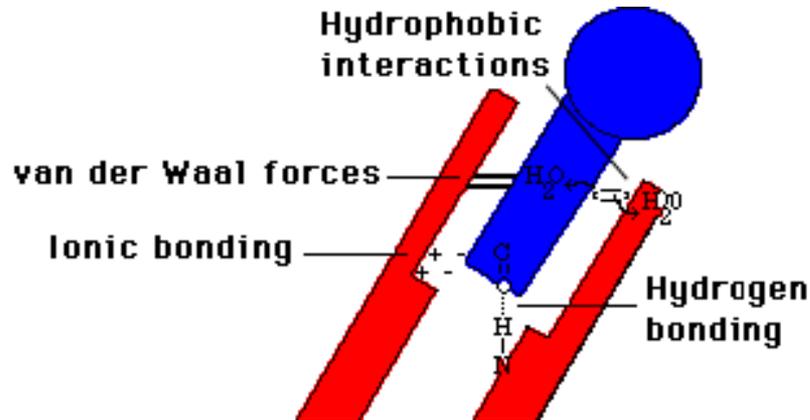


Tecniche immunochimiche

Si basano sul legame **altamente specifico antigene-anticorpo**.

Si forma un polimero di elevatissimo peso molecolare che diventa insolubile nelle soluzioni acquose: **immunocomplesso**.



Si basa su un **legame noncovalente** tra **epitopo** (sito attivo di **Ag**) e **paratopo** (sito di legame all'Ag su **Ab**).

E' un **legame forte** perché ci sono molte legami H, ionici, forze van der Waal, interazioni idrofobiche.

Epitopo: porzione di **antigene** riconosciuta dall'anticorpo; un antigene può avere sulla sua superficie uno o più epitopi identici tra di loro.

Apteni: antigeni di piccole dimensioni che non riescono a provocare una risposta cellulare: possono farlo solo se legati con proteine carrier.

Gli **anticorpi**, prodotti dalle plasmacellule, sono proteine a forma Y note come **immunoglobuline** (Ig).

Hanno diversi PM: cinque diverse classi: IgG, IgA, IgM, IgE, e IgD.

IgG hanno PM 150000

IgM sono le molecole + grandi con PM 900000

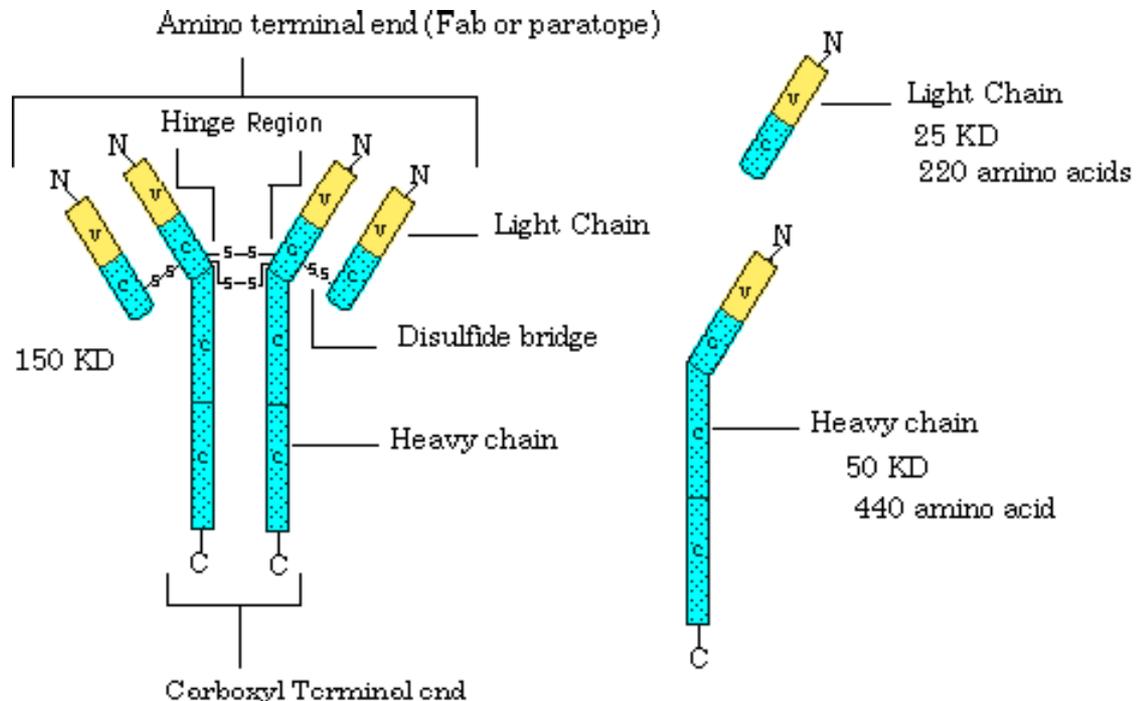
IgG: anticorpi più semplici costituite da:

quattro catene polipeptidiche: due catene **leggere** identiche tra di loro e due catene **pesanti** anch'esse identiche tra loro.

Le **catene leggere** (tipo κ o λ) sono costituite da

➤ una regione **variabile** composta da circa 110 residui nella porzione ammino terminale della molecola

➤ una regione **costante** (CL) costituita da un centinaio di amminoacidi nella porzione carbossi terminale.



Legame Ag-Ab

Si definisce **affinità di Ab** la forza di legame tra Ab monovalente e l'epitopo di un Ag monovalente.

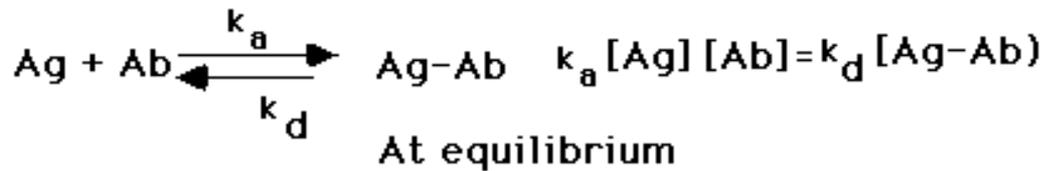
Si definisce **avidità di Ag** la forza di legame tra Ag polivalente e un Ab che possiede almeno 2 siti di legame o un antisiero che contiene Ab con diverse specificità.

Un antigene si può legare su + siti presenti su Ab (es IgM con 10 siti o IgG con 2): l'avidità complessiva è maggiore della soma delle affinità intrinseche, perché si devono rompere + legami simultaneamente.

Misure di Affinità di Ab

Espressa come costante di affinità di Ag per Ab (K).

Bisogna avere una procedura per misurare libando libero/legato (aptene).



$$K = \frac{k_a}{k_b} = \frac{[\text{Ag-Ab}]}{[\text{Ag}] [\text{Ab}]}$$

Bound antibody and antigen (r)
Free antibody (n - r)
Free antigen (c)

If all binding sites have a antibody then the equilibrium constant equals:

$$K = \frac{k_a}{k_b} = \frac{[\text{Ag-Ab}]}{[\text{Ag}] [\text{Ab}]} \rightarrow K = \frac{r}{(n-r)c} \rightarrow \frac{r}{c} = nK - rK$$

r = moles of ligand bound/mole of antibody

c = concentration of unbound (free) ligand in moles per liter.

n = valence of antibody (number of ligand binding sites).

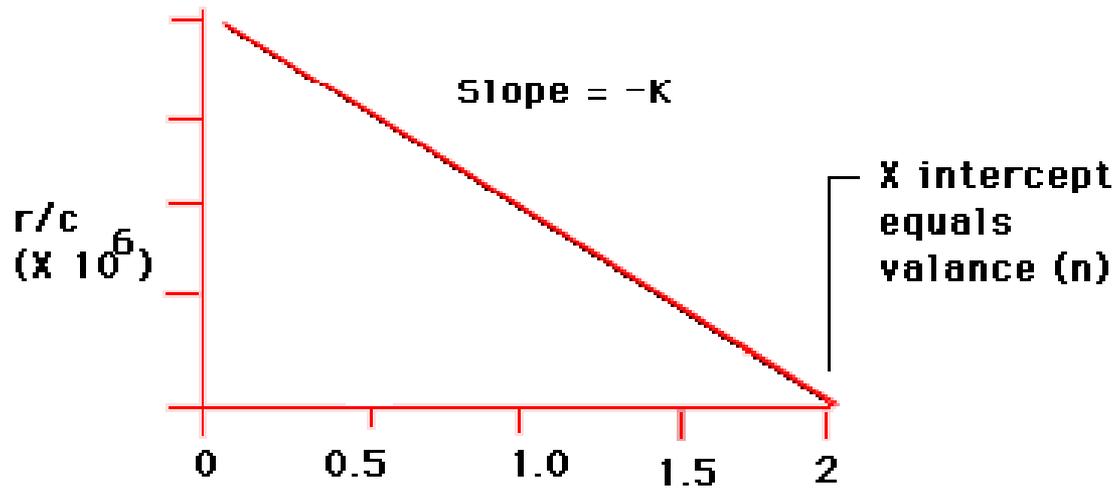
K values can vary from 10^5 liters/moles for low-affinity complexes to 10^{11} liter/mole for high-affinity complexes.

Ab con alte K sono richiesti per applicazioni diagnostiche, terapeutiche, analitiche.

Ab con basse K sono richiesti in Cromatografia Affinità, perché Ab possono essere liberati a basso pH.

Equation of the line $R/C = Kr + Kn$

y intercept equals Kn



For the y intercept set $x=0$ ($r=0$), For the x intercept set $y=0$ $r/c=0$

$$r/c = -Kr + Kn$$

$$r/c = -K(0) + kn$$

$$r/c = Kn$$

Kn equals y intercept

$$r/c = -Kr + Kn$$

$$0 = -Kr + kn$$

$$Kr = Kn$$

$$r = n$$

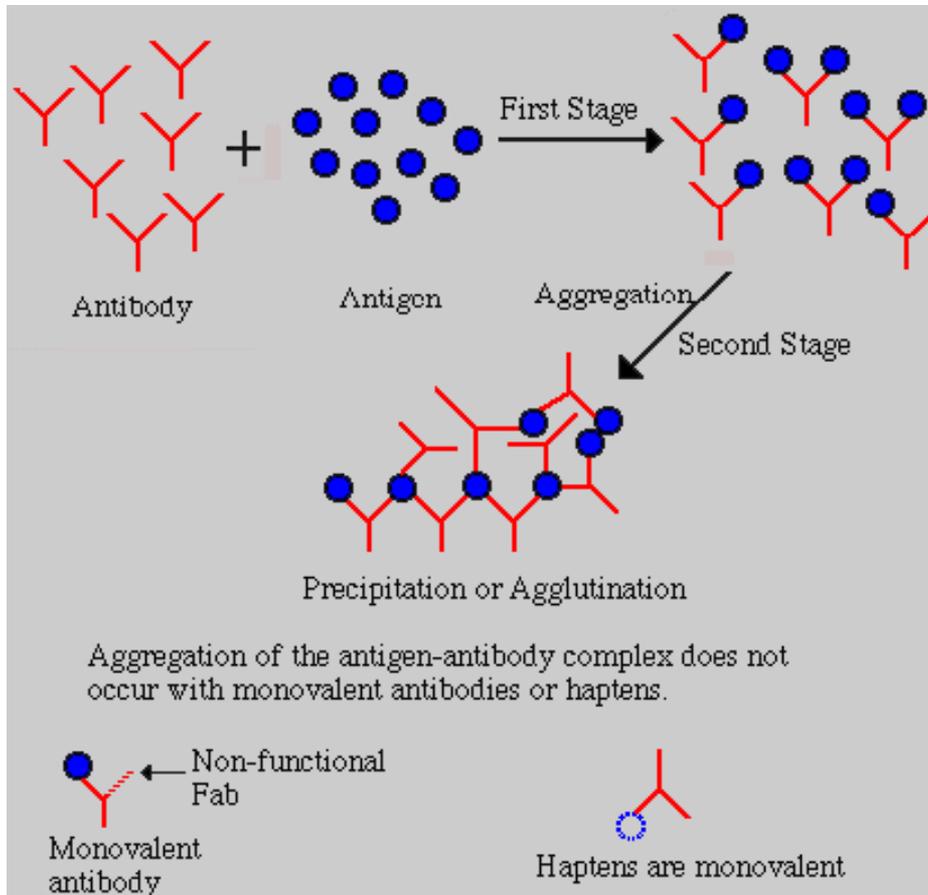
n equals x intercept

Immunoprecipitati

Gli immunoprecipitati si formano quando antigene e anticorpo sono presenti in determinati rapporti stechiometrici.

La reazione antigene-anticorpo avviene in 2 fasi:

- **combinazione** dei reagenti, quasi istantanea;
- **aggregazione** (precipitazione o agglutinazione) del complesso Ag-AB.



Non si ha complesso con Ab monovalenti o apteni, ma solo nel caso di **Ag polivalenti** e **Ab bivalenti** (ipotesi del reticolo).

Al punto di **equivalenza** (rapporto ottimale di conc. Ag/Ab) tutti Ag e Ab sono impegnati nella **formazione del reticolo**.

La **concentrazione di immunoprecipitato** in funzione della **concentrazione dell'antigene** è rappresentata da una curva suddivisa in tre zone:

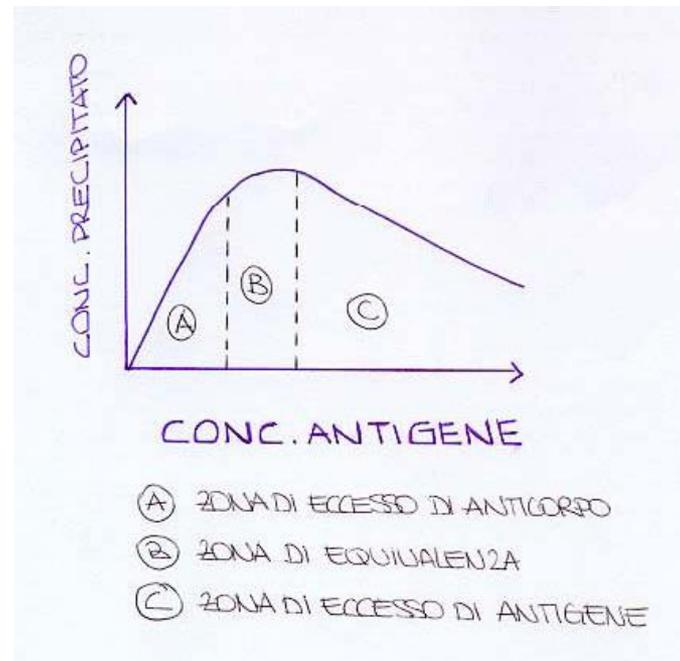
➤ zona di **eccesso di anticorpo**, in cui l'aggiunta di antigeni porta ad un aumento proporzionale della quantità di precipitato.

