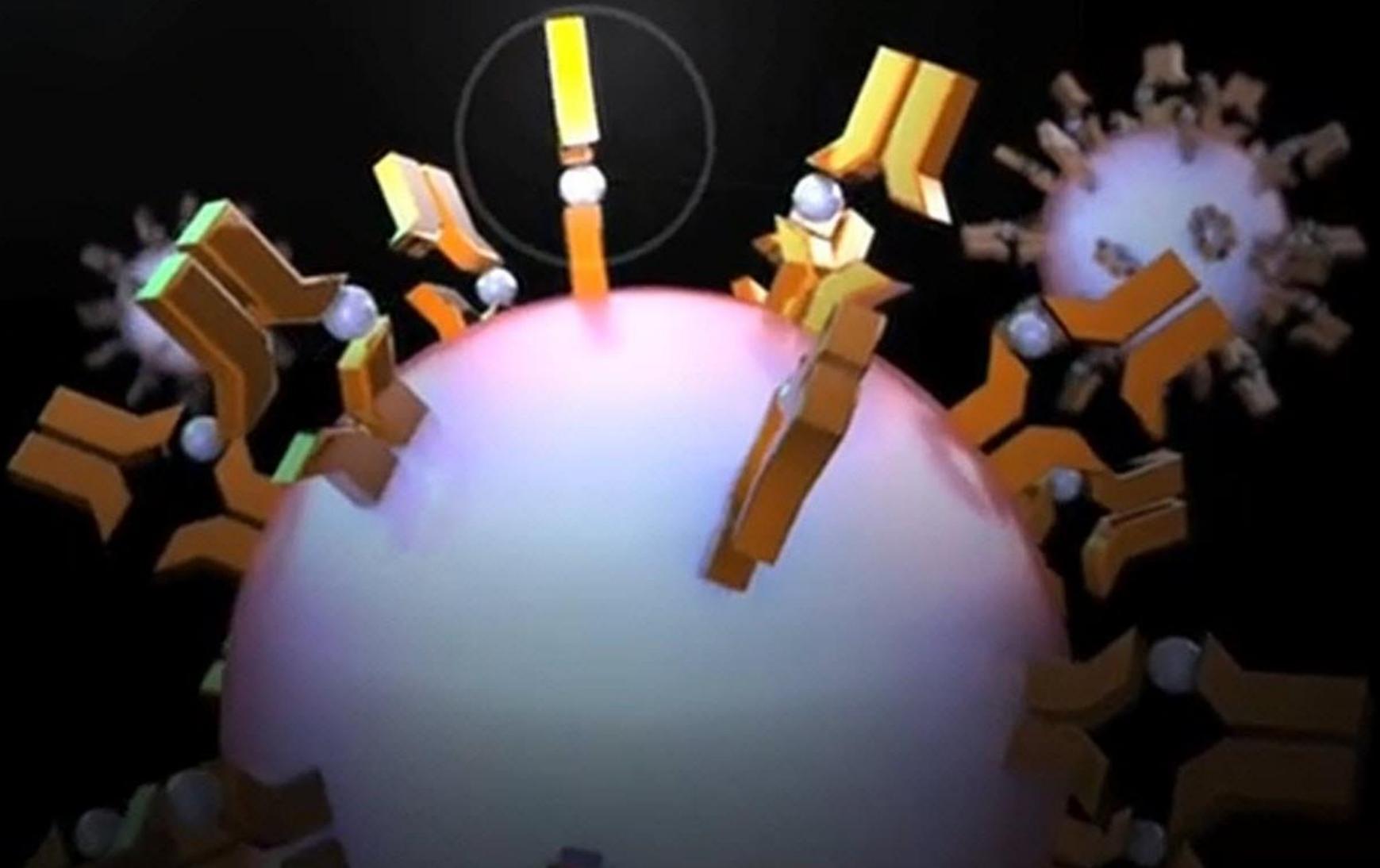


# BIOPLEX

Biotinylated Detection Antibodies

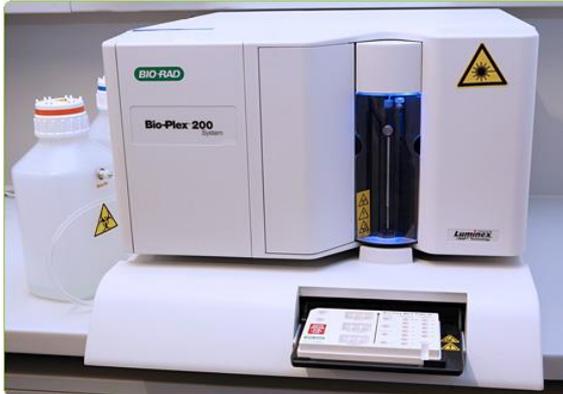
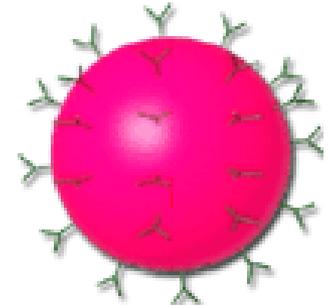


100 ELISA IN UN GIORNO?

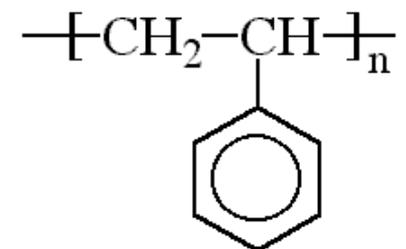


# BIOPLEX o MULTIPLEX o LUMINEX

**Dosaggio** basato su microsfere di **polistirene** del diametro di **5.6  $\mu\text{m}$**  e con grande superficie disponibile per legare un anticorpo specifico per l'analita che si voglia quantificare.

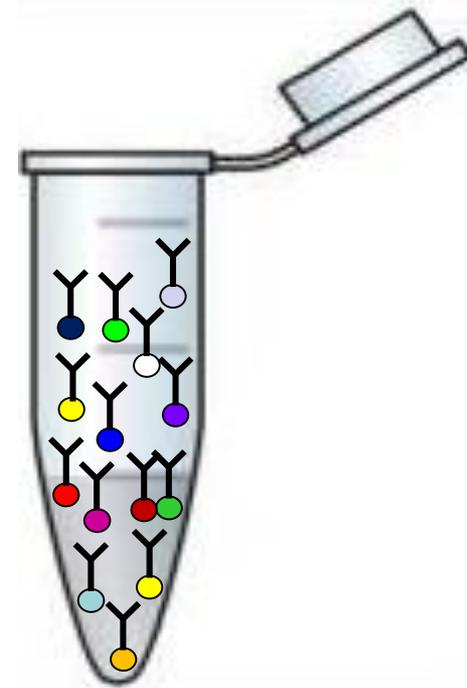
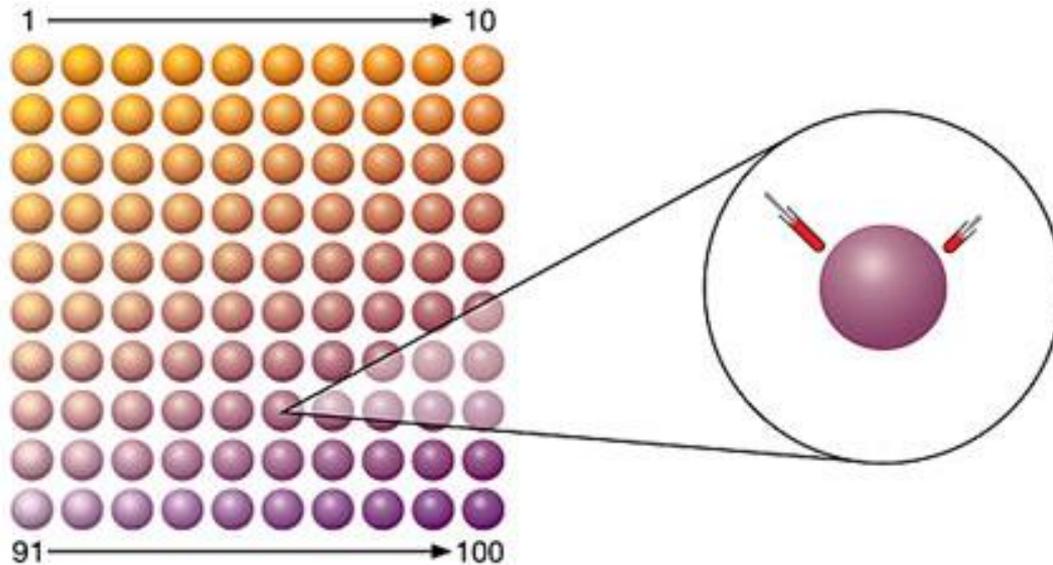


Il polistirene è un polimero vinilico; una lunga catena idrocarburica, con un gruppo fenilico legato ad un atomo di carbonio in modo alternato. Il polistirene si ottiene con la polimerizzazione radicalica vinilica dello stirene monomero.



# BIOPLEX

Le microsfere sono inoltre coniugate a **2 fluorocromi** in concentrazioni diverse, tali da determinare fino a **100 diverse colorazioni**.



Ogni diversa microsfera (determinata da un solo colore), sarà legata ad **un anticorpo** specifico per un diverso analita.

Ciò permette la rilevazione di più analiti, fino a 100 in uno stesso campione. Tutto ciò che ha dimensione < di 5,6 micron **viene escluso dall'analisi**.

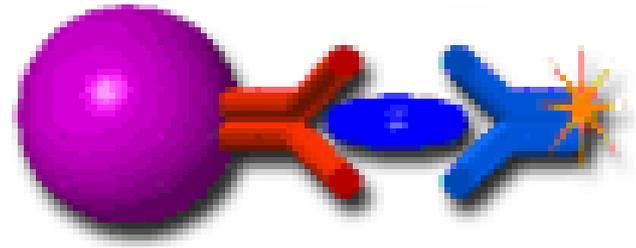
# SAGGIO AL BIOPLEX

- 1) In apposita piastra, con un **FILTRO** sul fondo dei pozzetti, si aggiunge una **combinazione di microsfere**;
- 2) aggiunta dei **campioni** contenenti gli analiti incogniti;
- 3) **lavaggio tramite aspirazione** della soluzione tampone, dal basso, in modo da non perder le microsfere;



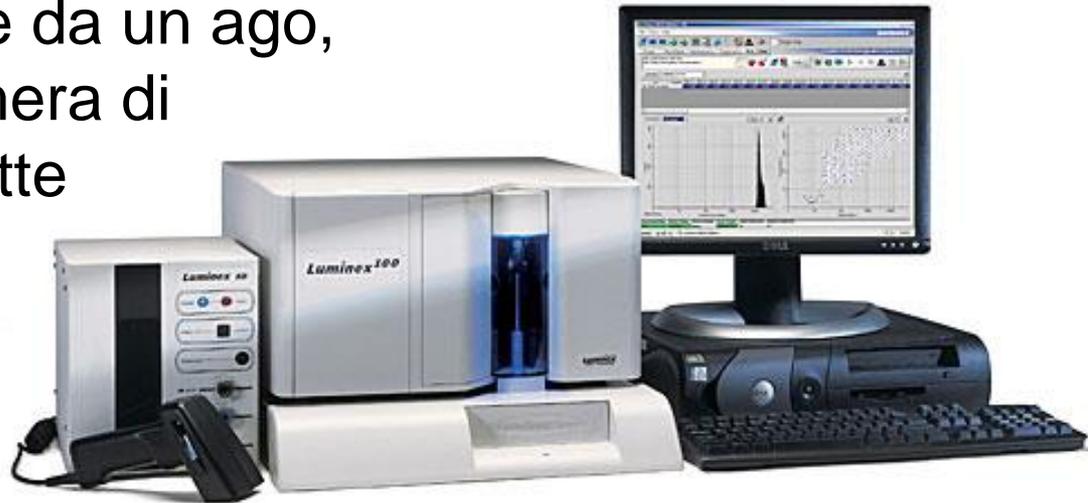
# SAGGIO AL BIOPLEX

- 1) In apposita piastra, con un filtro sul fondo dei pozzetti, si aggiunge una **combinazione di microsferi**;
- 2) aggiunta dei **campioni** contenenti gli analiti incogniti;
- 3) **lavaggio tramite aspirazione** della soluzione tampone, dal basso, in modo da non perder le microsferi;
- 4) aggiunta di un **Ab 2<sup>ario</sup>** coniugato a **biotina**, questo anticorpo lega l'analita in un sito diverso rispetto all'anticorpo legato alla microsfera, poi lavaggi;
- 5) aggiunta di **streptavidina** coniugata ad un terzo fluoroforo, poi lavaggi;
- 6) risospensione delle microsferi in un tampone di lettura.



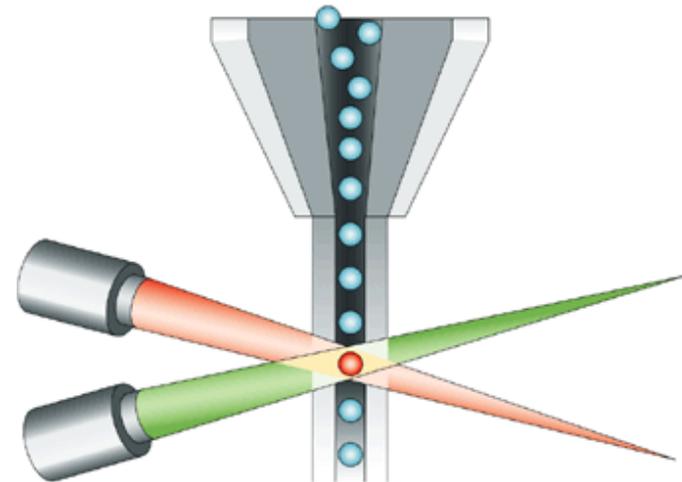
# STRUMENTO BIOPLEX

Le microsferi, aspirate da un ago, sono portate nella camera di lettura ove vengono fatte **passare una ad una.**

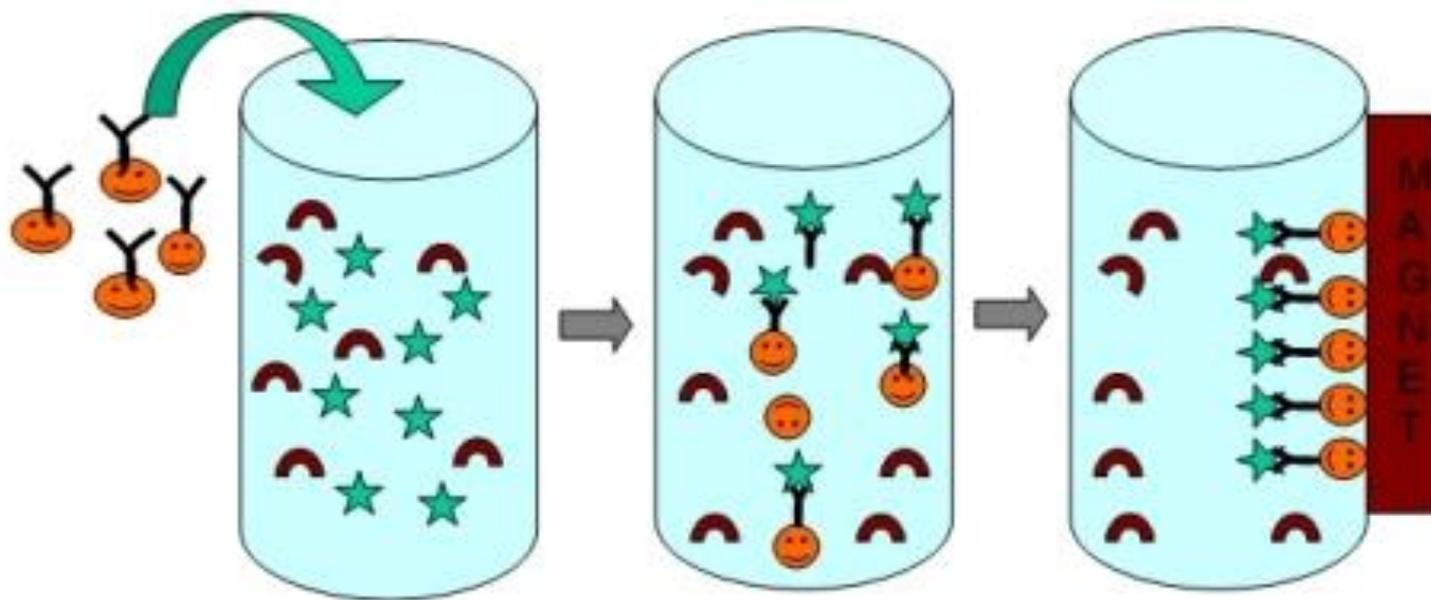


Qui sono colpite da **2 laser**. Uno riconosce il **colore** della microsfera e dunque il relativo analita riconosciuto dall'anticorpo ad essa legato, andando ad eccitare i 2 fluorocromi che la determinano.

L'altro laser la **quantifica** perché eccita il fluoroforo legato sull'**Ab 2°ario**.



