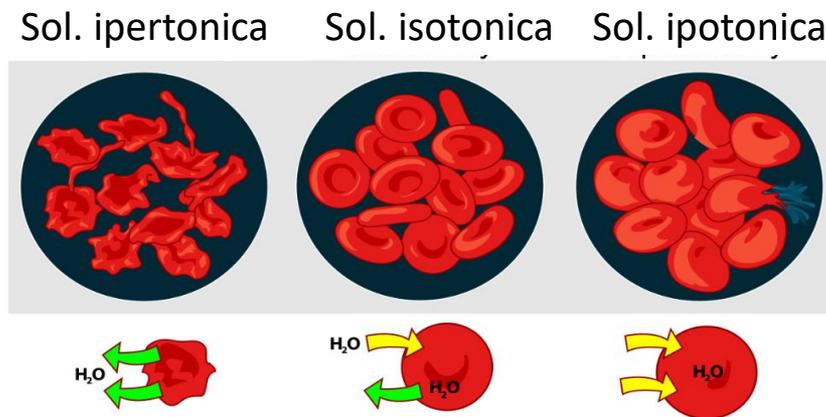


**Saggi
di
emoagglutinazione
ed
emolisi**

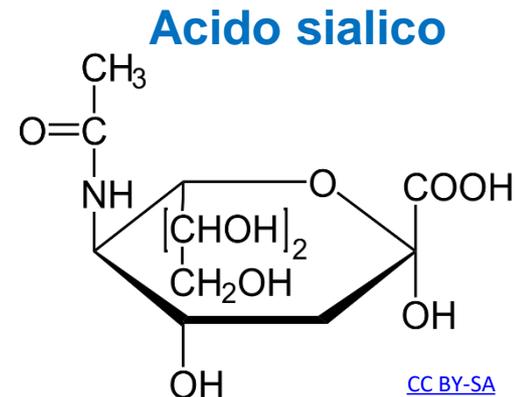
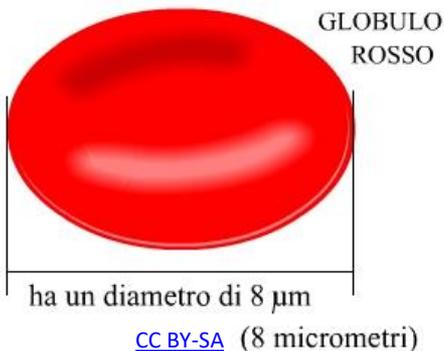
È importante ricordare che:

- Pressione osmotica $\Pi = MiRT$, dipende da M_i , cioè dalle particelle in cui si dissocia il soluto e che non possono attraversare la membrana cellulare, queste particelle sono dette osmoliti effettivi o efficaci
- L'osmolarità plasmatica dipende dalla concentrazione degli elettroliti, di glucosio e di urea (glucosio ed urea pur contribuendo all'osmolarità plasmatica, sono osmoliti inefficaci perché attraversano la membrana cellulare) mentre gli elettroliti sono responsabili dell'osmolarità effettiva.
- Il tono cellulare rappresenta il turgore della cellula e dipende dalla pressione osmotica. Nel caso del globulo rosso in una soluzione ipotonica, ad es, la pressione osmotica all'interno della cellula aumenta così tanto da far scoppiare la cellula (emolisi)



Globulo rosso come modello: perché?

- Il globulo rosso presenta residui di un derivato degli zuccheri, noto come acido sialico, o acido *N*-acetil-neuramminico, sulle glicoproteine di membrana (glicoforina A)
 - Una delle funzioni principali dell'acido sialico è di proteggere le proteine di membrana dall'attività delle proteasi
 - Ha funzione di recettore per le molecole di adesione.
 - Trattiene l'acqua sulla superficie della membrana, mantiene fluidità del muco
 - In particolare agisce anche da **recettore per i virus influenzali e parainfluenzali**, consentendo il loro attacco alle cellule mucose
- Sul globulo rosso l'effetto del Virus Sendai è facilmente osservabile attraverso i due saggi di emoagglutinazione e di emolisi



Lavaggio degli eritrociti

Le attività emolitica ed emoagglutinante del virus Sendai richiedono una soluzione di eritrociti umani lavati in tampone PBS e diluiti al 2% (v/v).

