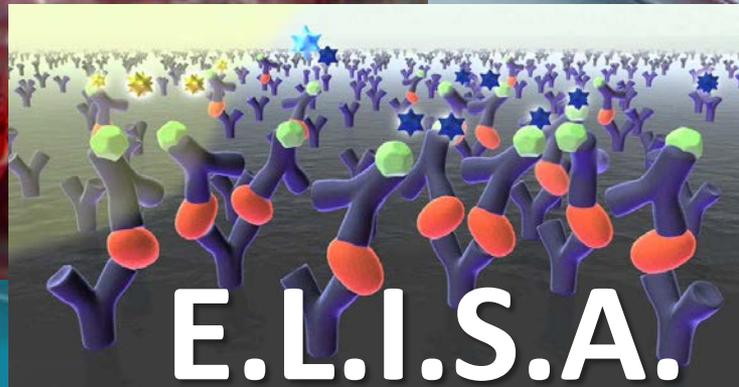
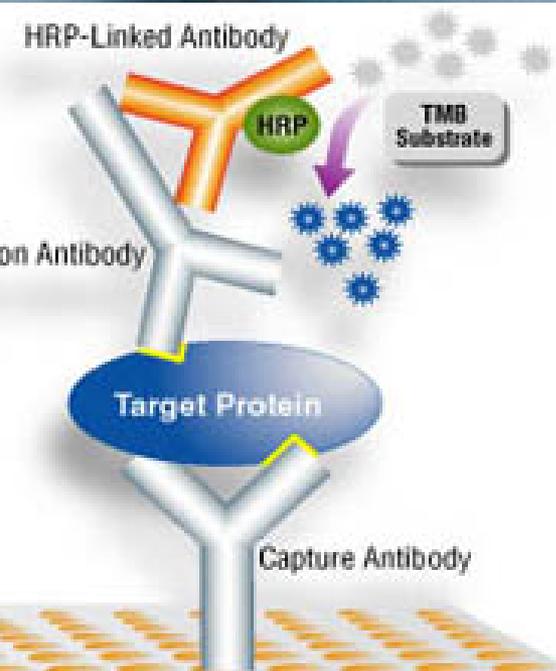


IMMUNODOSAGGI o DOSAGGI IMMUNOLOGICI



E.L.I.S.A.



Sandwich Elisa



Alcune applicazioni degli anticorpi in ricerca (tecniche immunochimiche)

Scopo sperimentale:

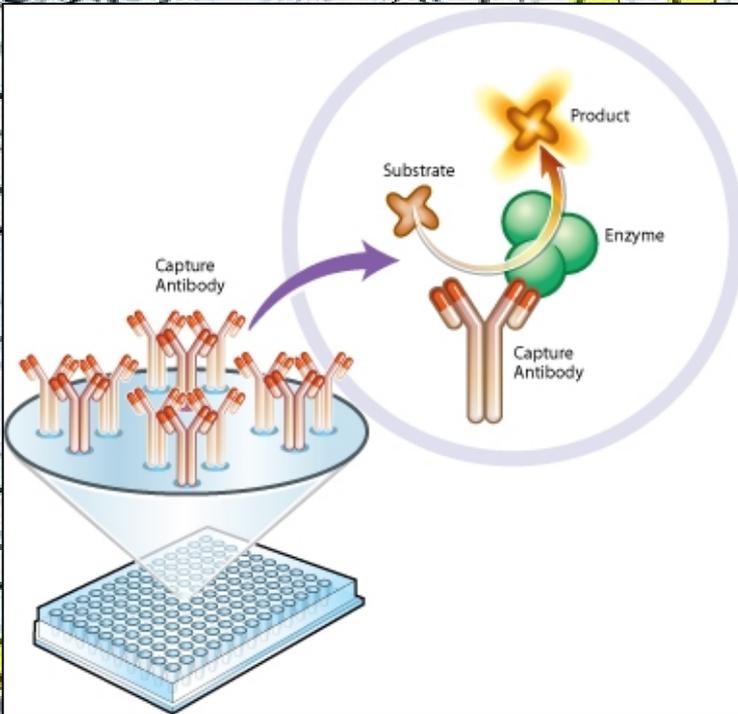
- ❑ **IDENTIFICARE** un determinato antigene (tecnica **QUALITATIVA**)
- ❑ **QUANTIFICARE** un determinato antigene (tecnica **QUANTITATIVA**)

Approccio sperimentale:

