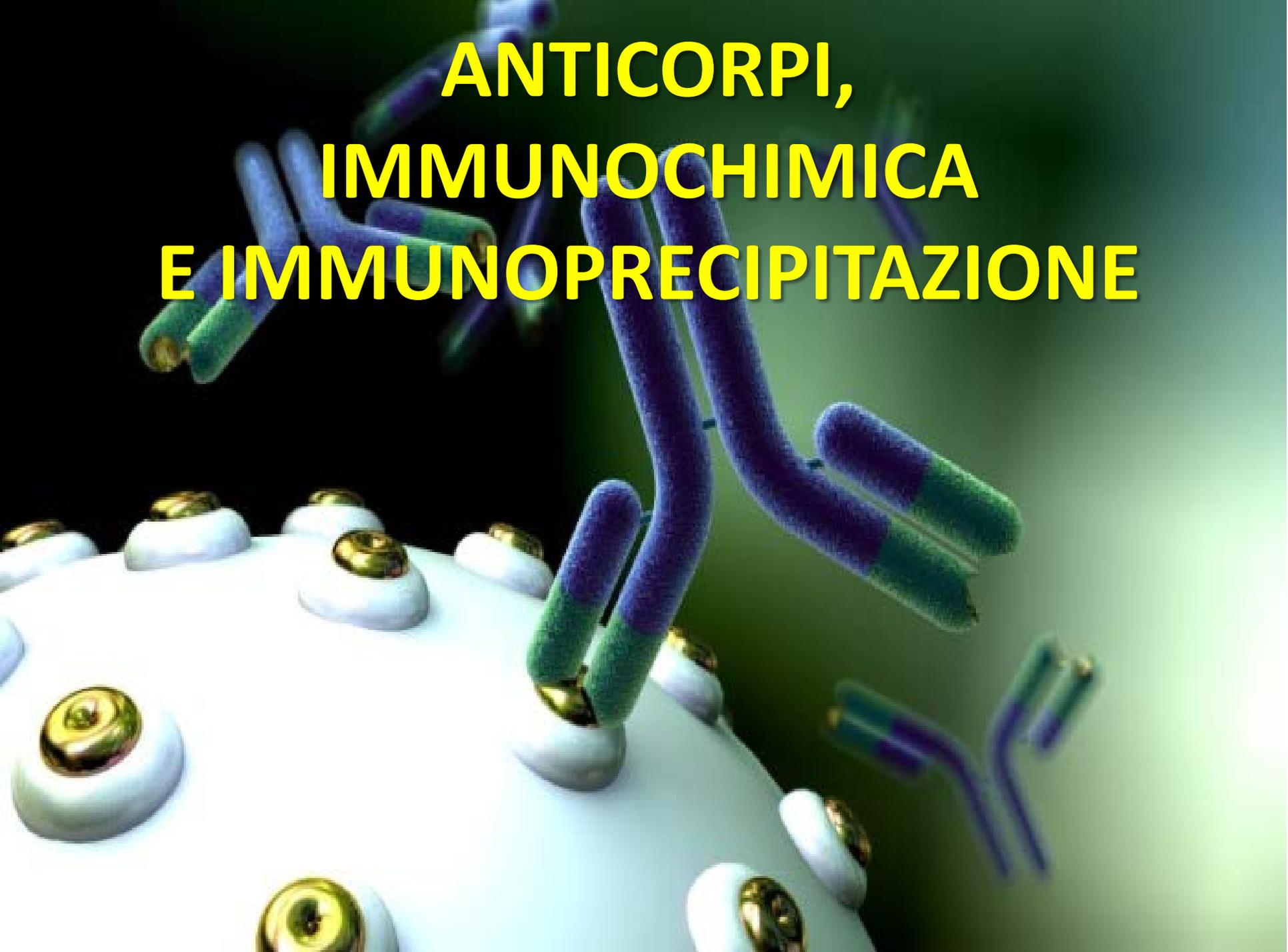
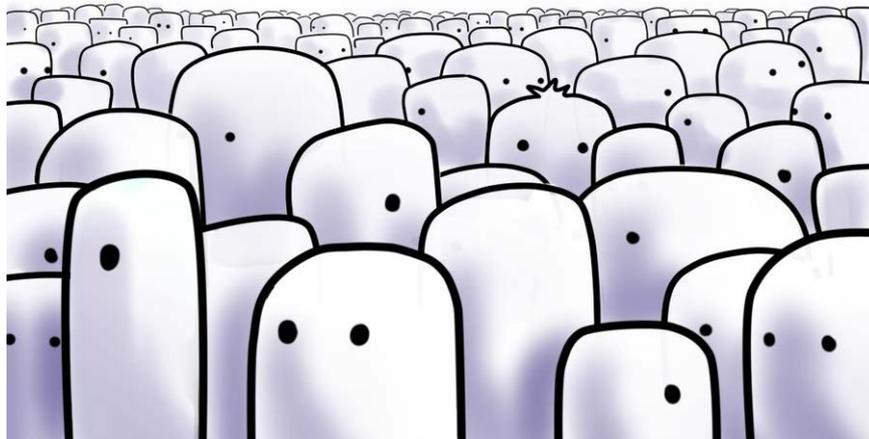


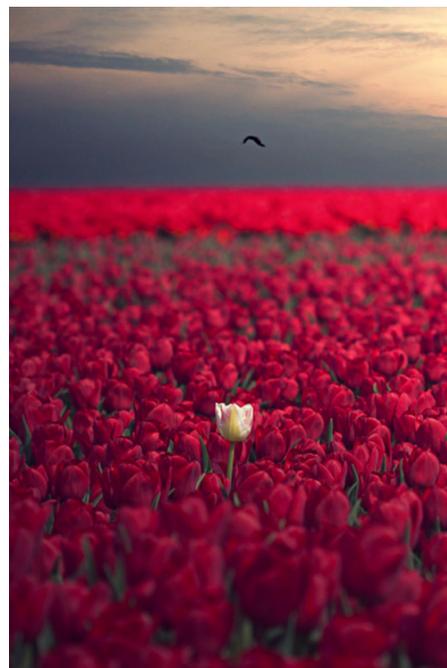
# ANTICORPI, IMMUNOCHEMICA E IMMUNOPRECIPITAZIONE



# Metodi colorimetrici



# Metodi immunochimici



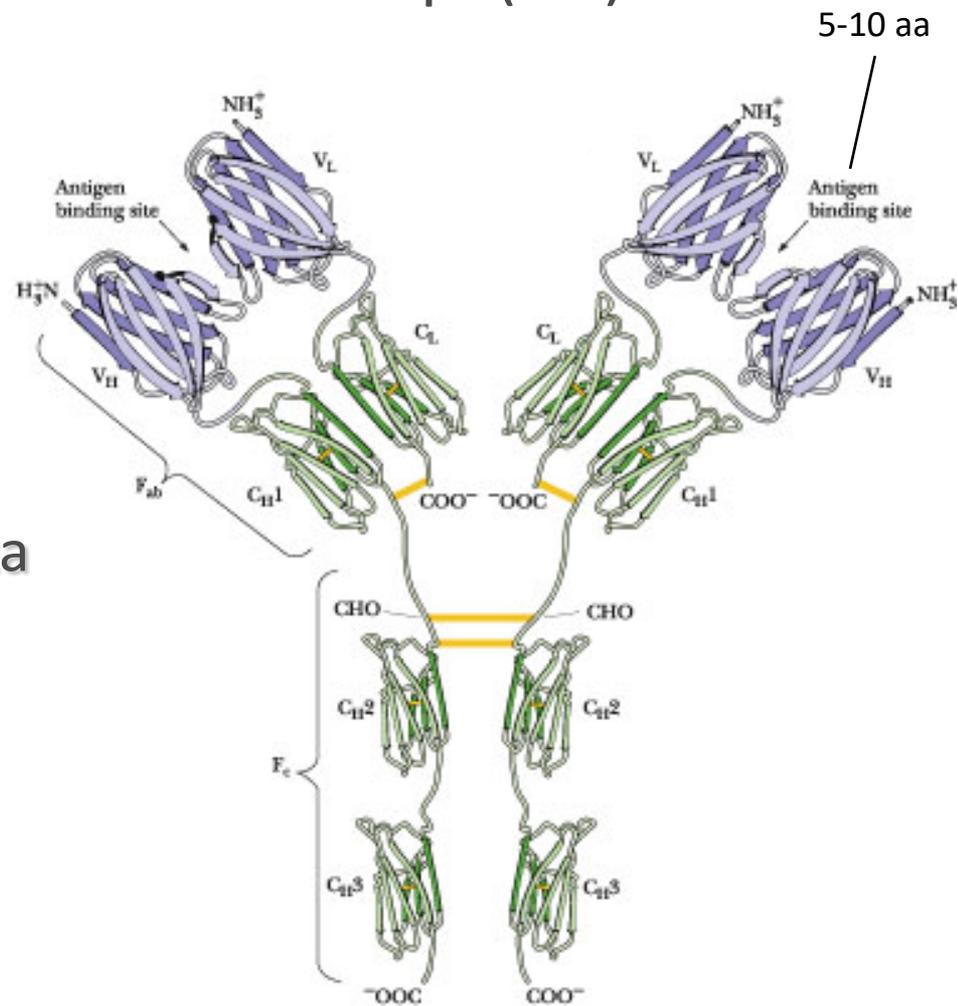
# TECNICHE IMMUNOCHEMICHE

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

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

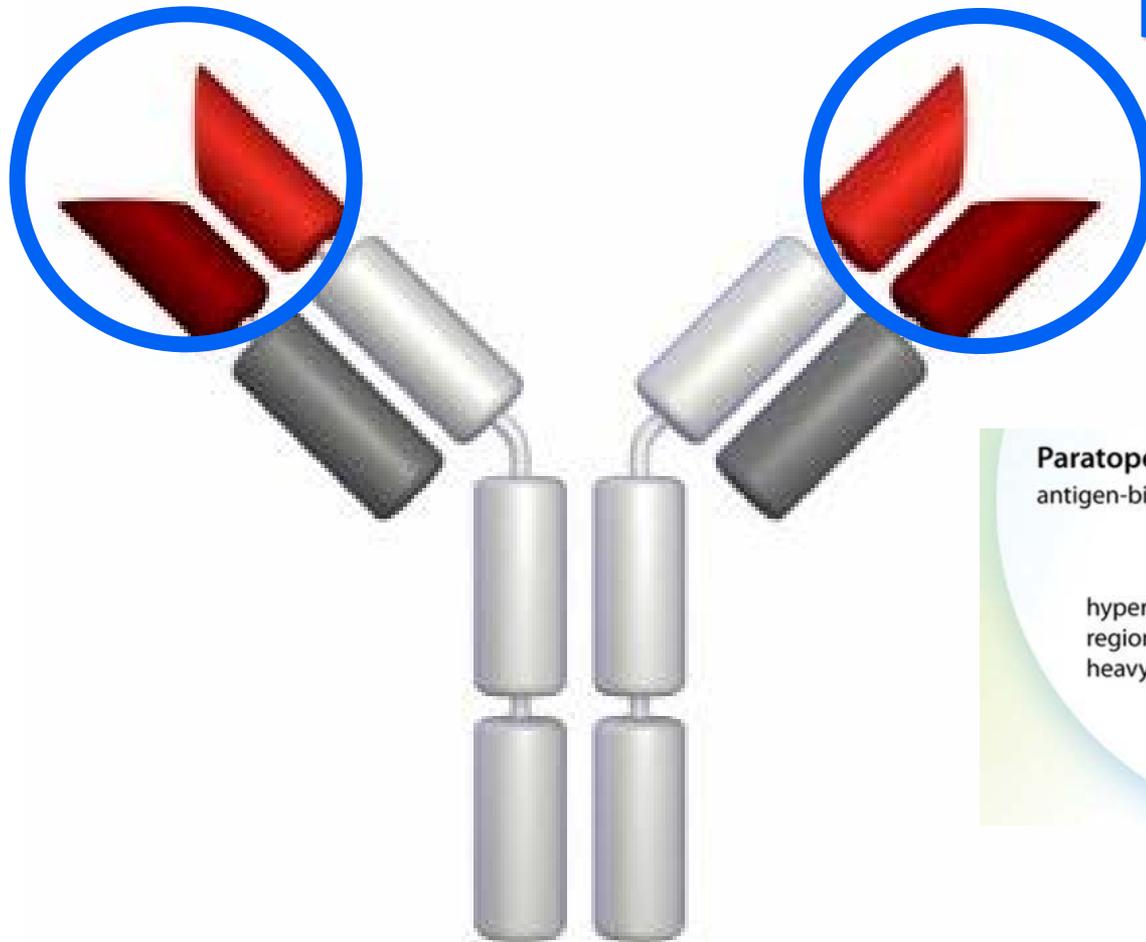
**Antigene (Ag)**: Qualsiasi sostanza estranea che induca risposta immunitaria (es. **polisaccaridi**, **proteine**).