Protocollo

Reagenti

- Sangue umano fresco.
- Tampone PBS: 150 mM NaCl, 10 mM fosfato, pH 7,4.

Esecuzione del lavaggio

Il sangue intero è diluito con PBS, in volume triplicato rispetto al sangue, e gli eritrociti vengono sedimentati per centrifugazione 10 a 3000 rpm. Plasma, leucociti e piastrine vengono rimossi; gli eritrociti sono risospesi in PBS, in volume triplicato, e centrifugati nuovamente. Questa operazione si ripete altre due volte.

Dopo l'ultima centrifugazione si elimina tutto il supernatante e gli eritrociti ottenuti si diluiscono al 2% (v/v) con tampone PBS e si utilizzano entro le 24 ore.

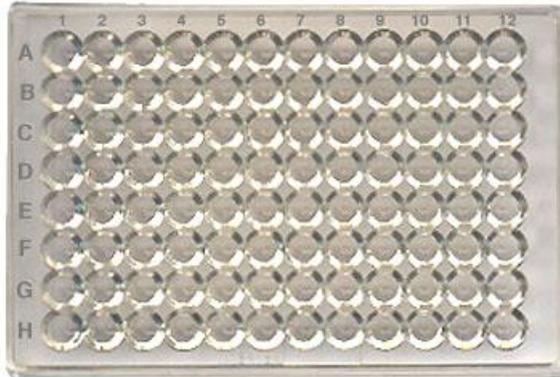
Emoagglutinazione

Saggio di emoagglutinazione

- L'attività emoagglutinante virale è diretta esclusivamente verso cellule bersaglio che presentano sulla membrana residui di acido sialico come gli eritrociti umani.
- L'attività emoagglutinante viene perciò testata facendo procedere la reazione a 4°C, in quanto a questa temperatura viene dosata, della glicoproteina HN, solo l'attività di legame con il suo recettore specifico. Essa è in grado di formare dei ponti tra i diversi eritrociti formando una sorta di reticolo che non precipita sul fondo del pozzetto, ma rimane a costituire un colore rosso diffuso.

SAGGIO DI EMOAGGLUTINAZIONE

Basato sulla proprietà di alcuni virus (ortomyxovirus, poxvirus, paramyxovirus) di agglutinare eritrociti

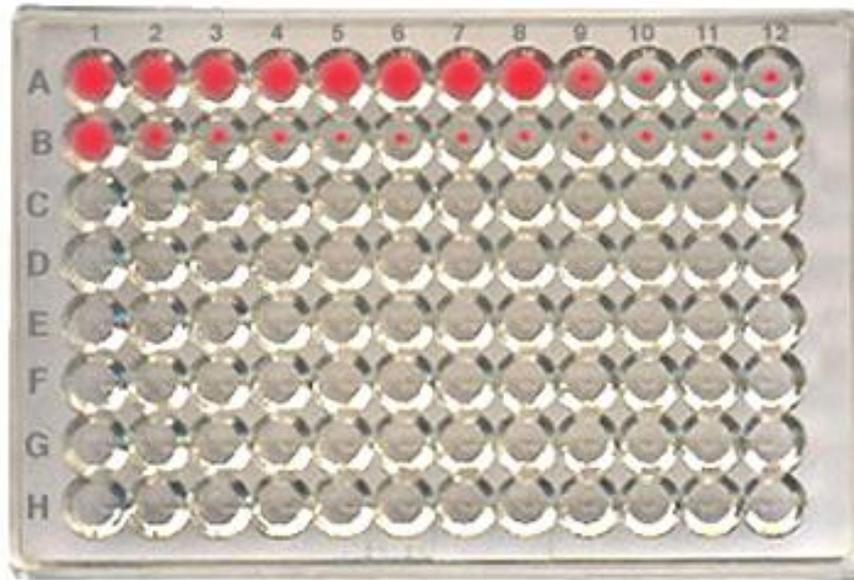


Diluizioni seriali della sospensione virale si mescolano con una diluizione standard di eritrociti



