF6,sICAM-1,MIF,PAI-1 (total),sVCAM-1.

-Panel 2: Granzyme B,HSP70, IL-1a,IL-8/CXCL8,MIP-1 $\beta$ /CCL3,MIP-1 $\beta$ /CCL4, MMP-8

-Panel 3: Lactotransferrin (LTF),NGAL/Lipocalin-2,Neutrophil Elastase-2 (ELA2),Resistin,Thrombospondin-1 (TSP-1).

-Panel 4: FGF-13,MMP-8,Olfactomedin-4(OLFM-4)

-Panel 5: Neutrophil Elastase-2(ELA2),Proteinase-3 (PRTN-3)

#### **-Piel:**

Cortisol,Fibronectin,Human Serum Albumin(HSA),Involucrin,Keratin-1,10Keratin-6,LPS.

### **Metabolismo/endocrinología:**

#### **-Adipocinas:**

-Panel 1: Adiponectin,Adipsin/Factor D,NGAL/Lipocalin-2,PAI-1 (total),Resistin

-Panel 2: HGF, IL-1 $\beta$ ,IL-6,IL-8/CXCL8,Insulin,Leptin,MCP-1/CCL2,NGF,TNF $\alpha$

#### **-Adipocitos:**

Adiponectin,HGF,IL-1b,IL-6,IL-8/CXCL8,Leptin,MCP-1/CCL2,NGF,PAI-1 (total),Resistin,TNF $\alpha$ .

#### **-Diabetes:**

C-Peptide,GLP-1 (active),Glucagon,Insulin,Leptin

#### **-Hormonas:**

Amylin (active),Amylin (total),C-Peptide,Ghrelin (active) %,GIP (total),GLP-1 (active),GLP-1 (total),Glucagon,IL-6,Insulin,Leptin,MCP-1/CCL2,Pancreatic Polypeptide(PP),PYY (total),TNF $\alpha$ .

#### **-Miocinas:**

Apelin,BDNF,Fractalkine/CX3CL1,Erythropoietin (EPO),LIF,IL-15,SPARC/Osteonectin, Myostatin,FABP3,Irisin,FSTL-1,IL-6,Osteocrin/Musclin, Oncostatin-M

#### **-Hígado:**

a-Fetoprotein (AFP),ANGPTL3,ANGPTL4,ANGPTL6,FABP1,FGF-19,FGF-21,FGF-23,HGF.

<b>-IGFB:</b>
IGFBP,IGFBP2,IGFBP3,IGFBP4,IGFBP5,IGFBP6,IGFBP7.
<b>-IGF:</b>
IGF-1 IGF-2
<b>-Pituitaria:</b>
-Panel 1:ACTH, Agouti-Related Protein(AgRP),CNTF,FSH,GH,LH,TSH
-Panel 2: BDNF, Prolactin
<b>Cardiovascular:</b>
<b>Enfermedad cardiovascular:</b>
-Panel 1:BNP,NTproBNP,CK-MB,LIX/CXCL6/GCP-2,CXCL16,Endocan(ESM-1),FABP3,FABP4,LIGHT,Oncostatin (OSM),Placental Growth Factor,(PLGF),Troponin I (TnI).
-Panel 2: ADAMTS13,GDF-15,D-dimer,sICAM-1,NGAL/Lipocalin-2,Myeloperoxidase (MPO),Myoglobin,Serum Amyloid A,sP-Selectin,sVCAM-1.
-Panel 3: a-2-Macroglobulin,Adipsin/Factor D,a1-Acid Glycoprotein(AGP),CRP,Fetuin A,Fibrinogen,Haptoglobin,sL-Selectin,Platelet ,Factor 4 (PF4),Serum Amyloid P,von Willebrand Factor(vWF)
-Panel 4: sE-Selectin,Follistatin (FST),dPAPP-A,sCD31/sPECAM-1,Pentraxin-3 (PTX3),Tissue Factor (TF),Thrombomodulin,Troponin T (TnT).
<b>Apolipoproteínas:</b>
Apo AI,Apo AII,Apo B,Apo CII,Apo CIII,Apo E.
<b>Hueso:</b>
-Panel 1:ACTH,DKK1,FGF-23,IL-1b,IL-6,Insulin,Leptin,Osteocalcin (OC),Osteopontin (OPN),Osteoprotegerin (OPG),PTH,Sclerostin (SOST),TNFa.
-Panel 2: RANKL

