

IMMUNOCHEMICA



QUANTIFICAZIONE DEI CAMPIONI

Metodi colorimetrici

VS

Determinazione
spettrofotometrica
diretta



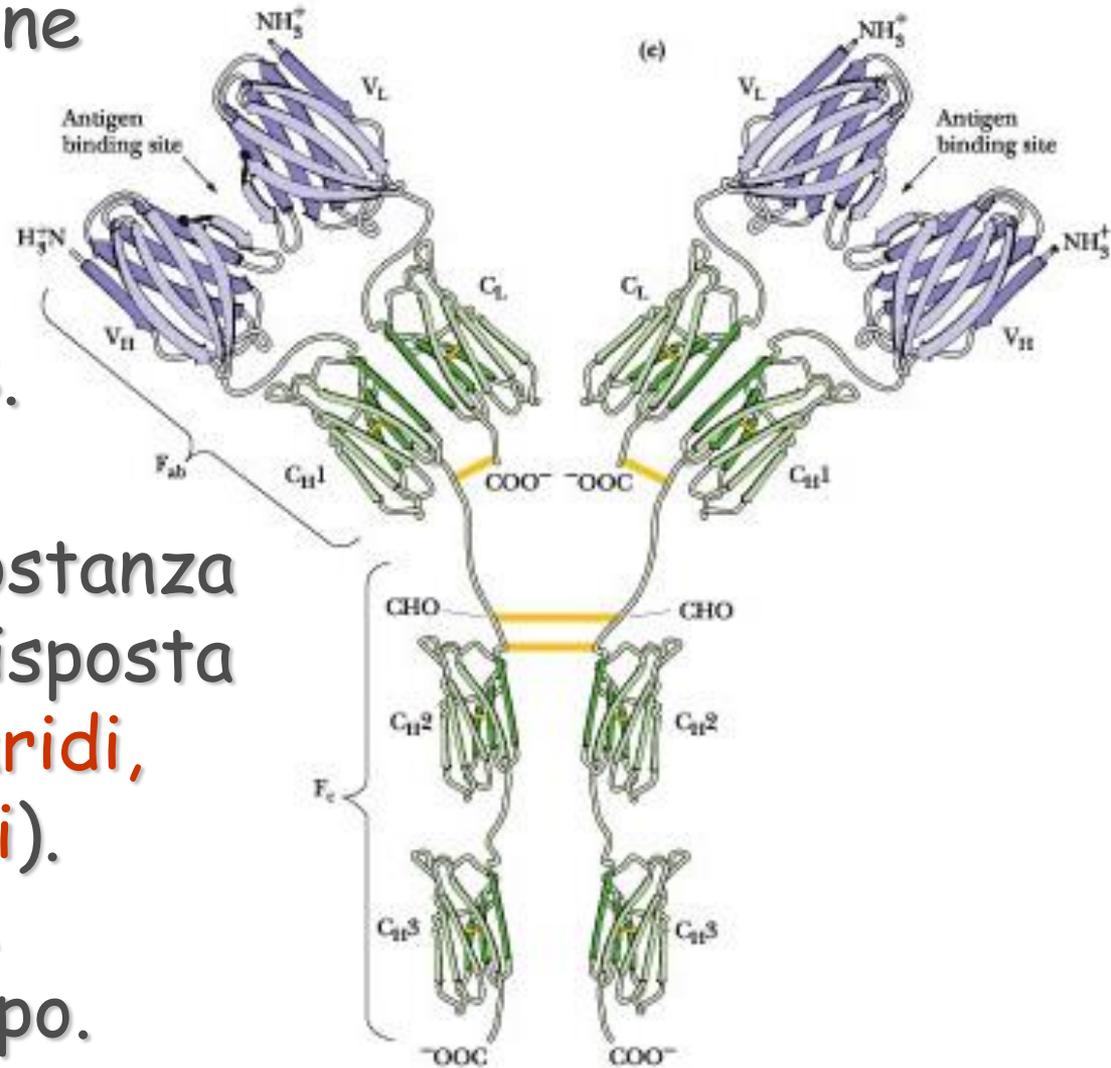
Metodi
immunochimici

TECNICHE IMMUNOCHEMICHE

Si basano tutte sull'uso di anticorpi (Ab).

Anticorpo: glicoproteine **solubili**, della classe delle immunoglobuline (Ig), prodotte e **secrete** dai linfociti B.

Antigene: Qualsiasi sostanza estranea che induca risposta immunitaria (**polisaccaridi, proteine, acidi nucleici**). Sostanza riconosciuta e **legata** da un anticorpo.



Keith Wilson

School of Life Sciences
University of Hertfordshire, UK

“Il biochimico, tuttavia, più che alle complesse interazioni che si verificano nella risposta immunitaria in vivo, è interessato all'uso delle tecniche immunochimiche **in vitro**.

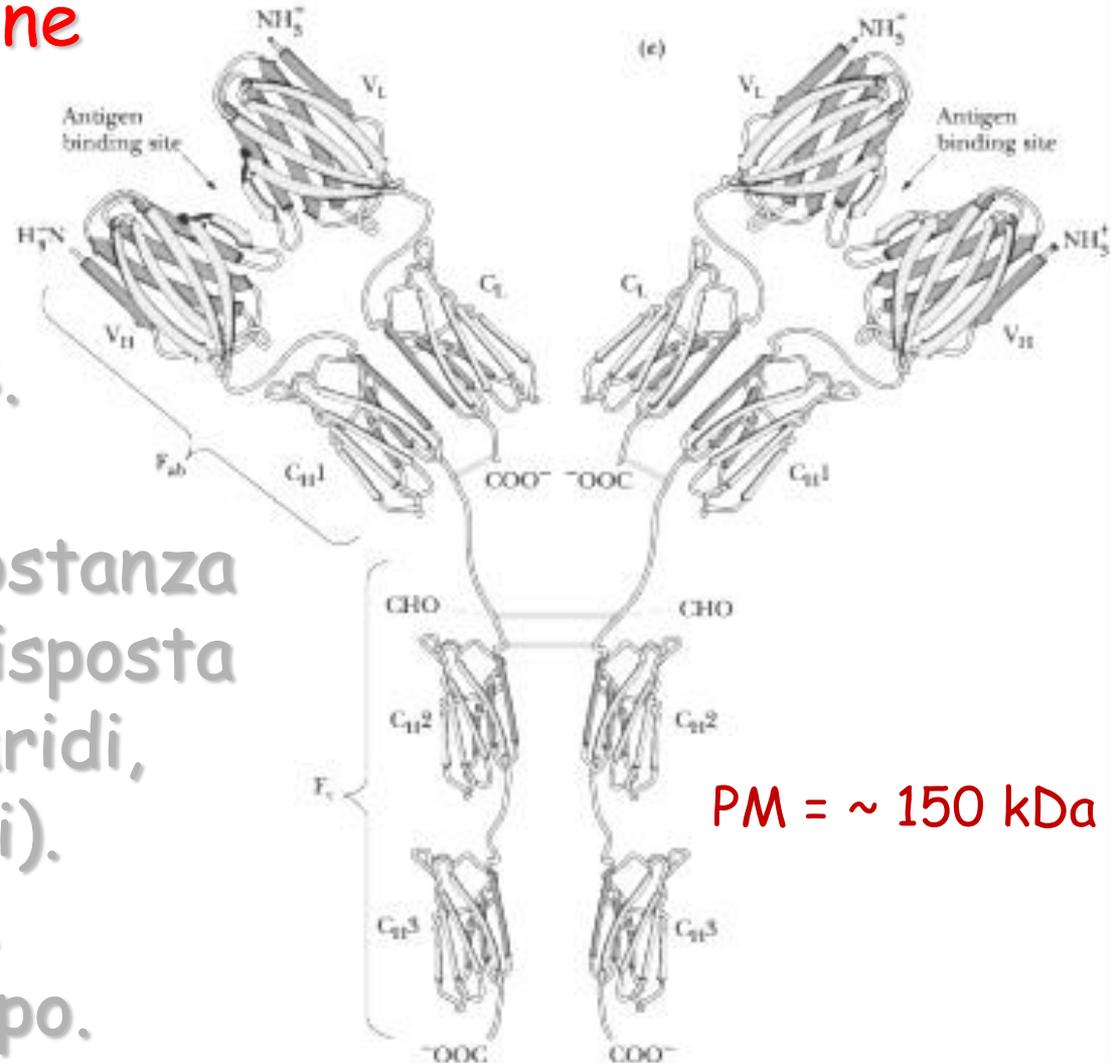
Occorre infatti sottolineare che non è necessario essere cultori di immunologia per poter impiegare e capire, la maggior parte delle tecniche immunochimiche.”

TECNICHE IMMUNOCHEMICHE

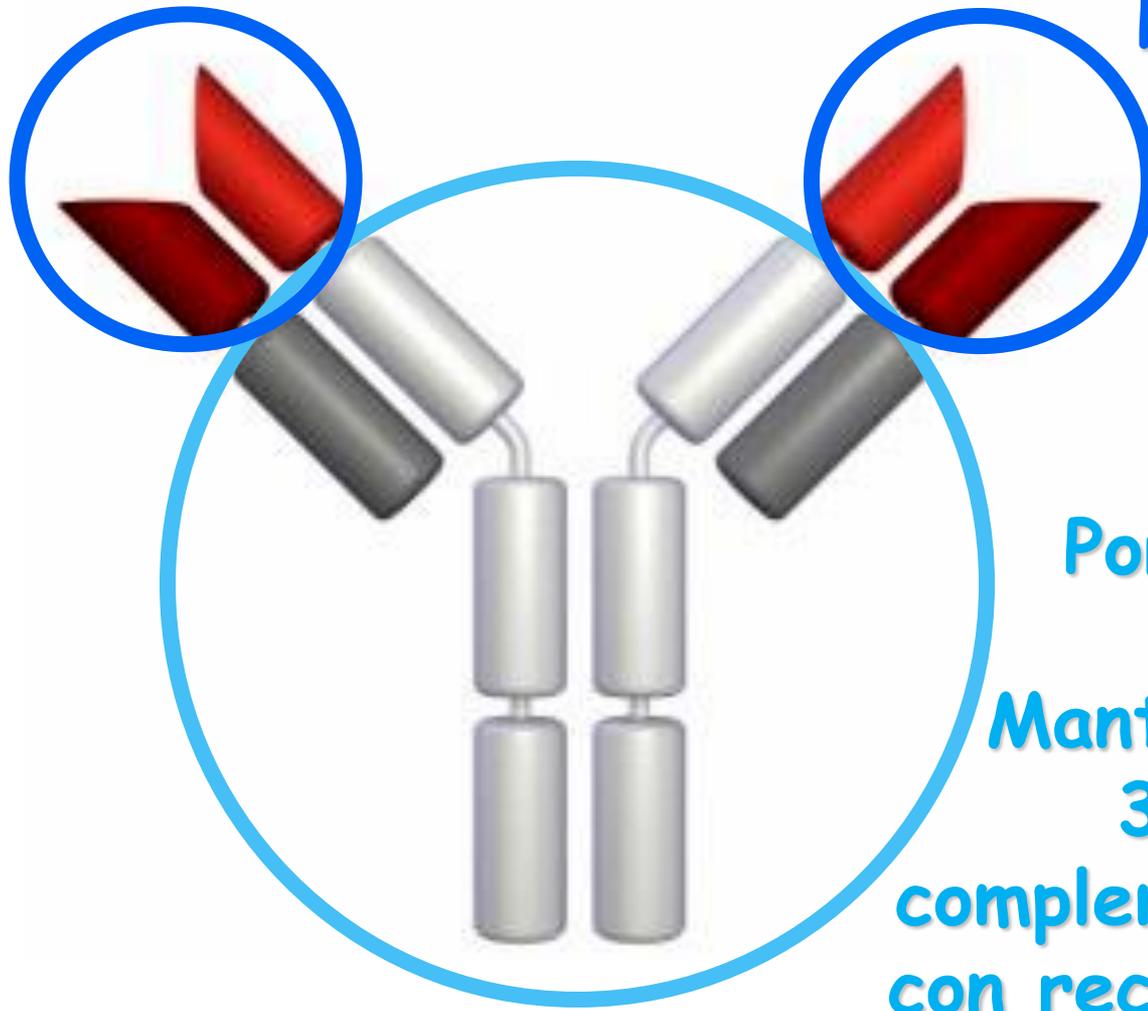
Si basano tutte sull'uso di anticorpi (Ab).

