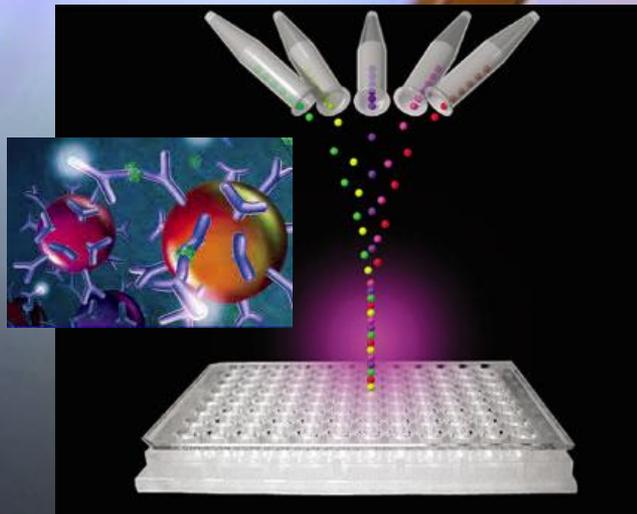
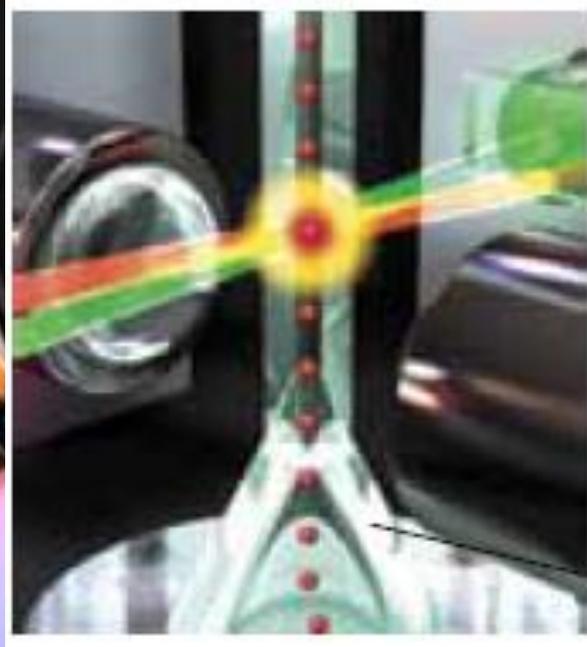
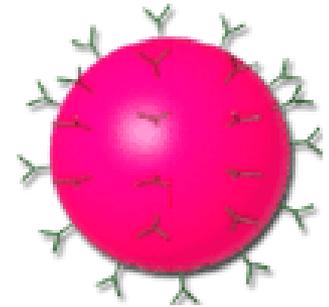