Sostanza riconosciuta e **legata** da un anticorpo.



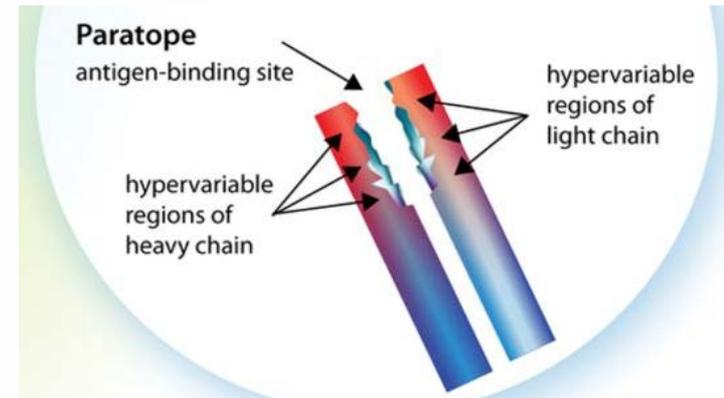
**Epitopo (o determinante antigenico)**:  
**Parte** dell'antigene **riconosciuta** dall'anticorpo

# SCHEMATIZZAZIONE DI UN IgG

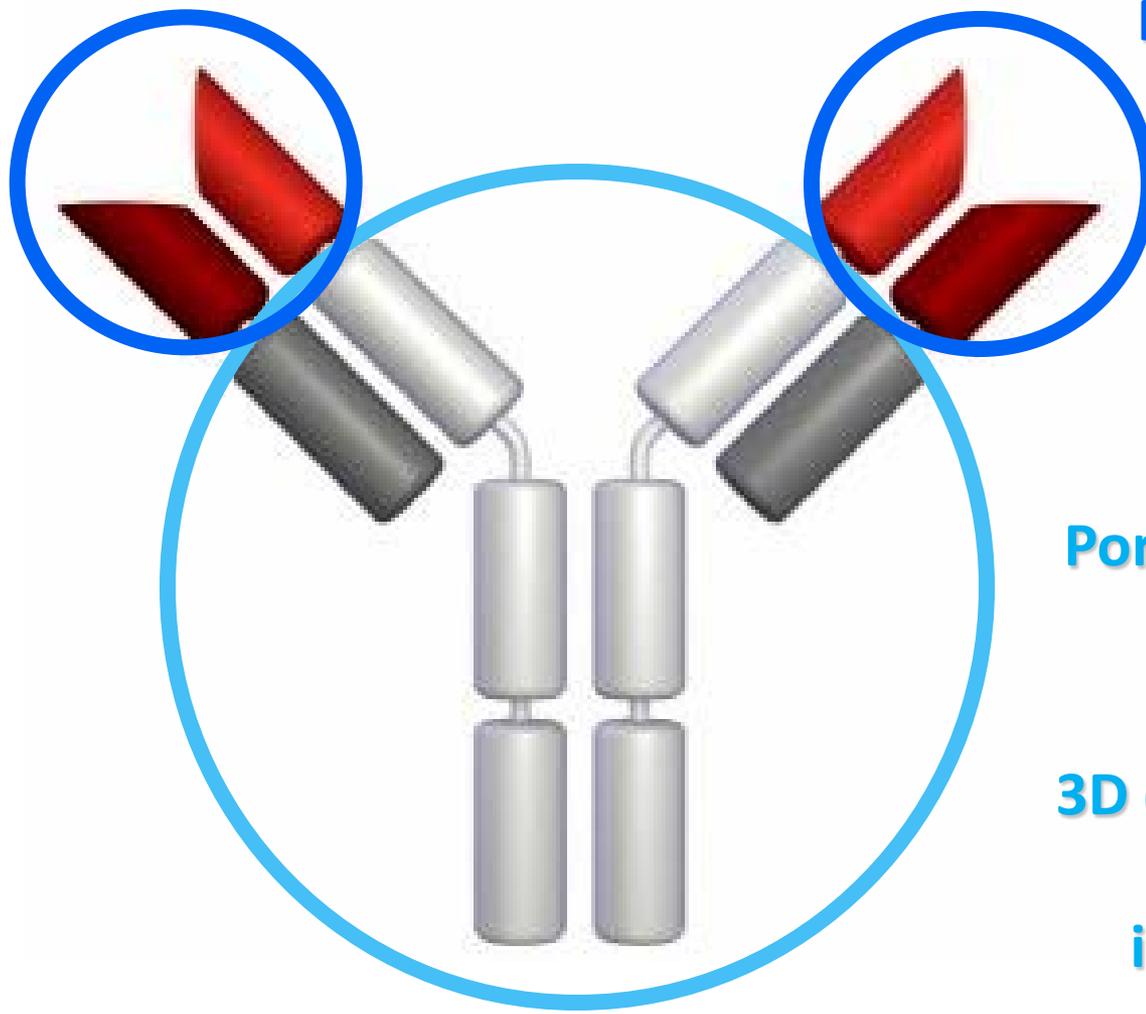


Porzioni variabili

Legame con  
l'antigene



# SCHEMATIZZAZIONE DI UN IgG



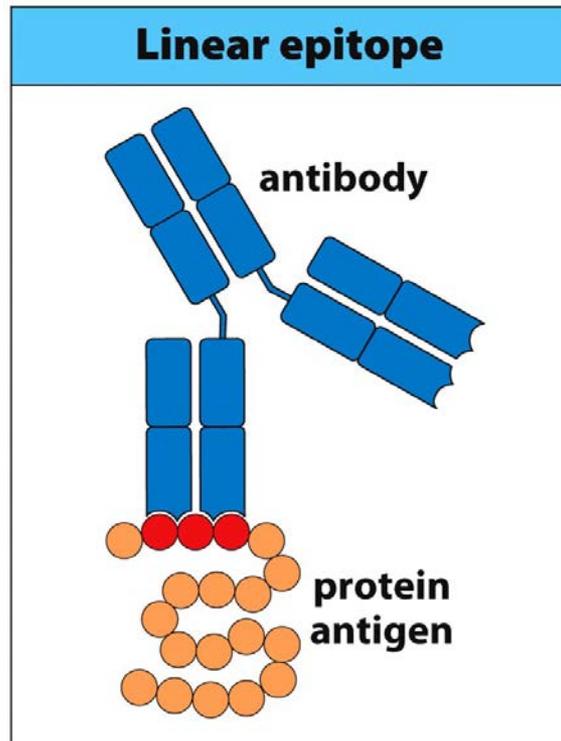
**Porzioni variabili**

**Legame con  
l'antigene**

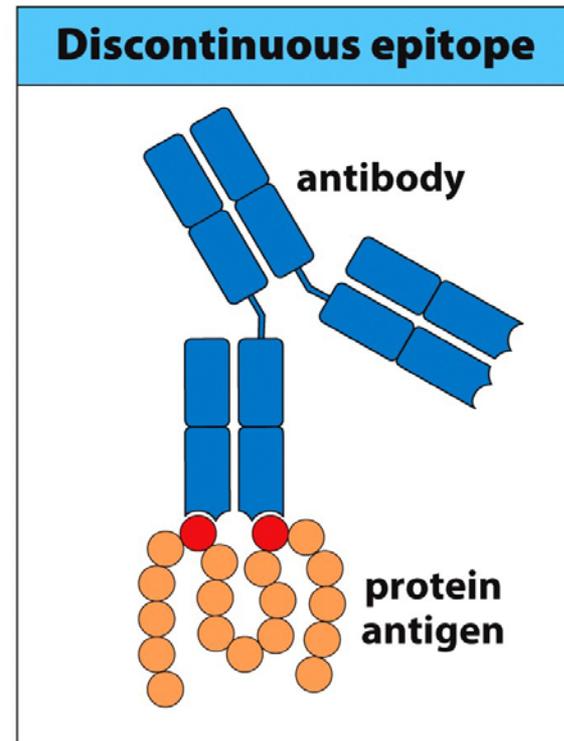
**Porzione costante**

**Mantiene la struttura  
3D dell'Ab, attiva il sistema  
del complemento,  
interagisce con recettori  
cellulari...**

# EPITOPI



**Linear epitope**  
Amino acid residues are adjacent in the polypeptide chain



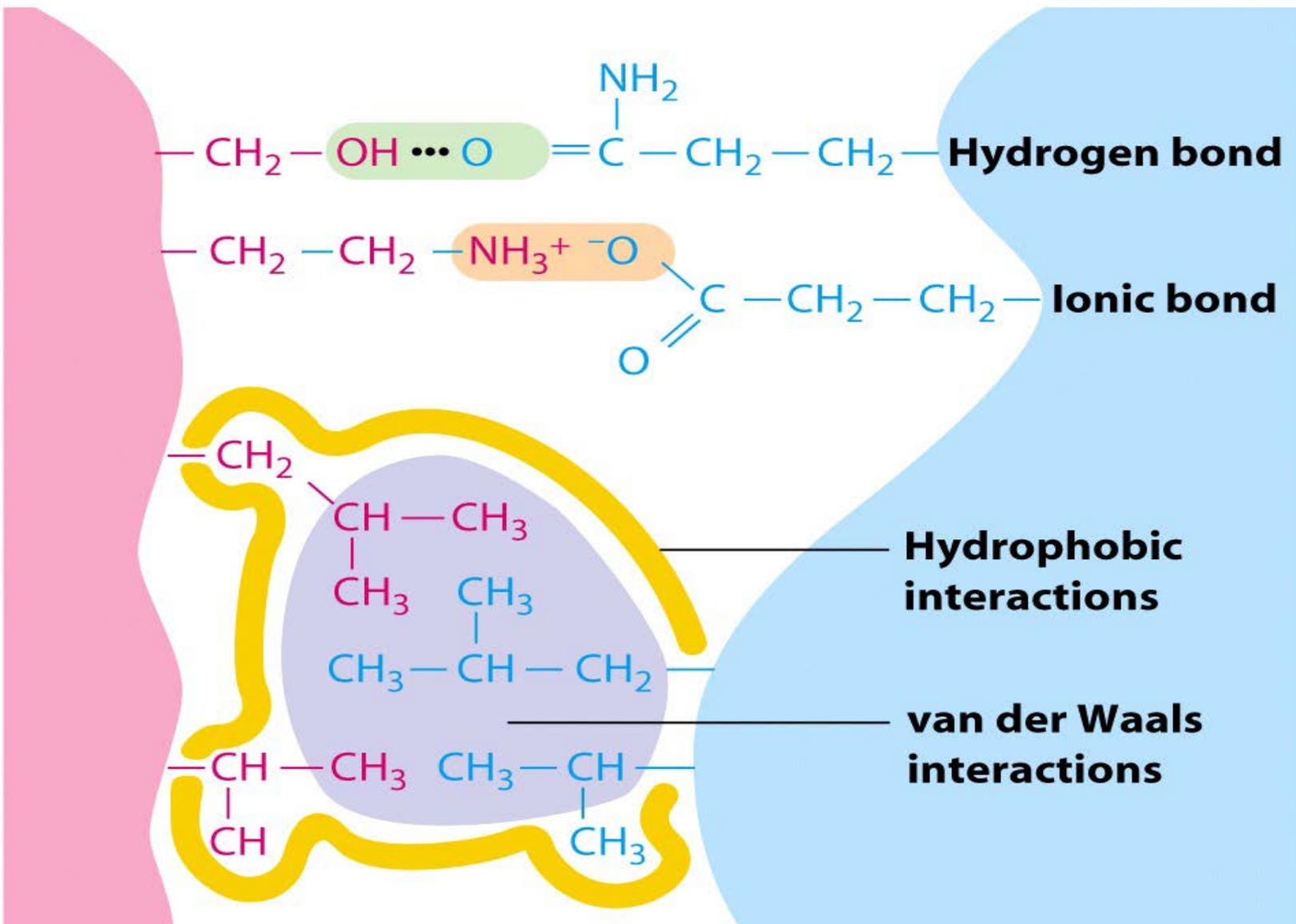
**Discontinuous epitope**  
Created from amino acid residues located in different parts of the polypeptide chain

