

## ESERCITAZIONE DI FISIOLOGIA

### Dosaggio dell'Apolipoproteina A1 (ApoA1) mediante ELISA

L'Apolipoproteina A-I (ApoA-I, PM = 28 kD) è la principale costituente proteica delle lipoproteine ad alta densità (HDL) e ne regola importanti funzioni metaboliche. In particolare essa stimola:

1. l'efflusso dell'eccesso di colesterolo dalle cellule periferiche;
2. stimola l'enzima lecitina colesterolo acil-transferasi, che ha un ruolo chiave nel trasporto inverso del colesterolo.

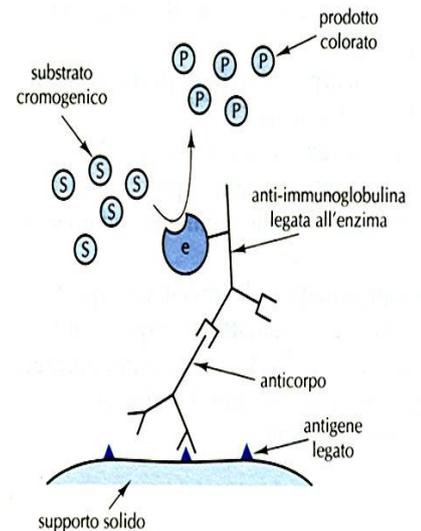
L'ApoA-I, essendo la componente più importante delle HDL, è considerato un marcatore della quantità di HDL circolanti. Maggiori livelli di ApoA-I-HDL sono associati ad un minor rischio di sviluppare patologie cardiovascolari.

Intervallo fisiologico di ApoA-I: 0.5 - 2.5 mg/ml.

**Il dosaggio ELISA** dell'Apolipoproteina A1 (ApoA1) da noi utilizzato è di tipo indiretto ed utilizza come enzima coniugato all'anticorpo (Ab) secondario la perossidasi di rafano. Il termine ELISA (Enzyme linked Immuno-Sorbent Assay) sta a significare che il dosaggio unisce la specificità del legame antigene-anticorpo con la sensibilità di un semplice dosaggio spettrofotometrico del prodotto di un enzima.

Il dosaggio si articola in diverse fasi.

1. **COATING:** Aliquote di soluzioni a concentrazione nota di ApoA1 (**l'antigene, Ag; 1,5 - 0,5 - 0,1 - 0,05 ng/μl**) e campioni di siero umano contenenti l'antigene, opportunamente diluiti in una soluzione di *coating buffer*, vengono poste in diversi pozzetti di una micropiastra ELISA e incubati tutta la notte a 4°C. Tale operazione permette l'attacco dell'Antigene al fondo dei pozzetti.
2. Lavaggi: 1x EWB  
1x TBS
3. **BLOCKING:** si riempiono i pozzetti di una soluzione **BLOCKING** che viene lasciata per 20 min a 37°C (in un incubatore). Tale operazione consente di saturare tutti i siti del pozzetto non coperti da proteine o componenti del siero posto il giorno prima.
4. Lavaggi come in 2.
5. **ADDIZIONE DEL PRIMO ANTICORPO:** si aggiungono a ciascun pozzetto aliquote di un anticorpo anti-ApoA1 (*Ab1*), opportunamente diluito (1:1000), e si incuba la piastra per 20 min a 37°C in modo da far avvenire il legame tra l'Ag e l'Ab1.
6. Lavaggi dei pozzetti come in 2, per allontanare l'eccesso di Ab1 non legato all'Ag.
7. **ADDIZIONE DEL SECONDO ANTICORPO:** si aggiungono a ciascun pozzetto aliquote di un altro anticorpo, coniugato con l'enzima perossidasi di rafano (*Ab2*), che è in grado di riconoscere regioni specifiche dell'*Ab1*, a cui si lega. La miscela viene lasciata per 15 min a 37 °C per consentire il legame tra Ag-Ab1 ed Ab2.
8. Lavaggi, come in 2, dei pozzetti per allontanare l'Ab2 libero.
9. Si aggiunge il substrato della perossidasi (OPD), che viene ossidato producendo un composto che sviluppa colore.
10. Si blocca la reazione enzimatica con una soluzione acida (2.5M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) dopo un tempo stabilito (circa 8-10 minuti).