BIOPLEX

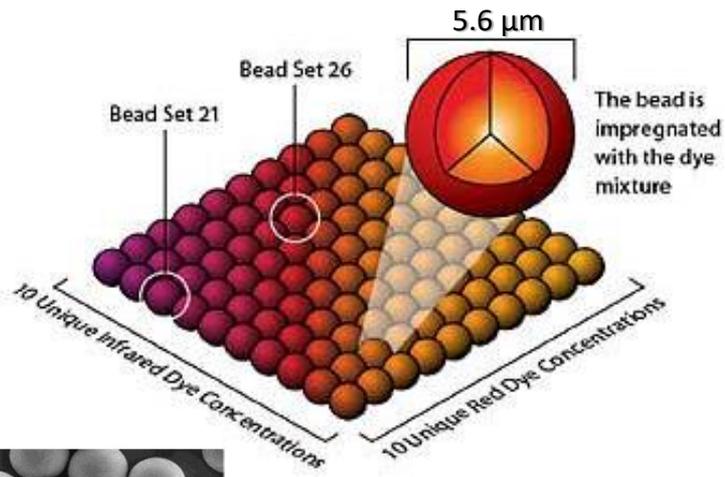


BIOPLEX o MULTIPLEX

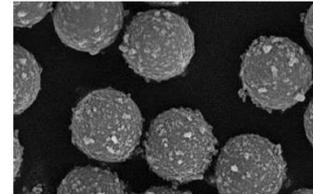
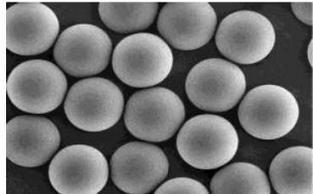
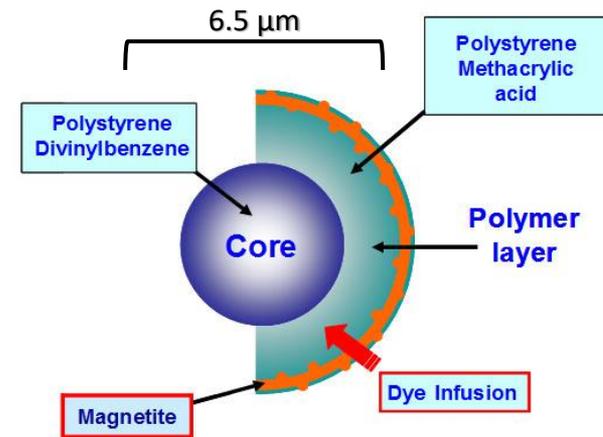
Dosaggio basato su microsfere di **polistirene** del diametro di **5.6 μm** o **6.5 μm** , a seconda del tipo di microsfera, caratterizzate da grande superficie disponibile per legare un anticorpo specifico per l'analita che si vuole quantificare.



Non magnetiche

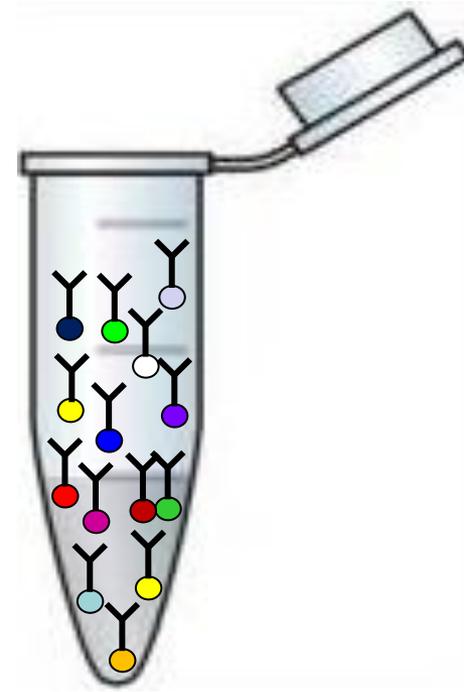
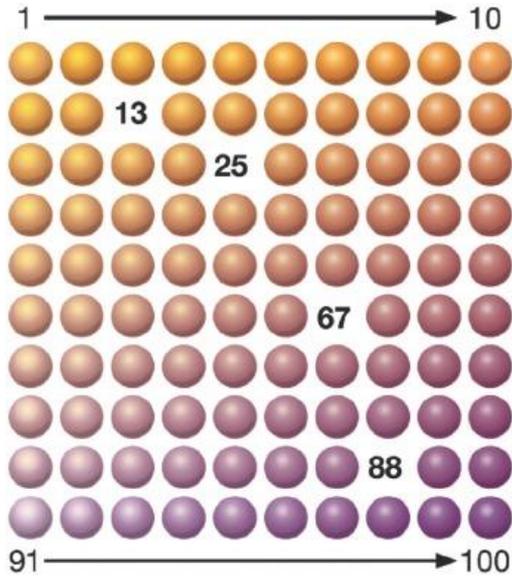


Magnetiche



BIOPLEX

Le microsfere sono coniugate a **2 fluorocromi** in rapporti di concentrazione diversi, a dare fino a **100 diverse colorazioni**.