- ❑ **Western Blotting** (tecnica **QUALITATIVA**)
- ❑ **ELISA** (saggio **QUANTITATIVO**)

ELISA

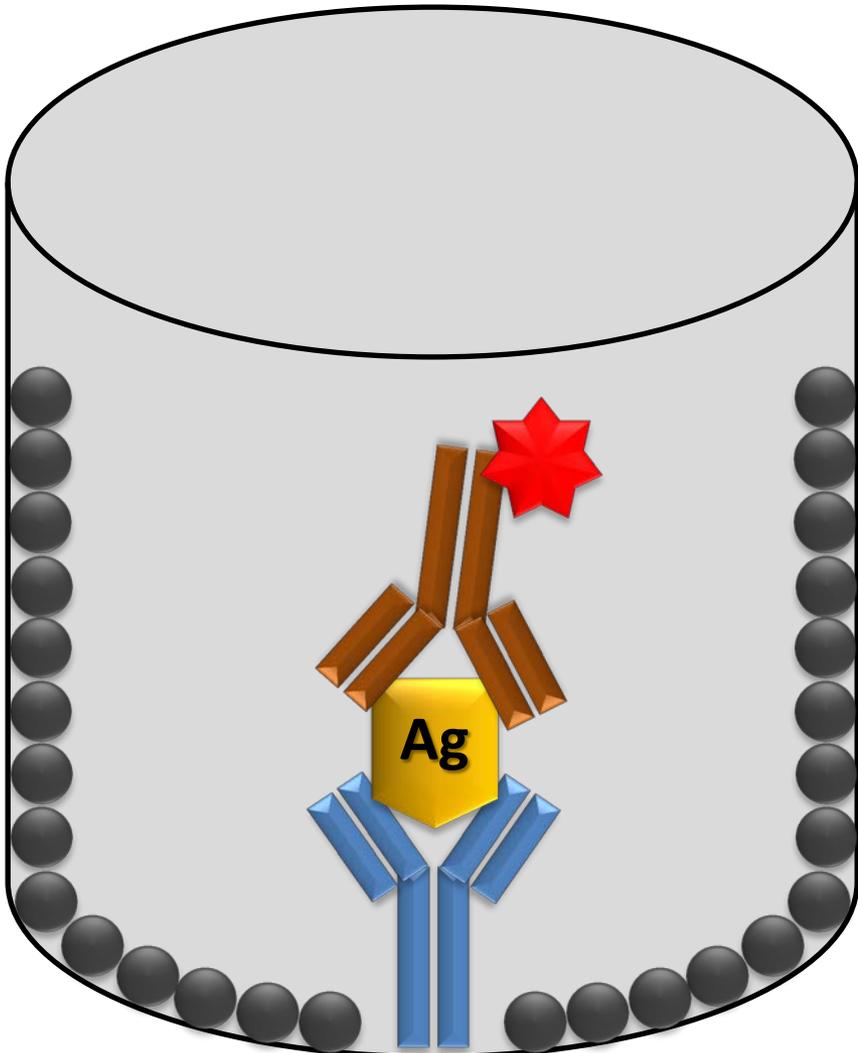
Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay



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

Saggio ELISA - Fasi sperimentali

Enzima = Anticorpo secondario = Antigene



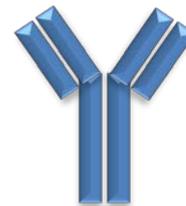
Anticorpo secondario
marcato



Antigene



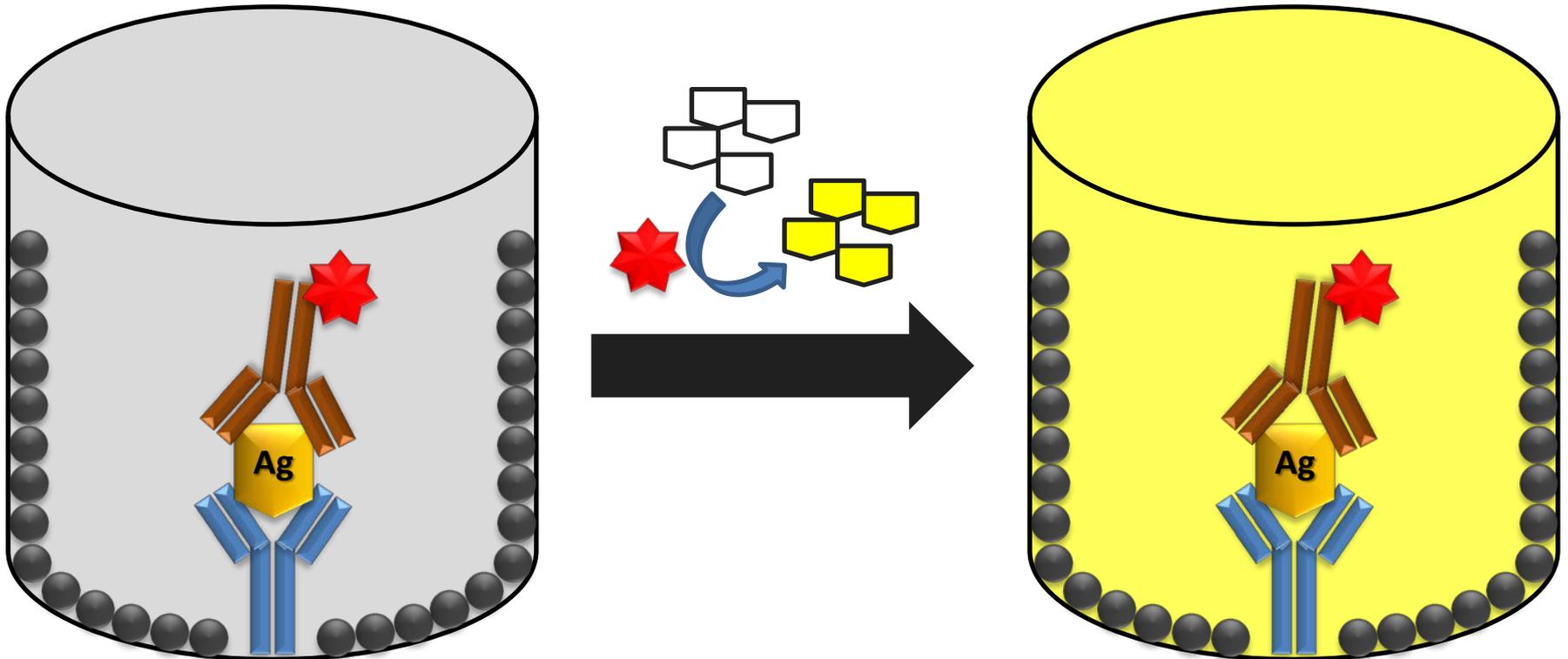
Proteina bloccante



Anticorpo immobilizzato

Saggio ELISA - Fasi sperimentali

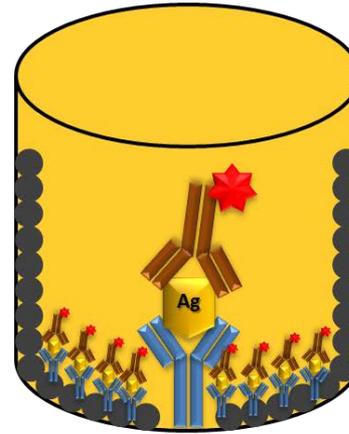
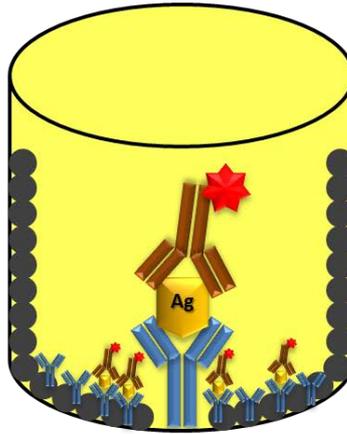
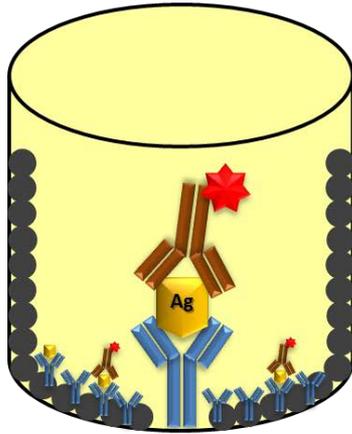
La rilevazione è data dall'aggiunta di una **quantità costante** di **substrato** all'interno di ogni pozzetto in cui si sono formati, o meno, gli immunocomplessi