Epitopo **conformazionale**

# BASI MOLECOLARI DELL'IMMUNOCOMPLESSO

ANTIGEN

ANTIBODY



# SIGNIFICATO PRATICO DEL TIPO DI LEGAME

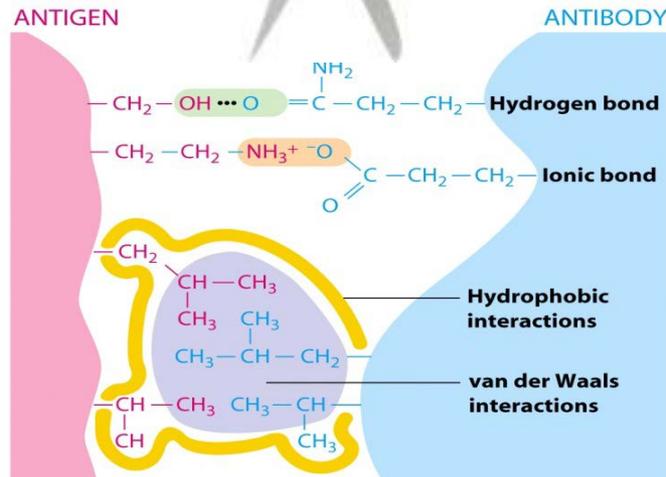
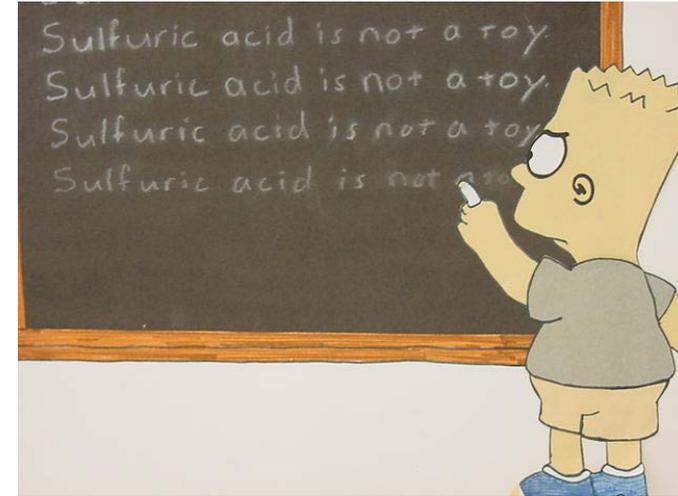


ALTA CONCENTRAZIONE SALINA

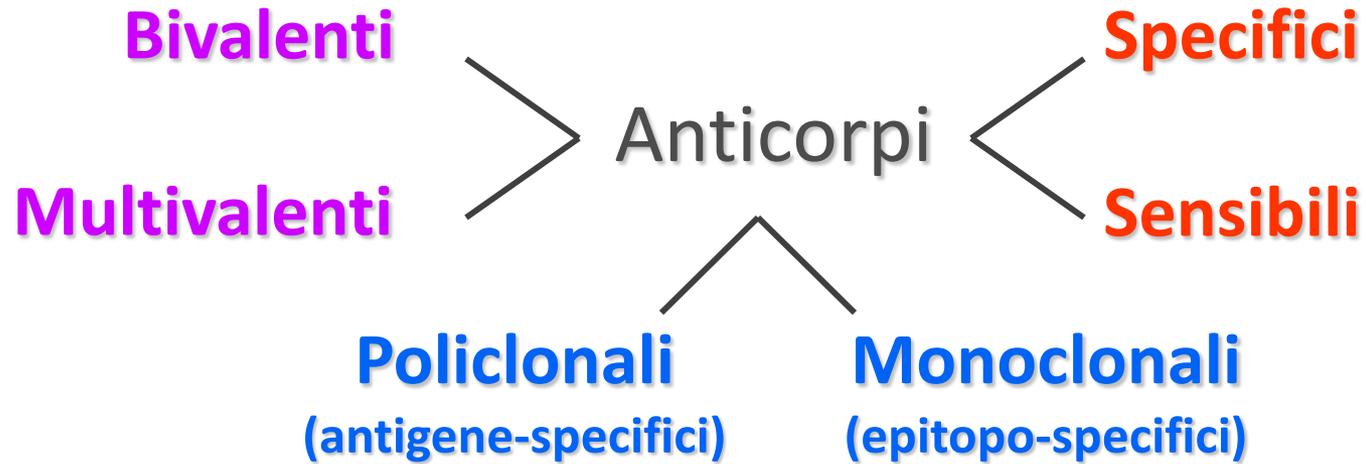


ALTA TEMPERATURA

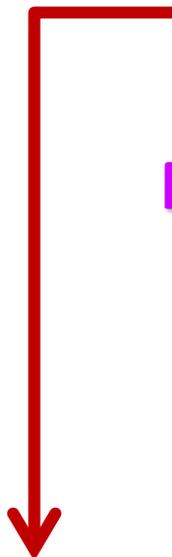
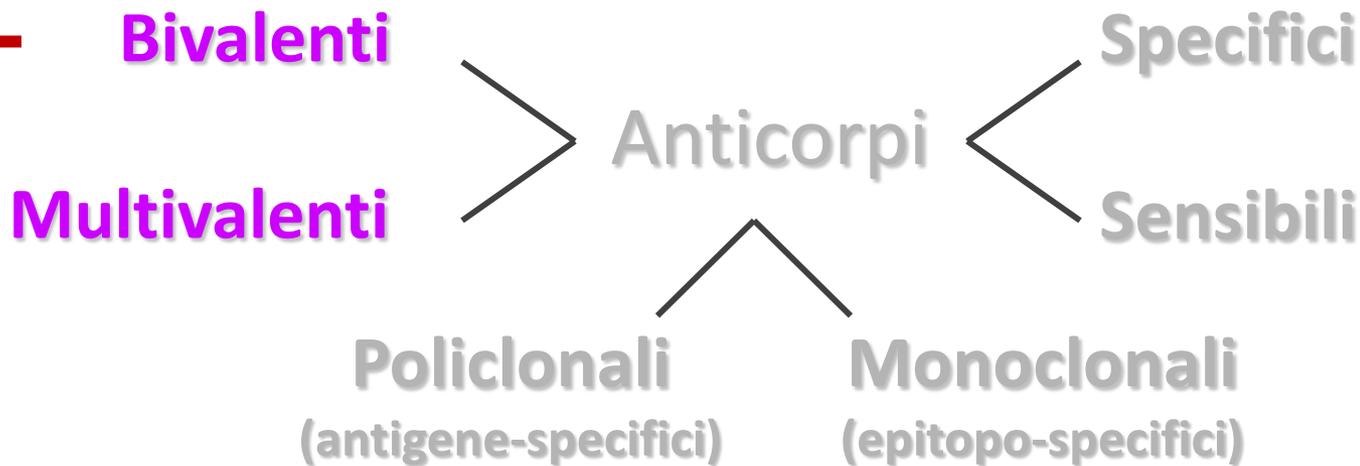
pH ESTREMI



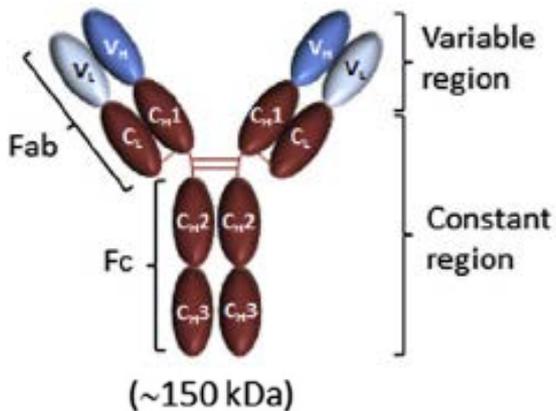
# CARATTERISTICHE DI UN ANTICORPO



# CARATTERISTICHE DI UN ANTICORPO



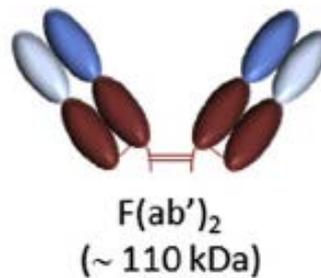
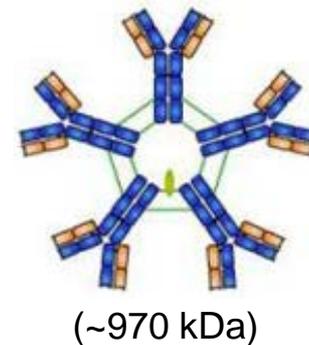
IgG



Valenza

2

IgM



F(ab')<sub>2</sub>  
(~ 110 kDa)

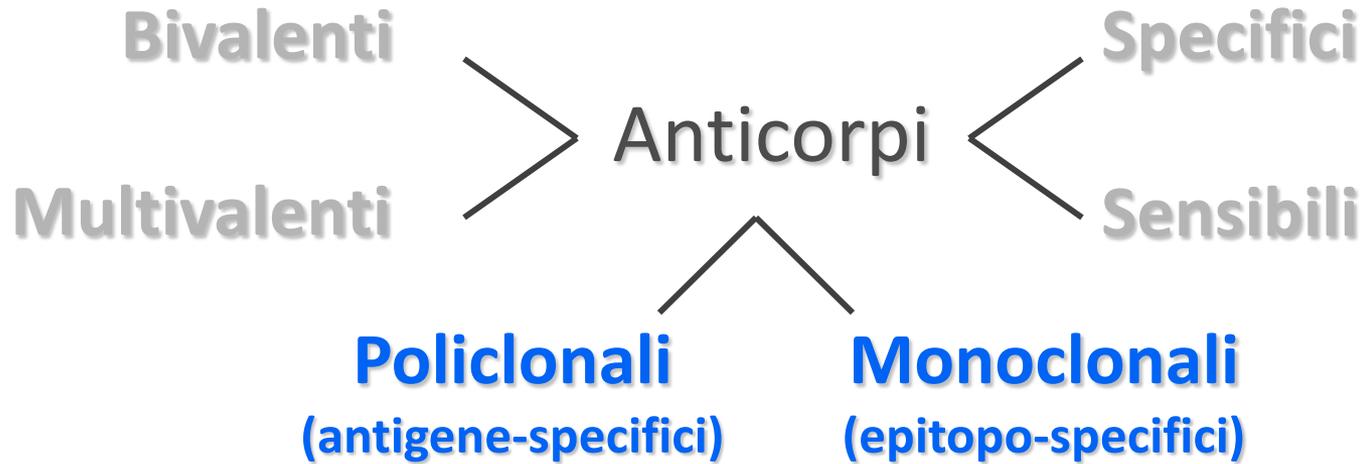


Fab  
(~ 55 kDa)

