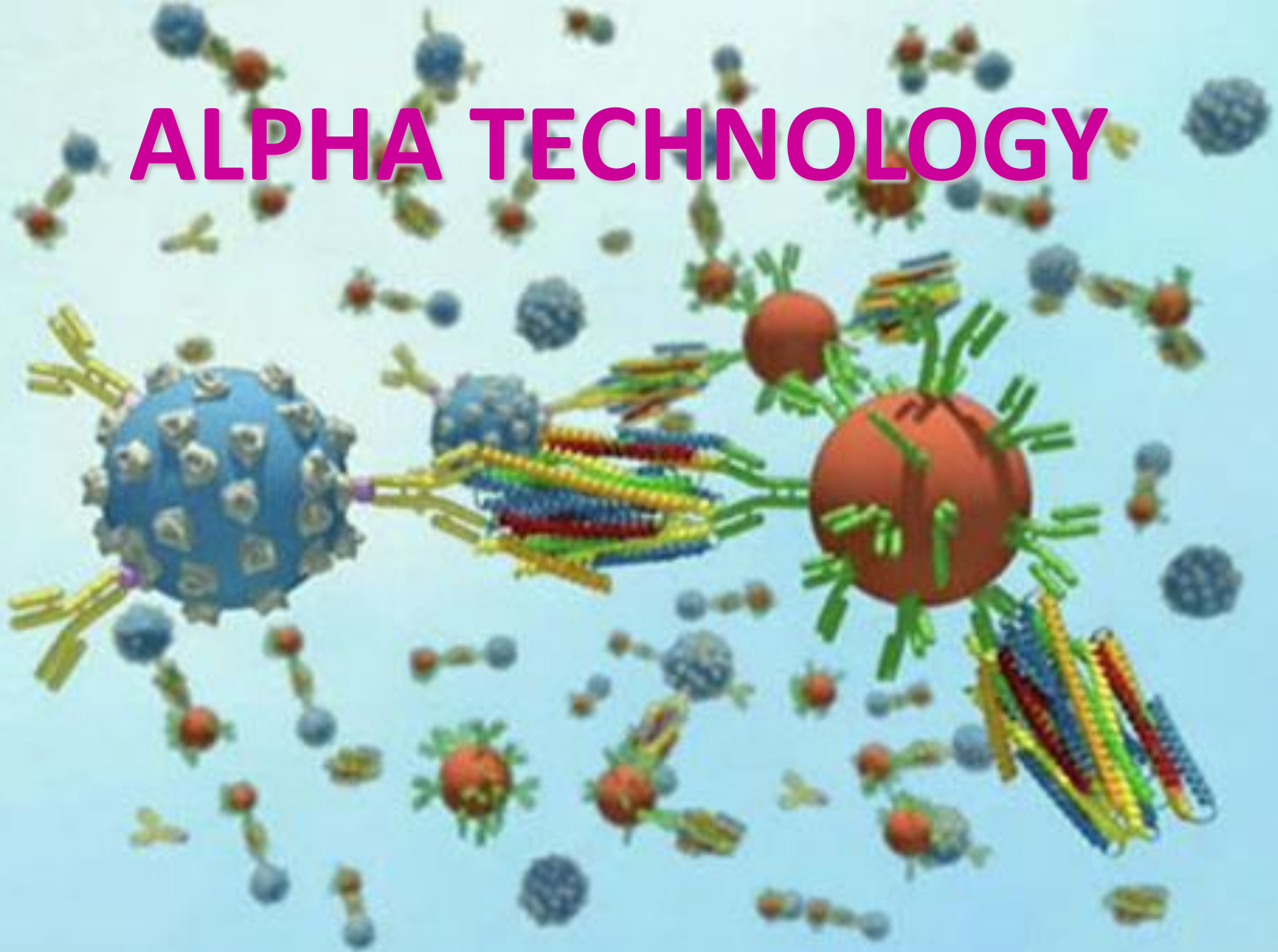


ALPHA TECHNOLOGY



ALPHA TECHNOLOGY

(Amplified luminescent proximity homogeneous assay)

Tecnica basata su biglie!

- Metodo basato sulla **chemiluminescenza**.
- Utilizzabile per lo **studio di interazioni** (da pM a mM).
- **Elevata sensibilità.**
- Eseguibile su piastre da 96, 384 e 1536 campioni
- Utilizzabile per lisati cellulari, plasma, siero, ecc.
- **Privo di lavaggi** (e perdita di campione)



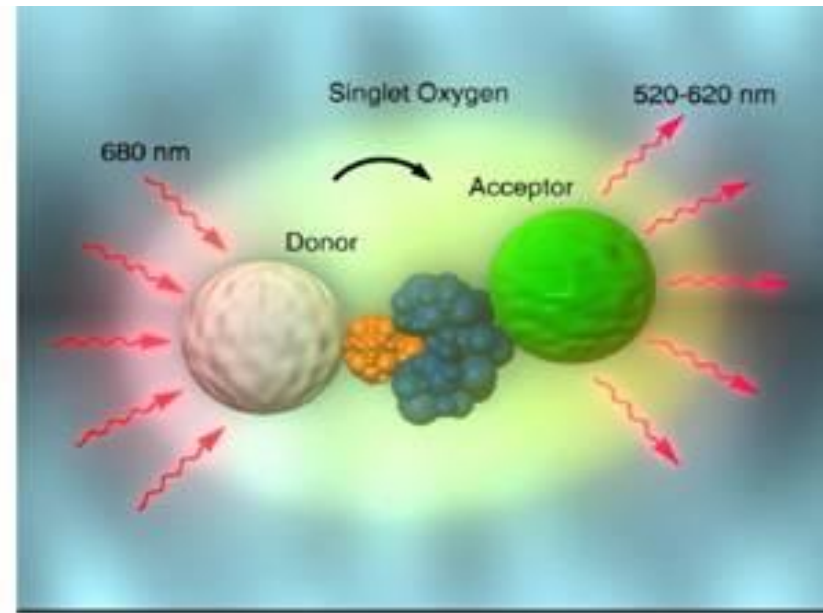
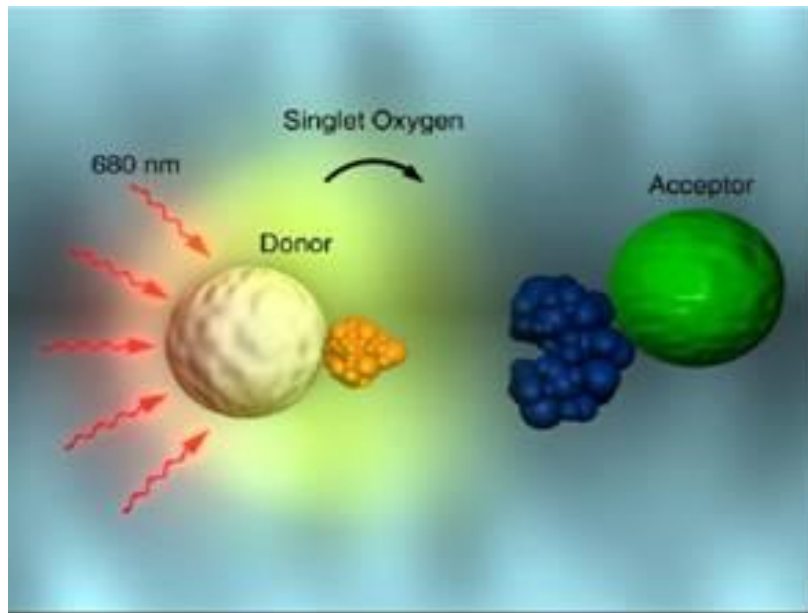
Avviene **tutto** in
soluzione

ALPHA TECHNOLOGY

(Amplified Iluminescent proximity homogeneous assay)

Alpha Technology is a bead-based proximity assay

Biglie di latex (250 nm) ricoperte da idrogel e funzionalizzate con gruppi chimici per il legame di molecole di diversa natura.



