

IMMUNODOSAGGI o DOSAGGI IMMUNOLOGICI

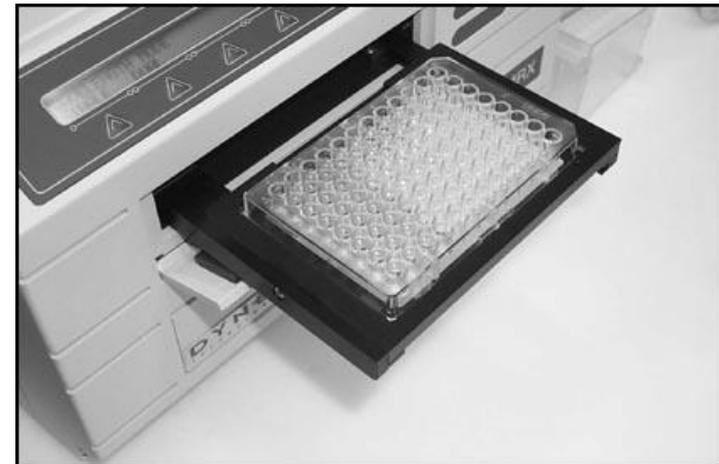


IMMUNODOSAGGI o DOSAGGI IMMUNOLOGICI

Preferiti ad immunodiffusione/immunolettroforesi quando si debba effettuare uno studio **quantitativo**.

Ampliamente utilizzati in **diagnostica** e nella **ricerca** di laboratorio (fin dal 1960) per la:

- **specificità**
- **sensibilità**
- **automatizzabilità (non tutti)**



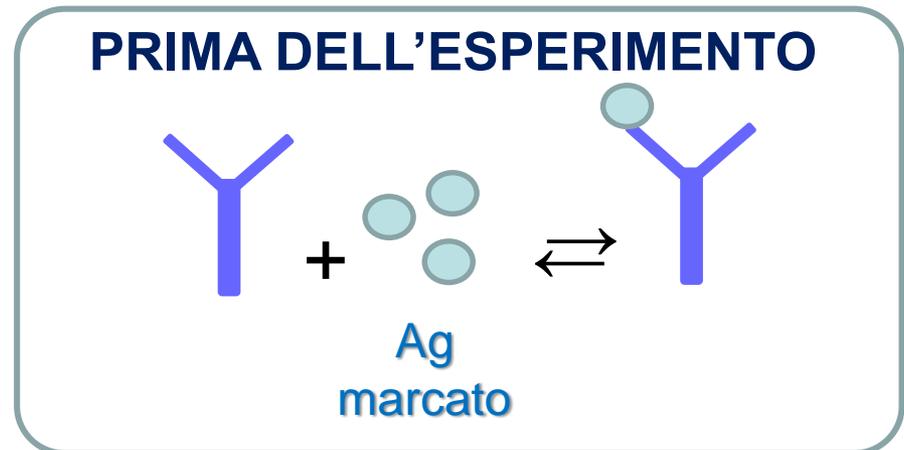
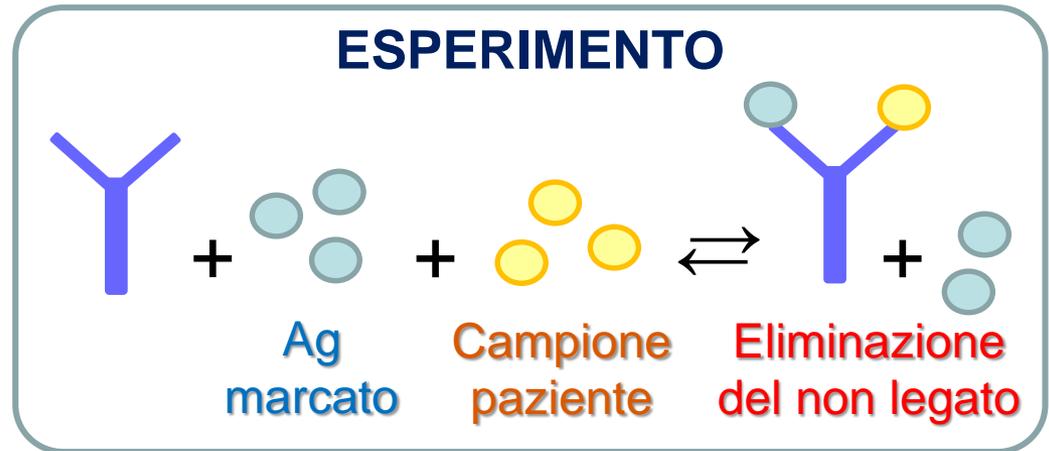
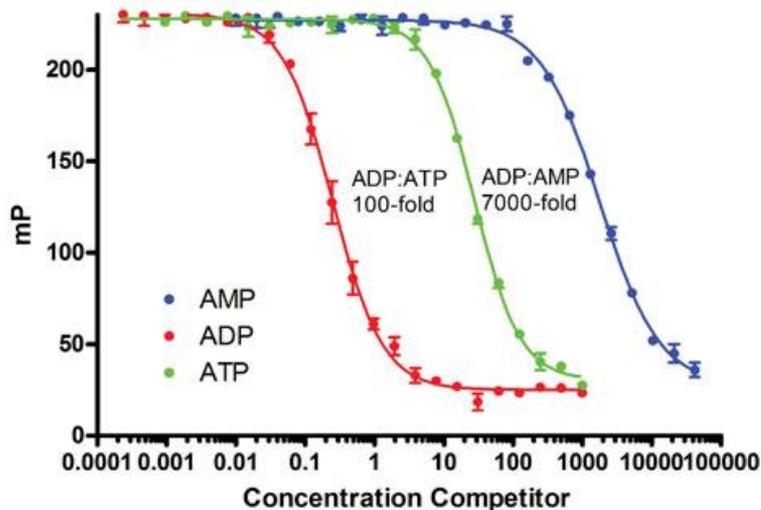
DOSAGGI IMMUNOLOGICI COMPETITIVI

L'Ag nel campione compete con una **quantità fissa di Ag marcato**, in presenza di **quantità limitante di Ab**.

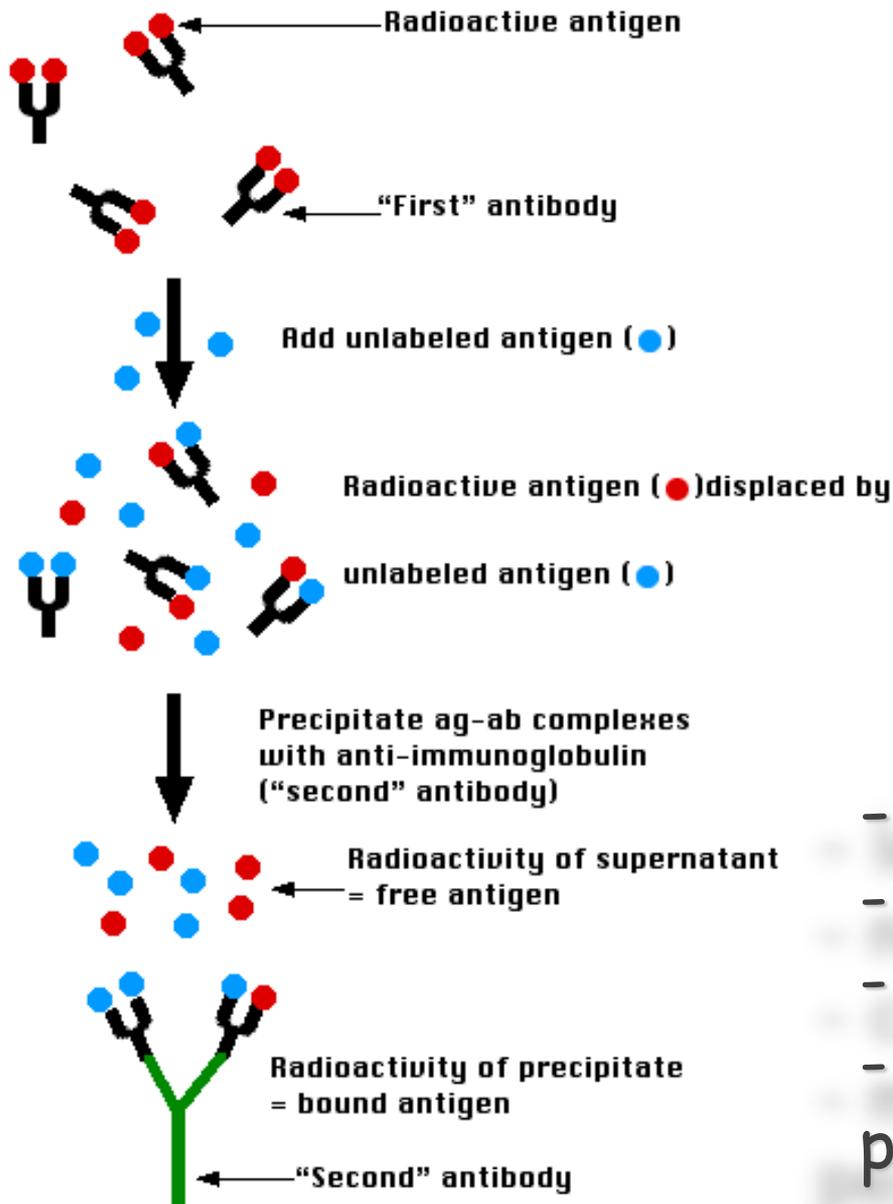
Marcatura
con ^3H o ^{125}I

RIA

(RadioImmunoAssays)



RadioImmunoAssays



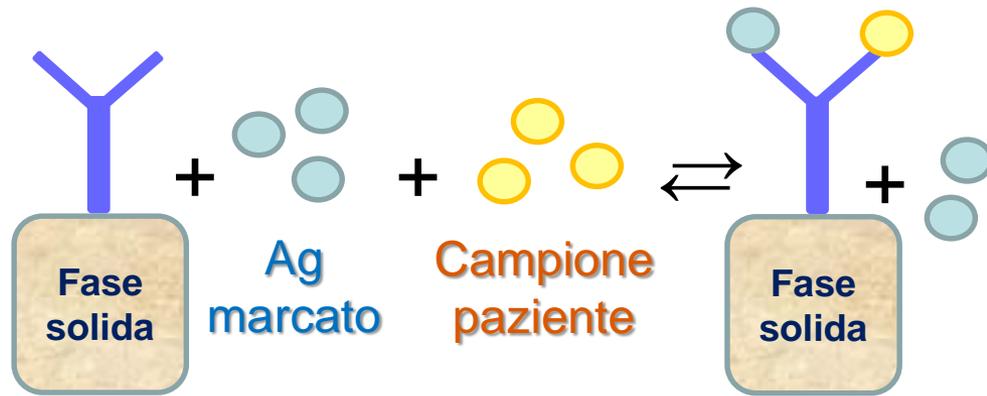
<http://www.biocompare.com/ProductListings/17896/RIA-Radioimmunoassay.html?types=102-74726>

Tutto avviene in
soluzione

Difetti

- lenti,
- non automatizzabili,
- curva dose-risposta limitata,
- marcatura radioattiva pericolosa per la salute.

RIA SU FASE SOLIDA



Vantaggio:
il lavaggio.

PASSO BREVE VERSO GLI ELISA

RIA SU FASE SOLIDA

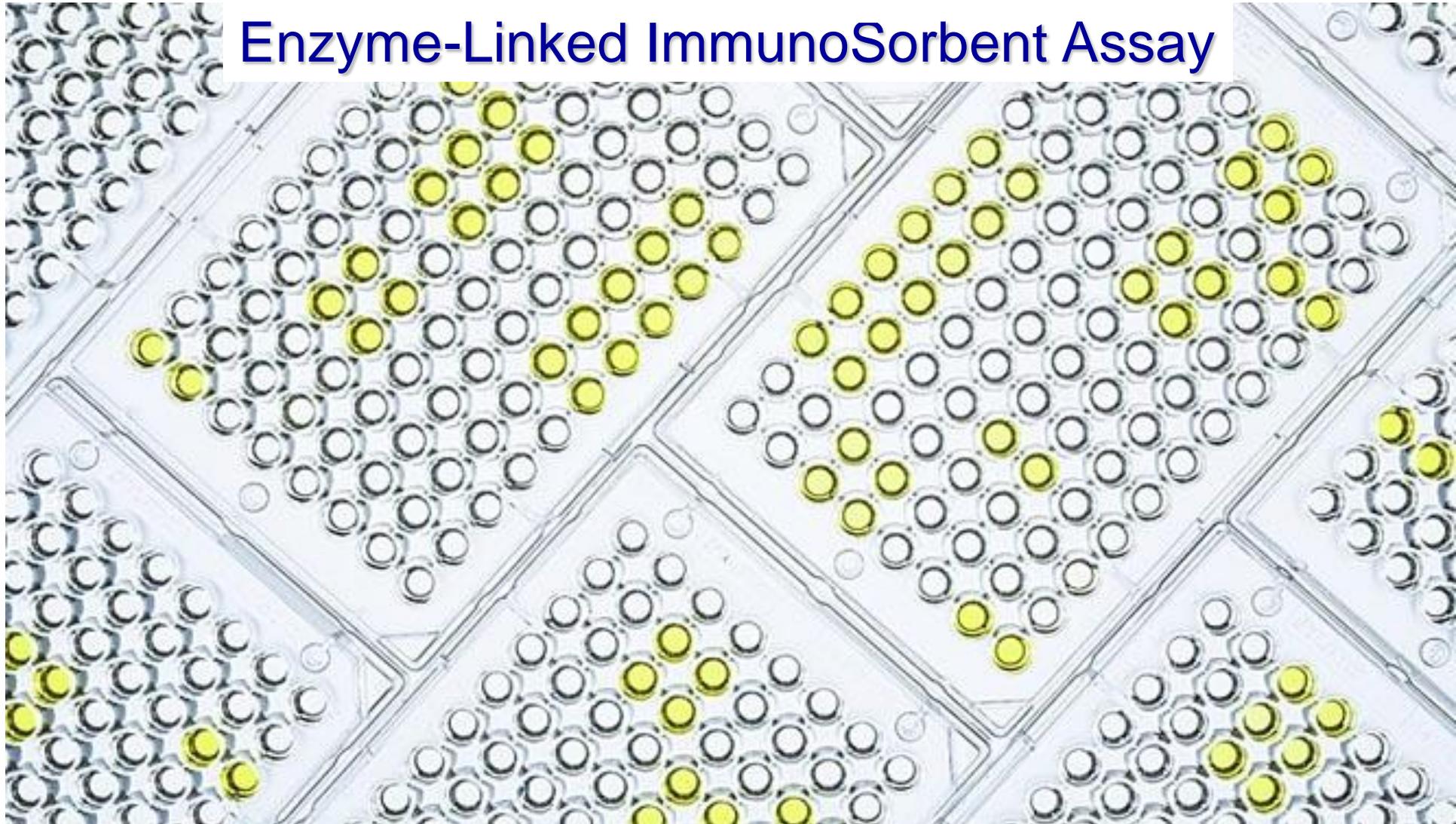


Vantaggio:
il lavaggio.



ELISA

Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay



Engvall E, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*. **1971** Sep;8(9):871-4.

ELISA

E' un immunodosaggio, dunque si basa sull'uso di anticorpi (**Ab**).

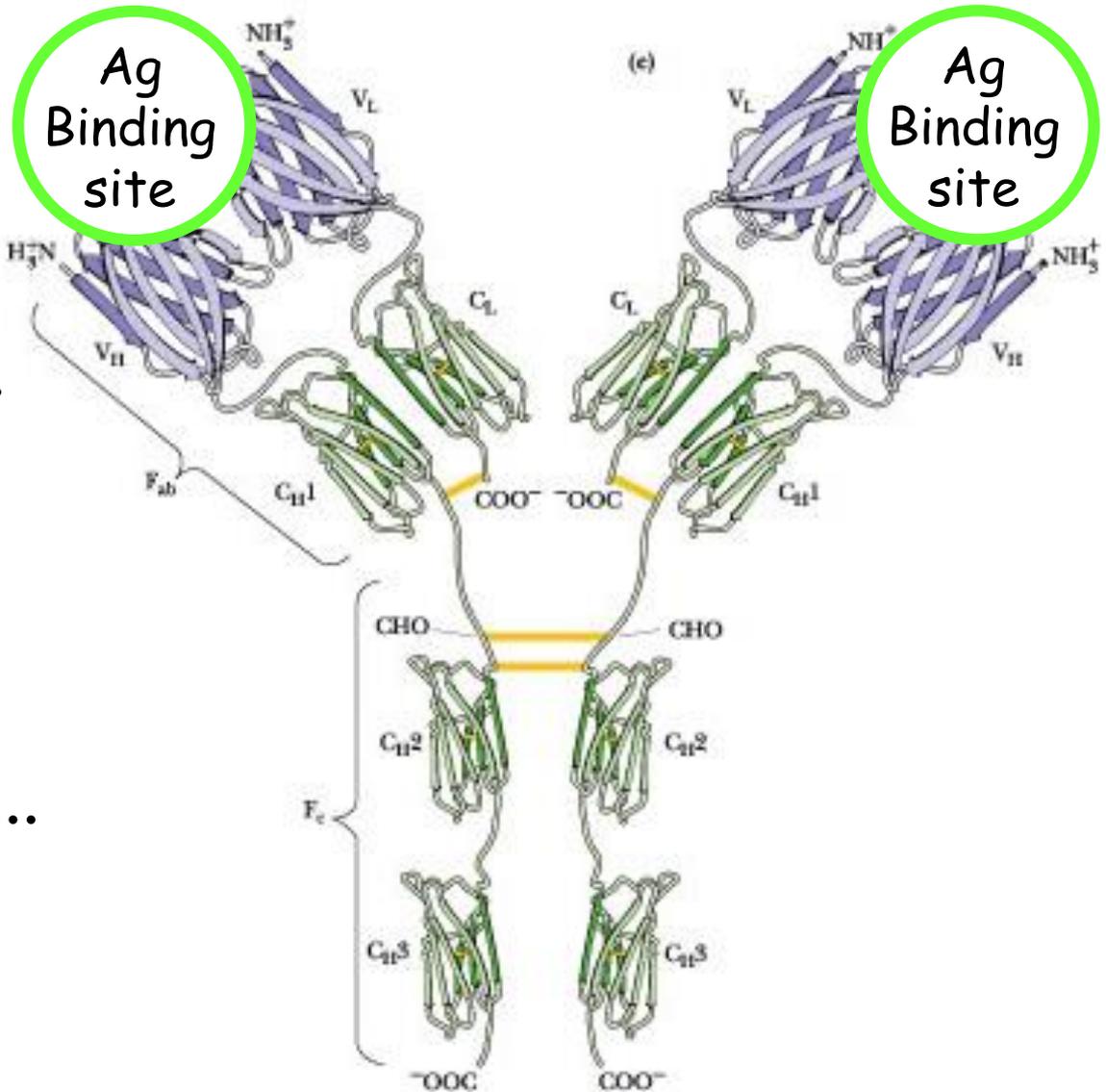
Perché ha rimpiazzato i metodi RIA?