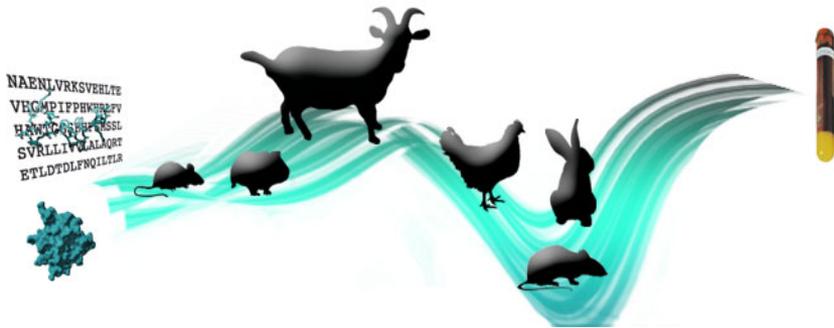
(~970 kDa)

10

# CARATTERISTICHE DI UN ANTICORPO



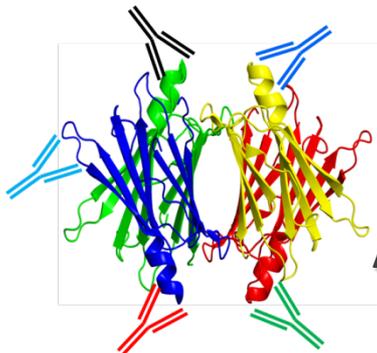
# PRODUZIONE DI ANTICORPI POLICLONALI



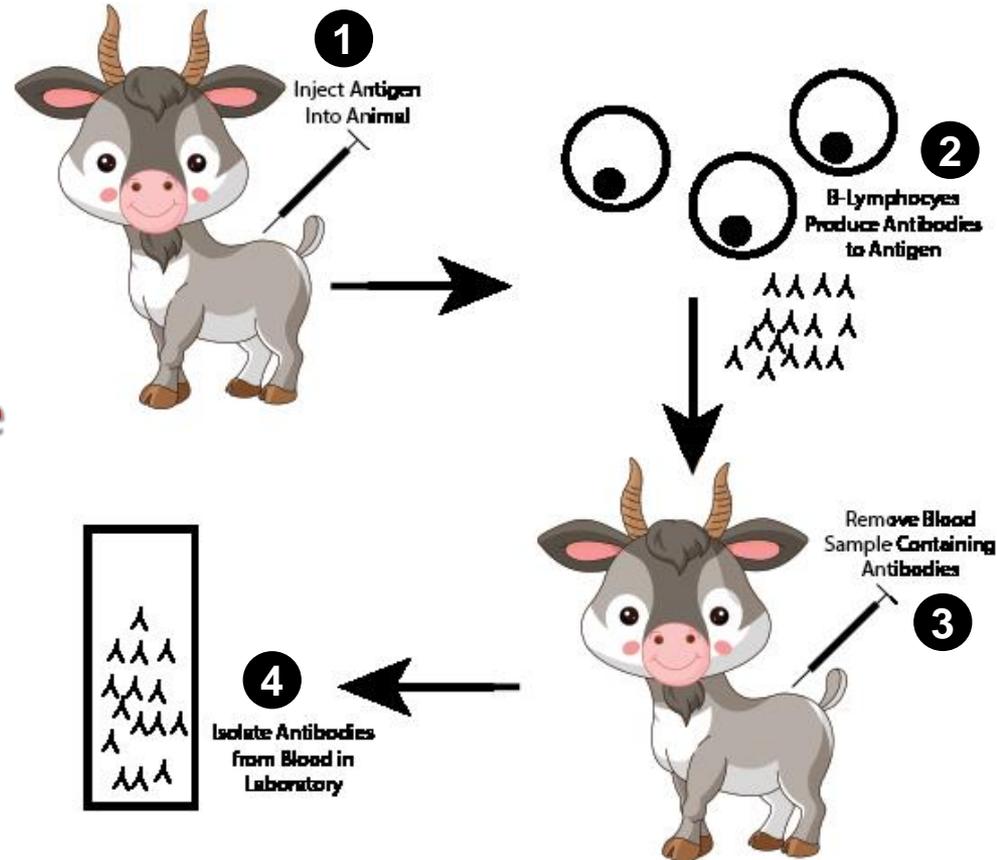
Anticorpi **policonali**:

-prodotti da **più tipi (cloni)** di cellule

-**antigene-specifici**: riconoscono **più epitopi** di uno **stesso antigene**



Proteina  
+  
Ab policlonali



# PRODUZIONE DI ANTICORPI MONOCLONALI

*Nature Vol. 256 August 7 1975*

---

**Continuous cultures of fused cells  
secreting antibody of predefined specificity**

---

*Köhler and Milstein. Nature. 1975;256(5517):495-7.*

1984



Fisiologia o  
Medicina



Niels K. Jerne



Georges J.F. Köhler



César Milstein

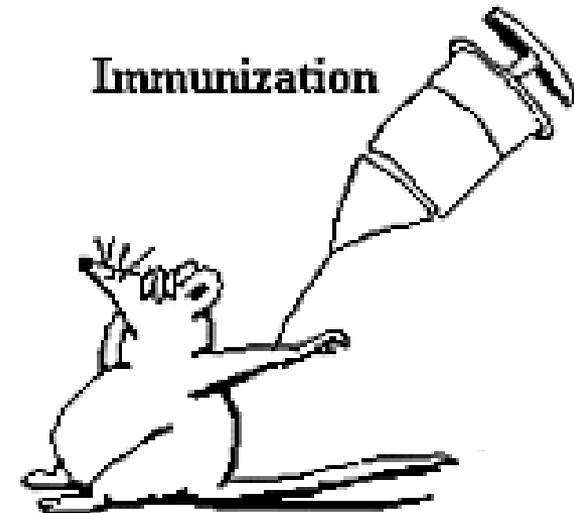
Basato sulla tecnologia degli **ibridomi**

-Cellule normali di topo vengono fuse con cellule tumorali (es. mieloma)

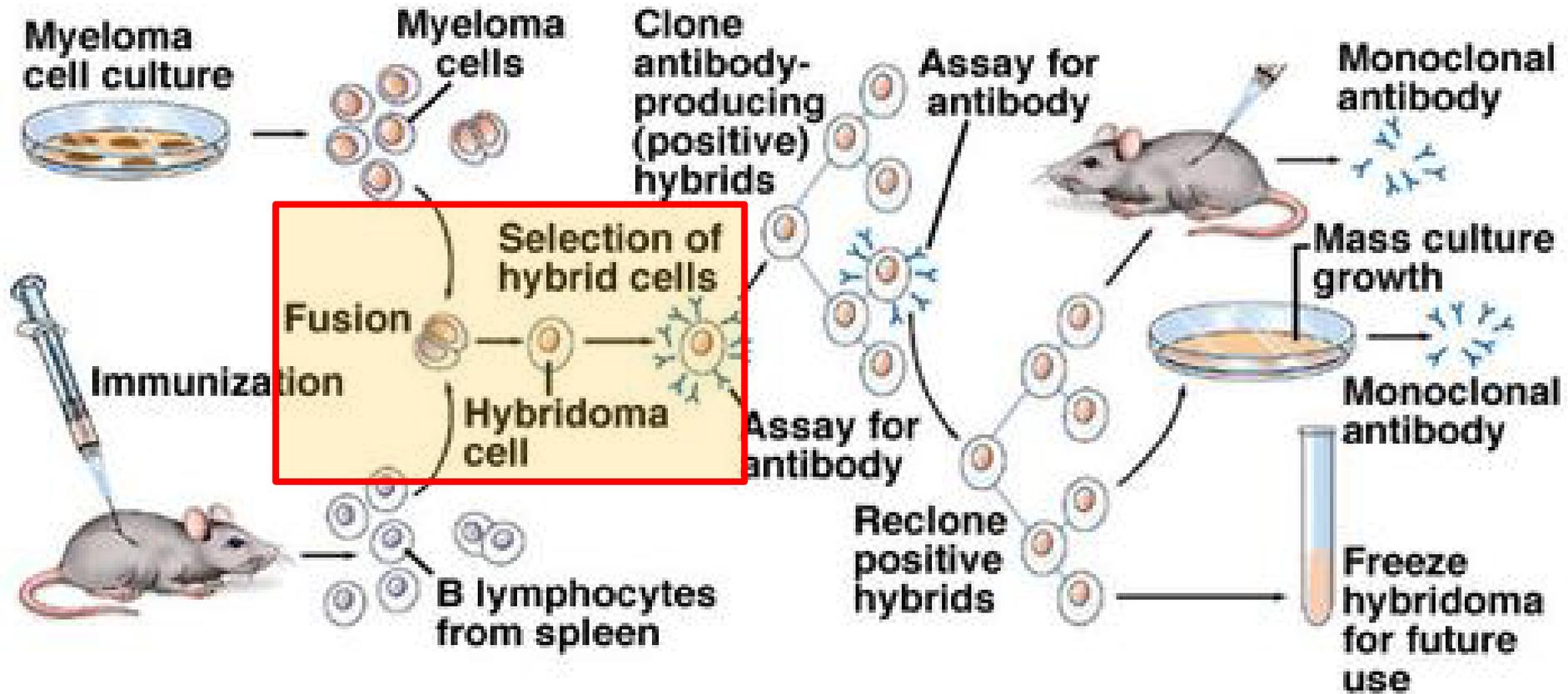
-La nuova cellula ibrida ha proprietà di entrambi i tipi cellulari:

-crescita illimitata;