# ACCOPPIAMENTO BIOPLEX – BIGLIE MAGNETICHE



Si elimina il sistema di lavaggio per aspirazione, passando a quello più efficiente basato sul **magnetismo**.



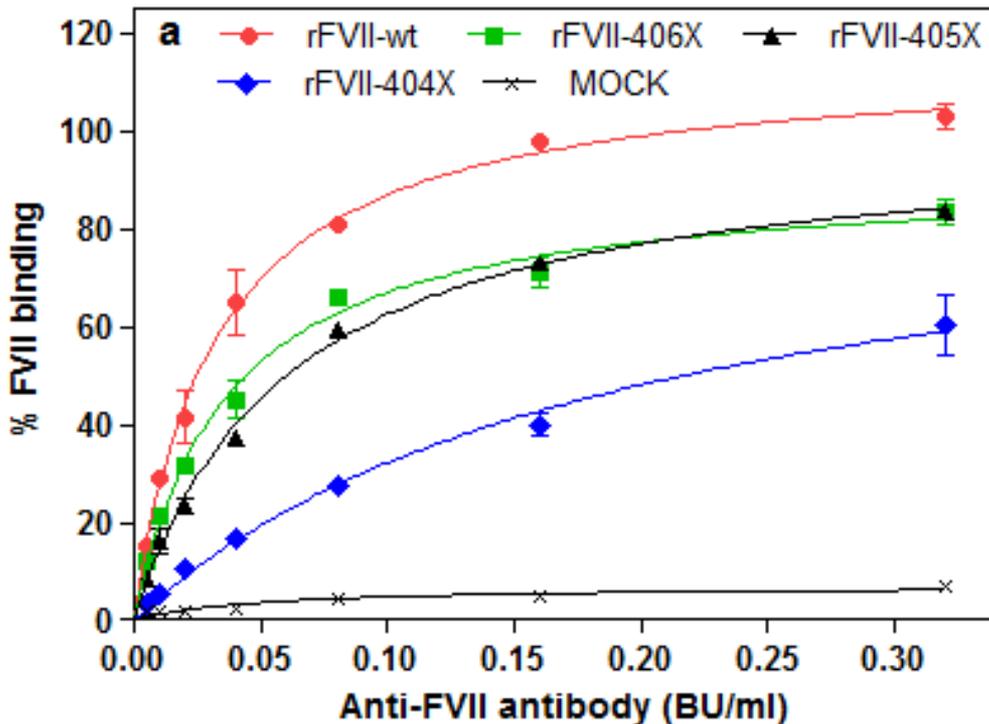
# ESEMPIO REALE

## Bioplex e biglie magnetiche

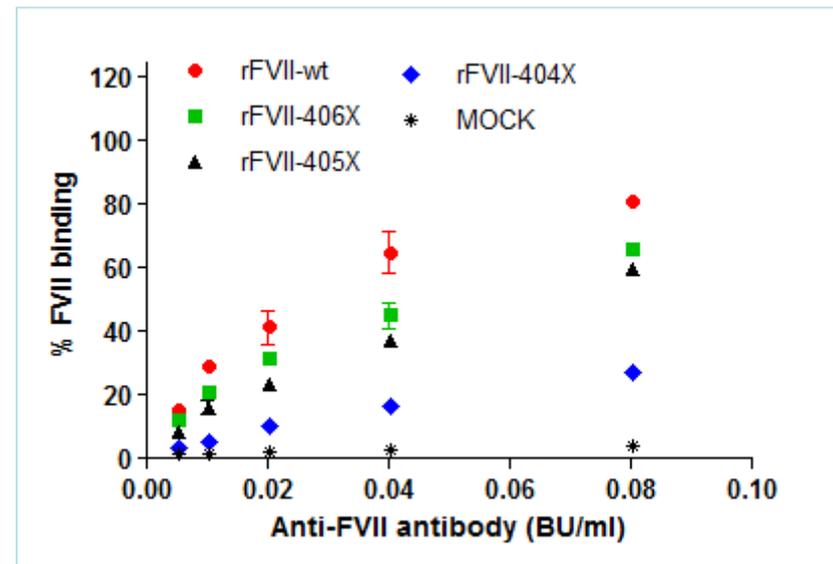
Binding assay (Bio-Plex) → the r404X variant is less recognized than r405X, r406X and rFVII-wt (60 ng/ml)



+ mAb againsts lighth chain of FVII + FVII + plasma + Ab anti human IgG

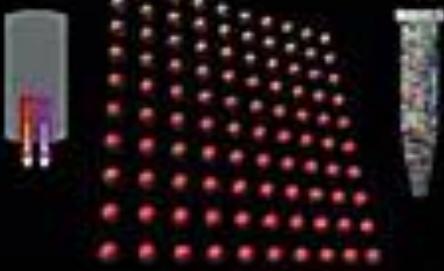


*Valori bassi di anti-FVII Ab*



# SOMMARIO

1. **100 Color Codes = 100 Simultaneous Tests**



Using a two-dye method, Luminex produces 100 distinct bead sets.

2. **Multiple Measurements With Color Separation**



Bio-Plex uses these uniquely color-coded beads to identify multiple assays in a single tube or well.

3. **Microspheres as Molecular Carriers**



To perform a test, thousands of probes are bound to the bead.

4. **Capturing the Target Molecule**



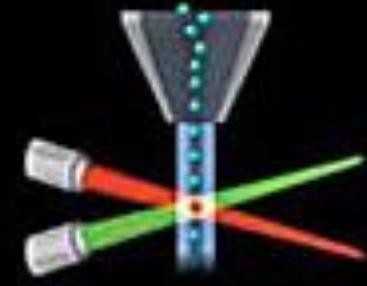
While suspended in a test sample, the bound probes collect molecules.

5. **Tagging the Reaction**



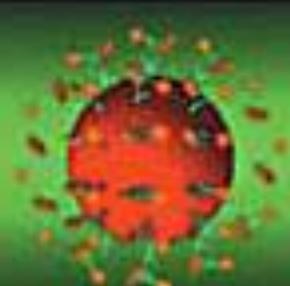
Fluorescently-labeled reporter tags bind to the sample molecule.

6. **Beads in a Fluid Stream**



Precision fluidics align the beads in single file, and pass them through the lasers one at a time.

7. **One Laser Excites Molecular Tags**



Reactions are measured for fluorescence intensity and reported in real time.

8. **Second Laser Excites Microsphere**



Fluorescence intensity of the bead identifies the reaction.

# VANTAGGI

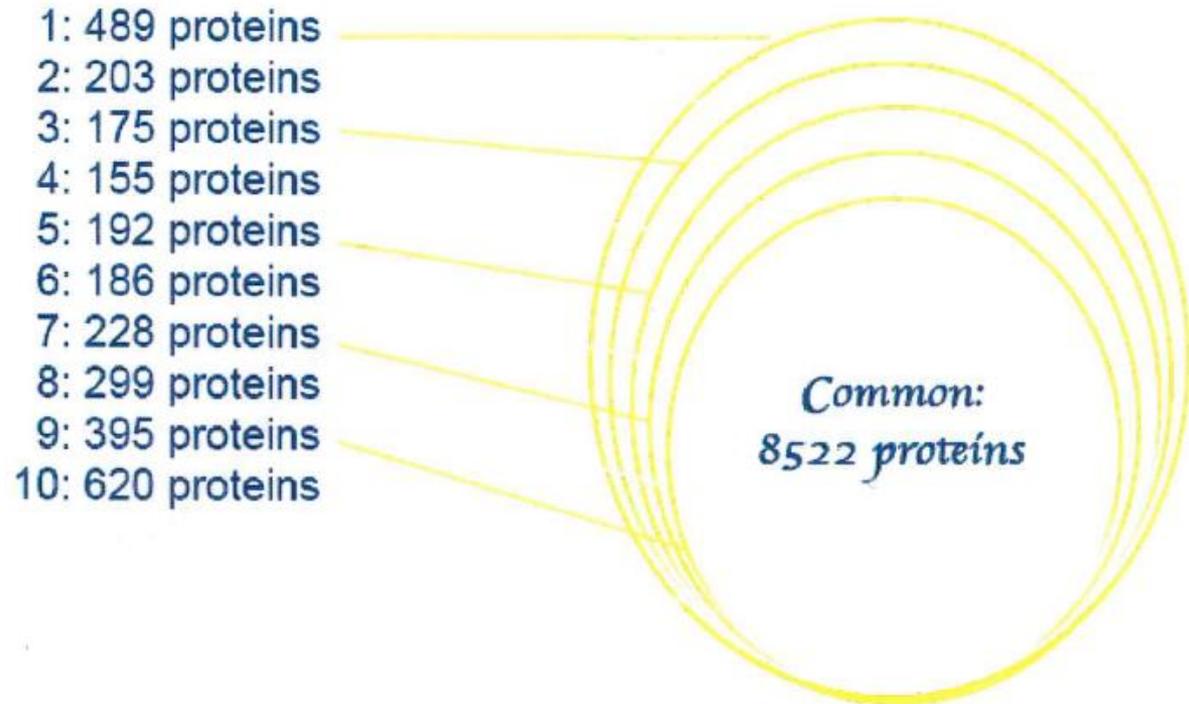
- Un unico strumento adatto per acidi nucleici, antigene-anticorpo, enzimi e interazione recettore-ligando...
- Analisi di **moltissimi campioni in contemporanea**.
- Flusso **velocissimo** (20000 microsfeere al secondo) che limita i tempi di analisi.
- Piccole quantità di campioni da usarsi, perché estremamente **sensibile**.
- Non è radioattivo.
- Ampi intervalli **quantitativi** di analisi.
- Permette lo studio di molecole presenti in fluidi complessi come: supernatanti da colture cellulari, plasma, siero....



# SVANTAGGI

**Soprattutto i costi elevati.**

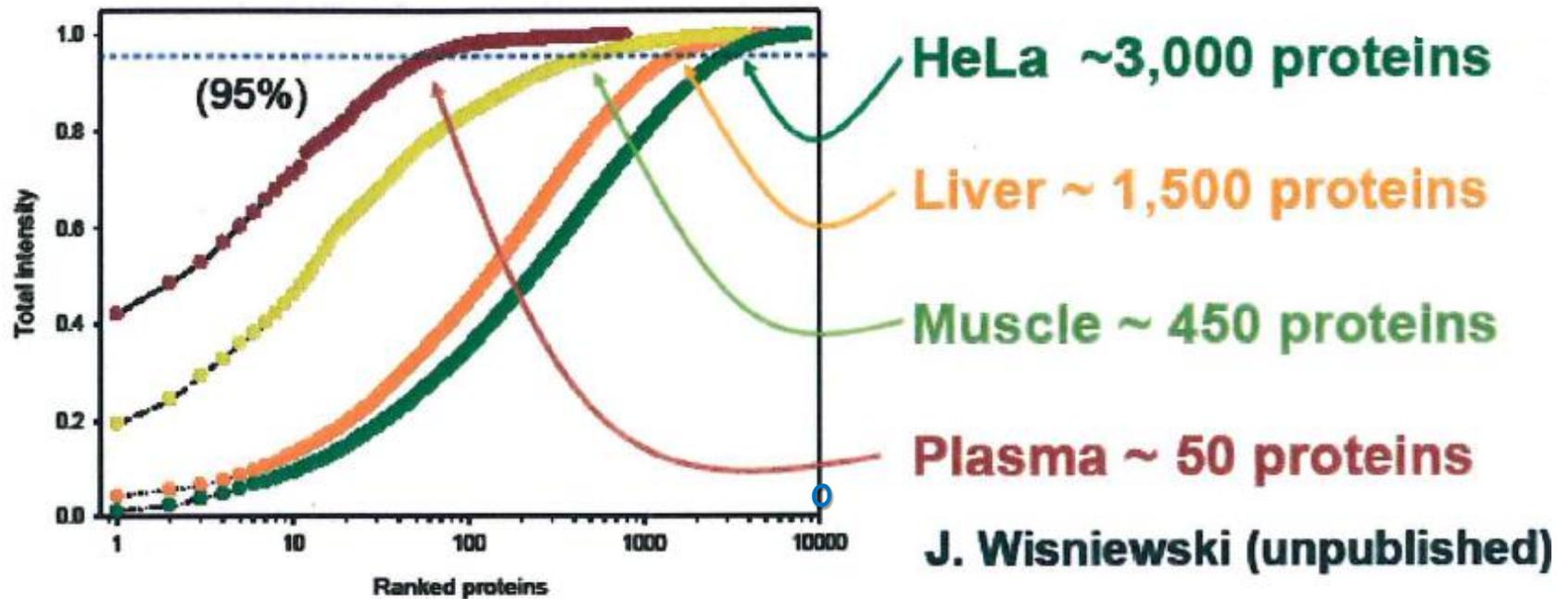
# Proteomica



Venn diagrams of the proteins identified in 10 different human cell lines. Each cell exhibited an average of 10,361 species, of which 8,522 proteins represented a common set and the remaining a set specific for each cell line, as indicated (Geiger, T.; Wehner, A.; Schaab, C.; Cox, J.; Mann, M., *Mol. Cell. Proteomics* 2012, 11.3, M111.014050).

OGGI: 14-15000 proteine espresse in ogni momento del ciclo cellulare. **Ne mancano circa 4000!**

# Limite della proteomica



Le proteine altamente abbondanti rappresentano la quasi totale massa proteica analizzata durante gli studi di proteomica.

Nuove strategie  
per arricchire  
campioni di proteine  
meno abbondanti:

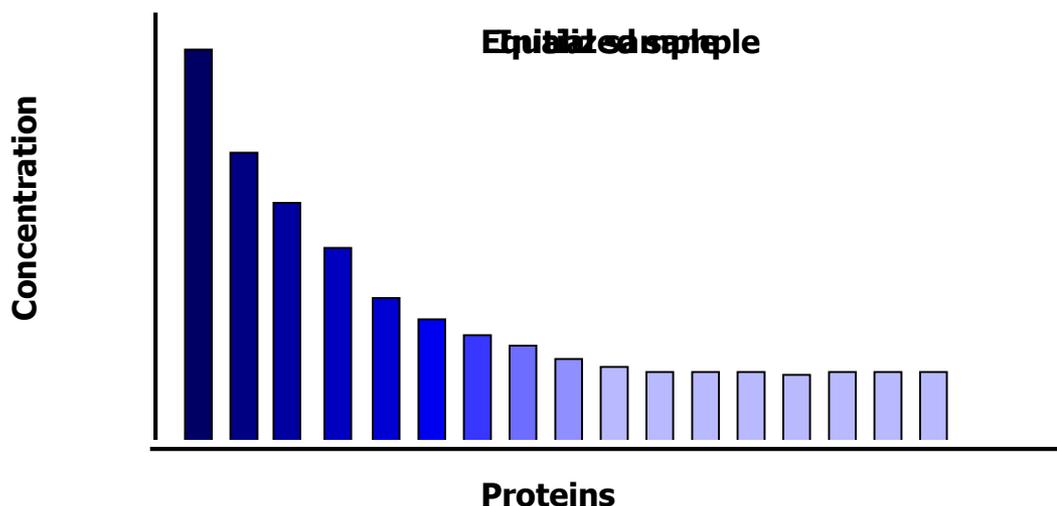


Pier Giorgio Righetti

PROTEOMINER

# ProteoMiner

Tecnologia che **riduce la complessità** dei campioni biologici riducendo il range dinamico del campione e portando il livello delle proteine meno abbondanti nel range di detection dell'applicazione, **senza ricorrere all'eliminazione selettiva di un gruppo di proteine.**



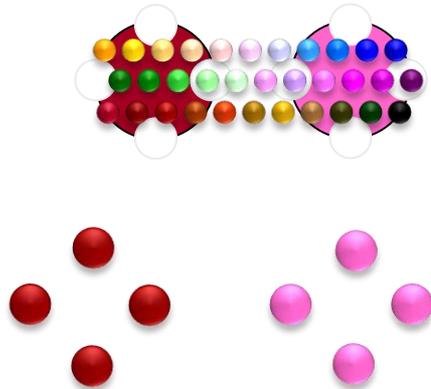
EQUALIZZAZIONE DI PROTEINE



# Principio

## CROMATOGRAFIA?

Libreria Combinatoria

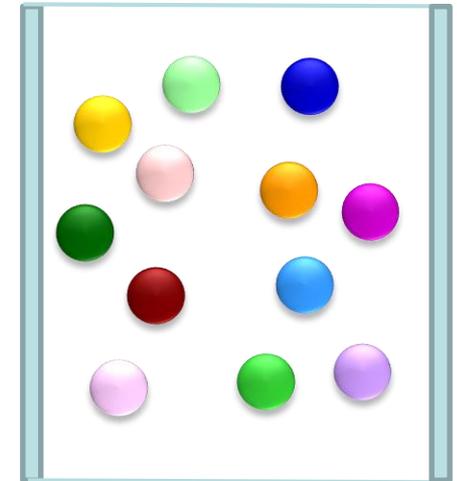
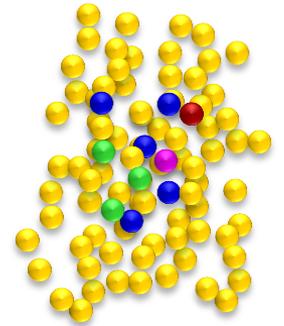