Anticorpo: glicoproteine solubili, della classe delle immunoglobuline (Ig), prodotte e secrete dai linfociti B.

Antigene: Qualsiasi sostanza estranea che induca risposta immunitaria (polisaccaridi, proteine, acidi nucleici). Sostanza riconosciuta e legata da un anticorpo.



SCHEMATIZZAZIONE DI UN IgG



Porzioni variabili

Legame con
l'antigene

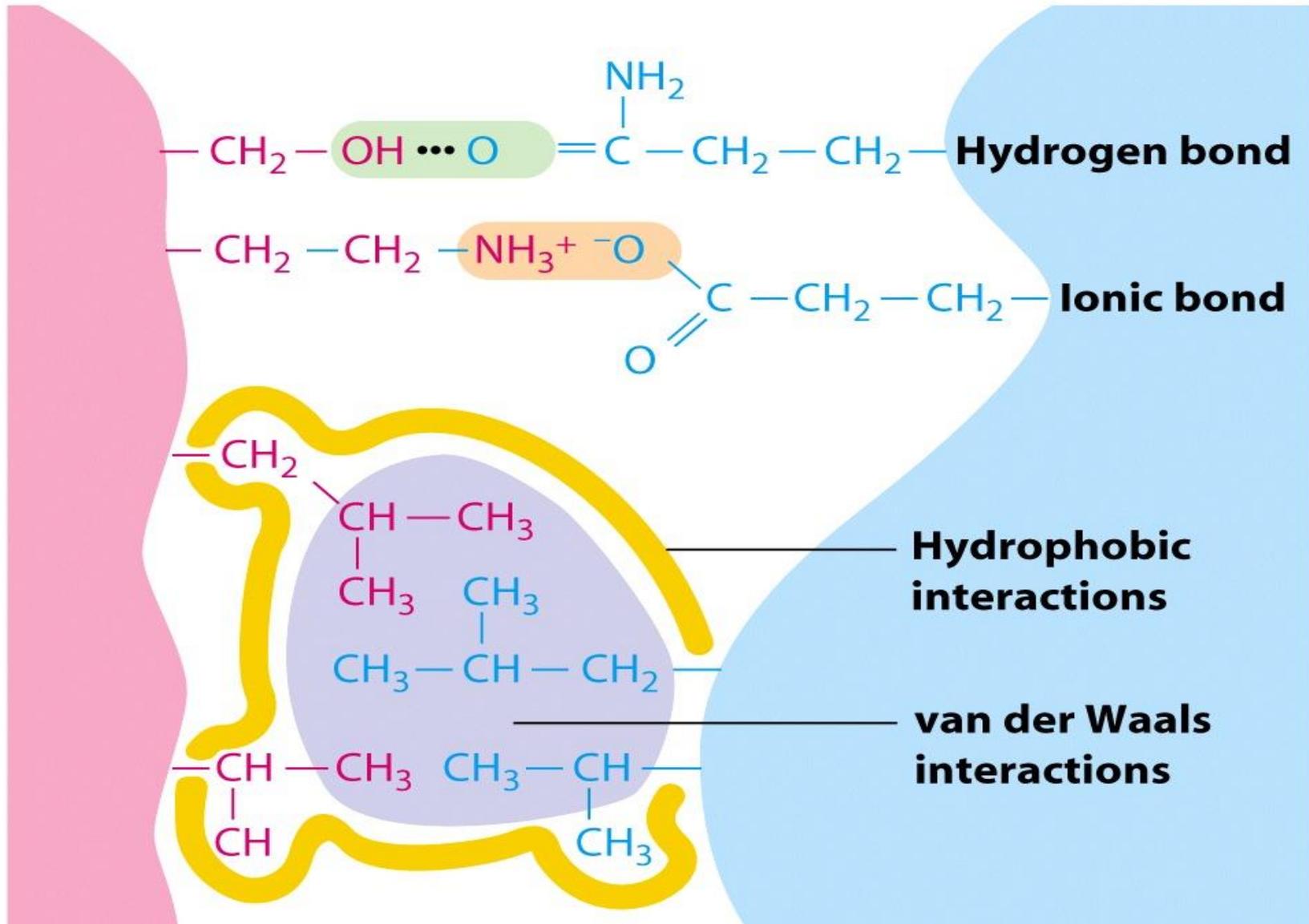
Porzione costante

Mantiene la struttura
3D dell'Ab, fissa il
complemento, interagisce
con recettori cellulari...

BASI MOLECOLARI DELL'IMMUNOCOMPLESSO

ANTIGEN

ANTIBODY



SIGNIFICATO PRATICO DEL TIPO DI LEGAME

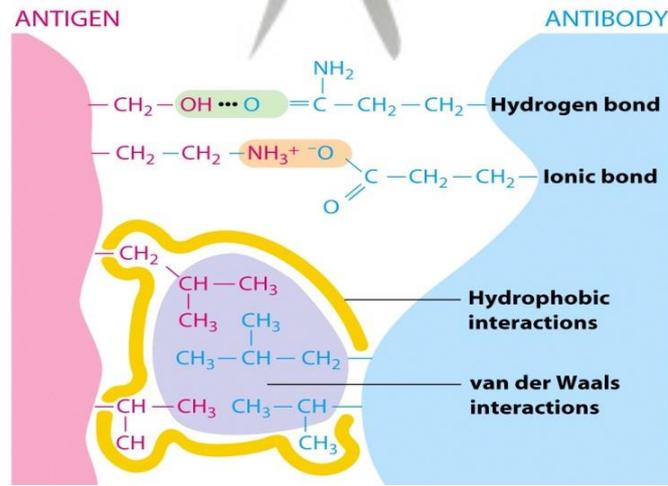
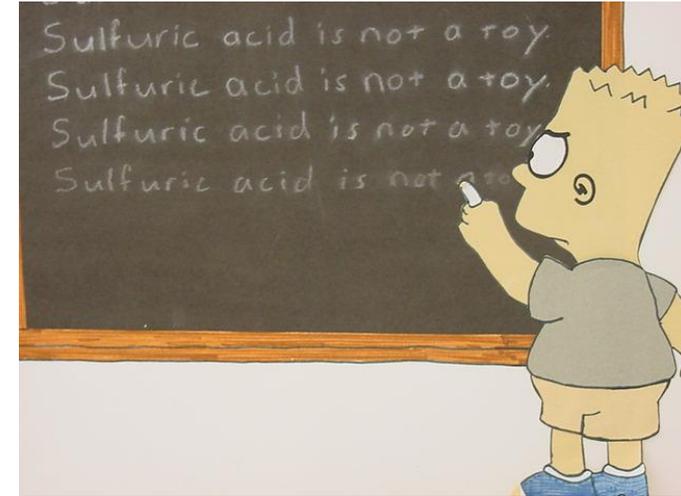


ALTA
CONCENTRAZIONE
SALINA

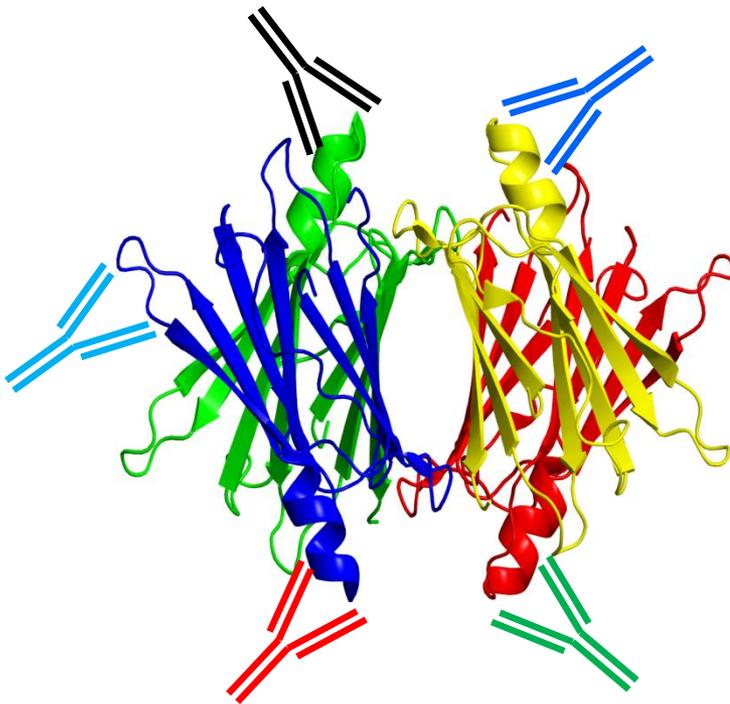
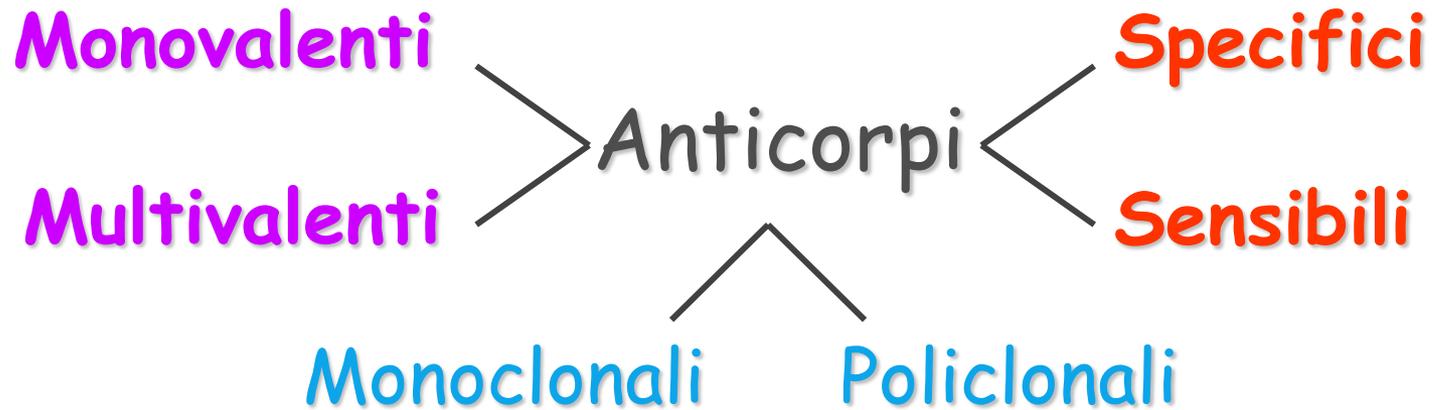


