



Test kappa: che novità!

Ecco su quali principi si basa e come funziona il test.

di M. Malacarne#, C. Nicoletti*

L'obiettivo alla base di questa idea è stato quello di mettere a punto un test rapido che permettesse di quantificare il contenuto di k-caseina B in campioni di latte di massa. Inoltre, l'ipotetico test doveva avere caratteristiche tali da consentirne l'uso nei normali laboratori di analisi del latte e da parte di personale non specializzato.

Si è ipotizzato un test di natura immunoenzimatica, che si basa sul riconoscimento specifico della k-caseina B del latte bovino da parte di un anticorpo monoclonale creato appositamente a questo scopo. L'anticorpo è stato formulato con la tecnologia innovativa HuCAL (Morphosys, 82152 Martinsried/Planned, Germania), che non prevede l'uso di cavie animali.

L'anticorpo è una proteina particolare costituita da una porzione in grado di legare, in maniera specifica, un determinato antigene. Nel caso dell'anticorpo impie-

gato nel test kappa, l'antigene è rappresentato da un frammento della k-caseina B, lungo circa 20 amminoacidi, nel quale sono compresi i due amminoacidi che distinguono la variante B dalla variante A. L'anticorpo, quindi, lega in modo specifico la variante B della k-caseina, senza reagire con la variante A. Una volta realizzato l'anticorpo, si è cercato di utilizzarlo per la messa a punto di un test rapido di natura immunoenzimatica. Nello specifico, si tratta di un test Elisa competitivo indiretto. Il principio di questo test viene illustrato nella figura 1. In breve, la piastra del kit è costituita da molecole di k-caseina B, purificata ed adsorbita sulla superficie di ogni pozzetto. Il protocollo di analisi può essere suddiviso in alcuni passaggi fondamentali: incubazione primaria, incubazione secondaria e colorazione.

Incubazione primaria

In questa fase nel pozzetto viene messa una quantità opportuna-

mente diluita del campione di latte da analizzare. Si procede, quindi, all'aggiunta dell'anticorpo primario, vale a dire dell'anticorpo monoclonale in grado di legare in maniera specifica la variante B della k-caseina.

La k-caseina B presente sulle pareti del pozzetto (k-caseina B legata) e quella nel campione da analizzare (k-caseina B libera) "competono" tra loro per legare l'anticorpo monoclonale. In pratica, maggiore è la quantità di k-caseina B presente nel campione di latte, minore sarà la quantità di anticorpo monoclonale che si legherà alla k-caseina B adsorbita alle pareti del pozzetto. L'incubazione ha la durata di circa 2 ore. Al termine dell'incubazione, si procede al lavaggio del pozzetto. Il lavaggio ha lo scopo di rimuovere l'anticorpo monoclonale, che si è legato con la k-caseina B libera (quella del campione di latte).

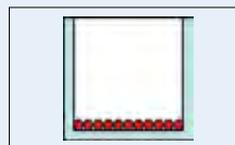
Incubazione secondaria

Una volta ultimato il lavaggio,

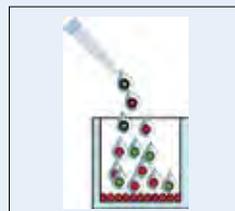
Figura 1



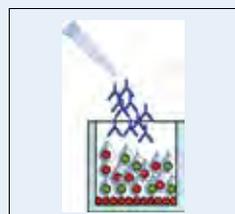
A



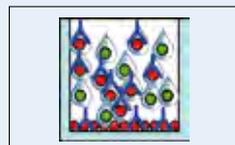
B



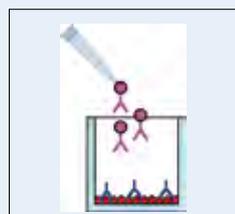
C



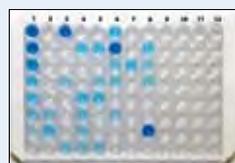
D



E



F



G



H

- k-caseina B
- k-caseina A
- Anticorpo k-caseina B
- Anticorpo secondario

si procede all'aggiunta dell'anticorpo secondario. La caratteristica di questo anticorpo secondario è quella di legarsi all'anticorpo monoclonale specifico per la k-caseina B. Inoltre, esso è associato ad un enzima, la perossidasi di rafano. Nel corso dell'incubazione, l'anticorpo secondario si lega all'anticorpo monoclonale presente, vale a dire quello che è legato alla k-caseina B, adsorbita sulle pareti del pozzetto. L'incubazione ha la durata di circa un'ora. La quota di anticorpo secondario, in eccesso, viene rimossa dai pozzetti con lavaggi specifici.