L'idrogel minimizza i legami apecifici, evita l'aggregazione delle biglie e fornisce i gruppi chimici necessari per i processi di coniugazione delle molecole alla superficie delle biglie

ALPHA TECHNOLOGY

Biglie utilizzate

Nel saggio si utilizzano 2 tipi di biglie:

Donor



Acceptor

ALPHA TECHNOLOGY

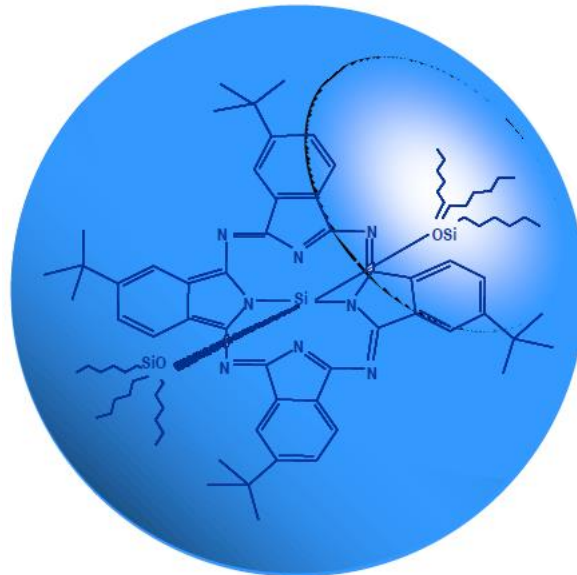
Biglie utilizzate

Nel saggio si utilizzano 2 tipi di biglie:

Donor



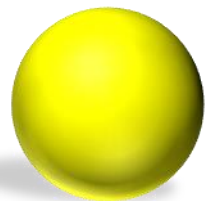
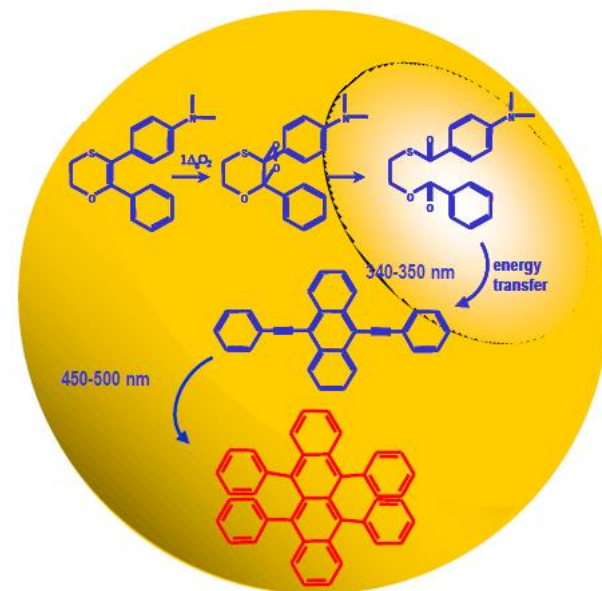
Contiene un fotosensibilizzatore (**ftalocianina**) che può convertire l'O₂ ambientale (disciolto) in una forma eccitata, il singoletto d'ossigeno (**¹O₂**).



ALPHA TECHNOLOGY

Biglie utilizzate

Nel saggio si utilizzano 2 tipi di biglie:



Acceptor

Contiene una molecola (es. derivato del Tioxene) che reagisce con 1O_2 dando emissione di luce come segnale di risposta.

ALPHA TECHNOLOGY

Biglie utilizzate

Nel saggio si utilizzano 2 tipi di biglie:

Donor



Contiene un fotosensibilizzatore (**ftalocianina**) che può convertire l'O₂ ambientale (disciolto) in una forma eccitata, il singoletto d'ossigeno (**¹O₂**).

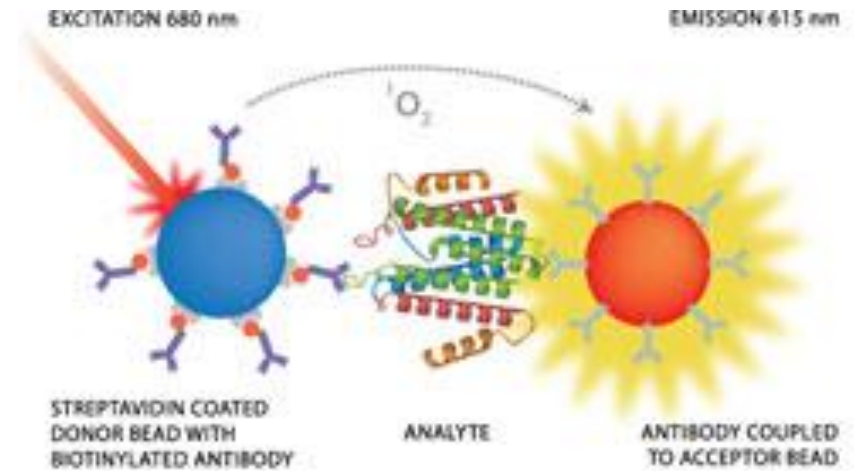
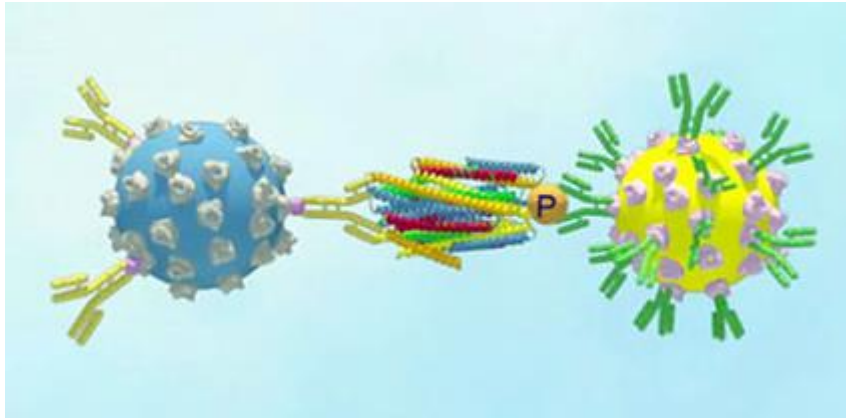


Acceptor

Contiene una molecola (es. derivato del Tioxene) che reagisce con ¹O₂ dando emissione di luce come segnale di risposta.

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

ESEMPI DI SAGGIO



STUDI DI
INTERAZIONE
(AlphaScreen)

NO WASH ELISA
(AlphaLISA)