ALTA TEMPERATURA

pH ESTREMI

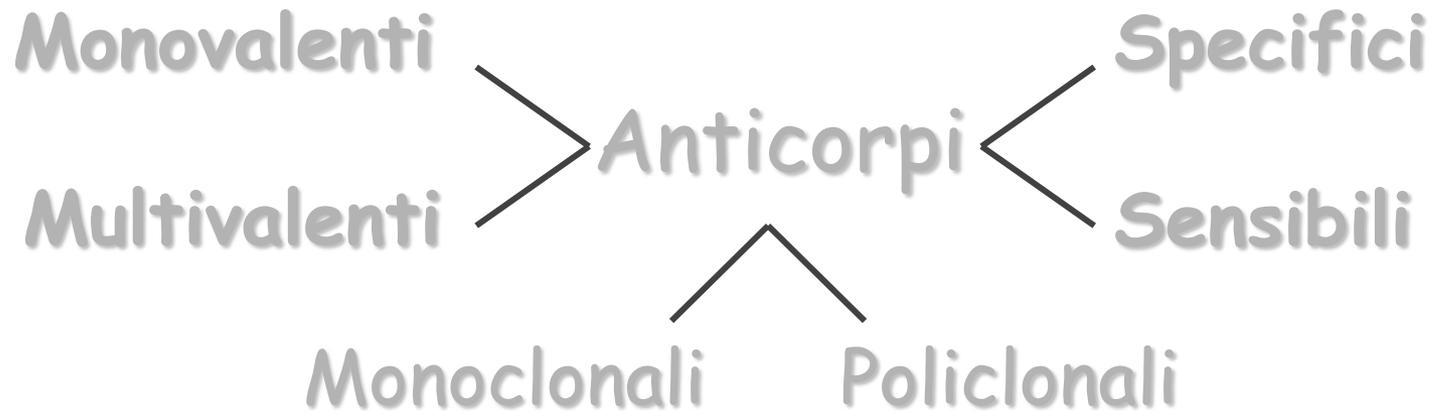


CARATTERISTICHE DI UN ANTICORPO



Proteina
+
Ab policlonale

CARATTERISTICHE DI UN ANTICORPO



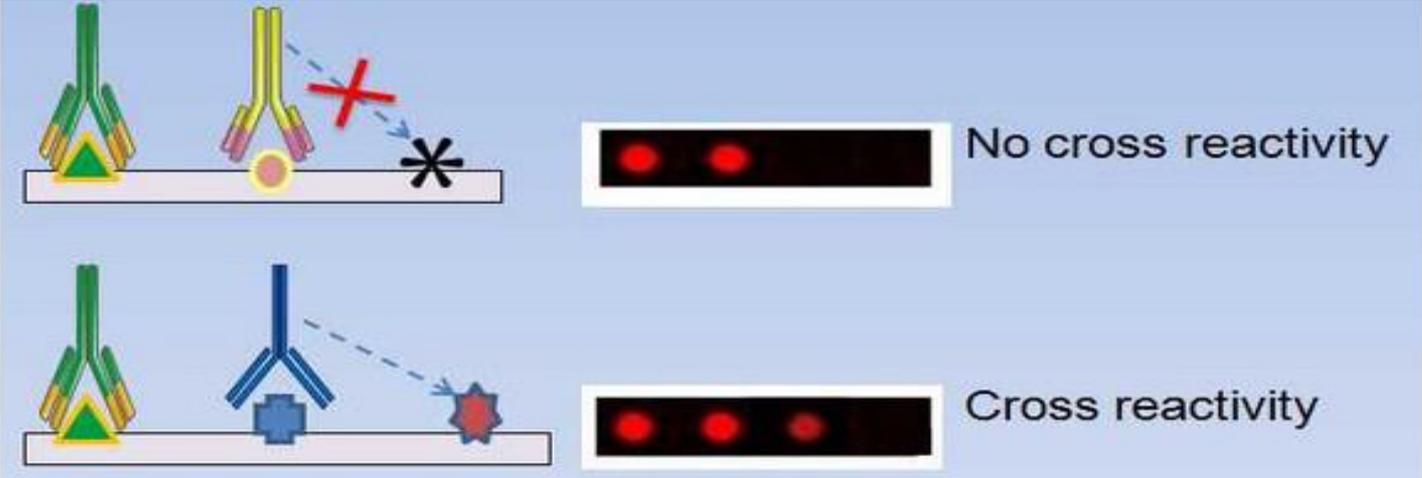
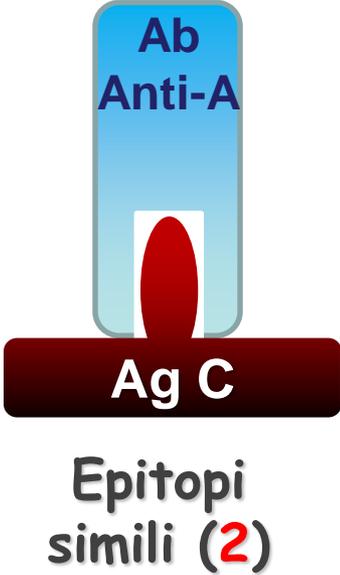
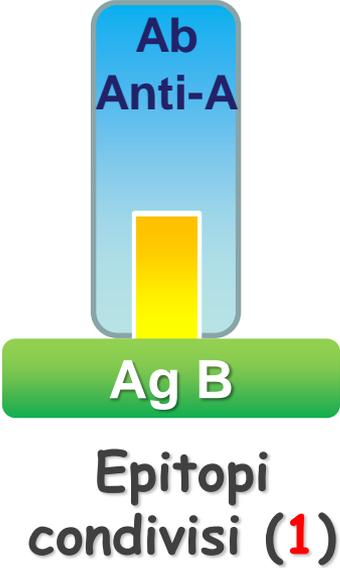
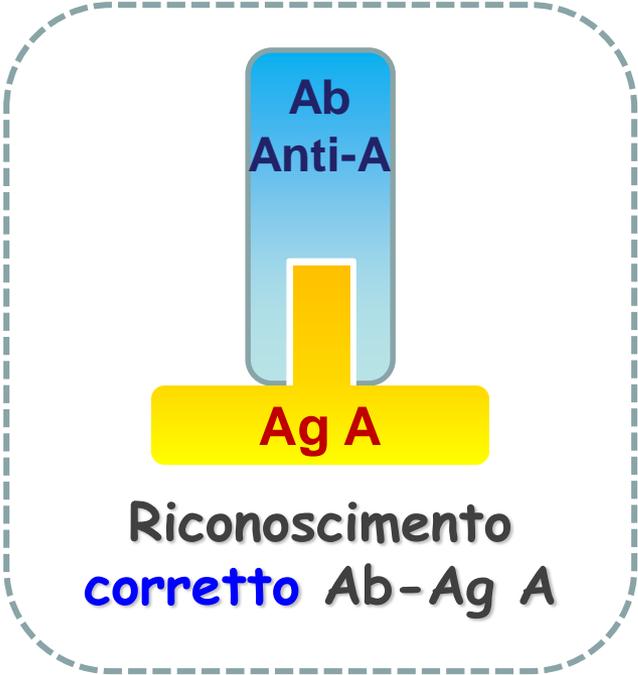
Cross reattività

Capacità di un singolo Ab di legarsi a **più epitopi** o di una popolazione di Ab di reagire con **più antigeni**.

Cause:

- Epitopi in comune (1)
- Epitopi strutturalmente simili (2)

CROSS REATTIVITA'

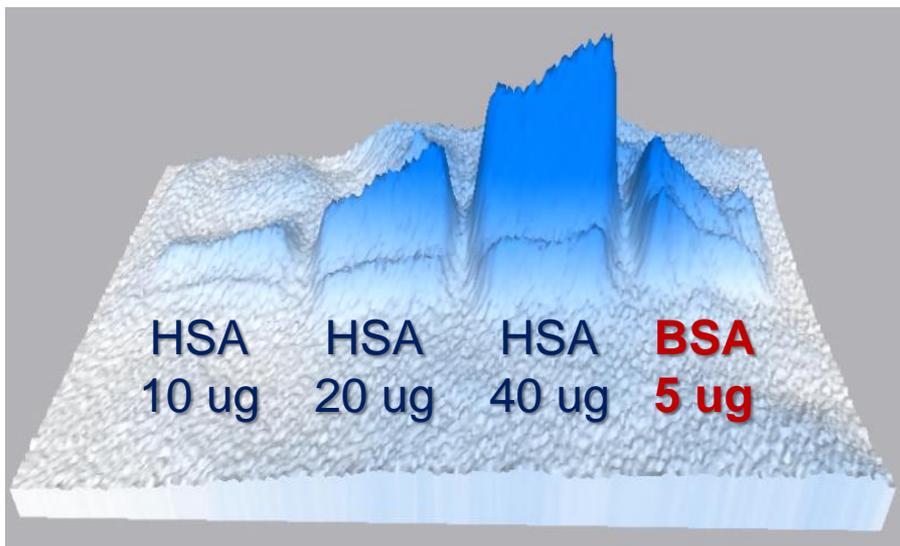


Effetto:

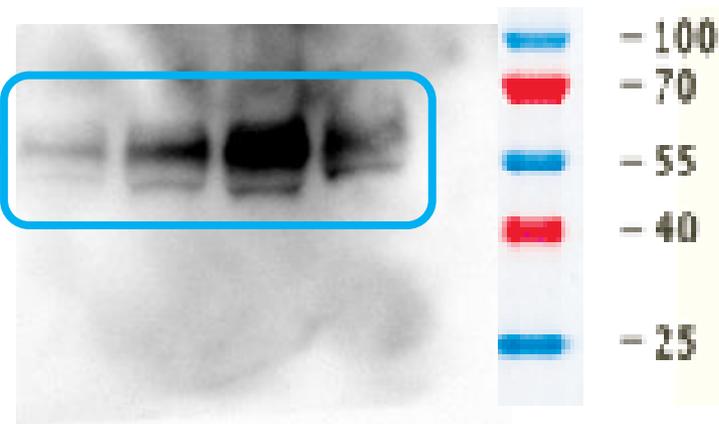
falso
segnale
positivo

ESEMPIO REALE DI CROSS REATTIVITA'

Albumina bovina (**BSA**) vs Albumina umana (**HSA**)

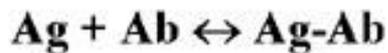
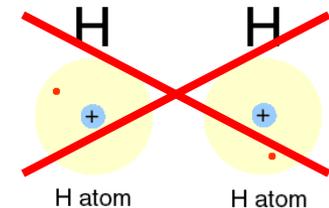
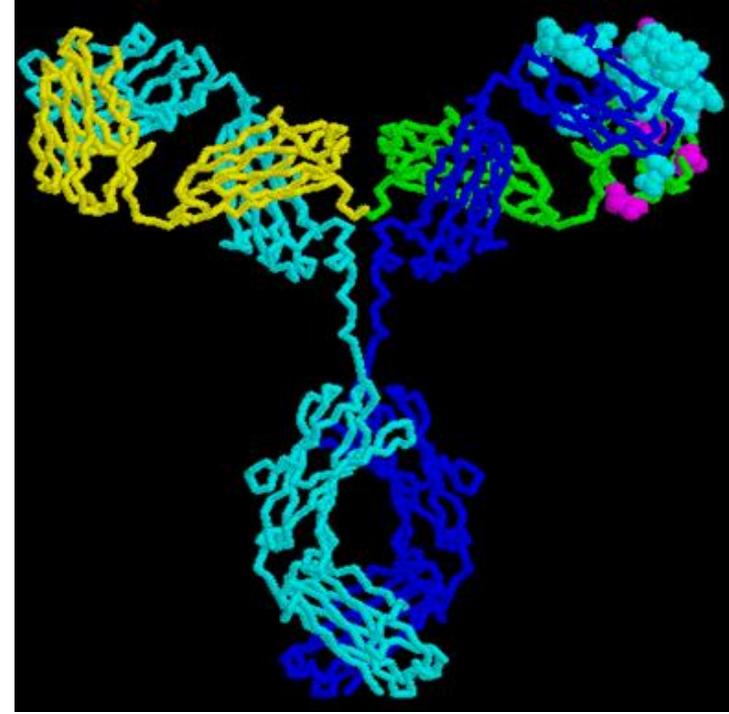


Riconoscimento
con anti-BSA



AFFINITA'

- **Forza** della reazione fra un singolo epitopo dell'Ag e un singolo sito di legame sull'Ab (**affinità**).
- **Equilibrio** fra forze di attrazione e di repulsione.
- Legami **non covalenti multipli**.