-secrezione di **anticorpi monoclonali**

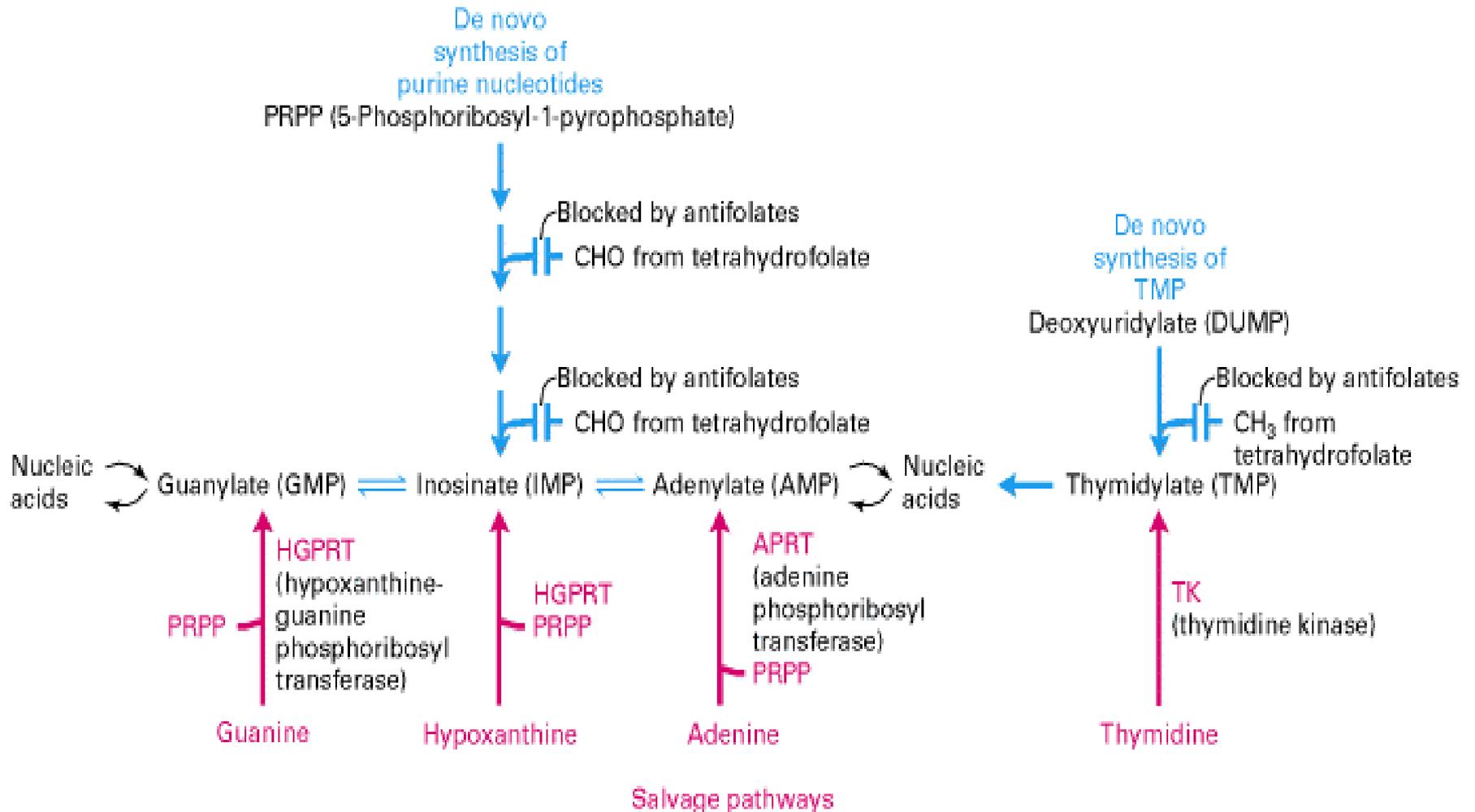


# PRODUZIONE DI ANTICORPI MONOCLONALI



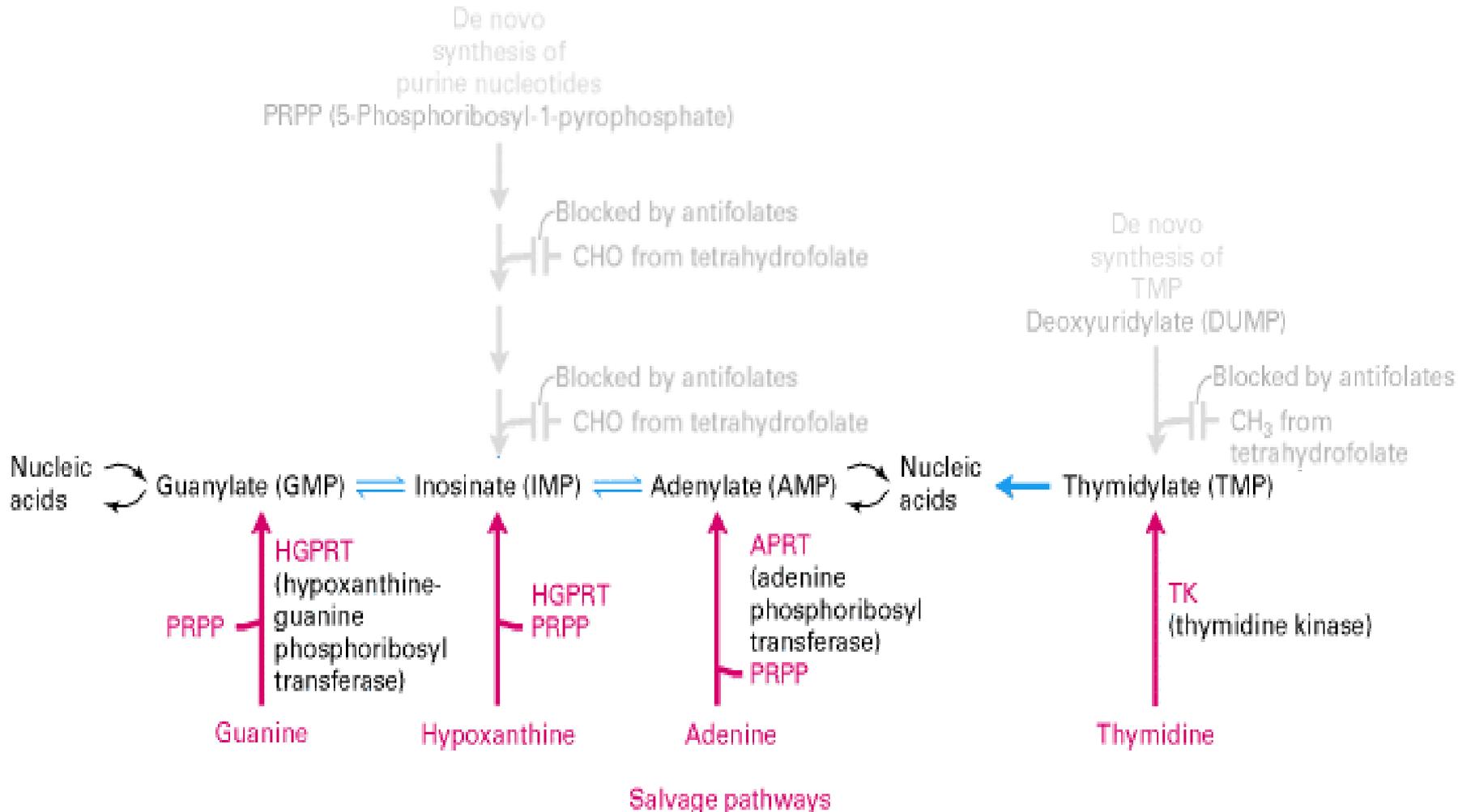
# PRODUZIONE DI ANTICORPI MONOCLONALI - *HAT selection*

- HAT:** **Hypoxanthine** → indispensabile per la sintesi di recupero delle basi puriniche  
**Aminopterin** → blocca la sintesi *de novo* delle basi puriniche e pirimidiniche  
**Thymidine** → indispensabile per la sintesi di recupero delle basi pirimidiniche



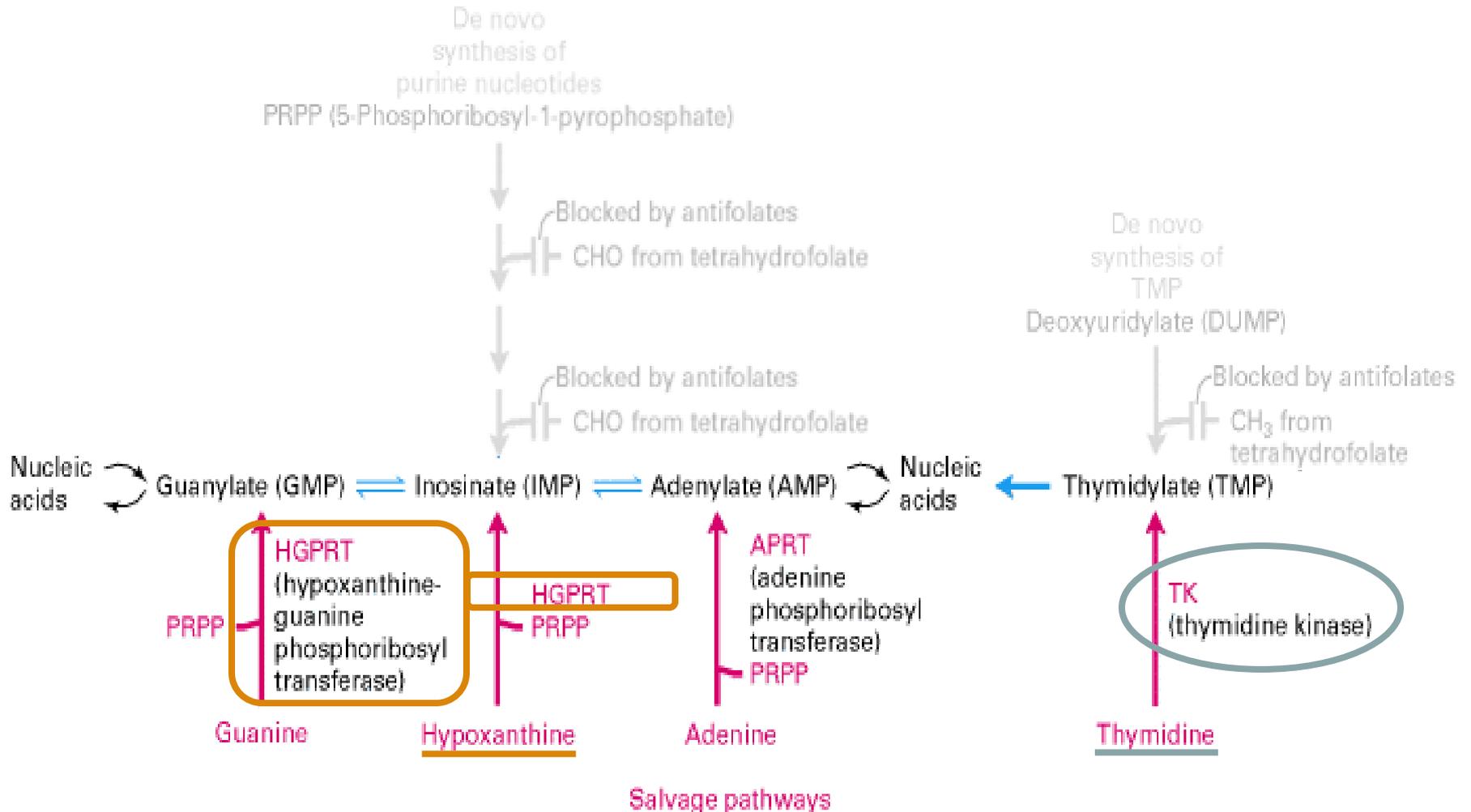
# PRODUZIONE DI ANTICORPI MONOCLONALI - *HAT selection*

- HAT:** Hypoxanthine → indispensabile per la sintesi di recupero delle basi puriniche  
Aminopterin → blocca la sintesi *de novo* delle basi puriniche e pirimidiniche  
Thymidine → indispensabile per la sintesi di recupero delle basi pirimidiniche



# PRODUZIONE DI ANTICORPI MONOCLONALI - *HAT selection*

- HAT:** **Hypoxanthine** → indispensabile per la sintesi di recupero delle basi puriniche  
**Aminopterin** → blocca la sintesi *de novo* delle basi puriniche e pirimidiniche  
**Thymidine** → indispensabile per la sintesi di recupero delle basi pirimidiniche



# PRODUZIONE DI ANTICORPI MONOCLONALI - *HAT selection*

**HAT:** **Hypoxanthine** → indispensabile per la sintesi di recupero delle basi puriniche  
**Aminopterin** → blocca la sintesi *de novo* delle basi puriniche e pirimidiniche  
**Thymidine** → indispensabile per la sintesi di recupero delle basi pirimidiniche

**Genotipo:**

**Tipo di cellula:**

**Selezione HAT:**

**Motivo:**

HGPRT -



HGPRT +



HGPRT +



**NO sintesi DNA:**  
- carenza di HGPRT nella "salvage pathway"  
- l'aggiunta di aminopterin blocca la sintesi *de novo*

**Linea continua e sintesi DNA:**  
1) Caratteristiche di cellula **immortalizzata** (**mieloma**)  
2) Capacità di **sintesi DNA** (enzima **HGPRT**; **cellule B** di milza)

**Mortalità:**  
HGPRT normale e sintesi DNA *ma* limitato numero di cicli di replicazione in coltura.

*HGPRT = hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (oppure anche TK-, TK = thymidine kinase)*

# PRODUZIONE DI ANTICORPI MONOCLONALI - *HAT selection*

## Hybridoma selection using HAT medium

Hybridoma selection after fusion of myelomas and spleen cells is a critical step in monoclonal antibody production.