- **Meno rischioso** per la salute dell'operatore.
- Più economico.

ELISA

Informa su **presenza e quantità** di un analita, ma **non** sulle proprietà biochimiche (es PM) o sulla distribuzione spaziale nei tessuti.

Per questo vi sono altre tecniche come il WB, la Immunoistochimica...



Perchè si fa un ELISA?

Altamente specifico

Sensibile

Riproducibile

Automatizzabile



Permette:

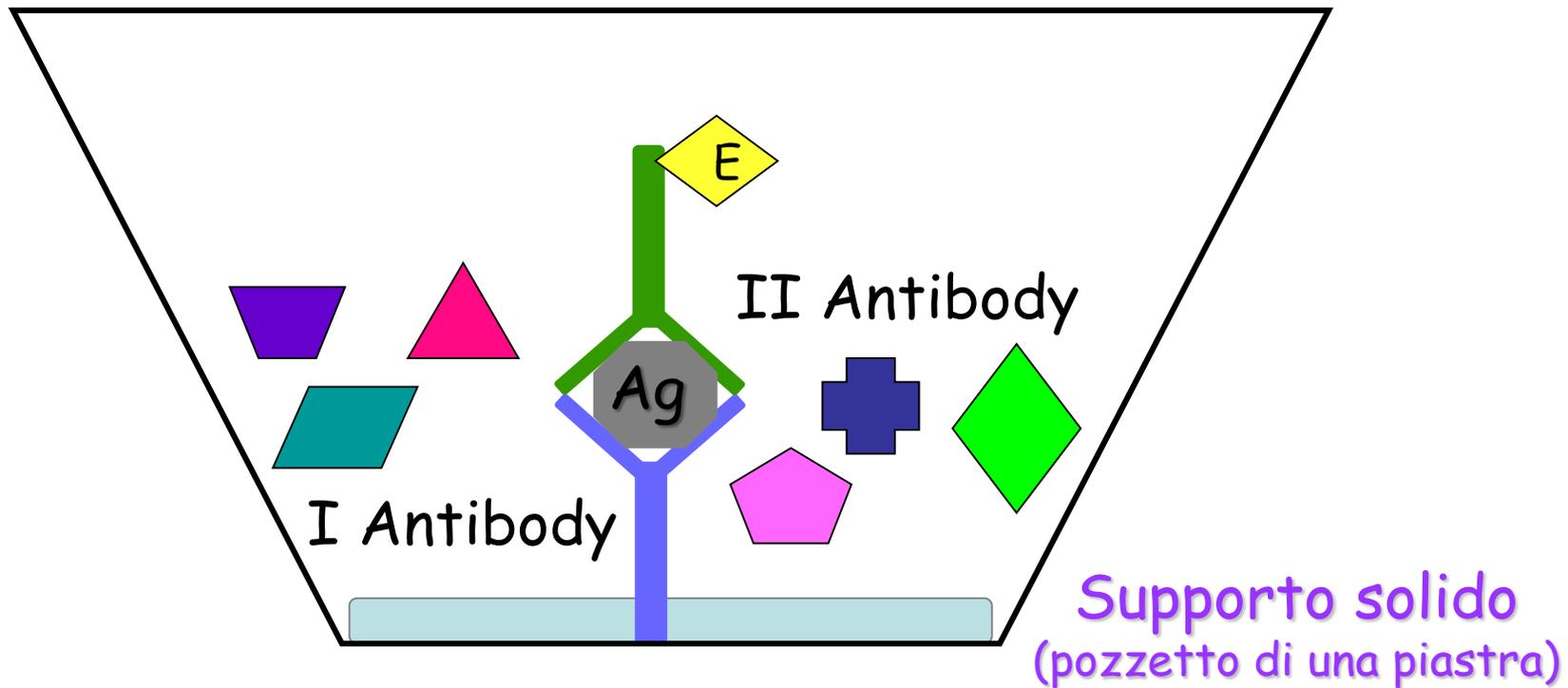
- di quantificare molecole presenti in cellule, o sulla loro superficie, o secrete in fluidi complessi (sangue, urina...),
- la ricerca di proteine virali per rilevare l'eventuale infezione.
- è utilizzabile su miscele omogenee o anche molto eterogenee.

Strumenti necessari



ELISA SANDWICH

Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

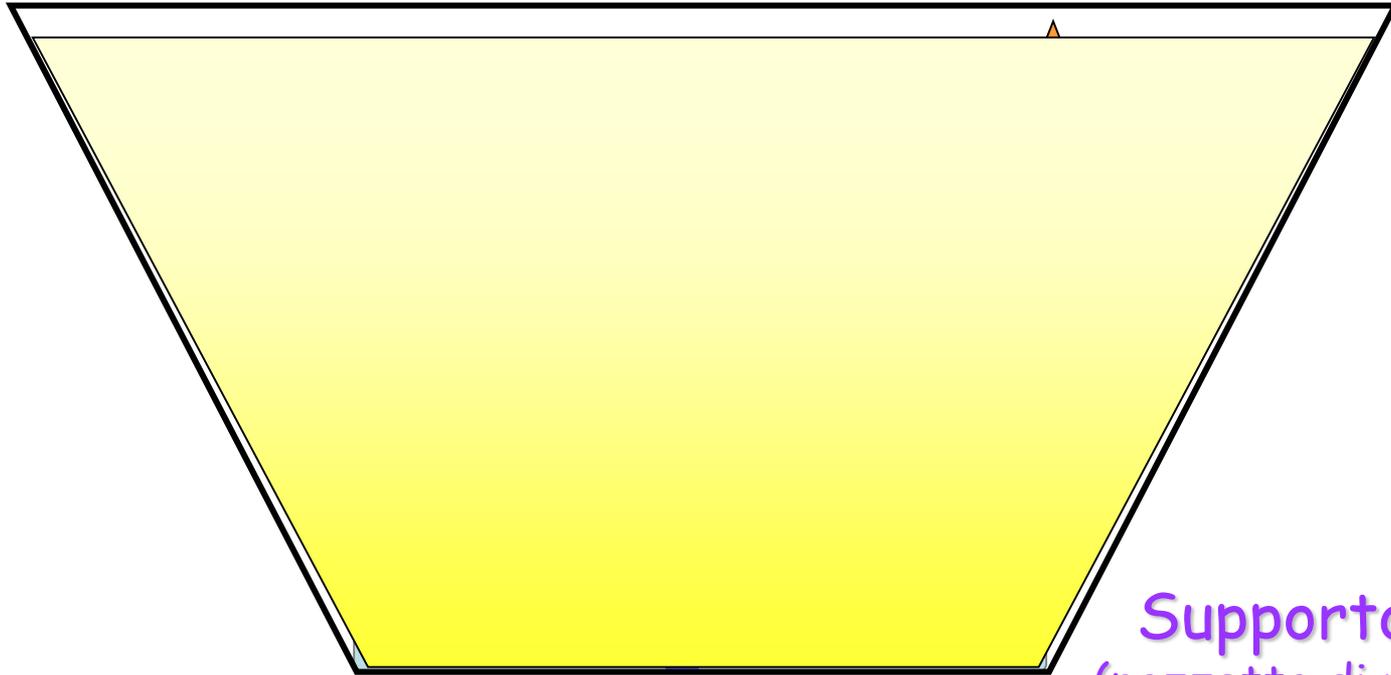


Il 1° Ab lega le molecole di Ag presenti nel campione.

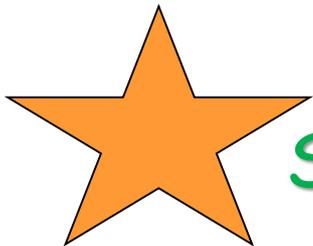
Il 2° Ab è coniugato con un enzima.

ELISA SANDWICH

Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay



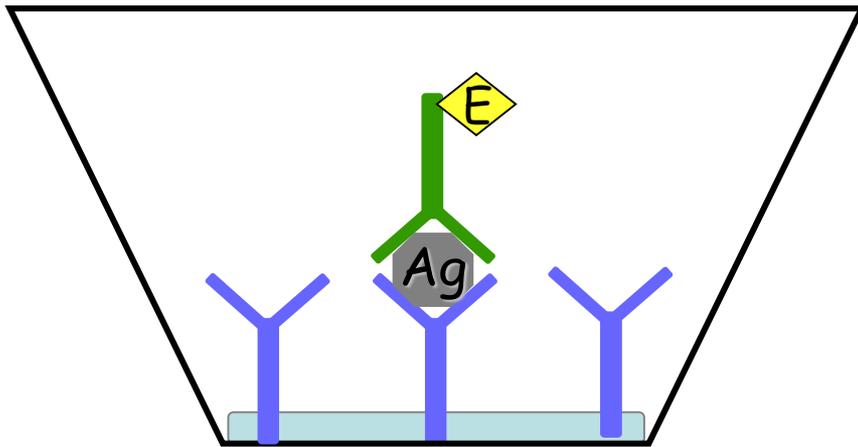
Supporto solido
(pozzetto di una piastra)



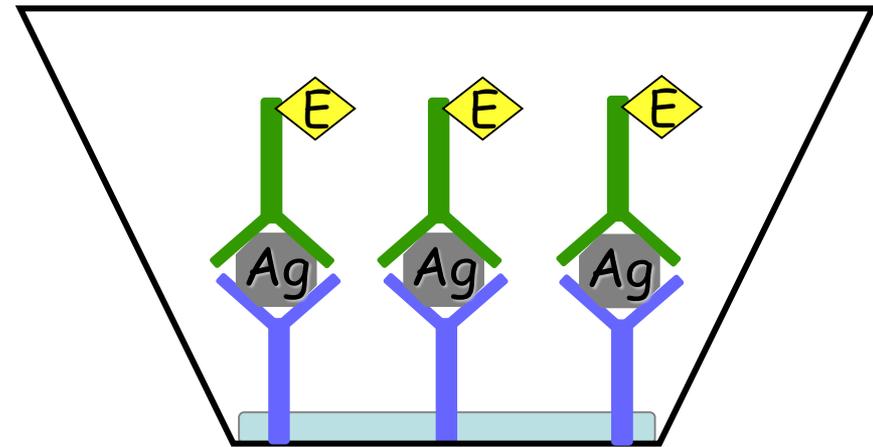
Substrato: molecola cromogenica

PROPORZIONALITA' DEL COLORE

L'intensità del colore è proporzionale al **numero di complessi antigene-anticorpo** formati e quindi alla **concentrazione dell'antigene** nel campione analizzato.

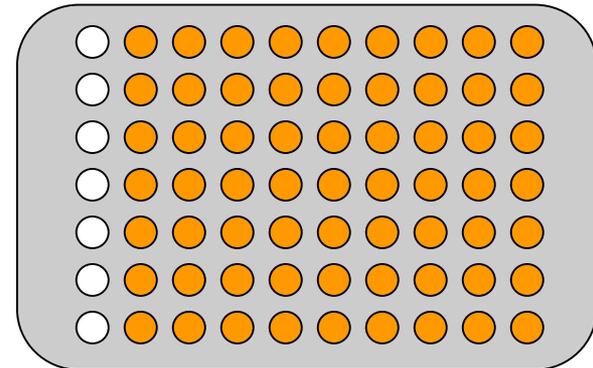
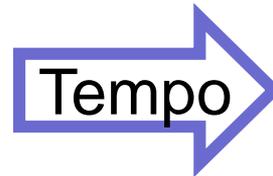
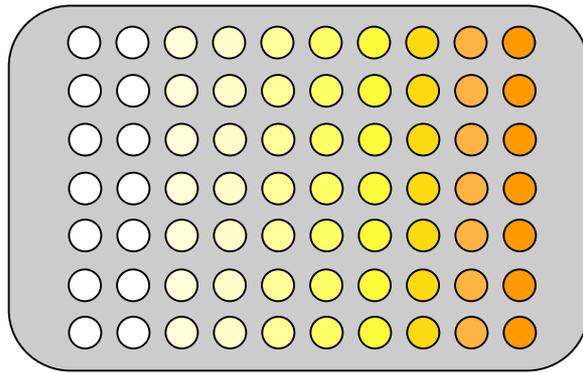


Caso A



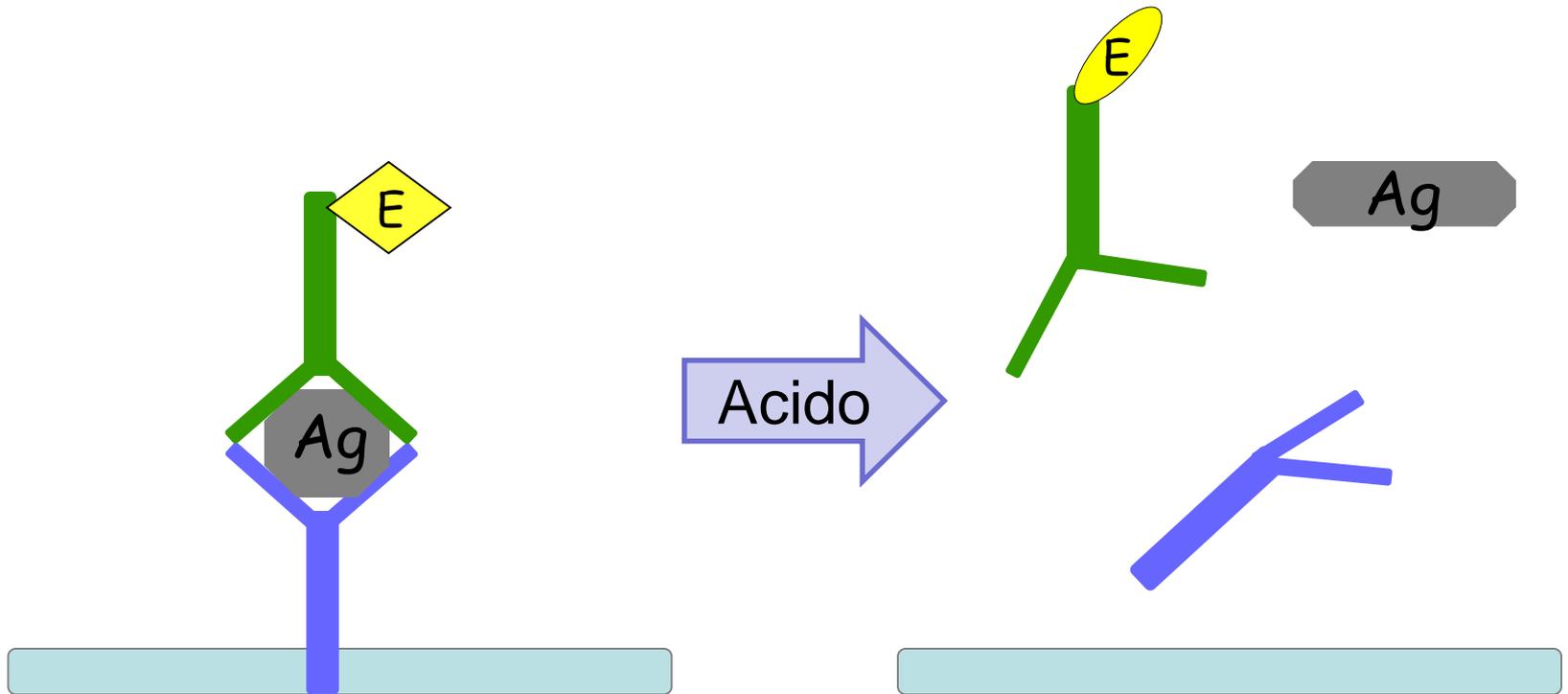
Caso B

IMPORTANZA DELLO STOP!