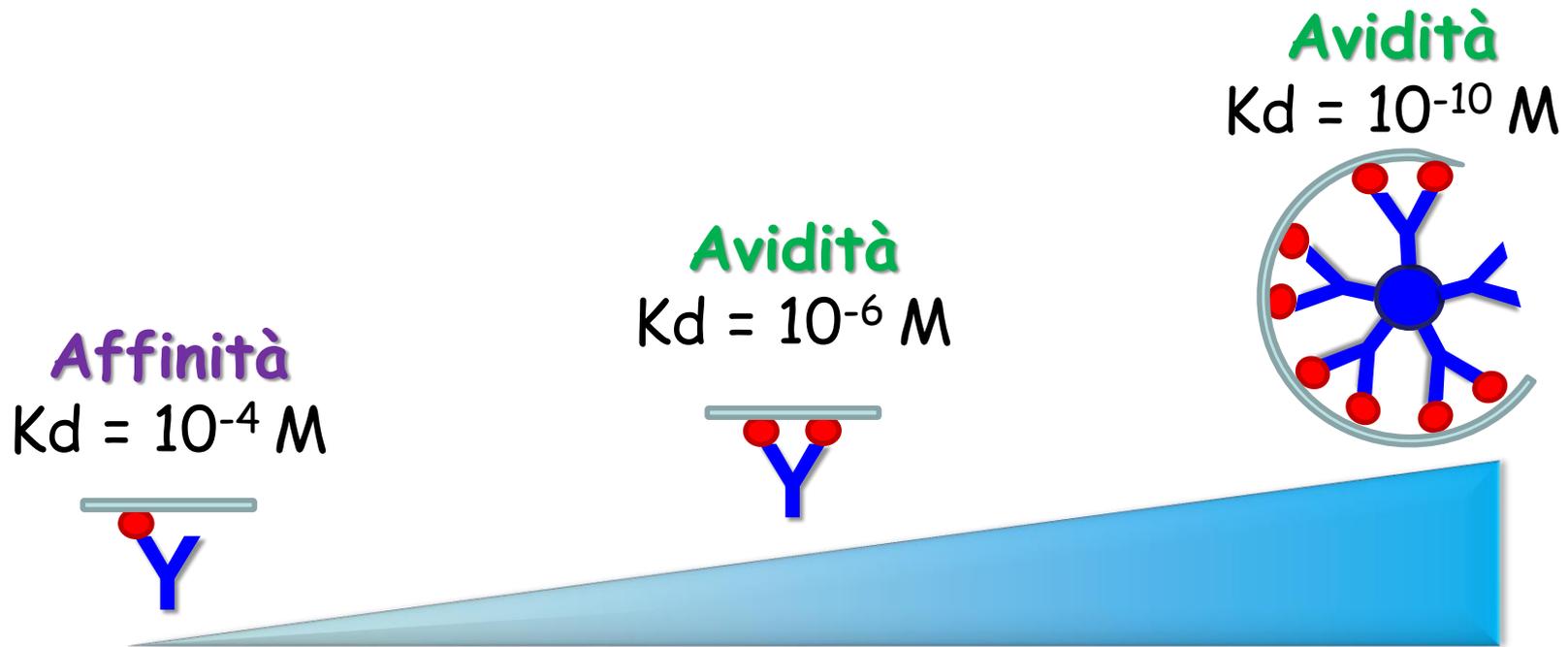
Applying the Law of Mass Action:

$$K_{\text{eq}} = \frac{[\text{Ag-Ab}]}{[\text{Ag}] \times [\text{Ab}]}$$

- **Reversibilità** del legame.
- Matematicamente è rappresentata dalla **costante di associazione** all'equilibrio (**Ka** o dalla **Kd**).

AVIDITA'

Misura la forza di legame **totale** di un Ab con un Ag con molti determinanti antigenici.

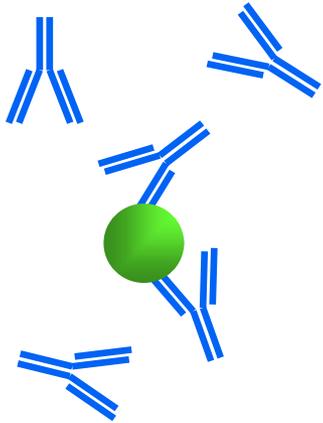


L'avidità è **>** della somma delle singole affinità.

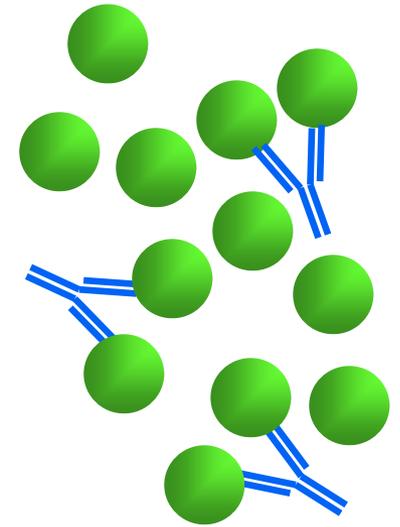
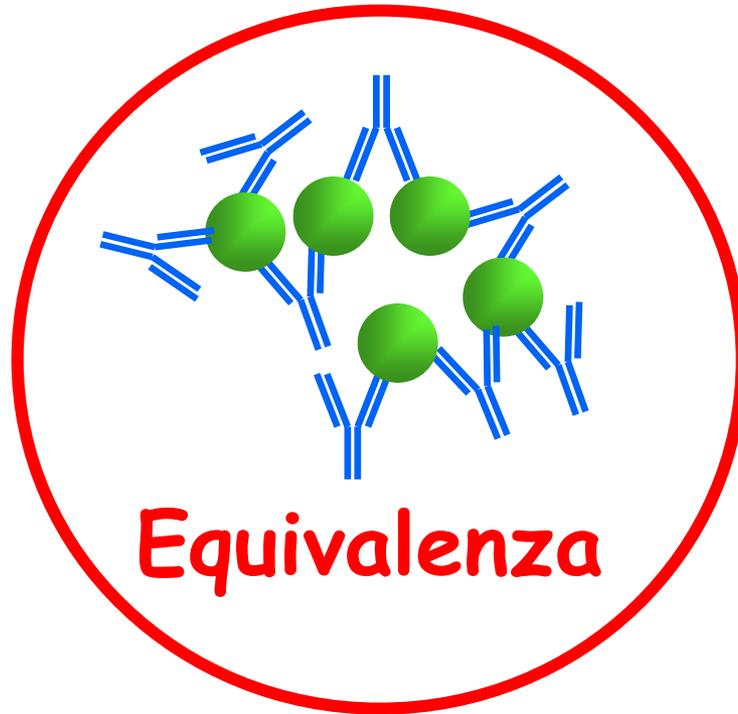
Forza Ionica - pH - Temperatura contano sempre!

IMMUNOPRECIPITAZIONE

Molti Ab divalenti (IgG) e multivalenti (IgM) hanno la capacità di far **precipitare** antigeni **in soluzione**, per formazione di un grande **reticolo macromolecolare**.



Eccesso di **Ab**

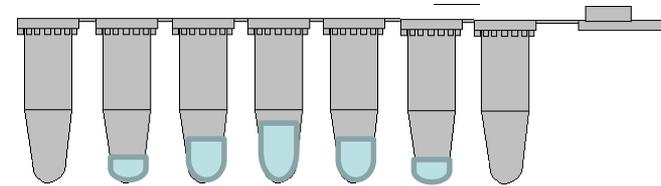
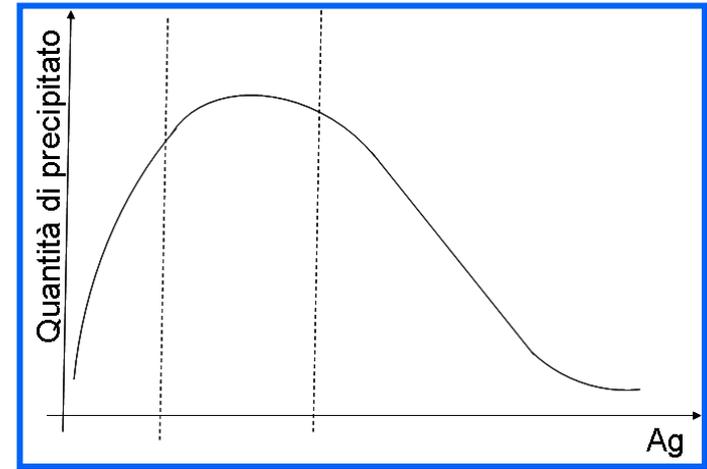
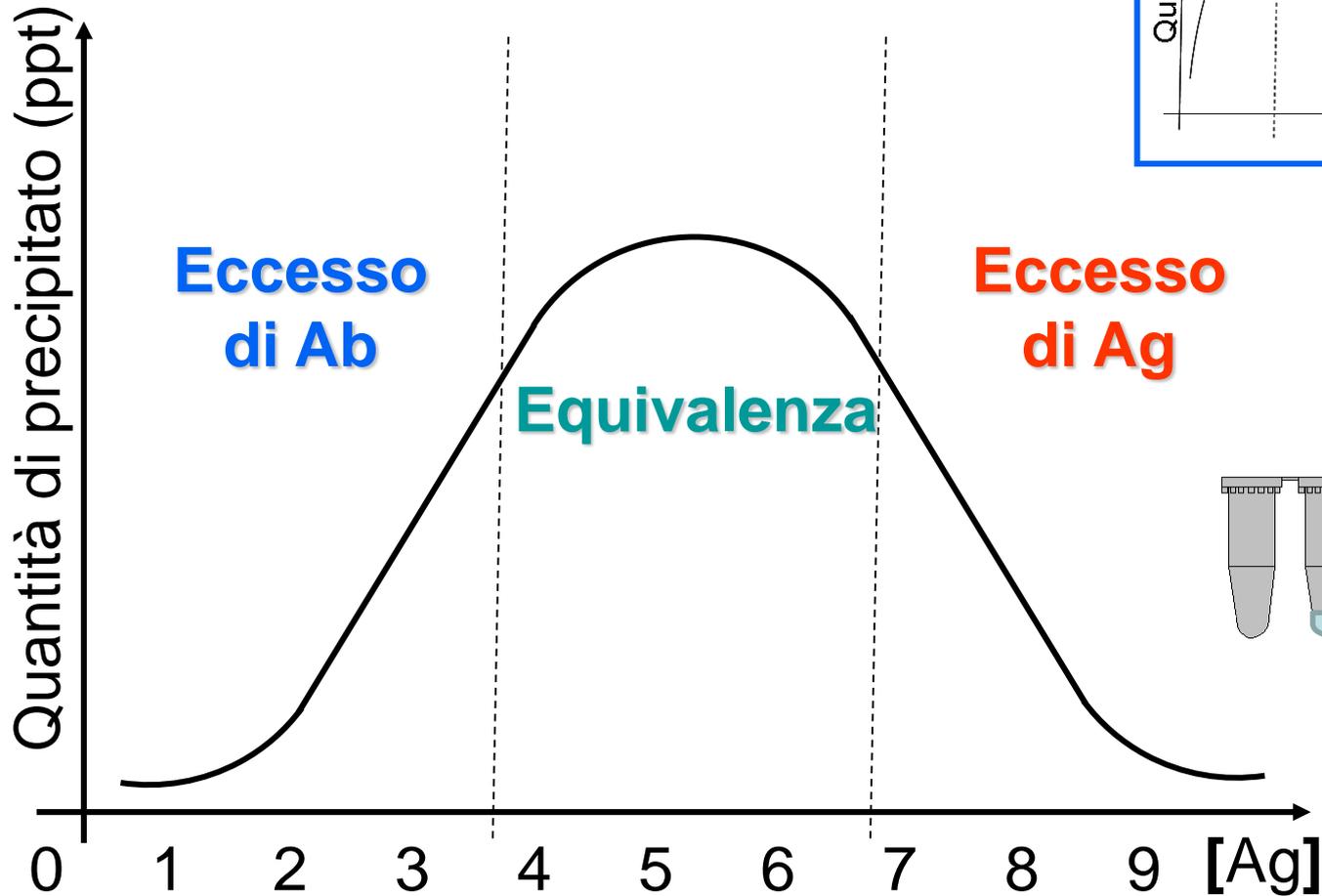