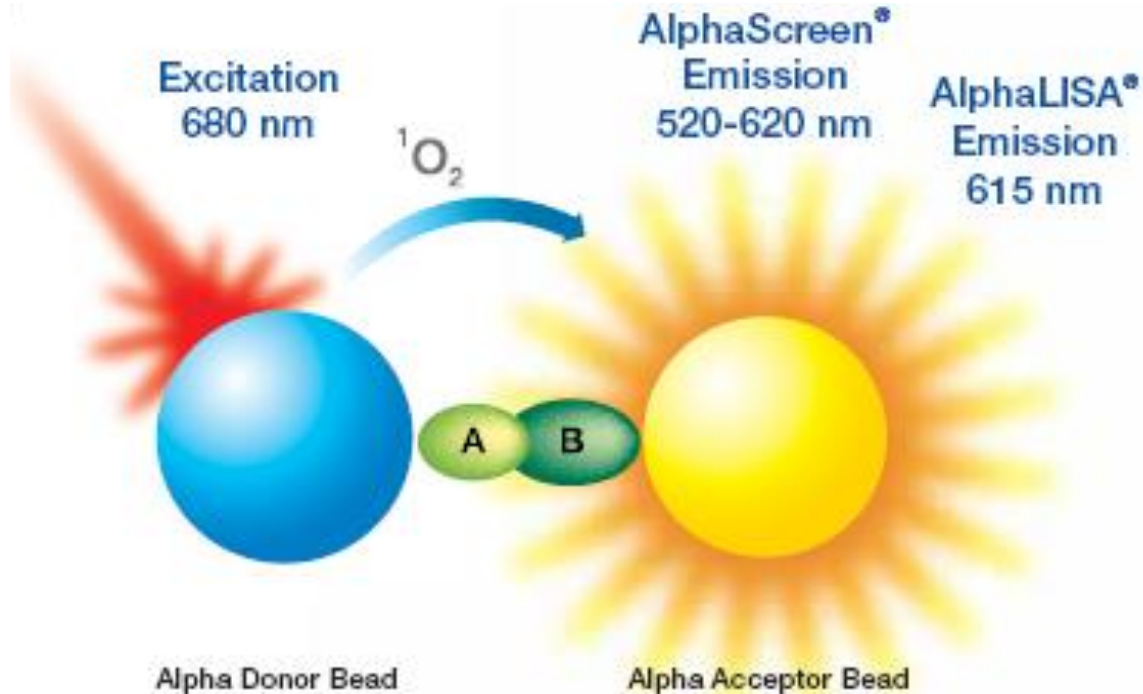
Il sistema di rilevazione non è portato dagli anticorpi, ma.....

....**le biglie stesse sono il sistema di rilevazione**

FUNZIONAMENTO DEL SAGGIO

- Onda EM ad elevata λ (680 nm) colpisce le biglie donatrici.
- Il fotosensibilizzatore delle biglie donatrici genera 60000/s molecole di $^1\text{O}_2$ che rapidamente diffonde.

Perché è indispensabile che donor e acceptor bead siano vicine?

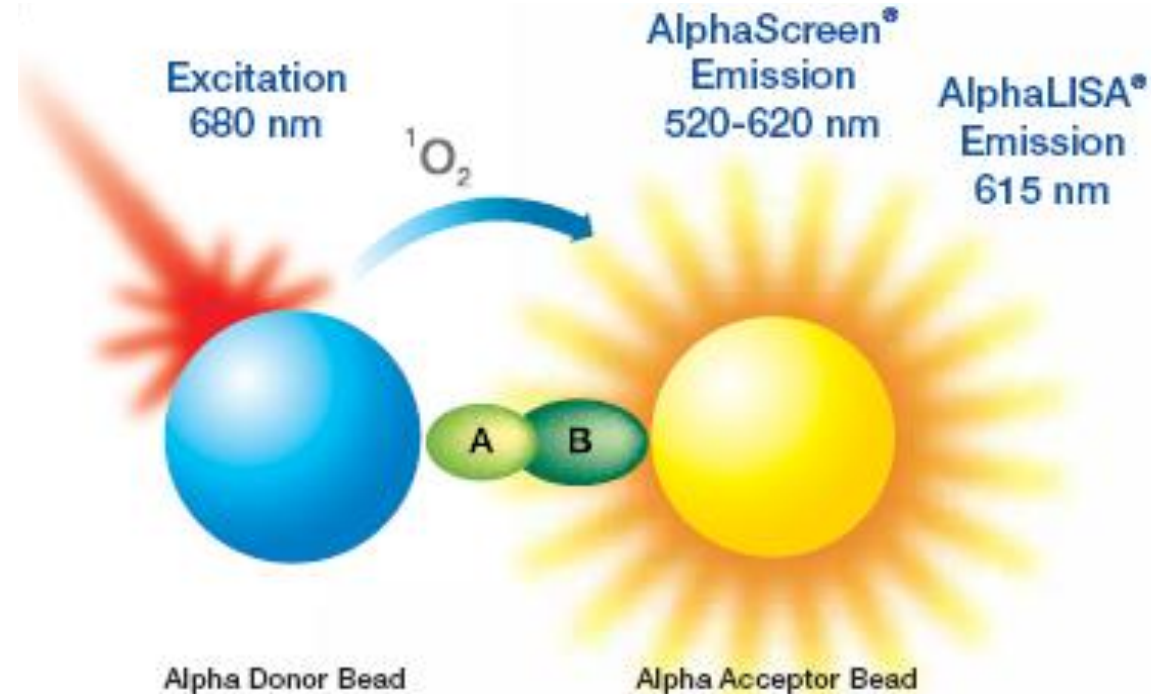


La biglia accettrice contiene un derivato del Tioxene che reagisce con $^1\text{O}_2$ **emettendo luce**, in quantità proporzionale alla quantità di analita.

FUNZIONAMENTO DEL SAGGIO

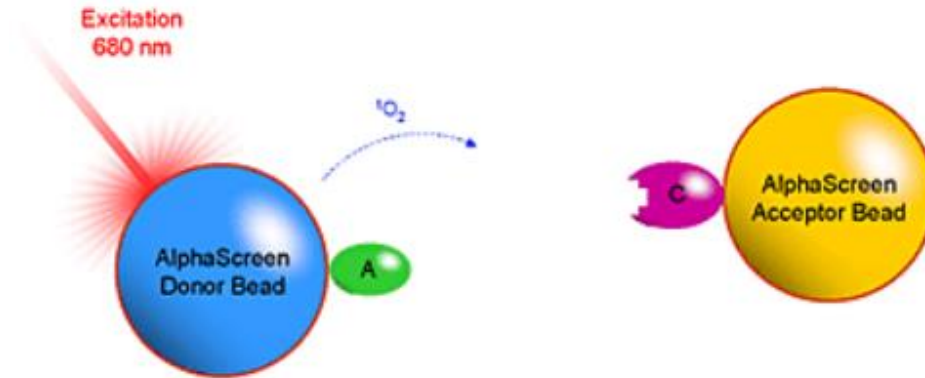
- Onda EM ad elevata λ (680 nm) colpisce le biglie donatrici.
- Il fotosensibilizzatore delle biglie donatrici genera 60000/s molecole di $^1\text{O}_2$ che rapidamente diffonde.

$^1\text{O}_2$: emivita di 4 μsec
Diffusione: ~ 200 nm



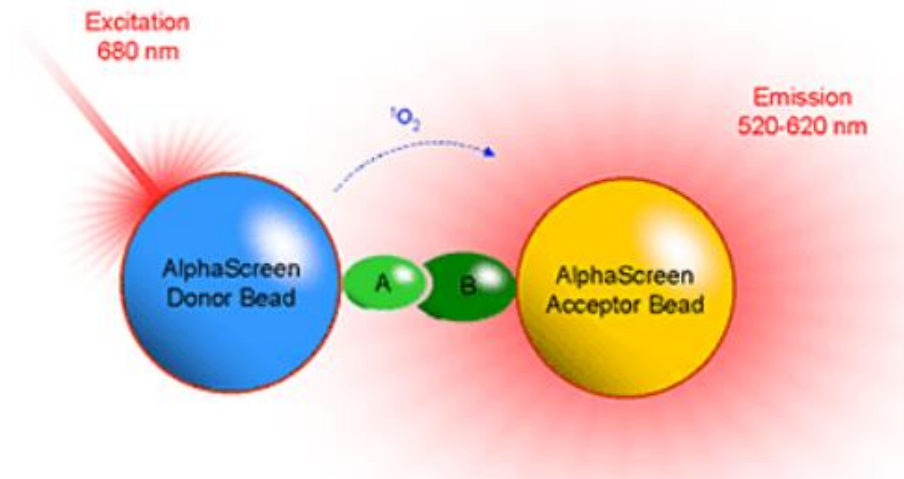
La biglia accettrice contiene un derivato del Tioxene che reagisce con $^1\text{O}_2$ **emettendo luce**,
in quantità proporzionale alla quantità di analita.