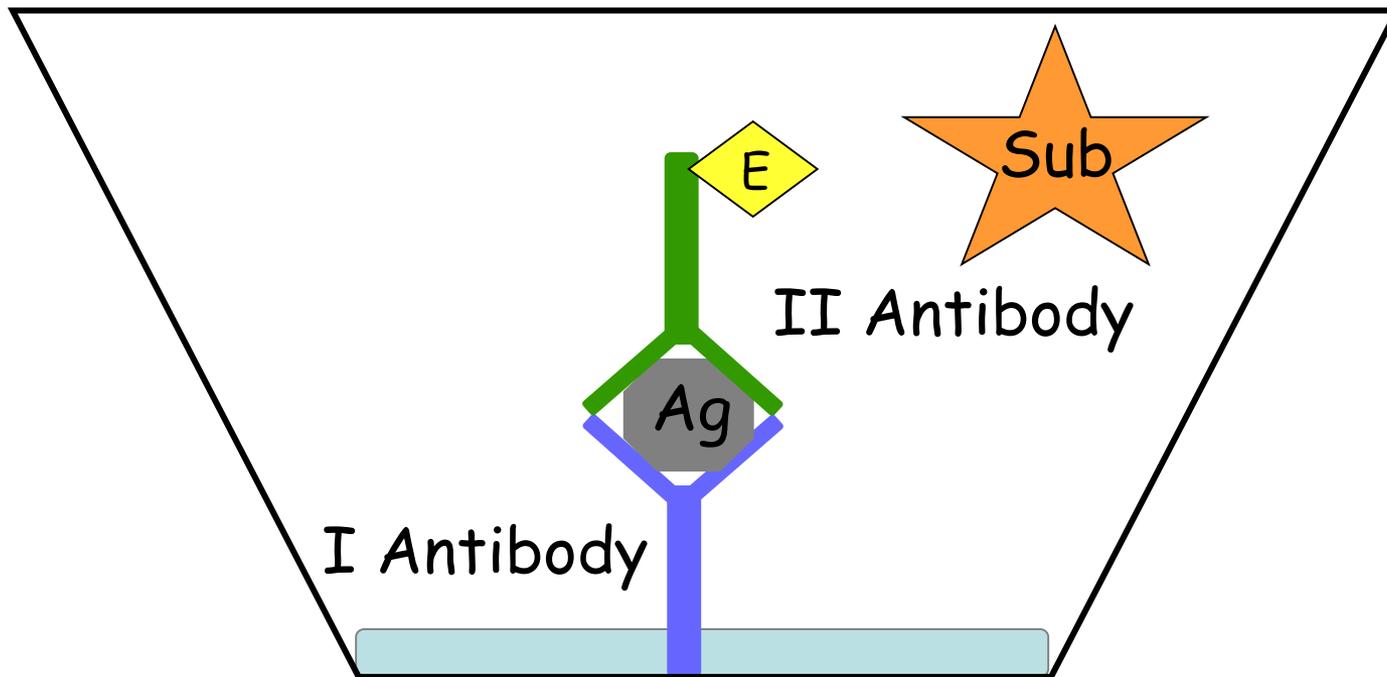


Micropiastra
(96 pozzetti)

STOP ELISA CON ACIDO DENATURAZIONE

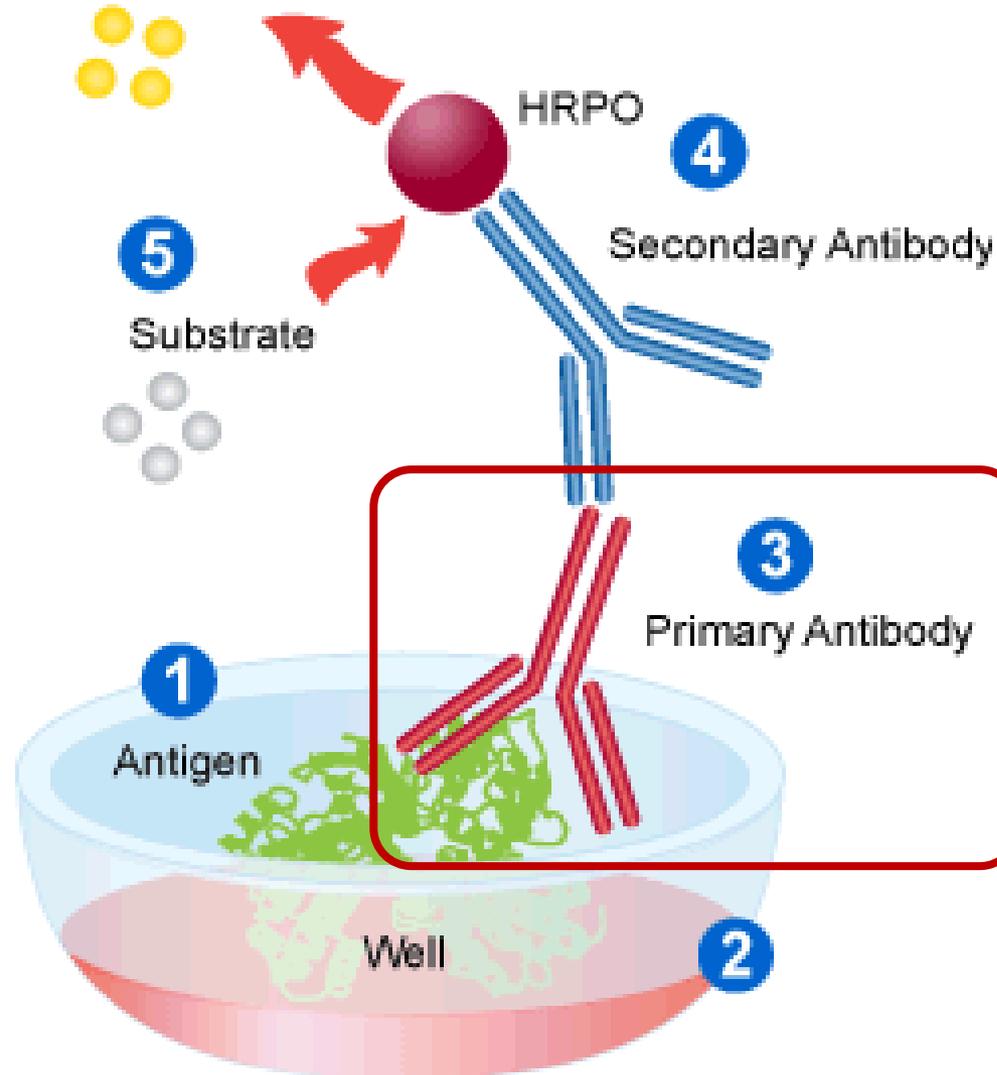


ELISA SANDWICH (o indiretto o a 2 siti)



ELISA SANDWICH (o indiretto o a 2 siti)

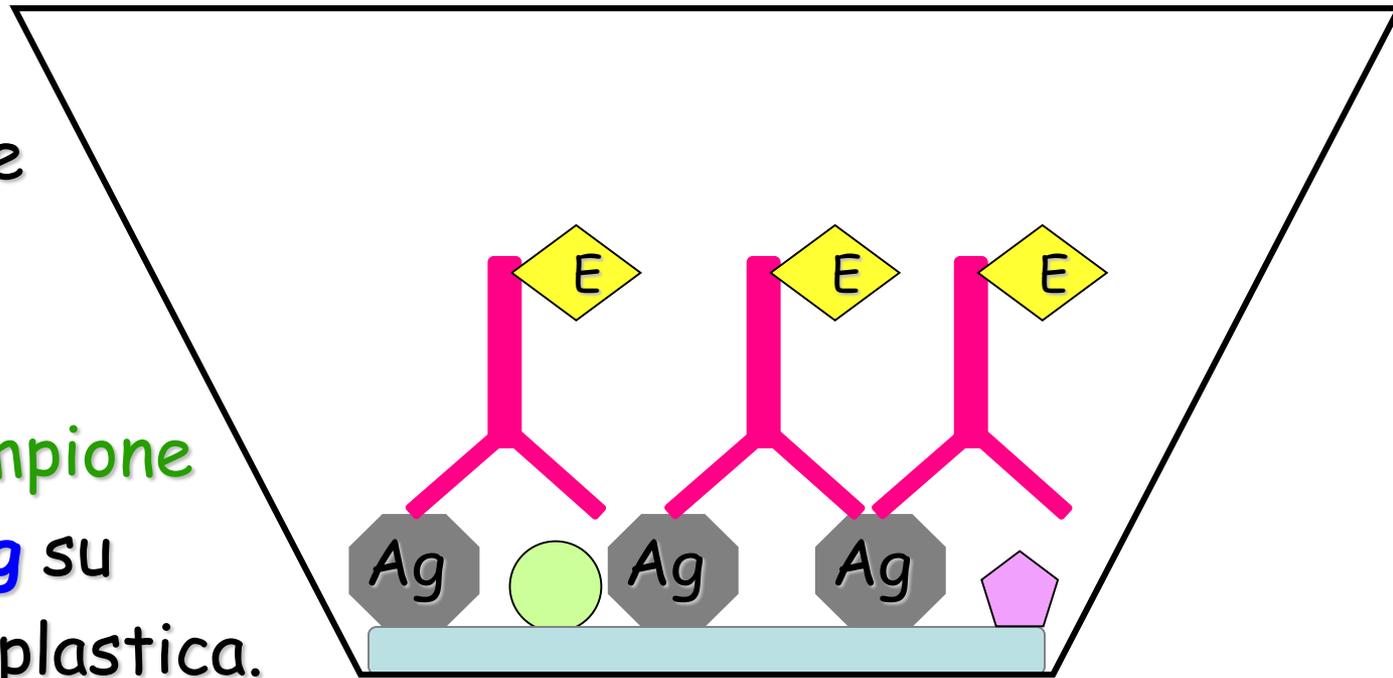
La proteina legata al supporto **non** deve essere limitante



Questo è l'Ag cercato

ELISA DIRETTO O A UN SITO

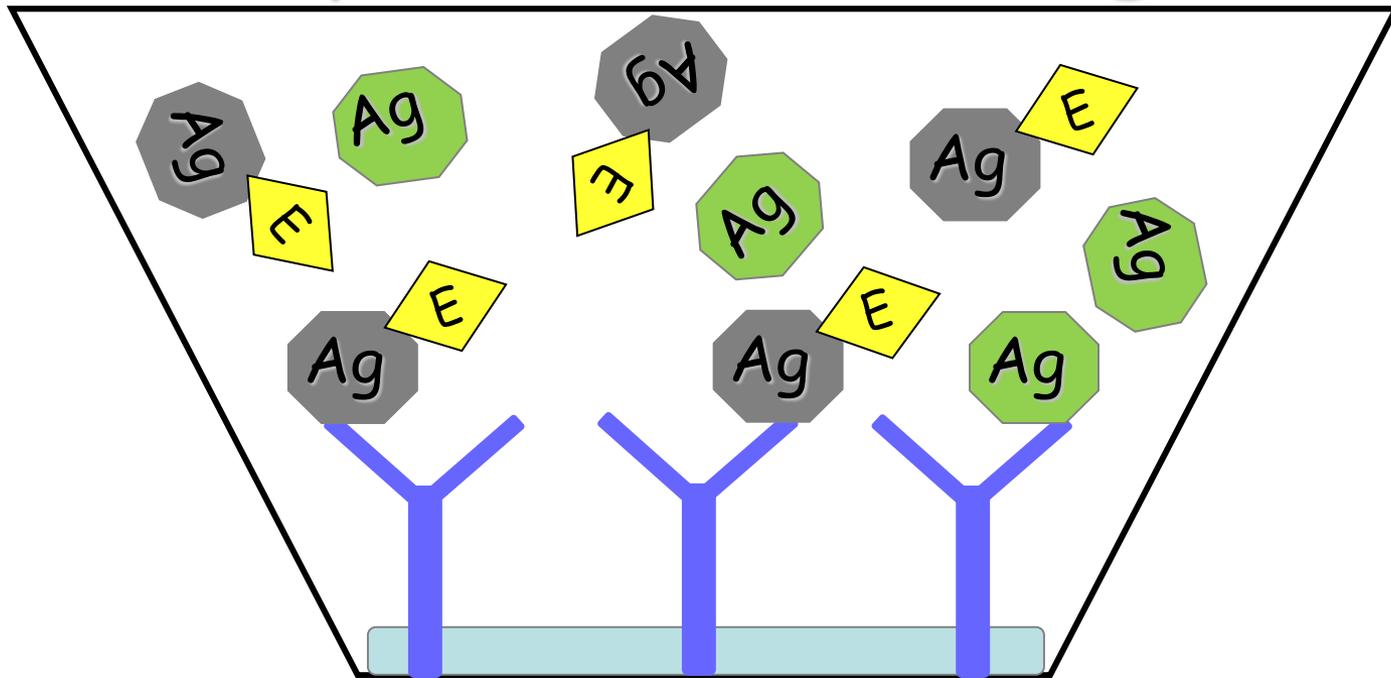
- Facile, veloce ed economico.
- Si lega **il campione** contenente l'**Ag** su una superficie plastica.
- Aggiunta di un **anticorpo marcato**.



Metodo **meno preciso** e **meno efficiente** dell'ELISA a sandwich.

ELISA COMPETITIVO

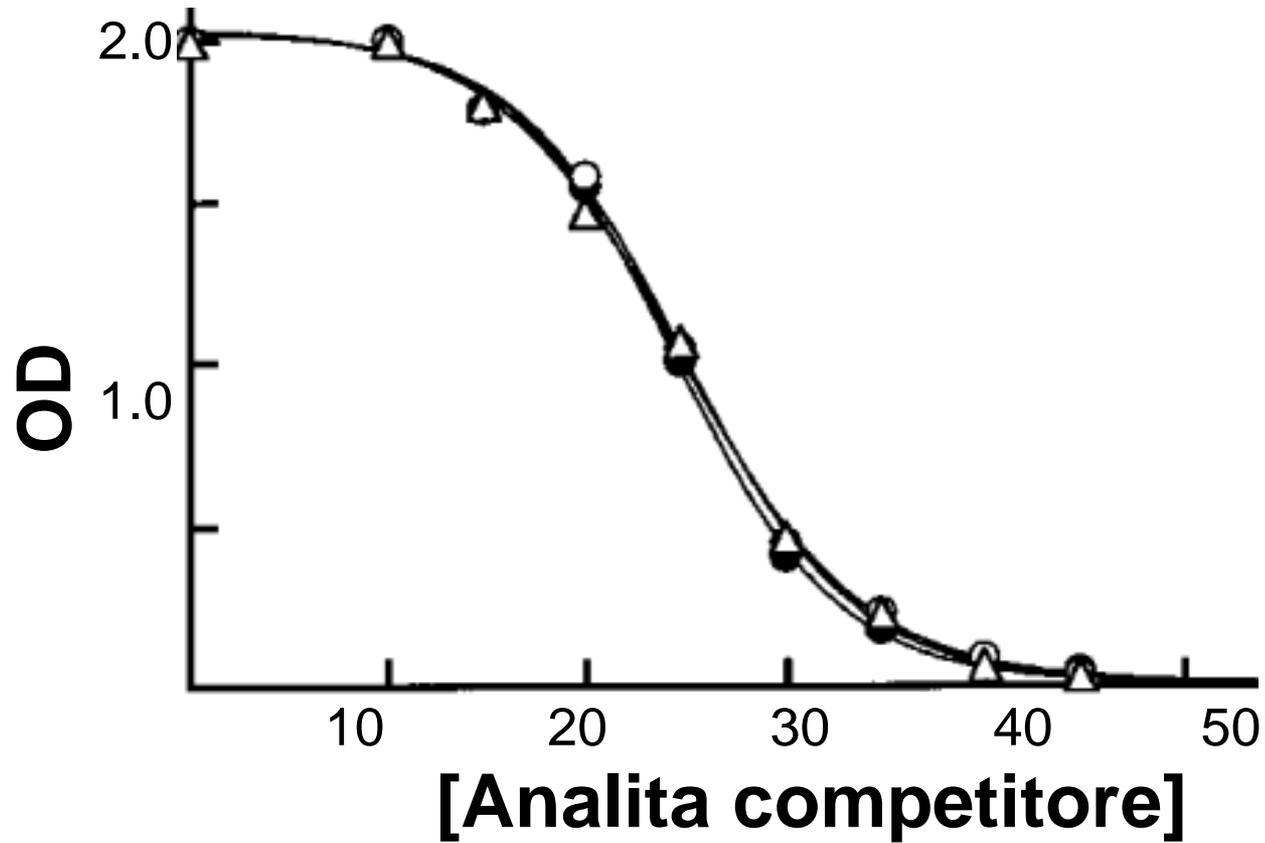
Competizione fra antigeni



Quantità sconosciuta di analita miscelato con **quantità nota di analita marcato**, che competono per un **numero limitato di anticorpi**.