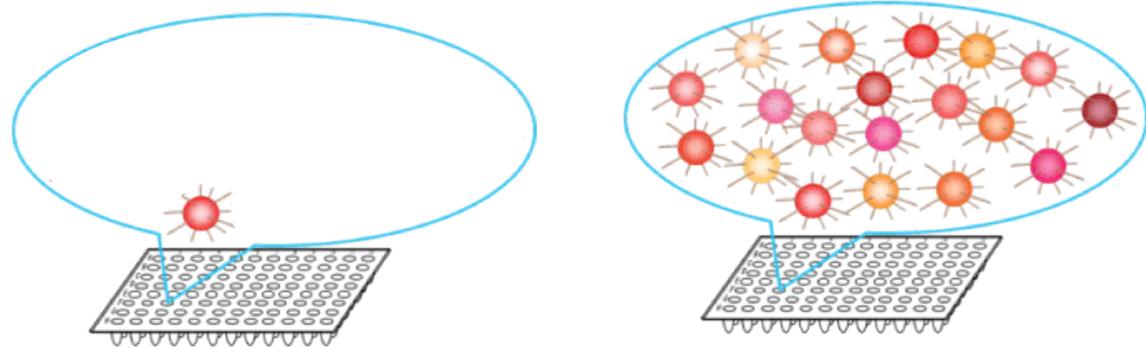


Ogni diversa **microsfera** (determinata da **un solo colore**), sarà legata ad **un anticorpo** specifico per un diverso analita.

Rilevazione di più analiti, **fino a 100 in uno stesso campione**.

→ Ogni **analita** ha **coordinate precise** ←

BIOPLEX vs ELISA



	ELISA	Bio-Plex
Number of cytokines	27	27
Number of samples	80	80
Total data points	2,160	2,160
Number of 96-well plates	27	1
Data points per plate	80	2,160
Total time required	>60 hr	3 hr

Un saggio al **Bioplex** equivale a **numerosi ELISA** in parallelo

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) **lavaggi tramite aspirazione** della soluzione tampone (procedimento diverso a seconda del tipo di microsfere);

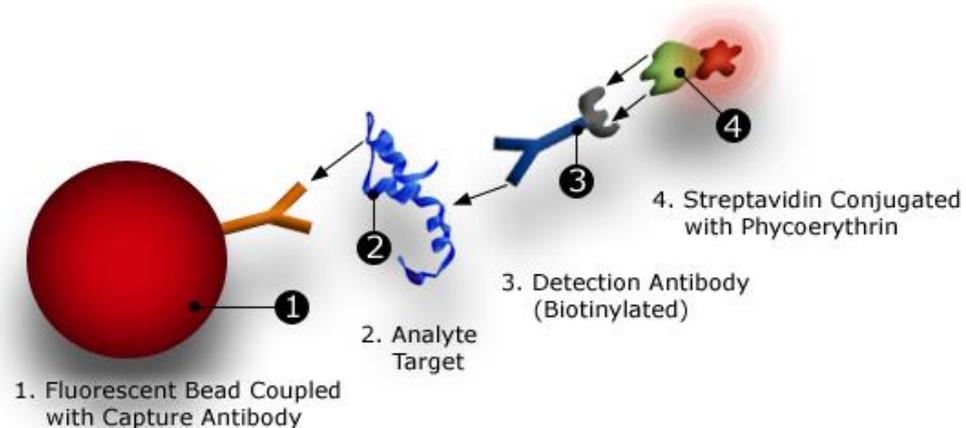
4) Aggiunta di un secondo **anticorpo**, coniugato a **biotina**, che lega l'analita in un sito diverso rispetto all'anticorpo legato alla microsfera;

5) Lavaggi;

6) Aggiunta di **streptavidina** coniugata ad un terzo fluoroforo;

7) Lavaggi;

8) Risospensione delle microsfere in un tampone di lettura.