Legame campione-libreria

Lavaggio dell'eccesso di  
proteine non legate

Eluizione campione  
equalizzato

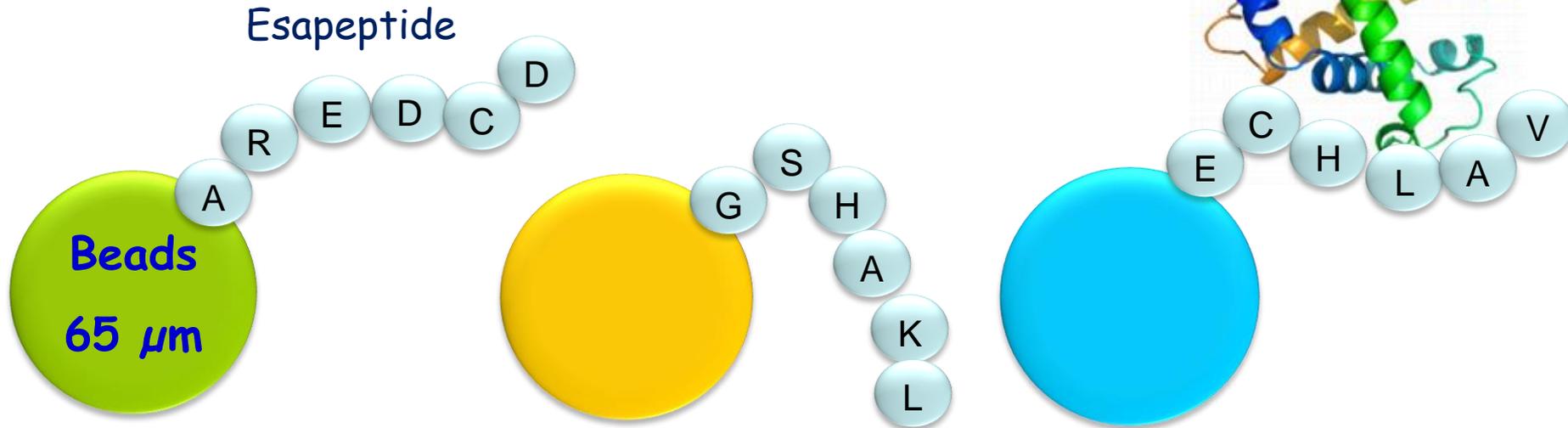
94 Gialle  
5 Blu  
3 Verdi  
1 Rossa  
1 Rosa



4 Gialle  
4 Blu  
3 Verdi  
1 Rossa  
1 Rosa

- Ogni biglia può legare **un solo tipo di proteina**, o un complesso di proteine.
- Grazie a un elevato numero di combinazioni, ci sarà una biglia per ciascuna proteina nella miscela.

# Esapeptidi



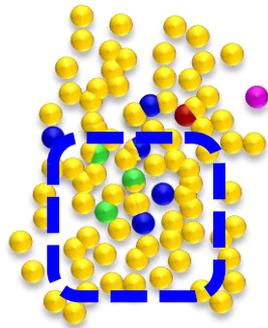
Ogni esapeptide è caratterizzato da una delle  $20^6$  (64 milioni) possibili combinazioni.

Un esapeptide può legarsi specificamente a una proteina attraverso **legami non covalenti**.

Le biglie sono mischiate in quantità **equimolari**: un numero limitato di biglie permette di **concentrare le proteine più rare** e **contemporaneamente di diluire le più abbondanti**.

# Principio: tutto si basa sulla concentrazione

Prima



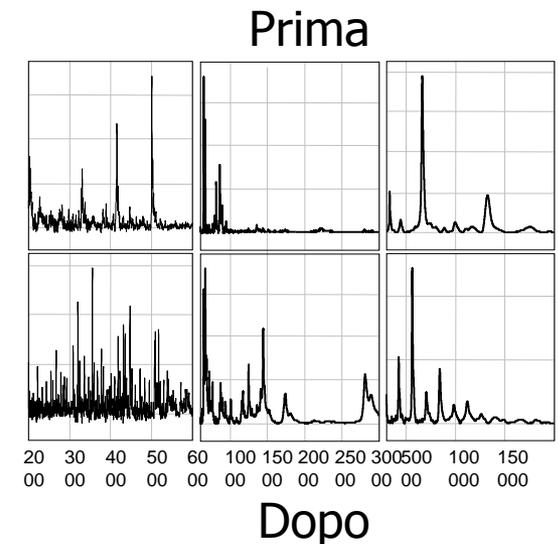
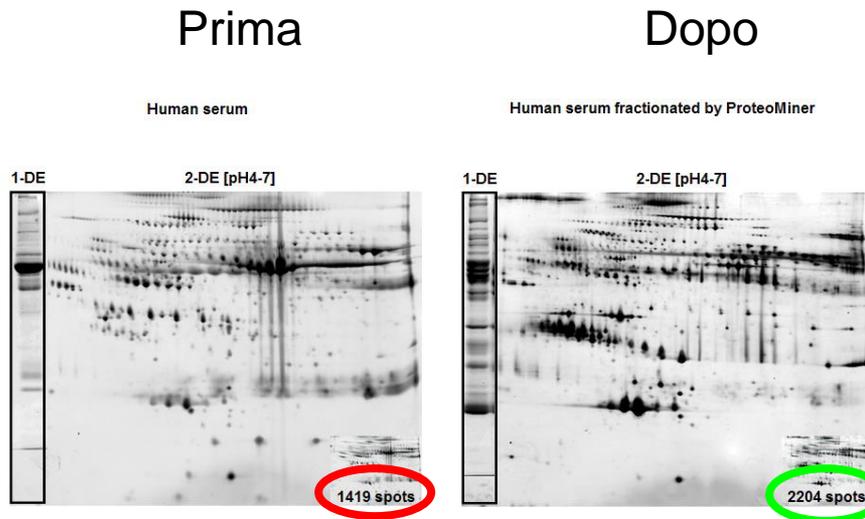
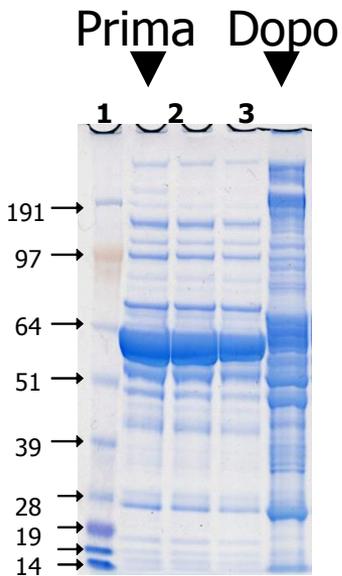
Dopo



Con l'equalizzazione non solo cambiano i rapporti relativi, ma anche le **concentrazioni**.

# Vantaggi dell'equalizzazione

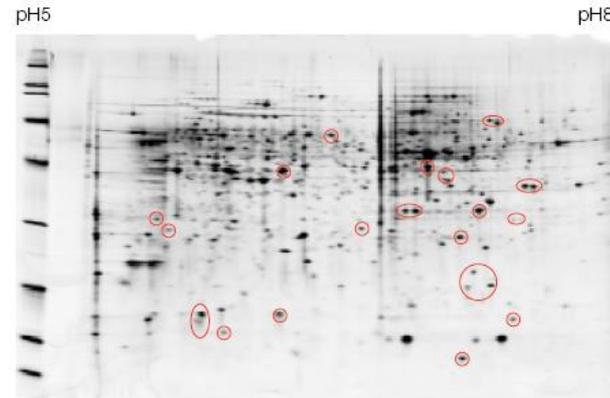
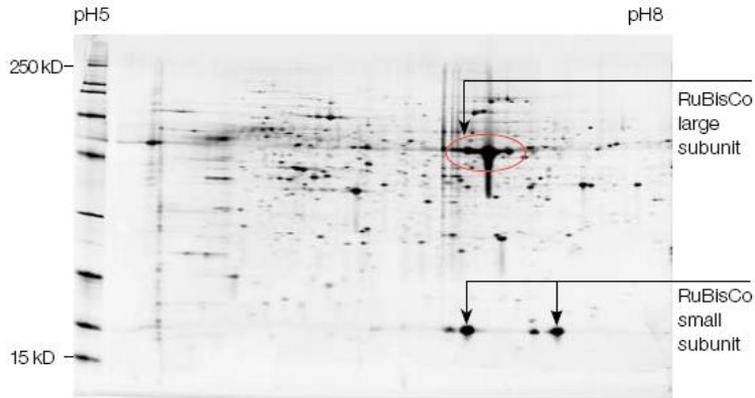
Gli studi di performance dei kit si sono basati soprattutto sull'analisi elettroforetica **mono- e bidimensionale** e sull'analisi per massa.



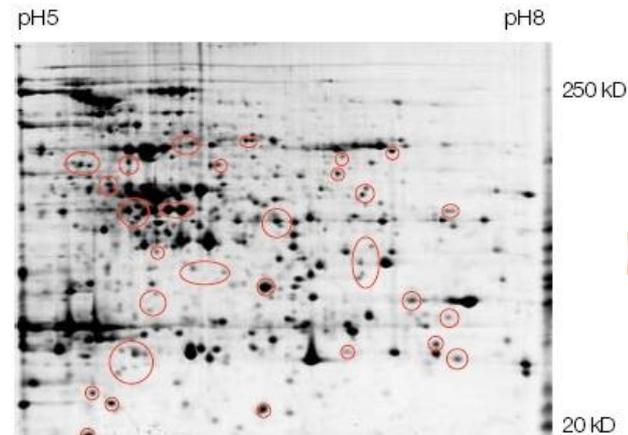
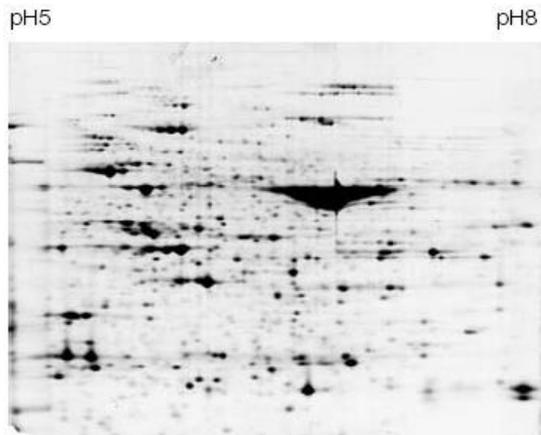
# Effetti dell'equalizzazione

Non Trattato

Trattato



Condizioni Native



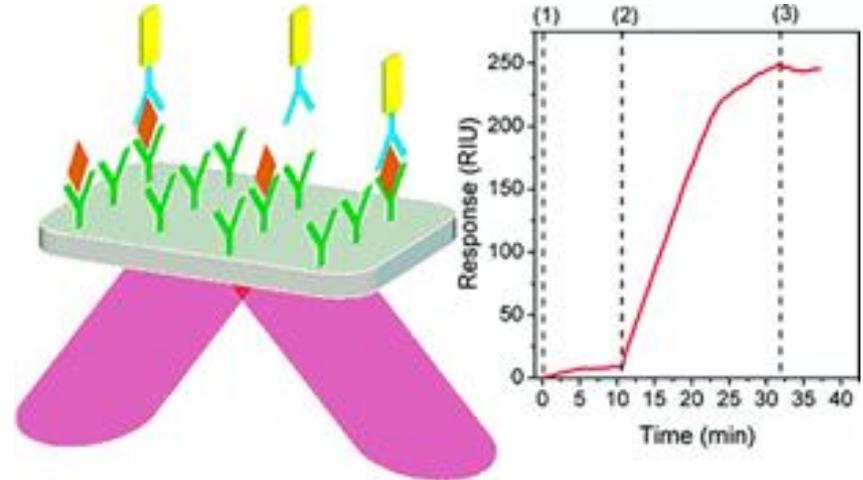
Condizioni Denaturanti

2D Analysis of Leaf Protein Sample Treated with ProteoMiner Beads Under Denaturing and Non denaturing Condition.

# Applicazioni del ProteoMiner

- La tecnologia dei ProteoMiner è stata sviluppata per:
  - Campioni di **Siero** e di **Plasma**
  - Campioni con una concentrazione proteica di partenza > di 50 mg/ml.
  - Mantenendo il rapporto campione: **beads di 1:10** (100 ml di beads per 1 ml di campione).
- Dal 2010 in poi sono stati messi a punto:
  - Protocolli alternativi per campioni vegetali, estratti cellulari, surnatante di colture cellulari, liquor, etc.
  - Nuovi kit (Small capacity kit) per campioni con quantità inferiori di proteine.

# BIOSENSORE



<http://biosensingusa.com/>

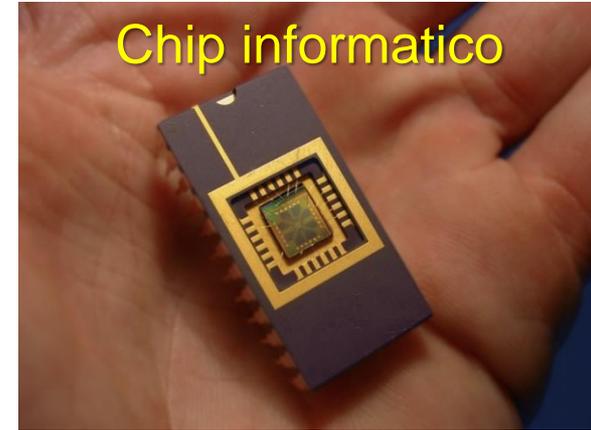
# BIOSENSORE

## Definizione IUPAC

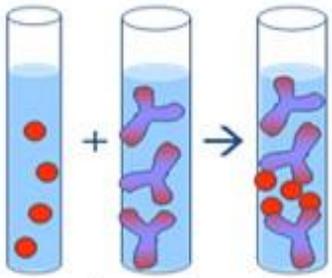
"un biosensore è un dispositivo di misura che utilizza molecole biologicamente attive, o tessuti, o cellule (o parti di essi) quali superfici sensibili di un biotrasduttore che trasformi l'informazione chimica data dalla concentrazione di un componente specifico del campione in analisi, in un segnale utile analiticamente. L'interazione specifica fra (macro)molecole è alla base del corretto funzionamento di un biosensore".

I biosensori rilevano interazioni fra  
(macro)molecole biologiche.

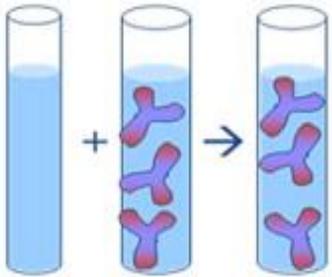
# BIOSENSORE SPR



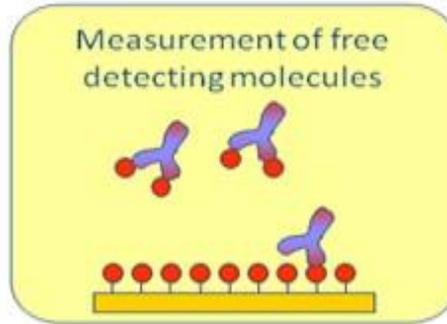
● Analyte  
Y Detecting molecule



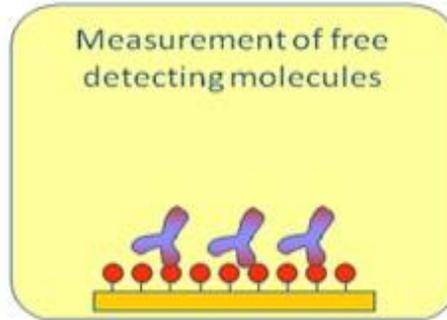
Sample with analyte



Sample without analyte



Low signal



High signal

**BIOSENSORE ottico:**

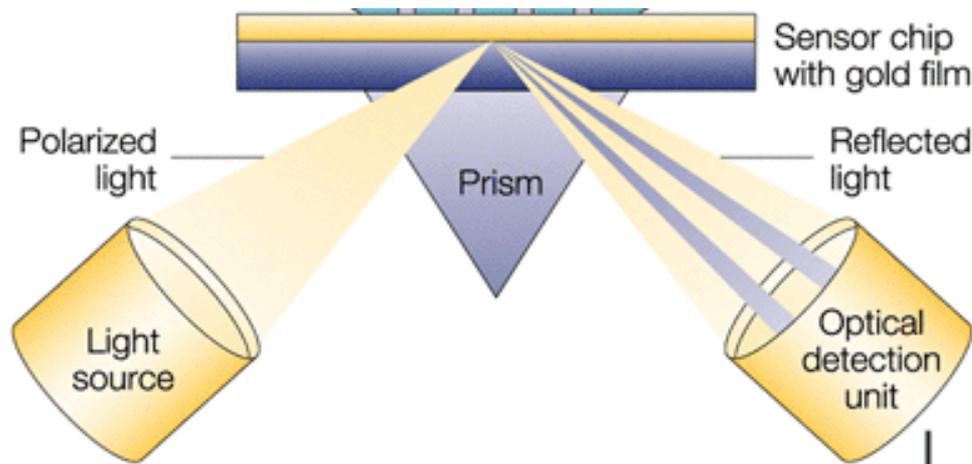
supporto dielettrico (vetro)

+

film metallico (Ag o Au)

# SPETTROSCOPIA DI RISONANZA PLASMONICA DI SUPERFICIE (SPR o PLASMON RESONANCE)

Utilizzata per studiare l'**interazione** fra 2 molecole biologiche: fra acidi nucleici, fra proteine, proteina-DNA, farmaco-bersaglio, **senza il bisogno di marcarle**.