PRINCIPIO DEL SAGGIO



Biglie lontane (>200 nm, es. no interazione), il singoletto di ossigeno decade

→ **ASSENZA** di segnale

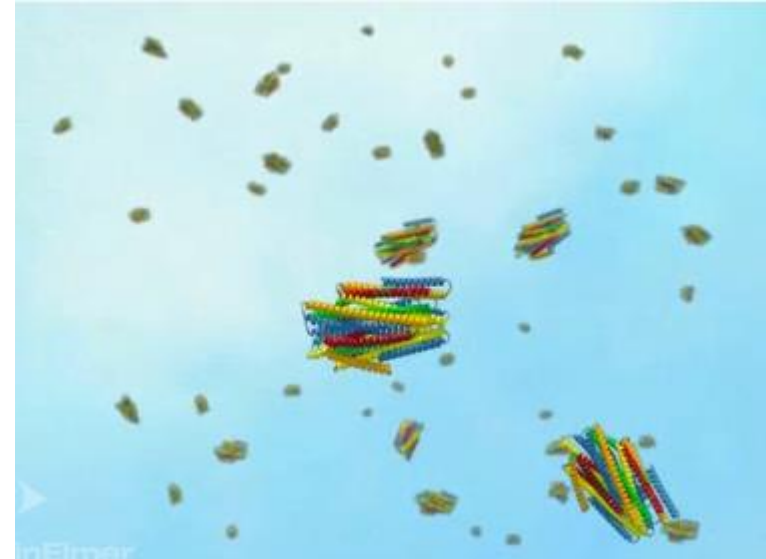
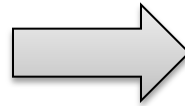


Quando avviene un'interazione e si verifica **prossimità** delle biglie

→ **SEGNALE**

PRINCIPIO DEL SAGGIO - Passaggi sperimentali

1) Aggiunta del campione (plasma, siero, ecc.) contenente l'**analita**



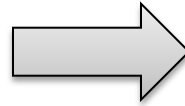
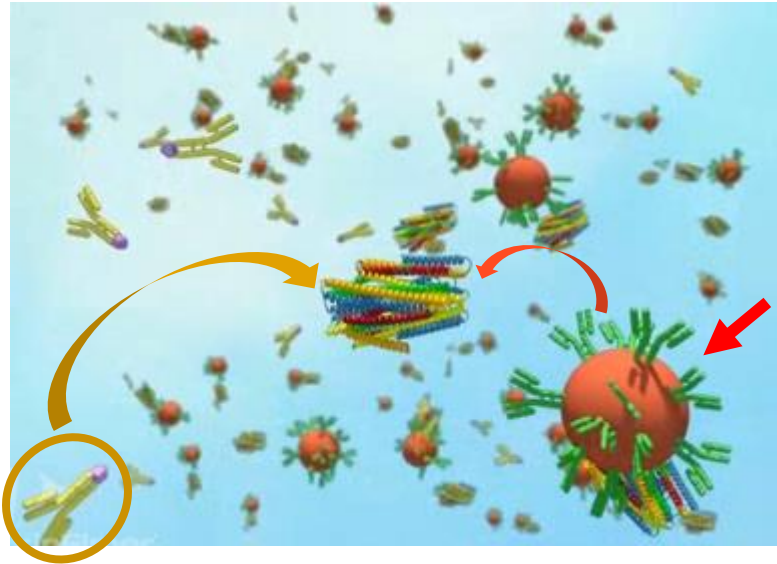
Volume di **campione**
diverso a seconda
del tipo di piastra:
96 pozzetti → 10-40 μ l
384 pozzetti → 3-10 μ l
1536 pozzetti → 1-2 μ l

Il campione è il
primo componente
ad essere aggiunto

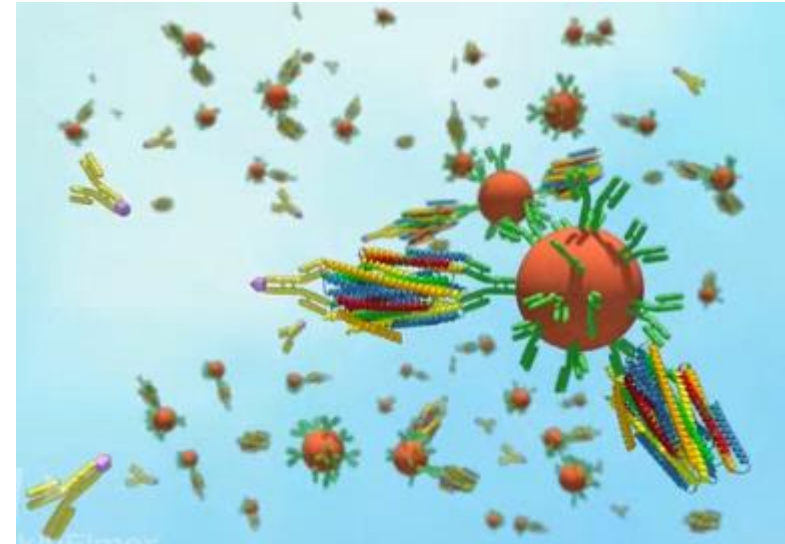
PRINCIPIO DEL SAGGIO - Passaggi sperimentali

2) Aggiunta di anticorpo e acceptor beads

Aggiunta Ab biotinilati e acceptor beads



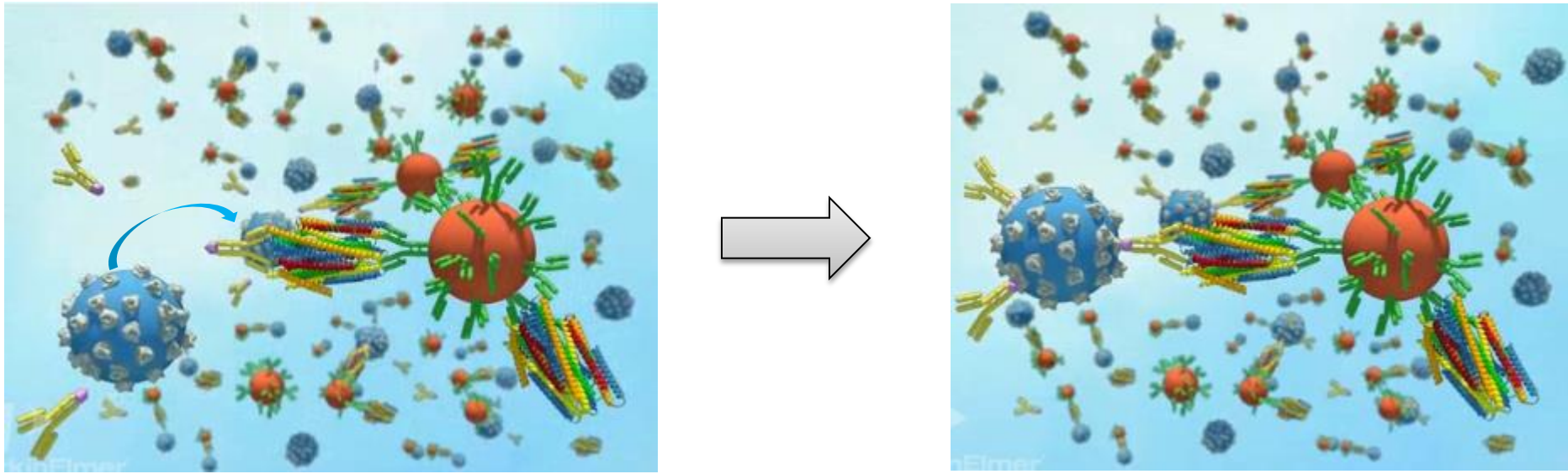
Interazione Ab-analita



Vengono aggiunti contemporaneamente gli **anticorpi biotinilati (anti-analita)** e le **acceptor beads** coniugate con l'anticorpo anti-analita