Eccesso di **Ag**

Non può avvenire con Ab monoclonali che riconoscano un solo epitopo sull' antigene (Ag monovalenti).

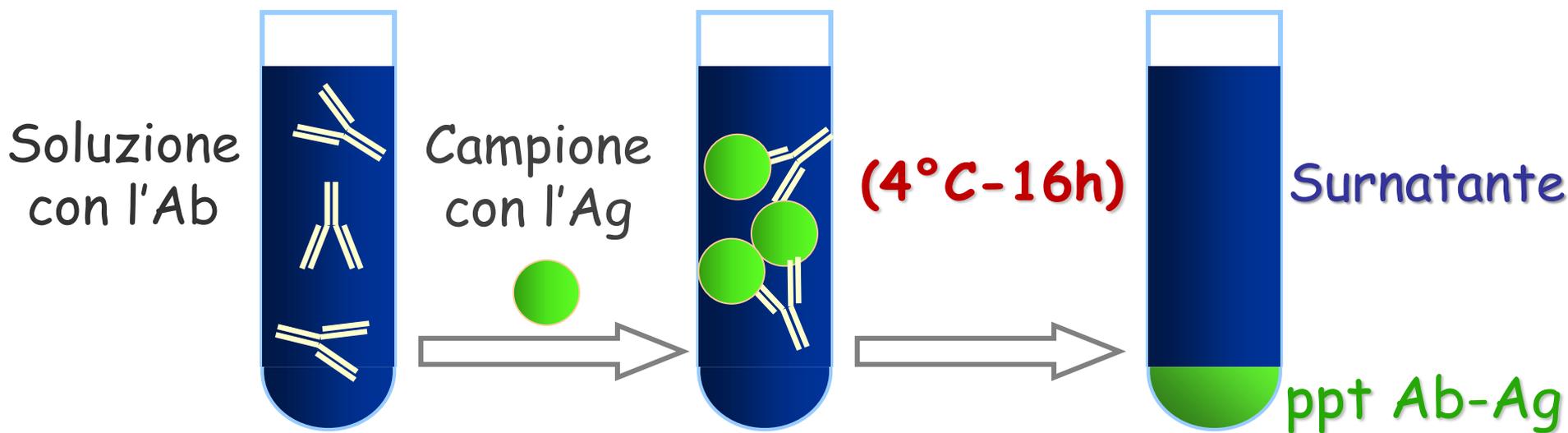
ZONA DI EQUIVALENZA

Non si raggiunge **MAI** ad un vero plateau.



IMMUNOPRECIPITAZIONE IN SOLUZIONE PER ANALISI **QUALITATIVE**

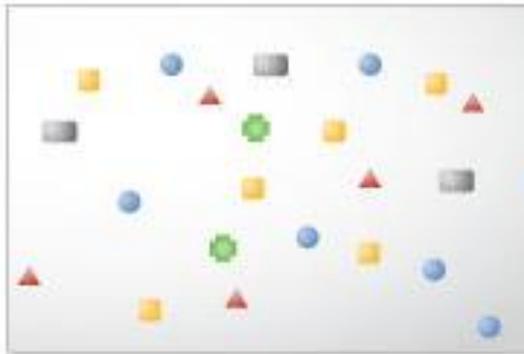
Per determinare la **PRESENZA** di un Ag in un campione.



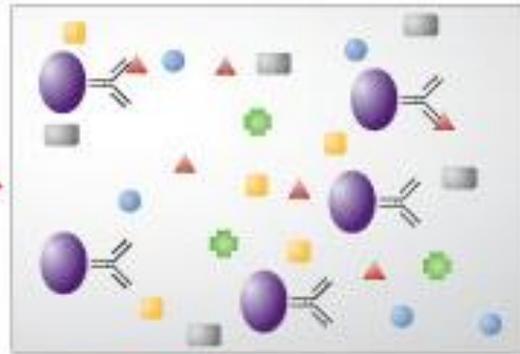
PROBLEMI: tecnica lenta e presenza di falsi negativi

IMMUNOPRECIPITAZIONE IN SOLUZIONE - **OGGI** AUMENTO DELLA EFFICIENZA

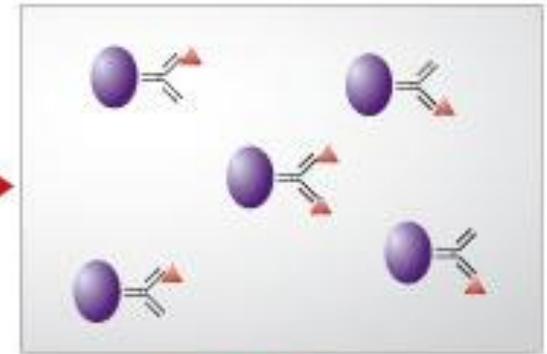
Lisato cellulare o
mistura di proteine



Aggiunta Ab-biglia
di Sefaroso

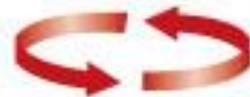


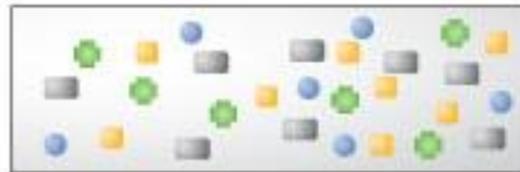
Centrifugazione



 Coupled Antibody

 Antigen

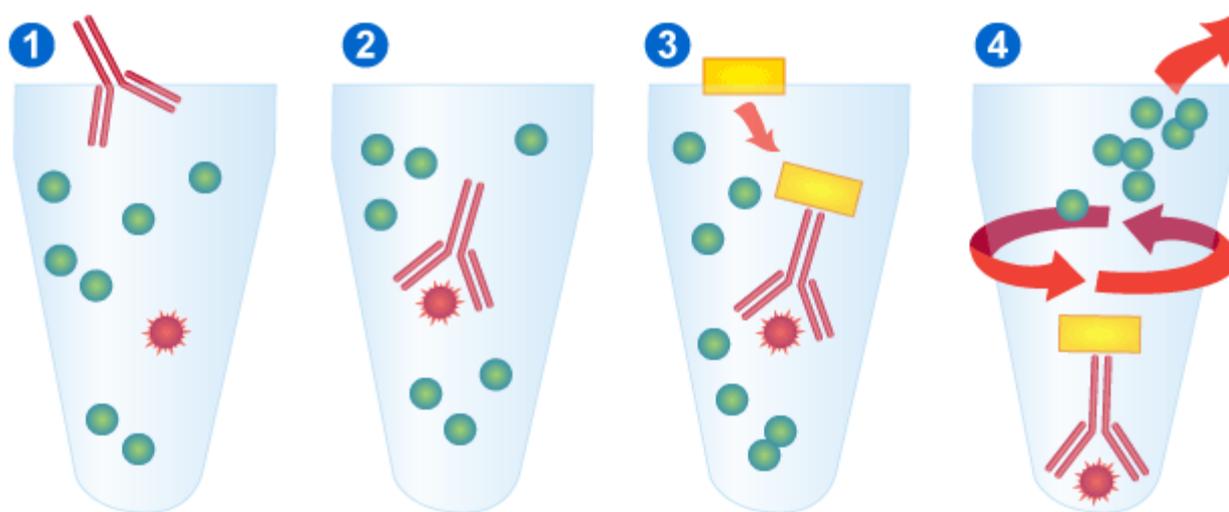
 Spin and wash



**Ab già coniugato
ad una biglia,
facile da separare
dalla soluzione.**

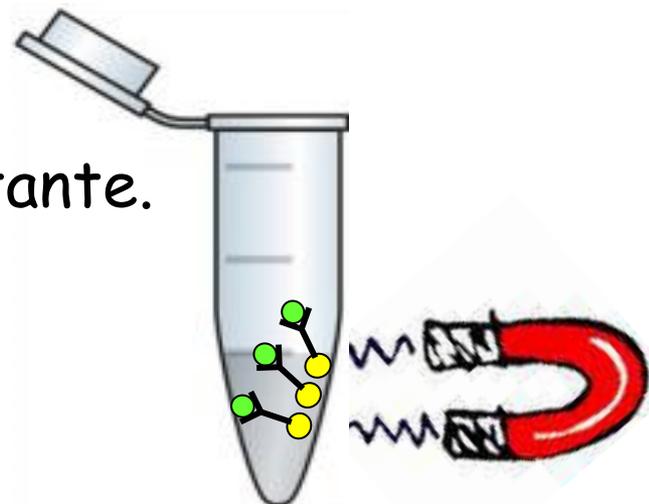
IMMUNOPRECIPITAZIONE IN SOLUZIONE

AUMENTO DELLA EFFICIENZA



- Aggiungere una molecola che forma con l'ab un **complesso insolubile** (es. proteina A).

- Centrifugazione e rimozione del surnatante.