## Cáncer:

-Panel 1: a-Fetoprotein (AFP),CA125,CA15-3,CA19-9,CEA,CYFRA21-1,sFas,sFasL/TNFRSF6,FGF-2/FGF-basic,HCGb,HE4,HGF,IL-6,IL-8/CXCL8,Leptin,MIF,Osteopontin (OPN),Prolactin,PSA (free),PSA (total),SCF,TGFa,TNFa,TRAIL/TNFSF10,VEGF-A

-Panel 2: Antithrombin III,Complement Factor H (CFH),Extracellular Matrix Protein 1 (ECM1),Vitamin D Binding Protein, Vitronectin

-Panel 3: Cathepsin D,Ferritin,Fibroblast Activation Protein (FAP),Galectin 3,IGFBP3,Melanoma Inhibitory Activity (MIA),Myeloperoxidase (MPO),Sex Hormone Binding Globulin (SHBG)

-Panel 4: ALDH1A1,Carbonic Anhydrase 9(CA9),CD44,EpCAM,Hepsin,Kallikrein6,Mesothelin,Midkine,NCAML1/L1CAM/CD171,Transglutaminase 2 (TGM2).

## -Metástasis:

DKK1,GDF15,Neuron-specific enolase(NSE),Osteonectin (SPARC),Osteoprotegerin (OPG),Periostin,TRAP,TWEAK,YKL40/1CHI3L1

## -Angiogénesis/factor de crecimiento:

-Panel 1: Angiopoietin-2,BMP-9,EGF,Endoglin,Endothelin-1,FGF-1/FGF-acidic,FGF-2/FGF-basic,Follistatin (FST),G-CSF,HB-EGF,HGF,IL-8/CXCL8,Leptin,Placental Growth Factor(PLGF),VEGF-A,VEGF-C,VEGF-D.

-Panel 2: Angiostatin/Kringle,sAXL,sc-Kit/sStem Cell Factor Receptor (SCFR),sE-Selectin,sEGFR/sHER1/sErbB1,sHER2/sEGFR2/sErbB2,sHER3/sEGFR3/sErbB3,sHGFR/sc-Met,sIL-6R $\alpha$ ,sNeuropilin-1 ,(sNRP-1),Osteopontin (OPN),PDGF-AB/BB,sPECAM-1,Tenascin C (TN-C),Thrombospondin-2 (TSP-2),sTIE-2,suPAR,sVEGFR1/sFlt1,sVEGFR2/sKDR/sFlk-1,sVEGFR3/sFlt-4.

## Neurociencia:

### -Amiloide beta y tau:

Ab1-40,Ab1-42,Tau (Thr181),Tau (total)

Panel 1: a-Synuclein PARK5/Uchl1,Glial Fibrillary Acidic,Protein (GFAP),PARK7/DJ1,Neuron-Specific Enolase,(NSE),Transglutaminase 2,(TGM2).



### **-Enfermedades neurodegenerativas:**

- Panel 1: a2-Macroglobulin, Apo AI, Apo CIII, Apo E, Complement C3, Factor H, Prealbumin/, Transthyretin (TTR).
- Panel 2: a-2-Antitrypsin (A1AT), C4, CRP, MIP-4/PARC/CCL18, PEDF, Serum Amyloid P (SAP)
- Panel 3: BDNF, Cathepsin D, sICAM-1, Myeloperoxidase (MPO), sNCAM, PAI-1 (total), PDGF-AA, PDGF-AB/BB, RANTES/CCL5, sVCAM-1
- Panel 4: Ab1-40, Ab1-42, GDNF, sRAGE, S100B