PRINCIPIO DEL SAGGIO - Passaggi sperimentali

3) Aggiunta delle donor bead



Aggiunta delle **donor_beads** coniugate alla **streptavidina**

Il sistema di rilevazione è dato dalla **donor bead**,
ossia la biglia che innesca la reazione

PRINCIPIO DEL SAGGIO - Passaggi sperimentali

4) Innesco della reazione

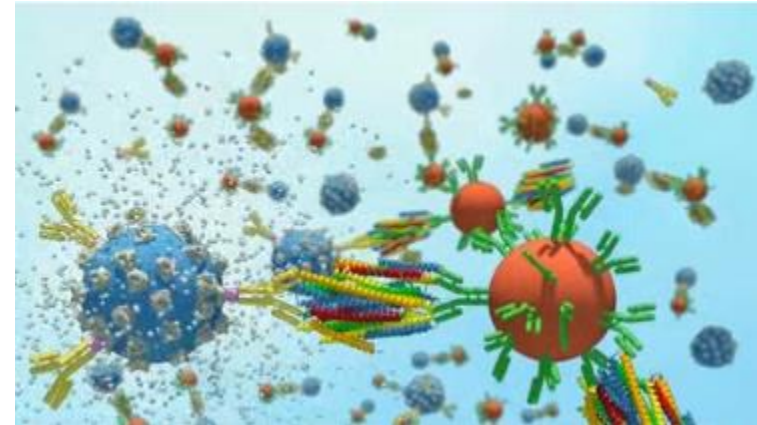
Eccitazione delle donor beads



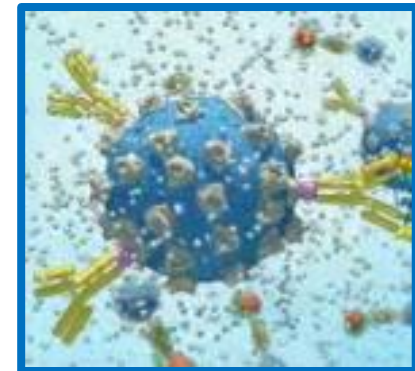
PRINCIPIO DEL SAGGIO - Passaggi sperimentali

4) Attivazione delle biglie

Eccitazione delle donor beads



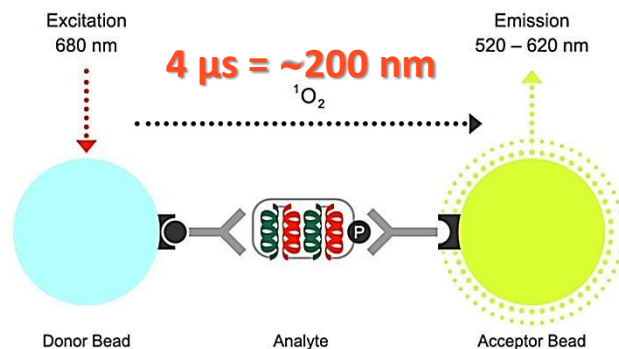
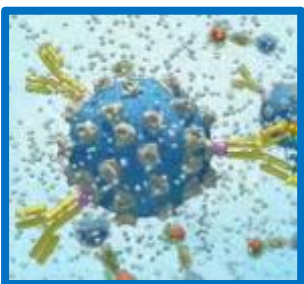
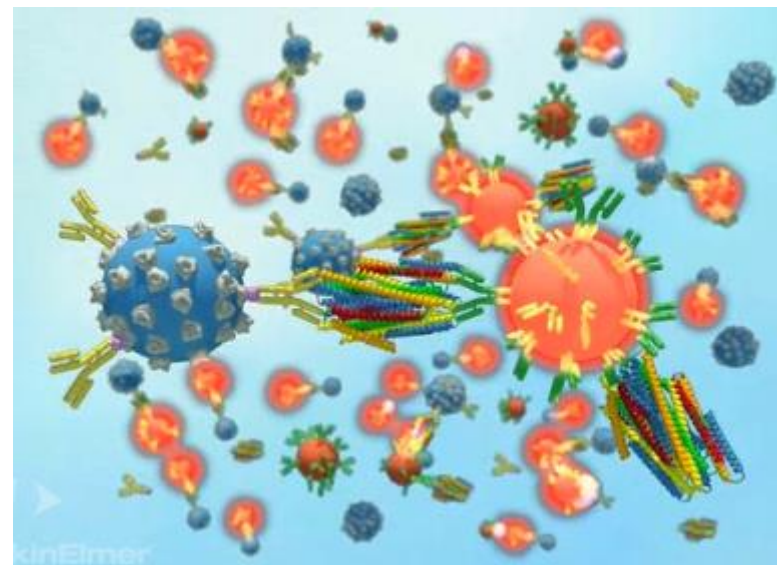
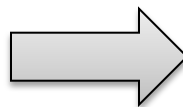
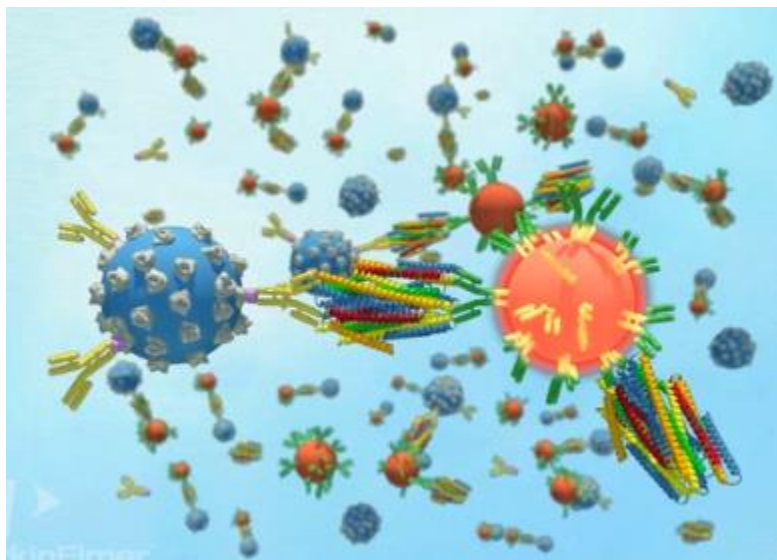
Rilascio del
singoletto di ossigeno



PRINCIPIO DEL SAGGIO - Passaggi sperimentali

5) **Rilevazione** del secondo segnale dato dalla **prossimità** delle **acceptor beads**

Emissione di luce da parte delle acceptor beads



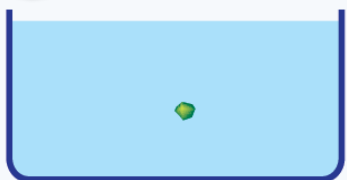
Interazione = prossimità
Mancanza di interazione



Segnale di background molto basso

FUNZIONAMENTO DEL SAGGIO - Riassunto

1



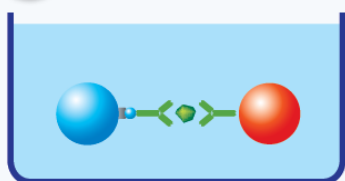
Add analyte to microplate.

2



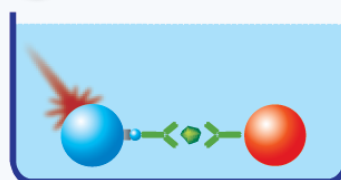
Add biotinylated anti-analyte antibody and anti-analyte antibody-conjugated acceptor beads. Incubate for 60 minutes.