## **BIOSENSORE ottico:**

supporto dielettrico (vetro)  
+ film metallico (Ag o Au).

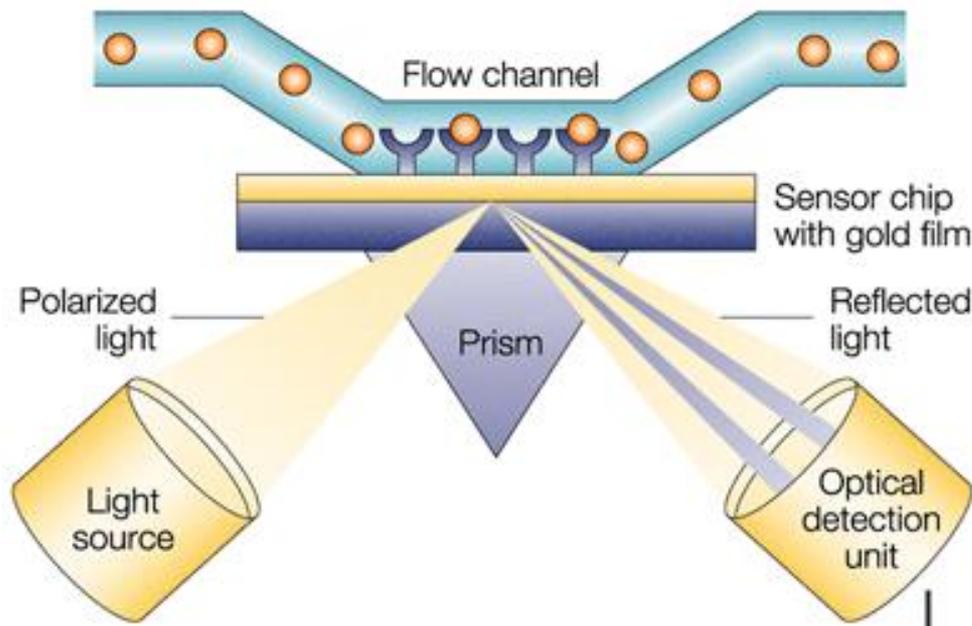
Prisma

Generatore di onde EM  
polarizzate

Detector

# SPETTROSCOPIA DI RISONANZA PLASMONICA DI SUPERFICIE (SPR o PLASMON RESONANCE)

Utilizzata per studiare l'**interazione** fra 2 molecole biologiche: fra acidi nucleici, fra proteine, proteina-DNA, farmaco-bersaglio, **senza il bisogno di marcarle**.



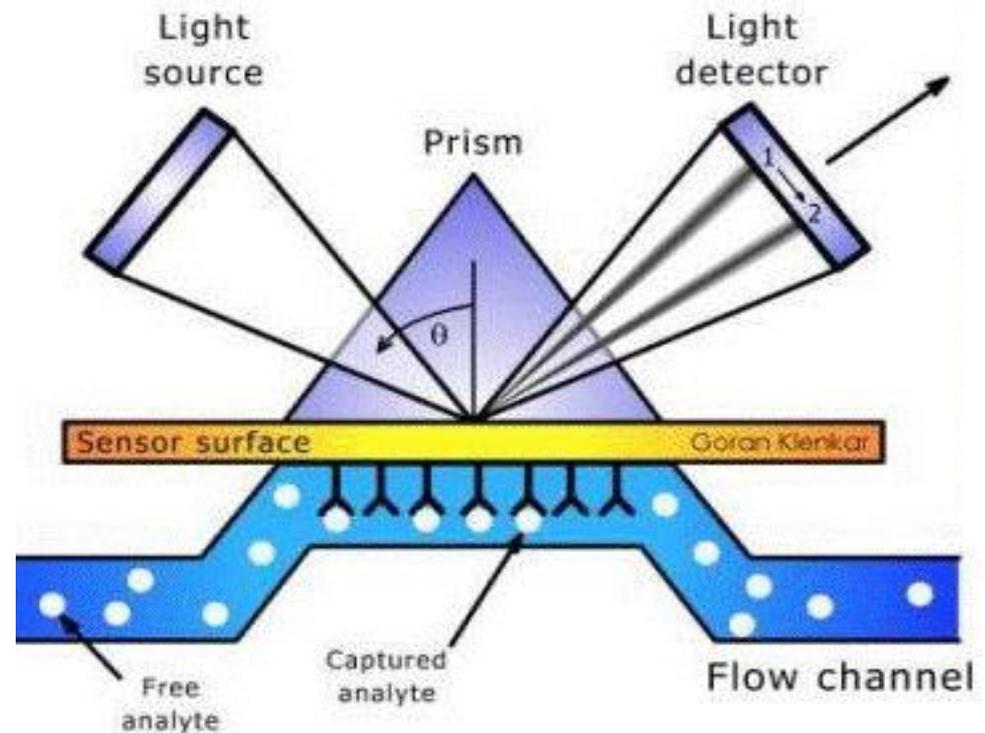
Immobilizzazione di una molecola sulla superficie metallica  
(es. 1-5 ng/mm<sup>2</sup> di proteina).

I campioni vengono fatti scorrere sul sensore con un sistema microfluidico.

# PRINCIPIO APPLICATIVO DELLA SPR

Velocità di flusso, pH, T, forza ionica...CONTROLLATE.

L'aumento di massa sulla superficie del biosensore in seguito al legame fra due molecole viene rilevato dallo strumento come **variazione dell'indice di rifrazione del mezzo.**

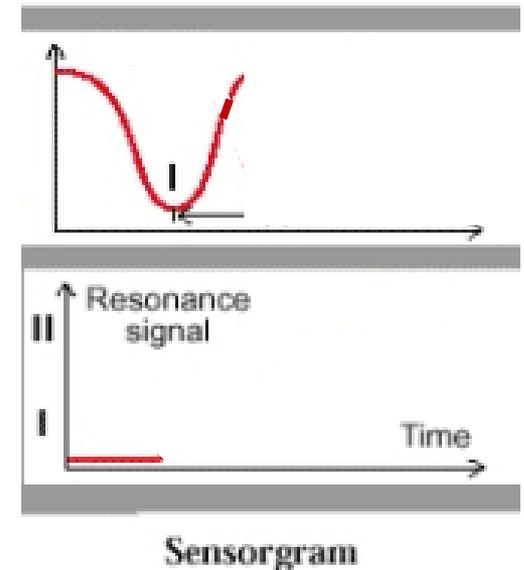
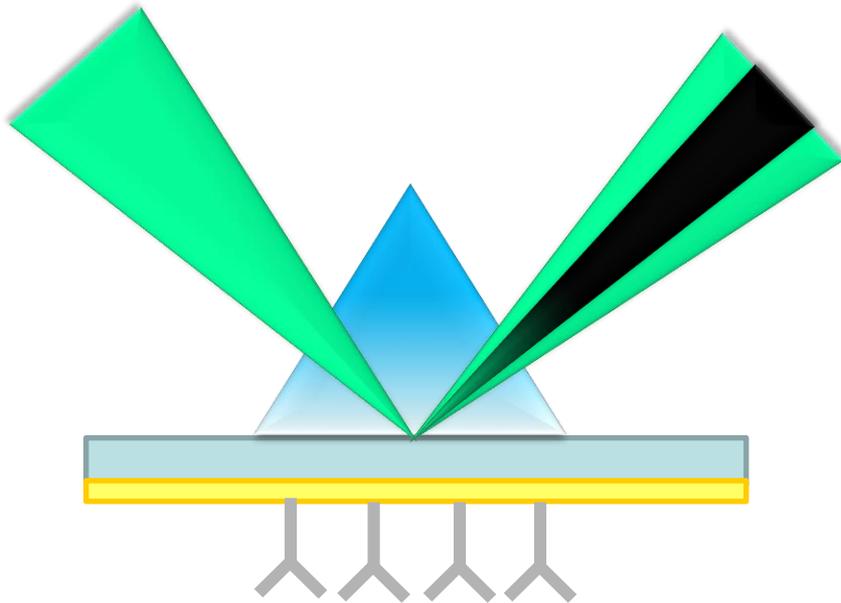


Tale variazione è **proporzionale** alla quantità di molecole che si legano.

# DETTAGLI SUL PRINCIPIO

Un raggio di **luce polarizzata** all'interfaccia prisma-biosensore subisce riflessione totale. Parte della radiazione EM riflessa viene assorbita dal metallo (**onda di campo evanescente**).

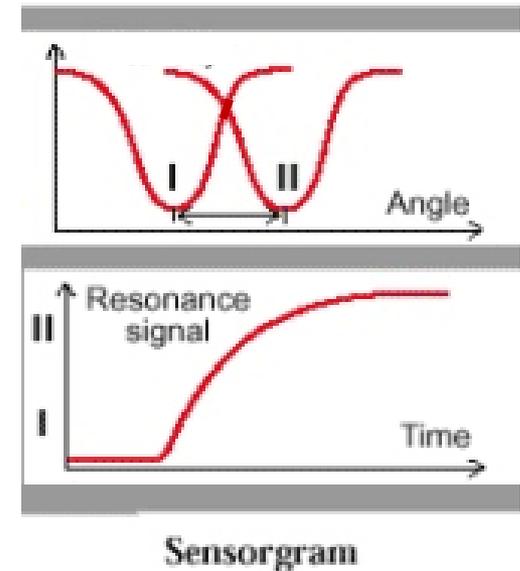
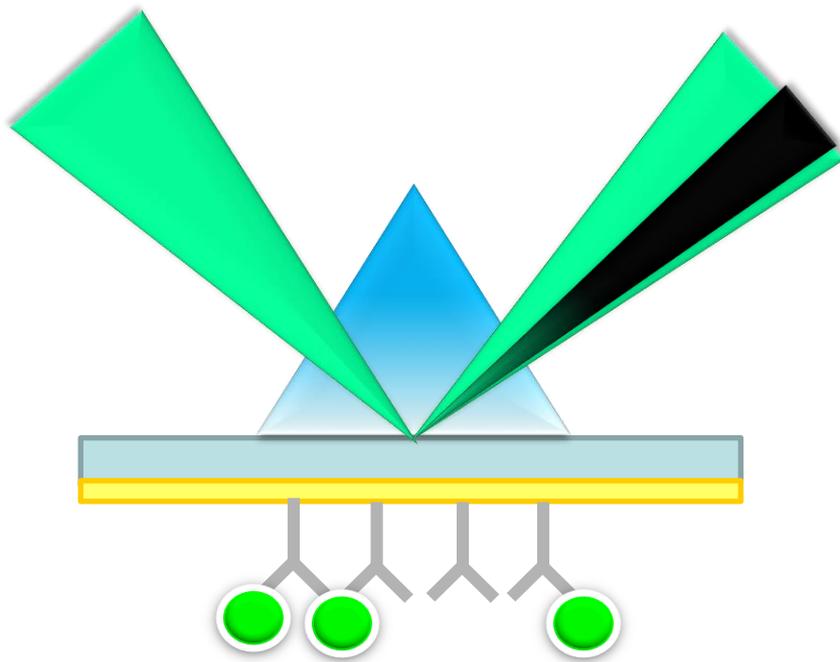
All'interfaccia fra i 2 mezzi vi è il metallo la cui nuvola di **e<sup>-</sup>** entra in **risonanza** con l'onda evanescente.



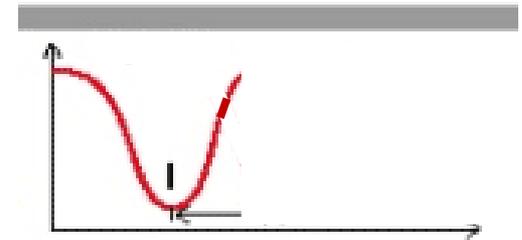
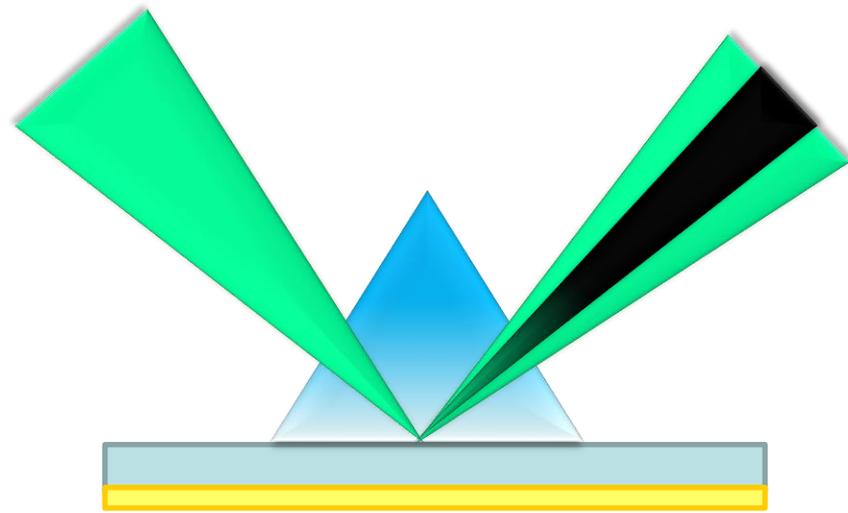
La risonanza **diminuisce l'intensità** della luce riflessa, misurata dallo strumento. Si ha cioè una **riflettanza totale attenuata (ATR)**.

# EFFETTO DI UNA INTERAZIONE

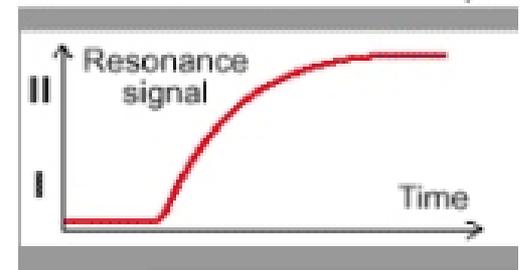
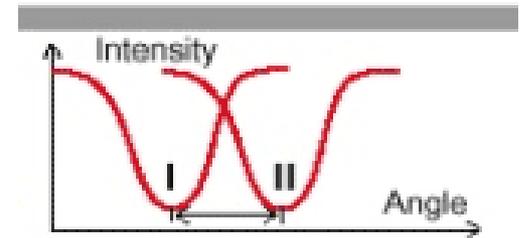
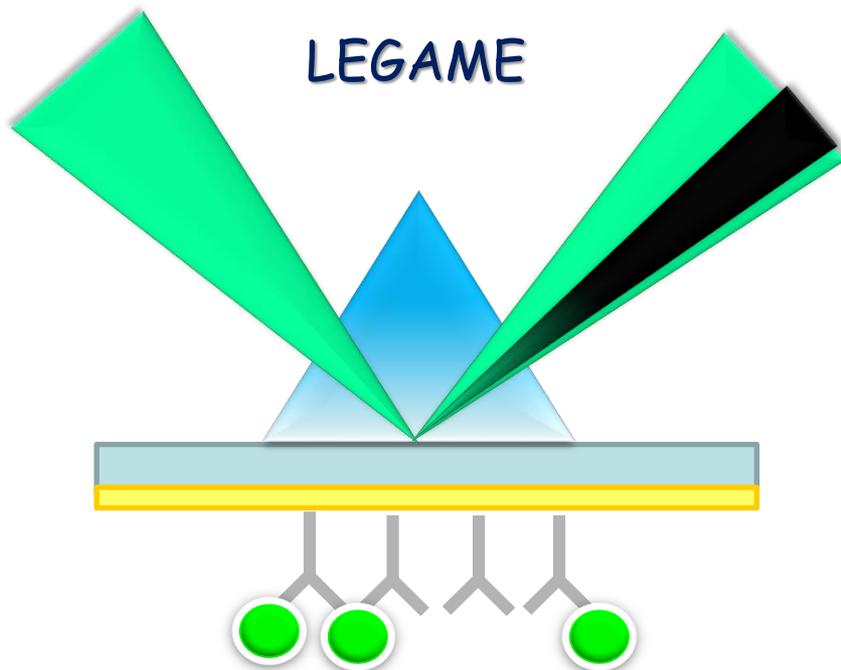
All'aggiunta della **2<sup>a</sup> molecola** in soluzione (un ligando), se avviene il riconoscimento, si forma il complesso. Ciò modifica le proprietà dell'onda evanescente, cioè l'**indice di rifrazione del mezzo**, nell'immediata vicinanza della superficie del chip e con esso l'angolo a cui si ha ATR.



