



PLS-BIOTECNOLOGIE

Dipartimento di Scienze

ATTIVITA' LABORATORIALE 2017-2018

Test ELISA ***(enzyme-linked immunosorbent assay)***

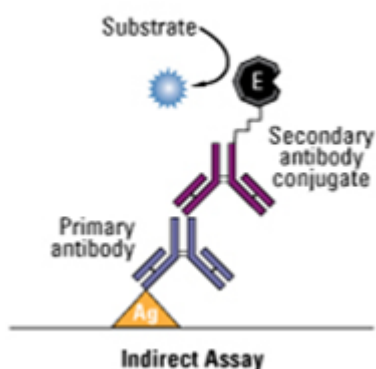
Determinazione della presenza/assenza di un Antigene

INTRODUZIONE

ELISA è l'acronimo dell'espressione inglese *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, un metodo di analisi immunologica usato in biochimica per la rivelazione e il dosaggio di antigeni o anticorpi.

A seconda dello scopo che si intende raggiungere si possono seguire diversi metodi, tutti basati sulla capacità di rivelare la reazione antigene-anticorpo utilizzando un secondo anticorpo in grado di legare il primo e coniugato con un particolare enzima (solitamente fosfatasi alcalina o perossidasi di rafano) che catalizza una reazione colorimetrica con l'aggiunta di un opportuno substrato.

Lo sviluppo del colore è indicativo della presenza dell'antigene o dell'anticorpo che si vuole saggiare e l'intensità della colorazione è misurabile grazie allo spettrofotometro.



ELISA indiretto è il metodo che si può utilizzare per valutare la presenza dell'antigene (es. proteina del capsido del virus influenzale) in un liquido biologico (ad es. nel siero di pazienti) utilizzando un anticorpo policlonale specifico (presente nel siero di un'altra specie immunizzata contro l'antigene di interesse).

PROTOCOLLO STEP-BY-STEP

Reagenti forniti

Antigene, gamma-globulina di pollo

Anticorpo primario, anti-gamma globulina di pollo, prodotto in coniglio

Anticorpo secondario, anti-gamma globulina di coniglio, prodotto in capra e coniugato all'enzima perossidasi di rafano (HRP)

Substrato dell'enzima HRP (TMB, tetrametil benzidina)

Buffer fosfato salino 10X (PBS)

10% Tween 20 (detergente)

Acqua distillata

Descrizione provetta	Colore provetta	Contenuto provetta
Campione studente	Giallo	Campione biologico
Anticorpo primario	Verde	Anti-gamma globulina di pollo, prodotto in coniglio
Anticorpo secondario	Arancione	Anti-gamma globulina di coniglio, prodotto in capra e coniugato all'enzima perossidasi di rafano (HRP)
Controllo positivo	Viola	Antigene
Controllo negativo	Blu	PBS 1X
Substrato (TMB)	Marrone	TMB, tetrametil benzidina

Step 1. Preparazione dei buffer

Buffer	Volume	Reagenti	Usato per
PBS* 1X	450 µl	Acqua distillata	<ul style="list-style-type: none">• Diluizione dell’antigene 50X• Controllo negativo• Studenti con campione negativo
	50 µl	PBS 10X	
	Preparare nella provetta blu		
PBST**	9 ml	Acqua distillata	<ul style="list-style-type: none">• Diluizione degli anticorpi 50X• Lavaggi
	1 ml	PBS 10X	
	50 µl	10% Tween 20	

* **PBS (Tampone Fosfato Salino)**: soluzione salina acquosa tamponata contenente cloruro di sodio, fosfato di sodio e cloruro di potassio.

** **PBST**: soluzione composta da PBS e Tween 20 utilizzata per i lavaggi dei pozzetti. L'aggiunta di Tween, un detergente, serve a ridurre i legami aspecifici.

