



Prove pratiche di immunologia

MODULO 8

European Initiative for Biotechnology Education

Gruppo di lavoro:

Lisbet Marcussen (Coordinatore), Birgit Sandermann, Elisabeth Strömberg,
Eckhard R. Lucius, Ute Steffens, Christine Labahn-Lucius



L'Iniziativa Europea per l'Educazione alla Biotecnologia (EIBE) ha per vocazione il miglioramento della comprensione della biotecnologia, di promuovere le sue tecniche, e di stimolare il dibattito pubblico con una formazione adeguata nelle scuole e nelle università dell'Unione Europea (UE).

Corrispondenti dell'EIBE



AUSTRIA

| Rainhart Berner, Höhere Bundeslehr- und Versuchsanstalt für Chemische Industrie Wien, Abt. für Biochemie, Biotechnologie und Gentechnik, Rosensteingasse 79, A-1170 WIEN.



BELGIO

| Vic Damen / Marleen Van Strydonck, R&D Groep VEO, Afdeling Didactiek en Kritiek, Universiteit Antwerpen, Universiteitsplein 1, B-2610 WILRIJK.



DANIMARCA

| Dorte Hammelev, Biotechnology Education Group, Foreningen af Danske Biologer, Sønderengen 20, DK-2860 SØBORG.
| Lisbet Marcussen, Biotechnology Education Group, Foreningen af Danske Biologer, Lindevej 21, DK-5800 NYBORG.



EIRE

| Catherine Adley / Cecily Leonard, University of Limerick, LIMERICK.



FRANCIA

| Gérard Coutouly, LEGTP Jean Rostand, 18 Boulevard de la Victoire, F-67084 STRASBOURG Cedex.
| Laurence Simonneaux / Jean-Baptiste Puel, Ecole Nationale de Formation Agronomique, Toulouse-Auzeville, Boîte Postale 87, F-31326 CASTANET TOLOSAN Cedex.



GERMANIA

| Horst Bayrhuber / Eckhard R. Lucius / Regina Rojek / Ute Harms / Angela Kroß, Institut für die Pädagogik der Naturwissenschaften an der Universität Kiel, Olshausenstraße 62, D-24098 KIEL.
| Ognian Serafimov, UNESCO-INCS, c/o Jörg-Zürn-Gewerbeschule, Rauensteinstraße 17, D-88662 ÜBERLINGEN.
| Eberhard Todt, Fachbereich Psychologie, Universität Gießen, Otto-Behaghel-Straße 10, D-35394 GIEßEN.



LUSSEMBURGO

| John Watson, Ecole Européenne de Luxembourg, Département de Biologie, 23 Boulevard Konrad Adenauer, L-1115 LUXEMBOURG.



ITALIA

| Antonio Bargellesi-Severi / Alessandra Corda Mannino / Stefania Uccelli, Centro di Biotecnologie Avanzate, Largo Rosanna Benzi 10, I-16132 GENOVA.



OLANDA

| David Bennett, Cambridge Biomedical Consultants, Schuytstraat 12, NL-2517 XE DEN HAAG.
| Fred Brinkman, Hogeschool Holland, Academy for Communication, Postbus 261, NL-1110 AG DIEMEN.
| Liesbeth van de Grint / Jan Frings, Hogeschool van Utrecht, Educatie Centrum voor Biotecnologie, FEO, Afdeling Exacte Vakken, Biologie, Postbus 14007, NL-3508 SB UTRECHT.



REGNO UNITO

| Wilbert Garvin, Northern Ireland Centre for School Biosciences, NIESU, School of Education, The Queen's University of Belfast, BELFAST, BT7 1NN.
| John Grainger / John Schollar / Caroline Shearer, National Centre for Biotechnology Education, The University of Reading, PO Box 228, Whiteknights, READING, RG6 6AJ.
| Jill Turner, School of Nursing and Midwifery, 1-3 College Park East, The Queen's University of Belfast, BELFAST, BT7 1LQ.
| Paul Wymer, Society for General Microbiology, Marlborough House, Basingstoke Road, READING, RG7 1AE.



SPAGNA

| María Sáez Brezmes / Angela Gómez-Niño / Rosa M. Villamañán, Facultad de Educación, Universidad de Valladolid, Geologo Hernández Pacheco 1, ES-47014 VALLADOLID.



SVEZIA

| Margareta Johansson, Föreningen Gensyn, PO Box 37, S-26881 SVALÖV.

Coordinatore dell'EIBE

Horst Bayrhuber, Institut für die Pädagogik der Naturwissenschaften an der Universität Kiel, Olshausenstraße 62, D-24098 KIEL, Germany. Telephone: + 49 (0) 431 880 3166 (EIBE Secretary: Regina Rojek). Facsimile: + 49 (0) 431 880 3132.



Esperienze pratiche di immunologia

MODULO
8

European Initiative for Biotechnology Education

CONTENUTI

Contenuti

★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★

I Gruppo di lavoro diritti d'autore	04
I Notizie sul modulo Introduzione	05
I Avvertenze	05
I Kit <i>Trichem</i> ELISA Spiegazioni	06
I Doppia immno-diffusione Spiegazioni	11
I Kit <i>Steffens</i> ELISA Spiegazioni	14

World Wide Web

★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★

Pochi settori conoscono uno sviluppo così rapido come le biotecnologie. La pubblicazione elettronica dei moduli dell'EIBE permette una revisione, un aggiornamento continuo dei contenuti e una diffusione ad un costo ridotto.

Questa pagine (e gli altri moduli EIBE) sono disponibili in tutto il mondo su World Wide Web:

<http://www.reading.ac.uk:8001/>

Tutti i moduli sono documenti in formato PDF, ciò significa che le illustrazioni di alta qualità, i colori, i caratteri tipografici e l'impaginazione verranno conservati qualunque Computer voi abbiate (Macintosh, compreso il Power PC, Windows, DOS e Unix).

I documenti in formato PDF sono anche di dimensione minore rispetto agli originali dai quali derivano e, pertanto, occorrerà meno tempo per trasferire i documenti. Fate attenzione che per visualizzare i moduli dell'EIBE avrete bisogno di una copia del software *Adobe Acrobat*[®] Reader.

Il software *Adobe Acrobat*[®] Reader 3 è disponibile gratuitamente in diverse lingue (olandese, inglese, francese, tedesco, spagnolo, svedese e italiano). Può essere recuperato a partire dal sito:

<http://www.adobe.com/>

Con questo software, è possibile visualizzare e stampare i moduli dell'EIBE e "navigare" facilmente attraverso i documenti.

N.B.: *Adobe* e *Acrobat* sono i marchi depositati di Adobe Systems Incorporated. *Macintosh* è il marchio depositato dell'Apple Computer Incorporated.