# RILEVAZIONE DEL LEGAME

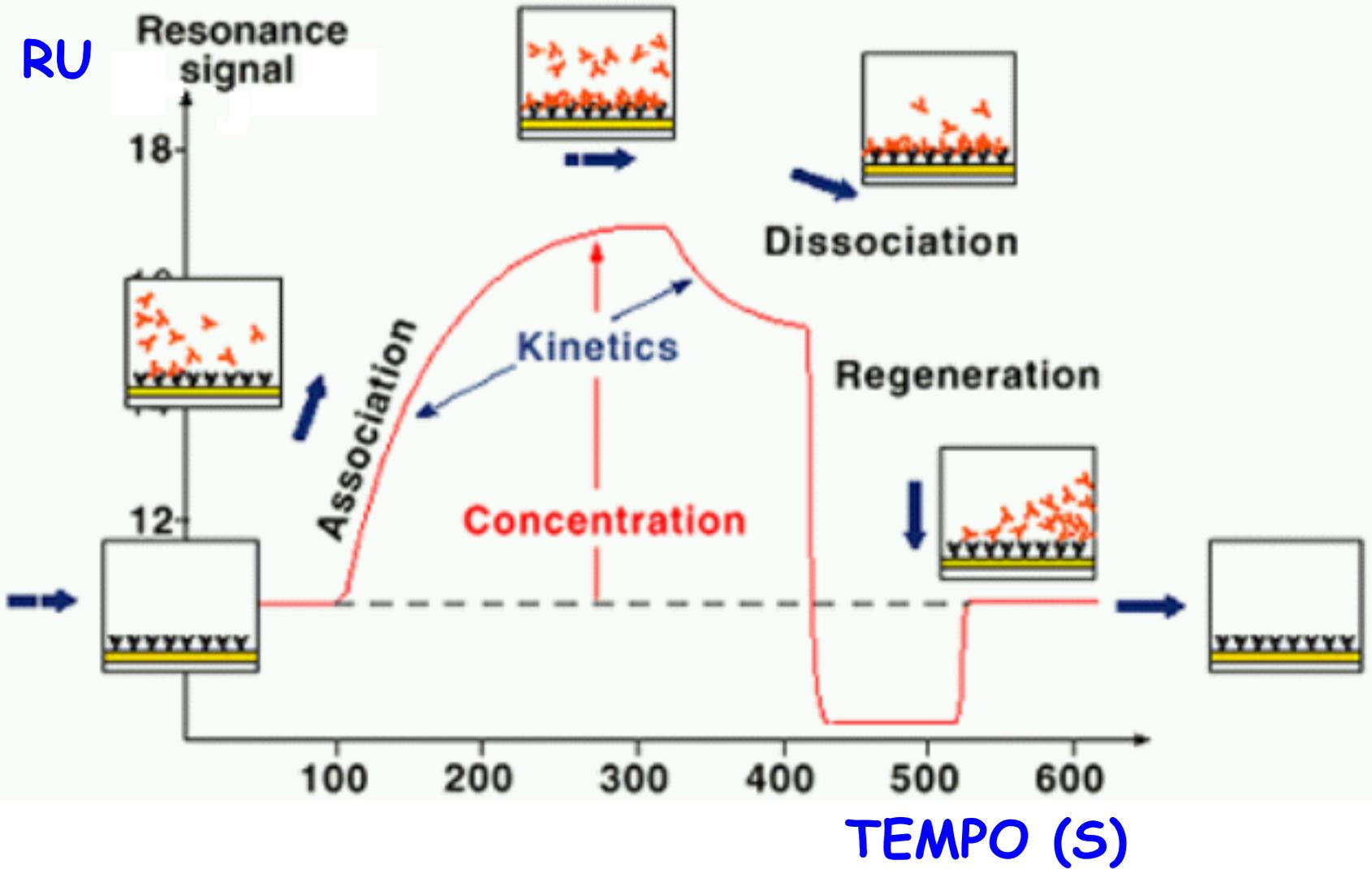


Sensorgram

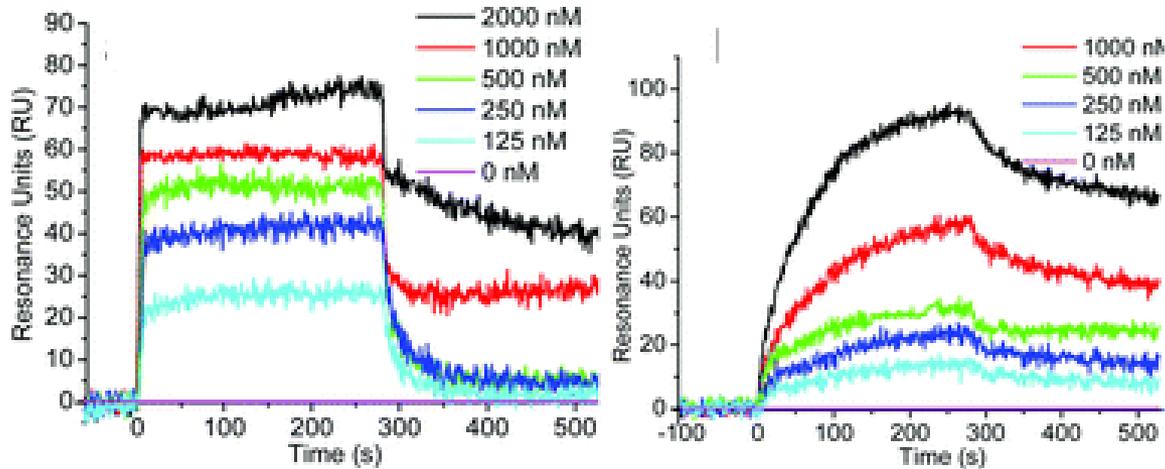


Sensorgram

# SENSORGRAMMA



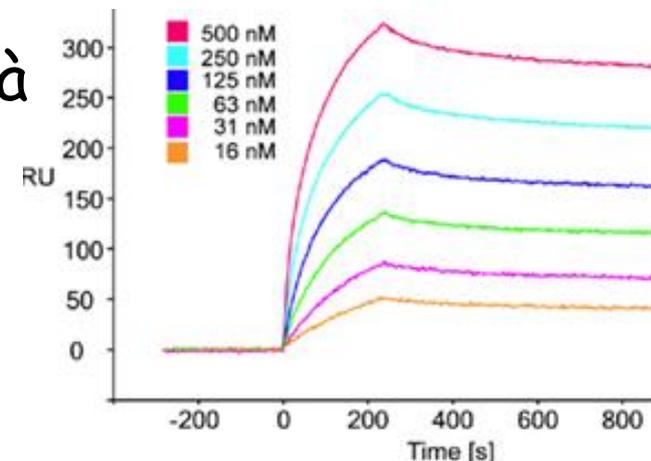
# SENSORGRAMMI REALI



Vengono in genere effettuate più misurazioni a varie concentrazioni.

Utilizzabile per:

- misure di affinità-cinetiche-specificità di legame.
- Caratterizzazione di farmaci.
- Selezione di Ab (es. monoclonali).
- "Pesca" di ligandi.



# VANTAGGI DEL BIOSENSORE

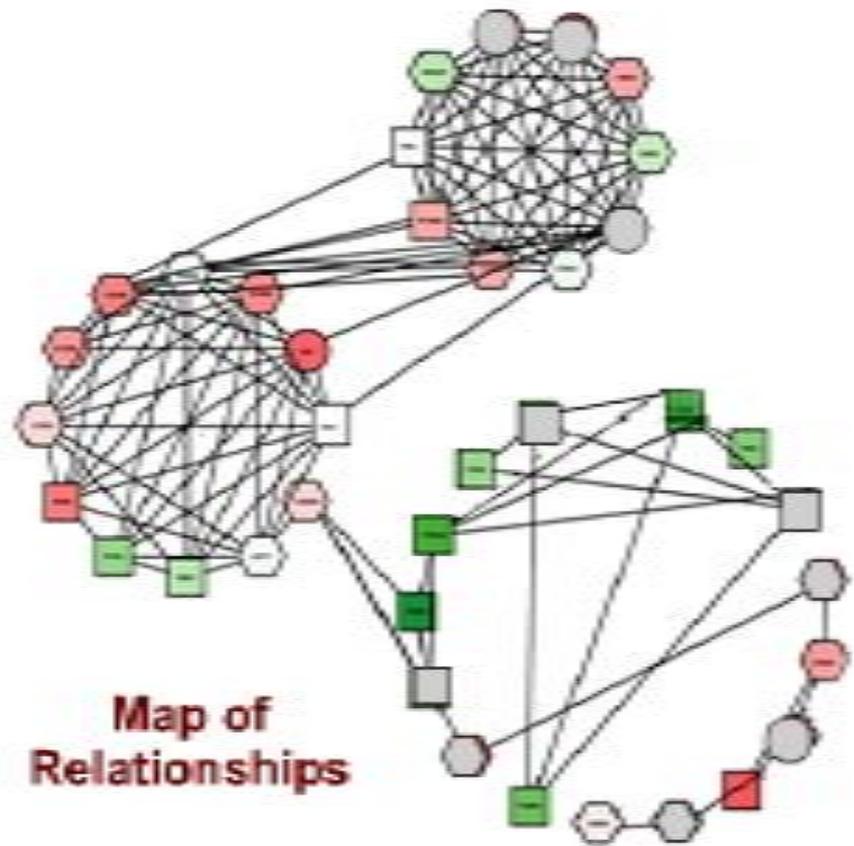
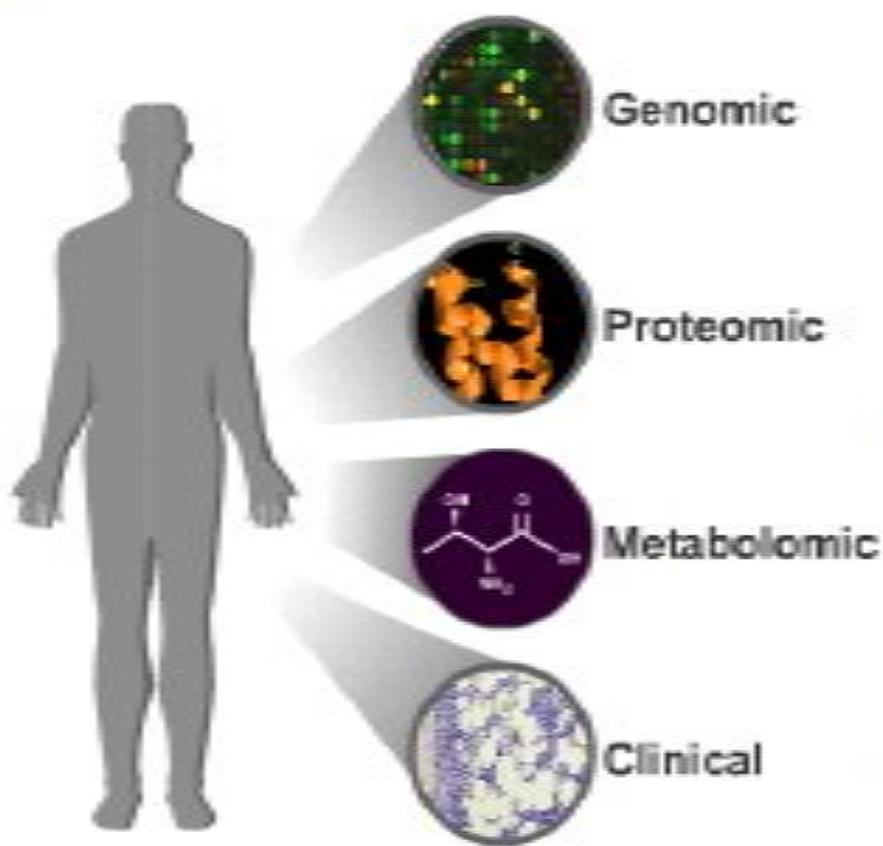
**Quantità** ridotta di campione necessaria per l'analisi.

Rilevazione in **tempo reale** del legame e della dissociazione fra 2 molecole, con parametri cinetici quantitativi.

Analisi assoluta, senza marker e **rapidissima**.

Possibilità di **recuperare** il campione studiato.





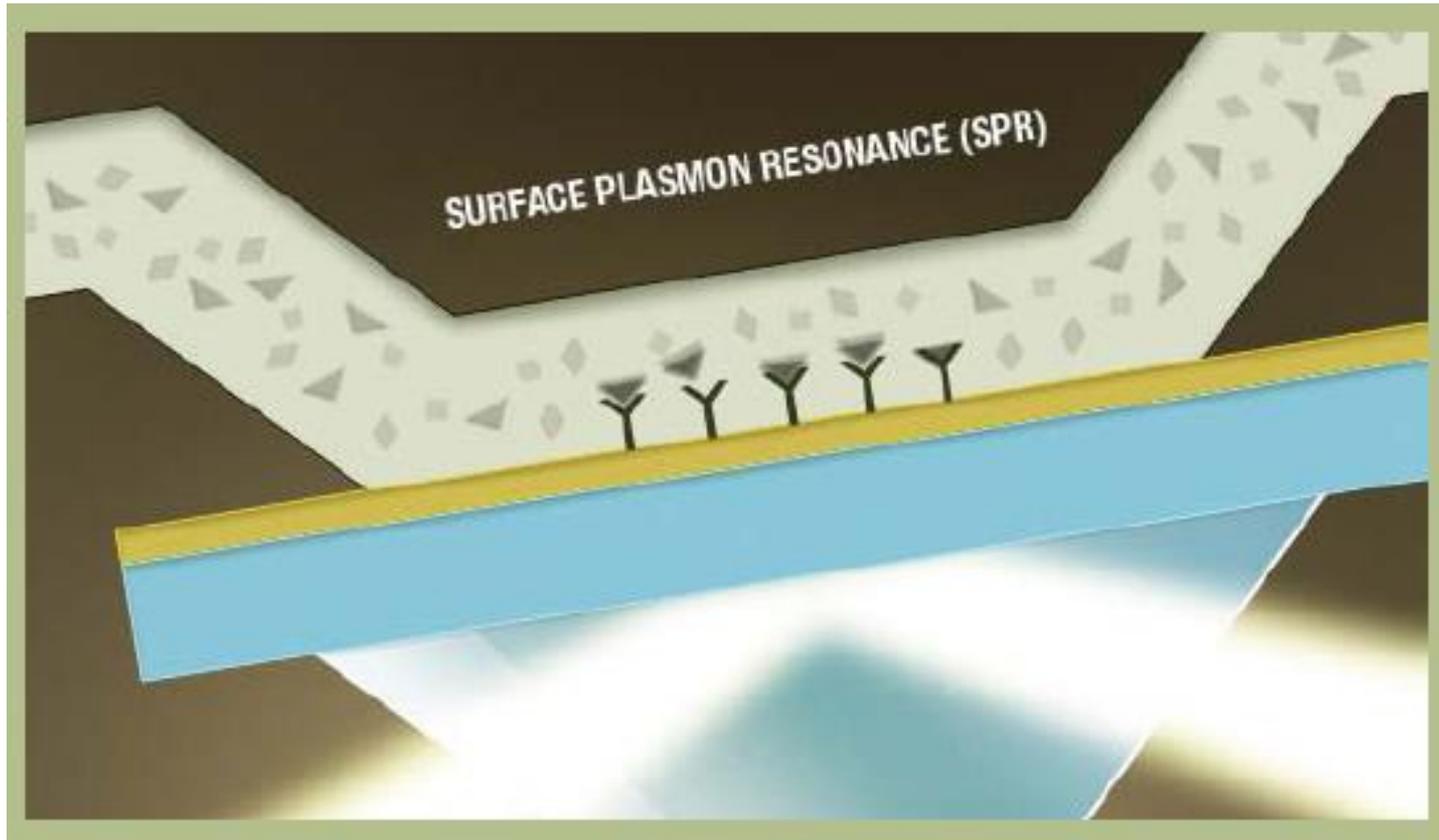
**NECESSITA' DI STUDIARE  
INTERAZIONI MULTIPLE**

# NUOVO BIOSENSORE: ProteOn XPR36



# NUOVO BIOSENSORE: ProteOn XPR36

## Biosensore ottico (SPR)



L'interazione che vedo è singola o fa parte di una **rete di interazioni**?

# POTENZIALITA' DEL ProteOn XPR36

Evoluzione del biosensore; permette l'analisi simultanea dell'**interazione** di **36 campioni** alla volta.