SAGGIO AL BIOPLEX SISTEMA DI LAVAGGIO

Microsfere

Non magnetiche

Aspirazione dal basso

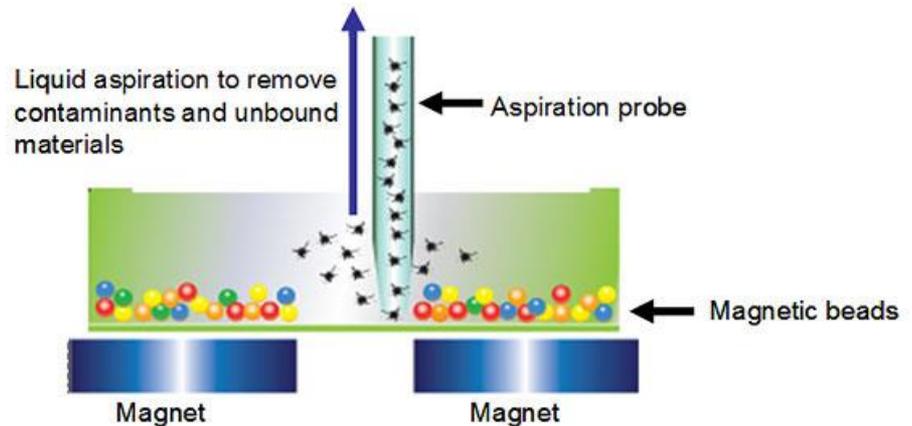


Tutto ciò che ha
dimensione < di 5.6 micron
viene **escluso dall'analisi**

→ **NON le microsfere**

Magnetiche

Aspirazione dall'alto



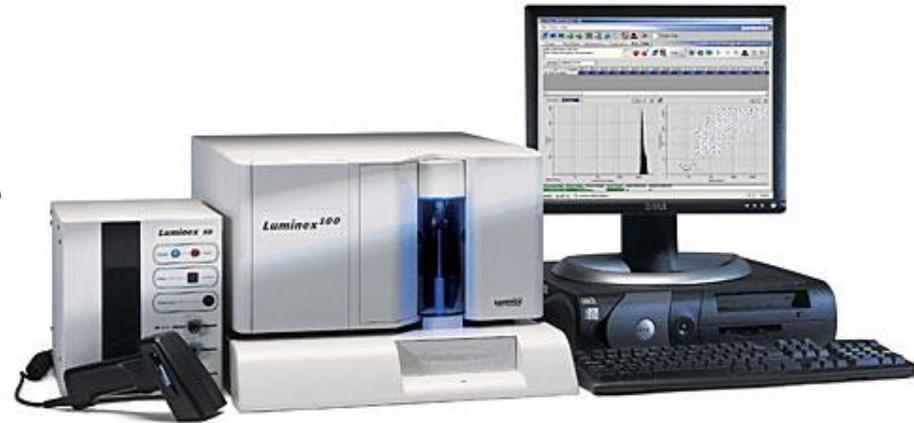
Microsfere
attratte dai
magneti



STRUMENTO BIOPLEX

Rilevazione

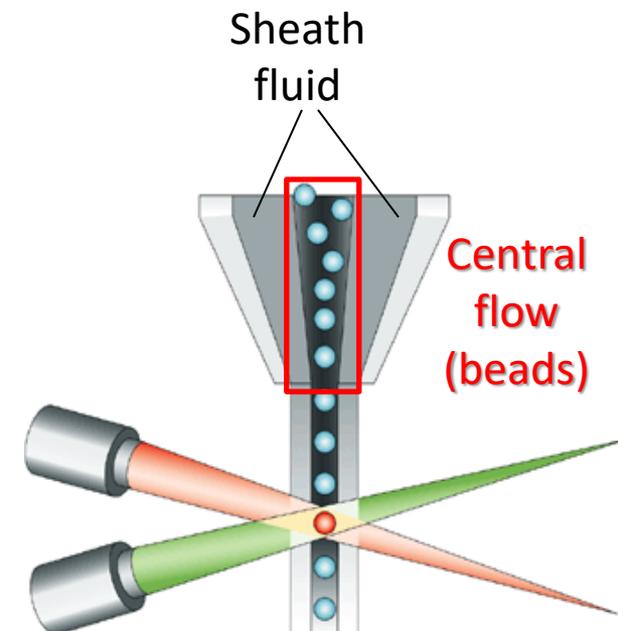
Stesso principio del citofluorimetro.