Gli eritrociti agglutinati sedimentano in maniera disordinata ricoprendo tutto il fondo del pozzetto, mentre quelli non agglutinati formano un anello circoscritto al centro della base del pozzetto

EMOAGGLUTINAZIONE



Il titolo virale è dato dall'ultima diluizione di virus che dà ancora emoagglutinazione, viene anche chiamata unità emoagglutinante

Protocollo

Reagenti

- Eritrociti umani freschi: diluiti al 2%(v/v) in tampone PBS.
- Tampone PBS: 150 mM NaCl, 10 mM fosfato, pH 7,4.
- Virus Sendai: 0.2-0.3 mg/ml in tampone PBS

Esecuzione del saggio

L'attività emoagglutinante è determinata in piastre da 96 pozzetti a fondo a fondo conico. In ciascun pozzetto sono messi 50 μ l di una soluzione virale in PBS, con diluizioni progressive in base **2** (al raddoppio: 1:2, 1:4, 1:8..), e 50 μ l di una sospensione di eritrociti al 2%.

Le piastre possono essere esaminate già dopo 1 ora (meglio dopo 2 ore) a 4°C.

Una unità emoagglutinante è la più bassa concentrazione virale che induce emoagglutinazione.

Protocollo sperimentale emoagglutinazione

RBC 100%V/V \longrightarrow 2,5 ml RBC 2%V/V in PBS

$100\%/2\%=50X \rightarrow 2,5\text{ml}/50=0,05 \text{ ml} = 50 \mu\text{l}$

2,450 ml PBS+ 50 μl RBC 100%

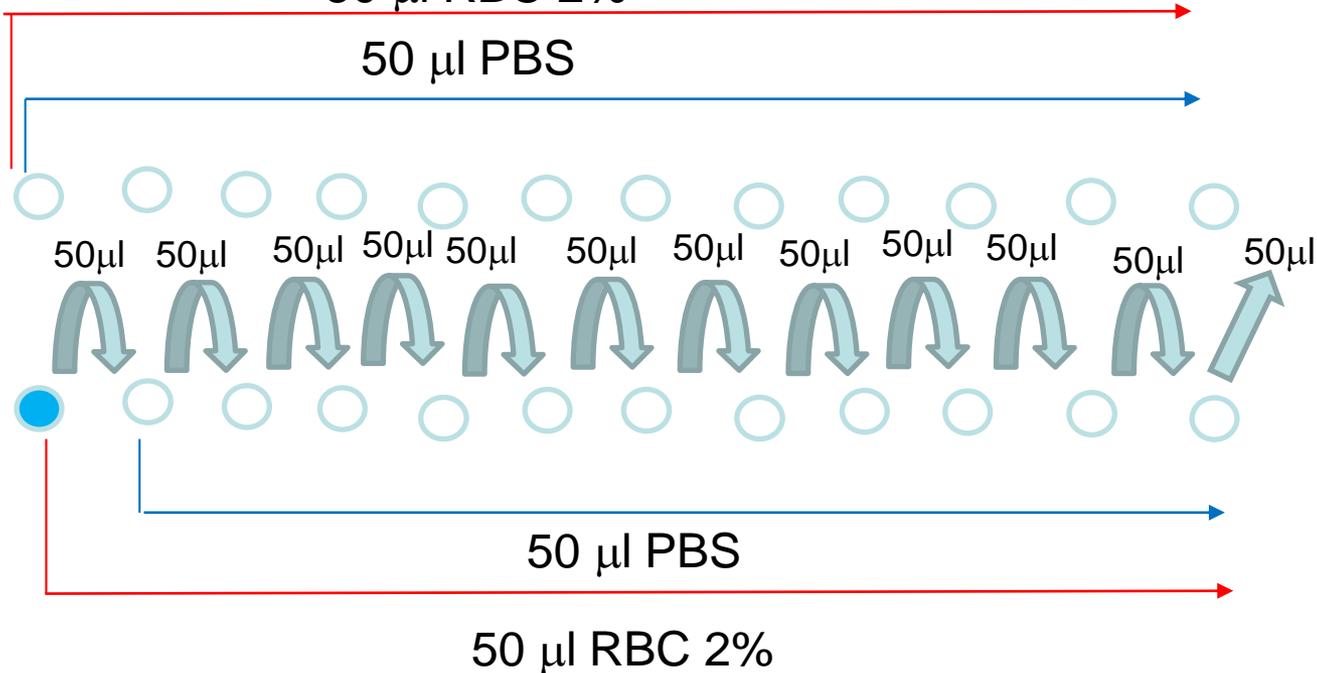
50 μl RBC 2%

50 μl PBS

1° fila BIANCO

2° fila CAMPIONE

100 μl SV
Ci=0,2 mg/ml



Fattore dil 2: 2^0 : 2^1 : 2^2 : 2^3 : 2^4 : 2^5 : 2^6 : 2^7 : 2^8 : 2^9 : 2^{10} : 2^{11}
non diluito