3



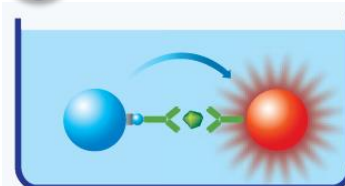
Add streptavidin-coated donor beads. Incubate for 30 to 60 minutes. The interaction between bead-bound molecules and analyte brings the beads into proximity.

4

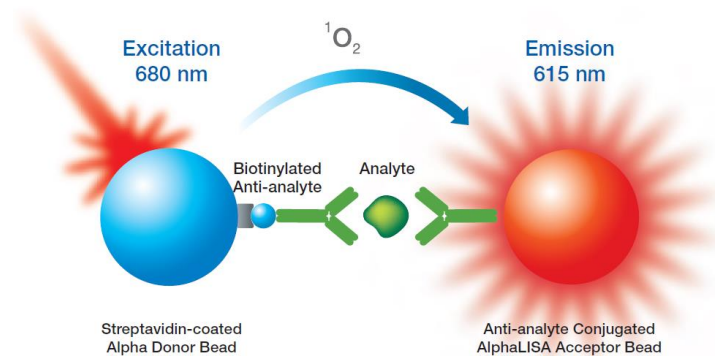


Excite the donor beads with red light.

5

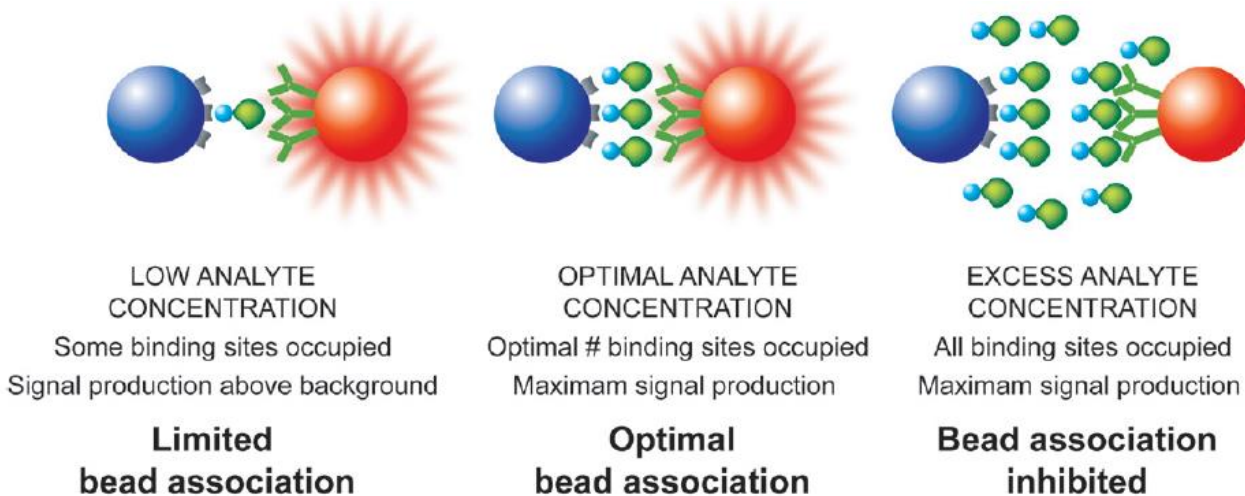
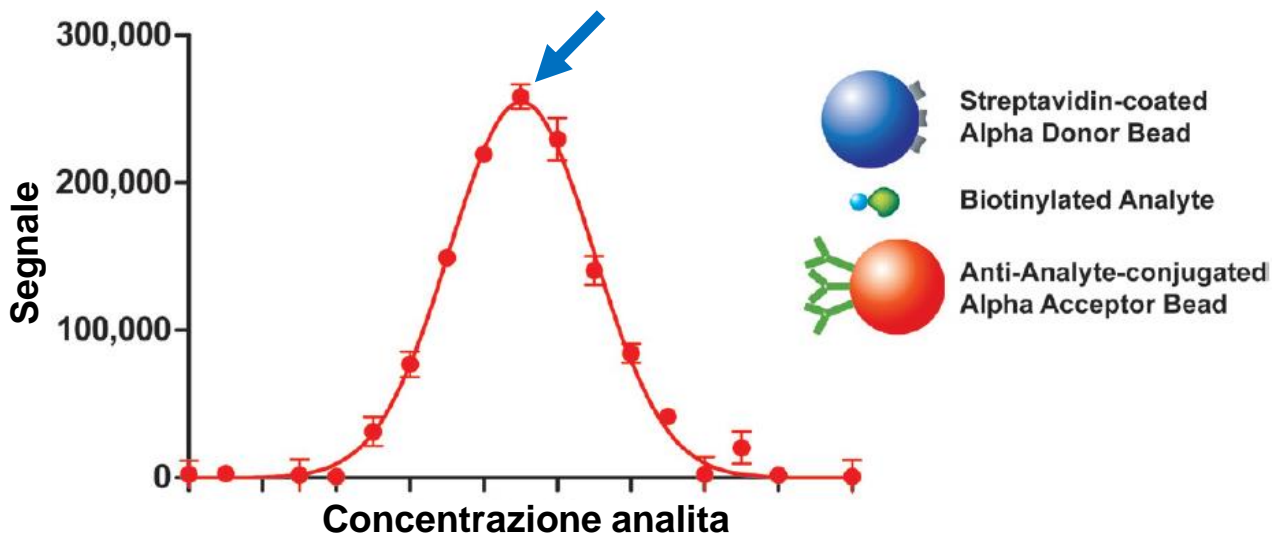


Singlet oxygen generated by donor beads excites the acceptor beads, which emit light proportional to the level of interaction.



La prossimità delle biglie genera il segnale rilevato

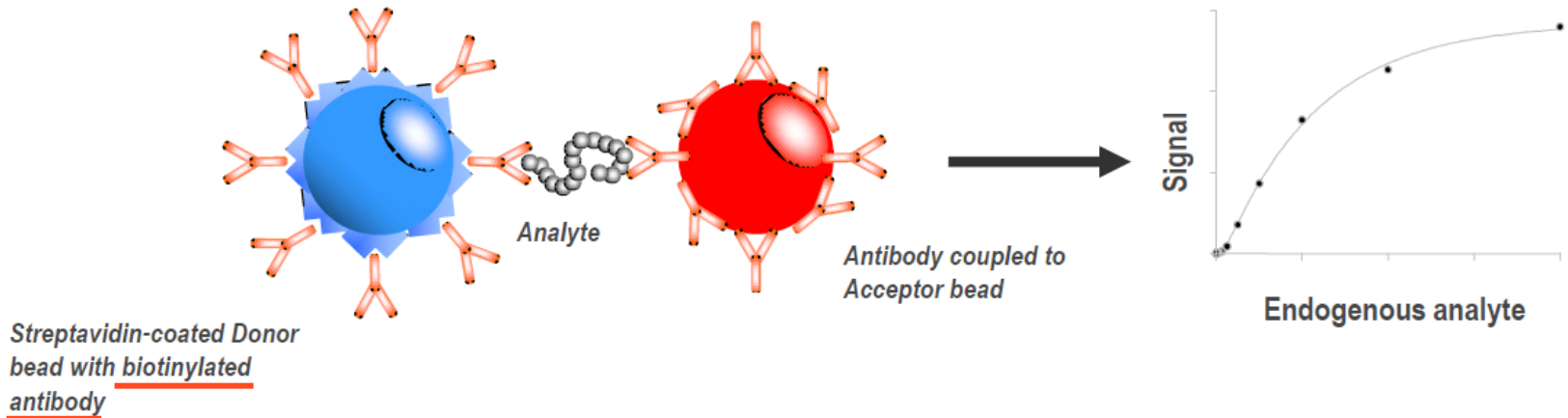
IMPORTANZA DELLA DILUIZIONE E EFFETTO UNCINO