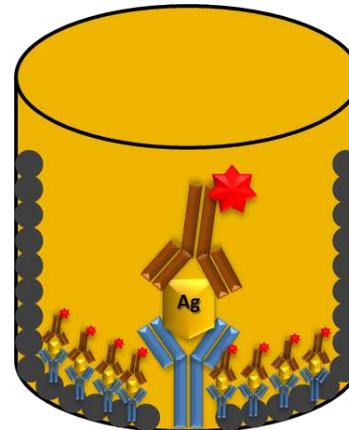
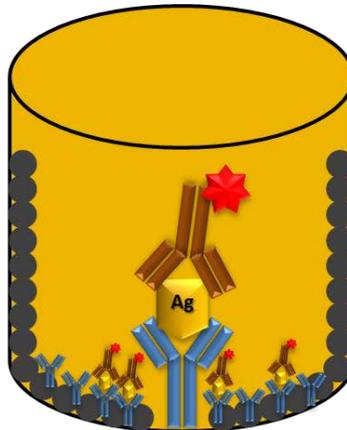
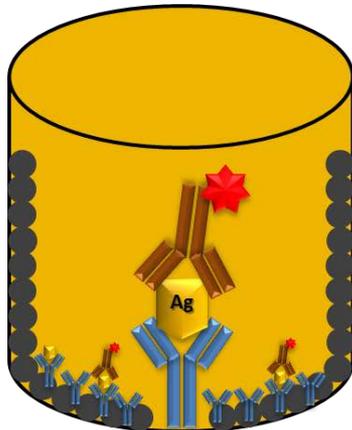
Reazione **COLORIMETRICA**, in cui **l'intensità del colore è PROPORZIONALE** al numero di immunocomplessi formati, quindi alla **CONCENTRAZIONE DI ANTIGENE**