Le microsfere, aspirate da un ago,
sono portate nella camera di lettura e
fatte **passare una ad una**.



A questo punto vengono colpite da 2 laser.

1° laser: eccita i 2 fluorocromi della microsfera
per **identificare** la combinazione di **colore**, e
quindi la microsfera e il corrispondente **analita**
riconosciuto dall'anticorpo legato

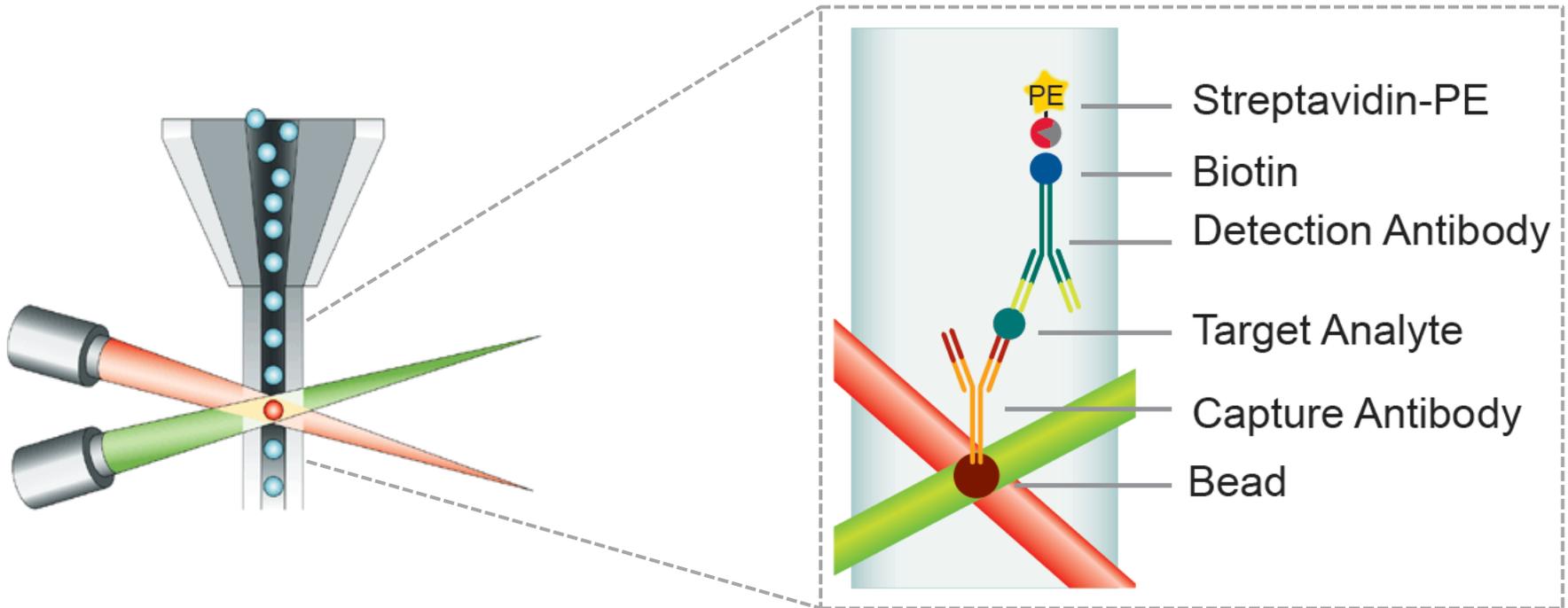
2° laser: eccita il fluoroforo legato sull'**Ab 2°**
per la **quantificazione**