Sviluppo del kit

Il kit *TriChem* ELISA utilizzato nella prima attività in questa dispensa è stato realizzato ed è possibile comprarlo presso:

TriChem
Bernahard Olsensvej 23
DK-2830 Virum, DANIMARCA
Telefono: + 45 (0) 45 85 82 83

I diritti d'autore del kit sono di proprietà di *TriChem*. Questo kit è stato adattato ad uso scolastico da *The Danish Immunology Group* e pubblicato su *Immunologyske Smaforsog*, Nucleus Forlag ApS (1994).

ISBN: 87 87661 83 7.

Lisbet Marcussen
Educational Biotechnology Group
Nyborg Gymnasium
Skolebakken 13
DK-5800 Nyborg
e-mail: lisbetma@post2.tele.dk

Il kit *STEFFENSELISA* proposto come terza attività è stato realizzato ed è possibile comprarlo presso:

STEFFENS BIOTECHNISCHE
ANALYSEN GmbH
Baumgartenstr. 5
D-79285 Ebringen (FGR)

Questo kit è stato adattato ad uso scolastico da Eckhard R. Lucius, Ute Steffens e Christine Labahn-Lucius presso The Institut fur die Padagogik der Naturwissenschaften (vd. indirizzo della segreteria EIBE).

Gruppo di lavoro

- **Lisbet Marcussen** (Coordinatore)
Nyborg Gymnasium og HF, Nyborg, Danimarca.
- **Birgit Sandermann Justesen**
Bjerringbro Gymnasium, Bjerringbro, Danimarca.
- **Elisabeth Stromberg**
Ostrabo Gymnasiet, Uddevalla, Svezia.
- **Eckhard R. Lucius, Ute Steffens, Christine Labahn-Lucius**
IPN, Università di Kiel, Germania

Disegni, illustrazioni, impaginazione:

Caroline Shearer, NCBE, The University of Reading, Whiteknights, Reading, RG6 6AJ, Regno Unito

Traduzione:

Sturla Maddalena, Università di Genova

Diritti d'autore

I diritti d'autore sono di proprietà dell'EIBE. Gli autori di questo modulo dichiarano di essere moralmente titolari del copyright secondo la sezione 77 di Designs, Patents e Copyright Act, UK (1998).

Uso didattico

La riproduzione elettronica o stampata della totalità o di una parte del modulo sono autorizzati per l'uso didattico a condizione che le copie siano distribuite gratuitamente o al prezzo di riproduzione e che vengano indicati gli autori e coautori proprietari dei diritti d'autore.

Altri impieghi

Questo modulo non può essere utilizzato a fini commerciali, non diffuso elettronicamente, né spedito via posta. Non può essere diffuso sul World Wide Web senza autorizzazione né in altro modo di distribuzione e riproduzione che si sostituirebbe ad un abbonamento o ad un'autorizzazione individuale d'accesso, né in altri modi che non rispettino queste condizioni.

Utilizzo commerciale

Per utilizzare parzialmente o integralmente questo modulo a fini commerciali o per altre pubblicazioni, dovete contattare:

Segreteria EIBE (Regina Rojek)
c/o Institut für die Pädagogik der
Naturwissenschaften (IPN)

Universität Kiel

Olshausenstraße 62

D-24098 Kiel 1

Germania

Telefono: + 49 (0) 431 880 3137

Fax: + 49(0) 431 880 3132

e-Mail: rojek@ipn.uni-kiel.de

Notizie sul modulo

Le attività di questo modulo sono state realizzate da insegnanti ed educatori provenienti da molti paesi europei sostenuti finanziariamente e moralmente dalla DG XII della Commissione Europea, per l'EIBE, European Initiative for Biotechnology Education.

Tutte le attività sono state testate in esercitazioni di laboratorio a cui hanno partecipato insegnanti e studenti di tutta Europa.

I contenuti e le attività suggerite in questo modulo sono opera degli autori e non della Commissione Europea.

Consigliamo di dedicare particolare attenzione alle indicazioni di sicurezza presenti nelle avvertenze e alle norme specifiche di sicurezza che si incontrano nel testo.

Avvertenze

In tutti i moduli EIBE abbiamo cercato di individuare quello che poteva costituire un pericolo ed abbiamo suggerito le precauzioni più idonee.

Dove è possibile, le metodologie proposte rientrano nei parametri di rischio delle valutazioni generali comunemente adottate. Se sussiste una situazione particolare di rischio, è stata indicata.

Comunque, coloro che usano queste tecniche devono tenere conto che possono esserci degli errori o delle omissioni, e che ogni operatore ed insegnante segue differenti standards di sicurezza. In particolare operatori ed insegnanti DEVONO attenersi alle norme locali vigenti, indipendentemente da ciò che suggerisce la dispensa EIBE.

A meno che vi siano delle indicazioni differenti, si presuppone che:

- l'attività venga svolta in un laboratorio adeguatamente attrezzato e sicuro;
- si utilizzino gli strumenti correttamente e in sicurezza;
- si faccia attenzione alle normali operazioni di laboratorio, come per esempio scaldare le sostanze;
- si svolga l'attività in un laboratorio adeguatamente attrezzato, quando si usano sostanze chimiche o organismi vivi;
- si indossino protezioni per gli occhi, quando c'è rischio per essi;
- bambini e/o agli studenti siano informati delle precauzioni di sicurezza per le attività che richiedano l'uso di sostanze chimiche e di microrganismi.

Kit *Trichem* ELISA per uso scolastico



Introduzione

ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) è un sensibile saggio immunologico che usa un enzima, legato ad un anticorpo o ad un antigene, come marcatore della presenza di una specifica proteina, specialmente un antigene o un anticorpo.

Il test ELISA è un metodo semplice e facile da usare per una rapida indagine di:

- determinare l'uso di droga;
- analisi di numerose malattie infettive, come per esempio HIV;
- identificazione di geni in mutanti (per esempio quelli introdotti da ingegneria genetica);
- cure genetiche.

Lo scopo di questo modulo è quello di dare agli studenti ed agli insegnanti l'opportunità di svolgere da soli un'indagine con il metodo ELISA. Avendo raggiunto una più approfondita conoscenza di questo tipo di analisi d'uso frequente e moderno, essi possono essere maggiormente competenti per partecipare e a discutere su questi metodi.

Per ulteriori informazioni su questa attività potete contattare The Danish Immunology Group or TriChem (l'indirizzo è all'inizio del modulo).

L'esperimento che segue utilizza il test di base dell'ELISA per analizzare campioni di sangue di maiali e determinare se gli animali sono stati esposti all'infezione di alcuni batteri.