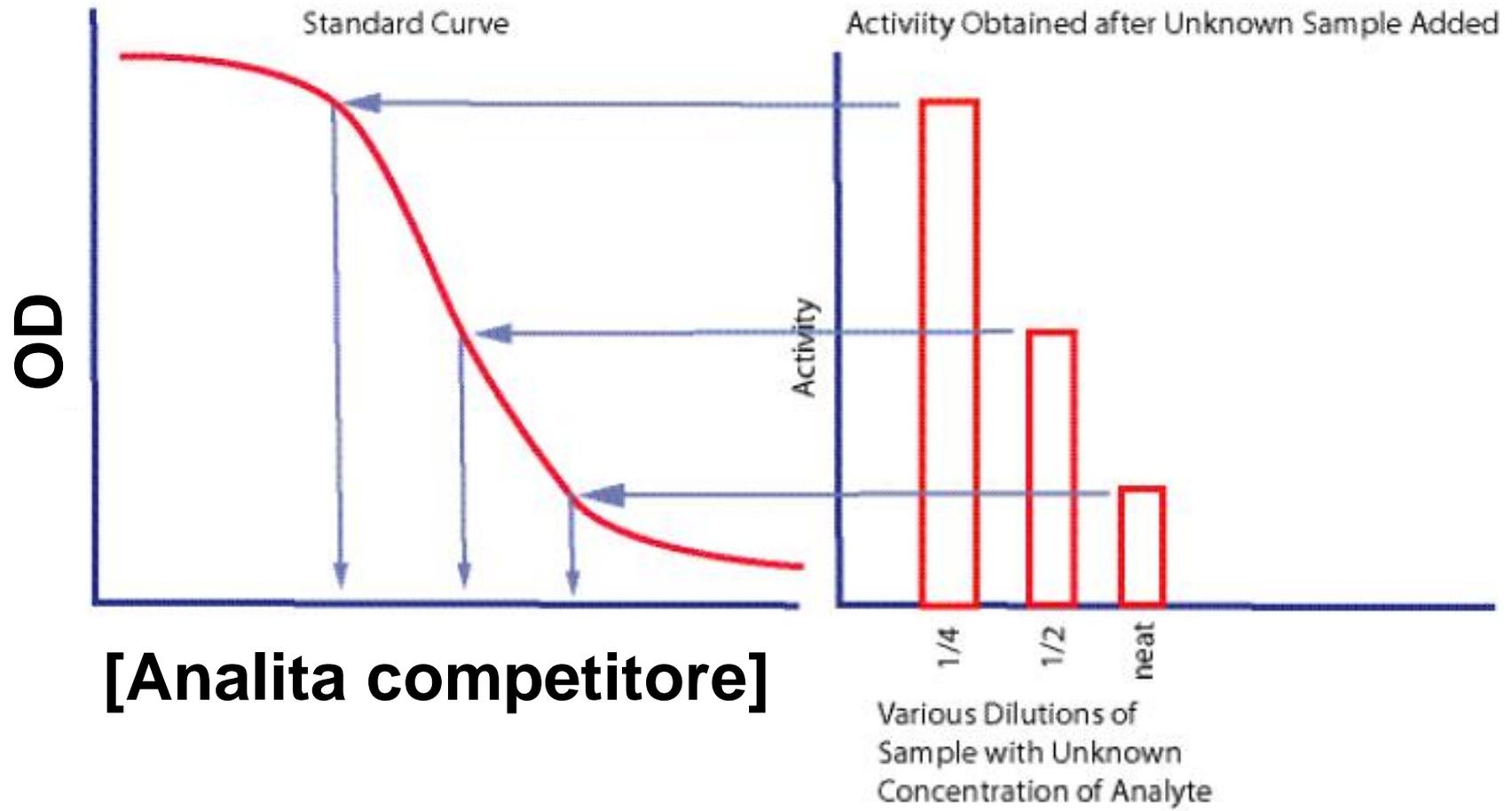
ELISA COMPETITIVO

Andamento



ELISA COMPETITIVO

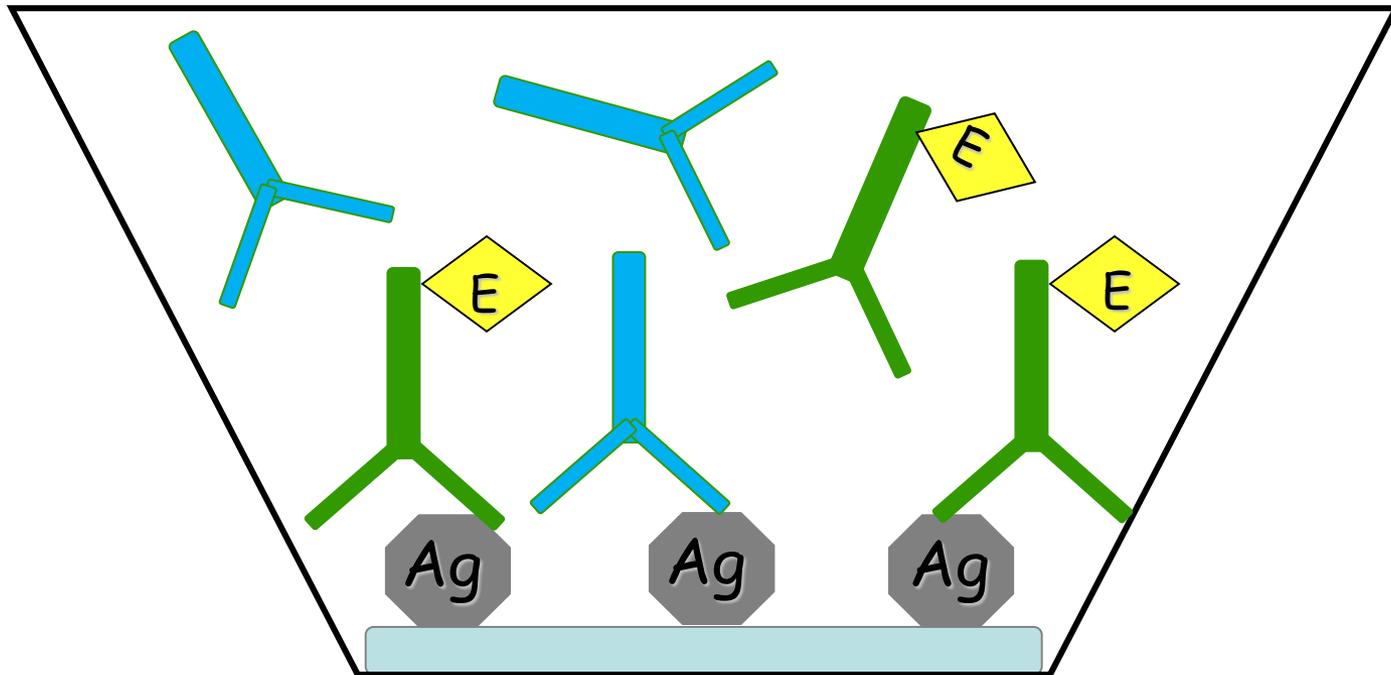
Andamento



Come **tutti gli ELISA** permette di quantificare solo se si usa una **curva di riferimento**.

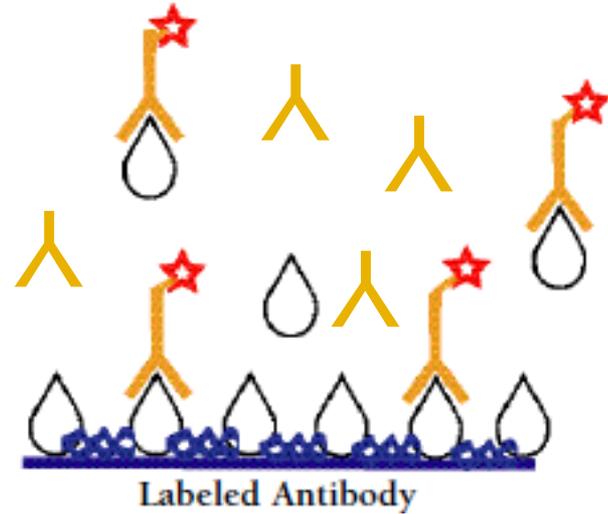
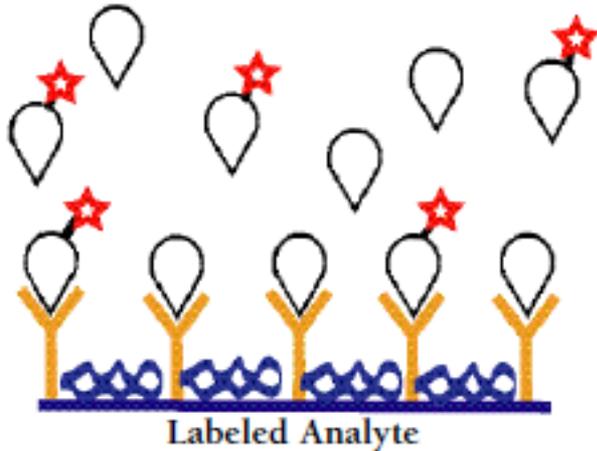
ELISA COMPETITIVO

Competizione anticorpale

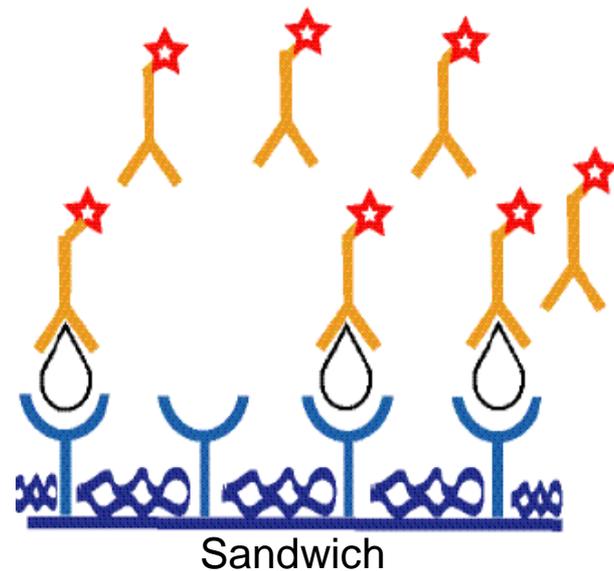
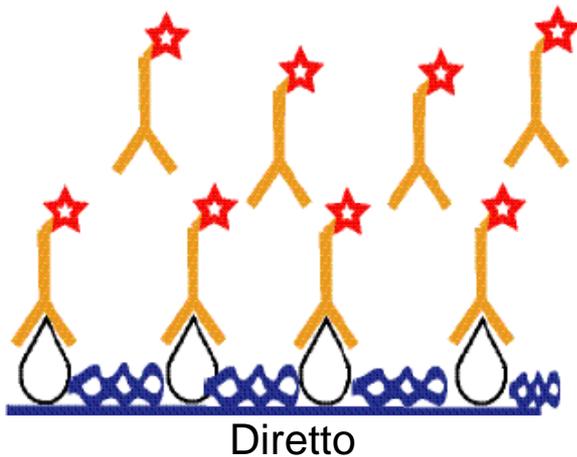


Riassunto

ELISA competitivo

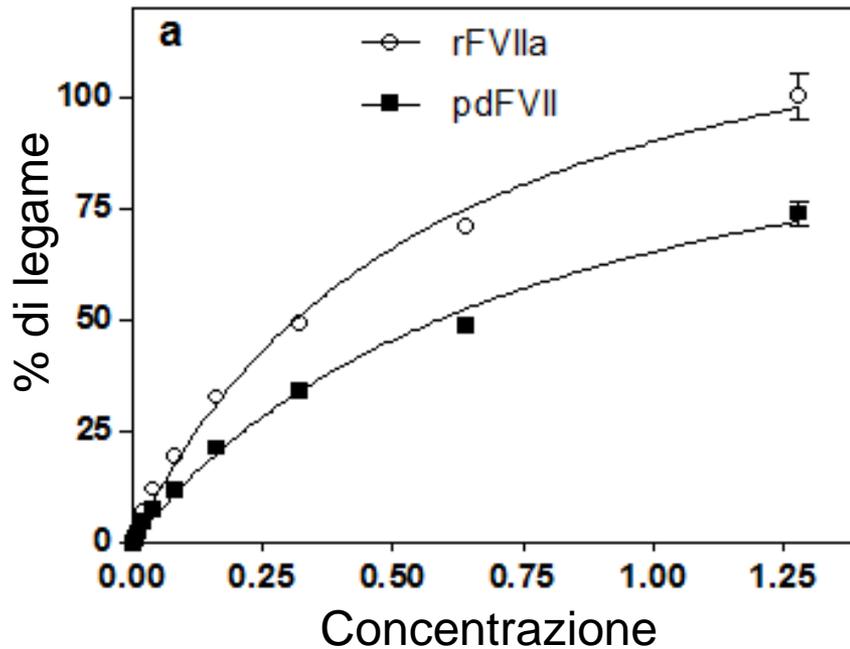


ELISA non competitivo

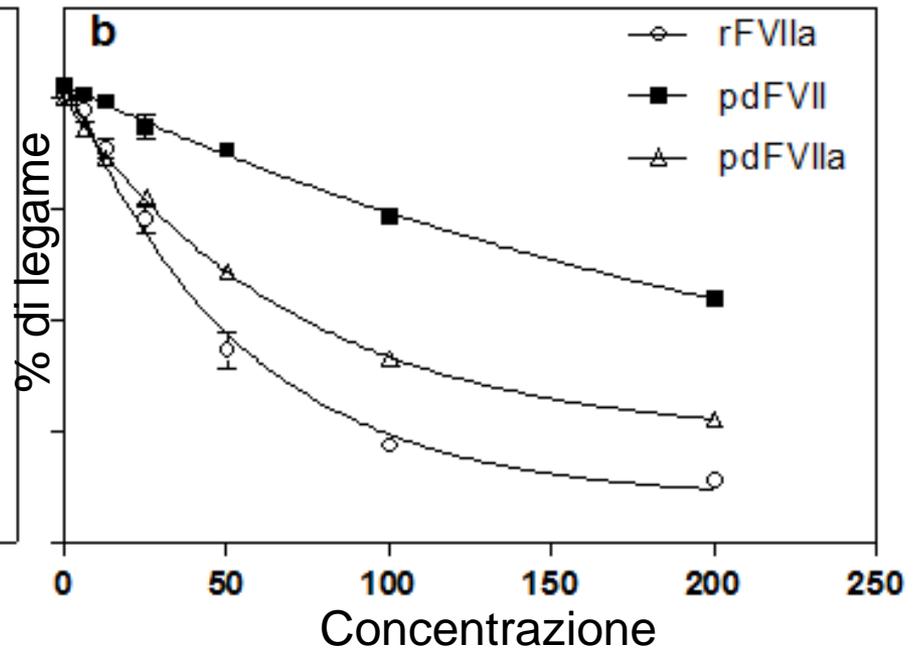


Competition assay

Binding assay



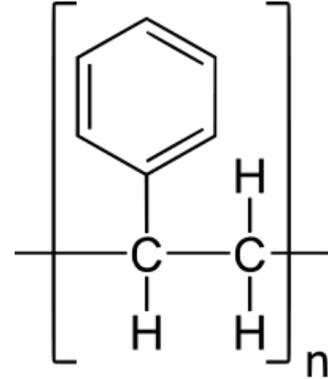
Competition assay



Chi è il miglior competitore?

Piastra

Materiale: Polistirene, superficie idrofobica low binding. Modificato per irraggiamento o aggiunta di gruppi reattivi (maleimide, hydrazine, N-oxysuccinimide groups).



Pozzetti: 8 righe e 12 colonne - 96 (o 384, o 1536),
2.5 cm² di superficie interna,
350 uL di volume.

- Resistente a sostanze chimiche.
- Trasparente.

Piastra



Fondo piatto (90°)

Classici, facilmente reperibili ed economici.

Recupero dei liquidi + facile.

Fondo emisferico

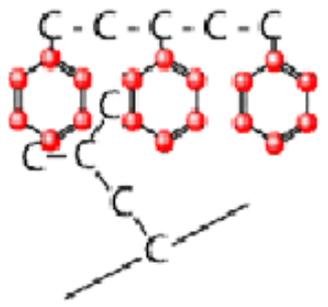
Migliori lavaggi.

Superficie di adsorbimento omogenea.

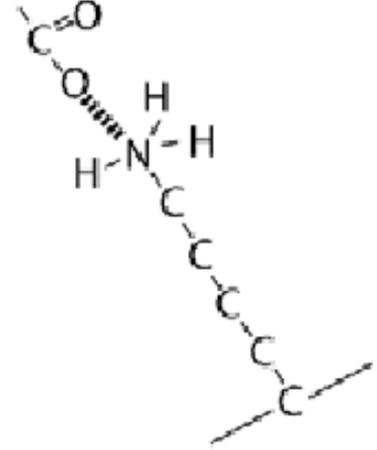
Fase di legame alla piastra (coating)

Forces Holding Proteins on a Plate

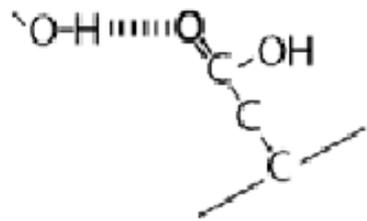
Hydrophobic Interaction



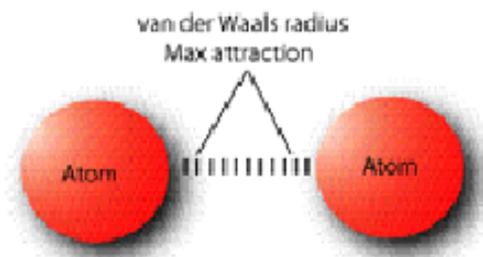
Ionic Interaction



Hydrogen Bonding



van der Waals Force



Coating

Vi si possono legare **200-500 ng** di proteine (es Ab).

50 mM carbonato pH 9,2

10 mM Tris pH 8,5

10 mM PBS pH 7,2

Condizioni vicine al PI ed atte a favorire
l'**interazione** degli Ab.

Assenza di **detergenti** o **proteine estranee**.

Tempi (t) e temperatura (T)

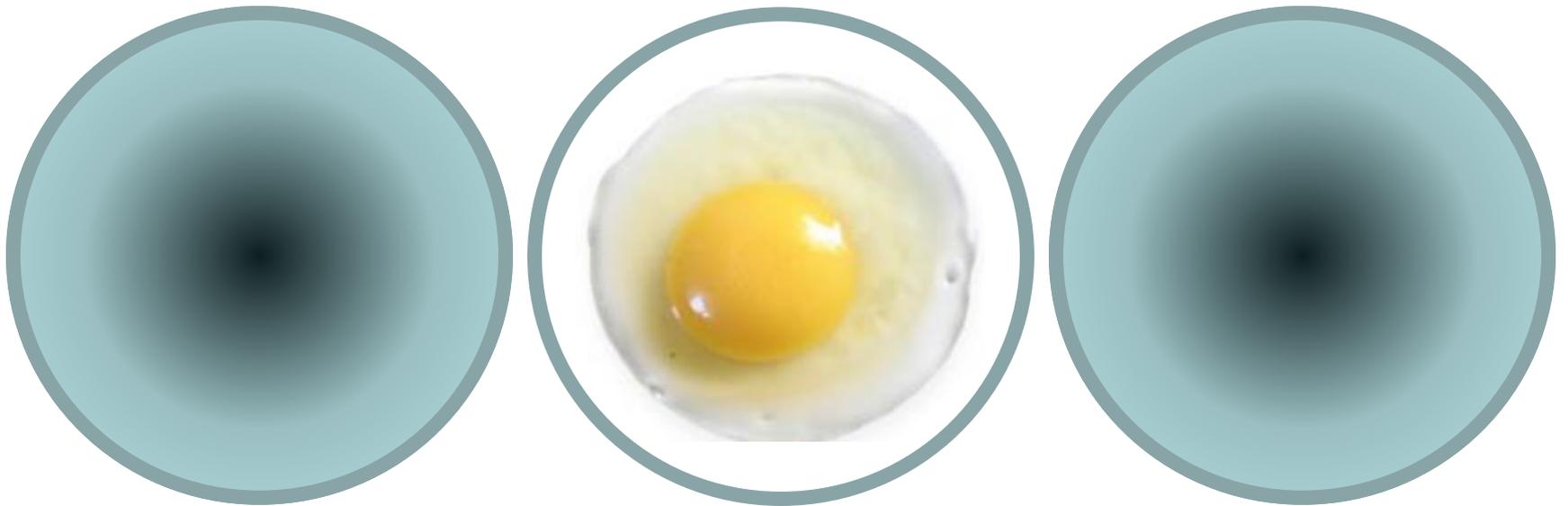
Sono i più importanti fattori che controllano la quantità di proteina **adsorbita**.

- Massimo adsorbimento a **4°C** (camera fredda, frigorifero) per 16-18 h (overnight), minima evaporazione.
- Velocizzabile a **T amb** per 4-8 ore.
Oppure
- A **37°C** per 2-4 ore.

Il polistirene non è un buon conduttore di calore.