Saggio ELISA - Fasi sperimentali

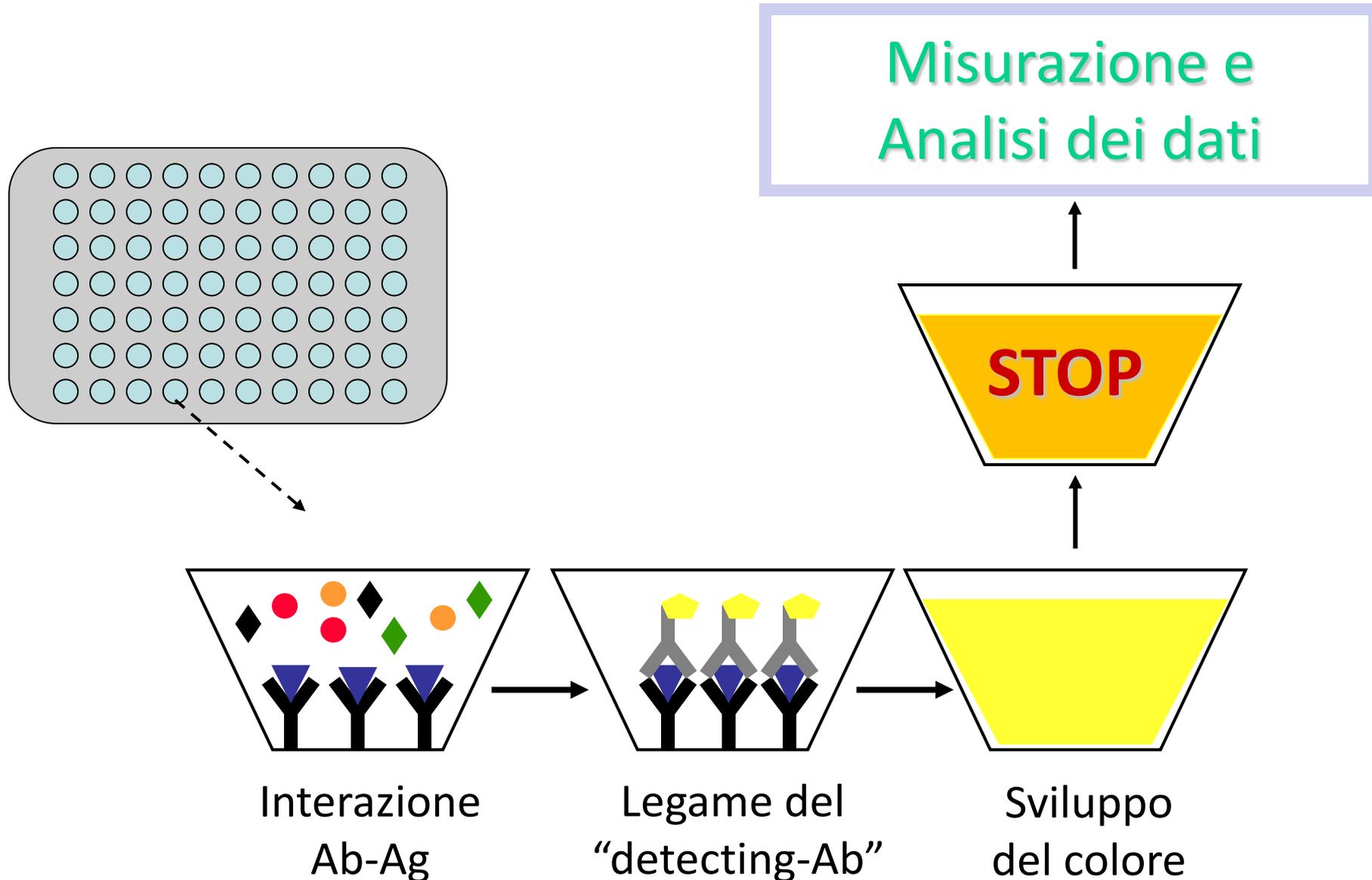
Blocco della reazione con acido forte



Concentrazione Antigene



Schema sperimentale



Come interpretare i risultati

Determinazione spettrofotometrica del colore

Il risultato viene fornito in forma di **Densità Ottica (OD)**, numero adimensionale

Measurement mode:
Measurement wavelength:
Read mode:

Absorbance
492 nm
Normal

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	

Serve un

INTERPRETE

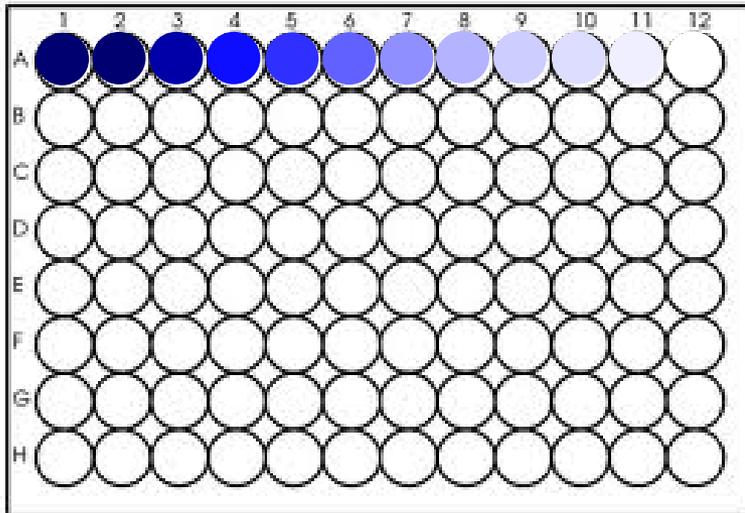
(curva di taratura)

per associare i
valori di OD a valori
di concentrazione

La curva di taratura

Indispensabile per la quantificazione perché la lettura allo **spettrofotometro** fornisce una **risposta di tipo relativo**

- ❑ Contiene la **STESSA molecola** che si vuole ricercare e quantificare
- ❑ Viene preparata con **diluizioni seriali** della proteina di riferimento
- ❑ Ogni singolo punto della curva di taratura è a **concentrazione NOTA**



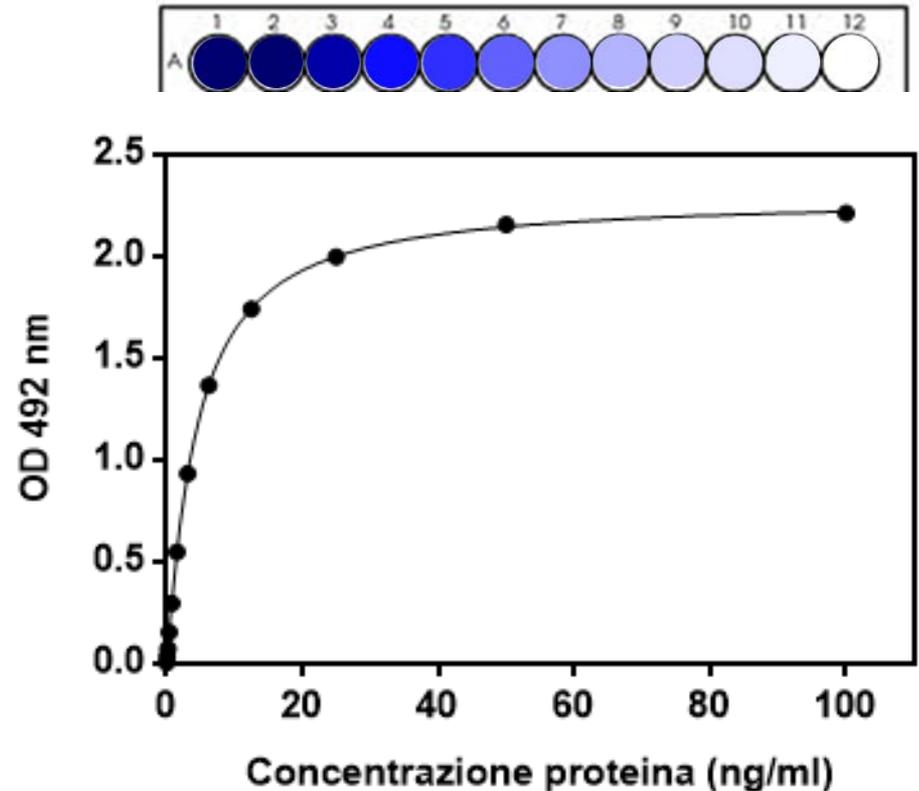
→ Pozzetti contenenti la curva di taratura