Il batterio *Pasteurella multocida*, liberando una tossina, causa varie deformità alle ossa del muso del maiale infettato. Ciò comporta

difficoltà ad assumere cibo, a starnutire e provoca numerosi danni agli organi respiratori. L'infezione è spesso seguita dall'infezione da batterio *Bordetella bronchiseptica*, che peggiora le condizioni. Questo comporta una crescita lenta del maiale e perdite economiche per l'allevatore. Perciò è importante fermare l'infezione il più presto possibile. Il test ELISA può essere usato per individuare la tossina ed anche la presenza del batterio *Bordetella bronchiseptica*.

In questo esperimento si utilizza il batterio *Bordetella bronchiseptica* (*Bb*) come antigene. Il primo giorno di analisi l'antigene viene messo nei pozzetti delle piastre del kit ELISA. Il giorno successivo le piastre sono pronte per l'analisi di campioni di sangue estratto da suini. Se un suino è infetto da *Bb* il campione di sangue reagendo con l'antigene dei pozzetti mostra una reazione positiva e origina un precipitato colorato.

Guida per l'insegnante

Scopo del lavoro

Analizzare di sangue di suino usando il metodo ELISA.

Tempo occorrente

Un giorno - 15 minuti circa

Due giorni - 2 x 45 minuti circa.



Avvertenze

L'acido 5-aminosalicilico non è tossico ed è usato in dosi dell'ordine di grammo per curare malattie umane, ma composti simili hanno mostrato un'azione mutagena. Perciò è necessario utilizzare l'acido con attenzione e provvisti di guanti da laboratorio.

Procedimento

Primo giorno. Preparazione dei reagenti

PBS

Sciogliere il contenuto del flacone "PBS" in 2.5 litri di acqua deionizzata.

Controllare il pH - deve risultare tra 7.1 e 7.5. Se è necessario correggere il pH con 5M NaOH o 5M HCl.

Lasciare da parte 30 ml di questa soluzione per preparare la "SOLUZIONE CON L'ANTIGENE".

Al resto del PBS aggiungere il contenuto del flacone "TWEEN 20".

Una volta versato il contenuto, sciacquare il contenitore con un po' di PBS.

Miscelare bene e chiamare la soluzione ottenuta "TAMPONE DI LAVAGGIO".

Tenere chiuso il recipiente con la soluzione.

Aggiungere al contenuto del flacone

"ANTIGENE Bb" i 30 ml di PBS

Miscelare bene! Questa è la "SOLUZIONE CON L'ANTIGENE".

Le piastre a pozzetti sono in materiale plastico e sono state esposte a raggi ultravioletti per facilitare la capacità di legame e mantenere la sterilità.

L'antigene è un estratto del batterio *Bordetella bronchisepta* (Bb) che è stato reso innocuo portandolo ad alta temperatura.

Secondo giorno. Preparazione dei sieri

Siero n° 1

E' un controllo negativo derivante da un suino che non è stato infettato con Bb.

Sieri dal n° 3 al n° 10

Sieri di cui non si conosce lo stato, provenienti da suini non controllati. Quattro di questi sieri sono negativi e gli altri possono essere positivi.

Siero n°12

Controllo positivo.

Sieri positivi che derivano da suini vaccinati utilizzando Bb reso prima innocuo.

Preparazione della soluzione di legame

La soluzione di legame deve essere preparata al momento dell'uso come segue:

Aggiungere 25 ml di "tampone di lavaggio" nel flacone BSA ed agitare la soluzione sino a completo scioglimento del contenuto, aggiungervi poi il contenuto del flacone "coniugato" che viene poi risciacquato con parte della stessa soluzione con BSA.

Il coniugato è costituito dall'anticorpo di coniglio anti-immunoglobuline di suino, legato all'enzima perossidasi. (Questo enzima è stato estratto da cavallo).

BSA

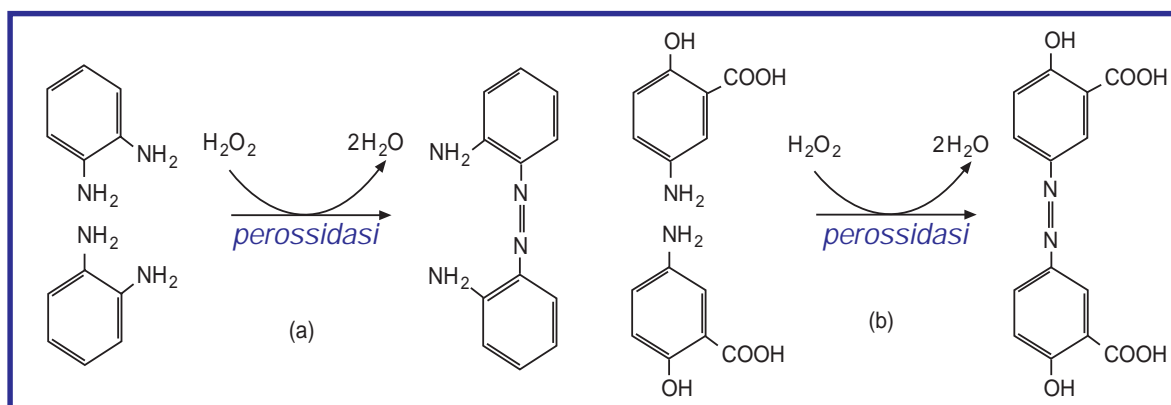
(Albumina di siero bovino)

La BSA è usata per evitare legami non-specifici di anticorpi o complessi coniugati sulla parete dei pozzetti. La BSA viene usata in una concentrazione tale da essere assorbita dai siti presenti sulla superficie dove non c'è legame.

Soluzione contenente il substrato

Importante: questa soluzione deve essere preparata al momento dell'uso!

Versare l'acido 5-amminosalicilico contenuto nel flacone "substrato" nel contenitore "Tampone H₂O₂ del substrato". Miscelare sino a completo scioglimento. **Usare i guanti.**



sopra: a) ossidazione di *O*-fenilendiammina

b) ossidazione di acido 5-amminosalicilico

Note per l'insegnante sui risultati

Risposte alle domande

1. I sieri negativi sono 4, 5, 8 e 9.
I sieri positivi sono (in ordine decrescente rispetto al risultato di reazione): 6, 7, 10 e 3.
Il siero negativo n° 1 è il controllo negativo prelevato da un suino non infetto da Bb.
Il siero n° 12 è il controllo positivo.
3. Vengono usati come antigeni i virus del morbillo e come coniugato anticorpi anti-IgG umane.
4. Il materiale patogeno anche se reso innocuo può essere pericoloso per gli uomini. E' difficile procurarsi un siero umano che sia libero al 100% da patologie umane come epatiti o HIV.

Nota:

Un risultato positivo non indica necessariamente che l'animale sia infetto. Potrebbe essere guarito dopo essere stato infettato.

Attrezzature e materiali

Ricordarsi che quando si riceve il kit alcuni dei reagenti vanno conservati congelati.