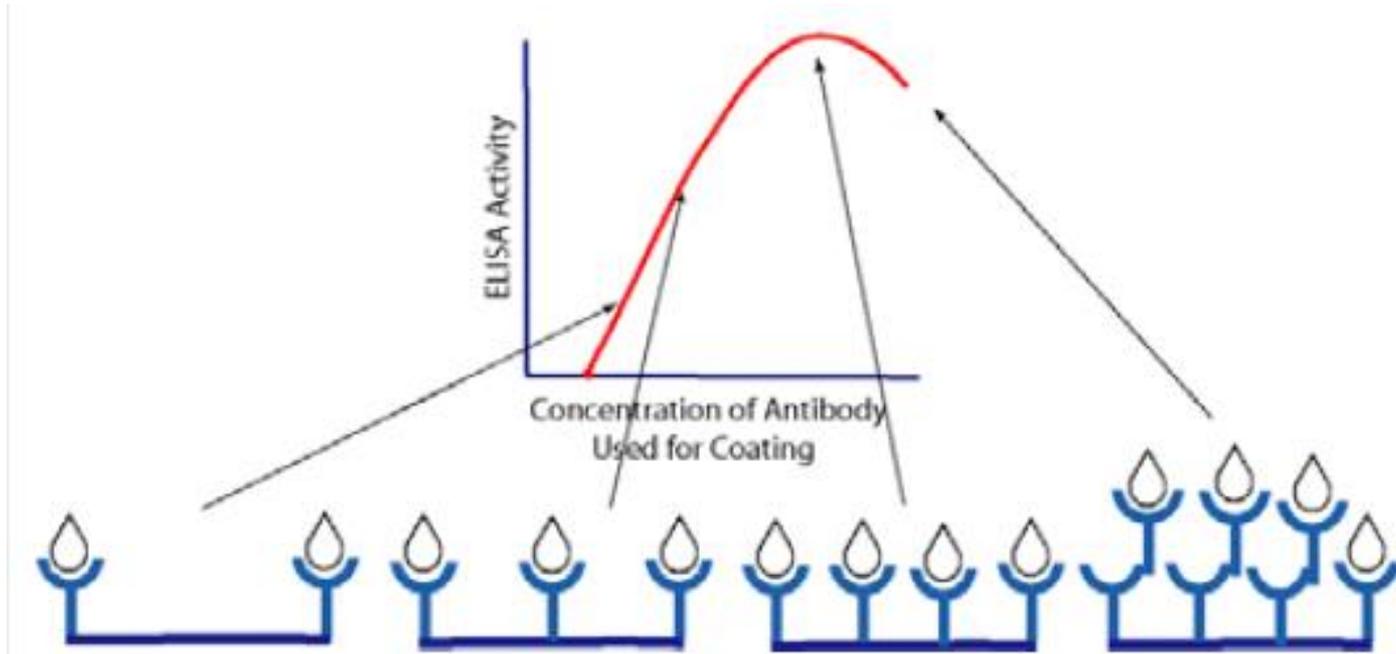
Sono parametri **sempre** fondamentali in tutte le fasi di un ELISA.

Problemi Effetto uovo!



Ormai limitato sulle plastiche di qualità.

Problemi Effetto uncino

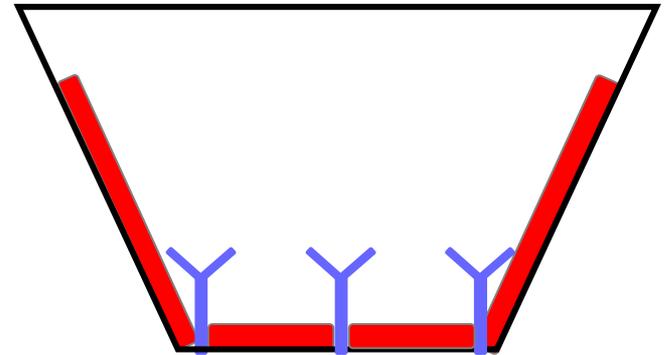
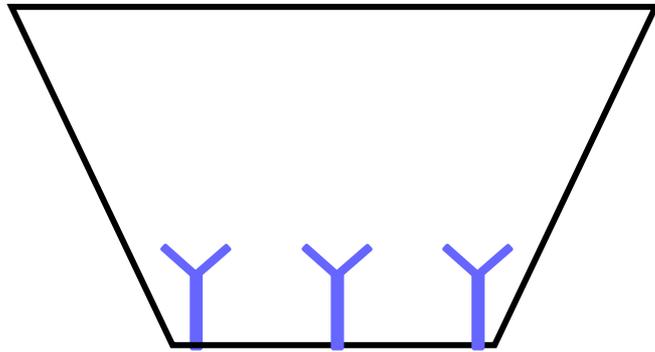


Per limitarlo l'operatore deve effettuare degli ELISA di prova (**setting**).

Blocking

FASE
OBBLIGATORIA

Fase in cui si limitano i siti idrofobici sulla plastica non occupati da Ab.



Ci sono **2 classi** di sostanze utilizzate:

- Detergenti
 - Proteine
- ← ~~Ionici~~
~~Zwitterionici~~
Non ionici

C'è
FEO?

Blocking

FASE
OBBLIGATORIA

DETERGENTI - *svantaggi* :

- Distruzione delle interazioni idrofobiche.
- Eliminati nei lavaggi (*CMC*).
- Interferiscono con l'attività dell'enzima.

PROTEINE:

Anche nei tamponi di lavaggio

- Albumina da siero bovino (BSA)
- Latte privo di grassi e disidratato (NFDM)
- Siero
- Caseina



Lavaggi

Fase
caratterizzante

Non denaturanti

Preservano la funzione dell'enzima

Eliminano le interazioni deboli

Frequentemente :

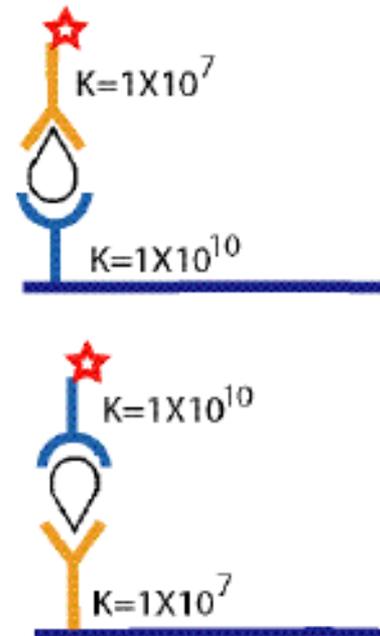
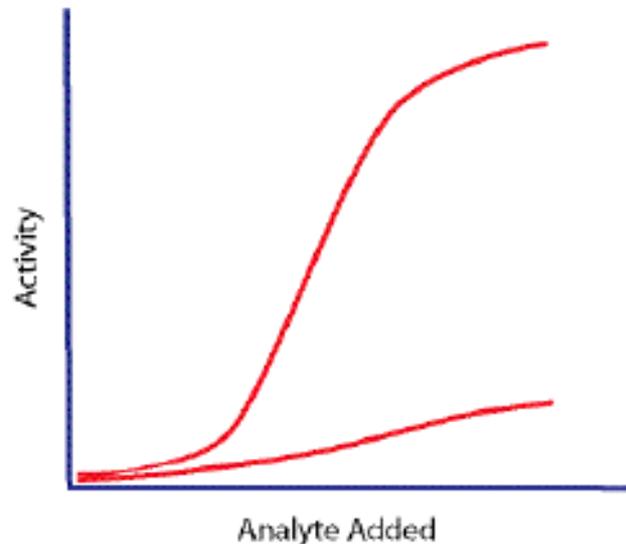
- a base di **Tris**, **Hepes** o **Fosfati** (PBS),
- con pH vicino alla **neutralità**,
- con **detergenti** non ionici a bassa [].

Anticorpi

Sono necessari anticorpi (Ab) con differenti specificità.

Fortissima differenza in sensibilità a seconda di quale Ab sia adsorbito e quale usato in soluzione.

K = costante di associazione



Enzimi e Substrati

FOSFATASI ALCALINA

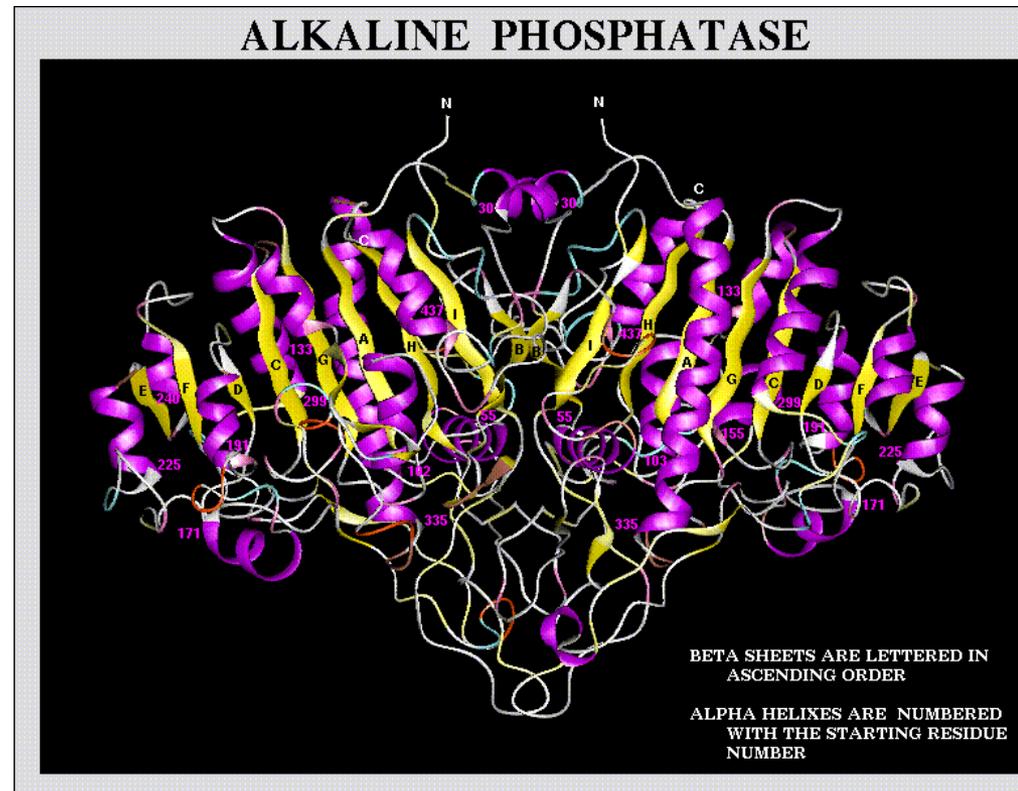
Metalloenzima contenente
2 atomi di zinco.

PM ~ 100 KDa.

Catalizza l'idrolisi del gruppo
fosforico presente sul substrato.

Substrato tipico:

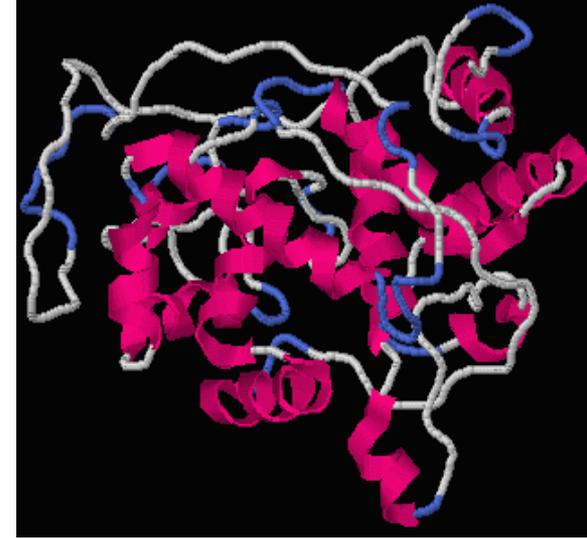
pNPP: p-nitrophenyl
phosphate, massimo
assorbimento a **450 nm**.



Enzimi e Substrati

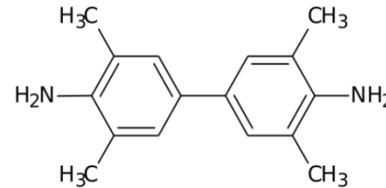
PEROSSIDASI

Horseradish peroxidase (**HRP**), oloenzima di 40 KDa. Catalizza l'ossidazione di un substrato in presenza di H_2O_2 .

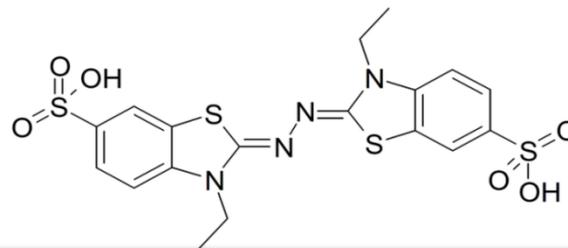


Substrati: Fenoli aromatici o ammine, come donatori di idrogeni.

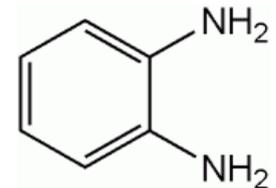
ABTS: acido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonico)



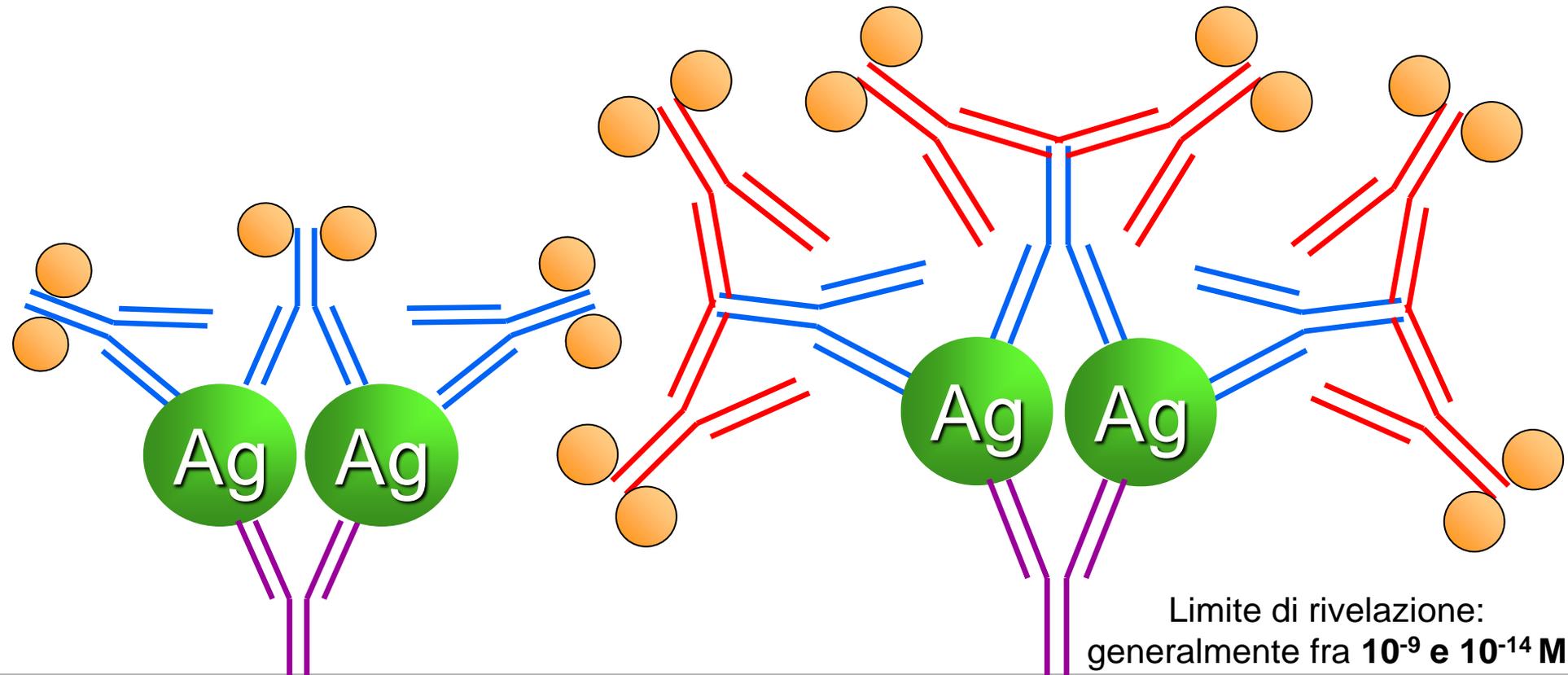
TMB: 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina



OPD: o-phenylenediamine. Cancerogena.
Massima assorbanza a 450 nm.



Amplificazione del segnale (sensibilità)

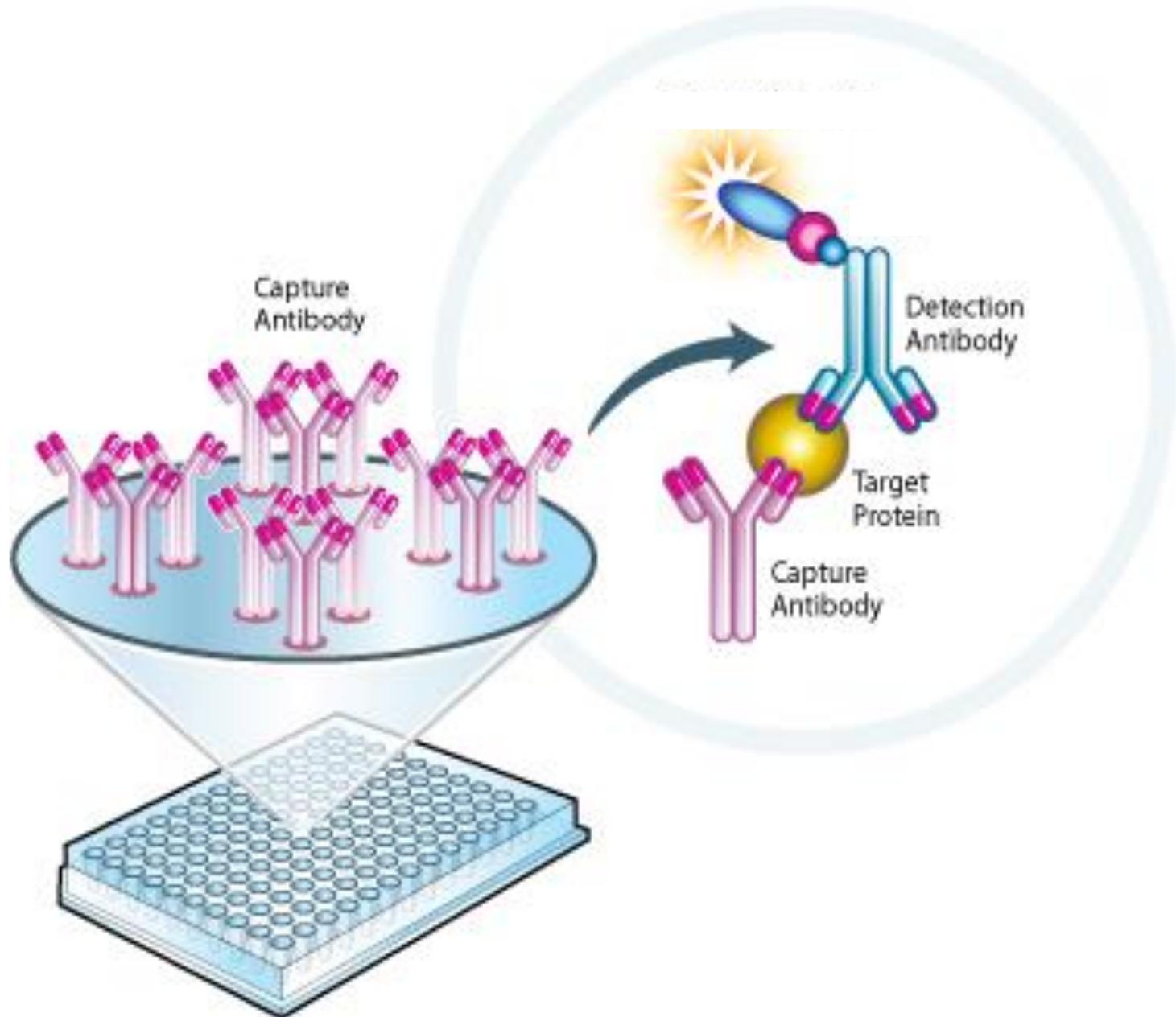


Rilevazione: 1 Ab

Rilevazione: 2 Ab

Limite di rivelazione:
generalmente fra 10^{-9} e 10^{-14} M

PROTOCOLLO DI UN E.L.I.S.A. A 2 SITI



PROTOCOLLO DI UN E.L.I.S.A. A 2 SITI

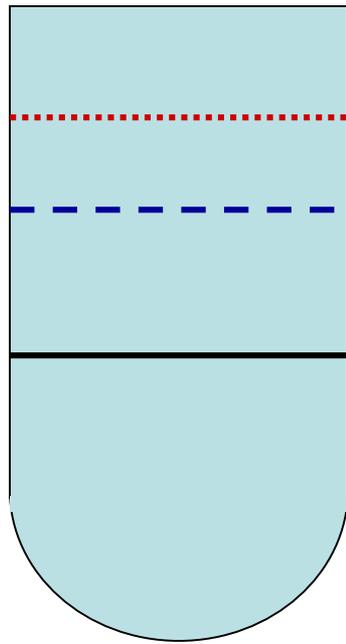
Coating: Coat microtiter plate with **70 uL/well** solution of primary antibody diluted 1:1250 (Monoclonal sheep Ab **anti-PROTEIN X**) in **carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.2)**. Incubation must be done overnight at **+4°C**.