Pozzetto	[ng/ml]
A1	100
A2	50
A3	25
A4	12,5
A5	6,25
A6	3,125
A7	1,563
A8	0,781
A9	0,391
A10	0,195
A11	0,098
A12	0,000

Relazione tra segnale e concentrazione del campione

Si ottiene un grafico all'interno del quale il **valore sperimentale (OD, asse y)** viene posto **in funzione della concentrazione (NOTA, asse x)** dei punti della curva di taratura

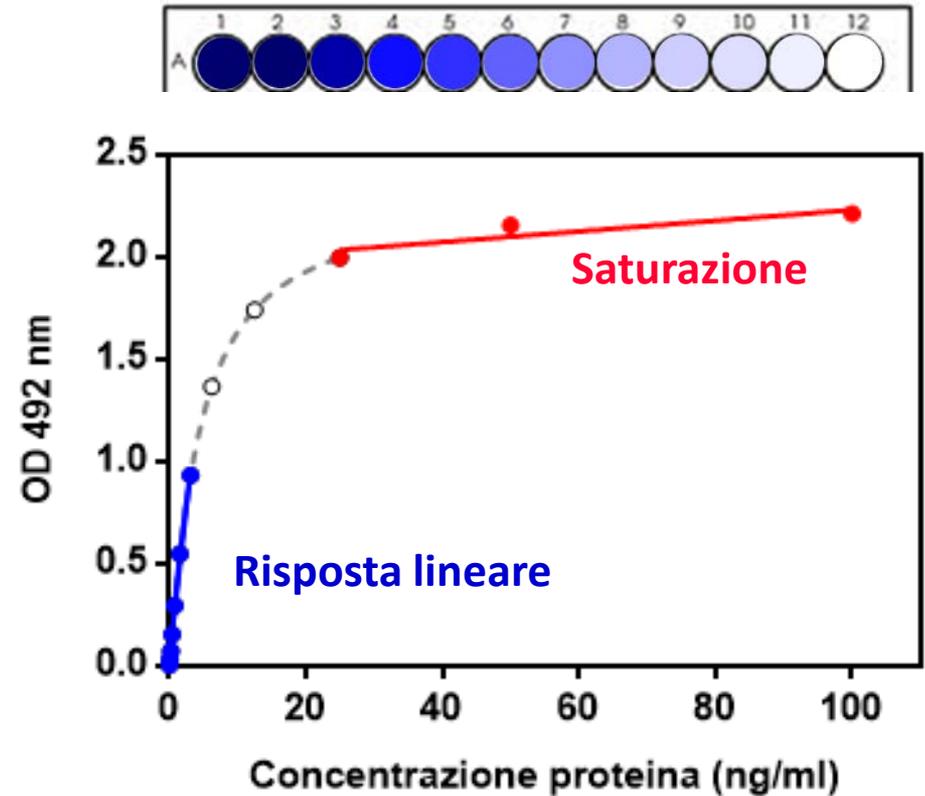
Pozzetto	[ng/ml]	OD	OD-bianco
A1	100	2,2920	2,2090
A2	50	2,2370	2,1540
A3	25	2,0770	1,9940
A4	12,5	1,8220	1,7390
A5	6,25	1,4470	1,3640
A6	3,125	1,0140	0,9310
A7	1,563	0,6280	0,5450
A8	0,781	0,3750	0,2920
A9	0,391	0,2340	0,1510
A10	0,195	0,1530	0,0700
A11	0,098	0,1160	0,0330
A12	0,000	0,0830	0,0000