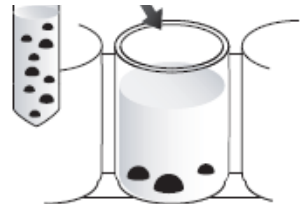
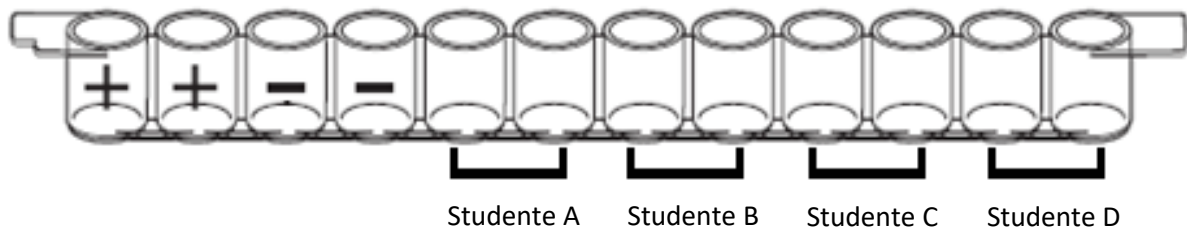
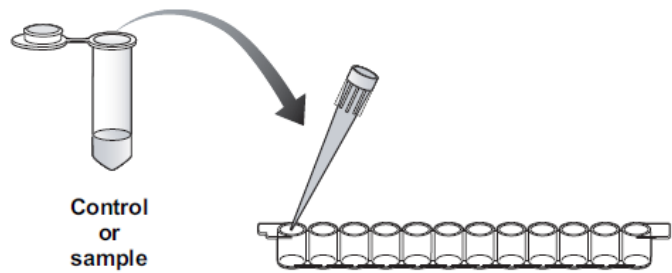
Step 2. Diluizioni dei reagenti 50X

Soluzione diluita	Volume	Reagenti	Usato per
Antigene 1X,	147 µl	PBS 1X*	Controllo positivo (in provetta viola)
	3 µl	Antigene 50X	
Anticorpo primario 1X,	637 µl	PBST	Anticorpo primario (in provetta verde)
	13 µl	Anticorpo primario 50X	
Anticorpo secondario 1X,	637 µl	PBST	Anticorpo secondario (in provetta arancione)
	13 µl	Anticorpo secondario 50X	

* PBS 1X contenuto nella provetta blu

Step 3. Procedura

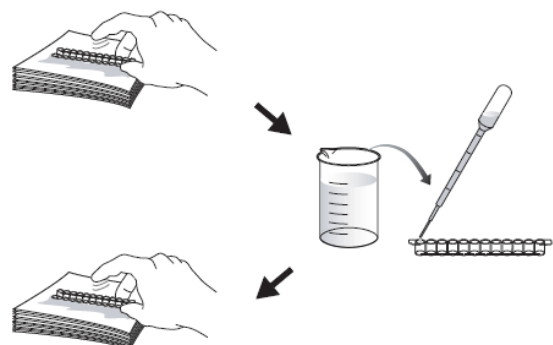
- 1) Scrivere sulla 12-well strip. Primi due pozzetti "+" per il controllo positivo, i successivi due pozzetti "-" per il controllo negativo. I rimanenti pozzetti scrivere la lettera assegnata allo studente (due pozzetti per ogni studente).