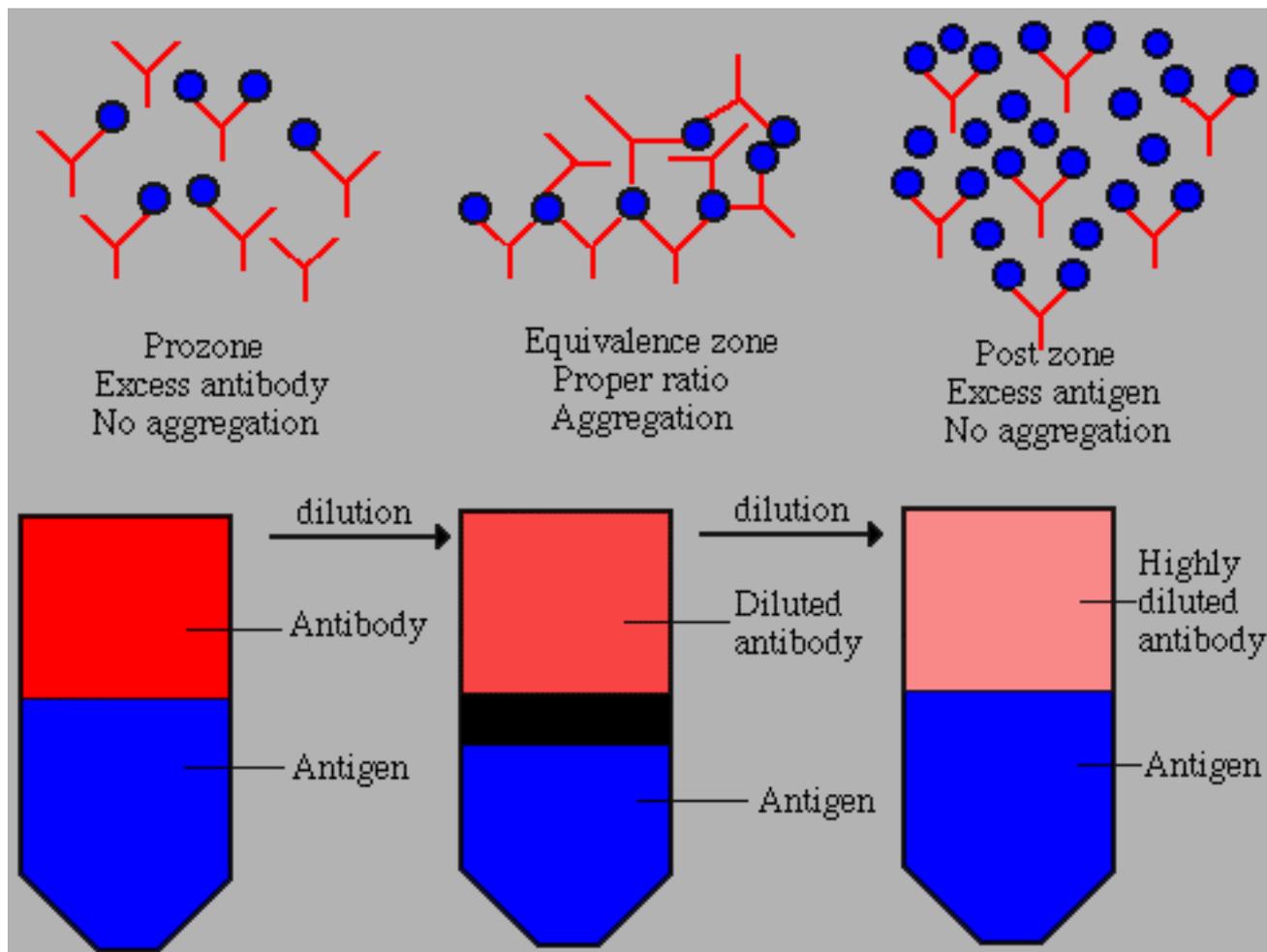
C'è un eccesso di Ab: ogni Ag è circondato da molecole di Ab e non si ha precipitazione.

➤ zona di **equivalenza** in cui si ha la massima concentrazione di precipitato del complesso antigene/anticorpo;

➤ zona di **eccesso di antigene** in cui il precipitato si ridiscioglie.

C'è una concentrazione troppo bassa di Ab: 1 solo Ag è disponibile per ogni molecola di Ab e non si ha precipitazione.





E' necessario che Ag ed Ab si avvicinino e la loro struttura sia **complementare** (meccanismo chiave-serratura). La reazione è **reversibile** ed Ag ed Ab restano invariati.

TECNICHE IMMUNOCHEMICHE

SFRUTTANDO LA CAPACITA' DEGLI ANTICORPI DI LEGARE IN MANIERA SPECIFICA GLI ANTIGENI SONO STATE CREATE MOLTE TECNICHE DI INDAGINE DETTE IMMUNOCHEMICHE

SPECIFICITA': E' fornita dalla natura dell'anticorpo che è in grado di discriminare tra la molecola desiderata e altre molecole presenti

SENSIBILITA': dipende dalla avidità dell'anticorpo, a sua volta rappresentata dalla somma delle affinità.

Anticorpi monoclonali e policlonali

Gli anticorpi vengono prodotti tramite **immunizzazione di animali** di laboratorio. La fase di immunizzazione è diversa da antigene ad antigene e da animale ad animale

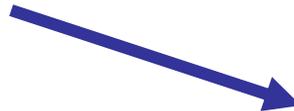
- Gli anticorpi **policlonali** derivano da risposta immune che comporta attivazione di popolazioni eterogenee di cellule B mature

Sono **miscele** di anticorpi che derivano da cloni plasmacellulari diversi: eterogeneità nelle regioni variabili e nelle regioni costanti formando gli epitopi potenzialmente immunogenici dell'antigene.

Alta avidità per l'antigene ma **bassa specificità**

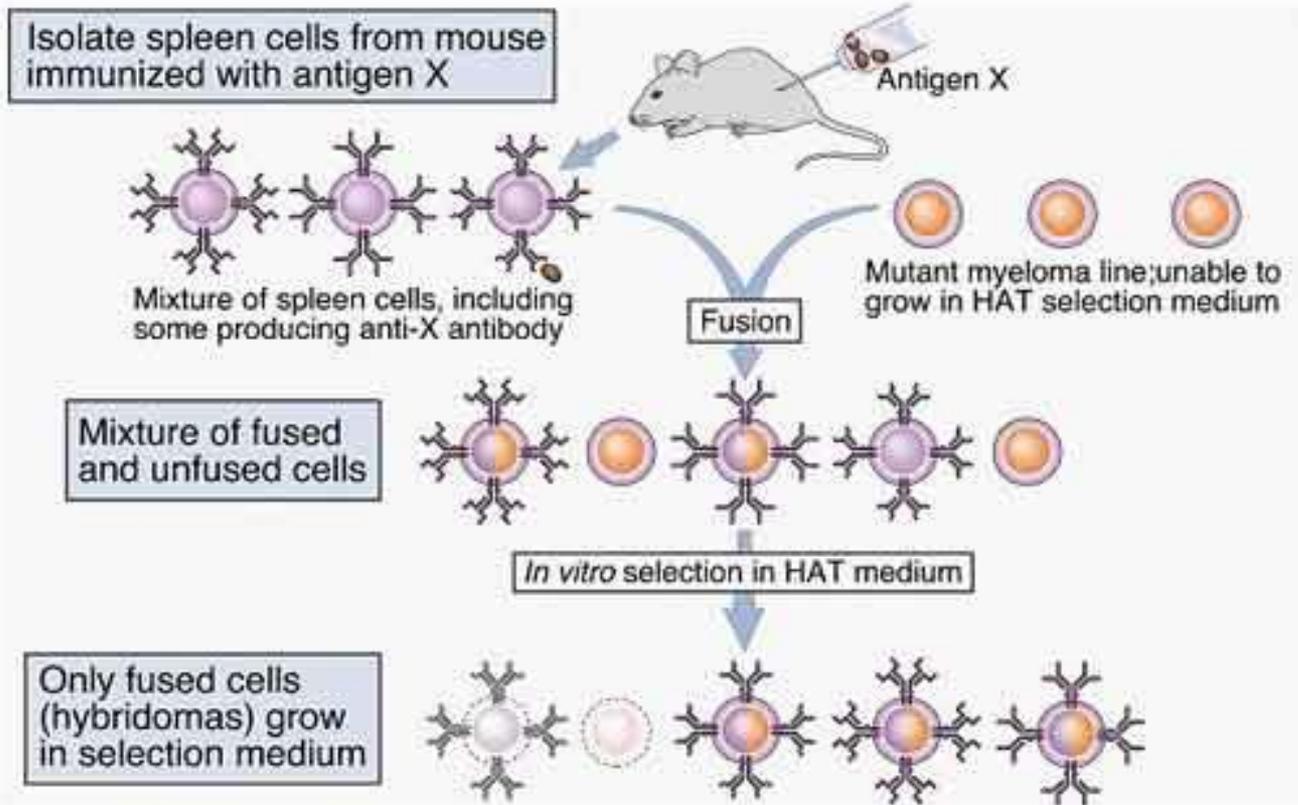
-Gli anticorpi **monoclonali** sono anticorpi che derivano da un **unico clone** plasmacellulare: sono identici nella struttura della regione costante e variabile. Riconoscenti un unico o al massimo tre epitopi dell'antigene.

-**Bassa avidità** ma **alta specificità**



ESSENZIALI NEI SAGGI IMMUNOCHEMICI

PRODUZIONE DI ANTICORPI MONOCLONALI



Da Abbas, Lichtman & Pober: Cellular and Molecular Immunology. W.B. Saunders, 1999

La metodologia prevede:

- l'immunizzazione di un animale (un topo) con un protocollo di immunizzazione
- l'isolamento e la proliferazione di una singola plasmacellula.

Dopo l'immunizzazione del topo, i **linfociti B** maturi vengono estratti dalla milza (100×10^6) e "trasformati" grazie alla fusione delle plasmacellule con cellule di mieloma (cellule proliferano velocemente in grande quantità). Si ottiene un **ibridoma**: cellula che conserva

- Capacità di produrre Ab come linfociti
- Capacità di dividersi e riprodursi velocemente come mieloma

Per la fusione si usa il polietilenglicole 4000 (PEG 4000, "colla cellulare"): le cellule in un rapporto ottimale di 5:1 sono sottoposte ad una continua e delicata agitazione .

Bisogna poi individuare l'ibridoma che produce Ab richiesti: **screening** mediante test immunochimici (RIA, ELISA).

L'intera procedura dura 6 mesi.

Metodi immunochimici

Metodi qualitativi: riconoscimento/dosaggio di antigeni

L'immunoprecipitazione avviene all'interno di un gel: *immunodiffusione*.

Metodi quantitativi: Dosaggi

Si misura quantità di Ag-Ab per determinare quantità analita: è necessaria marcatura di Ag o Ab.

Metodi qualitativi: saggi

L'immunodiffusione radiale semplice:

Si scavano dei pozzetti in un terreno di agar in cui è stato disciolto un anticorpo specifico, si pongono in questi pozzetti degli antigeni e si osservano gli anelli di precipitazione formati. Man mano che l'antigene diffonde nell'agar si forma un precipitato ad anello che si muove verso la periferia (zona di equivalenza).

Il diametro dell'anello è funzione della concentrazione di antigene. Ponendo in un grafico il diametro dell'anello (l'area del cerchio) al punto di equivalenza contro la concentrazione di antigene, si ottiene una retta di taratura che consente di determinare la concentrazione dell'antigene in un campione ignoto.