Interazione **in parallelo**  
di **6 ligandi con 6 analiti.**

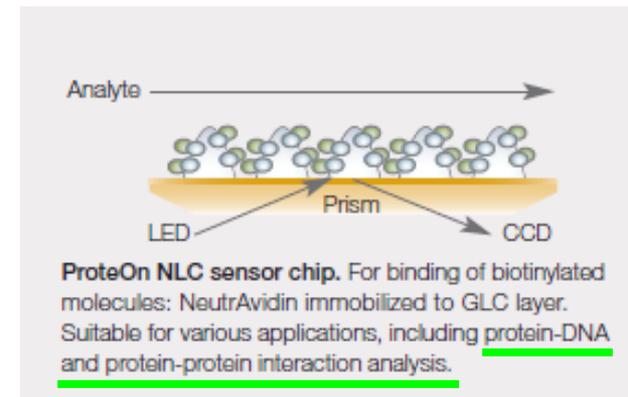
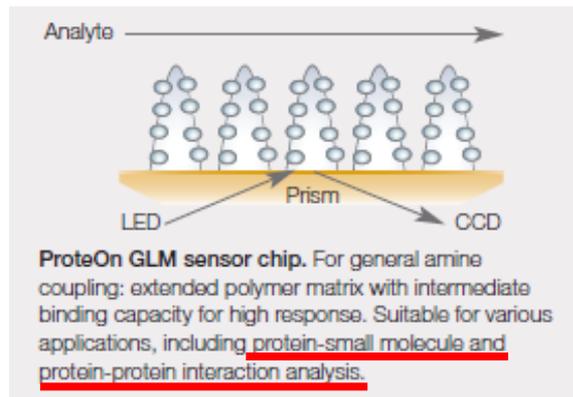
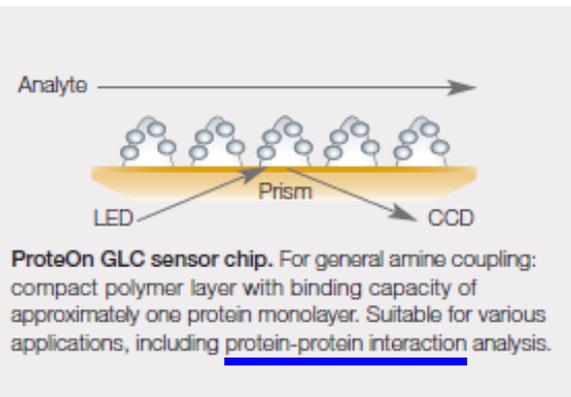


# NEW BIOSENSOR: ProteOn XPR36

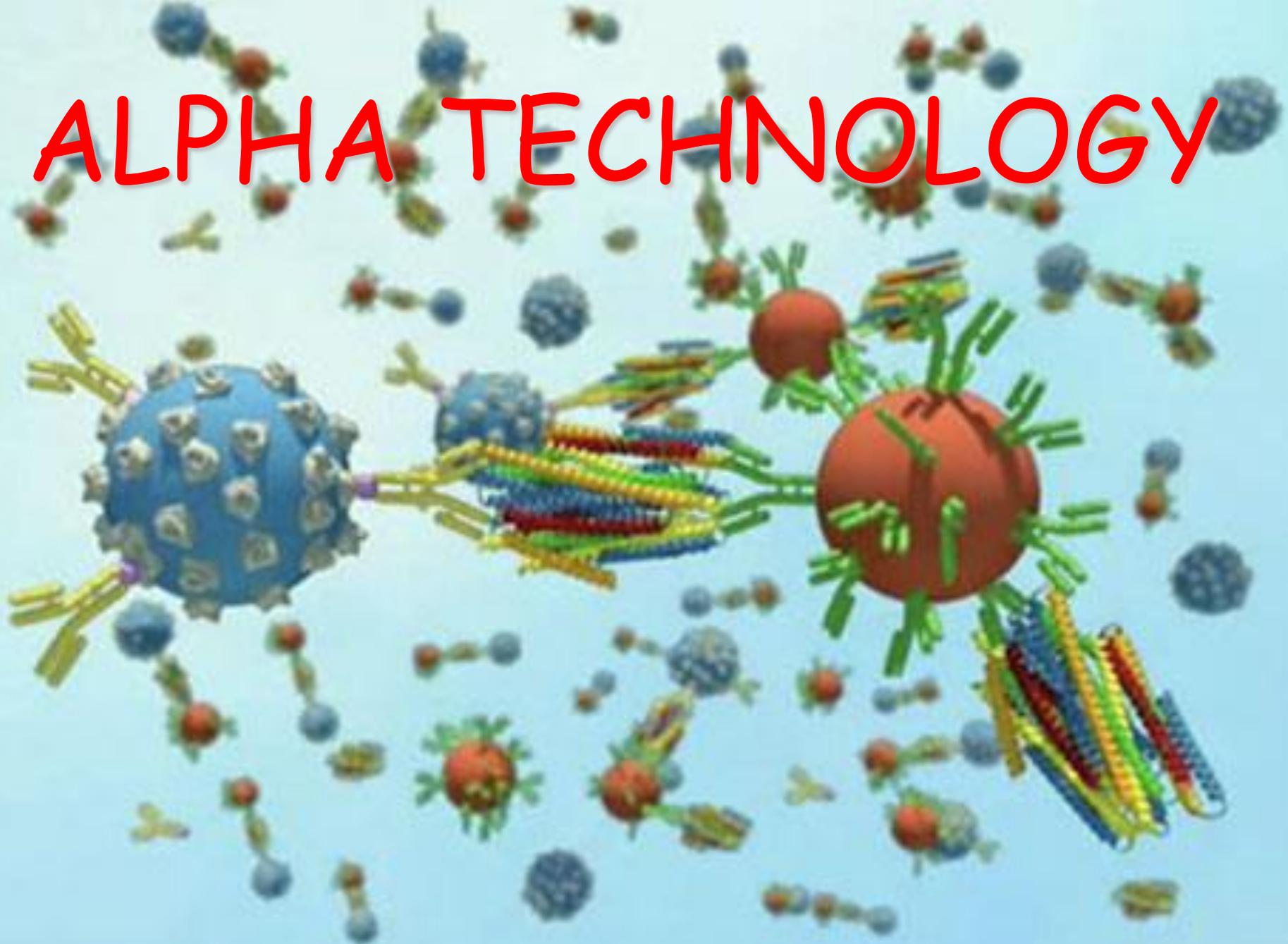
In un singolo chip si possono testare fino a **180 interazioni all'ora**.



Controllo della T, del pH e della forza ionica.



# ALPHA TECHNOLOGY



Ullman, E. F., Kirakossian, H., Singh, S., Wu, Z. P., Irvin, B. R., Pease, J. S., Switchenko, A. C., Irvine, J. D., Dafforn, A., Skold, C. N. & et al. (1994). Luminescent oxygen channeling immunoassay: measurement of particle binding kinetics by chemiluminescence. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 5426-30.

# ALPHA TECHNOLOGY

*(Amplified luminescent proximity homogeneous assay)*

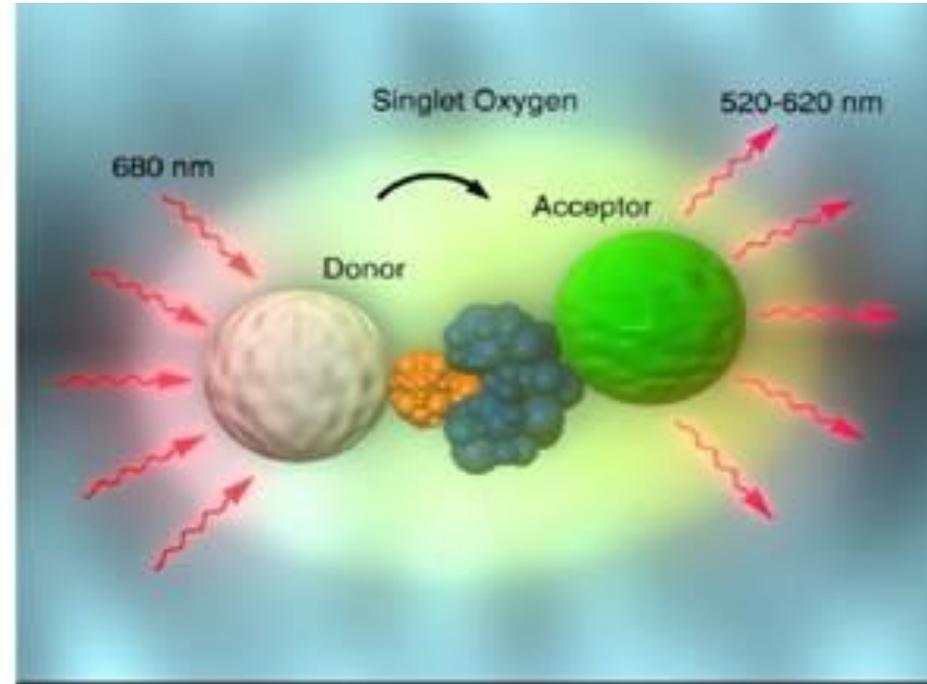
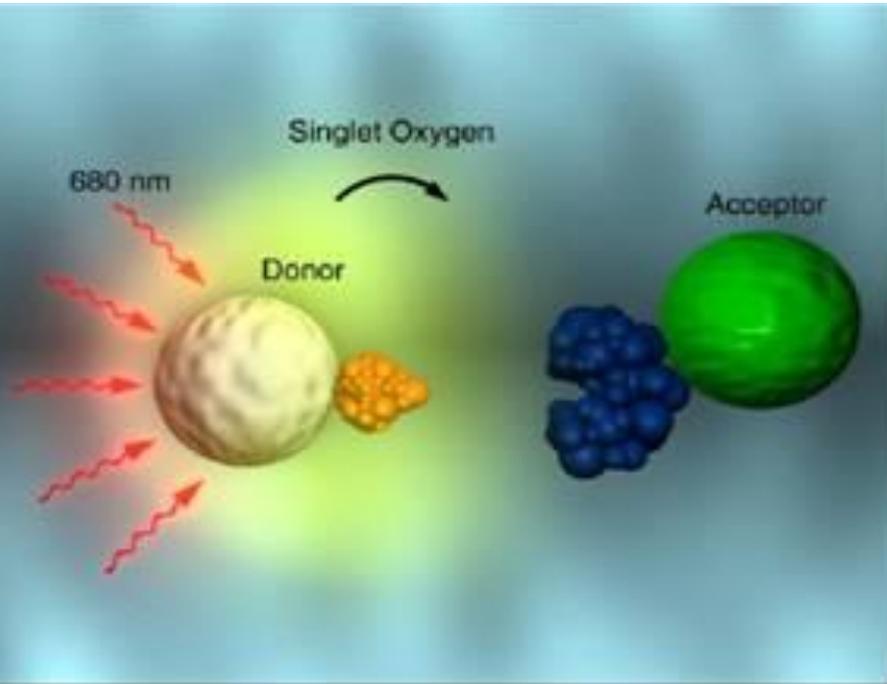
- Metodo basato sulla **luminescenza**.
- Utilizzabile per lo studio di interazioni.
- Elevata sensibilità.
- **Privo di lavaggi** (e perdita di campione)



**Avviene tutto  
in soluzione**

# ALPHA TECHNOLOGY

*(Amplified luminescent proximity homogeneous assay)*



Tecnica basata su biglie!

# ALPHA TECHNOLOGY

(Amplified luminescent proximity homogeneous assay)

**Biglie** di latex ricoperte da idrogel e funzionalizzate con vari gruppi chimici per consentire il legame di molecole di diversa natura.

Biglie



Proteominer

65  $\mu\text{m}$

FMAT

6-20  $\mu\text{m}$

Scintillation Proximity Assay

2-10  $\mu\text{m}$

Bioplex

5,6  $\mu\text{m}$

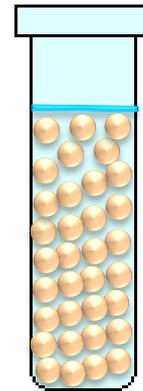
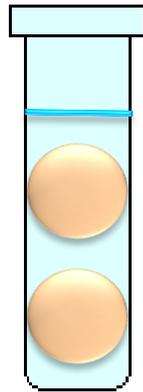
Dynabeads

1  $\mu\text{m}$

Alpha

250 nm

A PARITA' DI VOLUME,  
DOVE HO PIU' SUPERFICIE?



# RAPPORTO SUPERFICIE E VOLUME



$$A = 4 \times \pi \times r \times r$$

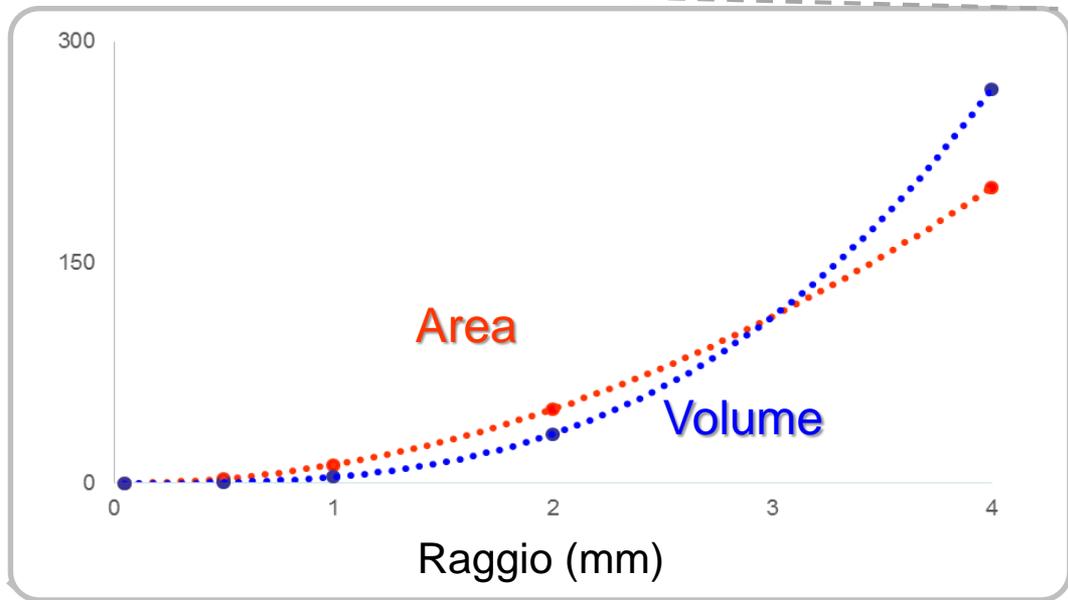
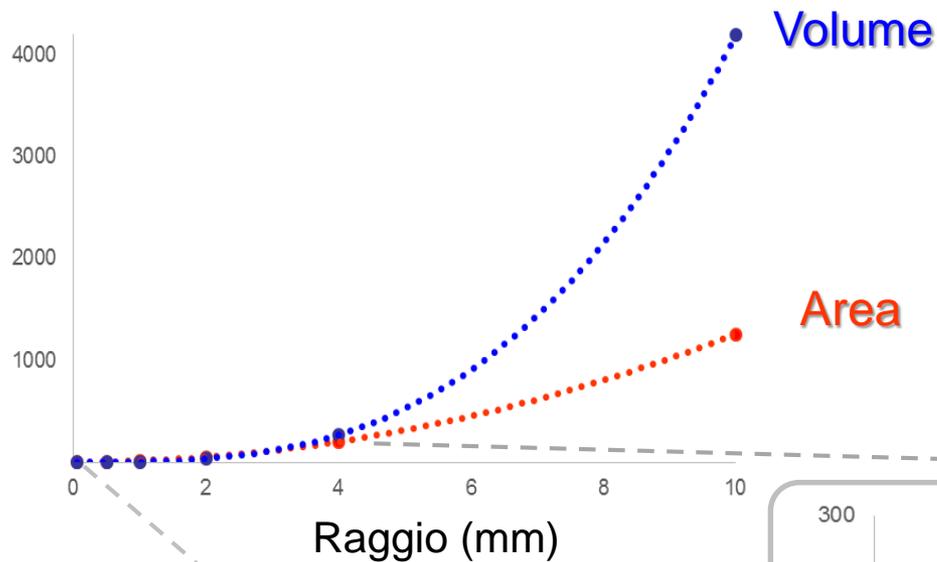
$$V = \frac{4 \times \pi \times r \times r \times r}{3}$$



<b>Raggio</b>	(mm)
<b>Area</b>	(mm <sup>2</sup> )
<b>Volume</b>	(mm <sup>3</sup> )

<b>r = 1</b>	<b>r = 2</b>	<b>r = 4</b>	<b>r = 10</b>	<b>r = 100</b>	<b>r = 5000</b>
12,6	50,3	201,1	1257	125664	314159265
4,2	33,5	268,1	4189	4188790	523598775598

# RAPPORTO SUPERFICIE E VOLUME

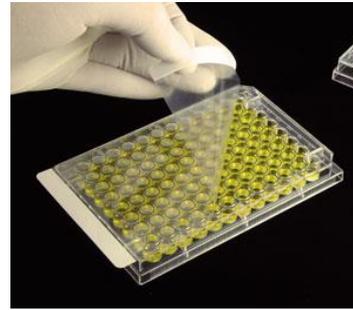
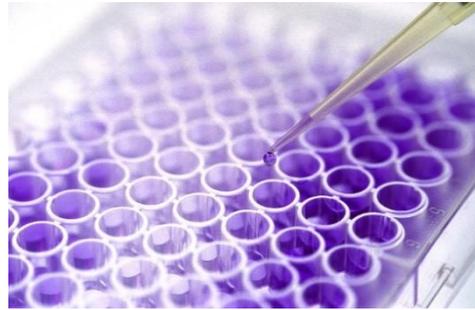


Raggio	(mm)	r = 0,05	r = 0,5	r = 1	r = 2	r = 4	r = 10	r = 100	r = 5000
Area	(mm <sup>2</sup> )	0,031	3,14	12,6	50,3	201,1	1257	125664	314159265
Volume	(mm <sup>3</sup> )	0,00052	0,52	4,2	33,5	268,1	4189	4188790	523598775598

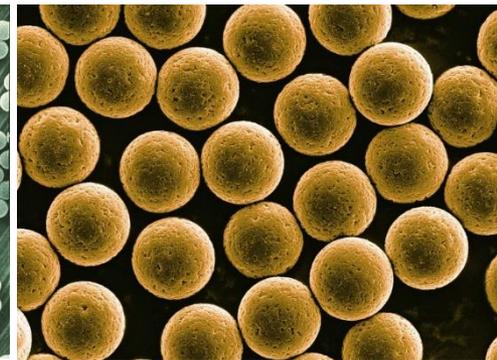
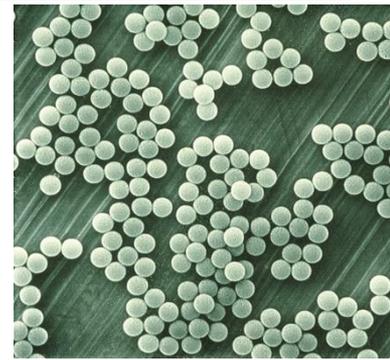
# PASSATO



# PRESENTE



# FUTURO



L → mL →  $\mu$ L

cm → mm →  $\mu$ m

# ALPHA TECHNOLOGY

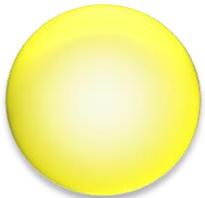
*Biglie utilizzate*

Nel saggio si utilizzano 2 tipi di biglie:

Donor



Contiene un fotosensibilizzatore (**ftalocianina**) che può convertir l'O<sub>2</sub> ambientale (disciolto) in una forma eccitata, il singoletto d'ossigeno (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>).