### **-Enfermedades neurológicas:**

- Panel 1: a-Synuclein, Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP), Neuron-Specific Enolase, (NSE), PARK5/UCLH1, PARK7/DJ1, Transglutaminase 2 (TGM2),
- Panel 2: a-1-Acid Glycoprotein (AGP), Ceruloplasmin (CP), Haptoglobin (HP), Serum Amyloid
- Panel 3: Angiotensinogen (AGT), Contactin-1, Fetuin A, Kallikrein-6, Osteopontin (OPN), Soluble Superoxide, Dismutase 1, sSOD1, Soluble Superoxide, Dismutase 2 (sSOD2)

### **-Neuropéptidos:**

aMSH, b-Endorphin, Neurotensin, Orexin A, Oxytocin, Substance P

### **-Estrés circadiano:**

Cortisol, Melatonin

## **Toxicidad**

### **Daño renal:**

- Panel 1: Calbindin, Collagen IV, FABP1, GSTa, GST $\pi$ , IP-10/CXCL10, KIM-1, Osteoactivin, Renin, TFF-3, TIMP-1,
- Panel 2: a-1-Microglobulin, Albumin, Clusterin, Cystatin C, EGF, NGAL/Lipocalin-2, Osteopontin (OPN)
- Panel 3: b-2-Microglobulin, RBP4, Uromodulin
- Panel 4: EGF, FABP1, GSTa, IP-10/CXCL10, KIM-1, Osteopontin (OPN), PTH, Renin
- Panel 5: a-1-Microglobulin, Collagen IV, GST $\pi$ , NGAL/Lipocalin-2, Osteoactivin, TIMP-1, Uromodulin

- Panel 6: b-2-Microglobulin,Clusterin,,Cystatin C,RBP4.

### **Ensayos de metabolismo celular:**

Paneles preformados y a elegir con proteínas de diversas vías:

-Vía de la glicolisis, fosforilación oxidativa, estrés oxidativo, complejo de la piruvato deshidrogenasa.

-Ensayos con proteínas relacionadas con apoptosis,daño de DNA, genotoxicidad, Heat Shock Protein, MAPK / SAPK, Mitogenesis RTK, ensayos multivías, analitos relacionados con NFkB, Src Family Kinase Active Site, STAT, analitos relacionados con receptor de células T, analitos relacionados con TGFb.

-Ensayos con fosfoproteínas: Akt, CREB fosforilada/total, Erk/MAPK, IRS, JNK, mTOR, p38, STAT3,mTOR.

## **4. Medidas de alta sensibilidad y creación de placas con analitos seleccionados de forma personalizada.**

Información de éstos y otros analitos disponibles:

- [https://www.merckmillipore.com/ES/es/life-science-research/protein-detection-quantification/Immunoassay-Platform-Solutions/milliplex-multiplex-assays-using-luminex/UjGb.qB.8WQAAAE\\_rn8RHeN.,nav](https://www.merckmillipore.com/ES/es/life-science-research/protein-detection-quantification/Immunoassay-Platform-Solutions/milliplex-multiplex-assays-using-luminex/UjGb.qB.8WQAAAE_rn8RHeN.,nav)
- <https://www.thermofisher.com/search/results?query=luminex&persona=Catalog&navId=13364%2B13027&resultPage=1&refinementAction=true>
- [http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin\\_6335.pdf](http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6335.pdf)

## **5. Precios a convenir según técnica/Analito.**

## Interesados contactar con:

### 1. *ibs.GRANADA*:

- **Teléfonos:** 958 020 245 / 120 245 (interno)
- **Web:** <http://www.ibsgranada.es/plataformas/plataforma-de-servicios-cientifico-tecnicos/unidad-cientifico-tecnica-laboratorios-investigacion/contacto/>
- **E-mail:** [institutoinvestigacion@fibao.es](mailto:institutoinvestigacion@fibao.es)

### 2. *UCT- Laboratorios Investigación*:

- **Teléfonos:** 659 287 334 / 958 023 980
- **E-mail:** [sonia.morales.exts@juntadeandalucia.es](mailto:sonia.morales.exts@juntadeandalucia.es)  
[palomalancha@hotmail.com](mailto:palomalancha@hotmail.com)/[paloma.muñoz.exts@juntadeandalucia.es](mailto:paloma.muñoz.exts@juntadeandalucia.es)  
[investigacion.chgra.sspa@juntadeandalucia.es](mailto:investigacion.chgra.sspa@juntadeandalucia.es)