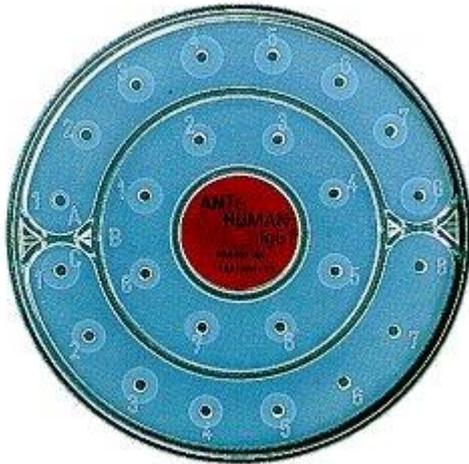
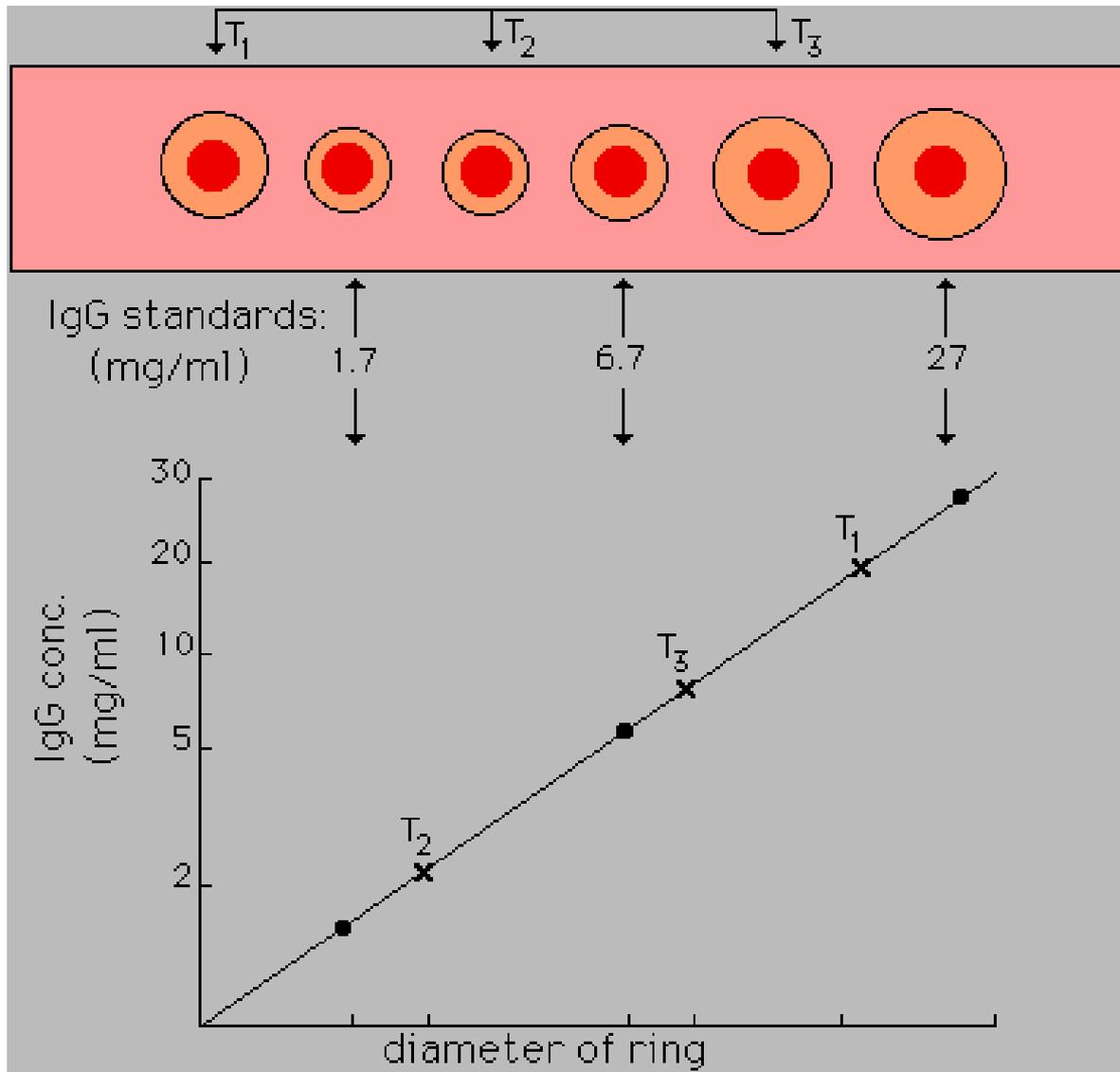
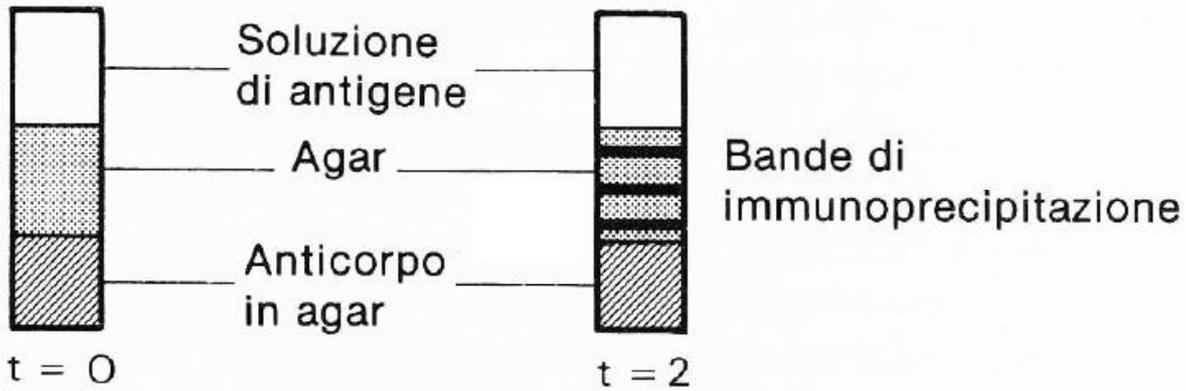


Figure 8 RID agar plate with precipitation rings.

Results are shown of a radial immunodiffusion assay for IgG1. The agar plate contains the anti-IgG1 antibody, and in the wells different samples, standards and controls are added. The diameter of the precipitation rings corresponds with the IgG1 concentration.



L'immunodiffusione monodimensionale



Semplice



L'immunodiffusione doppia (metodo di Ouchterlony).

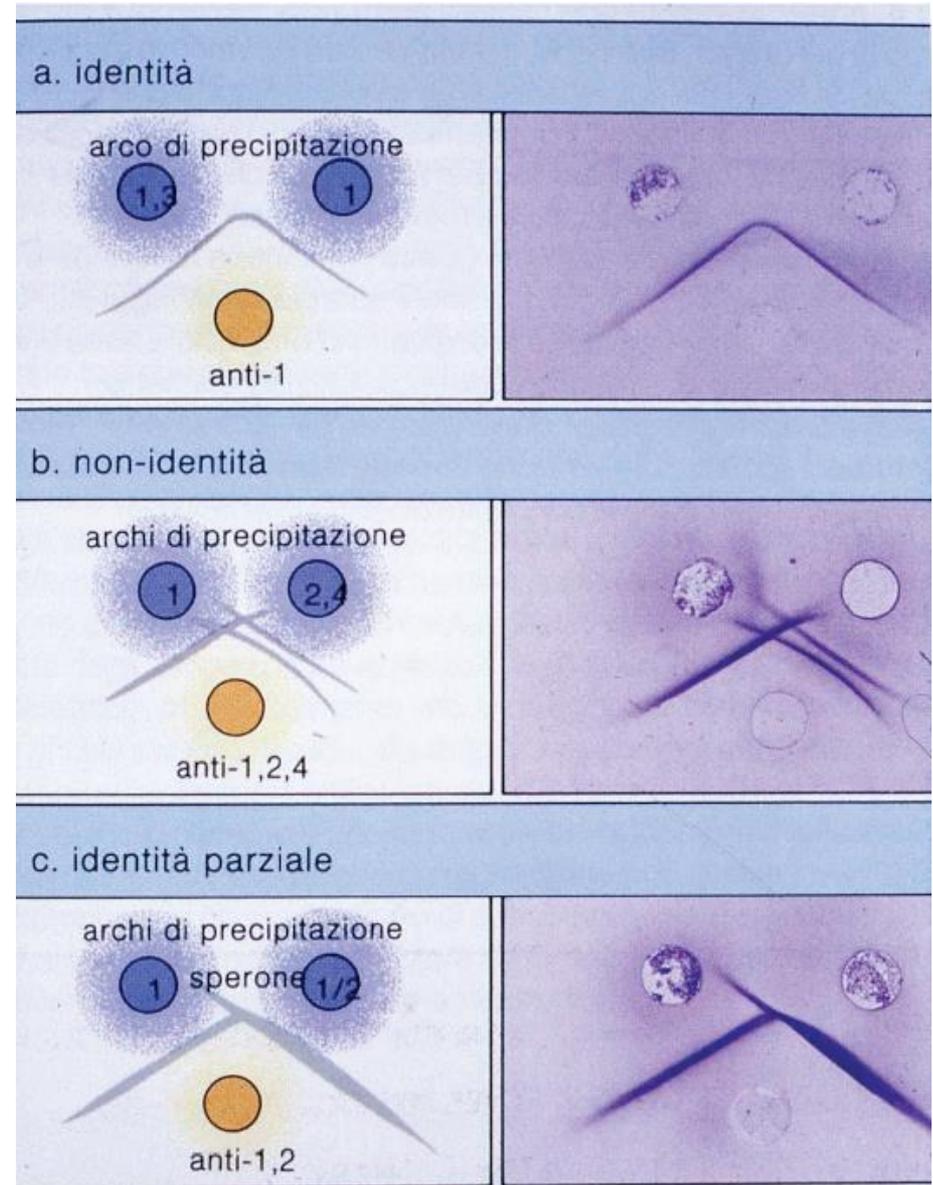
Si utilizza un gel di agar nel quale vengono scavati dei pozzetti

Nel pozzetto centrale si può depositare l'anticorpo e nei pozzetti attorno i diversi antigeni. Anticorpo ed antigene diffondono nell'agar, in corrispondenza del punto di equivalenza si forma l'**immunoprecipitato**.

a. identità: le bande di precipitazione si fondono lungo una linea continua

b. non identità (antigeni **non** hanno un **epitopo** in comune): due bande di precipitazione che si intersecano

c. identità parziale (antigeni hanno **almeno un epitopo in comune**, ma gli anticorpi riconoscono sia l'epitopo in comune sia un altro epitopo di uno solo degli antigeni): due bande asimmetriche.

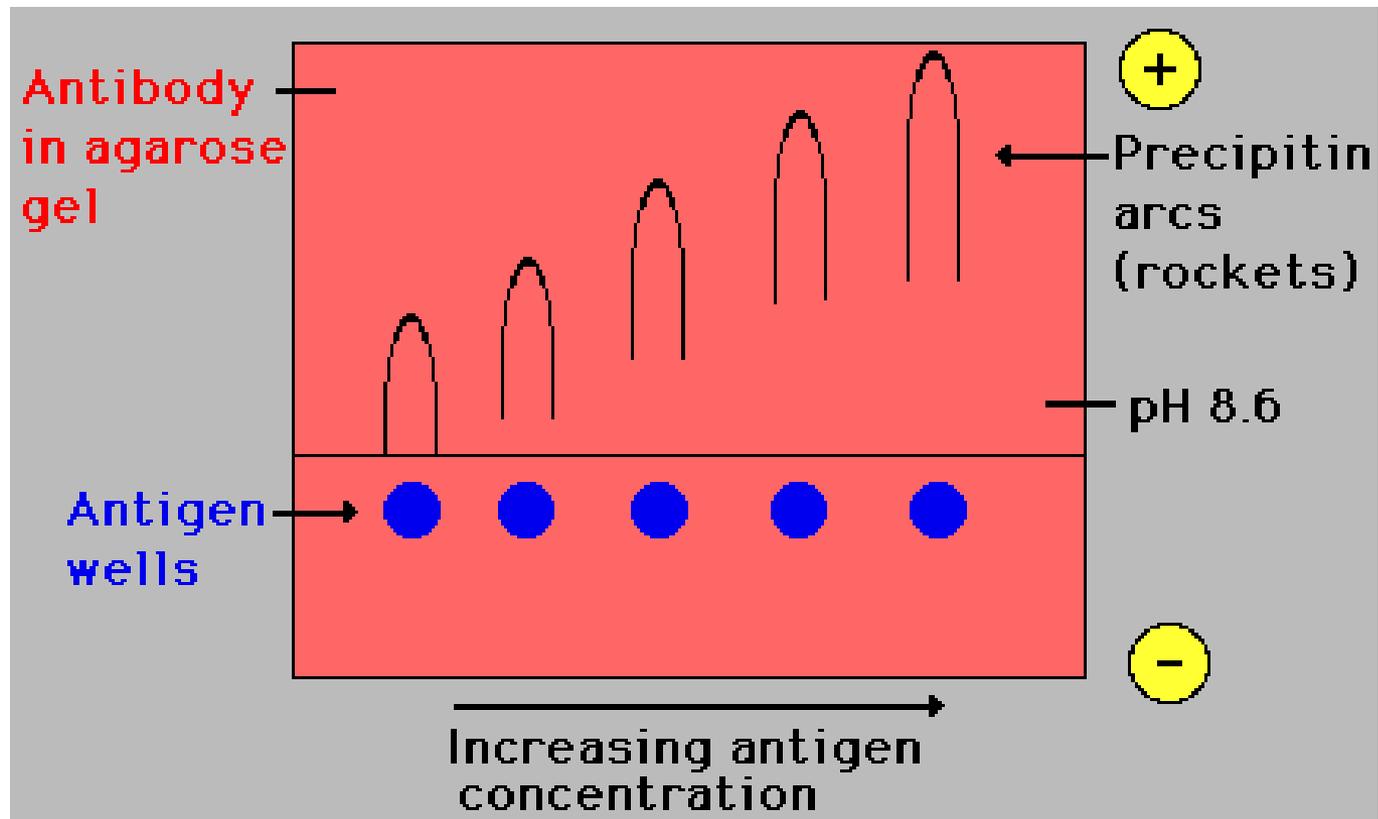


Immunolettroforesi

Si utilizza un gel d'agarosio su cui si praticano due incisioni parallele e alcuni pozzetti. Nei pozzetti si depositano gli antigeni e si fa avvenire l'elettroforesi. Al termine dell'elettroforesi, le due **incisioni parallele sono riempite con un antisiero opportuno** e si lascia in incubazione per una notte. Gli antigeni diffondono radialmente e gli anticorpi diffondono lateralmente dando quindi luogo ad **archi di precipitazione**.

L'immunolettroforesi quantitativa: "rocket elettroforesi": quando antigene e anticorpo hanno raggiunto l'equivalenza stechiometrica si formeranno gli archi di precipitazione.

Più l'antigene è concentrato nel pozzetto, più alto è il suo arco di precipitazione: altezza degli archi vs. concentrazione dell'antigene.