Often scientists use the **HAT (hypoxanthine-aminopterin-thymidine) method**.

During the fusion process, three types of cells are present: (1) **unfused myeloma cells** that are **deficient in the HGPRT enzyme**, (2) **unfused spleen cells**, and (3) **fused hybridoma cells**.

**Unfused spleen cells** are easily selected against since they **do not replicate in culture**.

**Unfused myelomas** can be **selected** against **using** media containing **HAT**. The **aminopterin** found in the medium **blocks** the **de novo DNA** nucleotide **synthesis** pathway. Typically when the *de novo* pathway is blocked, cells will then utilize the **salvage pathway** as an alternative means to replicate (only if hypoxanthine and thymidine are present). However, these myelomas are unable to do so since they are **deficient in the HGPRT enzyme**, which is **required for the salvage pathway**. Hence, myelomas are unable to replicate in culture.

**Only hybridomas survive**. Hybridomas inherit a functioning **HGPRT enzyme from** the **spleen cells**, so even though the *de novo* pathway is blocked, they can still use the salvage pathway to replicate, and are "**immortal**" due to features conferred by **myeloma cells**.

# PRODUZIONE DI ANTICORPI MONOCLONALI

*Nature Vol. 256 August 7 1975*

**Continuous cultures of fused cells  
secreting antibody of predefined specificity**

*Köhler and Milstein. Nature. 1975;256(5517):495-7.*

1984



Fisiologia o  
Medicina



Niels K. Jerne



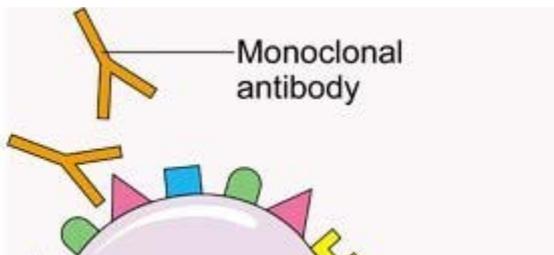
Georges J.F. Köhler



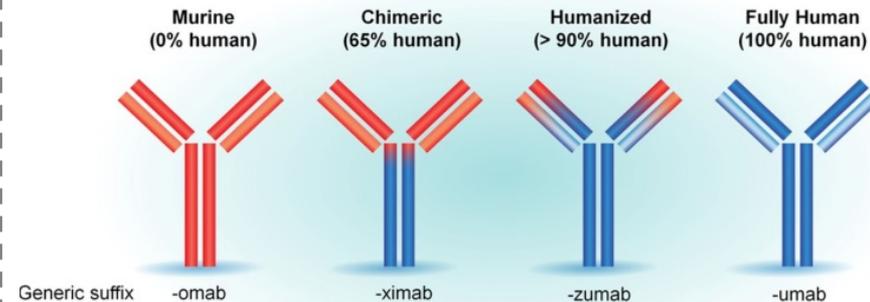
César Milstein

Anticorpi **monoclonali**:

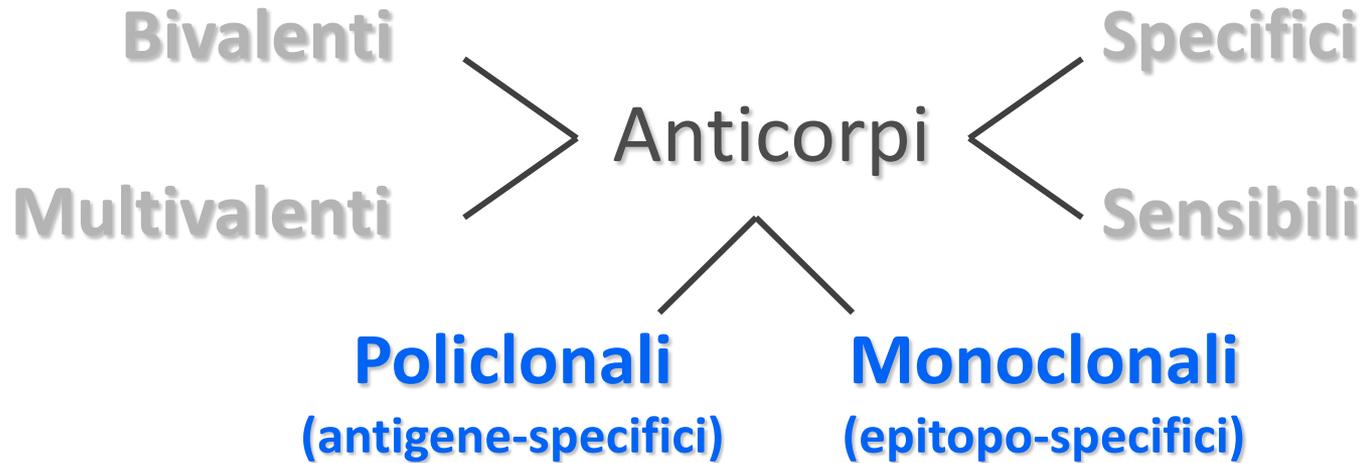
- anticorpi identici** prodotti da **un solo tipo (clone)** di cellule
- epitopo-specifici**: riconoscono **uno specifico epitopo** sull'antigene



Anticorpi monoclonali  
ad uso terapeutico:

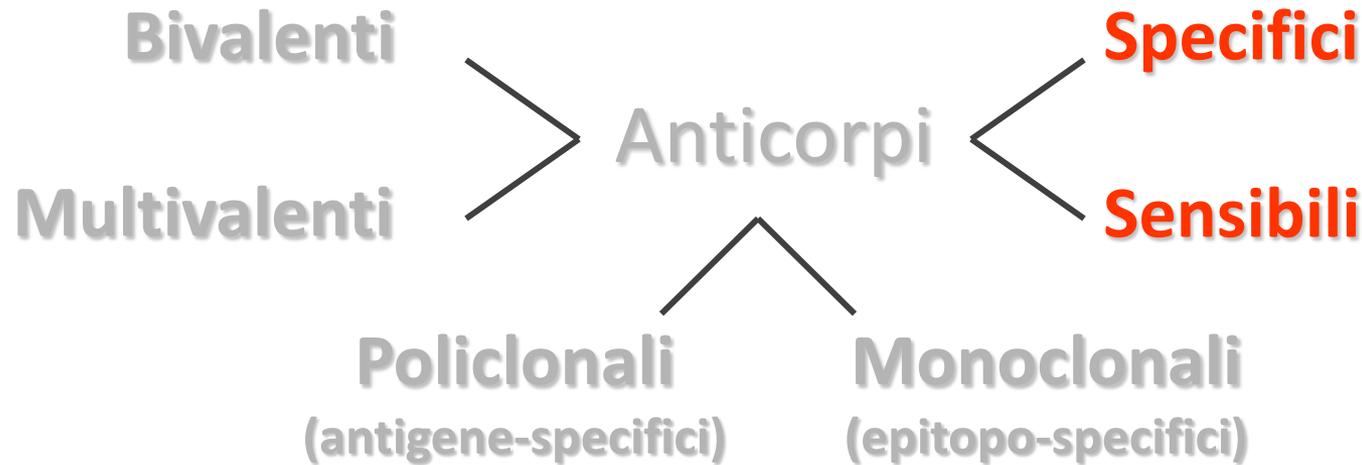


# CARATTERISTICHE DI UN ANTICORPO



	<u>Polyclonal antibodies</u>	<u>Monoclonal Antibodies</u>
<i>Produced by:</i>	Many B cell clones	A single B cell clone
<i>Bind to:</i>	Multiple epitopes of all antigens used in the immunization	A single epitope of a single antigen
<i>Antibody class:</i>	A mixture of different Ab classes (isotypes)	All of a single Ab class
<i>Ag-binding sites:</i>	A mixture of Abs with different antigen-binding sites	All Abs have the same antigen binding site
<i>Potential for cross-reactivity:</i>	High	Low

# CARATTERISTICHE DI UN ANTICORPO



## Cross reattività

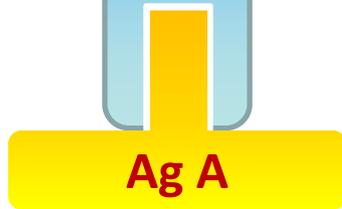
Capacità di un singolo Ab di legarsi a **più epitopi** o di una popolazione di Ab di reagire con **più antigeni**.

### Cause:

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

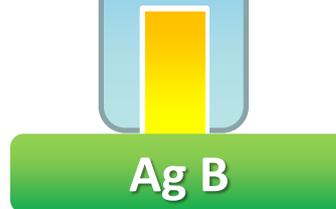
# CROSS REATTIVITÀ

Ab  
Anti-A



Riconoscimento  
**corretto** Ab-Ag A

Ab  
Anti-A

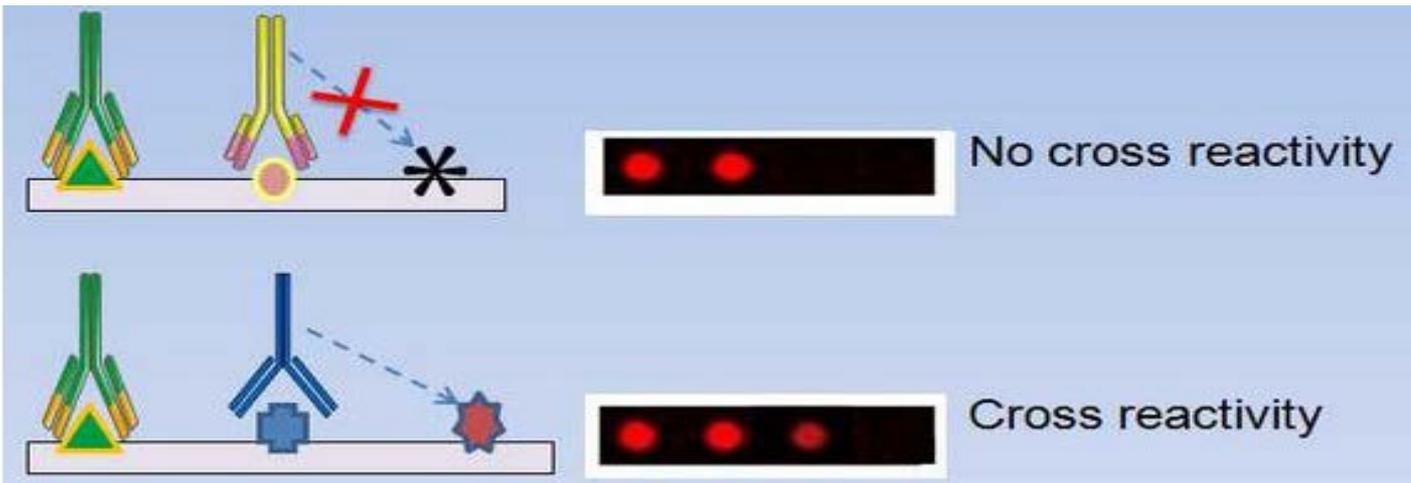


Epitopi  
condivisi (1)

Ab  
Anti-A



Epitopi  
simili (2)