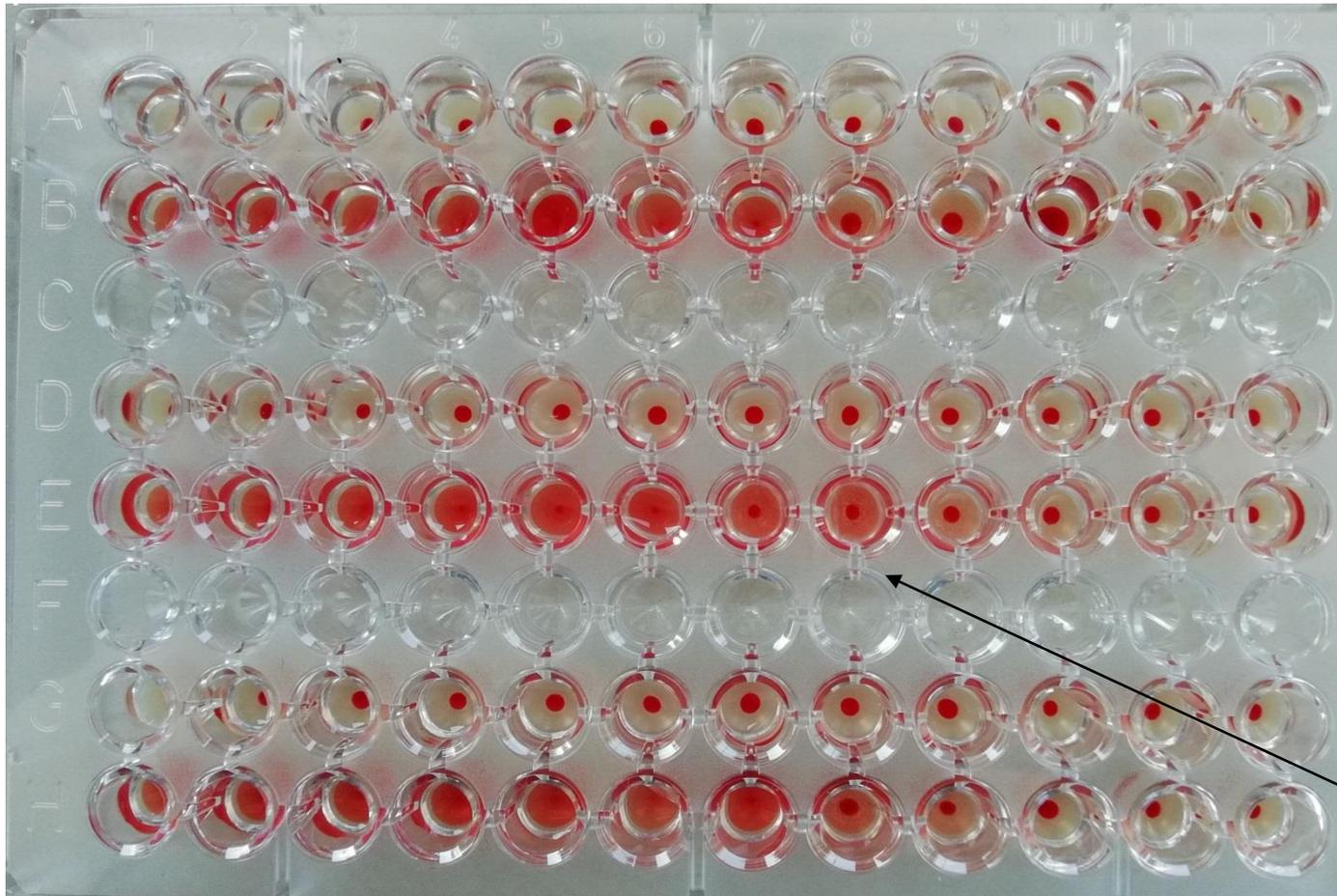


Pozzetto a fondo
conico/a V

Incubare 1-2 ore a 4°C, poi osservare la piastra.

Calcolare unità emoagglutinante data da: $Cf=Ci/2^{n-1}$

Emoagglutinazione



SCOPO:

calcolare unità emoagglutinante data da: $Cf = C_i / 2^{n-1}$

RISULTATO:

Unità emoagglutinante: $Cf = 0,2 / 2^{8-1} = 0,2 / 2^7 = 0,2 / 128 = 0,00156 \text{ mg/ml} = 1,56 \text{ } \mu\text{g/ml}$

Emolisi

Saggio di emolisi

- L'attività fusogena virale è rilevata usando come cellule bersaglio eritrociti umani. In seguito alla fusione, la membrana eritrocitaria subisce delle alterazioni che portano alla lisi delle emazie con fuoriuscita di emoglobina. L'attività fusogena del virus Sendai è direttamente proporzionale alla quantità di emoglobina rilasciata, determinabile spettrofotometricamente a 413 nm.
- Il grado di emolisi, invece, non è direttamente proporzionale alla concentrazione virale; infatti la curva che descrive il rilascio di emoglobina in funzione