Micropipette da 100 µl
Beaker da 100 ml
Cilindri graduati da 20 ml e 100 ml
Ancoretta magnetica
Beuta da 3 litri
2.5 litri d'acqua deionizzata
5M HCl
5M NaOH
Guanti da laboratorio (extra-kit)
Pennarelli ad inchiostro indelebile
Flacone di antigene (estratto denaturato di Bordetella bronchiseptica)*
Scatola contenente 10 fiale di siero suino*
Flacone di substrato - acido 5-amminosalicylico (30 mg)*
Flacone di complesso coniugato - anticorpo di coniglio anti-immunoglobuline di suino coniugato all'enzima perossidasi*
Una fiala di tampone con H₂O₂ per il substrato*
Piastre suddivise in pozzetti con coperchio*
Flacone di sali per preparare il PBS (tampone fosfato)*
Bocchetta (2.5 ml) di Tween 20 (detergente sintetico)*
Pipette in plastica*
Guanti da laboratorio*
Flacone di BSA (Albumina siero bovino)*
Palette in plastica*
Sacchetti sterili*

* incluso nel kit.

Guida per lo studente



Procedimento

Primo giorno

Riempire i pozzetti con l'antigene:

1. Porre 100 µl di antigene nei pozzetti A,B,C. Sono presenti 3 pozzetti marcati A, B e C per ognuna delle 12 colonne (per un totale di 36 pozzetti).
2. Coprire i pozzetti e lasciare le piastre a temperatura ambiente fino al giorno successivo. Se non è possibile continuare l'esperimento il giorno successivo, porre le piastre in frigo.

Secondo giorno

Rimuovere l'antigene in eccesso

1. Rimuovere il contenuto dai pozzetti (capovolgere e scrollare sul lavandino)
2. Scrollare le piastre per asciugare i pozzetti.

Lavaggio:

3. Riempire i pozzetti col tampone di lavaggio. Attendere per un minuto!
4. Svuotarli completamente (scrollare la piastra per asciugarla se necessario).
5. Ripetere le note 3 e 4 due volte.

Aggiungere i sieri:

6. Agitare le soluzioni scongelate dei sieri.
7. Aggiungere 100 µl di siero n° 1 nei pozzetti marcati A, B e C della colonna 1 (3 pozzetti).
CAMBIARE IL PUNTALE DELLA PIPETTA!
8. Aggiungere 100 µl di siero 3 nei pozzetti marcati A, B e C della colonna 3.
La colonna 2 si lascia inutilizzata.
CAMBIARE IL PUNTALE DELLA PIPETTA!
9. Continuare allo stesso modo riempiendo i pozzetti delle colonne 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, e 12. Le colonne 2 e 11 non si usano.
RICORDARSI DI CAMBIARE IL PUNTALE OGNI VOLTA CHE SI CAMBIA SIERO.

10. Incubare le piastre per 15 minuti a temperatura ambiente.

Rimuovere l'eccesso di siero:

11. Vuotare tutti i pozzetti allo stesso tempo. Scrollare la piastra per asciugarla se necessario.
12. Sciacquare, vuotare e asciugare come descritto alle note 3 e 4 per tre volte.

Aggiungere il coniugato:

13. Aggiungere 100 µl di complesso coniugato in tutti i pozzetti marcati con A, B e C.
14. Incubare le piastre per 15 minuti a temperatura ambiente.
15. Lavare, vuotare ed asciugare come descritto alla nota 12.

Aggiungere il substrato:

16. Aggiungere 100 µl di soluzione di substrato in tutti i pozzetti.
17. Attendere che si riveli il colore. Prendere nota dei risultati in una tabella usando una scala da 0 a 5 per esprimere l'intensità del colore. 0 indica una reazione negativa e 5 la reazione più positiva. Si possono anche descrivere i colori.

Eliminazione dei rifiuti di reazione:

Porre piastre e puntali in un contenitore di plastica e gettarli via. La soluzione restante si può versare nel lavandino.

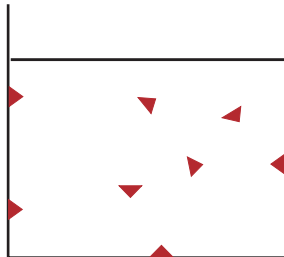
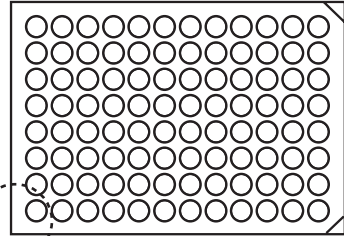
Risultati e valutazioni

1. Quale dei sieri ignoti era positivo? Porre i sieri in ordine crescente di risultato positivo.
2. Quale tipo di errore è possibile che si verifichi in questo tipo di analisi?
3. Se si desidera fare un test simile per trovare degli anticorpi contro virus umani di morbillo, quale dei reagenti bisognerebbe sostituire?
4. Per quale motivo ritenete che non venga utilizzato questo test per una analisi su morbillo?

ELISA saggio proteico

Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

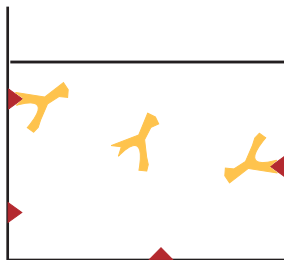
Dopo l'aggiunta di ogni reagente, la piastra viene lasciata in incubazione, successivamente i pozzetti vengono sciacquati per rimuovere i reagenti che non si sono legati.



- 1. Viene posta nel pozzetto la proteina (antigene) affinché si leghi alle pareti.**



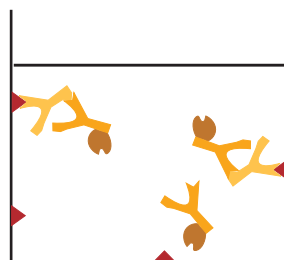
Sciacquare i pozzetti per rimuovere le molecole che non si sono legate



- 2. Aggiunta del campione. Gli anticorpi si legano agli antigeni.**



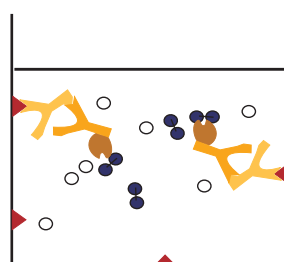
Sciacquare i pozzetti per rimuovere le molecole che non si sono legate



- 3. Aggiunta del complesso coniugato anticorpo secondario-enzima. Il complesso coniugato si lega all'anticorpo primario-antigene.**



Sciacquare i pozzetti per rimuovere le molecole che non si sono legate



- 4. Aggiunta del substrato incolore che in presenza del legame enzimatico sviluppa un colore.**

Come individuare la presenza di uovo in differenti cibi con la doppia immuno-diffusione



Le uova sono usate in differenti tipi di cibo come, per esempio, gli hamburgers, la pasta e qualche volta il gelato. Molte persone sono allergiche alle uova anche se sono presenti in piccola quantità. E' possibile individuare anche piccole tracce sia di albume che di tuorlo usando anticorpi contro ovalbumina. Il metodo che viene utilizzato si chiama doppia immuno-diffusione.