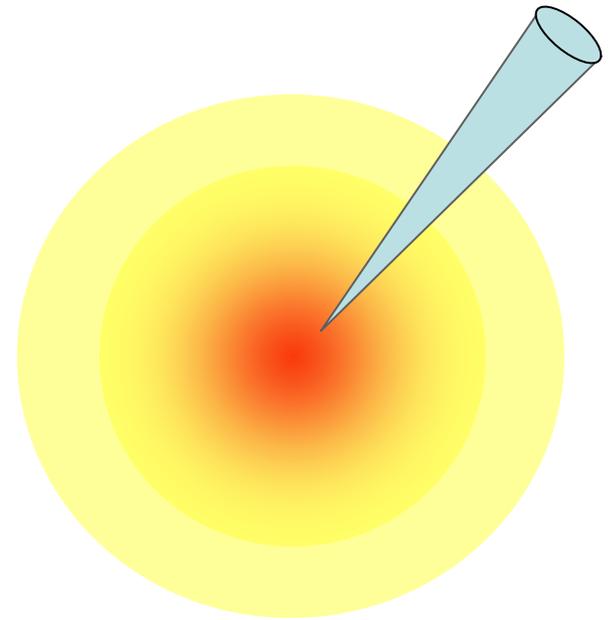
Biglie magnetiche

INDAGINI QUANTITATIVE: IMMUNOPRECIPITAZIONE SU GEL IMMUNODIFFUSIONE (ID)

Concetto : antigeni solubili diffondono in gel di agarosio creando un gradiente di concentrazione.

Max [Ag]: in corrispondenza del punto di deposizione dell'Ag.

Min [Ag]: alla massima distanza dal punto di deposizione dell'Ag.



IMMUNODIFFUSIONE RADIALE SEMPLICE (SRID)



● = Concentrazione
massima

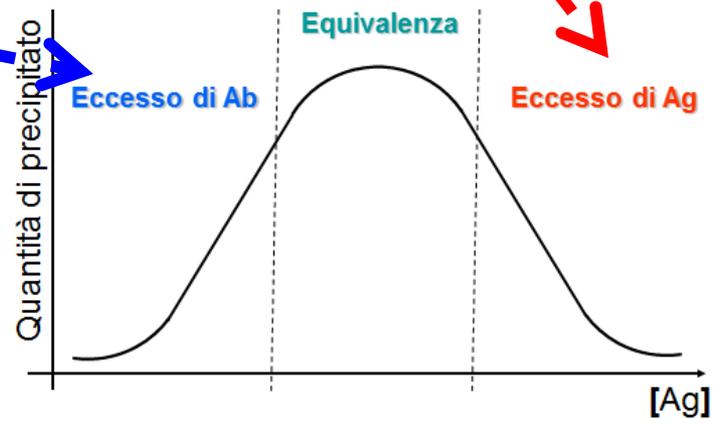
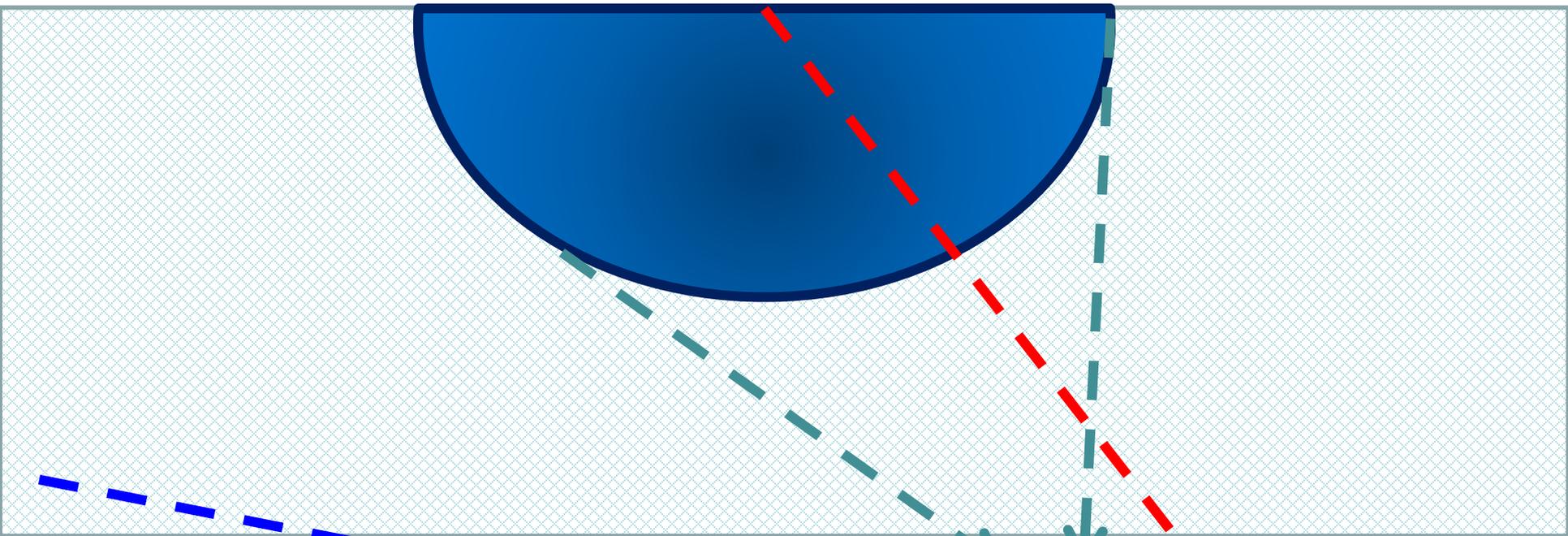
IMMUNODIFFUSIONE RADIALE SEMPLICE (SRID)



● = Concentrazione
massima

○ = Zona di equivalenza

IMMUNODIFFUSIONE RADIALE SEMPLICE (SRID)



● = Concentrazione massima

PIASTRE PER LA SRID



Contengono **coloranti** per evidenziare gli immunocomplessi.

IMMUNODIFFUSIONE RADIALE SEMPLICE (SRID)

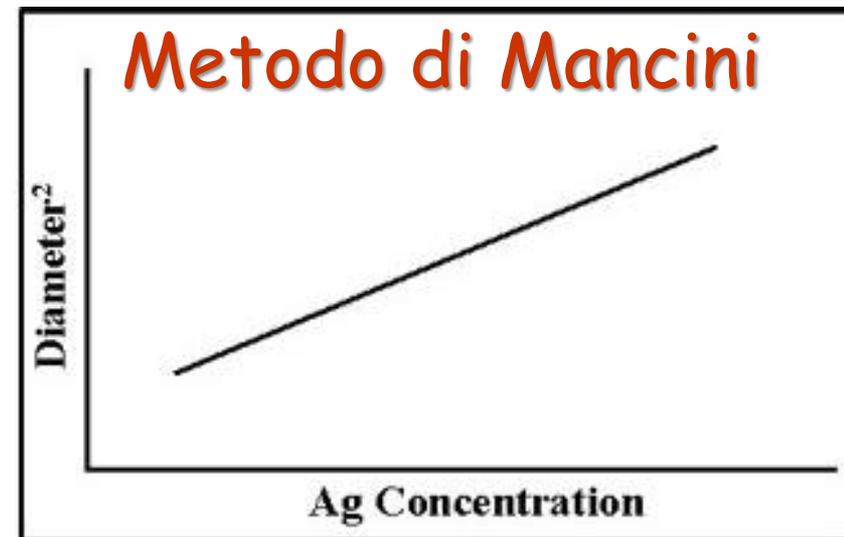
- **Ab** incorporato in un gel di agarosio a 56°C.



- **Ag** aggiunto in pozzetti → **diffusione** → formazione di un **gradiente** → **anelli di ppt** al punto di equivalenza.

- Possibile realizzazione di una curva standard → **test quantitativo**.

- \varnothing degli anelli proporzionale alla **[Ag]**.

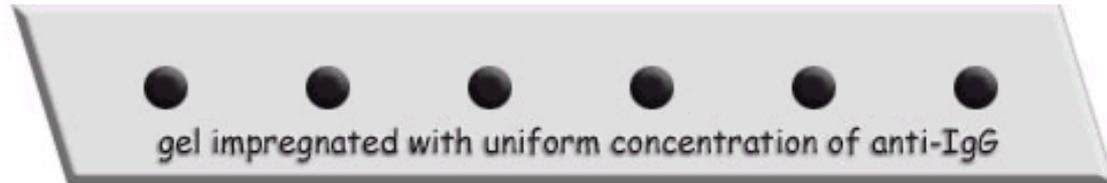


ESEMPIO DI SRID

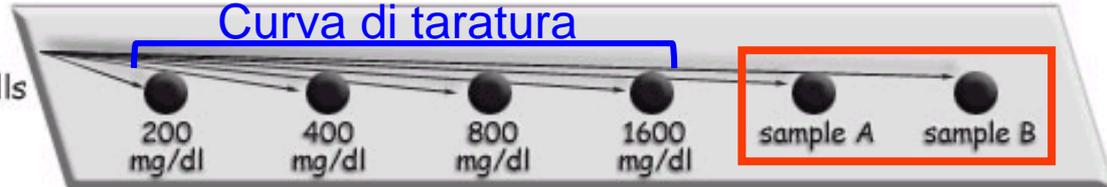
Usata per misurare la concentrazione totale di **IgG** e **IgM** in alcune patologie. **L'Ag cercato può esser un Ab!**

REAGENTS:

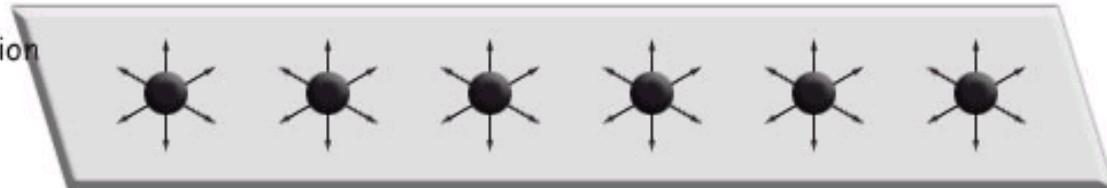
agar gel impregnated with antiglobulins (anti-IgG)



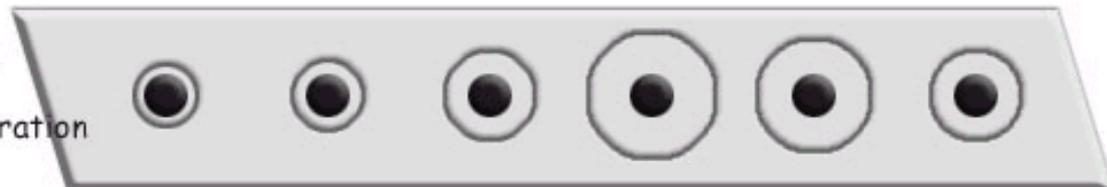
1. add serum sample & IgG standards to wells



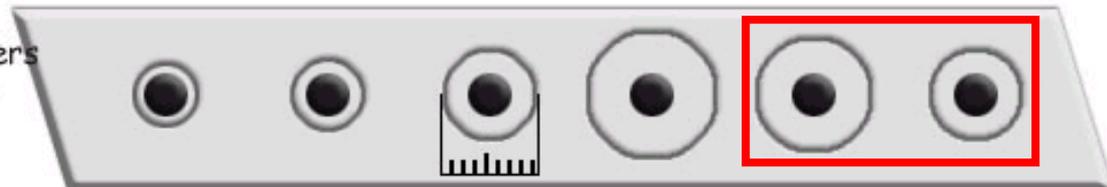
2. allow time for diffusion of IgG's into gel