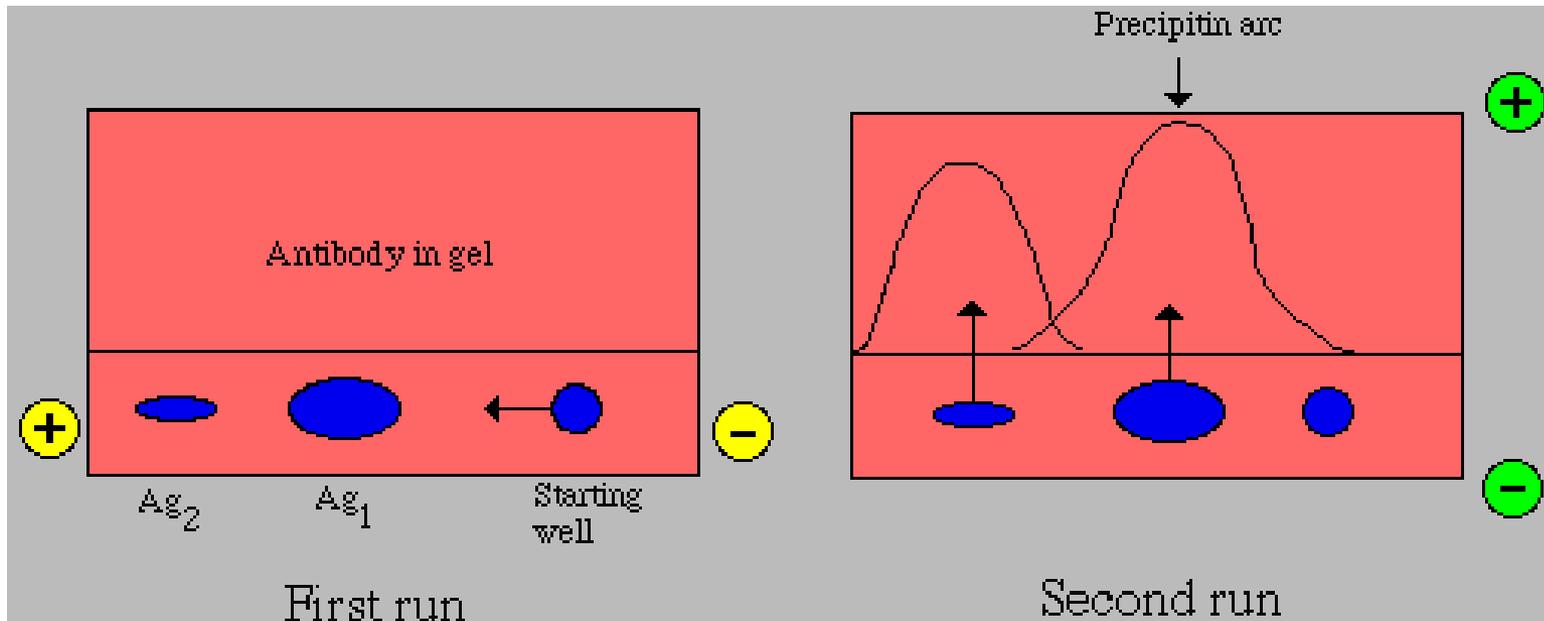


Immunolettroforesi bidimensionale

La separazione elettroforetica di una miscela di sostanze (proteine, antigeni) è accoppiata alla specificità e la rapidità della rocket elettroforesi.

Una porzione del gel su cui sono separati i composti viene poi trasferita su uno strato d'agar contenente un anticorpo. Si effettua una **elettroforesi in direzione perpendicolare** alla precedente. Si formano degli archi di precipitazione (forma di campana).

Confronto con **aree** di standard: **stima semiquantitativa** della concentrazione.



Metodi quantitativi: dosaggi

Determinazione quantitativa di antigene o anticorpo.

❖ richiedono **marcatura di Ag o Ab** per determinazione quantitativa del complesso Ag-Ab:

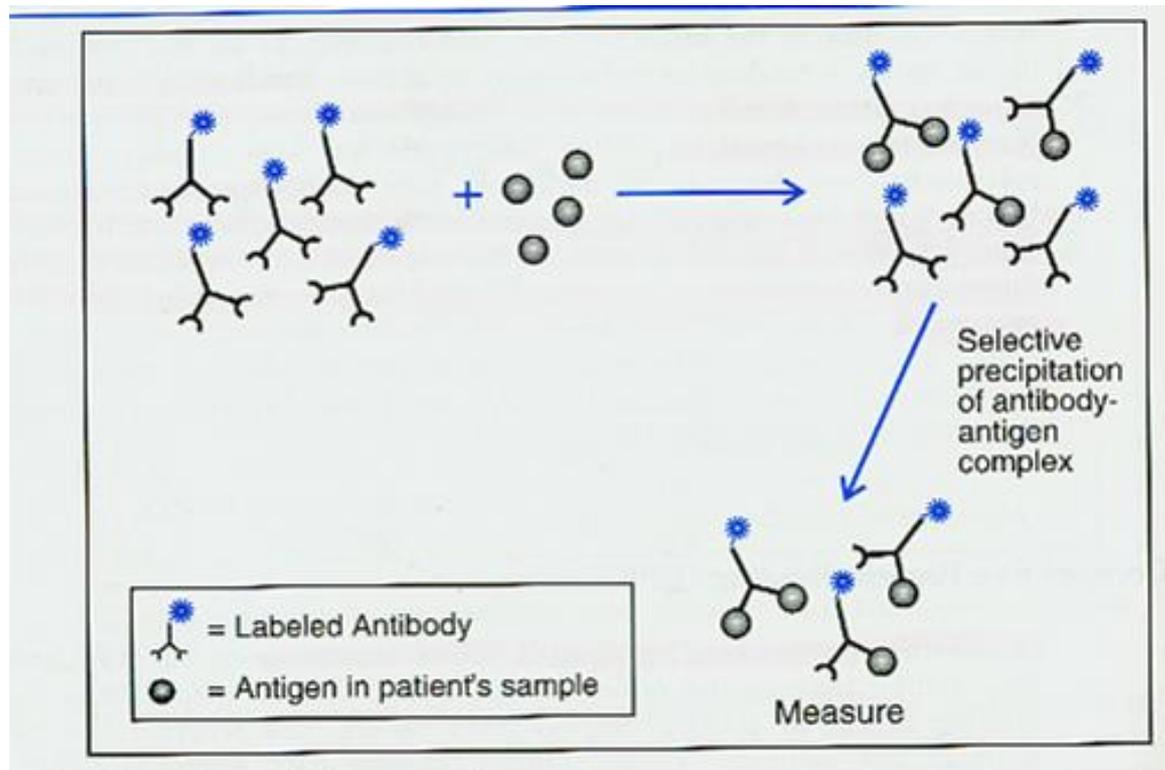
- Raioisotopi:RIA
- Fluorocromo:FIA
- Enzima:EIA

❖ utilizzo di composti marcati in metodi:

- non competitivi
- competitivi

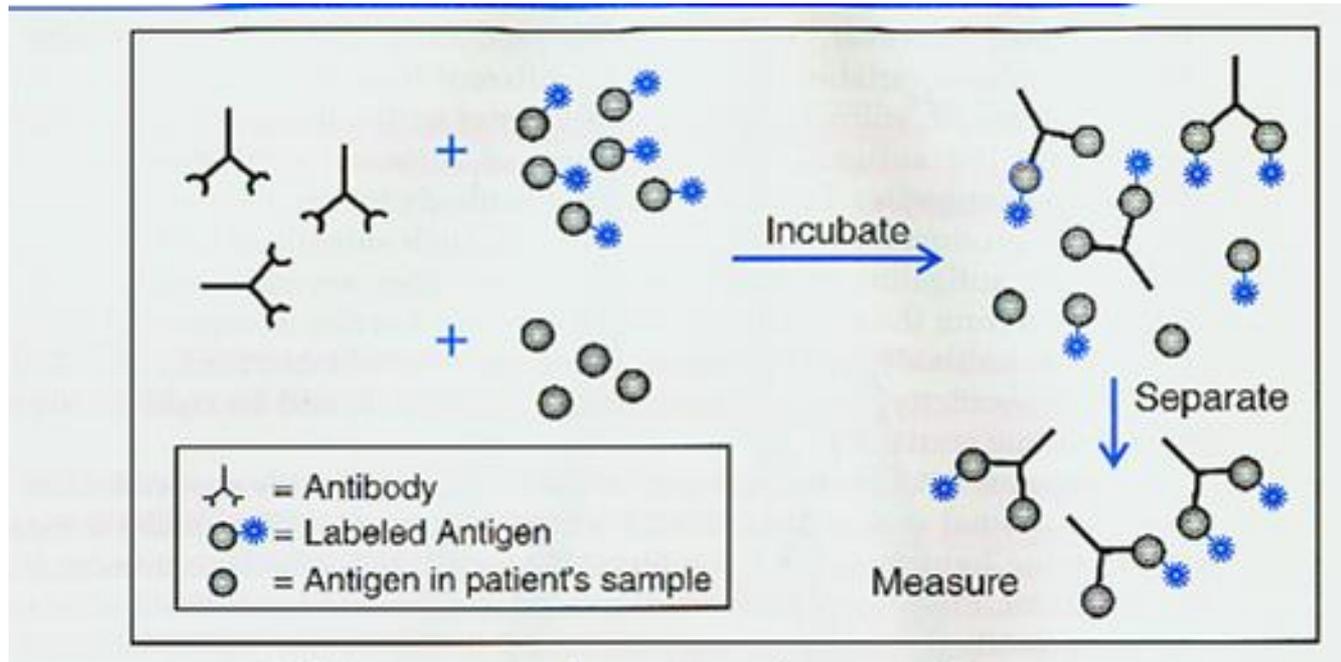
Dosaggi non-competitivi

Ag (analita incognito) è fatto reagire con quantità aggiunta in eccesso di **Ab marcato**
La quantità di complesso Ag-Ab è **proporzionale** alla concentrazione di Ag



Dosaggi competitivi

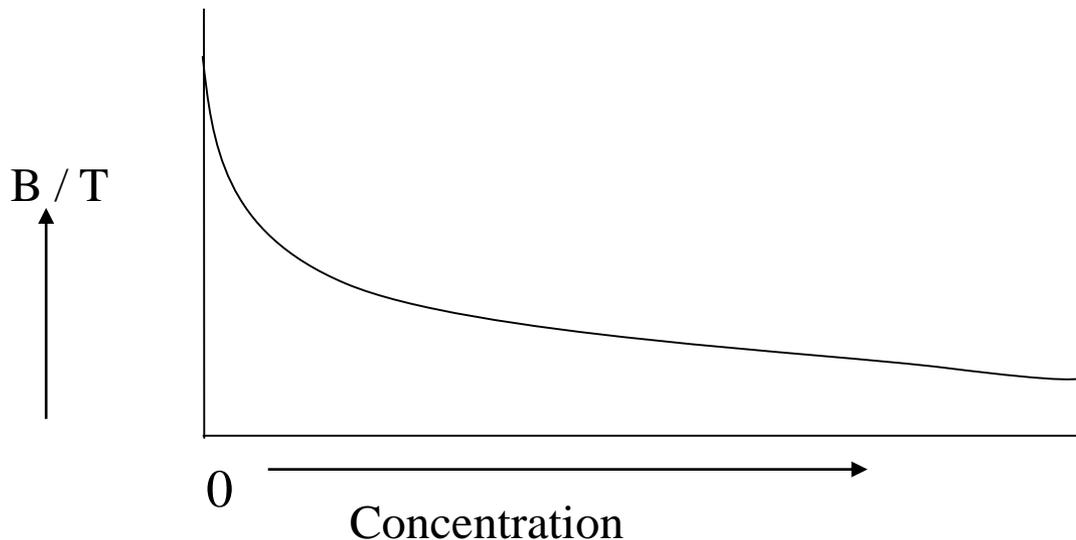
Si basa sulla **competizione** tra Ag freddo (analita incognito) e **Ag marcato** (quantità nota aggiunta) su Ab



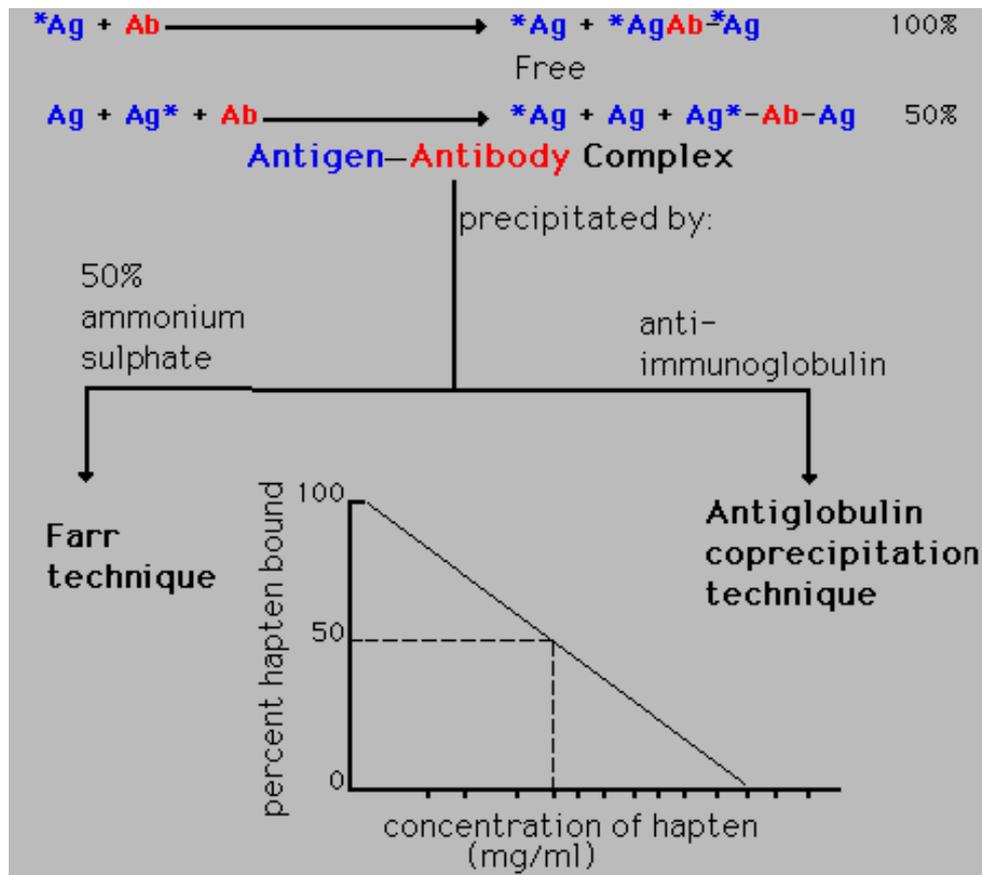
Dosaggi competitivi

Il rapporto tra Antigene legato (B) ed antigene totale (T) è **inversamente** proporzionale alla quantità di antigene freddo.

Utilizzando Standard di antigene freddo si costruiscono curve di calibrazione.