L'intensità del colore sviluppato, proporzionale alla quantità di enzima presente e quindi, di conseguenza alla concentrazione di Ag presente nei campioni, può essere rilevata misurando l'assorbanza (Abs) a 492 nm con un lettore ELISA. Quindi, la presenza dell'Ag è determinata in base alla quantità di prodotto colorato prodotto dall'enzima legato all'anticorpo secondario.

La quantificazione della concentrazione di Ag nei campioni di siero viene effettuata confrontando l'Abs dei pozzetti contenenti il siero con quella dei pozzetti contenenti le soluzioni a concentrazione nota di Ag.

Infatti, riportando in grafico la media delle assorbanze ottenute per le soluzioni a concentrazione nota di ApoA1 in funzione della concentrazione stessa dell'Apolipoproteina, in ciascun pozzetto, si ottiene una retta di calibrazione mediante la quale è possibile determinare la concentrazione di ApoA1 nei campioni di siero analizzati (di cui è nota solo l'Abs ma NON la concentrazione di ApoA1).

### Strumentazione e Reagenti

- Piastra costituita da 96 pozzetti di polistirene sulle cui pareti è stato immobilizzato l'Ag (cioè ApoA-I) a diverse concentrazioni (**1,5 - 0,5 - 0,1 - 0,05 ng/μl**) e campioni diluiti di siero (C1 e C2) di cui stabilire la concentrazione di Ag presente. Sarà inoltre presente un controllo negativo, cioè un campione che NON contiene ApoA-I.
- Soluzione di Blocking
- Anticorpo anti-ApoA1 (Ab1)
- Anticorpo anti-Ab1 coniugato con l'enzima perossidasi di rafano (Ab2)
- Soluzione di sviluppo contenente il cromogeno OPD in tampone citrato e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- Tamponi di lavaggio EWB e TBS
- Soluzione di stop costituito da H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2,5 M)
- Lettore di micropiastre
- Acqua distillata
- Pipette automatiche da 100 μl o 200 μl
- Pipette Pasteur per il lavaggio manuale delle piastre

### Preparazione dei reagenti

**Coating Buffer (CB):** 7,3 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> + 17,4 mM NaHCO<sub>3</sub>

**Blocking:** 20 mM Tris pH 7,3 + 130 mM NaCl + 0,5% albumina di siero bovino (BSA).

Tampone di lavaggio **ELISA Washing Buffer (EWB):** 20 mM TRIS pH 7,3 + 130 mM NaCl + 0,05% Tween 20.

Tampone di lavaggio **Tris Saline Buffer (TBS):** 20 mM TRIS pH 7,3 + 0,5 M NaCl.

**Diluting Buffer (DB):** 0,25% BSA in EWB.

Soluzione **Ab1:** diluire l'Ab1 con DB in rapporto 1:1000.

Soluzione **Ab2:** diluire l'Ab2 con DB in rapporto 1:2000.

**Developer Solution (DS) 10X:** 0,3M acido citrico + 0,7 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> in cui viene sciolta una pasticca di **O-Phenylenediamine Dihydrochloride (OPD)** in presenza di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

**Soluzione di Stop:** 2,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

## Procedura sperimentale

1. Individuare e segnare i pozzetti nella piastra che verranno utilizzati da ciascun studente.
2. Eliminare dai pozzetti la soluzione di “coating”, utilizzata per far aderire gli Ag.
3. Lavare i pozzetti aggiungendo 300 µl di tamponi di lavaggio EWB, svuotando poi la piastra della soluzione di lavaggio nel rubinetto.
4. Lavare i pozzetti aggiungendo 300 µl di tampone di lavaggio TBS, svuotando poi la piastra della soluzione di lavaggio nel rubinetto.
5. Capovolgere la piastra su un supporto rivestito di carta assorbente per eliminare gocce di tampone dai pozzetti.
6. Riempire i pozzetti con 300 µl soluzione di soluzione di **Blocking**.
7. Incubare per 20 min a 37°C.
8. Lavare i pozzetti nuovamente come fatto ai punti 3 – 4 – 5
9. Aggiungere 60 µl della soluzione di **Ab1** a ciascun pozzetto.
10. Incubare i pozzetti per 20 min a 37°C.
11. Lavare i pozzetti nuovamente come fatto ai punti 3 – 4 – 5
12. Aggiungere 60 µl della soluzione **Ab2** a ciascun pozzetto.
13. Incubare i pozzetti per 15 min a 37°C.
14. Lavare i pozzetti nuovamente come fatto ai punti 3 – 4 – 5
15. Aggiungere 100 µl della soluzione di sviluppo **DS**.
16. Incubare a 37°C per circa 7-10 min evitando l'esposizione diretta alla luce.
17. Aggiungere 50 µl della soluzione di stop a ciascun pozzetto.
18. Leggere l'assorbanza dei pozzetti a 492 nm.
19. Calcolare l'assorbanza media (ABSm) dei duplicati (Ag standard e campioni di siero da dosare).
20. Rappresentare graficamente la curva standard riportando sull'ordinata i valori di Abs medi e sull'ascissa la concentrazione degli Ag standard.
21. Interpolare sulla curva i valori di Abs medi ottenuti per i vari campioni di siero in modo da determinare la concentrazione di ApoA1.