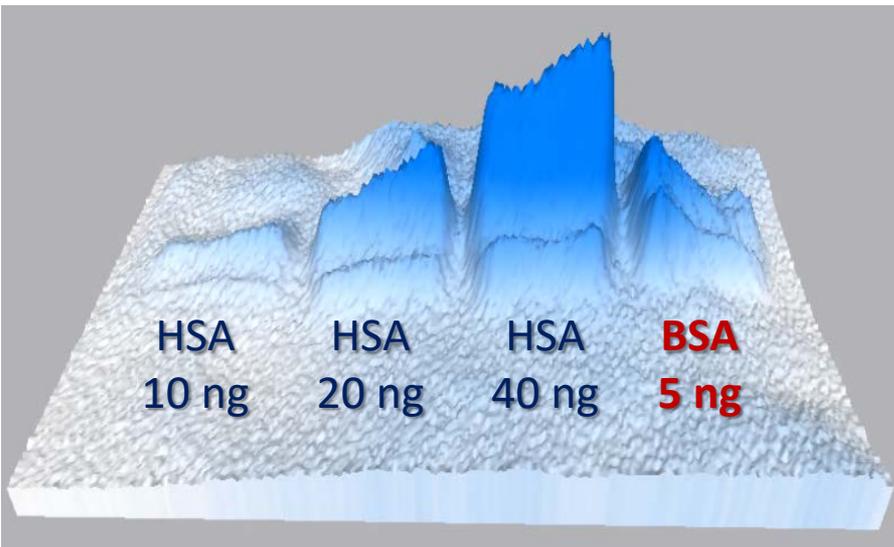


Effetto:

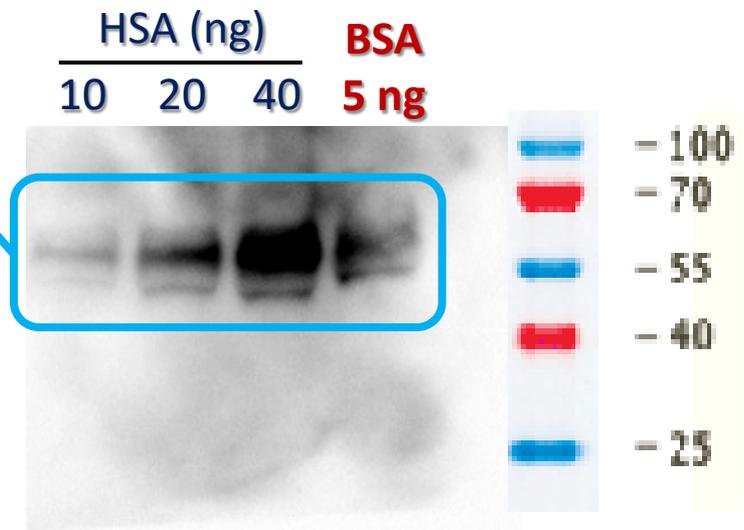
**falso**  
segnale  
**positivo**

# ESEMPIO REALE DI CROSS REATTIVITÀ

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

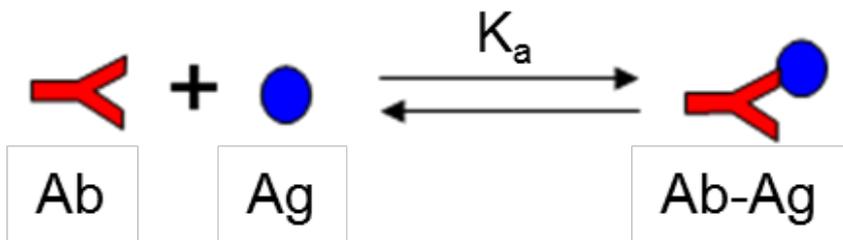
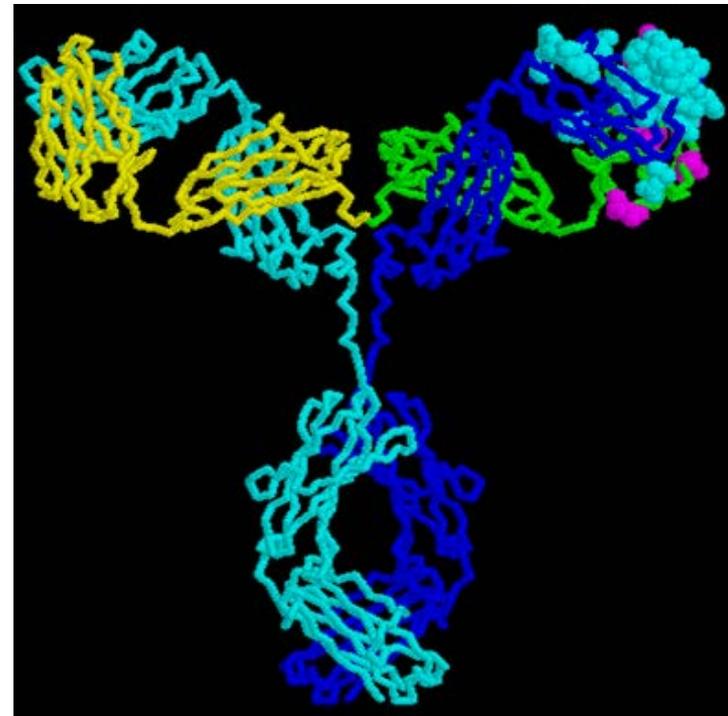


Riconoscimento  
con anti-BSA



# AFFINITÀ

- **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**.

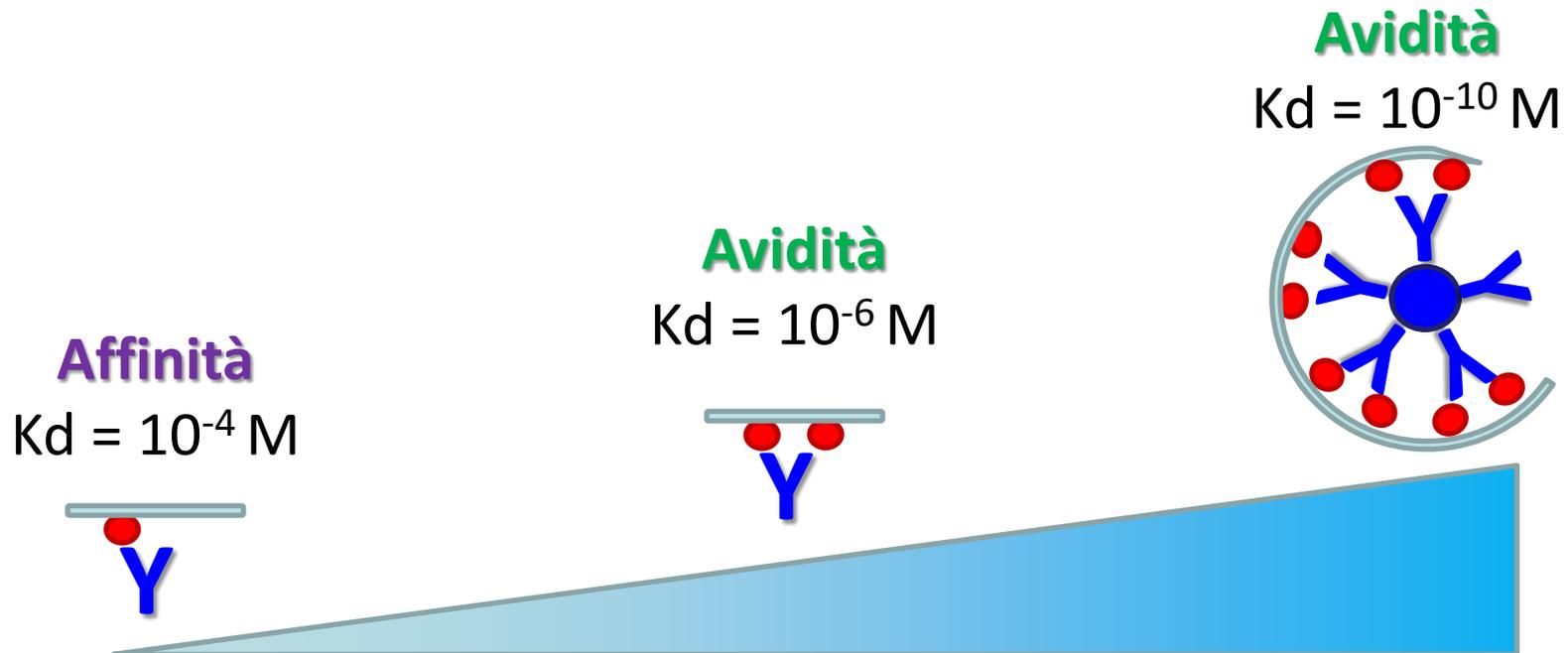


$$K_A = \frac{[Ab-Ag]}{[Ab] [Ag]}$$

- **Reversibilità** del legame.
- Matematicamente è dato dalla **costante di associazione** (**Ka** o dalla **Kd**).

# AVIDITÀ

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

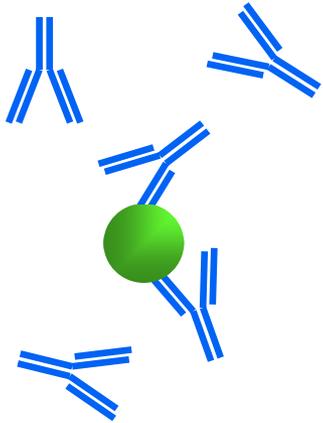


L'**avidità** è **>** della somma delle singole affinità

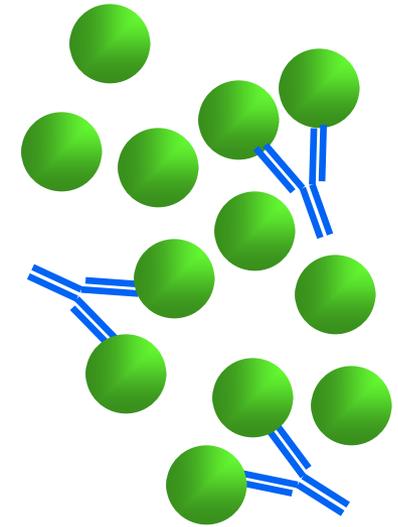
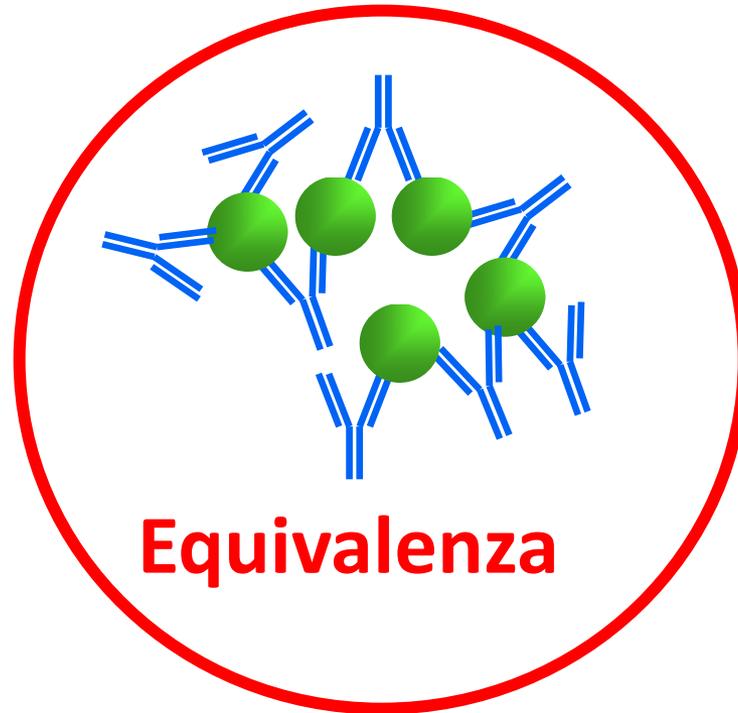
**Forza Ionica - pH - Temperatura contano sempre**