Determinazione **quantità ottimale antigene marcato** *Ag:
 Aggiunta di eccesso di *Ag per avere legame quantitativo con Ab
 Aggiunta di Ag fino ad avere lo **spostamento del 50% del complesso formato**.
 Precipitazione con ammonio solfato (Farr) o aggiunta di antiglobulina



Saggi immunologici eterogenei verso omogenei

- **Eterogenei**: richiedono la **separazione** dei componenti legati e non legati dopo che la reazione ha avuto luogo (p.e. ELISA)
- **Omogenei**: non è necessaria la **separazione** dei componenti legati e non legati dopo la reazione perchè i prodotti di reazione sono misurati direttamente *in situ*.

Metodi di separazione del ligando marcato e non marcato

Metodo	Principio
Carbone vegetale rivestito Florisil Proteina A di <i>S. aureus</i>	Adsorbimento della frazione legata o di quella libera
Polietilenglicole Etanolo Solfato di ammonio	Precipitazione frazionata della parte legata
Anticorpo secondario solubile in fase solida – cellulosa – particelle magnetiche	Precipitazione della frazione legata
Anticorpo primario in fase solida – pozzetti e tubi rivestiti – cellulosa – particelle magnetiche	Precipitazione della frazione legata

Marcatura nei dosaggi immunochimici

Diversi tipi di dosaggio utilizzando diverse sonde di marcatura:
per identificare/quantificare antigene o anticorpo:

Dosaggio radio immunologico (RIA)

Marcatura con radioisotopo

Dosaggio anticorpo fluorescente (FIA)

Marcatura con un fluorocromo per aumentare la sensibilità

Dosaggio enzimatico (EIA)

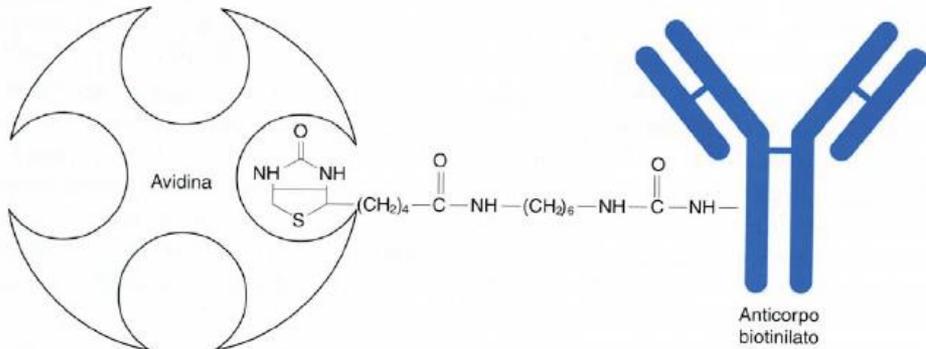
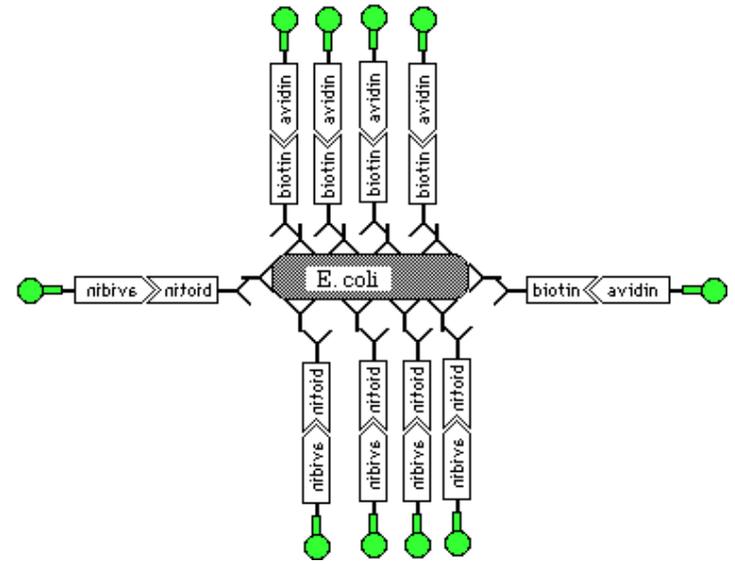
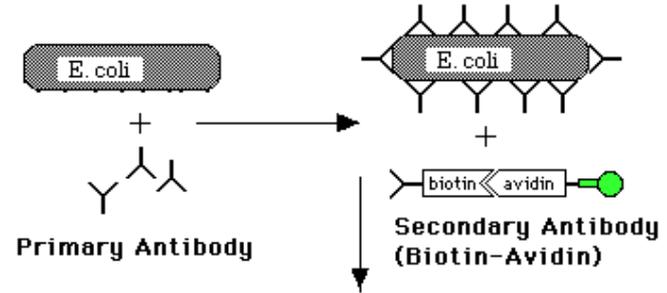
Marcatura con un enzima per aumentare la sensibilità

Marcatura con Biotina-Avidina

Avidina è una glicoproteine (da albumina di uovo) con grande *affinità e specificità* per biotina (vitamina).

Biotina si lega a IgG

Avidina viene marcata con un fluorocromo, enzimi, radioisotopi



Anticorpi marcati utilizzando il legame Biotina-Avidina sono usati in dosaggi **FIA, ELISA, RIA**.

Dosaggio radio immunologico (RIA)

RIA usa una marca radioattiva (normalmente ^{125}I , ^3H o ^{14}C), che emette radiazioni che possono essere misurate da un contatore gamma o beta

Negli anni passati la tendenza è stata di allontanarsi dal RIA e muoversi verso tecniche non isotopiche

Isotopo	Vita media
^3H	12,26 anni
^{14}C	5.760 anni
^{22}Na	2,58 anni
^{32}P	14,20 giorni
^{35}S	87,20 giorni
^{42}K	12,40 ore
^{45}Ca	165 giorni
^{59}Fe	45 giorni
^{125}I	60 giorni
^{131}I	8,05 giorni
^{135}I	6,7 ore

Antigene viene marcato con radioisotopo.

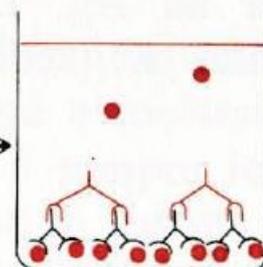
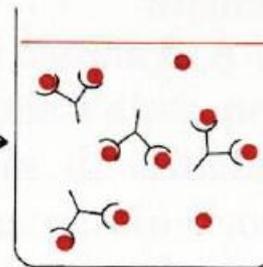
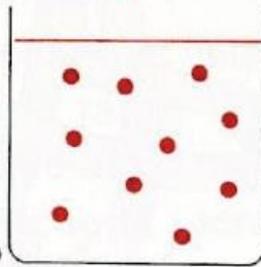
Si separano le specie legate da quelle libere, su ciascuna **si misura la radioattività**.

Curva di taratura: radioattività legata/radioattività libera contro la concentrazione nota di Ag.

Dosaggi RIA

CAMPIONE DI CONTROLLO

quantità fissa di antigene radioattivo



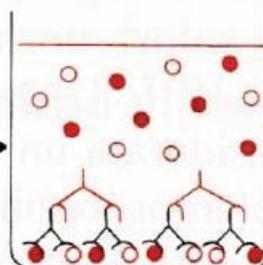
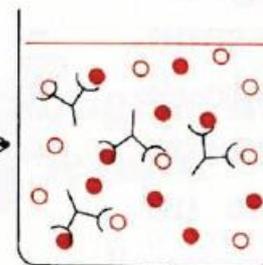
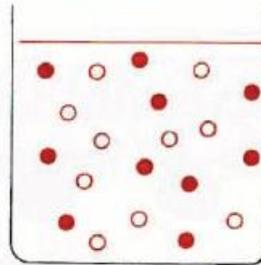
aggiunta di una quantità fissa di anticorpo anti-A

l'aggiunta di anticorpi anti-immunoglobulina fa precipitare gli anticorpi anti-A con gli antigeni A legati

viene misurata la radioattività nel precipitato

CAMPIONE DA DETERMINARE

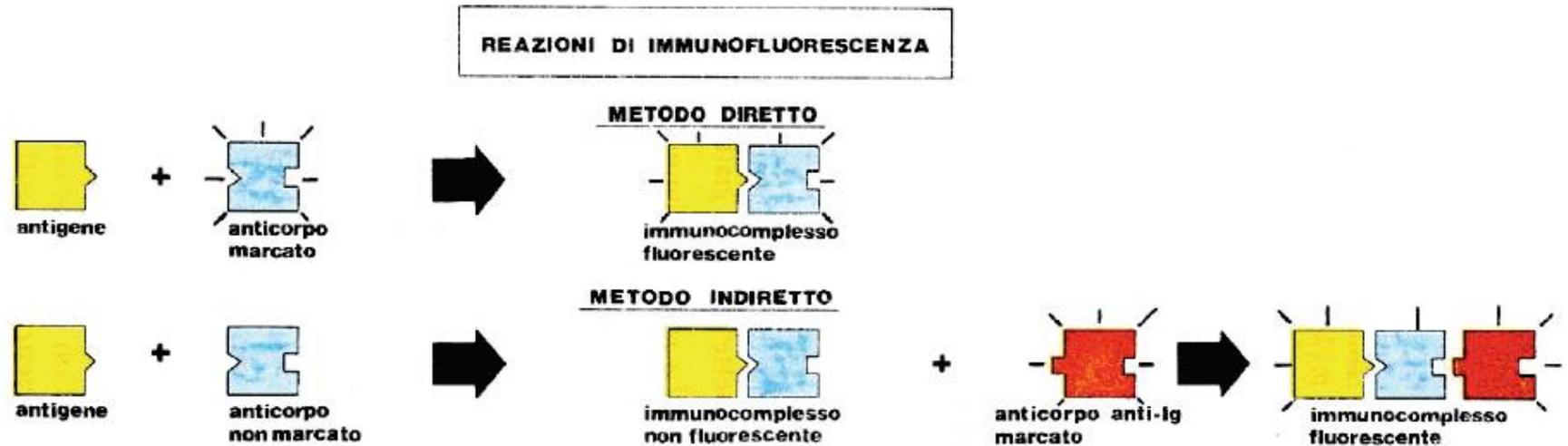
una quantità fissa di antigene A radioattivo miscelato con una quantità non nota di antigene A non radioattivo



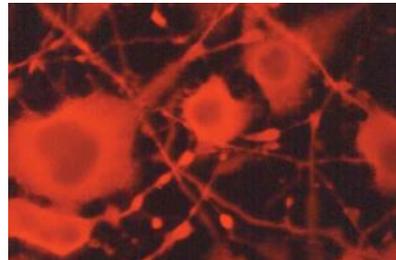
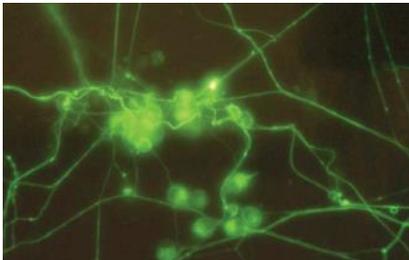
Marcatura con sonda fluorescente (FIA)

Antigene viene marcato con un fluorocromo per aumentare la sensibilità

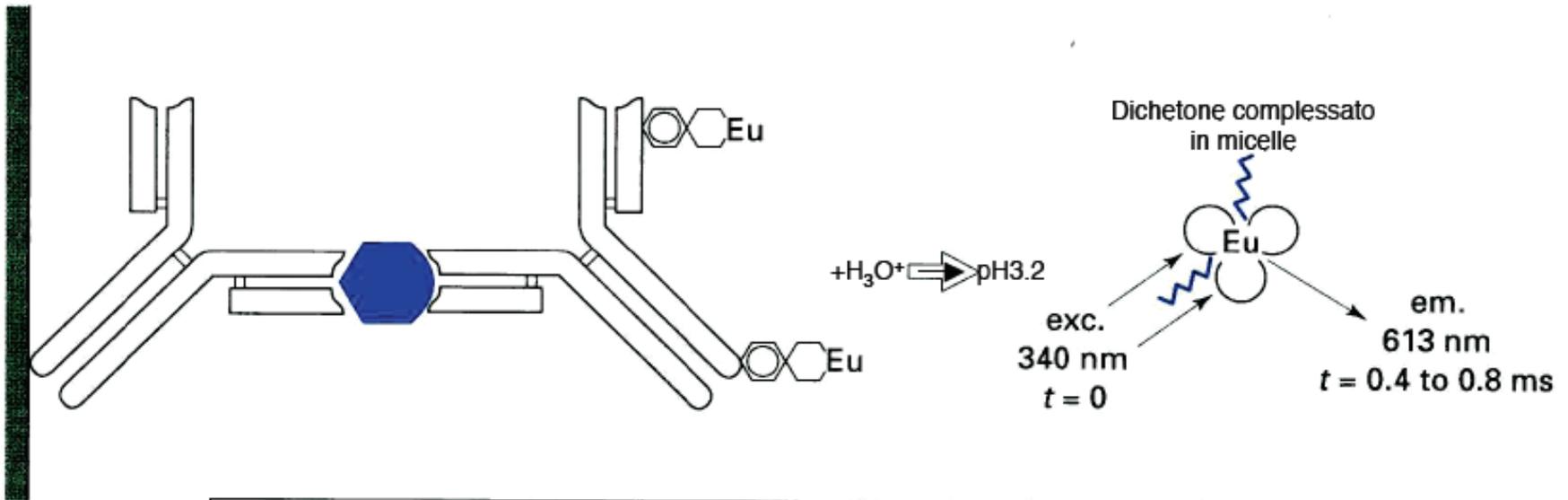
Dosaggio: competizione tra un antigene non marcato e una quantità fissa dello stesso antigene marcato.