3. precipitin rings form at site of optimal IgG:anti-IgG concentration

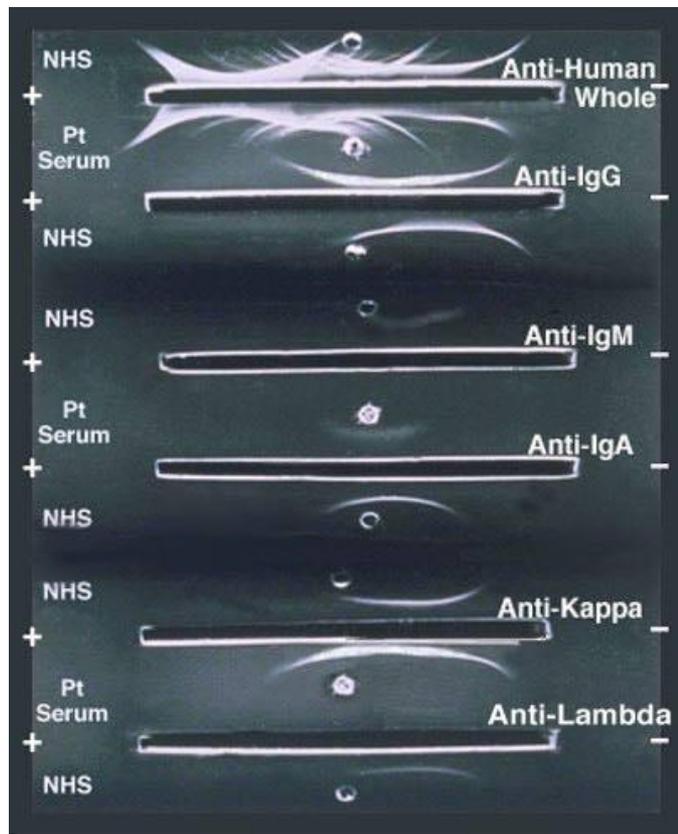


4. measure ring diameters (proportional to IgG concentrations)



IMMUNOELETTROFORESI

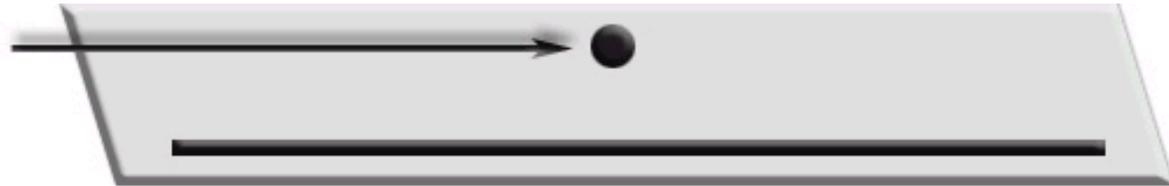
1. **Miscela di Ag**, separati per **elettroforesi** su agarosio.
2. Deposizione e **diffusione** di un **Ab**.
3. Formazione di **archi** di precipitazione (zona di equivalenza).



- Misura **qualitativa**.
- Possibile stima **quantitativa** (spessore delle bande di precipitazione).
- Es. analisi: le componenti seriche.
- **NB** **Risparmio di Ab!**

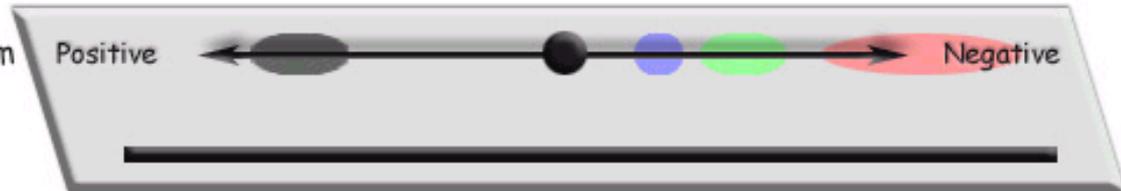
IMMUNOELETTROFORESI

1. Add serum to well

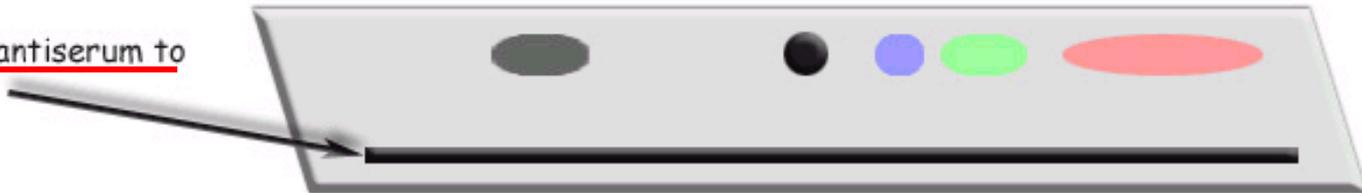


2. Electrophorese serum proteins

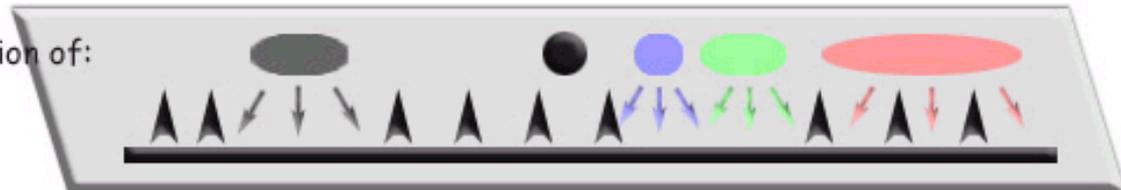
Positive ← ● ● ● ● → Negative



3. Add antiserum to slot



4. allow time for diffusion of:
• serum proteins
• Ab's in antiserum

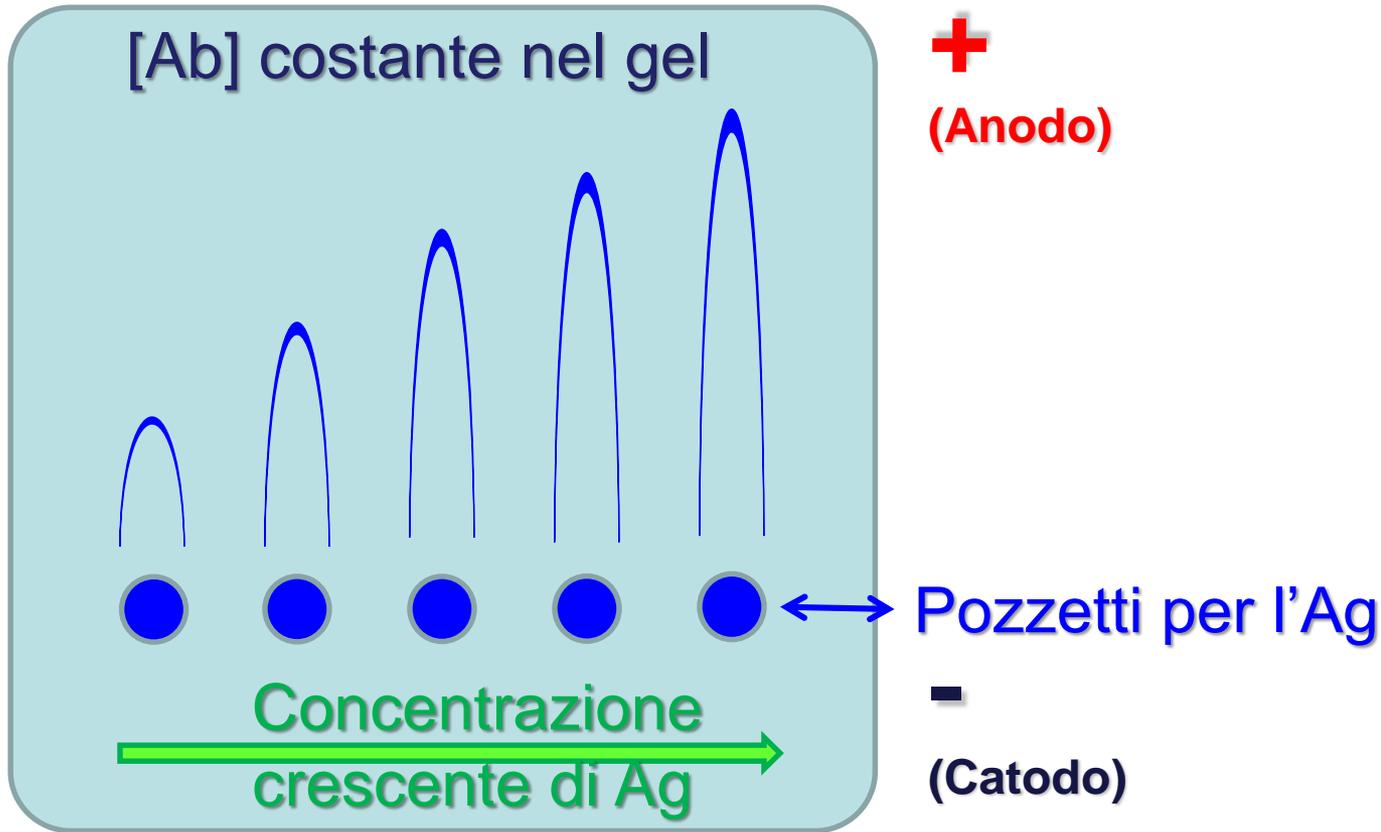


5. stain gel & read precipitin lines



Usata su campioni di **siero**, **urina**, e liquido spinale.

IMMUNOELETTROFORESI ROCKET



Modificazione della SRID

Bande di precipitazione a forma di razzo, la cui **AREA** (o h) è proporzionale alla $[Ag]$.
Tecnica quantitativa.

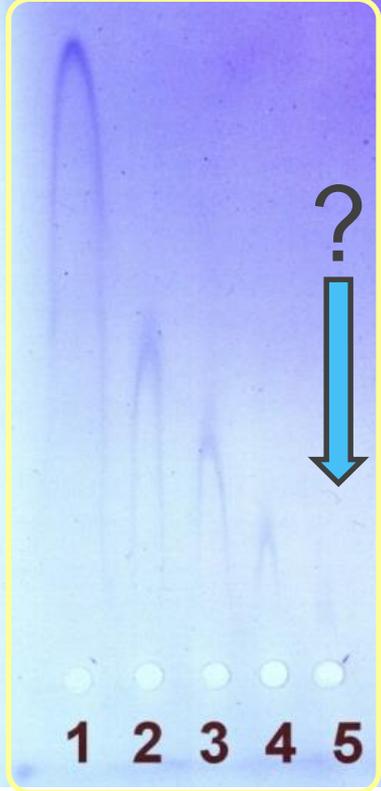
IMMUNOELETTROFORESI ROCKET

Valida solo per Ag con pI bassi.