Relazione tra segnale e concentrazione del campione

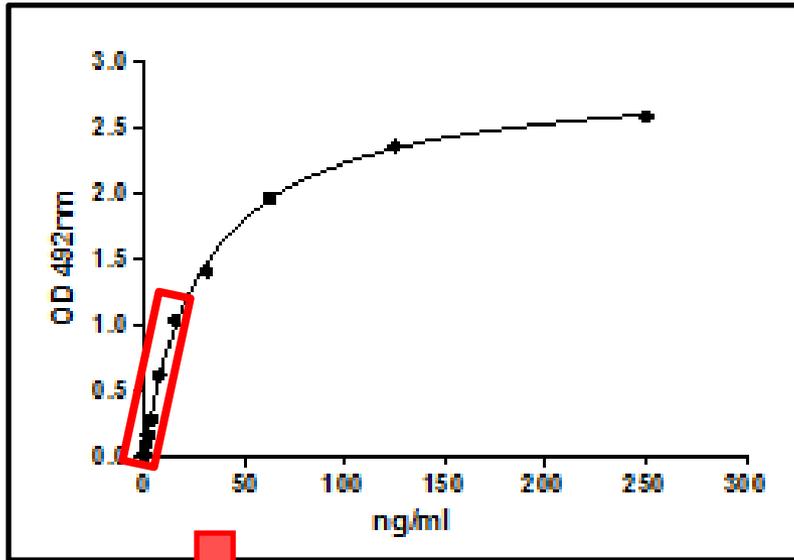
Si ottiene un grafico all'interno del quale il **valore sperimentale (OD, asse y)** viene posto **in funzione della concentrazione (NOTA, asse x)** dei punti della curva di taratura

Pozzetto	[ng/ml]	OD	OD-bianco
A1	100	2,2920	2,2090
A2	50	2,2370	2,1540
A3	25	2,0770	1,9940
A4	12,5	1,8220	1,7390
A5	6,25	1,4470	1,3640
A6	3,125	1,0140	0,9310
A7	1,563	0,6280	0,5450
A8	0,781	0,3750	0,2920
A9	0,391	0,2340	0,1510
A10	0,195	0,1530	0,0700
A11	0,098	0,1160	0,0330
A12	0,000	0,0830	0,0000

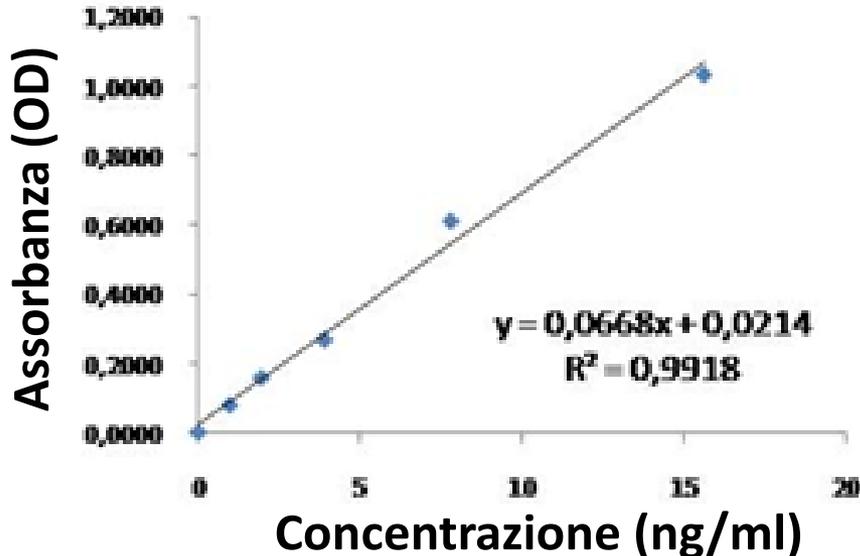


L'equazione che descrive la curva permette di **CALCOLARE la concentrazione** di **analita** presente nel **campione** di indagine.

