

Esperienza 14: il test ELISA

La tecnica di dosaggio immuno-assorbente legato a un enzima (in inglese Enzyme-Linked Immuno Assay) o ELISA è principalmente utilizzato in immunologia al fine di rilevare e/o dosare la presenza di proteine, anticorpi o antigeni nel campione. In particolare questa tecnica è utilizzata per il depistaggio dell'HIV e permette di determinare la concentrazione sierologica di anticorpi diretti contro il virus.

Esistono molti tipi di test ELISA, ma il più utilizzato, quello che proponiamo per questa esperienza, è il test **ELISA indiretto**.

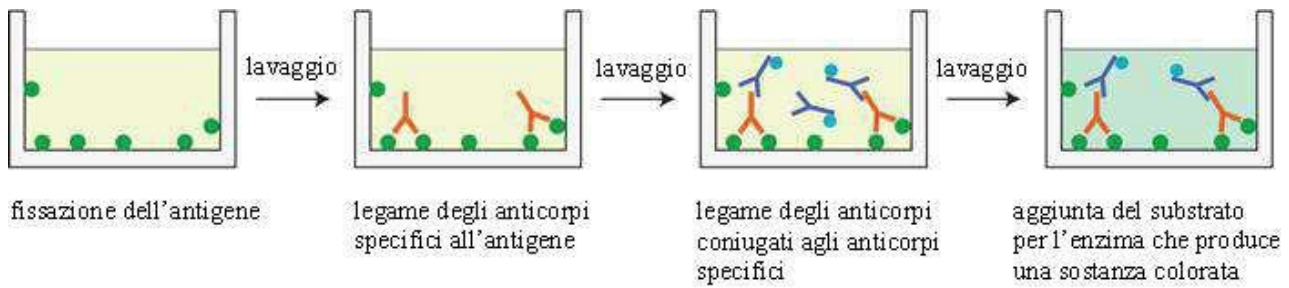
Test ELISA

Il principio del test ELISA indiretto consiste nel rilevare la presenza di un anticorpo specifico nel campione. Per fare ciò abbiamo bisogno:

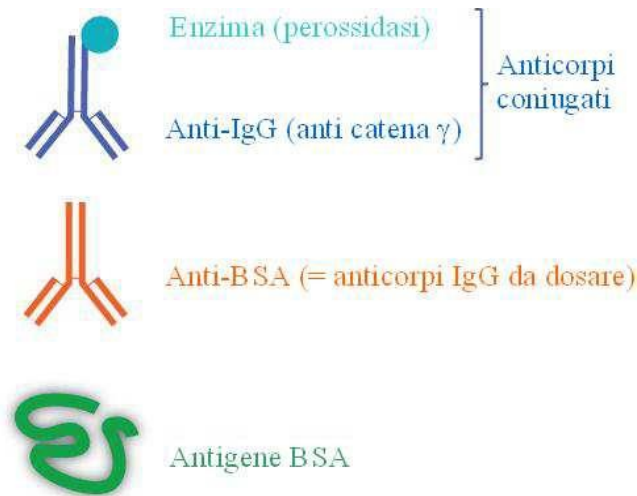
- Di un antigene conosciuto specifico all'anticorpo ricercato.
- Di un campione da analizzare.
- Di un anticorpo secondario anti IgG coniugato a una perossidasi (questo anticorpo riconosce in modo specifico gli anticorpi IgG).
- Di un substrato specifico all'enzima, qui TMB.

Il test comprende quattro tappe principali:

- 1) **Fissazione dell'antigene:** l'antigene conosciuto, specifico all'anticorpo ricercato, è incubato su una piastra di microtitolazione. L'antigene si fissa elettrostaticamente al fondo dei pozzetti. I pozzetti saranno poi lavati per togliere gli antigeni non fissati.
- 2) **Fissazione degli anticorpi da dosare:** si incuba il campione da dosare (siero contenente gli anticorpi), così come gli standard (soluzioni contenenti delle concentrazioni conosciute di anticorpi). Gli anticorpi specifici si fissano agli antigeni. Un lavaggio dei pozzetti è necessario per togliere gli anticorpi non fissati.
- 3) **Fissazione degli anticorpi di rilevazione:** si incubano gli anticorpi secondari coniugati a una perossidasi. È dunque un anti IgG che riconoscerà l'anticorpo primario. Un lavaggio dei pozzetti è necessario per togliere gli anticorpi secondari non fissati.
- 4) **Rilevazione:** si incuba il substrato specifico all'enzima. Nel caso in cui la reazione è positiva (presenza degli anticorpi ricercati) il substrato sarà trasformato e indurrà una colorazione blu. L'intensità della colorazione è proporzionale alla quantità di enzima presente e dunque alla concentrazione dell'anticorpo ricercato.