Blocking: After incubation wash the wells 3 times with a solution of TBS and **Tween 0,1%**. Saturation of protein binding sites on the plate was performed with a solution of TBS + **BSA 5%** (**80 uL/well**) incubated for 60' at room temperature (**RT**).

Sample: Wash 3 times with TBS and Tween 0,1%. Add **50 uL/well** of sample solution (containing **PROTEIN X**) or **standard curve**. All dilution should be done in the **TBS-BSA (0,2%)** buffer. Incubation must be done 90' at room temperature.

PROTOCOLLO DI UN E.L.I.S.A. A 2 SITI

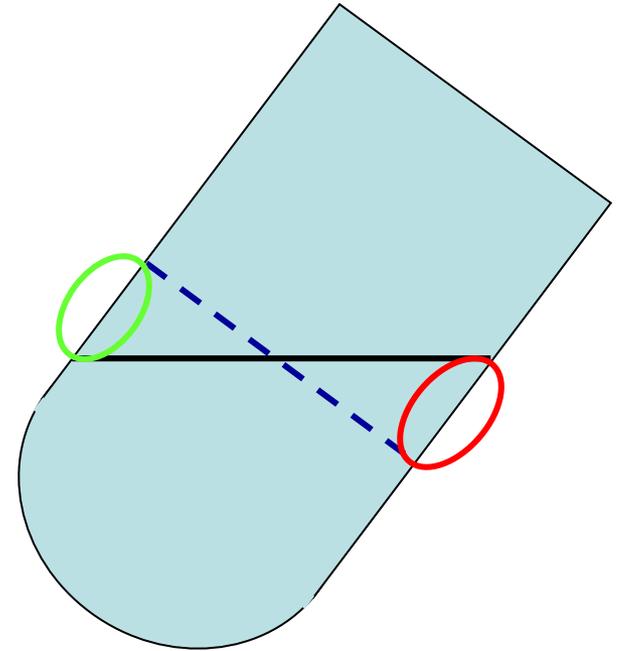
VOLUMI UTILIZZATI IN E.L.I.S.A.



80 uL di blocking

70 uL coating

50 uL sample



First Ab: Wash 3 times with TBS and Tween 0,1%.
Add **50 uL**/well of the secondary antibody (**Polyclonal** rabbit Ab **anti-PROTEIN X**) diluted 1/500 in HBS-BSA (0,2%)
buffer. Incubation: 60' at **RT**.

PROTOCOLLO DI UN E.L.I.S.A. A 2 SITI

Second Ab: Wash 3 times with TBS and Tween 0,1%.

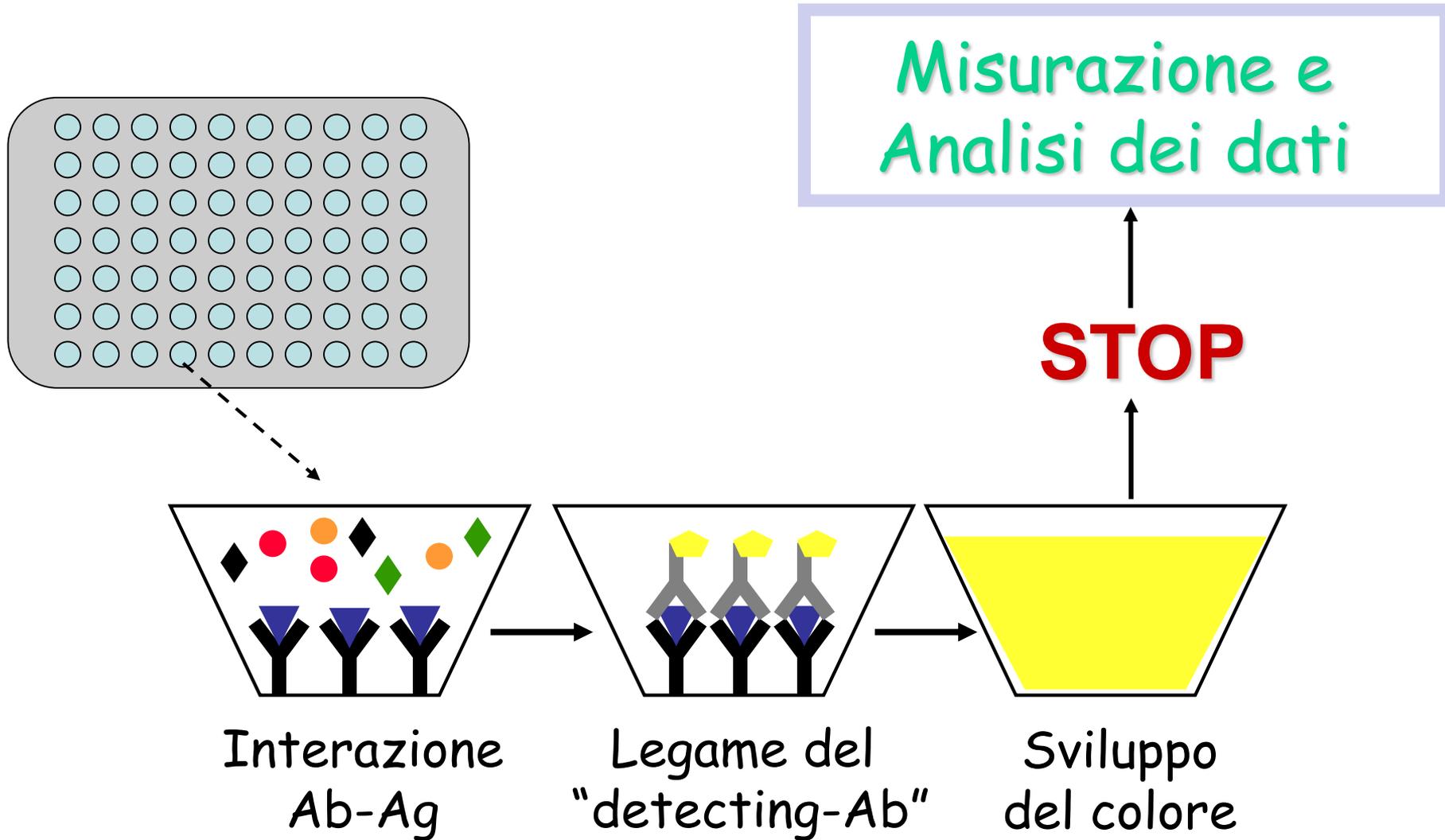
Add **50 uL**/well of the tertiary antibody (Mouse polyclonal Ab **anti-rabbit HRP conjugated**) diluted 1/1000 in the HBS-BSA(0,2%) buffer. Incubation: 60' at **RT**.

Substrate: Wash 3 times with TBS and Tween 0,1% and adding **50 uL**/well of **substrate solution** (**OPD**, buffer and **3% H₂O₂**).

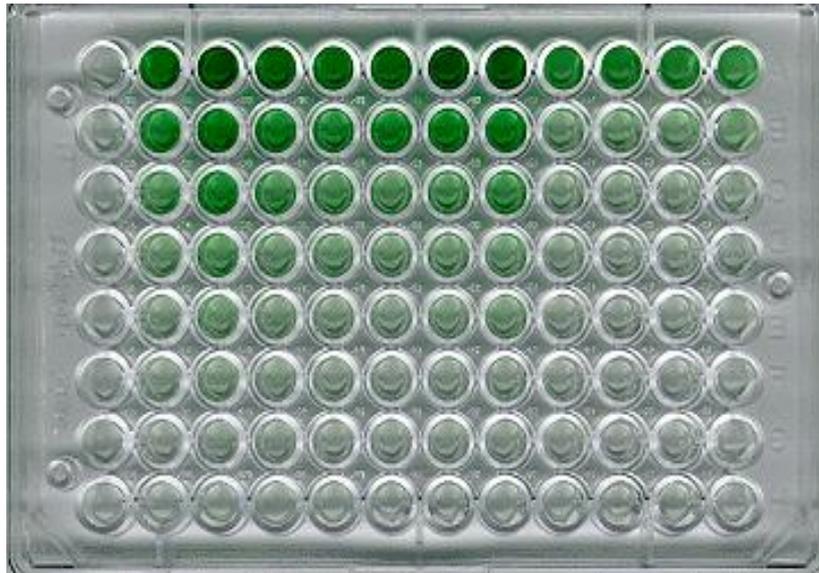
Stop Color Reaction: Stop color reaction after **XX** min with **50 uL/well** of **H₂SO₄** 2,5 M.

Optical Density Measurement: **Measure OD** sample at **492 nm** after 30 min from substrate addition.

Schema sperimentale



Come interpretare i risultati?



Determinazione
spettrofotometrica
del colore

Measurement mode: Absorbance
Measurement wavelength: 492 nm
Read mode: Normal

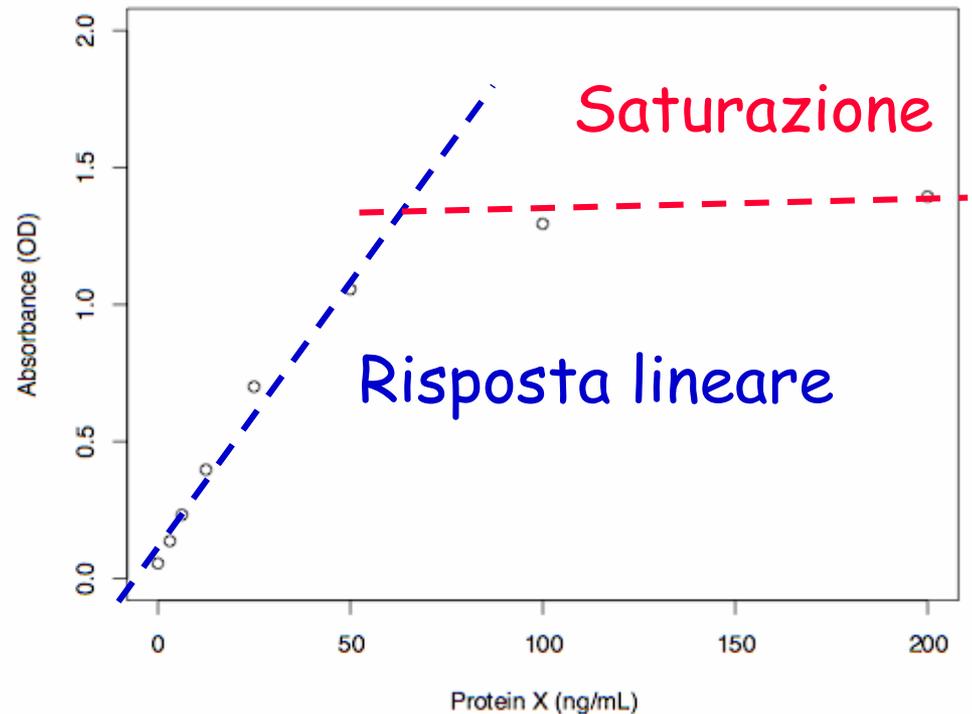
...we need
calibrators !

Rawdata

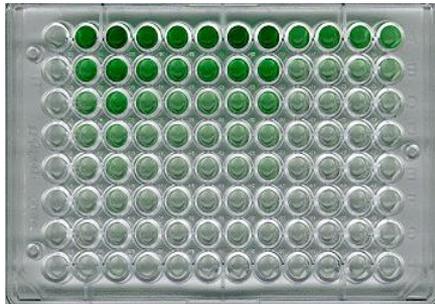
<>	1	2	3	4	5	6
A	1,0820	0,9560	0,7190	0,6200	0,4810	0,0590
B	0,7510	0,7160	0,4760	0,6250	0,3180	
C	0,4850	0,4530	0,4740	0,4010	0,3140	
D	0,2780	0,2570	0,4800	0,4050	0,3230	
E	0,1630	0,1600	0,2870	0,4010	0,1800	
F	0,1120	0,0980	0,2850	0,2430	0,1900	
G	0,0570	0,6810	0,3150	0,2430	0,1830	
H	0,0530	0,7000	0,6630	0,2650	0,4820	

Relazione fra segnale prodotto e concentrazione del campione

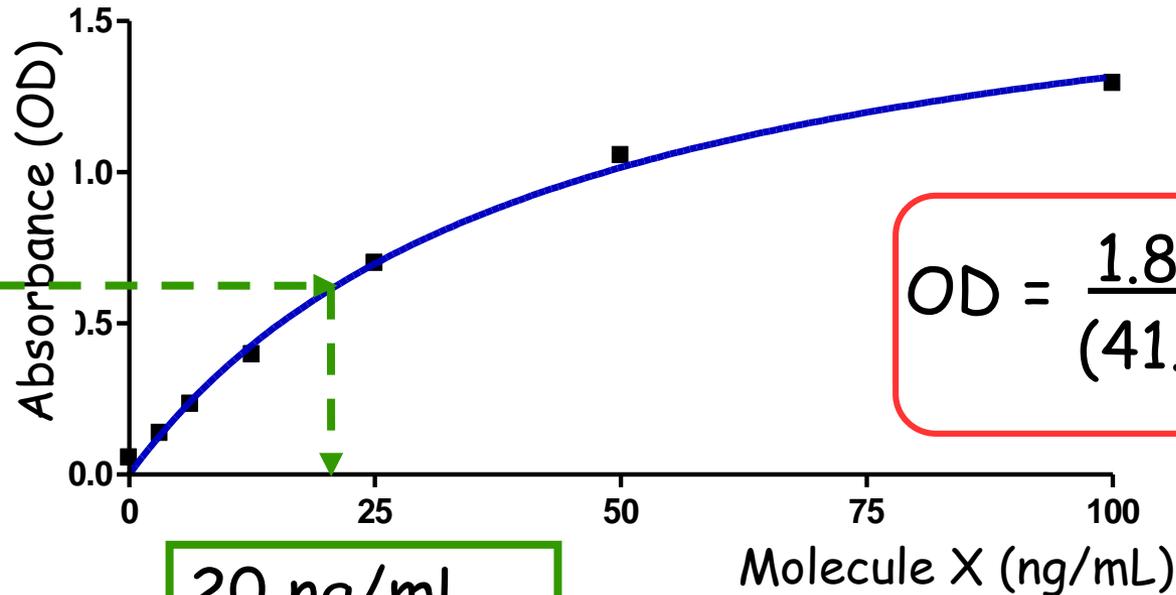
Calibrator (ng/ml)	Absorbance (OD)
200	1.9723
100	1.5683
50	1.1696
25	0.7609
12.5	0.4424
3.125	0.2429
0	0.056



Come si usa la curva di taratura?



Sample 1:
0,666 OD



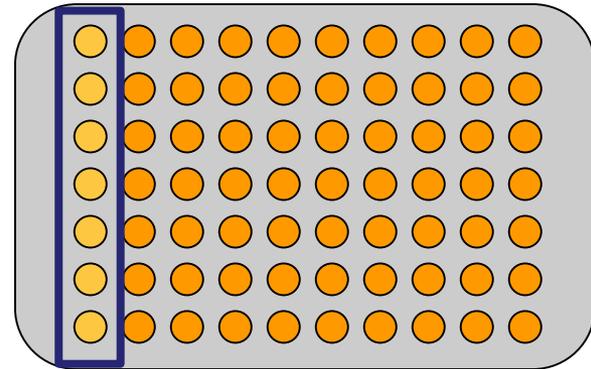
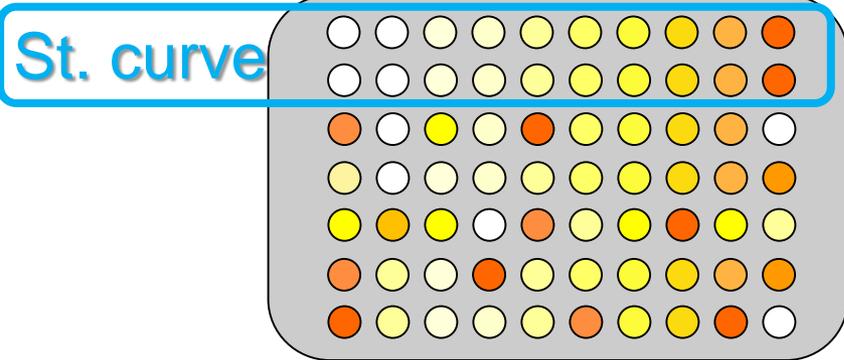
20 ng/mL
molecule X
in Sample 1

$$OD = \frac{1.868 [X]}{(41.96 + [X])}$$

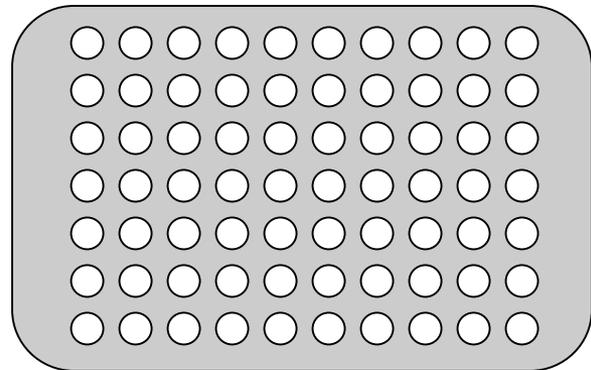
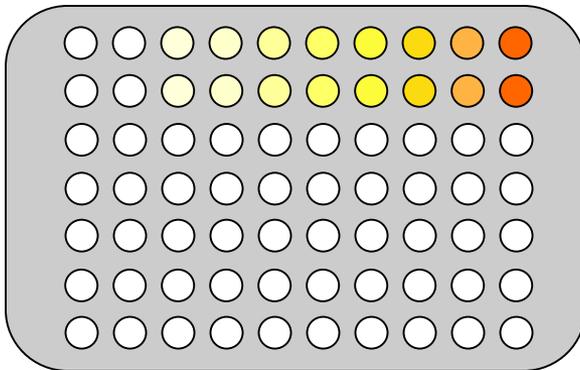
L'equazione che descrive la curva permette di **CALCOLARE** la quantità di analita presente nel campione in indagine.