Colorazione

Al termine dell'incubazione, si aggiunge tetrametil-benzidina che, grazie all'azione enzimatica della perossidasi di rafano, viene convertita in un composto che è in grado di generare una colorazione blu (rilevabile a 450 nm). L'intensità della colorazione è direttamente proporzionale alla quantità di perossidasi di rafano presente nel pozzetto e, soprat-



tutto, è inversamente proporzionale alla quantità di k-caseina B presente nel campione di latte analizzato. Al fine di amplificare l'intensità del segnale colorimetrico, si aggiunge un'ulteriore sostanza (acido fosforico) in grado di convertire la colorazione da blu a gialla e si procede quindi alla lettura del campione. La trasformazione del dato analitico – il valore della densità ottica rilevato allo spettrofotometro – in quantità di k-caseina B è funzione di una curva di calibrazione costruita utilizzando diluizioni successive di una soluzione standard di k-caseina B – inclusa nel kit analisi – e di un bianco analitico (i soli reagenti previsti).

Dotazione nel kit d'analisi

Il materiale incluso nel test comprende tutte le soluzioni (quella per diluire i campioni e quella per i lavaggi), due standard di k-caseina B in polvere, l'anticorpo

- A** Piastra prima dell'utilizzo.
- B** Il pozzetto è foderato di k-caseina B.
- C** Caricamento campione.
- D** Aggiunta quantità nota di anticorpo specifico per la k-caseina B.
- E** L'anticorpo reagisce con tutta la k-caseina B del campione; la parte in eccesso si lega alla k-caseina del pozzetto.
- F** Coloro l'anticorpo in eccesso che si è legato alla base del pozzetto.
- G** Piastra con reazione avvenuta.
- H** Maggiore è l'intensità del colore, inferiore è il contenuto di k-caseina B nel campione.



primario (monoclonale, specifico per la k-caseina B), l'anticorpo secondario, i reagenti per generare la colorazione e la piastra con i pozzetti (12 x 8). I pozzetti sono organizzati in file di otto, rimovibili e conservabili in frigo a 4 °C. È attualmente in fase di verifica il protocollo sperimentale fornito con il kit di analisi. In via prelimi-

The article explains in details the principles on which the kappa test I based and how it works. The main goal of the research was designing a quick testing kit able to measure the k-casein B content in mass milk. The test had to be suitable for the use in standard milk testing laboratories and by unskilled personnel. It

nare, si ritiene che la quantità di latte necessaria per effettuare l'analisi sia di pochi microlitri e che la durata del test, nel suo complesso, non dovrebbe superare le 4 ore circa. Secondo quanto indicato nel protocollo sperimentale, i valori di ripetibilità e di sensibilità della metodica dovrebbero permettere l'analisi

is an indirect, competitive ELISA test. Its basics are illustrated in picture 1.

In dem detaillierten Artikel geht es darum, nach welchem Prinzip der Kappa-Test funktioniert. Das Ziel, das dem Konzept zugrunde liegt, ist die Bereitstellung eines Schnelltests zur Bestimmung des K-Kasein B-Gehalts

in singolo dei campioni e, di conseguenza, con ciascuna piastra, sarà possibile analizzare circa 80 campioni di latte. 

Dipartimento di produzioni animali, biotecnologie veterinarie, qualità e sicurezza degli alimenti, Università degli studi di Parma

* Anarb, Associazione nazionale allevatori bovini della razza Bruna

in Sammelmilchproben. Ferner sollte der Test Merkmale aufweisen, die dessen Einsatz in normalen Laboratorien zur Milchanalyse und durch nicht extra hierfür ausgebildetes Personal ermöglichen. Genau handelt es sich hier um einen kompetitiven indirekten Elisatest. Das Grundprinzip dieses Tests ist in Abb.1 dargestellt.