Indagine **qualitativa/morfologica** utilizzando immagini da emissione



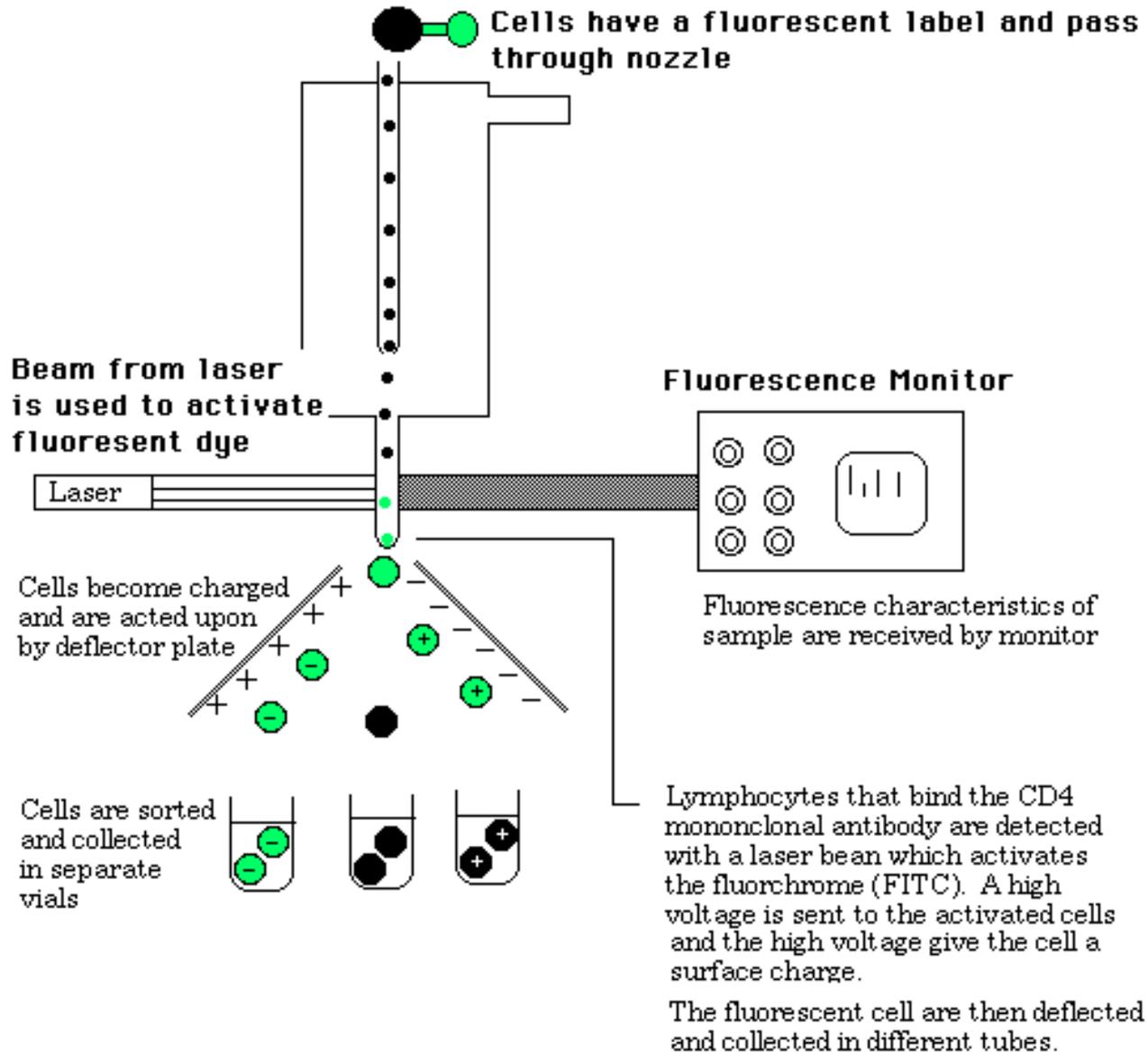
Amplificazione di sensibilità: fluorescenza



1	2	3	4
Immunodosaggio su fase solida	Immunoreagente marcato con Eu	Amplificazione della fluorescenza a seguito della dissociazione	Dosaggio fluorimetrico nel tempo

Europio: lantanide con fluorescenza naturale

Fluorescence-Activated Cell Sorter (FACS)



Saggio immunoenzimatico (EIA)

Marcatura con enzima per fornire un segnale misurabile;

Scelta di enzima/**substrato adatto**:

- ✓ facilmente quantificabile con strumenti facilmente reperibili: spettrofotometria come variazione di assorbanza;
- ✓ atossico;
- ✓ molto stabile;
- ✓ di facile utilizzo;
- ✓ richieda poco tempo e tamponi semplici per l'utilizzo.

Enzimi più comunemente utilizzati come marcatori

Enzima	Fonte	Struttura	Reazione catalizzata
Perossidasi	Rafano	Glicoproteina monomerica M_r 40 000	$H_2O_2 + \text{substrato ossidabile} \rightarrow \text{prodotto ossidato} + 2H_2O$
Fosfatasi alcalina	Intestino di vitello (di solito)	Glicoproteina contenente Zn^{2+}	$R-O-P + H_2O \rightarrow R-OH + Pi$ monoestere alcol fosfato ortofosforico inorganico
β -Galattosidasi	<i>E. coli</i>	Proteina multimerica (4 subunità) M_r 540 000	β -D-Galattoside + $H_2O \rightarrow$ galattosio + alcol
Glucosio ossidasi	<i>Aspergillus niger</i>	Flavoglicoproteina	β -D-Glucosio + $O_2 \rightarrow H_2O_2 +$ acido gluconico
Ureasi	<i>Canavalia ensiformis</i>	M_r 480 000	$(NH_2)_2CO + 3H_2O \rightarrow CO_2 + 2NH_4OH$

Esempi di EIA in bioanalitica

Sostanza	Enzima marcatore	Tecnica di separazione
Insulina	Glucoso-ossidasi	Fase solida (sephadex)
Insulina	Perossidasi	Doppio anticorpo
Estriolo	Perossidasi	Doppio anticorpo
Tiroxina	Malato deidrogenasi	Doppio anticorpo
HPL	Perossidasi	Doppio anticorpo
HCG	Perossidasi	Fase solida (cellulosa)
α_1 fetoproteina	Perossidasi	Doppio anticorpo
Ig E	Fosfatasi alcalina	Fase solida (adsorbita alla provetta)
Ig G	Fosfatasi alcalina	Fase solida (biogel)

Confronto **sensibilità** tra di dosaggi immunochimici

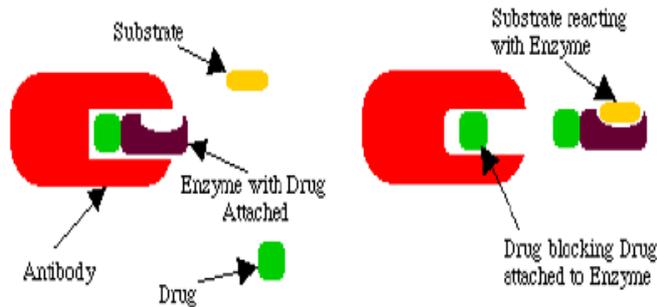
Tracciante: limite di rivelazione

Deve essere presente nel tubo da saggio ad una massa estremamente bassa (10^{-12} - 10^{-20} g) e facilmente rivelabile.

TRACCIANTE	SEGNALE	MASSA (moli/tubo)
^{125}I	~ 10.000 dpm	$0.1 - 10 \times 10^{-15}$
<i>Enzima</i>	— Assorbanza	$10^{-15} - 10^{-16}$
	— Luminescenza	$10^{-16} - 10^{-18}$
	— Fluorescenza	$10^{-15} - 10^{-18}$
	— Amplificazione ciclica enzim.	$10^{-20} - 10^{-21}$
<i>Molecola fluorescente</i>	I fluorescente	$10^{-18} - 10^{-19}$
<i>Molecola chemiluminescente</i>	mV	$10^{-16} - 10^{-18}$

EMIT Enzyme Multiplied Immunoassay Technique

Dosaggi omogenei: non è necessaria separazione Ag* Libero/legato perchè legato non dà segnale



- L'attività/assorbimento dell'enzima è direttamente proporzionale alla concentrazione di farmaco

- Il farmaco nel campione ed il farmaco marcato con G6PD competono per siti peptidilici di anticorpi
- Il legame inibisce l'attività dell'enzima, mentre enzimi liberi restano liberi di interagire con il substrato.

La **glucosio-6-fosfato deidrogenasi (G6PD)** catalizza la reazione di ossidazione:



La reazione è seguita con misura di **fluorescenza**: NAD(P)H massimo di eccitazione a **340 nm** ed un massimo di emissione a **460 nm**

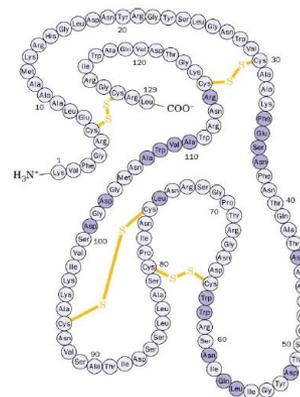
Dosaggi EMIT per **farmaci e droghe**

Sostanza

Amfetamine
Barbiturici
Metadone
Oppiacei
Digossina
Difenilidantoina
Fenobarbital
Primidone

Enzima marcatore

Lisozima
Lisozima
Lisozima
Lisozima
G-6-PD
G-6-PD
G-6-PD
G-6-PD



Lisozima: catalizza l'idrolisi di un acetale ad emiacetale

Dosaggio ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

ELISA: Enzyme Linked ImmunoSorbent Assays

Test immunochimico che si usa per la rilevazione di Peptidi, Proteine, anticorpi, ormoni.

Principio: Antigene **immobilizzato** su fase solida: le superfici di plastica sono in grado di legare dosi bassissime di proteine riconosciute dall'anticorpo.

Linked: favorita complesso ag-Ab per fattori entalpici.

ELISA: Combina la specificità degli anticorpi con la sensibilità dei dosaggi enzimatici.

Limite: provvede informazioni solo sulla presenza/concentrazione di una molecola, ma non danno informazioni sulle sue proprietà biochimiche (es peso molecolare, localizzazione cellulare, ecc).

Si può effettuare su piastre da microdosaggio: ogni piastra contiene 96 pozzetti per saggiare contemporaneamente un elevato numero di campioni.

FASI DI UN METODO ELISA

- ✓ 1. Scelta del supporto adeguato all' analita: **piastre da 96 pozzetti** in grado di legare anticorpi e proteine con diverse affinità;
- ✓ 2. Ottimizzazione della fase di **coating** (legame dell'analita o di un anticorpo primario alla piastra);
- ✓ 3. Ottimizzazione della **fase di blocco per occupare i siti ancora liberi** sulla superficie del pozzetto
- ✓ 4. Scelta di un tampone ideale per effettuare i lavaggi in grado di eliminare interferenze e favorire segnali specifici
- ✓ **Scelta del tempo di incubazione** dei campioni e tampone idonei al test (tamponi da diluizione anche per dissociare immunocomplessi)
- ✓ **Anticorpo marcato** in modi diversi, a seconda della sensibilità che si vuole ottenere

1. SCELTA DELLA PIASTRA

Polistirene o di polipropilene: deve legarsi con forza alta o media all'analita/anticorpo;

- Per molecole che non aderiscono (peptidi di origine sintetica o farmaci) si utilizzano **micropiastre chimicamente attivate** per formare un legame covalente dell'antigene, es avidina;

- da 96 a 120 pozzetti: analisi di un alto numero di campioni con poco analita

- A seconda del tipo di segnale che deve essere rilevato si utilizzeranno piastre con caratteristiche diverse:

- Saggi colorimetrici e radioattivi: piastre trasparenti

- Saggi fluorescenti: piastre nere

- Saggi chemiluminescenti: piastre bianche opache



2. FASE DI COATING

Passaggio chiave nel corretto funzionamento di un sistema ELISA.

➤ QUANTITA' DI ANTIGENE:

di solito viene valutato l'**ingombro sterico** dell'analita e la sua capacità di adesione

➤ TAMPONI CHE FAVORISCONO IL COATING:

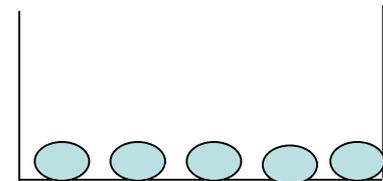
NaCl 0,9% se l'antigene è rappresentato da una proteina che aderisce facilmente alla plastica oppure se vogliamo far aderire un anticorpo.

Tampone Carbonato 50 mM pH 9,6-9,8

Tris-HCl 20 mM pH 8,5

➤ TEMPI DI INCUBAZIONE:

In base alle caratteristiche adesive dell'analita da tutta la notte a 37°C fino a 30 minuti a temperatura ambiente



3. FASE DI BLOCCO

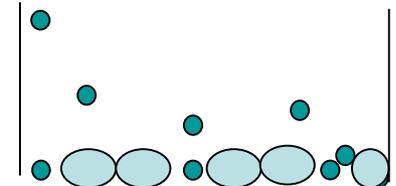
Il “Blocco” serve a **bloccare i siti non occupati** per ridurre il legame aspecifico di proteine e soprattutto dell’anticorpo coniugato, durante le fasi successive del saggio.

Si effettua in diversi modi:

- ✓ BSA (albumina bovina): il più usato;
- ✓ Latte in polvere: abbastanza comune: Latte in polvere
- ✓ Gelatina: in casi eccezionali.

La piastra viene incubata a 37° C per 60-90 minuti

La piastra viene stabilizzata per essiccazione o con agenti stabilizzanti



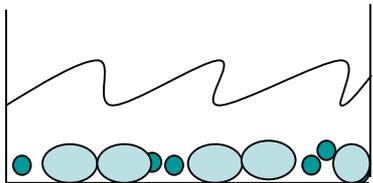
4. FASE DI LAVAGGIO

Il lavaggio è estremamente importante per togliere tutto il materiale non legato in modo specifico in tutti i passaggi previsti dal metodo.

Si utilizzano soluzioni fisiologiche addizionate con un detergente a basse concentrazioni il quale favorisce l'eliminazione dei legami aspecifici

E' facile separare il materiale legato immobilizzato sulla superficie da quello non legato.

- metodo adatto per misurare analiti in estratti grezzi;
- lavatore automatico per ottenere la massima riproducibilità dei sistemi



Determinazione di Antigene: ELISA DIRETTO SEMPLICE

Metodo DIRETTO competitivo:

➤ Si aggiunge una quantità nota di **antigene marcato con un enzima** e una **quantità ignota dello stesso antigene libero**. Dopo aver lavato il complesso con tampone, **si aggiunge il substrato dell'enzima** e si misura l'attività enzimatica.

➤ L'attività enzimatica misurata è **proporzionale alla frazione di antigene marcato** presente nella miscela.