STRUMENTO BIOPLEX

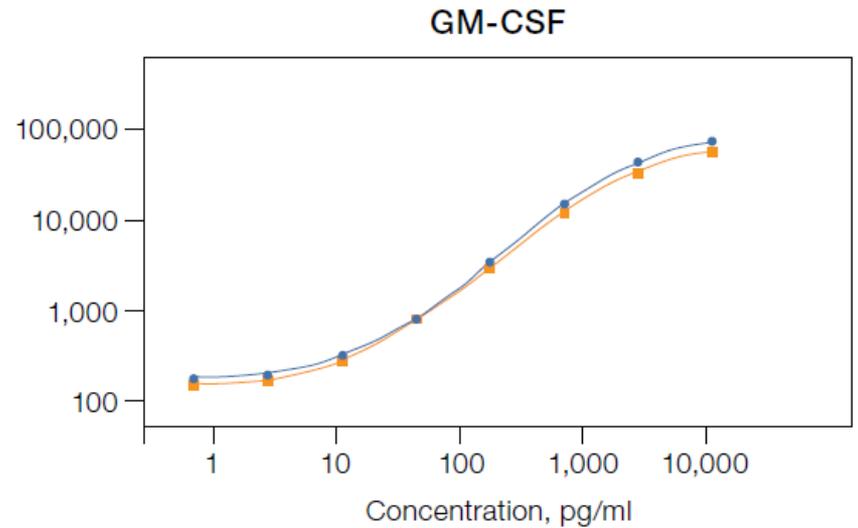
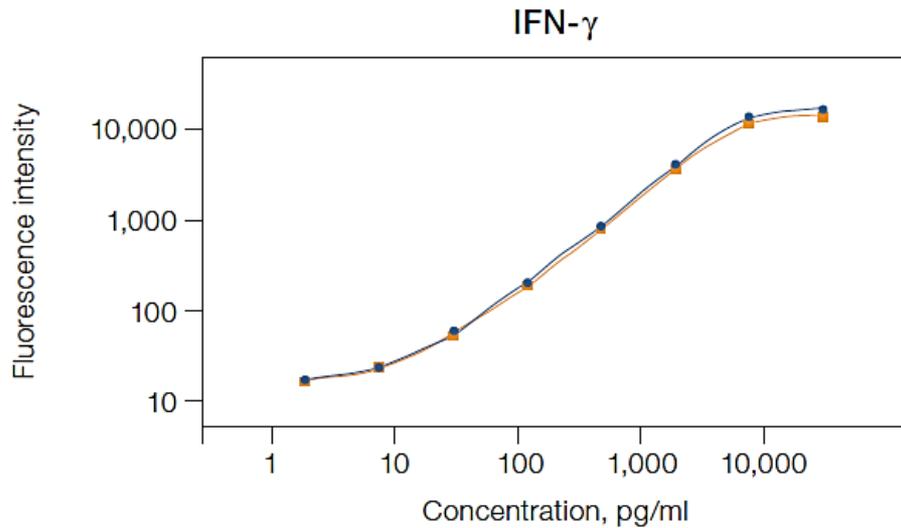