della concentrazione virale è di tipo sigmoide, perciò il fenomeno emolitico è di tipo cooperativo. I saggi di emolisi richiedono, quindi, l'impiego di concentrazioni virali tali da permettere la determinazione del 50% di lisi rispetto ad un campione completamente lisato, ottenuto da una soluzione ipotonica.

Protocollo

Reagenti

- Eritrociti umani freschi: diluiti al 2%(v/v) in tampone PBS.
- Tampone PBS: 150 mM NaCl, 10 mM fosfato, pH 7,4.
- Virus Sendai: 0.03-0.06 mg/ml in tampone PBS

Esecuzione del saggio

L'attività emolitica è determinata mescolando 50 μ l di una soluzione virale in PBS, con diluizioni progressive, con una sospensione di eritrociti al 2%.

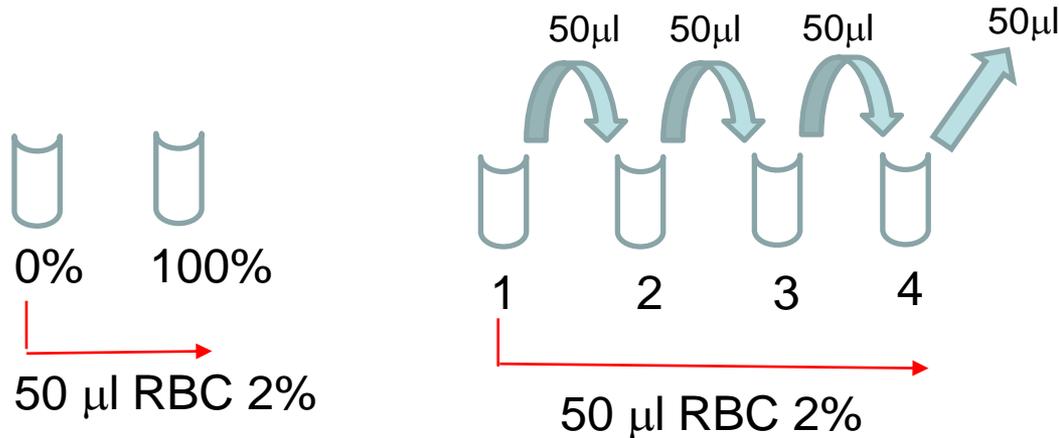
Dopo 30 min di incubazione a 37°C, la reazione viene arrestata con 1 ml di PBS freddo. Il campione è centrifugato 3 min a 3000 rpm per sedimentare gli eritrociti. La concentrazione dell'emoglobina nel supernatante è determinata allo spettrofotometro a 413 nm.