➤ La **differenza** tra questo valore e quello di un campione in cui non è presente l'antigene libero rappresenta la misura della **concentrazione di antigene** nel campione ignoto

ELISA: metodo competitivo

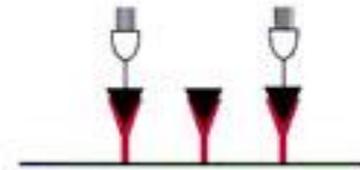
Anticorpi specifici legati ad una fase solida



Aggiunta di antigene marcato con un enzima e di antigene non marcato, seguita da incubazione e lavaggio



Antigeni legati



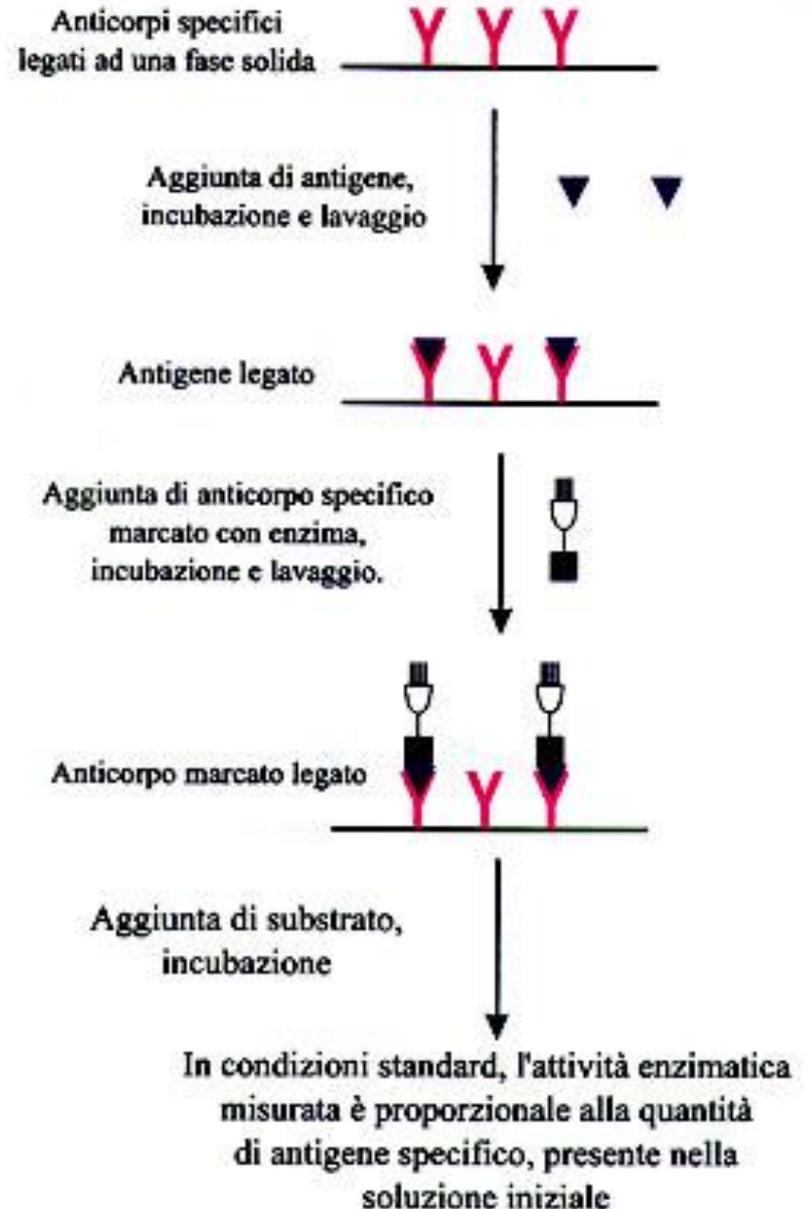
Aggiunta del substrato dell'enzima e incubazione

In condizioni standard, l'attività enzimatica è proporzionale alla frazione di antigene marcato presente nella miscela antigene marcato + antigene non marcato

Dosaggio Antigene: ELISA INDIRETTO

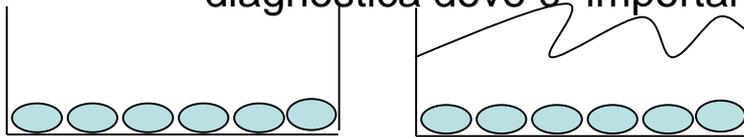
- Si fa reagire una soluzione incognita di antigene con un anticorpo specifico legato ad una fase solida,
- si lava e si aggiunge un **secondo anticorpo policlonale** per legarsi ad un diverso epitopo dell'antigene.
- Dopo un secondo lavaggio **si aggiunge il substrato dell'enzima**.
- L'attività enzimatica dosata in condizioni standard, sarà **direttamente proporzionale** alla quantità di antigene presente.

ELISA: metodo del doppio anticorpo

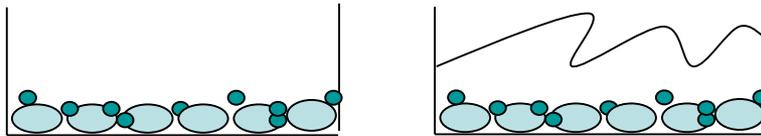


Determinazione di Antigene: ELISA INDIRETTO SEMPLICE

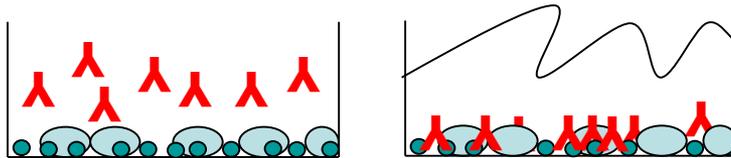
spesso **solo qualitativo** per scarsa possibilità di curva standard adeguata molto utilizzato nelle diagnostica dove è importante calcolare cut off sieri positivi e negativi



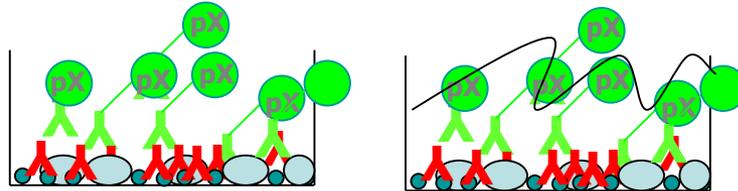
1. coating analita incubazione lavaggio



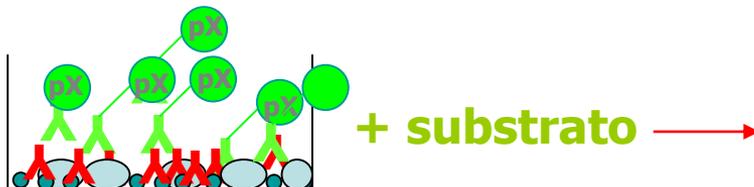
2. Blocco della piastra incubazione lavaggio



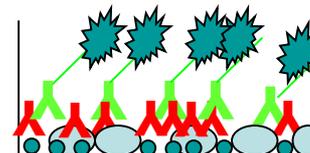
3. Aggiunta dell'anticorpo primario incubazione lavaggio



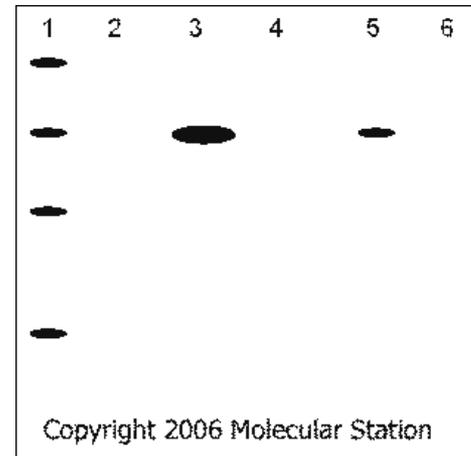
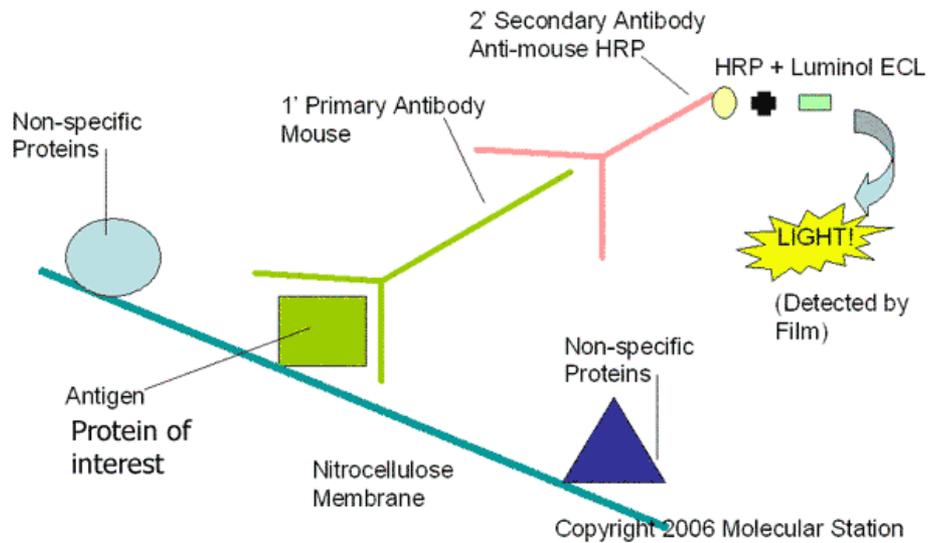
4. Aggiunta dell'anticorpo secondario coniugato incubazione lavaggio



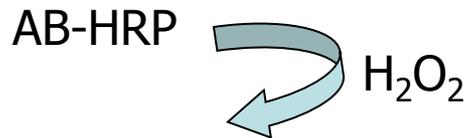
+ substrato →



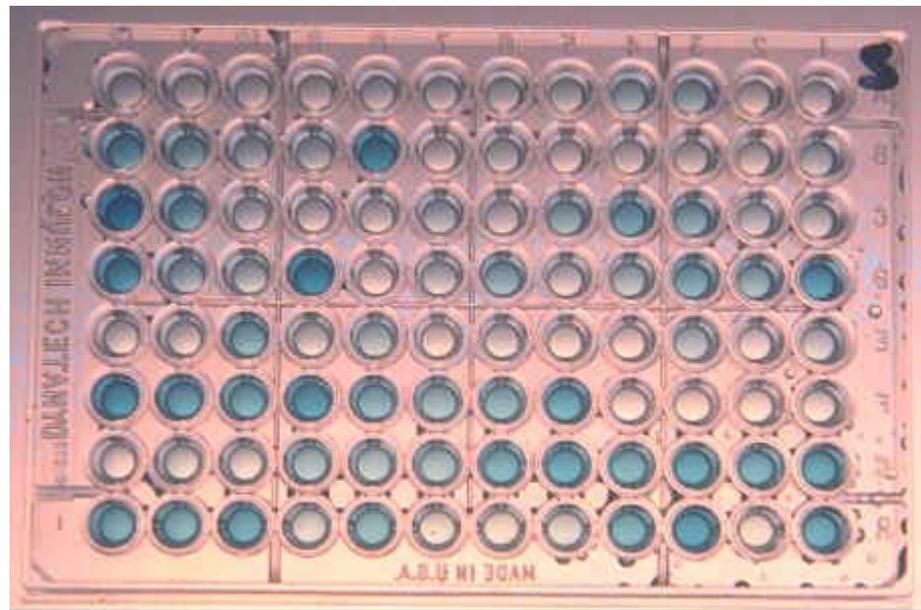
5. Aggiunta del substrato sviluppo del segnale



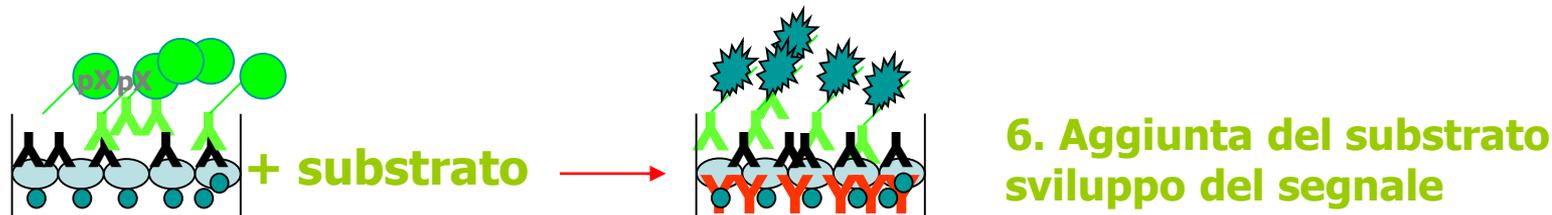
perossidasi di rafano (HRP)



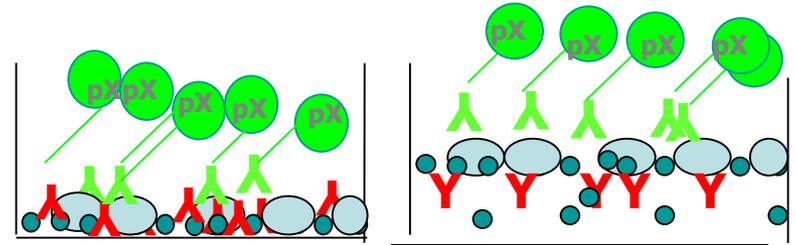
SUBSTRATO CROMEGENICO



Determinazione di Antigene: ELISA INDIRECTO SANDWICH



CARATTERISTICHE di ELISA INDIRECTO sandwich



Molto utilizzato nei **test quantitativi** per cui prevede sempre una curva standard

Vantaggi : molto **specifico e sensibile**: segnale amplificato al massimo.