Per la determinazione della concentrazione di ApoA1 bisogna tener conto anche della diluizione applicata (1 : 100.000).

## **Dosaggio Immunoenzimatico (ELISA)**

Il dosaggio immunoenzimatico è una delle tecniche più utilizzate in campo clinico e nell'ambito della ricerca scientifica per l'analisi quantitativa di ormoni, steroidi, citochine, markers tumorali, e numerose altre sostanze.

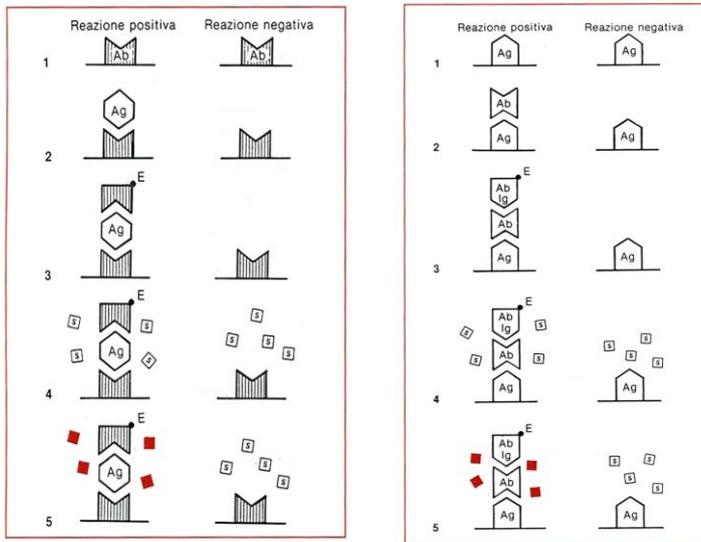
Il termine ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) sta a significare che il dosaggio unisce la specificità della reazione antigene-anticorpo (reazione immunologica) con la sensibilità di un semplice dosaggio spettrofotometrico del prodotto dell'attività di un enzima.

### **Sensibilità e specificità del saggio Immunoenzimatico**

L'ELISA ha una elevata selettività nei confronti degli analiti da determinare. L'anticorpo, infatti, è in grado di riconoscere specificamente l'antigene che ha evocato la sua formazione. L'affinità per la formazione dei complessi antigene-anticorpo è estremamente grande e, benché la reazione sia di tipo reversibile, l'equilibrio è di gran lunga spostato verso la formazione dei complessi antigene-anticorpo. La tecnica si basa sul fatto che, con metodiche adeguate, è possibile coniugare gli anticorpi di un siero con alcuni enzimi (perossidasi, fosfatasi alcalina, beta-galattosidasi) senza alterare la capacità di interazione con gli antigeni corrispondenti. Gli enzimi utilizzati sono dotati di un elevato numero di turnover e sono facilmente dosabili in quanto in grado di catalizzare una reazione che porta alla formazione di un prodotto terminale colorato. Il legame dell'anticorpo con l'antigene viene svelato aggiungendo il substrato ed i reattivi necessari ad evidenziare l'attività enzimatica.