Quando l'antigene e l'anticorpo reagiscono legandosi tra di loro, nel punto dove reagiscono, originano un precipitato. Se la reazione avviene su un mezzo di supporto come, per esempio, un gel di agar, i reagenti formano un precipitato a forma d'arco o di linea, che può essere usato per identificare la presenza di antigeni e anticorpi in miscele complesse.

Il precipitato si forma perchè l'anticorpo e l'antigene hanno più di un sito di legame sicchè si forma una grossa struttura. Una bassa specificità comporta una minor formazione di precipitato.

Il metodo della doppia immuno-diffusione è stato sviluppato dallo svedese Orjan Ouchterlony circa 30 anni fa. Questo tipo di analisi si chiama "doppia", in riferimento al fatto che in questa procedura l'anticorpo e l'antigene possono migrare l'uno verso l'altro in un gel e si forma un arco o una linea di precipitato dove i due, una volta incontratisi, reagiscono.

Questa reazione di precipitazione è altamente specifica e sensibile ed è oggi usata per le diagnosi, la rivelazione di proteine, di antigeni ed anticorpi.

Guida per l'insegnante

Scopo del lavoro

Individuare la presenza di ovalbumina di differenti cibi.

Tempo di preparazione

Una giornata: 60 minuti, più la notte fino a quando si è formata la linea di precipitato (vd. le note per l'insegnante) e 20 minuti per analizzare il risultato. (Se si desidera effettuare anche una colorazione del preparato occorrono altre 2 ore e 45 minuti).



Avvertenze

Non è necessaria alcuna particolare precauzione.

Note

Preparazione dei pozzetti

E' necessario praticare i pozzetti nel gel secondo un regolare disegno. Perciò sarebbe bene iniziare a fare il primo pozzetto vicino al margine e lasciare dello spazio prima di fare un secondo pozzetto. Utilizzare cannucce o pipette in plastica. Le linee di precipitazione si formano più rapidamente se si riduce la distanza tra i pozzetti. Una distanza di 5 mm mostra un risultato dopo 24 ore e una distanza di 10 mm mostra un risultato dopo 48 ore.

Dopo il primo giorno:

Se si usano dei vetrini e nel laboratorio l'ambiente è caldo e asciutto occorre conservare in contenitore con un alto grado di umidità, ad esempio, in una Petri provvista di una spugna o carta da filtro umida, coperta da un foglio di plastica fino al giorno successivo. Se è necessario

conservare i vetrini per molti giorni, si raccomanda di tenerli in una scatola di plastica (umida), in presenza di conservanti per evitare la formazione di muffe.

I vetrini sono pronti dopo una notte, ma si possono conservare per una settimana in frigo.

Soluzione di controllo

Poichè può essere difficoltoso preparare la soluzione di controllo, è una buona idea prima sbattere insieme alcuni albumi e poi preparare la soluzione di controllo con una parte della soluzione ottenuta dagli albumi.

Ovalbumina - anticorpo

Ricostituire l'anticorpo liofilizzato e congelato in tampone TRIS seguendo le istruzioni presenti nella confezione. Questa soluzione può essere aliquotata in eppendorf e conservata congelata.

Rifiuti

Ogni cosa può essere eliminata come un normale rifiuto

Colorazione

La colorazione non è necessaria, ma può aiutare nell'interpretazione del risultato. Le colorazioni che si possono utilizzare sono Amido Black e Coomassie Brilliant Blue.

Attrezzature e materiali

Vetrini da microscopio o piccole Petri circolari (diametro 5 cm)
Cannucce o pipette in plastica del diametro di 2.5 mm per creare nel gel piccoli pozzetti
Micropipette: 0-10 cm³
Camera umida per i vetrini, ad esempio una scatola in plastica con della carta assorbente bagnata o piccole Petri circolari di plastica (diametro 5 cm)
Omogenizzatore/ liquidificatore
Asciugacapelli*
Carta da filtro
Bilancia - fino 1 kg*
Contenitore per colorare il gel*
Tampone-TRIS 0.01M, pH 8.0
Soluzione di agarosio in tampone TRIS
Soluzione di controllo: 0.01 % albume diluito in acqua deionizzata
Anticorpo suscitato in coniglio contro ovalbumina (Pharmacia AS-23)
Acido acetico
Metanolo
Soluzione di Amido Black (0.1 g di Amido Black sciolto in 100 ml di una miscela di acido acetico, metanolo e acqua deionizzata nelle seguenti proporzioni 10:70:20)*
Soluzione di cloruro di sodio - 0.9%
Soluzione di decolorazione contenente acido acetico 10%, metanolo 70% ed acqua deionizzata 20%*

*Necessario solo se si esegue la colorazione.

Guida per lo studente



Procedimento

Preparazione dei campioni

1. Omogenare 5 g di campione da analizzare in 5 ml di acqua.
2. Centrifugare il campione omogenato 15 minuti a 6000 rpm (o 10 minuti a 9500 rpm).
3. Filtrare il sopranatante in una siringa dotata di filtro

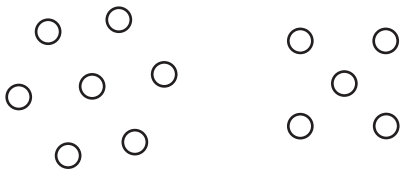
Preparazione del gel

4. Sciogliere la giusta quantità di agarosio in tampone TRIS (1%). Mescolare. Per una Petri (5 cm) occorrono 3-5 ml e per un vetrino 3.5 ml.
ATTENZIONE! BOLLE FACILMENTE!
5. Portare a 60-80 °C.
6. Porre le Petri o i vetrini su un piano vicino al bordo. Togliere i coperchi.
7. Mettere il gel caldo nelle Petri o sui vetrini - è sufficiente uno strato di 2-3 mm. Mettere i coperchi.
8. Lasciare solidificare il gel - occorrono circa 5-10 minuti.

Preparazione dei pozzetti

9. Usare una cannuccia o una pipetta del diametro di 2.5 mm per fare i pozzetti nel gel. Attenzione a farli con i bordi verticali. Togliere il gel dal pozzetto risucchiando con la pipetta o usando un ago. Seguire una delle seguenti disposizioni.

Aggiunta dell'anticorpo



N.B. Marcare i pozzetti sul fondo della Petri o sul vetrino prima di riempirli.