Svantaggi: richiede molto tempo e anticorpi altamente specifici

STUDIO DI UNA ADEGUATA CURVA STANDARD nei test quantitativi

(TAB.1) ANTIGEN STANDARD:

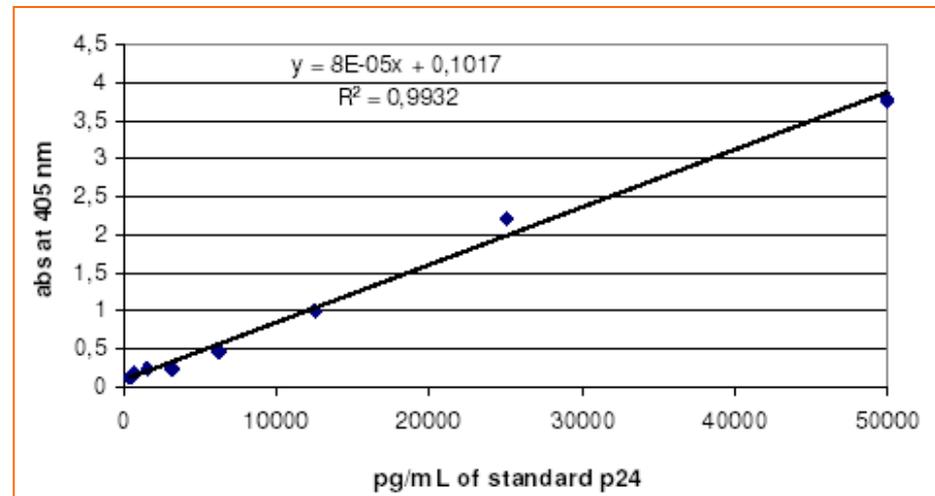
Prepare 1:2 serial dilutions of p24 standard using BUFFER A or culture medium as diluent

<u>TUBE</u>	<u>Diluent +</u>	<u>Antigen reagent</u>	<u>Final p24(pg/ml)</u>	<u>pg/μl</u>
A	800 μ l	200 μ l	50000	50
B	500 μ l	#A:500 μ l	25000	25
C	500 μ l	#B:500 μ l	12500	12.5
D	500 μ l	#C:500 μ l	6250	6.5
E	500 μ l	#D:500 μ l	3125	3
F	500 μ l	#E:500 μ l	1562	1.5
G	500 μ l	#F:500 μ l	718	0.7
H	500 μ l	#G:500 μ l	390	0.35

Add 100 μ l of standard and samples to appropriate wells (in duplicate)

PUO' ESSRE FATTA:
nel tampone fornito nel kit;
in ambiente di cultora.
E' stato testata ed è
risultato riproducibile in
entrambi i casi.

Si deve cercarere un
tampone adatto in cui diluire
l'analita per dare il massimo
della stabilità, evitando
aggregazioni, degradazioni e
adesioni sulle pareti del vial



Dosaggi immunochimici: **problemi**

Fattori potenzialmente **interferenti**:

- **fattori biologici**
- **fattori immunologici** come la variabilità nella specificità dell'anticorpo
- **fattori di preparazione**

Nonostante i progressi raggiunti nella tecnologia esiste **variabilità** tra i dati dosaggi.

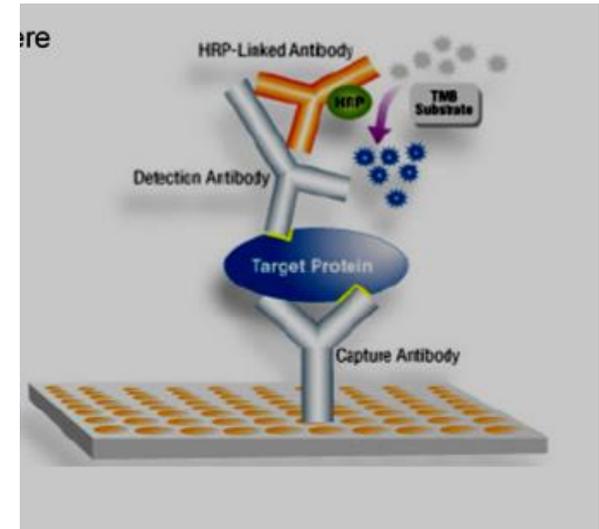
- Stabilizzazione di tutto il sistema con metodiche e reagenti opportuni
- Compilazione di un adeguato **protocollo** da seguire per sviluppare il test
- Stabilizzazione dello standard nei test ELISA quantitativi che assicuri una **riproducibilità** del segnale.

ELISA

La nascita di kit ELISA: vera e propria rivoluzione tecnologica in ricerca e diagnostica:

caratteristiche tecniche diverse:

- sensibilità più o meno elevate,
- metodiche di sviluppo innovative,
- anticorpi con diverse caratteristiche e traccianti.



- riduzione dei tempi di analisi
- aumento sensibilità
- alta selettività

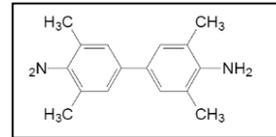
ELISA Assay per Policlobifenili



Ag specifico per miscele di PCB (aroclor) senza cross-reactivity con altri composti simili di uso industriale;

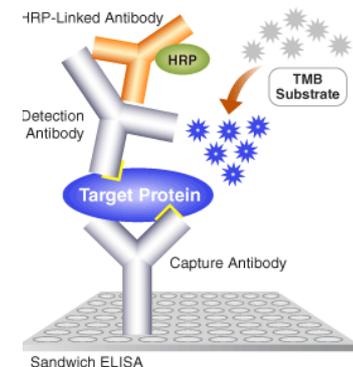
Ab PCB 118 è legato sul supporto solido

Si aggiunge **Ag competitore** (50 μ l) marcato con HRP (perossidasi del rafano (HRP))



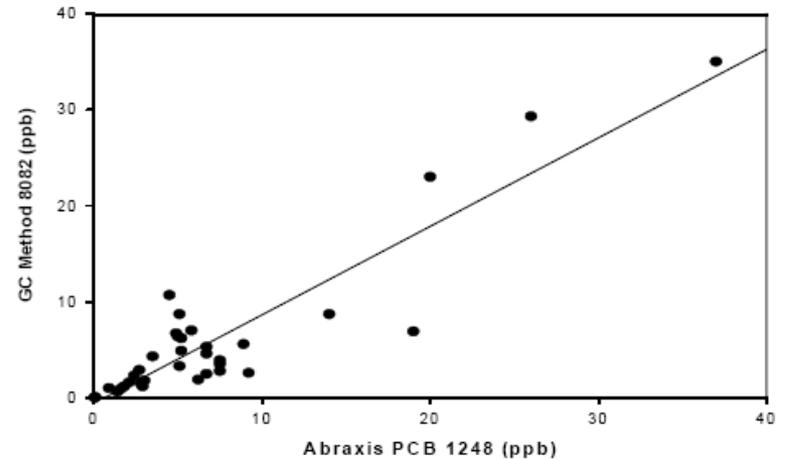
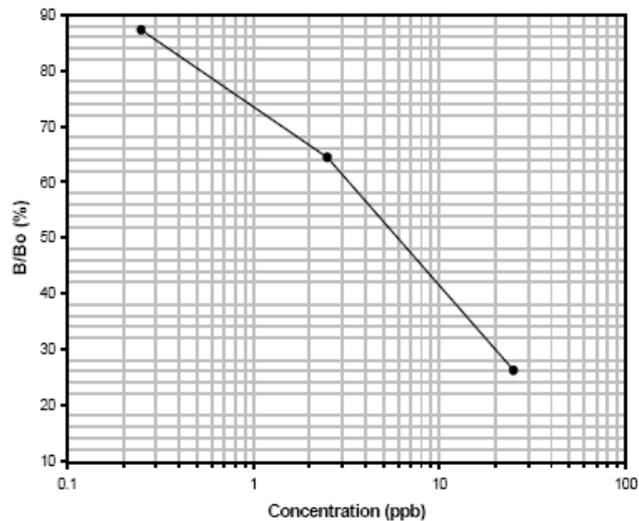
- Si incuba per 30 min a T ambiente
- Si lava con tampone
- Si aggiunge substrato **3,3',5,5'-tetramethylbenzidine** (50 μ l per pozzetto)
- Si incuba per 20 min a T ambiente
- Si ferma la reazione enzimatica con 0.5 M H_2SO_4 (50 μ l) e si misura l'assorbanza a 450 nm

TMB (blu con picchi di assorbimento a 370 nm e 650 nm) **ossidata** a prodotto **giallo** (assorbente a 450 nm).



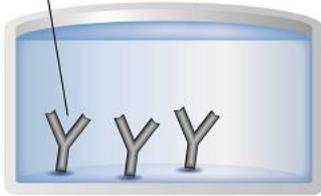
- Buona linearità curva di calibrazione,
- Alta specificità per Aroclor 1242
- Buona correlazione con risultati ottenuti da metodo standard GC-MS

PCB (Aroclor 1254) Standard Curve



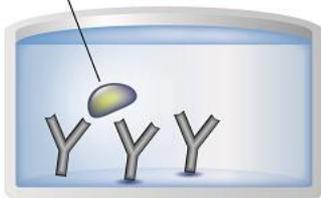
Kit ELISA per analisi di Bis Fenolo A in ambiente

Capture Antibody



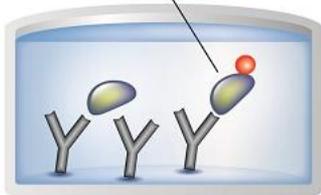
Prepare all reagents and samples as instructed.

Sample



Add standards and samples to each well used.

Labeled HRP-Conjugate



Add prepared HRP conjugate to each well and incubate at room temp.

Substrate Colored Product



Add TMB substrate to each well. Incubate at room temperature. Add Stop Solution to each well. Read immediately.

BPA: composto distruttore del sistema endocrino (mima effetto estrogeni). Test competitivo: BPA e BPA marcato con HRP
96 well ELISA plate: legati anticorpi specifici: anti-Estrogen BPA
Confronto tra segnale di campione e soluzione standard.
Il complesso Ag-Ab è rivelato aggiungendo TMB ossidato a composto giallo (450 nm).

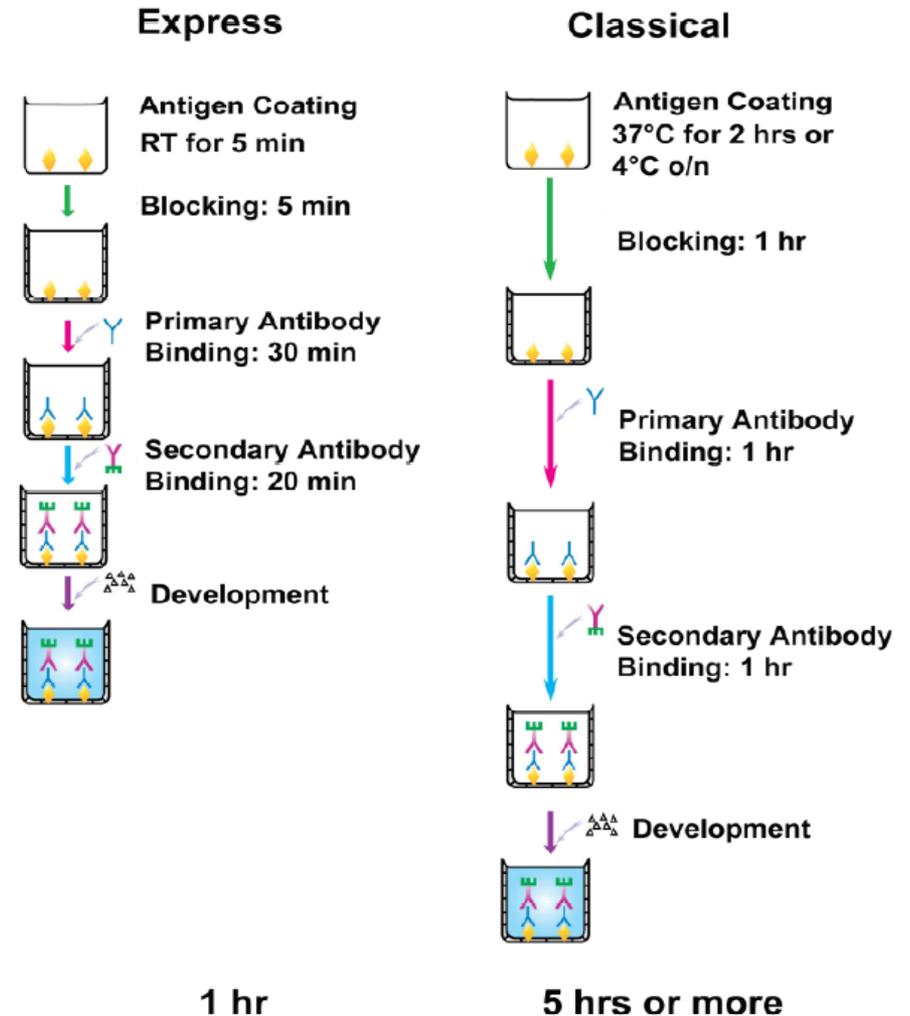
ELISA Express

The GenScript Express™ ELISA kit is designed to detect and quantitate antigen-specific antibodies in serums or other samples using a proprietary (patent pending) one-hour indirect ELISA procedure. This kit allows user to perform a complete ELISA from antigen coating to signal development in just one hour. The one-hour Express™ ELISA procedure is contrasted with a classical five-hour ELISA procedure at right (Figure 1).

Coat the plate with an antigen (protein or peptide) in the Coating Buffer for five minutes. Then block the plate with Pretreat Solution for five minutes so that it will be ready for antigen-specific antibody binding. After the 30-minute binding phase, treat the plate with the ELISA solution included in the kit for 20 minutes. No secondary antibody is needed. The plate can then be developed with the One-Solution Microwell TMB solution included in the kit.

The kit contains all necessary reagents and buffers for performing indirect ELISA using ten 96-well plates.

Indirect ELISA Overview



APPLICAZIONI DEI TEST ELISA

Negli ultimi anni l'utilizzo della tecnica ELISA si è sempre più diffuso nei laboratori di controllo e di ricerca.

In particolare è utilizzata per:

- Determinare presenza e concentrazione di un antigene nel campione da testare;
- Determinare presenza e concentrazione di un anticorpo nel campione da testare;

➤ **Industria farmaceutica:** mezzo fondamentale per lo **screening iniziale** di molecole interessanti

➤ nella scoperta di farmaci, negli studi con modelli animali, nei trials clinici.

➤ **Drug discovery:** nelle industrie farmaceutiche più di 100.000 molecole sono testate di routine con kit ELISA nelle fasi iniziali dello screen per identificare molecole promettenti.

➤ **Food science industry:** i kit ELISA vengono utilizzati per analizzare le tossine nel cibo

➤ **Monitoraggio ambientale:** vengono utilizzati per analizzare xenobioti in complesse miscele ambientali (specificità e selettività)