Le reazioni vengono, di norma, eseguite all'interno di pozzetti di piastre di polivinile o polistirene, al cui interno vengono fatti aderire (mediante incubazione in idonee miscele di reazione) campioni biologici (plasma, siero, omogenati tissutali, latte etc.) al cui interno sono presenti gli antigeni da titolare. Dopo la rimozione dell'eccesso di materiale mediante opportuni lavaggi, ai pozzetti "sensibilizzati" sono aggiunti in successione gli altri reagenti (materiale in esame per la ricerca di antigene o anticorpi, anticorpi marcati con l'enzima, etc.) intervallati da lavaggi in grado di rimuovere ogni traccia di materiale che non si sia legato al reagente precedente. Per ultimo si aggiunge il substrato per l'enzima e la relativa

miscela di reazione. La positività della reazione è valutata analizzando la comparsa di un



prodotto di reazione (colorato) in seguito alla reazione catalizzata dall'enzima sul substrato.

La tecnica immunoenzimatica può essere impiegata per la ricerca di antigeni o anticorpi e si presta a numerose variazioni per altrettante applicazioni diverse. Nelle figure qui a lato sono illustrate alcune tra le principali applicazioni.

I principali vantaggi della tecnica ELISA sono i seguenti:

1. può essere usato per saggiare qualsiasi composto immunogenico, cioè qualsiasi composto capace di dare una risposta immunitaria;
2. è estremamente sensibile: alcuni ormoni possono essere infatti dosati anche quando presenti a concentrazione molto bassa nei fluidi biologici (es: pg/ml, ng/ml etc.);
3. è altamente specifico, come tutti i dosaggi immunologici;
4. può essere automatizzato in modo da ridurre al minimo la manualità e l'elaborazione dei dati.

Il metodo ELISA sta soppiantando il dosaggio radioimmunologico (RIA), nonostante quest'ultimo sia ben collaudato, automatizzato e talora più sensibile. Ciò perché il metodo ELISA è meno costoso e non presenta i rischi connessi con la manipolazione di materiale radioattivo.

### Cenni di immunologia

L'immunologia è lo studio della risposta immunitaria, cioè del processo tramite il quale l'animale si difende dall'invasione di microrganismi estranei. Le risposte immunitarie possono essere distinte in due gruppi:

**Immunità Umoreale** (mediata da anticorpi)

**Immunità Cellulare** (mediata da cellule).

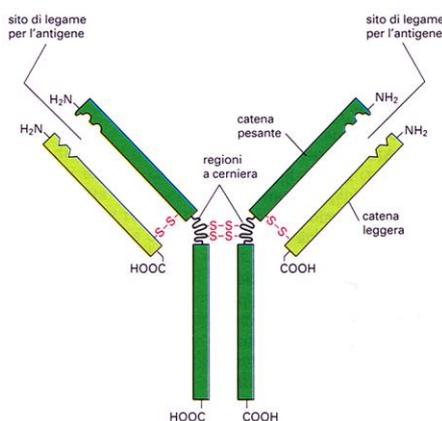
Le tecniche immunochimiche impiegano gli anticorpi che partecipano all'immunità umorale.

Quando un **antigene**, che può essere un organismo o un composto estraneo, penetra nei tessuti di un animale, i linfociti vengono stimolati a dividersi e a differenziarsi. Nel caso di una risposta umorale, ciò comporta la differenziazione di linfociti B in plasmacellule secernenti anticorpi, aventi siti specifici di legame capaci di combinarsi stabilmente, anche se non covalentemente, all'antigene. La combinazione di un anticorpo con il rispettivo antigene può essere considerata una reazione biomolecolare reversibile, il che sta a significare che l'anticorpo si unisce all'antigene con legami deboli, quali le forze di Van der Waals (attrazione reciproca fra atomi) e le interazioni fra gruppi polari non ionici (legame a idrogeno). Tali legami avvengono tra il sito combinatorio dell'anticorpo e l'epitopo dell'antigene.

Gli anticorpi appartengono al gruppo di proteine note come immunoglobuline (Ig), nel cui insieme si possono riconoscere cinque classi: IgG, IgM, IgA, IgD, e IgE.

Le tecniche immunochimiche utilizzano principalmente le IgG che rappresentano l'80% delle immunoglobuline sieriche.

Tutte le immunoglobuline hanno una struttura di base formata da quattro catene polipeptidiche: due catene leggere (L) identiche e due catene pesanti (H) identiche le cui subunità si associano mediante ponti di solfuro e legami non covalenti per formare un



dimero simmetrico a forma di Y. I domini N-terminale delle catene L e H presentano una sequenza di aminoacidi estremamente variabile che costituisce il sito di legame per l'antigene. I restanti domini delle catene L e H presentano una sequenza aminoacidica costante per tutti gli anticorpi.