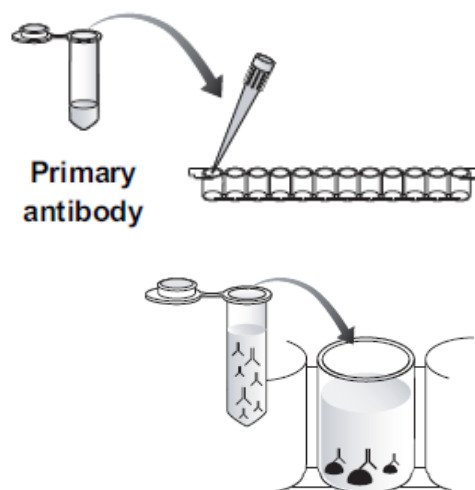
- 2) Trasferire 50 μ l del controllo positivo (provetta viola) nei due pozzetti segnati come "+".
- 3) Trasferire 50 μ l del controllo negativo (provetta blu – PBS 1X) nei due pozzetti segnati come "-".
- 4) Trasferire 50 μ l del proprio campione (provetta gialla) nei due pozzetti corrispondenti.
- 5) Incubare per 15 minuti, tempo necessario affinché le proteine si leghino al fondo del pozzetto.

6) LAVAGGI:

- a. Svuotare i pozzetti capovolgendo la strip su carta assorbente.
- b. Trasferite 100 μ l di buffer di lavaggio (PBST) in tutti i pozzetti.
- c. Ripetere i punti a. e b. Svuotare i pozzetti capovolgendo la strip su carta assorbente.



- 7) Trasferire 50 μ l di anticorpo primario (provetta verde) in tutti i pozzetti.
- 8) Incubare per 15 minuti, tempo necessario affinché l'anticorpo primario riconosca e legni l'antigene.

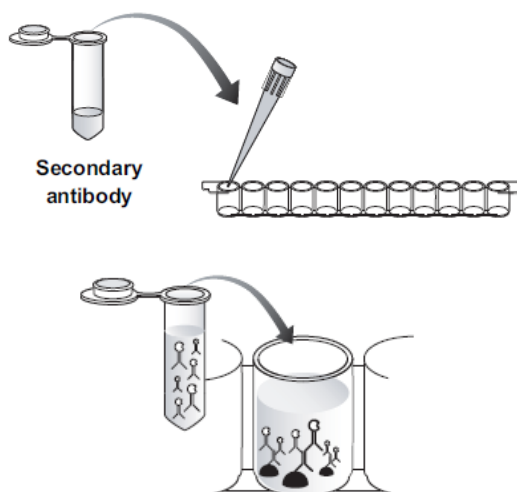


9) LAVAGGI:

- a. Svuotare i pozzetti capovolgendo la strip su carta assorbente.
- b. Trasferite 100 μ l di buffer di lavaggio (PBST) in tutti i pozzetti.
- c. Ripetere i punti a. e b. Svuotare i pozzetti capovolgendo la strip su carta assorbente.

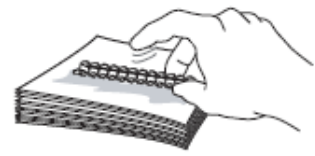


- 10) Trasferire 50 μ l di anticorpo secondario (provetta arancione) in tutti i pozzetti.
- 11) Incubare per 15 minuti, tempo necessario affinché l'anticorpo secondario riconosca e legni l'anticorpo primario.

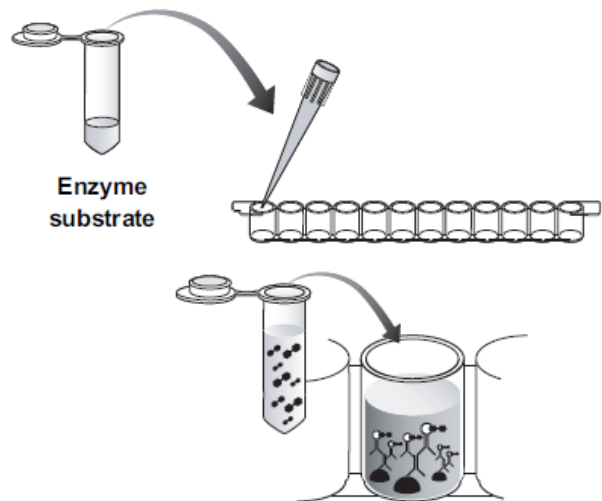


12) LAVAGGI:

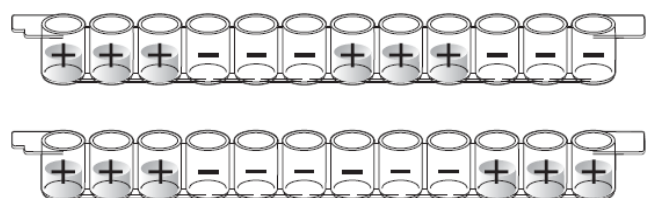
- d. Svuotare i pozzetti capovolgendo la strip su carta assorbente.
- e. Trasferite 100 μ l di buffer di lavaggio (PBST) in tutti i pozzetti.
- f. Ripetere i punti a. e b. Svuotare i pozzetti capovolgendo la strip su carta assorbente.

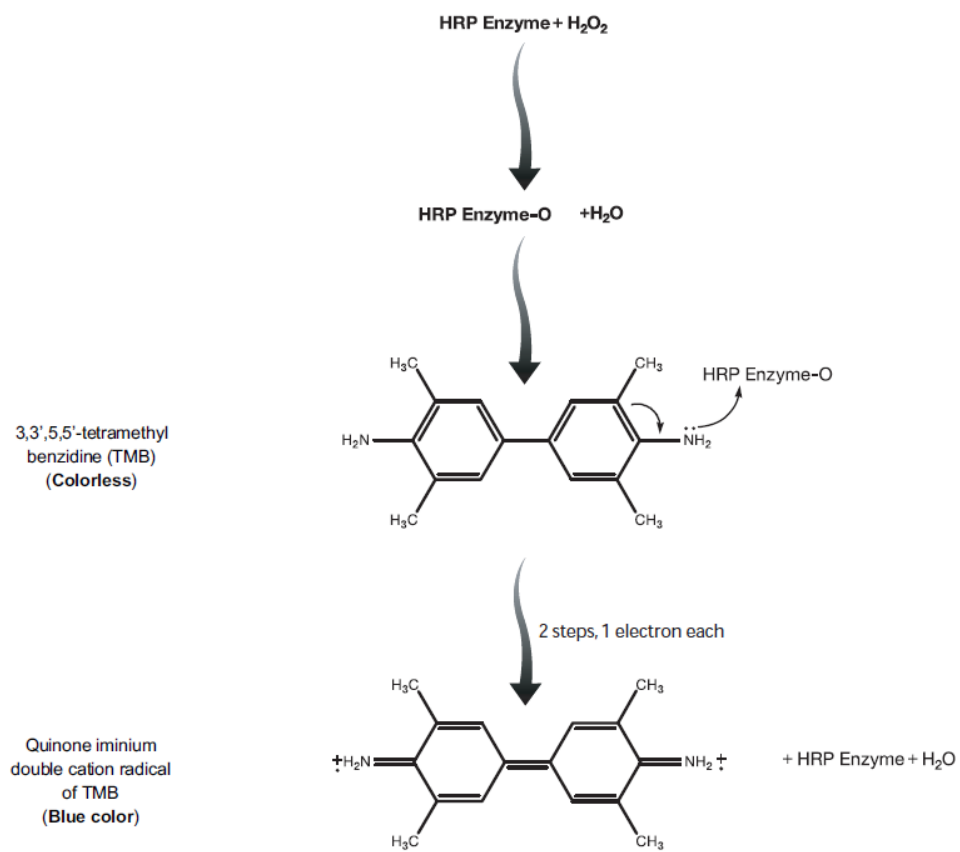


- 13) Trasferire 50 μ l di substrato (provetta marrone) dell'enzima HRP legato all'anticorpo secondario, in tutti i pozzetti.



- 14) Incubare per 5 minuti. Si osserverà un cambio di colore (blu) nei pozzetti del controllo positivo e nei pozzetti dello studente con campione "infetto".





Colorimetric Detection: Oxidation of TMB by HRP