L'effetto uncino è dovuto alla saturazione delle biglie con l'analita, il cui eccesso distrugge le associazioni tra donor e acceptor beads alle concentrazioni oltre lo "hook point" → **le diluizioni sono sempre importanti**

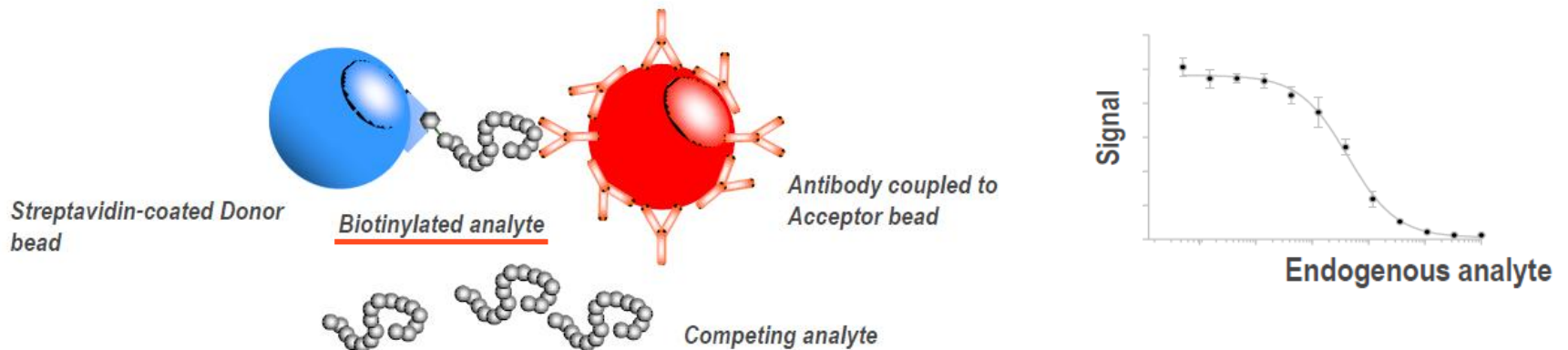
SAGGI COMPETITIVI E NON COMPETITIVI

A- Sandwich Assay



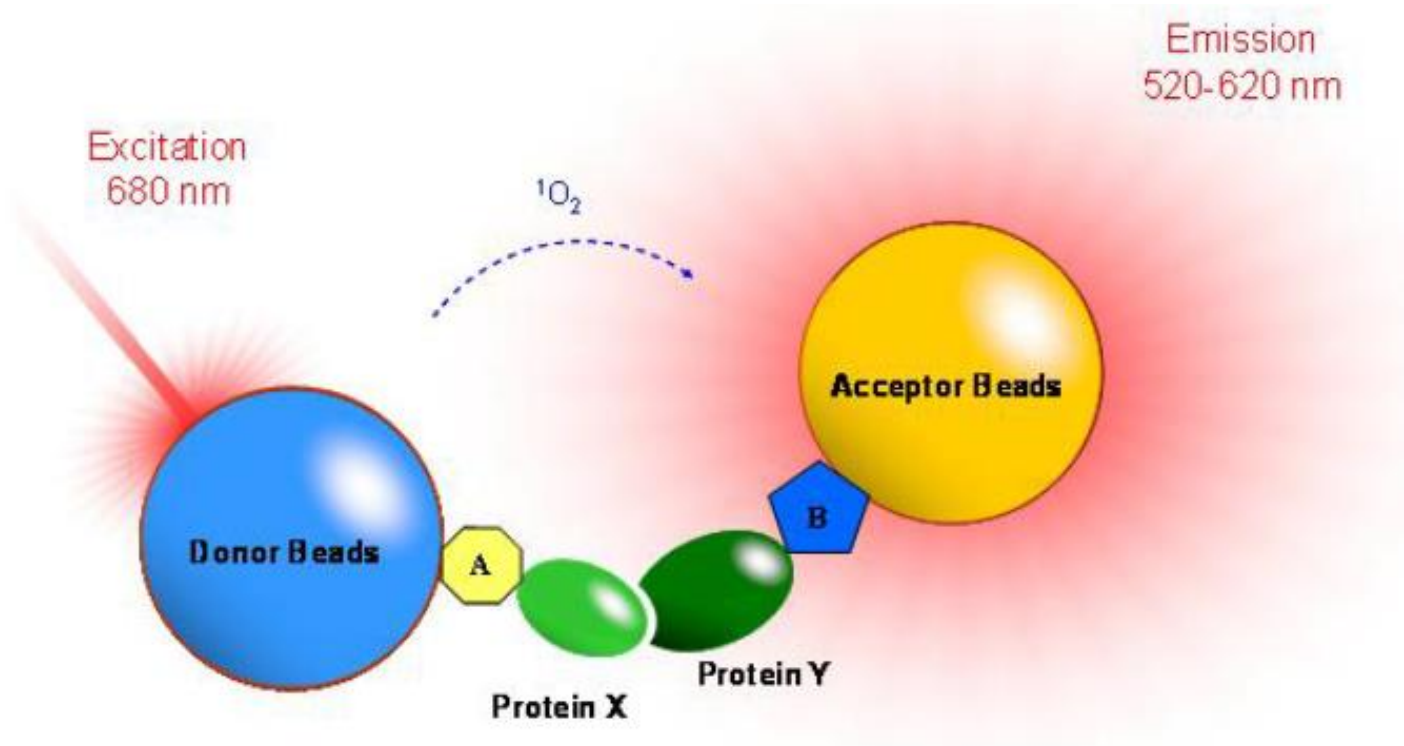
Devono sempre essere riconosciuti **epitopi diversi**

B- Competition Assay



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

SAGGIO VERSATILE



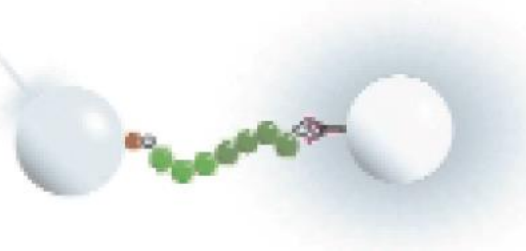
➤ X and Y can be: anything, proteins, peptides, oligonucleotide, polysaccharides, small molecules.

➤ A can be streptavidin, antibody, binding protein, chelate, small molecule, oligonucleotide.

➤ B can be antibody, binding protein, chelate, oligonucleotide, small molecule.

ALTRI ESEMPI DI TIPI DI SAGGIO

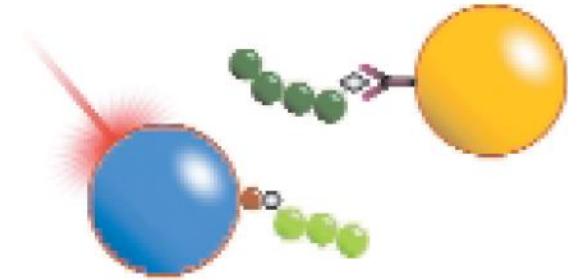
Dissociation assays



Risultato:

Segnale ↓

Saggio di attività proteolitica:
Proteina/peptide biotinilati legati a donator bead-streptavidina e riconosciuti da un anticorpo anti-tag sulla acceptor bead. Quando l'enzima effettua il **taglio** si osserva un **calo** nel **segnale**. Se l'attività enzimatica non è presente il segnale risulta inalterato.