Acceptor

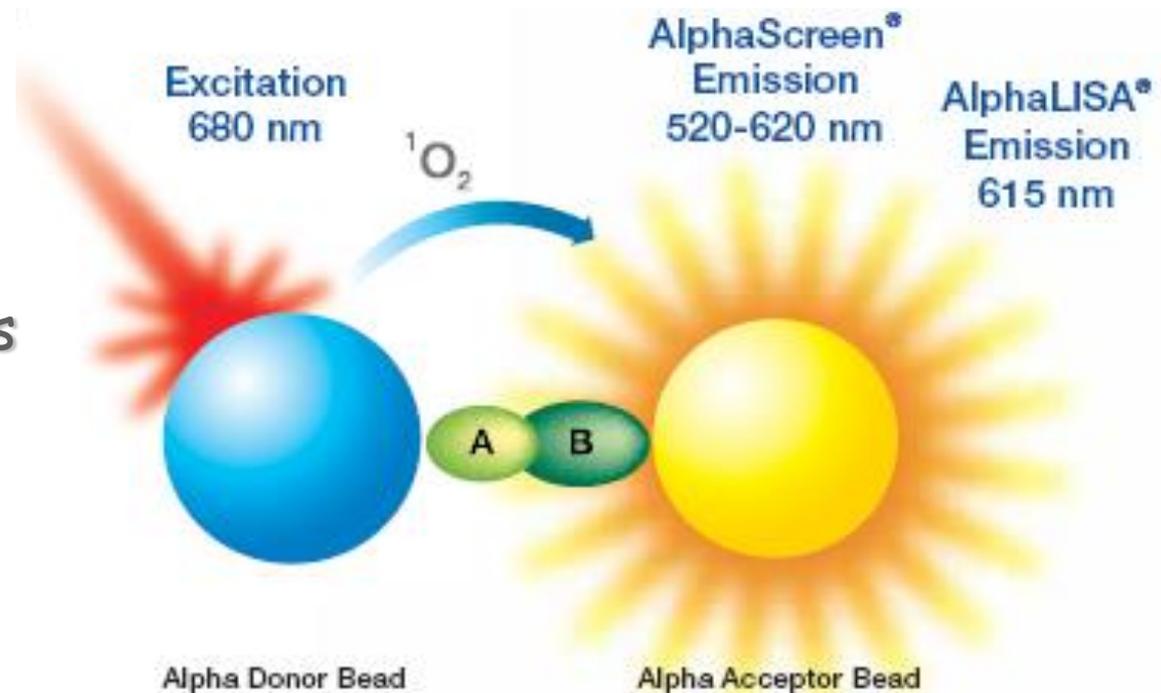
La biglia accettrice contiene un derivato del **Tioxene** che reagisce con <sup>1</sup>O<sub>2</sub>.

Se una reazione biologica porta le due biglie **vicine** può scatenarsi una reazione di luminescenza.

# FUNZIONAMENTO DEL SAGGIO

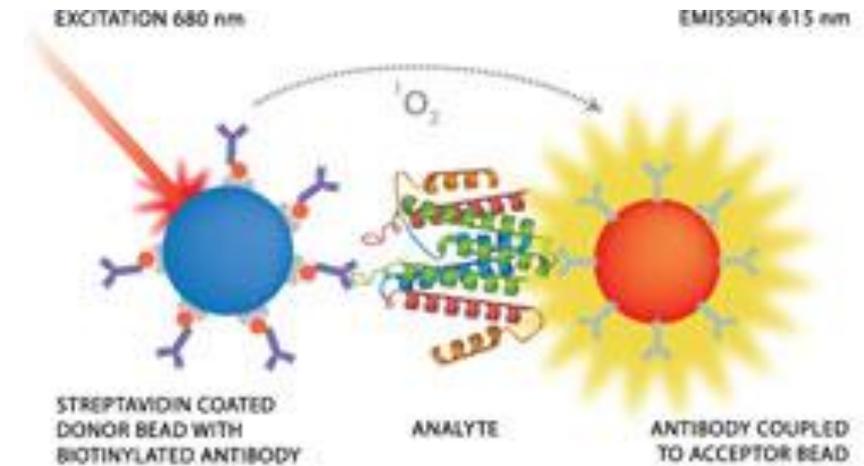
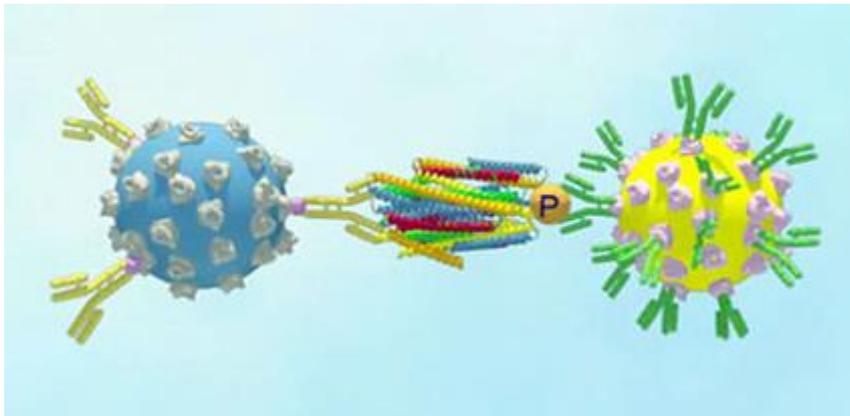
- Onda EM ad elevata  $\lambda$  (680 nm) che colpisce le biglie donatrici.

- Il fotosensibilizzatore contenuto nelle biglie donatrici genera 60000/s molecole di  $^1\text{O}_2$  che rapidamente diffonde.



- La biglia accettrice contiene un derivato del Tioxene che reagisce con  $^1\text{O}_2$  **emettendo luce.**

# SCOPI DEL SAGGIO

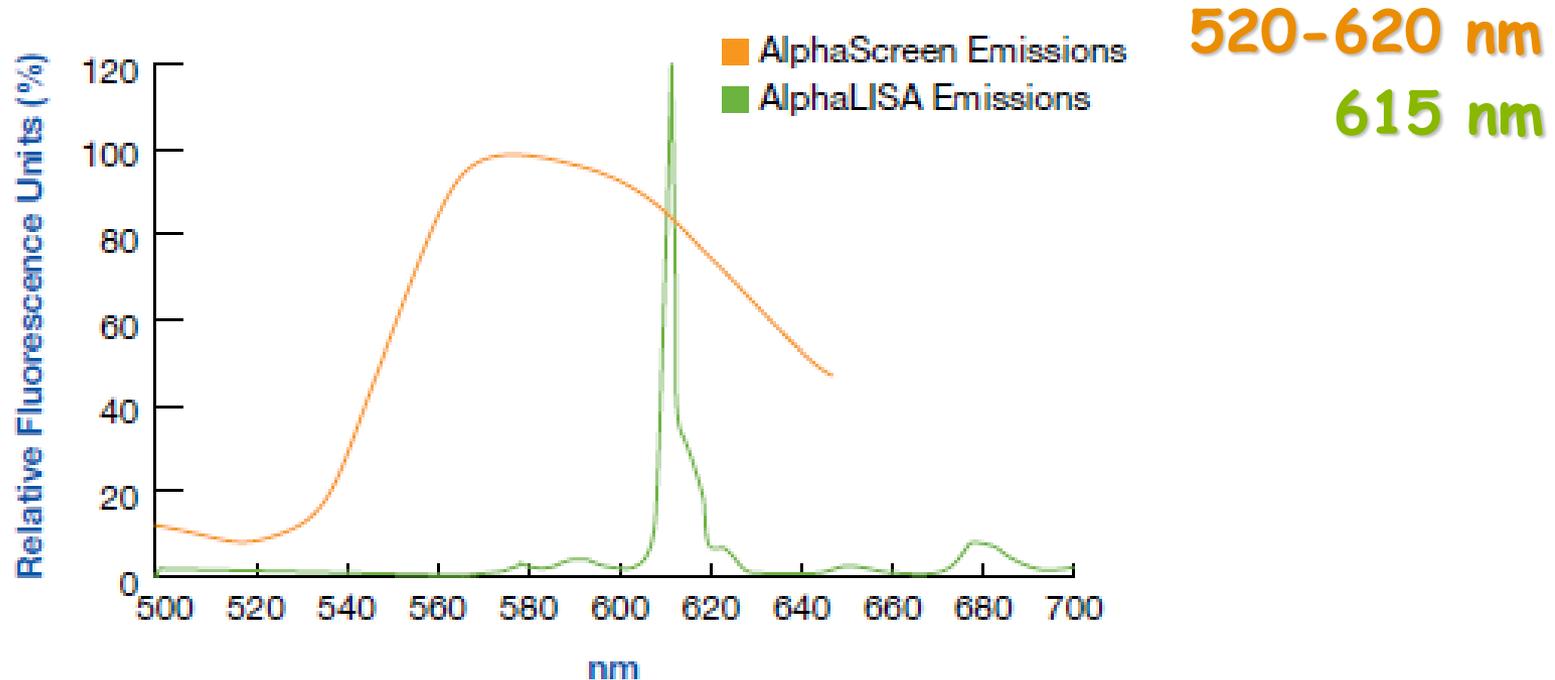


STUDI DI  
INTERAZIONE

NO WASH  
ELISA

# ALPHA TECHNOLOGY

(Amplified luminescent proximity homogeneous assay)



Le emissioni di AlphaLISA sono più strette e più luminose delle emissioni di AlphaScreen. Ciò permette lo sviluppo delle analisi in campioni complessi quali siero e plasma.

# STRUMENTI

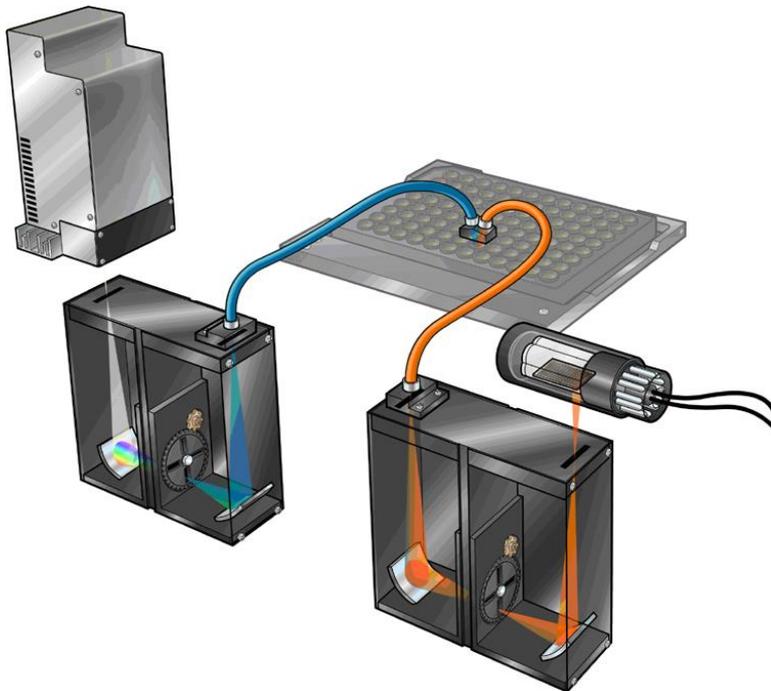
*(Amplified luminescent proximity homogeneous assay)*

## Detection Modes:

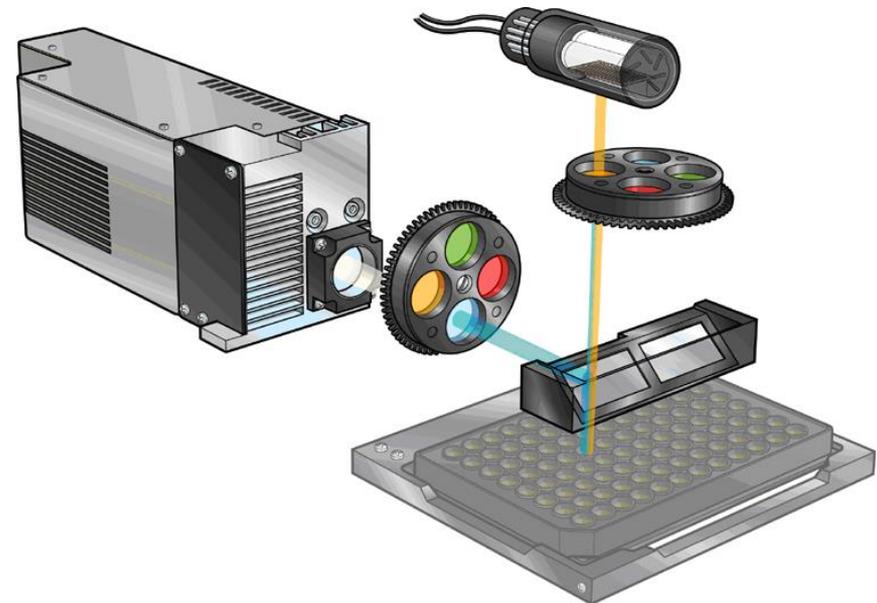
Fluorescence intensity (FI), Fluorescence Polarization (FP), Time-Resolved Fluorescence (TRF), TR-FRET, High-Performance Luminescence, UV-Visible Absorbance, AlphaScreen / AlphaLISA.