Problemi tipici

Condizione ideale

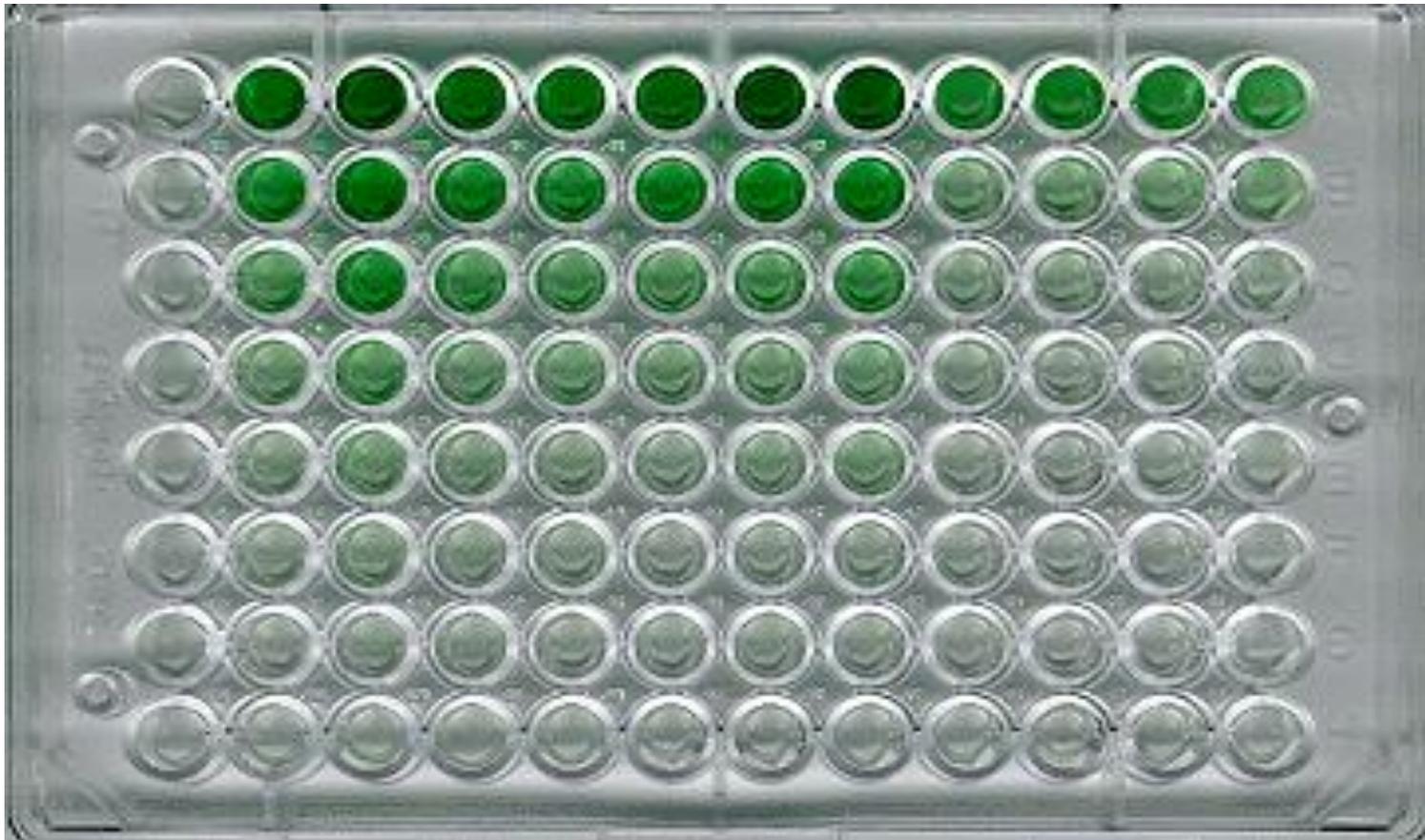


Bianco!



Setting di un E.L.I.S.A. a 2 siti

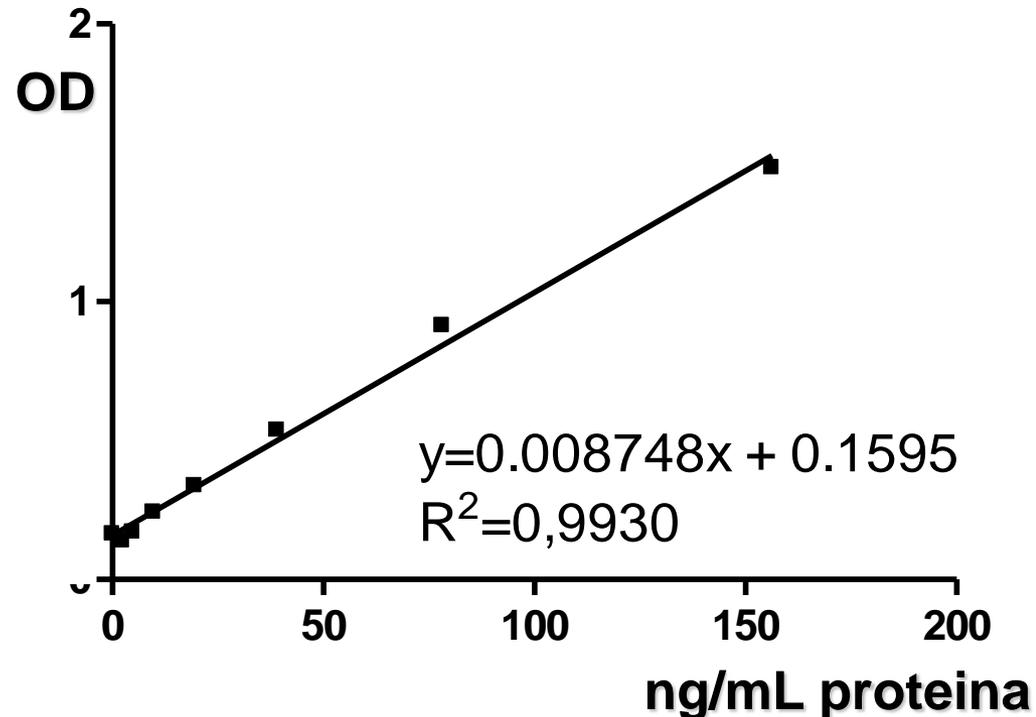
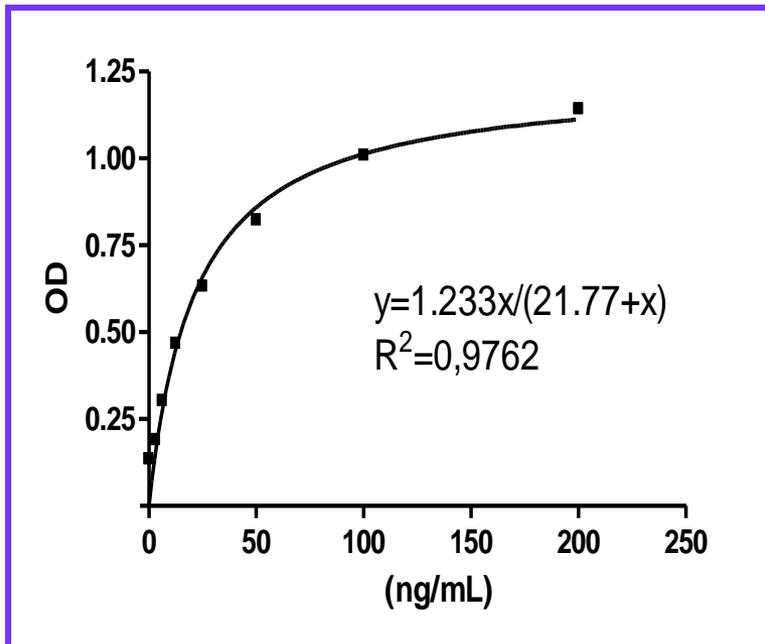
- **Matrici** di concentrazioni degli anticorpi e studio del background.



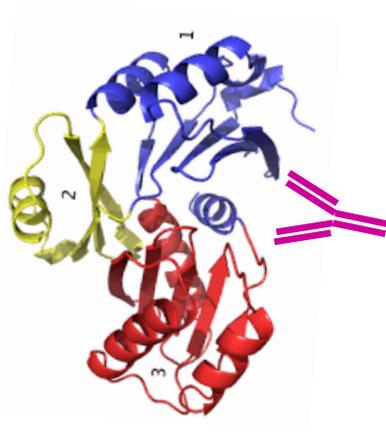
Setting di un E.L.I.S.A. a 2 siti

- Matrici di concentrazioni degli anticorpi e studio del background.

- Intervallo di concentrazione in cui l'Ag può essere determinato.



Lo scopo di qualunque
E.L.I.S.A. è di **quantificare**
con precisione un antigene

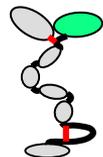


Usi alternativi:

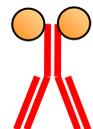
- Studi di conformazione
- Studi di legame

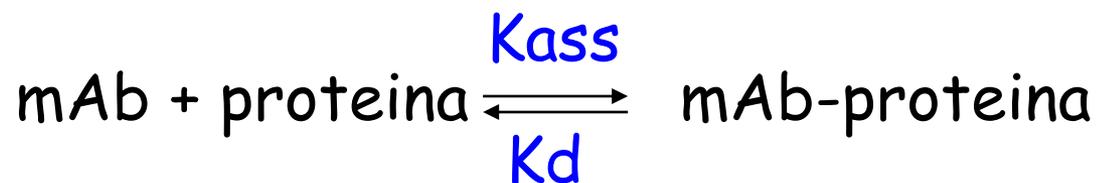
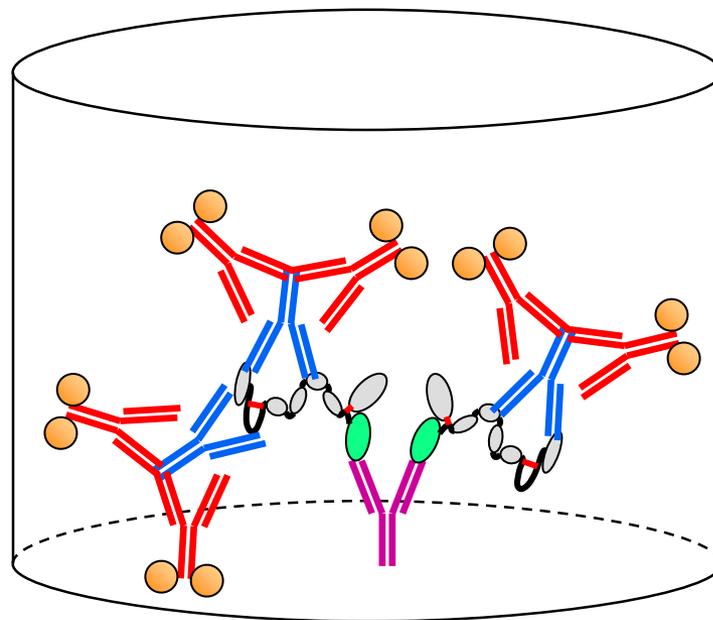
STUDI DI CONFORMAZIONE MEDIANTE E.L.I.S.A.

 Ab monoclonale anti-dominio A

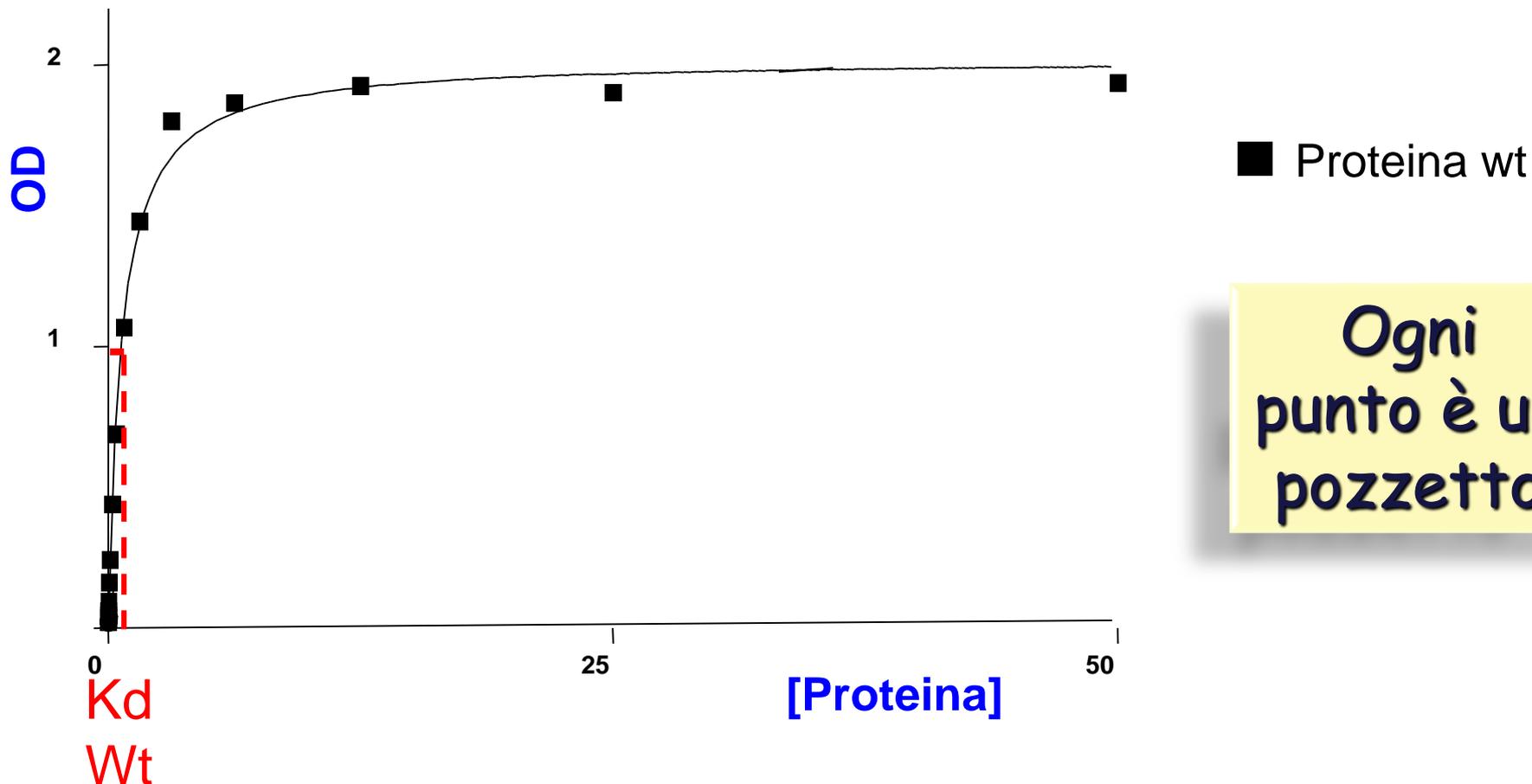
 Proteina di interesse

 Ab mono/policlonale anti-proteina d'interesse

 Ab policlonale anti-Ab, coniugato con perossidasi



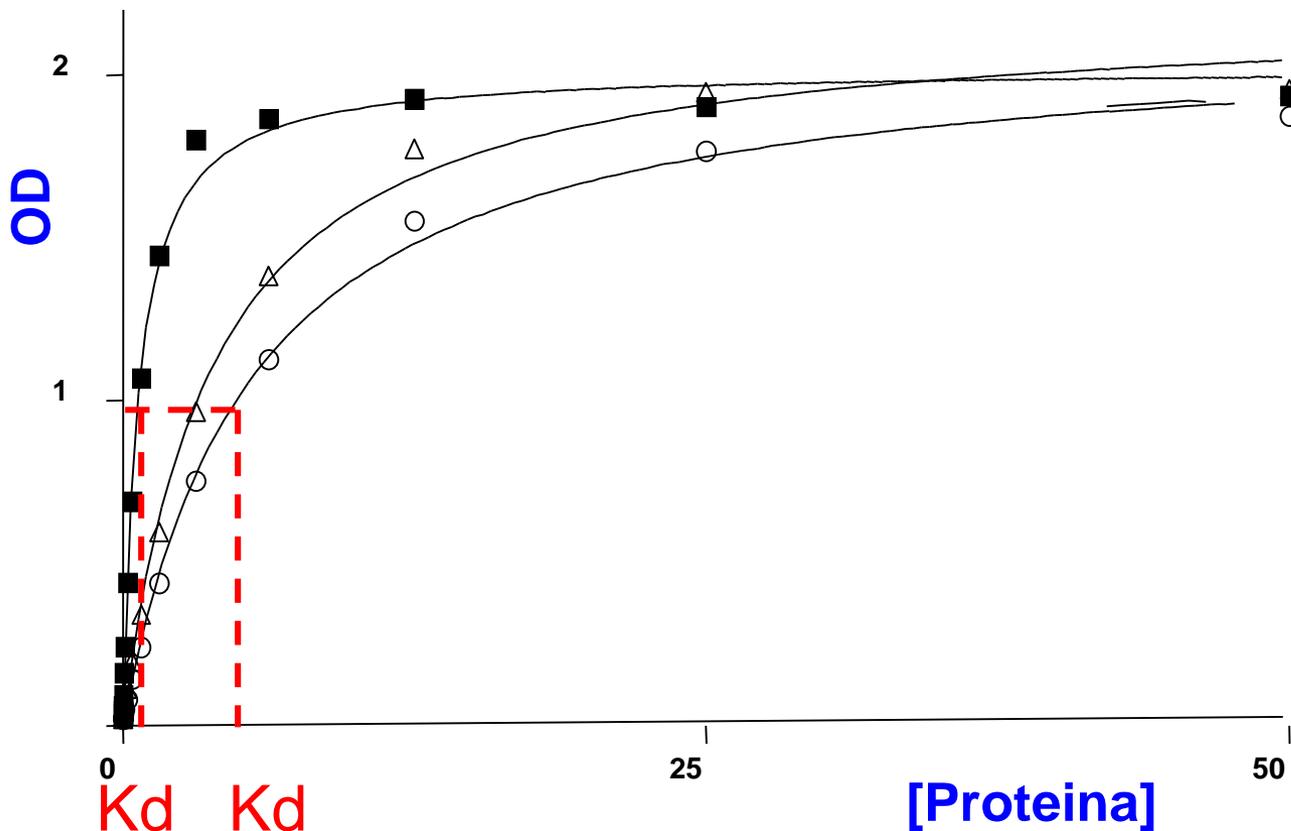
STUDI DI CONFORMAZIONE MEDIANTE E.L.I.S.A.