10. Riempire il pozzetto centrale con l'anticorpo (anti-ovalbumina) - è sufficiente porre 5-10 µl.
NON FARE TRABOCCARE L'ANTICORPO DAL POZZETTO.

Aggiunta dell'antigene

11. Riempire alcuni pozzetti più esterni con la soluzione di controllo
NON FARE TRABOCCARE LA SOLUZIONE DI CONTROLLO
12. Riempire gli altri pozzetti esterni con il campione da controllare. Annotarsi in quali pozzetti esterni è presente il campione.
NON FARE TRABOCCARE LA SOLUZIONE DI CAMPIONE

Lasciare che avvenga la diffusione ponendo le Petri o i vetrini una notte in camera umida a temperatura ambiente o in frigo.

13. Successivamente è possibile osservare linee o archi di precipitato bianco dove è avvenuta una reazione positiva. Le linee si osservano più facilmente ponendo le Petri o i vetrini in campo scuro.

Colorazione (facoltativa)

14. Rimuovere le proteine non precipitate sciacquando il gel con NaCl 0.9% per 60 minuti a temperatura ambiente
15. Togliere la soluzione e riempire il contenitore con acqua deionizzata.

Lasciare per 60 minuti a temperatura ambiente.

16. Rimuovere l'acqua.
Pressare il gel tra 10 fogli di carta da filtro sotto un peso di circa 1 Kg per 15 minuti.
17. Asciugare il gel usando un asciugacapelli.
18. Immengere il gel nella soluzione di colorazione per 10 minuti.
19. Rimuovere la soluzione.
Decolorare con la soluzione di decolorazione per 10 minuti. Se necessario ripetere la decolorazione.

Risultati

La minima presenza di albumina osservabile è di 2.5 mg in 100 g. Se sono presenti altre proteine di pollo nel campione, occorre far attenzione ad una possibile cross-reazione. Inoltre, il tuorlo contiene abbastanza proteine di albumina per dare risultati in questa analisi.

Kit **STEFFENS** ELISA per uso scolastico



Introduzione

In questo kit un anticorpo policlonale contro il virus (PFBV) che altera il colore del fiore del Pelargonium è presente all'interno di una serie di capsuline e questa disposizione permette di effettuare un test in modo semplice ed economico con una classe.

La peculiarità del kit è di permettere di individuare sensibilmente e con sicurezza, l'infezione di PFBV su 2 x 10 campioni. Controlli positivi e negativi sono presenti sulle punte di un pettine.

La sensibilità del test dipende dall'estratto di pianta infetta (*Chenopodium quinoa*) diluito in tampone. Il virus può essere individuato in una diluizione di 1:1000 - diluizione del 10% dell'estratto.

I reagenti del kit possono restare stabili fino alla data di scadenza segnata sull'etichetta se conservati a 4 °C.

Referenze

Bomer, H. (1989) *Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*. UTB 518. Stoccarda, Verlag Eugen Ulmer.

Clark, M.F. and Adams, A.N. (1977) *Journal of General Virology*, **34**, 475-483.

Hollings, M. and Stone, O.M. (1974) *Description of plant viruses*. CMI/AAB, **130**, 4.
Nelln, U (1992) *The ELISA test: a universal procedure for the identification of antigens on the basis of biotechnologically produced monoclonal antibodies - information and school-experiment*. *Biotechnology Education* (**3**) 3, 107-112.

Guida per l'insegnante

Materiali

Per ogni test è necessario:

Kit STEFFENS ELISA 2 x 12 analisi (numero d'ordine 04093P00):

- In un contenitore di plastica, insieme ad accessori antiumidità, sono presenti in pacchetti separati:
- Uno speciale pettine con 12 punte nelle quali si trova l'anticorpo contro PFBV
- 3 strisce di 12 pozzetti di reazione
- 10 contenitori per l'estratto (contenitori in plastica con cotone)
- 50 ml di tampone pronto per l'uso (giallo)
- 12 pipette monouso (per i 10 campioni, il coniugato ed il substrato)
- 1 pipetta monouso graduata (per il tampone)
- una pipetta non-graduata monouso con punta sottile (per il coniugato concentrato)
- 1 boccetta con 0.05 ml di coniugato concentrato (incolore)
- un piccolo flacone con tappo svitabile con 1.6 ml di tampone per il coniugato (blu)
- un piccolo flacone con tappo svitabile con 1.6 ml pronto all'uso per il substrato (incolore)
- un porta pipette (presente nel pacco)

Del kit occorre preparare precedentemente al test:

(Tutti i reagenti devono essere portati a temperatura ambiente prima di iniziare il test).

Le tre strisce con i pozzetti devono essere poste nel supporto formato dal coperchio del contenitore.

Il coniugato concentrato deve essere trasferito per intero nel tampone blu, usando la pipetta a punta fine a disposizione. Fate attenzione che non restino gocce di coniugato nel coperchio della boccetta dove era conservato.

In aggiunta, occorre:

- Almeno 10 piante di *Pelargonium* di diversa derivazione
- Forbici
- Omogenizzatore (si può utilizzare un oggetto come un pestello)
- Acqua fredda
- Lettore fotometrico (650 nm) se è disponibile (il risultato può essere valutato visualmente)
- Contenitore per rifiuti.

Tempo occorrente

Si suggerisce il seguente piano di lavoro:

Primo giorno

- Introduzione dell'argomento
- Reazioni tra antigene ed anticorpo
- Virus patogeni
- Lavoro a casa - raccogliere materiale da campionare (*Piante di Pelargonium* o foglie recise)

Secondo giorno

- Omogenare i 10 campioni negli appositi contenitori per gli estratti (lavoro di gruppo tra studenti)
- Preparare i pozzetti e le soluzioni e caricare i campioni
- Gli studenti o gli insegnanti seguono le tappe di reazione
- Valutazione dei risultati

Terzo giorno

- Discussione dei risultati
- Quali fattori favoriscono l'infezione del virus?
- Motivazioni per riprodurre piante

Suggerimenti e consigli

Composizione del kit: il kit ELISA comprende due sets di 12 analisi, con tutte le parti fornite in duplicato. Metà dei componenti si possono lasciare nella confezione e conservare a freddo (4°C) per poterli usare successivamente.

Pipette: i puntali delle pipette non devono essere toccati.

Omogenizzatore: al posto di un omogenizzatore si possono usare oggetti con superficie liscia, come il manico di un cacciavite o un pestello.

Pettine speciale: Il pettine per il test antigene-anticorpo è presente insieme a tre serie di capsuline sistemate in separati contenitori di plastica con accessori antiumidità. L'anticorpo policlonale è immobilizzato in cima ai denti del pettine, esso riconosce il *Virus Pelargonium flower break* (PFBV). La punta n°11 (verde) del pettine è il controllo negativo, la punta n°12 (rossa) è il controllo positivo. Il pettine deve essere tenuto solo dal manico verde. Evitare di toccare le punte.