### **Produzione di antisieri (anticorpi policlonali)**

La maggior parte degli anticorpi usati in immunochimica sono prodotti per iniezione di una soluzione o di una sospensione dell'antigene appropriato (per es. una proteina umana) in un coniglio. Dopo un certo periodo di tempo, si preleva il sangue dal coniglio immunizzato. Si

lascia coagulare il sangue a 37°C per un'ora, si stacca il coagulo dalle pareti del contenitore per favorire la sua retrazione e si lascia a 4°C per consentire l'estrusione del siero, il quale viene poi separato dal coagulo e dalle cellule libere mediante centrifugazione. Il siero viene solitamente conservato a -20°C, suddiviso in piccole aliquote. Il siero di controllo si ottiene dallo stesso coniglio prima dell'immunizzazione. Se si inocula un coniglio con una singola iniezione di un composto ad alta antigenicità sciolto in soluzione fisiologica, si ottiene una produzione di anticorpi specifici che diventano misurabili nel siero dopo circa 10 giorni, raggiungono un massimo di concentrazione dopo circa 15-20 giorni e poi calano lentamente nel giro di alcune settimane. Questa produzione è chiamata *risposta immunitaria umorale primaria* ed è costituita interamente da anticorpi IgM. Si può indurre una *risposta secondaria* tramite una successiva inoculazione dello stesso antigene in un tempo qualsiasi successivo alla risposta primaria. La risposta secondaria è più rapida della primaria e si può già osservare un aumento di anticorpi circolanti dopo solo 3 giorni, con un massimo dopo 10 giorni. Il livello di anticorpi IgM è simile a quello osservato nella risposta primaria ma, in aggiunta, si osserva la presenza di una quantità di anticorpi IgG circa 3-10 volte superiore. Ulteriori inoculazioni dello stesso antigene, a intervalli di 2 settimane, provocano l'iperimmunizzazione dell'animale, cioè il siero arriva a contenere un'enorme quantità di anticorpi IgG specifici per l'antigene inoculato.

## **Definizioni**

L'immunologia è una branca della scienza che usa un suo proprio vocabolario ed è quindi opportuno riportare subito qui di seguito la definizione di alcuni termini importanti che verranno usati.

**Antigene.** Qualsiasi sostanza estranea che induca una risposta immunitaria (cioè la produzione di molecole di un anticorpo specifico) quando venga introdotta nei tessuti di un animale suscettibile e che sia in grado di combinarsi specificamente con le molecole di anticorpo prodotte. Gli antigeni sono ad alto peso molecolare e sono di solito proteine o polisaccaridi.

**Determinante antigenico o epitopo.** Sito presente sull'antigene a cui si può legare in modo specifico un anticorpo complementare tramite il proprio sito di legame. Generalmente un

determinante antigenico è costituito da 1-6 residui monosaccaridici o aminoacidi presenti alla superficie dell'antigene, non necessariamente uniti tra loro con legami covalenti.

**Plasmacellula.** La fase terminale della differenziazione di un linfocita B esposto al suo epitopo specifico. È la cellula che secerne anticorpi.

**Anticorpo.** Proteina della classe delle immunoglobuline, capace di combinarsi specificamente con l'antigene che ha indotto la sua produzione in un animale suscettibile.

**Sito di legame con l'antigene o paratopo.** Il sito di un anticorpo che si combina in modo specifico con il corrispondente determinante antigenico. È costituito solitamente da pochi residui aminoacidici che danno origine a una tasca nella molecola dell'anticorpo e che di solito non sono legati covalentemente tra loro.

**Anticorpi policlonali.** Prodotti dai linfociti B, o meglio da diversi cloni di plasmacellule, in risposta ad un antigene. Ad esempio quando una proteina umana viene iniettata in un animale alcune cellule della popolazione dei linfociti B si attivano producendo diversi anticorpi che legano in modo specifico diversi epitopi presenti sull'antigene (proteina). Quindi nella preparazione di anticorpi policlonali si produce una miscela di anticorpi che riconoscono diverse parti dello stesso antigene.

**Anticorpo monoclonale.** Immunoglobulina derivata da un singolo clone e perciò omogenea in quanto riconosce un solo tipo di sito antigenico.

**Antisiero.** Siero contenente anticorpi diretti contro uno specifico antigene o una miscela di antigeni (ad es. siero anti-ovalbumina; siero antieritrociti di montone, ecc.).