Ogni punto è un pozzetto

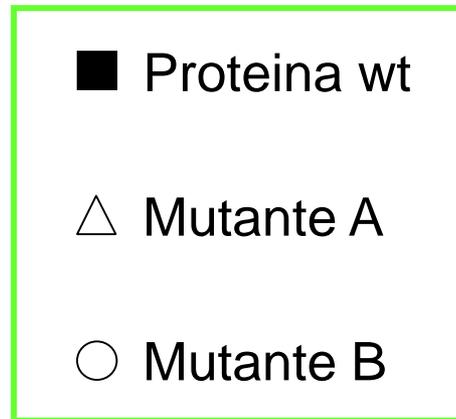
Partite da quantità note di proteina!

STUDI DI CONFORMAZIONE MEDIANTE E.L.I.S.A.



Kd Kd
Wt Mutante B

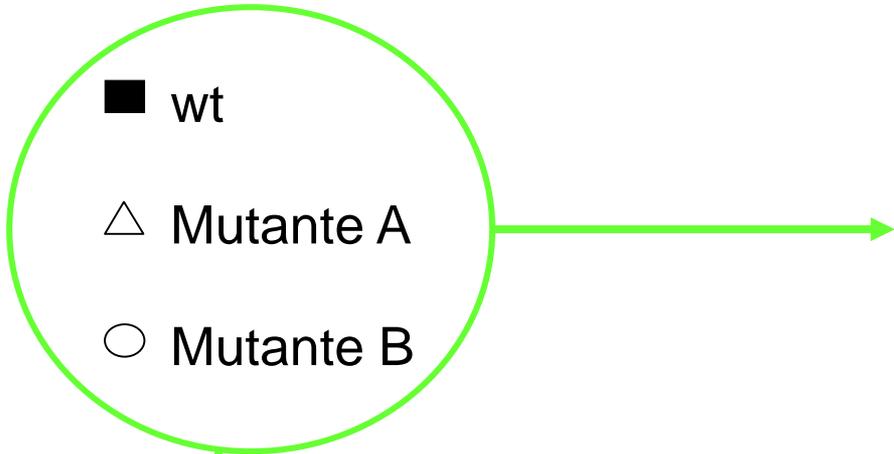
Costanti di
dissociazione



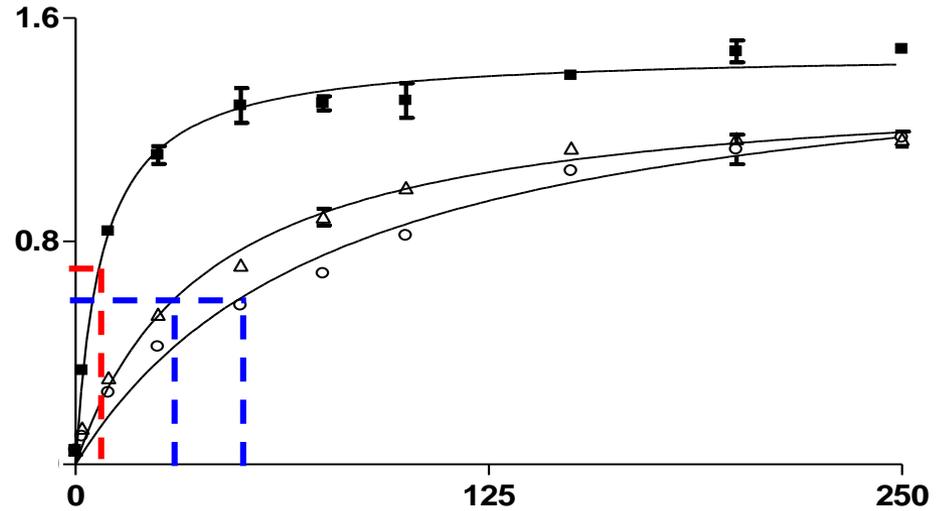
Varianti di
una
proteina di
interesse

STUDI DI LEGAME MEDIANTE E.L.I.S.A.

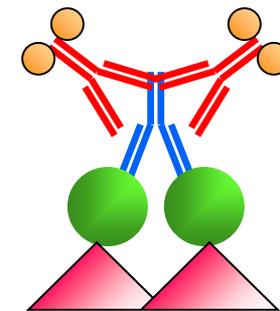
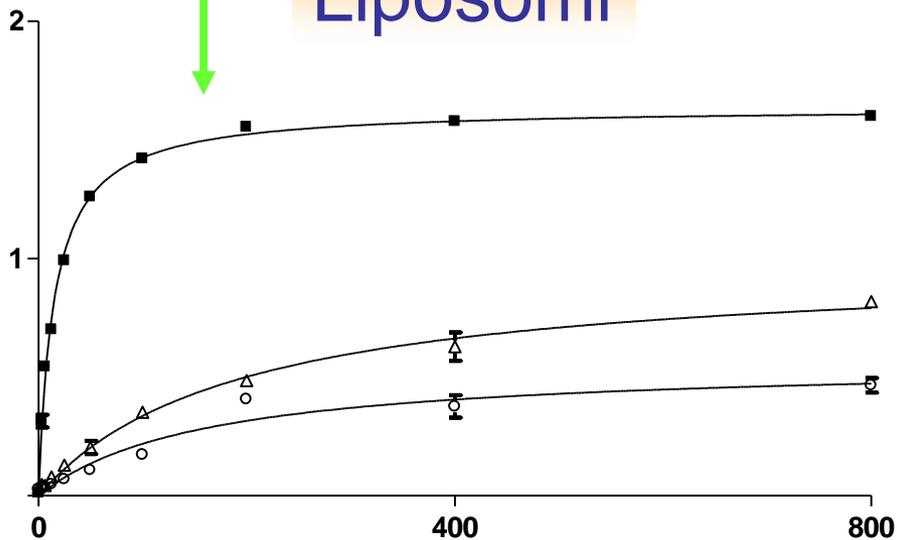
Proteina di interesse:



Recettore



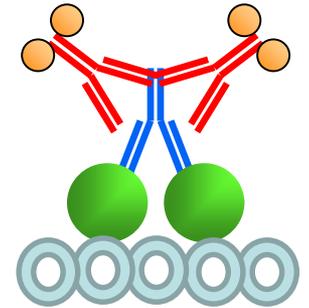
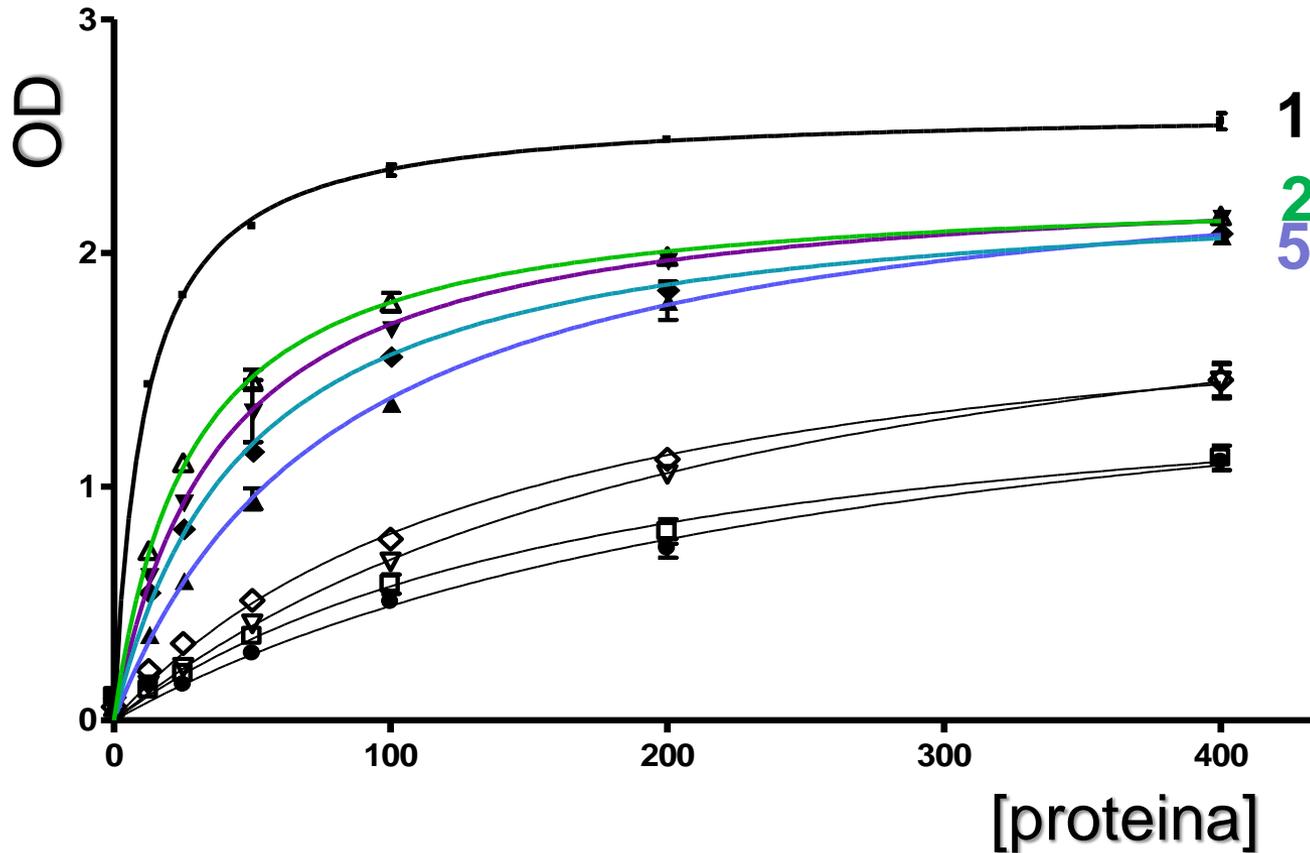
Liposomi



Proteina di interesse

Molecola che lega la proteina di interesse

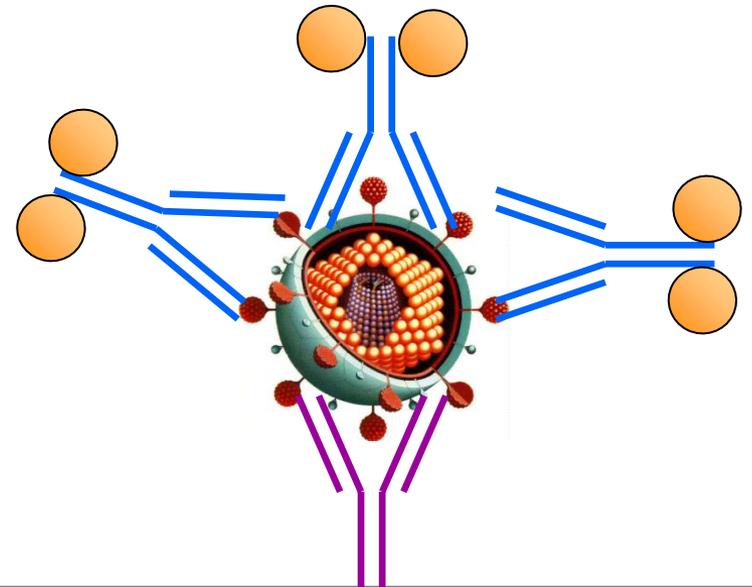
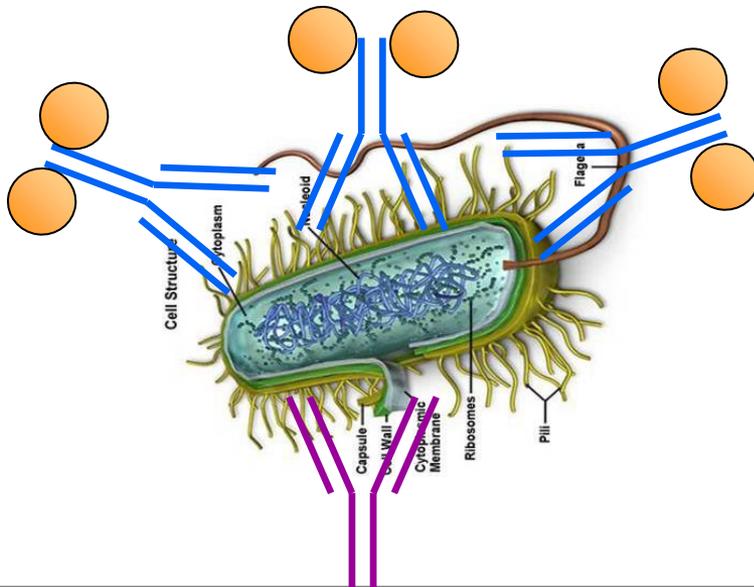
STUDI DI LEGAME MEDIANTE E.L.I.S.A.



La proteina
è la stessa,
variano i
liposomi
immobilizzati

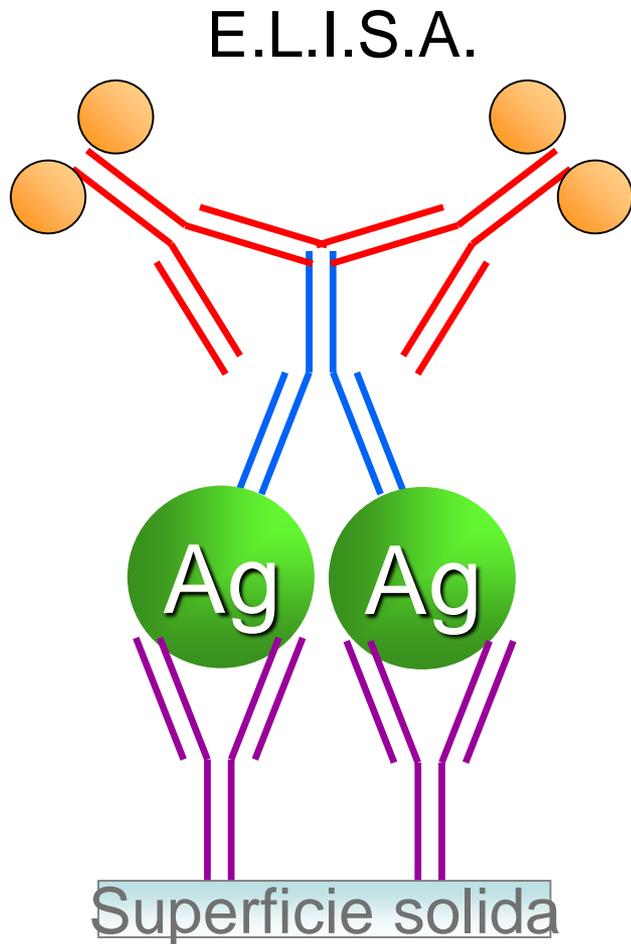
Variazione delle curve di legame in funzione della
composizione lipidica.

E.L.I.S.A. UTILIZZATO PER RICONOSCERE INTERI ORGANISMI!



Superficie solida

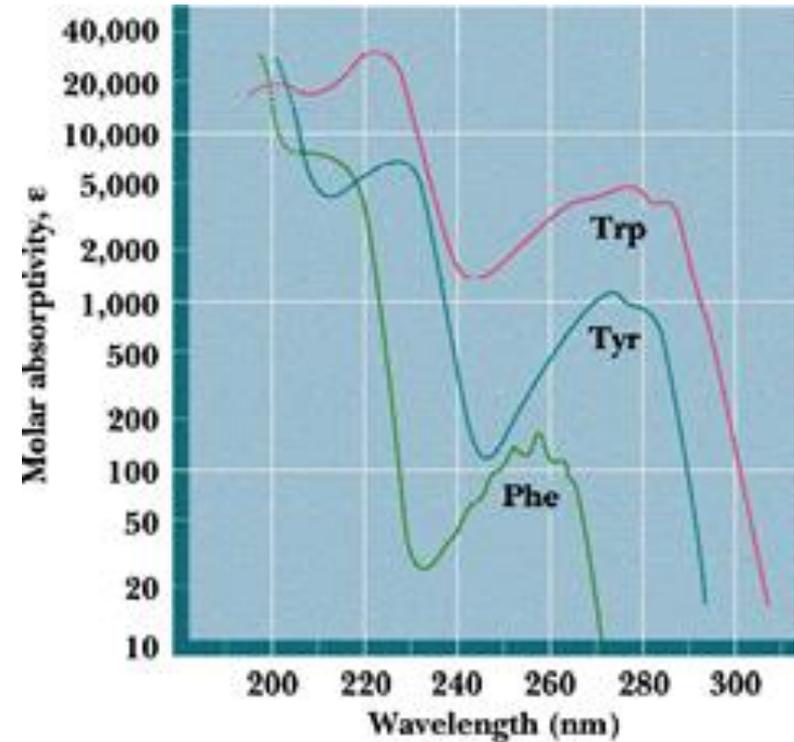
DETERMINAZIONE DELLA QUANTITA' DI PROTEINE



**Metodo specifico
e relativo.**

VS

Assorbimento nell'UV
(**275-280 nm**)



Metodo diretto.

CONCLUSIONI

Permette di affermare
SE C'E' una molecola.

QUANTO è
presente.



NON dà informazioni
sulla funzione e molte
altre caratteristiche
biochimiche.