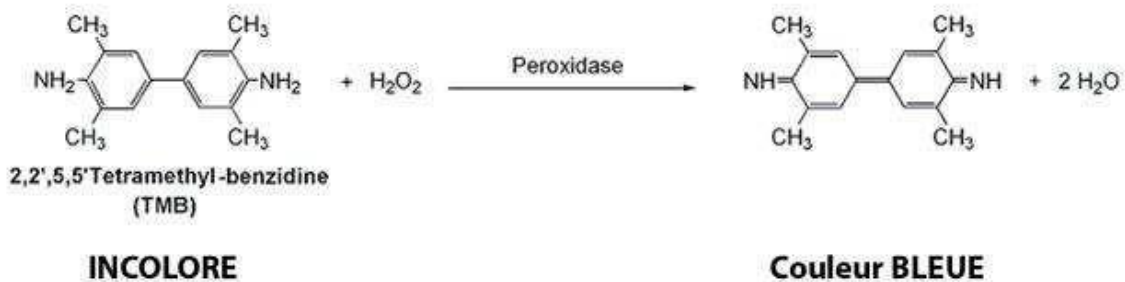


In questa esperienza gli anticorpi da titolare sono degli IgG anti-BSA. L'antigene sarà dunque la BSA (albumina di siero di bovino). L'enzima coniugato all'anticorpo secondario è una perossidasi.



Perossidasi:

La perossidasi è un enzima di tipo ossidasi, che permette la degradazione dei perossidi. L'ossidazione di diversi substrati permette di ottenere un composto cromogenico come prodotto finale.



È nel 1810, prima ancora che il concetto di enzima fosse stato coniato, che si constatava che gli estratti di alcune radici avevano la proprietà di ossidare (dunque di ricolorare) la tintura di guaiaco (incolore allo stato ridotto) in presenza di acqua ossigenata. Attualmente, la risorsa più comune di perossidasi è la radice di ravanello o di rafano.

Soggetti: anticorpi, antigeni, perossidasi.

Protocollo

Per una classe ricevete una piastra da 96 pozzetti divisibile in colonne da 8 tubi. Ogni binomio farà l'esperienza con una barretta da 8 tubi.

1) Fissazione dell'antigene

Da eseguire dall'insegnante o il preparatore il giorno prima dell'esperienza!

Ricevete una soluzione di BSA a 5 g/l.

- Aggiungere 100 µl nei pozzetti (tanto di colonne quanto di binomi).
- Mettere del film alimentare sulla piastra e incubare a 4°C (frigorifero) durante la notte.
- Il giorno dopo staccare le colonne da 8 e distribuirle a ogni binomio.
- Preparare le diluizioni degli standard e gli anticorpi secondari come descritto nella tabella qui sotto:

Diluizioni degli anticorpi

Le diluizioni devono essere effettuate dall'insegnante. Il volume finale di ogni diluizione è calcolato dalla classe.

Curva standard

	C1	C2	C3	C4	C5	C6
Anticorpi anti-BSA	10 µl	2 µl	1 µl	1 µl	1 ml di C4	200 µl di C5
PBS	990 µl	998 µl	1999 µl	5 µl	1 ml	1800 µl
Totale per la classe	1 ml	2 ml	2 ml	4 ml	2 ml	2 ml

- ◆ Distribuire 100 µl di ogni standard a ogni binomio

Anticorpi secondari

	Per la classe
Anticorpi anti-rabbit	1 µl
PBS	10 µl

- ◆ Preparare delle aliquote di 1 ml per binomio

2) Fissazione dell'anticorpo anti-BSA (anticorpo primario)

I pozzetti 1-6 sono utilizzati per la curva standard, il pozzetto 7 è il controllo negativo e il pozzetto 8 sarà il nostro campione da dosare.