Lo 0% di emolisi è costituito dal solo PBS. Il 100% di emolisi viene determinato per lisi ipotonica degli eritrociti. Una unità emolitica è la più bassa concentrazione virale che induce il 50% di emolisi.

Protocollo sperimentale emolisi

RBC 2%V/V RBC100%/2%=50X → 1 ml/50=0,02 ml=20 μ l

980 μ l PBS+20 μ l RBC 100%



0%= 50 μ l PBS (sol. Isotonica)
100%=50 μ l H₂O (sol. Ipotonica)
1=100 μ l SV 0,06 mg/ml
2= dil 1:2 (50 μ l PBS + SV da 1)
3= dil 1:4 (50 μ l PBS + SV da 2)
4= dil 1:8 (50 μ l PBS + SV da 3)

- 1) Incubare le provette chiuse 30 min a 37°C in un bagnetto termostataato
- 2) Aggiungere 1 ml di PBS freddo per bloccare la reazione di emolisi
- 3) Centrifugare 3 min a 3000 rpm in una centrifuga da banco
- 4) Prelevare con attenzione 200 μ l da ogni provetta e metterli in una piastra a fondo piatto
- 5) Leggere l'Abs a $\lambda=413$ nm in uno spettrofotometro per piastre



Protocollo sperimentale emolisi elaborazione risultati

- 1) Trovare i **valori netti** di abs nei campioni 1, 2, 3 e 4 e nel campione corrispondente al 100% emolisi sottraendo al loro valore, il valore corrispondente allo 0% emolisi
- 2) Calcolare, in mg/ml, le concentrazioni del Virus Sendai, nei campioni 2, 3 e 4
- 3) Calcolare a che % di emolisi corrispondono le abs dei campioni 1, 2, 3 e 4 rispetto al 100% emolisi con la seguente proporzione:

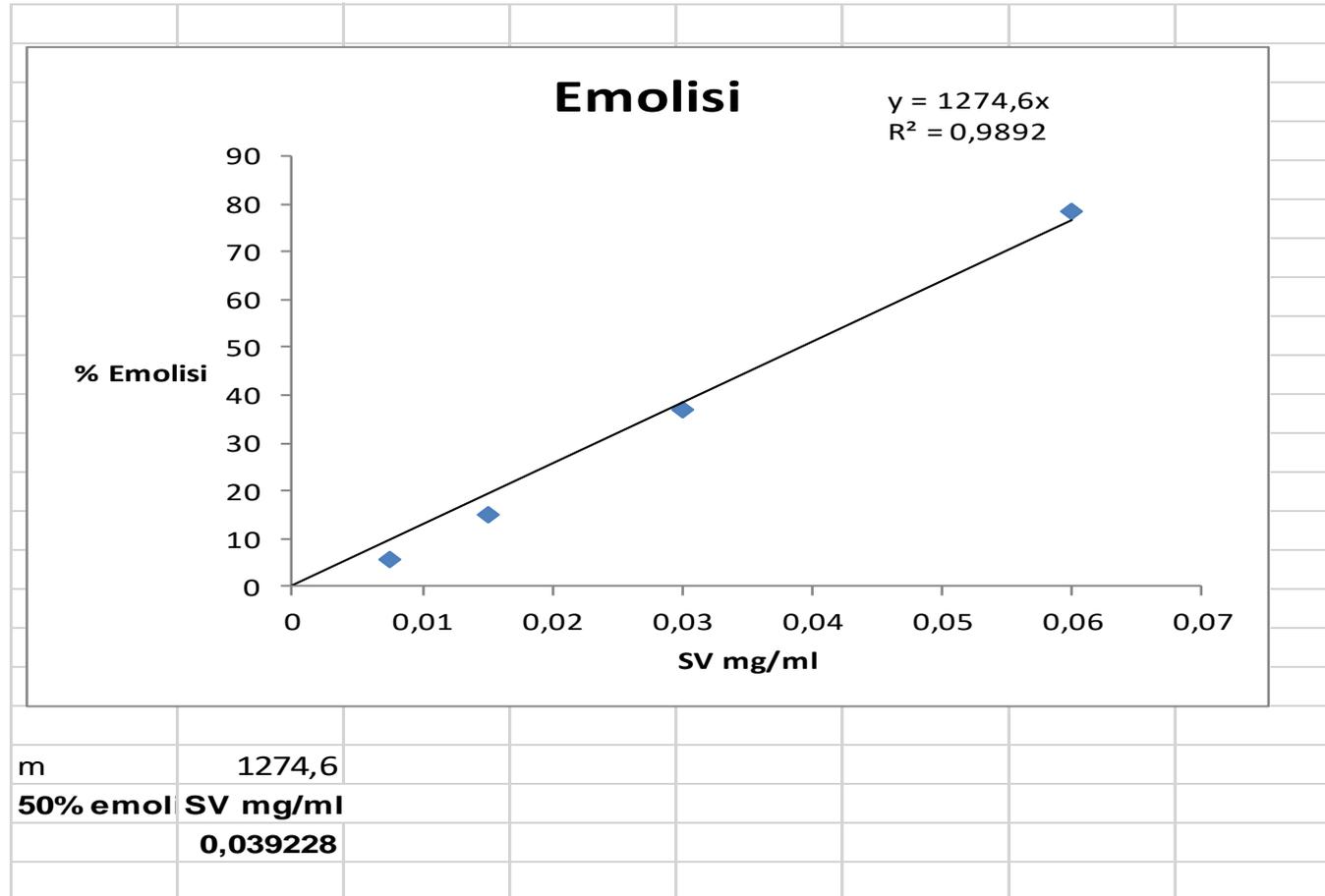
$$\text{Abs campione}_{\text{netti}} : \text{Abs campione}_{100\% \text{ netti}} = X\% \text{ emolisi} : 100\% \text{ emolisi}$$

Esempio da mettere in grafico:

0=0,064 OD; 1=0,885 OD; 2= 0,458 OD; 3=0, 224 OD; 4= 0,114 OD
100=1,344 OD;

- 3) Mettere in grafico questi dati, dove sull'asse delle x c'è la concentrazione del SV, in mg/ml; corrispondenti ai campioni 1, 2,3 e 4 e in ordinata le rispettive % di emolisi trovate con la proporzione
- 4) Determinare la retta di pendenza passante per i quattro valori e la formula della retta di tipo $y=mx \rightarrow x=y/m$
- 5) Per $y=50\%$ troviamo il valore della x, cioè il valore di concentrazione virale che corrisponde al 50% di emolisi.
- 6) In tal modo ho determinato l'unità emolitica

Emolisi



SCOPO:

calcolare unità emolitica data da:
Concentrazione SV che induce il 50% emolisi



Corso di laurea in Scienze Biologiche
Corso di laurea magistrale in Scienze Biomolecolari e dell'Evoluzione

Materiale didattico di supporto

Tutto il materiale fornito a supporto delle lezioni e reperibile nel minisito dell'insegnamento o sulla piattaforma online UniFE deve essere inteso come traccia degli argomenti svolti e non sostituisce il libro di testo.

Raccomandazione importante: questo materiale didattico è per uso personale dello studente, ed è coperto da copyright. Ne è severamente vietata la riproduzione, la diffusione o il riutilizzo, anche parziale, ai sensi e per gli effetti della legge sul diritto d'autore.