Preparazione dei pozzetti: bisogna aprire la busta all'interno della scatola e prelevare metà dei contenitori e delle pipette. Il coperchio del compartimento interno deve essere capovolta per formare il supporto alle tre serie di pozzetti. L'orientazione delle serie non è importante. E' meglio lasciare il pettine nella scatola così le punte non vengono toccate inavvertitamente. Non è necessario conservare gli accessori antiumidità che possono essere gettati.

Coniugato: Il coniugato concentrato deve essere trasferito completamente nel tampone blu usando l'apposita pipetta con punta fine. Fare attenzione che non restino gocce nel tappo del contenitore del coniugato. Gettare la pipetta dopo l'uso. Coniugato e tampone devono essere ben miscelati.

Rifiuti: Dopo aver osservato il test, sciacquare il pettine e i pozzetti con acqua corrente prima di gettarli. Non riutilizzare i pozzetti, anche dopo averle lavati abbondantemente, in quanto possono dare risultati inesatti.

Nota sui risultati per l'insegnante

L'illustrazione schematica seguente della terza serie di pozzetti mostra un tipico risultato:



Pozzetto 11 (controllo negativo - corrisponde al punto verde del pettine), la reazione dovrebbe essere incolore.

Pozzetto 12 (controllo positivo - corrisponde alla punto rosso del pettine), dovrebbe formarsi un blu intenso. Confrontare questi risultati con quelli dei campioni (pozzetti da 1 a 10). Il tono del colore varia tra blue chiaro e scuro in proporzione all'intensità della infezione presente nella pianta esaminata.

Avvertenze

Agenti chimici

Composizione del tampone per il campione: tampone TRIS/HCl, polyvinylpyrrolidone, cloruro di sodio, Tween 20, sodio azide, colorante - E 102.

Composizione del coniugato: tampone fosfato, perossidasi, siero albumina bovino, Tween 20, Bronidox L (5-bromo-5-nitro-1,3-dioxane), colorante E 131.

Composizione del substrato: TMB (Tetramethylbenzidina), tampone, H₂O₂.
N.B. I reagenti contengono sodio azide e Bronidox L come stabilizzatori. Essi sono tossici se ingeriti!

Disposizioni

Nessun particolare problema.

Garanzie e responsabilità

EIBE non dà garanzie e non ha responsabilità rispetto al materiale o agli agenti chimici del kit.

Steffens Biotechnische Analysen GmbH garantisce che i prodotti sono stati testati a fondo in modo che il kit abbia le peculiarità della descrizione. Non vengono date ulteriori garanzie.

Steffens Biotechnische Analysen GmbH non è responsabile per i danni dovuti un utilizzo o conservazione impropri del kit.

Tabella dei risultati

Campione n°	Caratteristiche (nome del campione, origine)	Osservazioni (note del test)	Risultati
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11	Controllo negativo		incolore
12	Controllo positivo		blu

Guida per lo studente



Introduzione

L'immunobiologia è uno dei più importanti settori di ricerca della biologia applicata di oggi. Risale all'inizio di questo secolo quando Paul Ehrlich (Premio Nobel 1908) ha scoperto il ruolo degli anticorpi per combattere le malattie infettive.

La resistenza immunitaria dei vertebrati deriva dalla formazione di uno specifico complesso antigene-anticorpo. È un antigene ogni sostanza capace di stimolare la produzione di un anticorpo. L'antigene può essere ogni componente organico, come un polisaccaride, una proteina, un peptide o un acido nucleico.

Alcune proteine globulari endogene, chiamate immunoglobuline, agiscono come anticorpi. Queste "riconoscono" la superficie della struttura di un antigene a livello molecolare e si combinano con esso a formare un complesso insolubile.

Questa caratteristica degli anticorpi è utilizzata nelle analisi dei processi immunologici. Possono essere identificate minuscole tracce di antigeni (10^{-8} g/ml per campione). In passato gli anticorpi venivano estratti da animali ai quali erano stati iniettati particolari antigeni, tuttavia questo metodo dava una scarsa produzione di anticorpi. Si è avuto un miglioramento con lo sviluppo del "metodo degli ibridomi", che viene oggi usato per produrre anticorpi "monoclonali". Con tecniche di biotecnologia si produce un ibrido cellulare dato dalla combinazione di anticorpi animali, che originano linfociti e cellule tumorali, queste hanno le caratteristiche di entrambi e cioè di essere capaci di replicarsi all'infinito e di produrre anticorpi "monoclonali". Gli anticorpi utilizzati per un test diagnostico devono essere marcati in modo da rendere visibile il complesso antigene-anticorpo. Per questo motivo gli anticorpi sono spesso legati ad un enzima. L'enzima può allora reagire con un substrato trasformandolo in un precipitato colorato. Il colore derivato dalla reazione indica un campione positivo.

Il test ELISA si basa su questo principio: Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay. Una ampia varietà di antigeni possono essere esaminati con questo metodo, compresi quelli di origine virale.

Malattie virali possono infettare non solo gli animali e gli esseri umani, ma anche le piante. Il diffondersi di materiale infetto, dovuto ai metodi di propagazione usati in agricoltura e nei vivai, aumenta l'importanza di ELISA in questo campo.

Questo test individua la presenza di un virus infettivo del geranio. L'infezione del ***Pelargonium flower break virus*** (PFBV) induce la pianta a produrre fiori di un colore indesiderato. Questa è una infezione frequente dei gerani perciò non è difficile trovare dei campioni infettati da testare. Il principio del test si basa sulla tecnica chiamata "sandwich": un anticorpo immobilizzato si lega all'antigene se questo è presente nel campione, un secondo anticorpo si lega al precedente formando con essi un complesso anticorpo-antigene-anticorpo. Il secondo anticorpo è marcato con un enzima che trasforma il substrato incolore in un precipitato colorato.

Nel kit *STEFFENSELISA* il primo anticorpo contro PFBV è immobilizzato sulle punte di un pettine speciale.

Prima reazione

Gli antigeni PFBV presenti nei campioni si legano agli anticorpi immobilizzati sul pettine. Sulle punte del pettine si forma il complesso antigene-anticorpo.

Seconda reazione

Un secondo anticorpo contro PFBV, che è marcato horse radish peroxidase (enzima coniugato) si lega al complesso antigene-anticorpo sulle punte del pettine.

Terza reazione

Il complesso antigene-anticorpo che è marcato con l'enzima trasforma il substrato tetramethylbenzidina in un precipitato blu. I campioni infettati da PFBV mostrano il colore blu, i campioni non infetti restano incolore.