- Buttare il resto del liquido nel lavandino o in un becher.
- Sciacquare i pozzetti con 100 µl di PBS – 0.02% Tween. Ripetere l'operazione 3 volte.
- Aggiungere 80 µl di ciascuno dei 6 standard, rispettivamente C1-C6 nei pozzetti 1-6.
- Aggiungere 80 µl di acqua nel pozzetto 7 (controllo negativo) e 80 µl del campione sconosciuto nel pozzetto 8.
- Incubare 30 minuti a RT (temperatura ambiente).

3) **Fissazione dell'anticorpo di rilevamento** (anticorpo secondario coniugato alla perossidasi)

- Eliminare il resto del liquido nel lavandino o in un becher.
- Sciacquare i pozzetti con 100 μ l di PBS – 0.02% Tween. Ripetere l'operazione 3 volte.
- Aggiungere 80 μ l di anticorpi secondari in ogni pozzetto.
- Incubare 20 minuti a RT.

4) **Rilevazione**

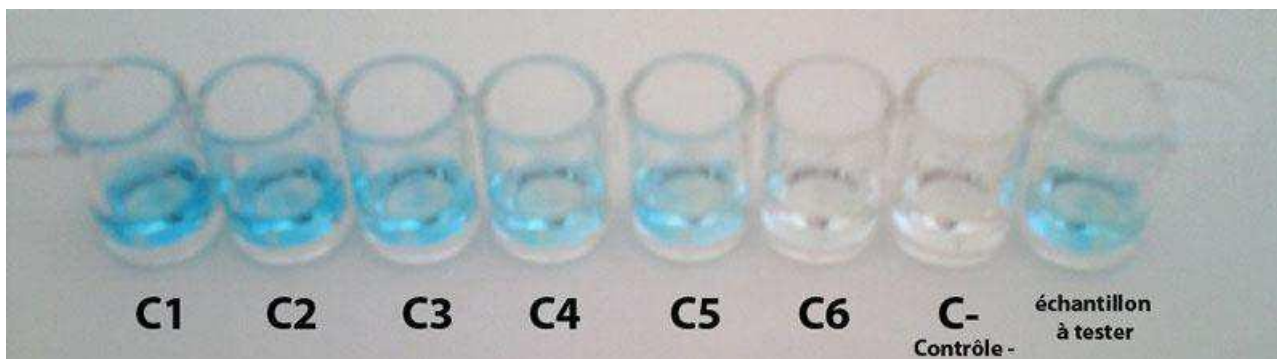
- Eliminare il resto del liquido nel lavandino o in un becher.
- Sciacquare i pozzetti con 100 μ l di PBS – 0.02% Tween. Ripetere l'operazione 3 volte e poi una volta con PBS.
- Aggiungere 80 μ l di TMB in ogni pozzetto.
- Incubare 5 minuti poi interpretare i risultati.

5) **Analisi dei risultati**

Determinare il titolo degli anticorpi anti-BSA nel campione sulla base dell'intensità della colorazione blu.

Concentrazione della curva standard:

C1	C2	C3	C4	C5	C6
1/100	1/500	1/2000	1/5000	1/10000	1/100000



Materiale

Commenti:

- Il punto 1 del protocollo è da effettuare il giorno prima dell'esperienza dall'insegnante o dal preparatore.
- La preparazione degli standard (C1-C6) e la diluizione degli anticorpi secondari devono essere preparate dall'insegnante o dal preparatore.

- P200 e punte gialle
- Piastre di microtitolazione (in strip da 8)
- Soluzione di BSA a 5 g/l
- Anticorpi primari (anti-BSA)
- Anticorpi secondari coniugati alla perossidasi
- Campione da dosare
- TMB (substrato della perossidasi)
- PBS 1x
- Tween 20
- Falcon 15 ml

Stoccaggio del materiale:

- Gli anticorpi sono stoccati a -20°C , scongelati sul ghiaccio e poi rimessi a -20°C dopo l'utilizzo.
- Il TMB si tiene a 4°C .
- La soluzione di BSA si tiene a -20°C .