Come si utilizza la curva di taratura



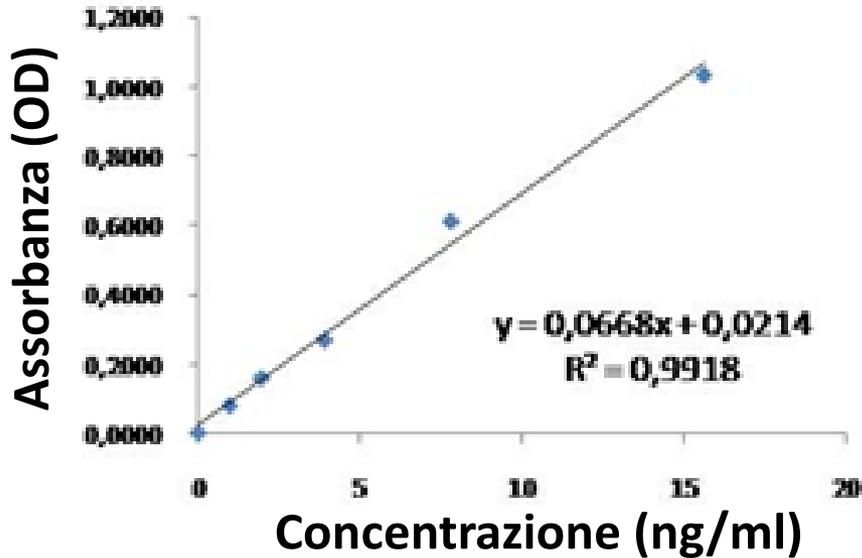
Determinazione ottimale dei valori di concentrazione nella parte lineare della curva



$$y = mx + q$$

y = valore sperimentale (OD)
 x = concentrazione campione

Come si utilizza la curva di taratura



$$y = m x + q$$

y = valore sperimentale (OD)

x = concentrazione campione

$$y = m x + q$$

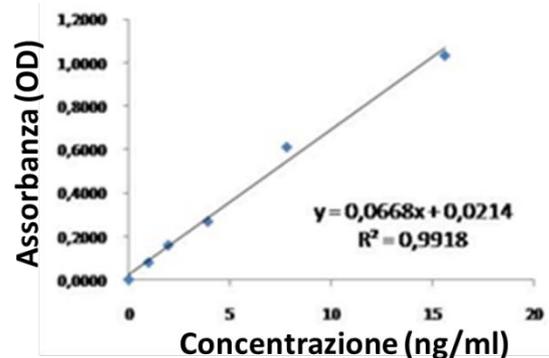
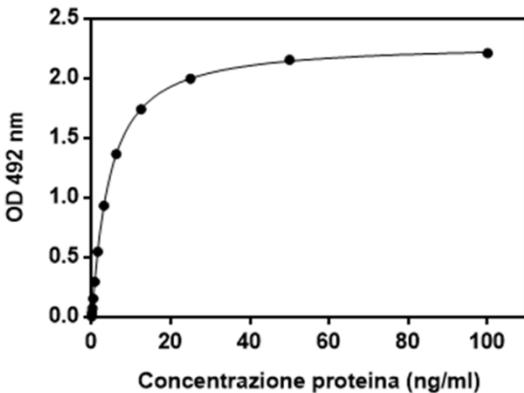
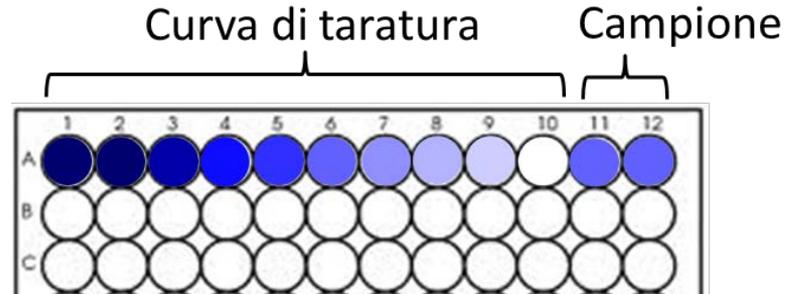
Campione:
OD = 0,666

$$\longrightarrow x = \frac{(y - q)}{m} \longrightarrow x = \frac{(0,666 - 0,0214)}{0,0668}$$

$$X = 9,6 \text{ ng/ml}$$

Riepilogo applicativo della tecnica E.L.I.S.A.

- Tecnica quantitativa che utilizza anticorpi per determinare la concentrazione di un analita (a concentrazione incognita)
- Il valore sperimentale ottenuto viene confrontato con i valori relativi ad una curva di taratura a concentrazione nota



Valore sperimentale (OD)
campione

**Concentrazione
campione**