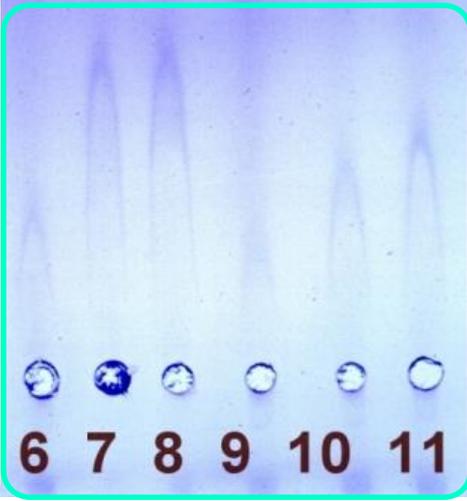
Gel di agaroso



Curva di taratura



Campioni

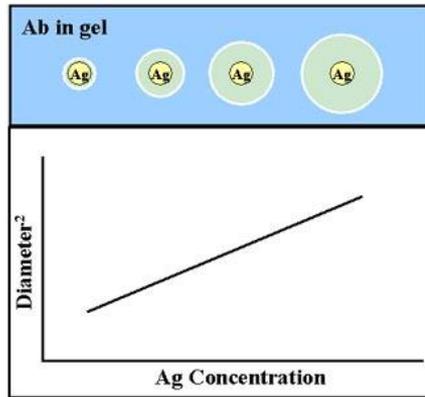


Ag: pI basso per garantire una carica **negativa** al pH del gel.

Ab: preferibilmente con carica **nulla** o **positiva**, come normalmente avviene a **pH 8.6**.

CONFRONTO FRA TECNICHE

SRID

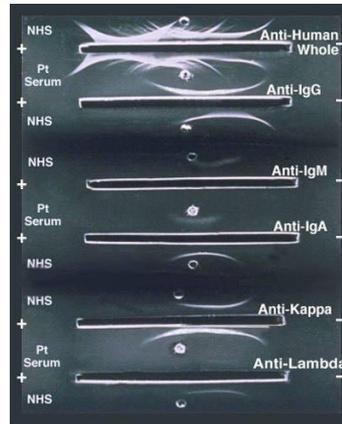


Diffusione

e

precipitazione

IMMUNOELETTROFORESI



Elettroforesi,

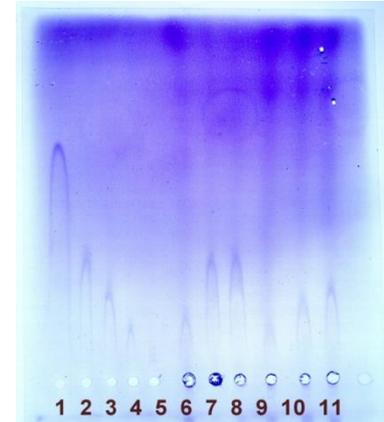
poi

diffusione

e

precipitazione

IMMUNOELETTROFORESI ROCKET

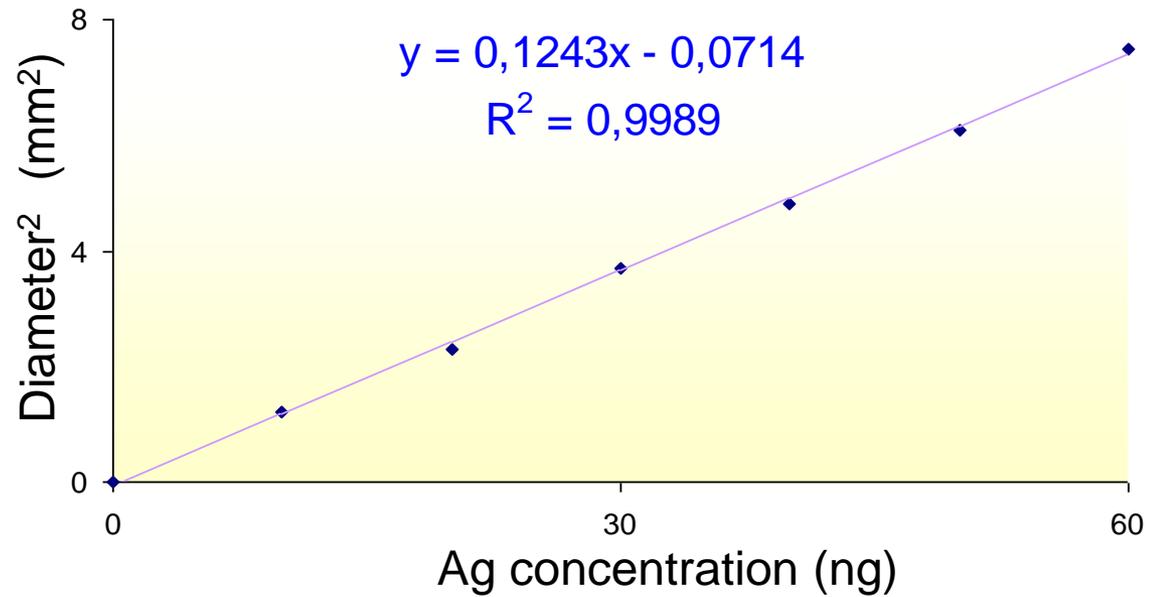
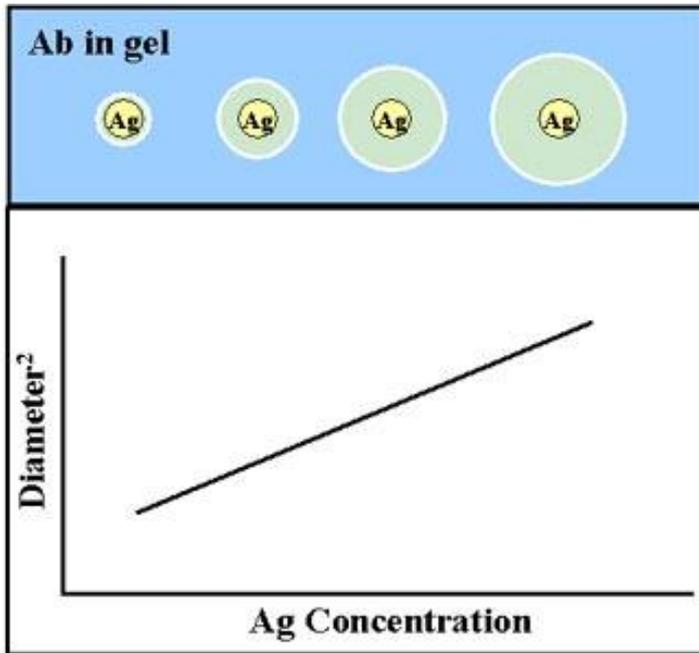


Elettroforesi

e

precipitazione

ESERCIZIO SULLA SRID



$$Y = 4.2 \text{ mm}^2$$

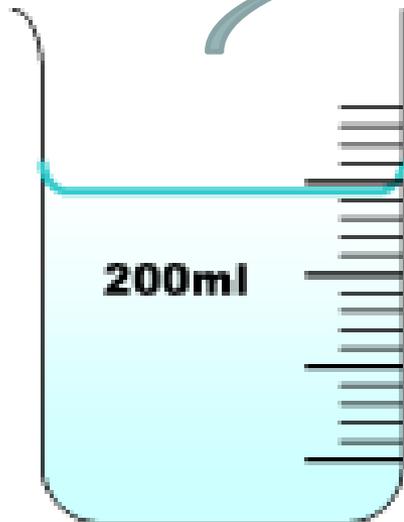
$$X = 34.4 \text{ ng}$$

DILUIZIONI

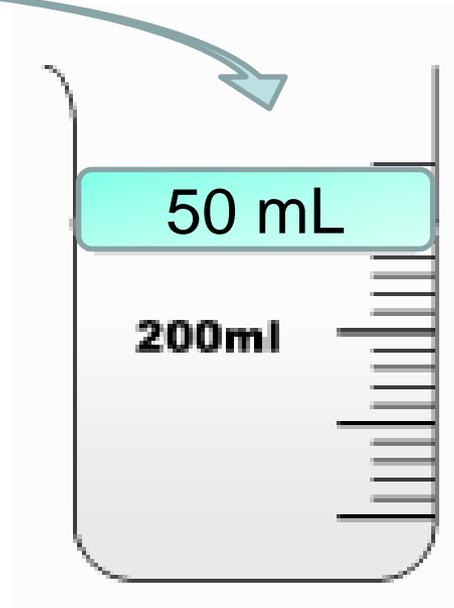
Soluzione A

50 mL

Soluzione B



Concentrazione
iniziale (C_i o C_1) = 100 mM



Concentrazione
finale (C_f o C_2)?

Quanto sono V_1 e V_2 ?

Conti di laboratorio più frequenti

Molarità (M) = n° moli soluto/Litro di soluzione
n° moli = massa/PM

% p/p: 10% p/p di KCl

10 g di soluto in 100 g di soluzione, ovvero 10 g di KCl + 90 g di solvente (es. H₂O).

% p/V: 10% p/V di KCl

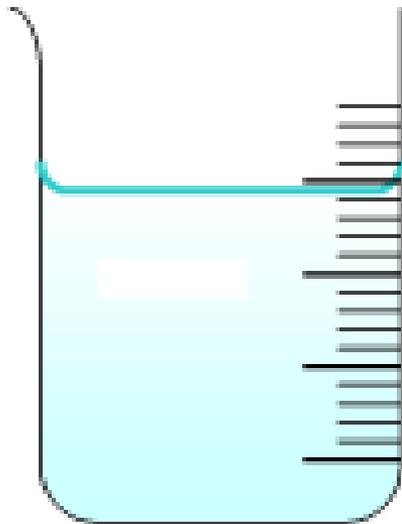
10 g di soluto in 100 mL di soluzione, cioè 10 g di sale portati a volume sino a 100 mL, con H₂O

% p/V = % p/p . d (densità)

d = Massa/Volume

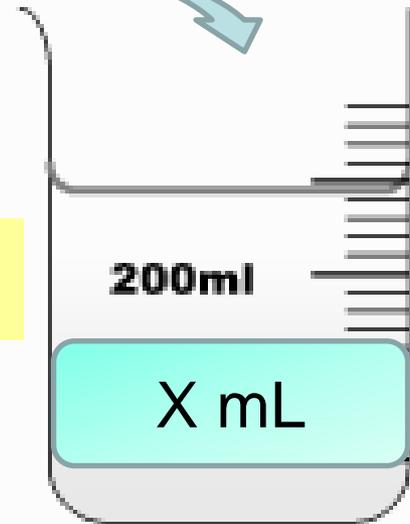
DILUIZIONI : **$C1.V1 = C2.V2$**

Soluzione A



X mL

Soluzione B



$$C1 \cdot V1 = C2 \cdot V2$$

$$C1 = 4X$$

$$V1 = \dots \text{ mL}$$

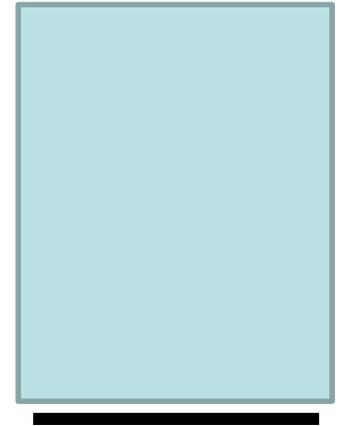
$$C2 = 1X$$

$$V2 = 200 \text{ mL}$$

Condizioni sperimentali

GEL di PAA 8% (15 mL)

TBE 5X	→ 1X
Acril/bisAcril 40%	→ 8%
APS	→ 0.66%
TEMED 10 μ M	→ 10 nM
H ₂ O	



15 mL

m → μ → n