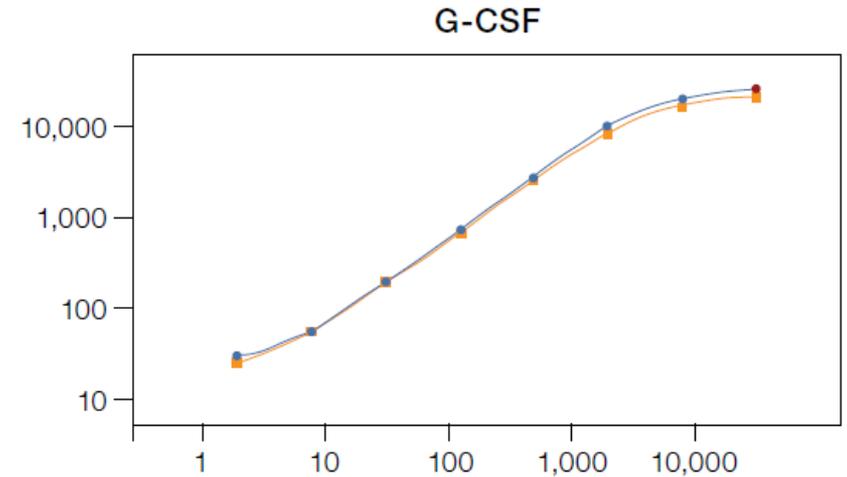
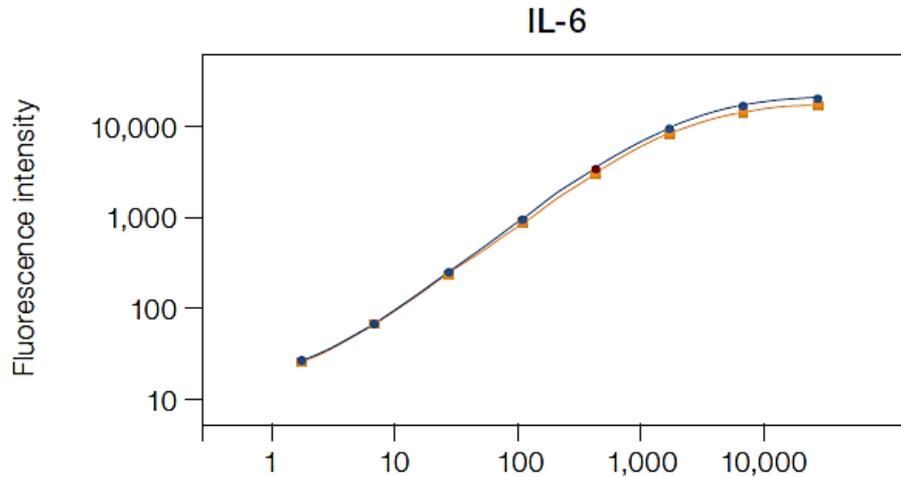
Rilevazione