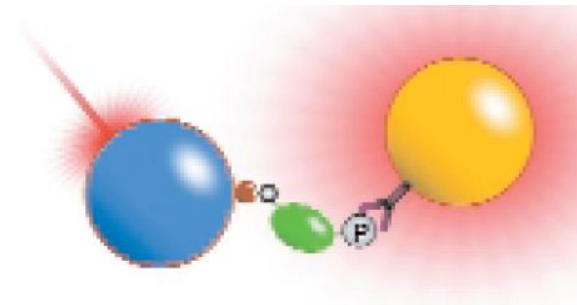
Detection assays



Risultato:

Segnale ↑

Saggio di attività chinasi:
Proteina/peptide biotinilati legati a donator bead-streptavidina e riconosciuti da anticorpo che riconosce i residui fosforilati sulla acceptor bead. La **fosforilazione** della proteina induce un **aumento** del **segnale**, che non si verifica in assenza di fosforilazione.



Esperimento con proteine ricombinanti

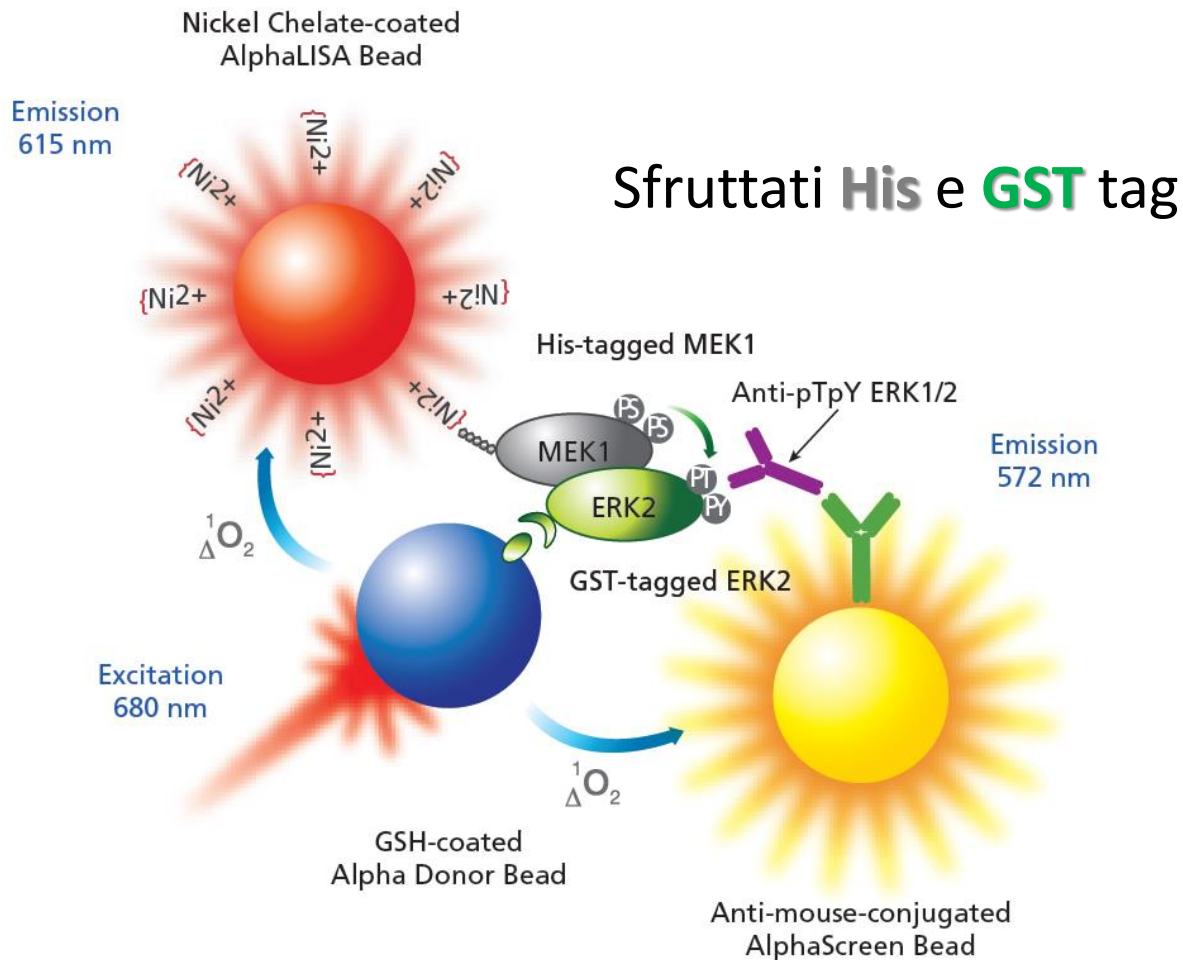
Scopo: testare l'interazione tra le chinasi MEK1 e ERK2

Emissione a **615 nm**:
presenza **MEK1**
(con His tag)

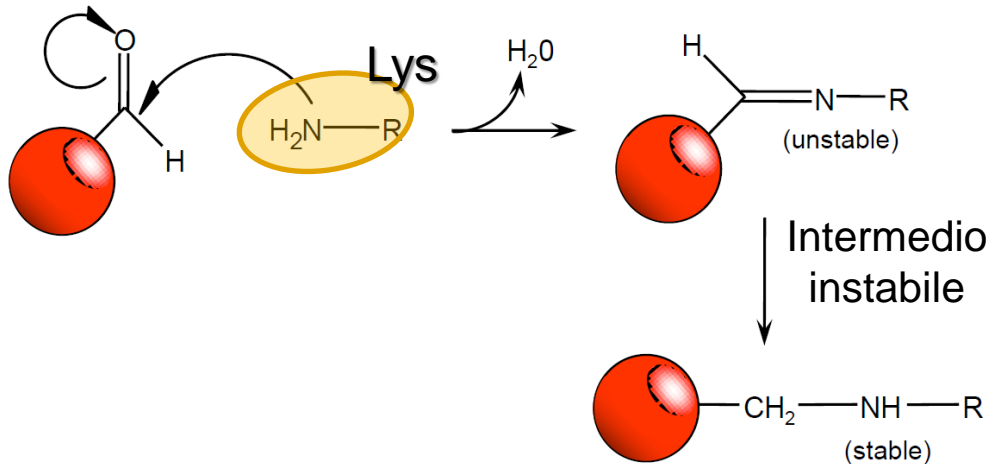
Reazione che avviene
in un singolo pozzetto
della piastra

Emissione a **572 nm**:
presenza **pERK2** (GST tag) generata dall'interazione con MEK1

Solo questa interazione crea le condizioni di prossimità per avere segnale



POSSIBILITÀ DI PERSONALIZZARE IL SAGGIO



Coniugazione di peptidi,
proteine, anticorpi
a biglie (donor o acceptor)
non coniugate

Bead Coating

Used to Bind/Capture

Molecule and Partner Bead

| | | |
|------------------------------------|--|--|
| Streptavidin | Biotinylated peptides, proteins, oligos, sugars, small molecules, etc. | Biotinylated peptide |
| Anti-GST antibody | GST-fusion proteins and peptides | Biotinylated GST with streptavidin bead |
| Anti-6X His antibody | His-tagged proteins and peptides | 6X His-GST with glutathione bead |
| Anti-HA antibody | Hemagglutinin-tagged proteins and peptides | Biotinylated-PEG-HA with streptavidin bead |
| Anti-GFP antibody | GFP-tagged (green fluorescent protein-tagged) proteins | Biotinylated GFP with streptavidin beads |
| Glutathione (GSH) | GST-fusion proteins and peptides | 6X His-tagged GST with nickel chelate bead |
| Nickel chelate (Ni ²⁺) | His-tagged proteins and peptides | 6X His-tagged GST with glutathione bead |
| Protein A | Antibodies | Biotinylated rabbit IgG with streptavidin bead |
| Protein G | Antibodies | Biotinylated rabbit IgG with streptavidin bead |
| Anti-human IgG | Fc portion of human IgG antibodies | Biotinylated human IgG with streptavidin bead |

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.