## Quadruple monochromator system



## Deep blocking filters and dichroic mirrors



# DISPENSATORI

*(Amplified luminescent proximity homogeneous assay)*



Sistema con  
dispensatore  
manuale



Piastre da  
1536 pozzetti  
**NON CI SONO  
LAVAGGI**

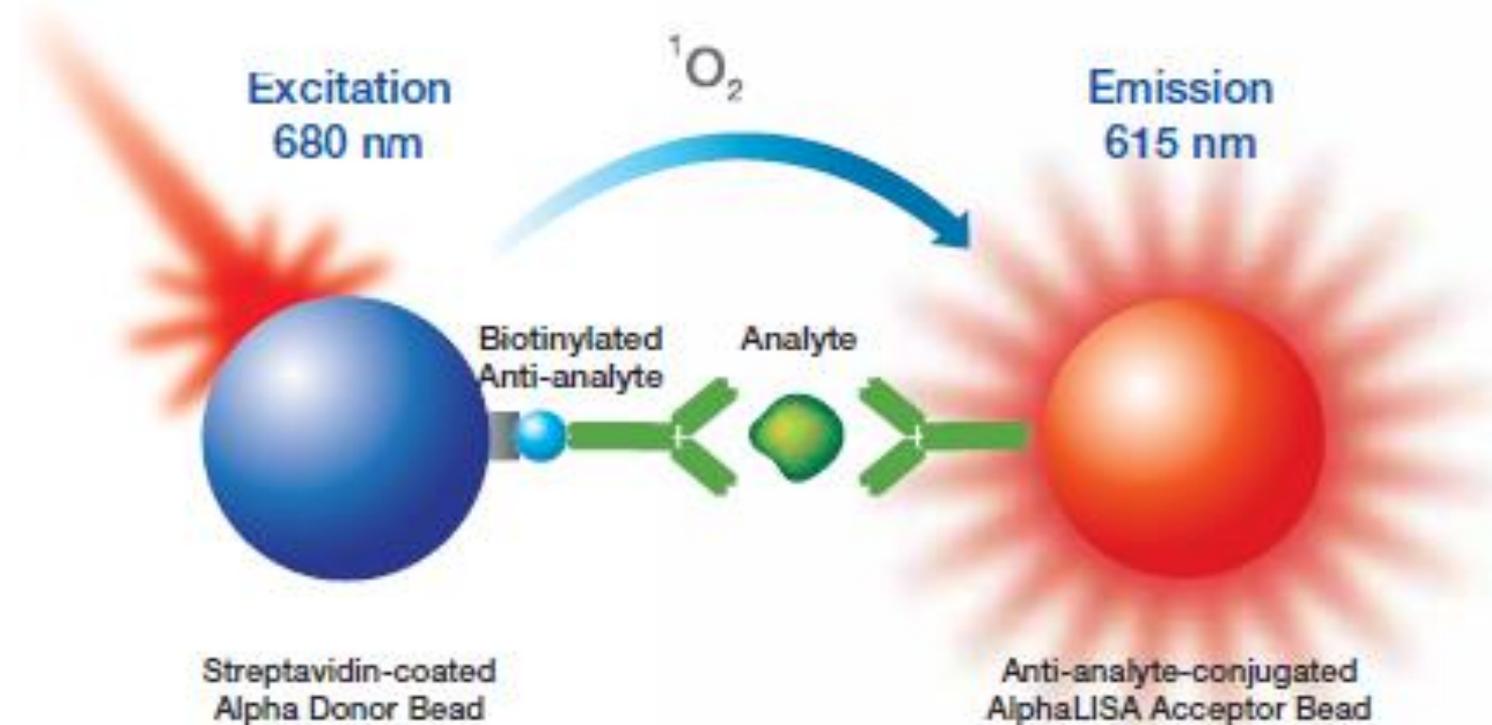


Sistema con  
dispensatore  
automatico

ALPHA TECHNOLOGY

Utilizzo  
come  
dosaggio

# ALPHALISA IMMUNOASSAY KITS



Each AlphaLISA immunoassay kit has five components:

- AlphaLISA Acceptor beads coated with an anti-analyte antibody
- Streptavidin-coated Alpha Donor beads
- Biotinylated anti-analyte antibody
- Lyophilized analyte
- AlphaLISA immunoassay buffer

The Alpha Donor bead (blue) is coated with streptavidin which captures the biotinylated antibody.

The Acceptor bead (red) is coated with analyte-specific antibody.

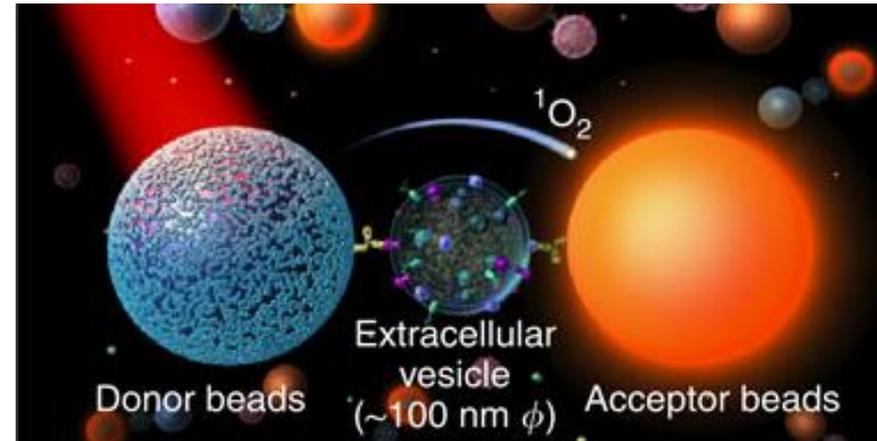
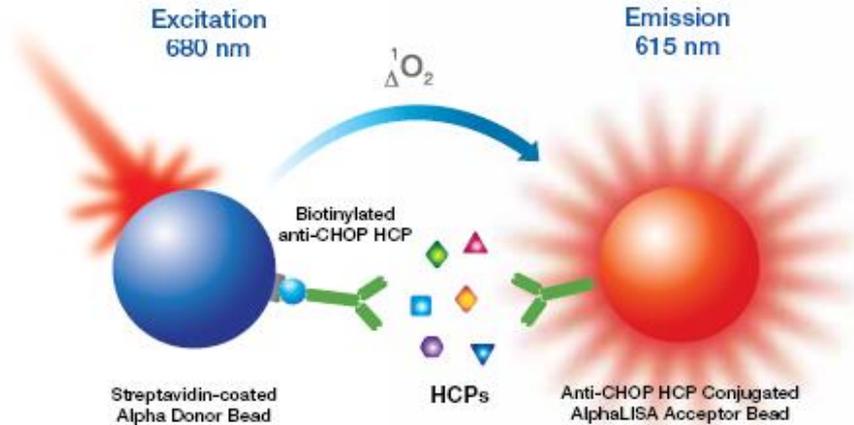
The beads are brought into proximity through binding to the analyte.

When excited by laser at 680 nm, the Alpha Donor bead releases singlet oxygen which travels to the nearby Acceptor bead where it induces emission of light.

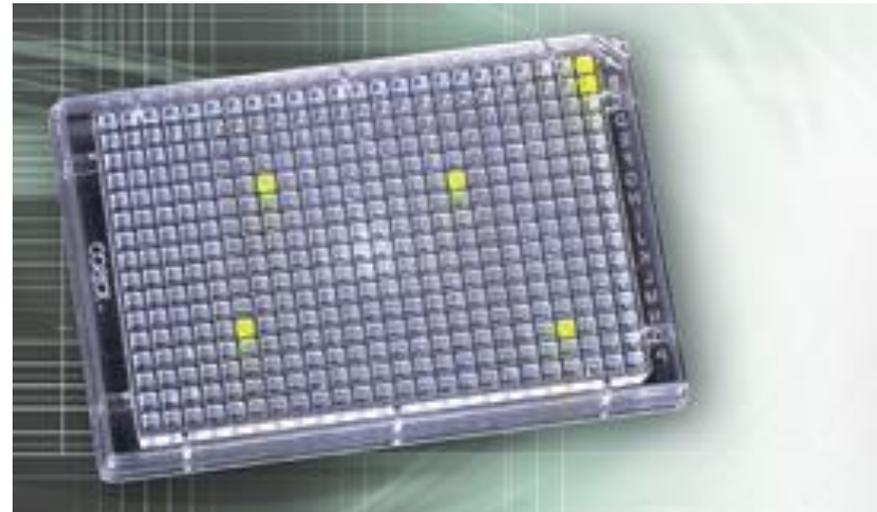
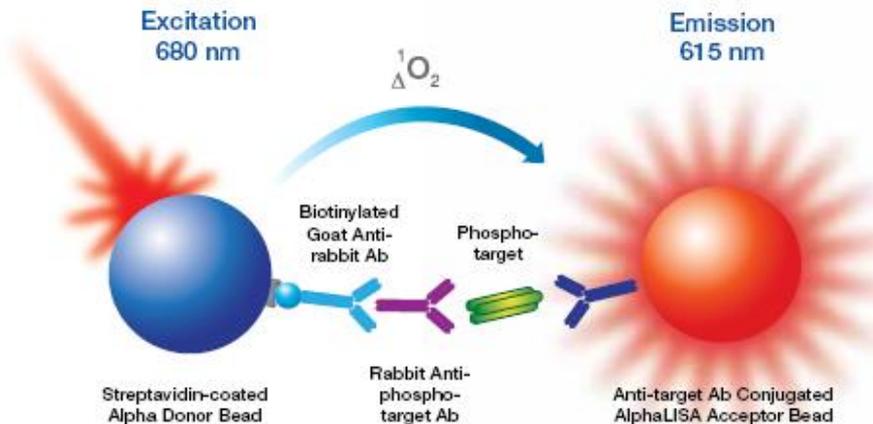
The kits can be used in a 96-, 384- or 1536-well format.

# ALPHALISA IMMUNOASSAY KITS

## CHOP HCP Assay

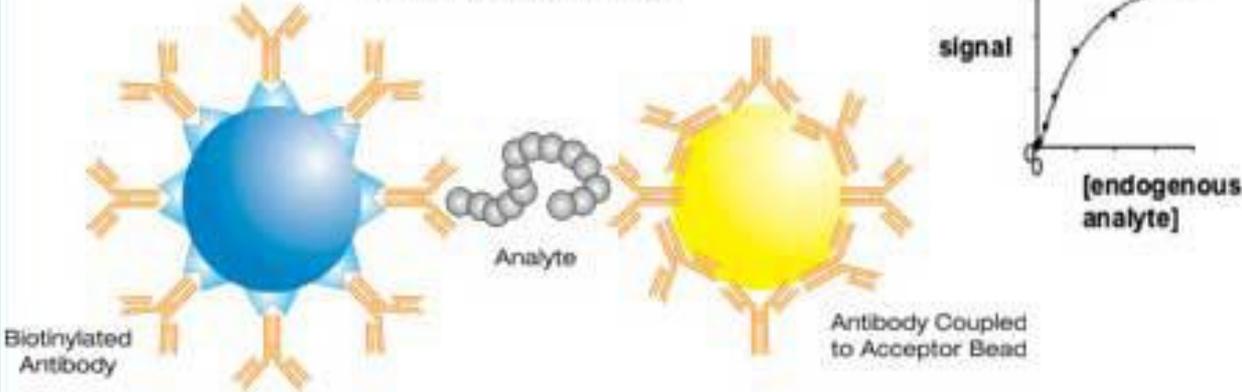


## Detection of a Phosphorylated Intracellular Target

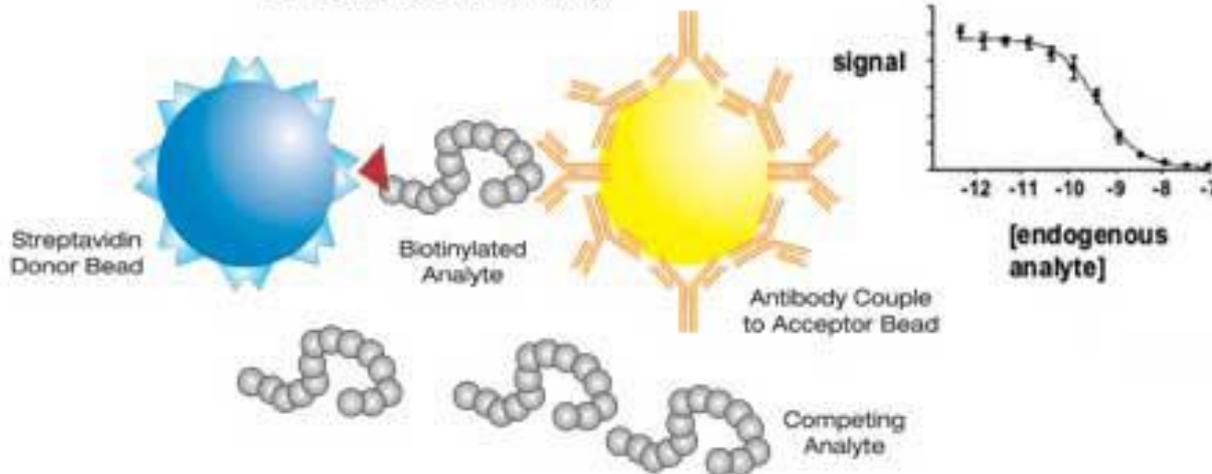


# SAGGI COMPETITIVI E NON

A. Sandwich Assay



B. Competition Assay

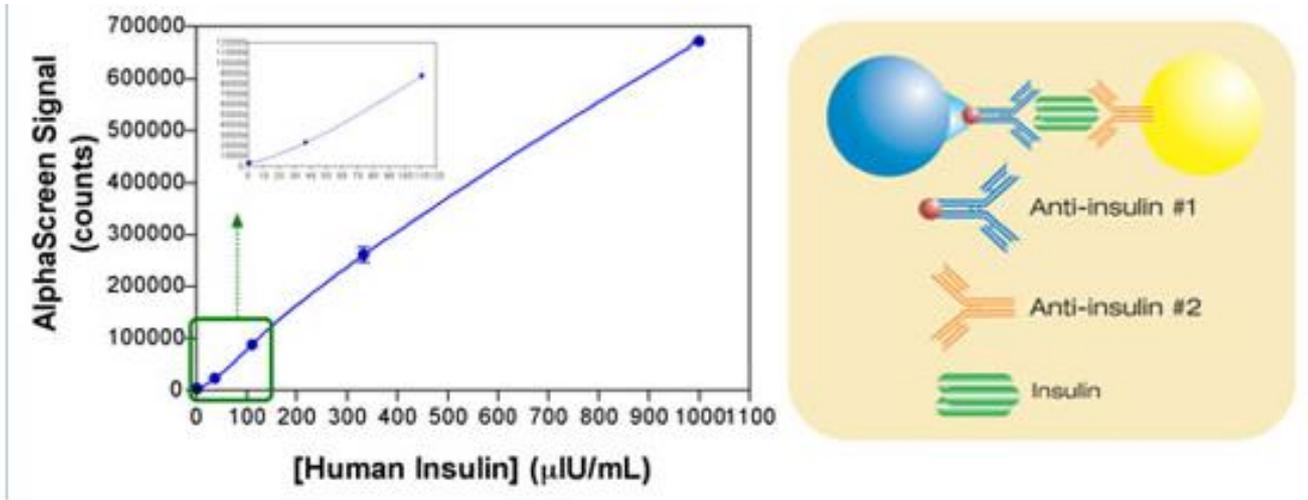


Devono sempre  
esser  
riconosciuti  
**epitopi diversi.**

Si usa quando  
**un solo Ab è**  
disponibile per  
l'analita.

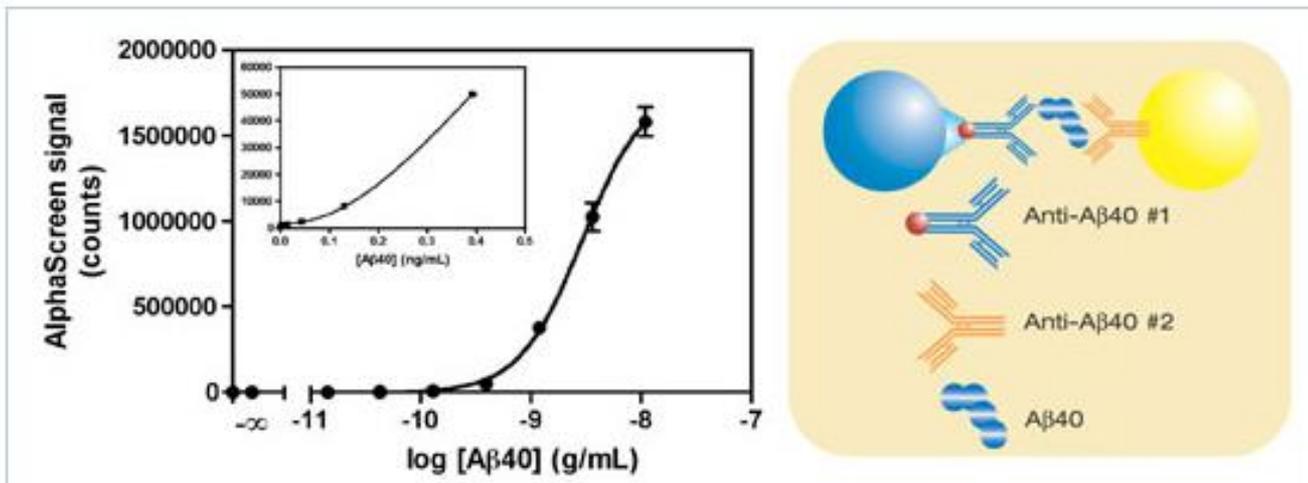
# ALPHA TECHNOLOGY vs ELISA

AlphaLISA™ - Non ha i limiti dell'ELISA



Quantification of Human Insulin in Serum

Calibration curve using 5 μL insulin calibrators prepared in insulin depleted serum (384 format) using a 5 μL sample size Dynamic range: 2–1,000 μIU/mL. Detection limit: 2 μIU/mL (85 pg/mL)



# STUDI DI INTERAZIONE

Altre tecniche permettono di studiare le interazioni fra molecole:

ELISA

BIOSENSORI

Time-Resolved  
fluorescence  
(FRET)

Limite: possono studiare solo molecole medio-piccole.

# IMPIEGHI DELL'ALPHA TECHNOLOGY

L'Alpha technology  
permette di  
lavorare con  
tantissime  
molecole, anche  
**molto grandi** :

DNA,  
RNA,  
Enzimi e in generale proteine,  
peptidi,  
zuccheri  
farmaci...

Tecnica adatta per lo studio di interazioni :

- enzima-substrato,
- recettore-ligando,
- a bassa affinità...

mediante saggi diretti/indiretti di :

**associazione, dissociazione, competizione.**