Nel **punto di lettura** arrivano **soltanto** i complessi contenenti le **microsfere**
NO molecole da sole (Detection Ab, analita, ecc.)



Durante i **lavaggi** tutti i componenti vengono persi, tranne le microsfere

BIOPLEX - Esempio di curve di taratura

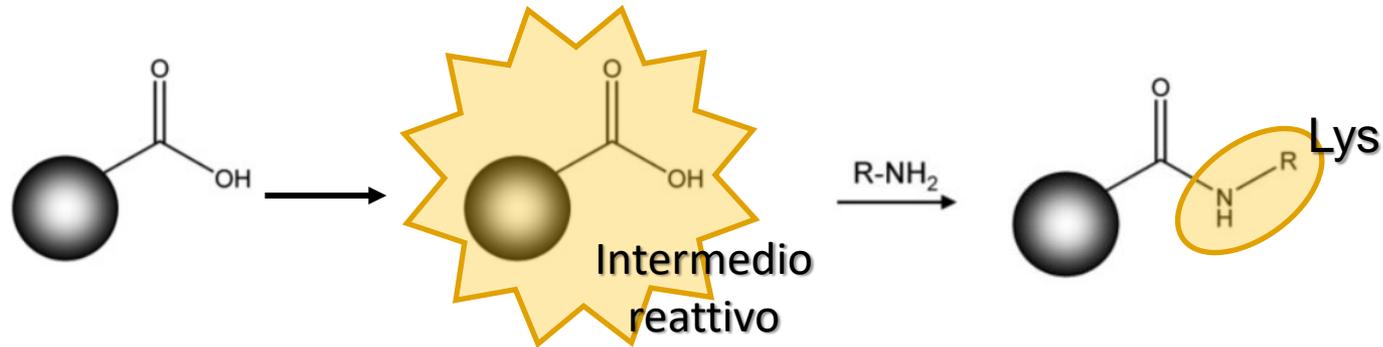


Tecnica e strumento molto utilizzati per la misurazione delle citochine e dei marker dell'infiammazione

ESEMPIO REALE

Bioplex e biglie magnetiche

Possono essere preparate anche biglie "personalizzate" → Coupling



Studies on fluorescent beads

...Functionalisation of activated magnetic fluorescently-tagged carboxyl microbeads (#46) was performed by incubation for 2 h at room temperature with 9 μg of an anti-FVII monoclonal antibody (mAb) in 50 mmol/l 2-N-morpholino ethanesulphonic acid (MES), pH 6.0...

Optimal amount of protein for one coupling reaction

Protein	MW (kD)	Mass (μg)
Insulin	6	5
Human IL-10	18.6	2
Erk	44	11
Mouse IgG	150	9

Si possono legare molecole di dimensioni da 6 kDa (piccole proteine) a 150 kDa (anticorpi)

VANTAGGI

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



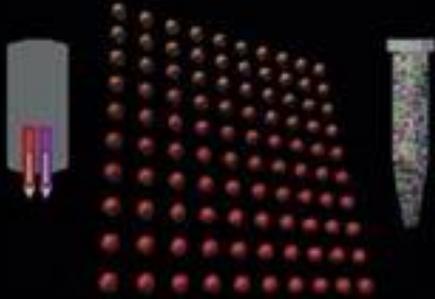
SVANTAGGI

Soprattutto i costi elevati.

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.

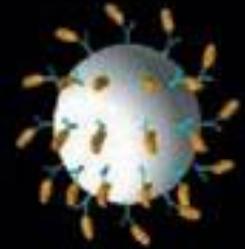
**Microspheres as
Molecular Carriers**



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.

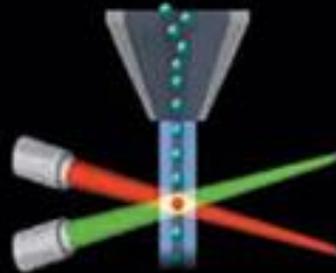
Tagging the Reaction



Fluorescently-labeled reporter tags bind to the sample molecule.

6.

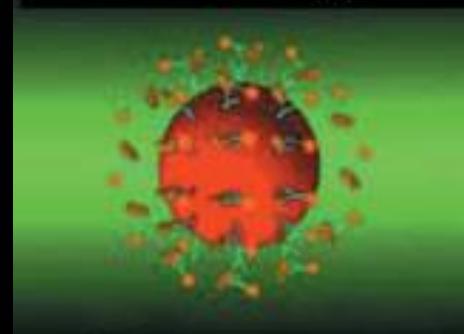
Beads in a Fluid Stream



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

7.

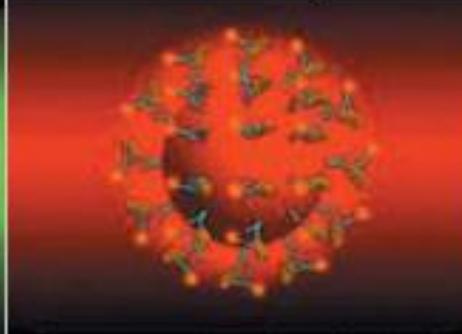
**One Laser Excites
Molecular Tags**



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

8.

**Second Laser
Excites Microsphere**



Fluorescence intensity of the bead identifies the reaction.