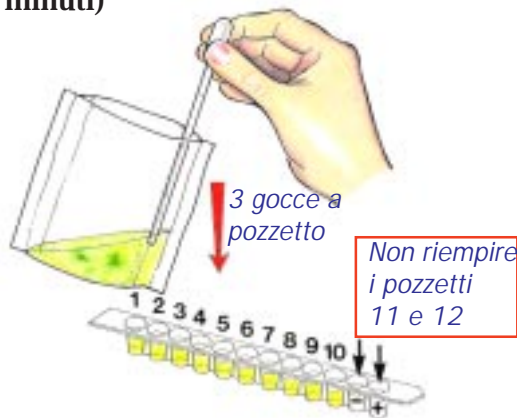
Procedimento

1. Preparazione dei campioni (10 minuti)



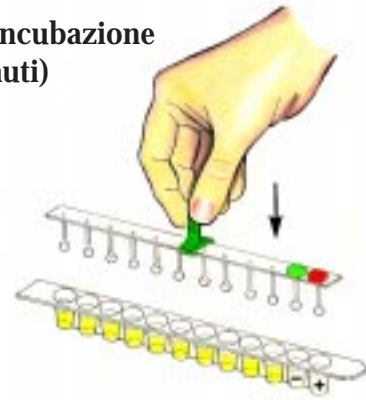
- 1.1 Mettere un pezzetto della foglia di Pelargonium circa 15 cm² (circa 0.5 g) nel centro del sacchetto di garza destinato alla preparazione dell'estratto.
- 1.2 Aggiungere 5 ml di tampone (giallo) con una pipetta graduata. Evitare di contaminare il tampone rimasto nel flacone con l'estratto della pianta in esame.
- 1.3 Mettere il sacchetto per la preparazione dell'estratto su una superficie liscia e con una moderata pressione muovere su di esso, con movimento circolare, l'utensile scelto come omogenizzatore, fino a formare una sospensione fine. Il rilascio della clorofilla (colore verde) è indice di un buon estratto.

2. Distribuzione dei campioni (5 minuti)



- 2.1 Numerare i campioni da 1 a 10 e trasferire tre gocce nella prima serie di pozzetti numerati, lavorare da sinistra a destra. **Cambiare la pipetta per ogni campione.**
- 2.2 Lasciare i pozzetti n° 11 e n° 12 all'estremità destra vuoti, restano vuoti per questa prima parte di lavoro.

3. Prima incubazione (10 minuti)



- 3.1 Porre il pettine nella prima serie di pozzetti in modo che i controlli (che sono fissati sul pettine - le punte rossa e verde) corrispondano con i pozzetti n° 11 e n° 12. Questa prima reazione di inizio richiede un tempo di incubazione di 10 minuti. (Usare questo periodo per preparare il coniugato).

4. Preparazione del coniugato



- 4.1 Utilizzando la pipetta con punta fine, trasferire completamente il coniugato concentrato nel tampone specifico blu. Far attenzione a non lasciare alcuna goccia nel contenitore del coniugato. Mescolare bene.

5. Distribuzione del coniugato



- 5.1 Usando una nuova pipetta, mettere tre gocce di coniugato diluito in ogni pozzetto (compresi i pozzetti n° 11 e n° 12) di una nuova serie. Evitare di contaminare la terza serie di pozzetti (vuoti).

6. Lavaggio del pettine (30 minuti)



- 6.1 Dopo 10 minuti di incubazione, rimuovere il pettine dalla prima serie di pozzetti.
- 6.2 Lavare le punte in acqua fredda corrente con getto moderato per 15 - 30 secondi. Non mettere il pettine verticalmente sotto l'acqua per evitare contaminazione tra le punte. Un perfetto risciacquo è necessario per evitare colorazione di fondo.
- 6.3 Rimuovere l'acqua dal pettine con un rapido scrollo.

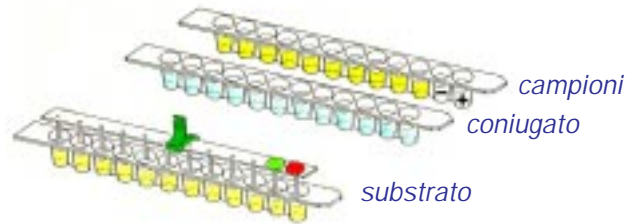
7. Incubazione con il coniugato (10 minuti) e distribuzione del substrato



- 7.1 Mettere il pettine nella seconda serie i pozzetti, sempre con i controlli sul lato destro (punte rossa e verde).
- 7.2 Incubare per 10 minuti.
- 7.3 Utilizzando una nuova pipetta mettere tre gocce di soluzione di substrato in ogni pozzetto della terza serie (compresi il n° 11 e n° 12).

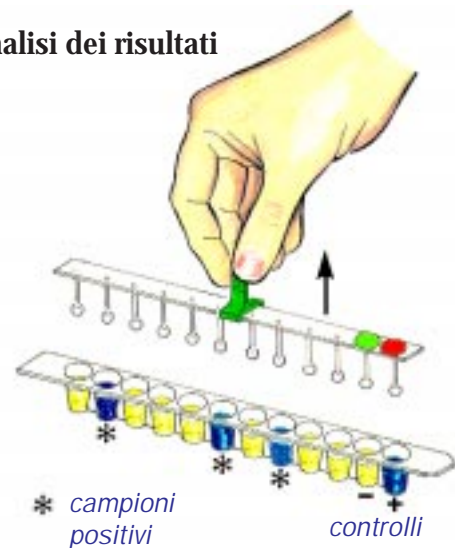
N.B. Il substrato è sensibile alla luce. Evitare di lavorare alla luce diretta.

8. Incubazione con il substrato (11 minuti)



- 8.1 Dopo l'incubazione, lavare nuovamente il pettine in acqua corrente fredda come descritto al punto 6.
- 8.2 Mettere il pettine nella terza serie di pozzetti (contenente il substrato) mettendo le punte di controllo sul lato destro. Incubare per 10 minuti. Evitare l'esposizione alla luce diretta.

9. Analisi dei risultati



- 9.1 Una buona valutazione del test si ottiene appena si toglie il pettine dai pozzetti dopo l'ultima incubazione. Ciò è possibile osservando e annotando il colore che si è sviluppato o con l'aiuto di un lettore fotometrico (650 nm).
- 9.2 I controlli servono per interpretare il test. Se il controllo positivo mostra un blu intenso, mentre il controllo negativo resta di un colore molto tenue, il test è stato svolto perfettamente. Ogni campione che presenta un colore di reazione più intenso del controllo negativo appartiene ad una pianta infetta. Se il campione è incolore o ha lo stesso colore del controllo negativo, appartiene ad una pianta non infetta. La presenza di infezione non si può tuttavia escludere, in quanto può succedere che la concentrazione del virus sia così bassa da non essere rilevabile dal test.