# 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**

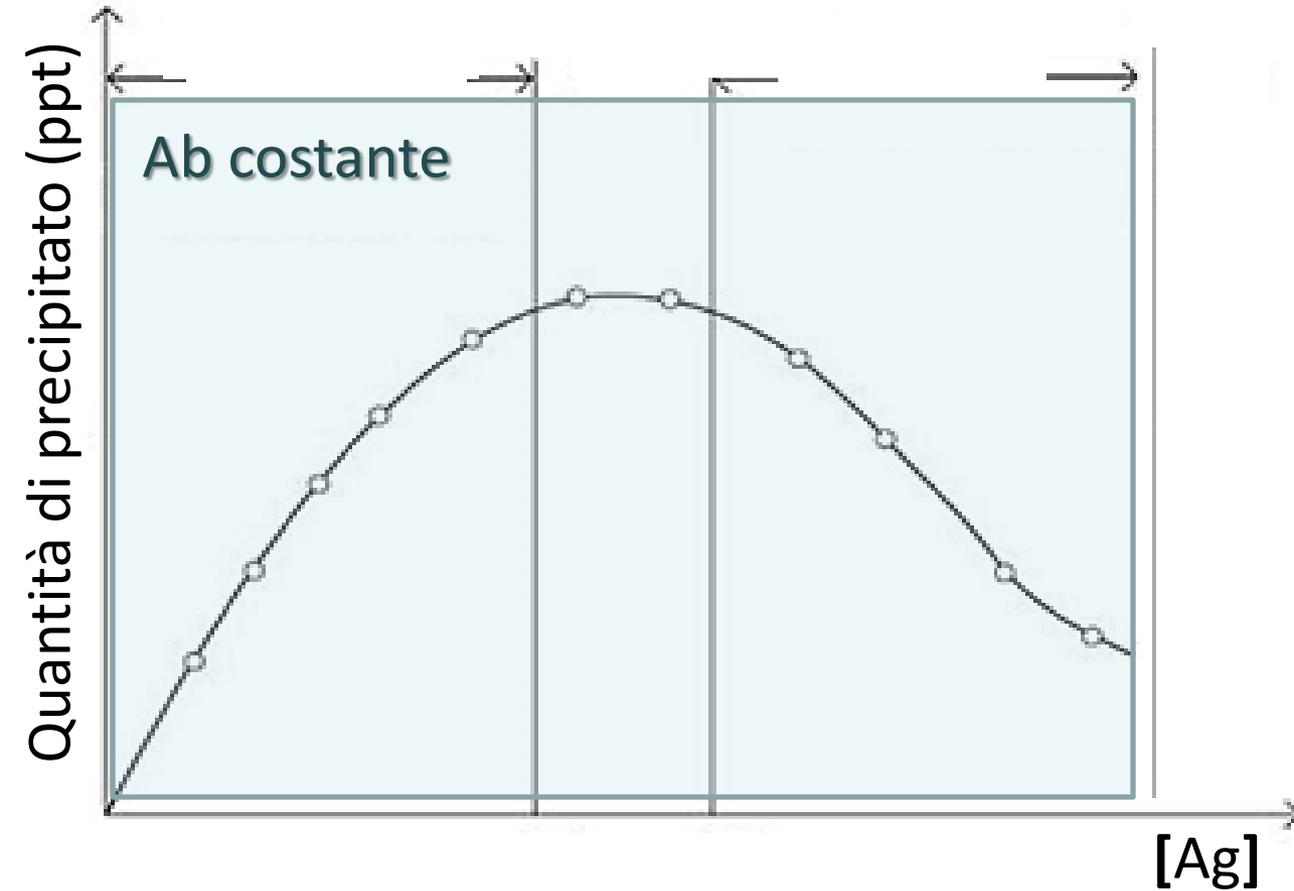


Eccesso di **Ag**

**Non** può avvenire con Ab monoclonali che riconoscano un solo epitopo sull'antigene

# ZONA DI EQUIVALENZA

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

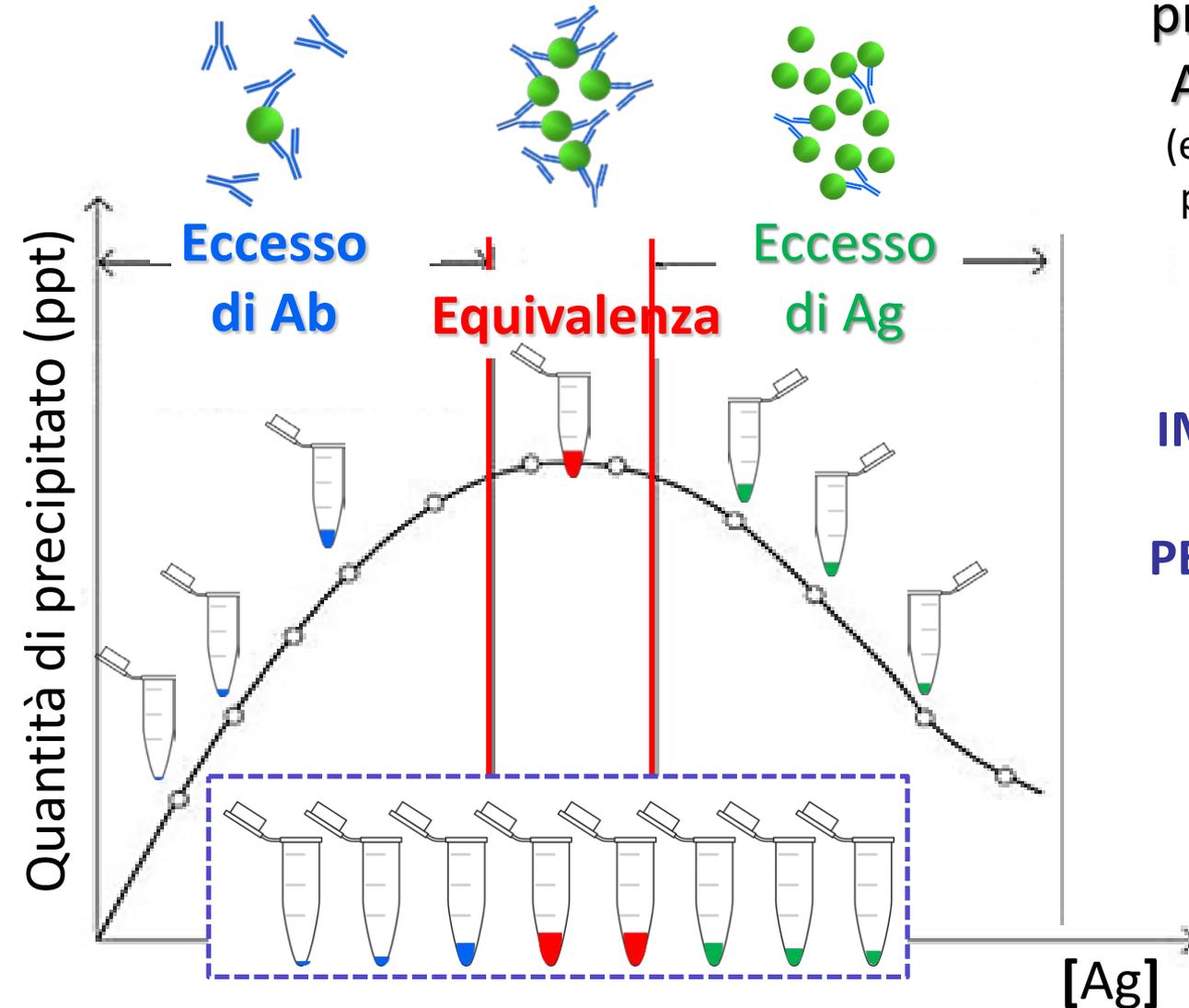


# ZONA DI EQUIVALENZA

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

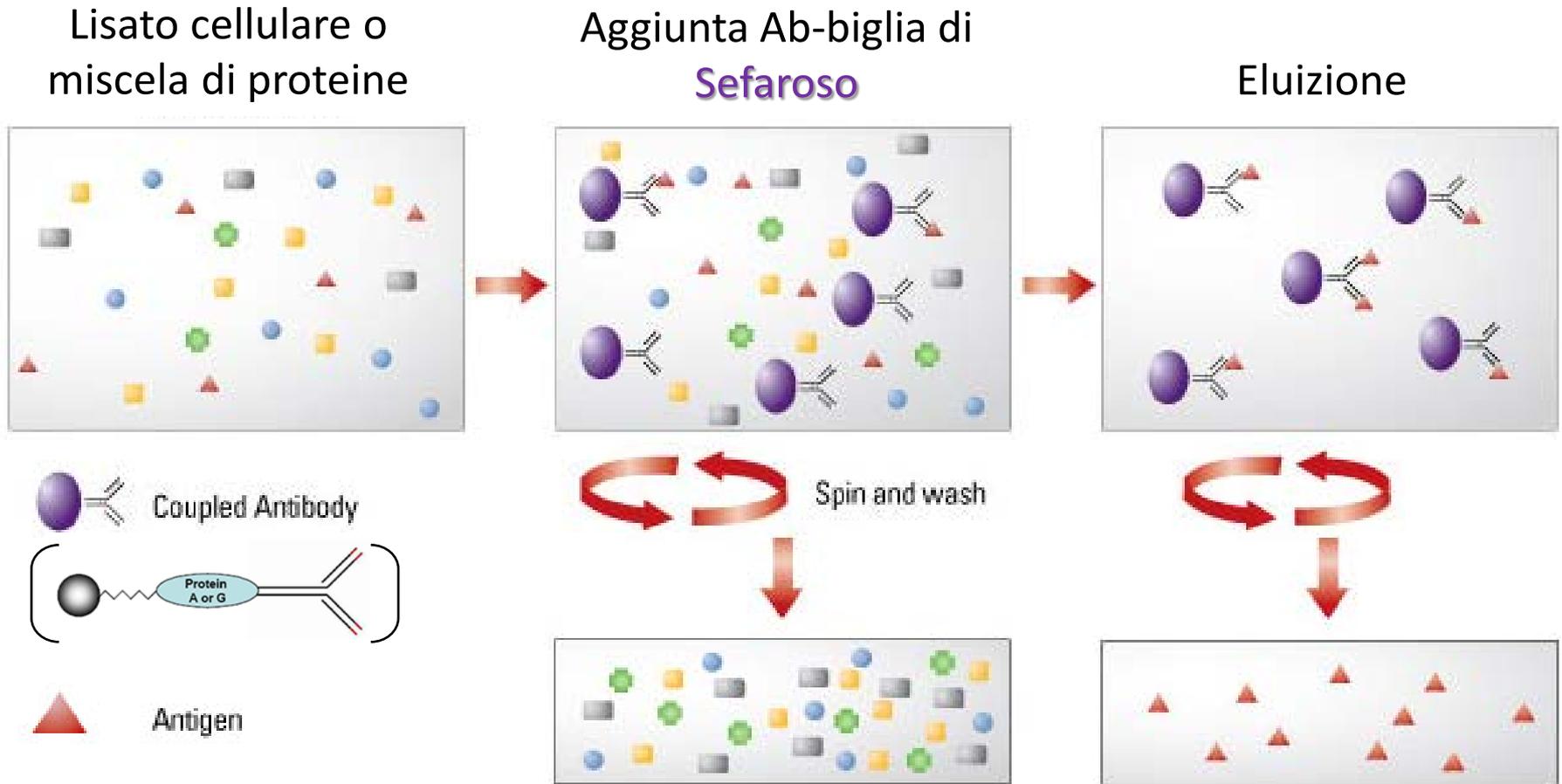
Per determinare la presenza o isolare un un Ag in/da un campione.  
(es. tossine, immunoglobuline, prodotti solubili da patogeni)

**IMMUNOPRECIPITAZIONE  
IN SOLUZIONE  
PER ANALISI QUALITATIVE**



# IMMUNOPRECIPITAZIONE IN SOLUZIONE - OGGI

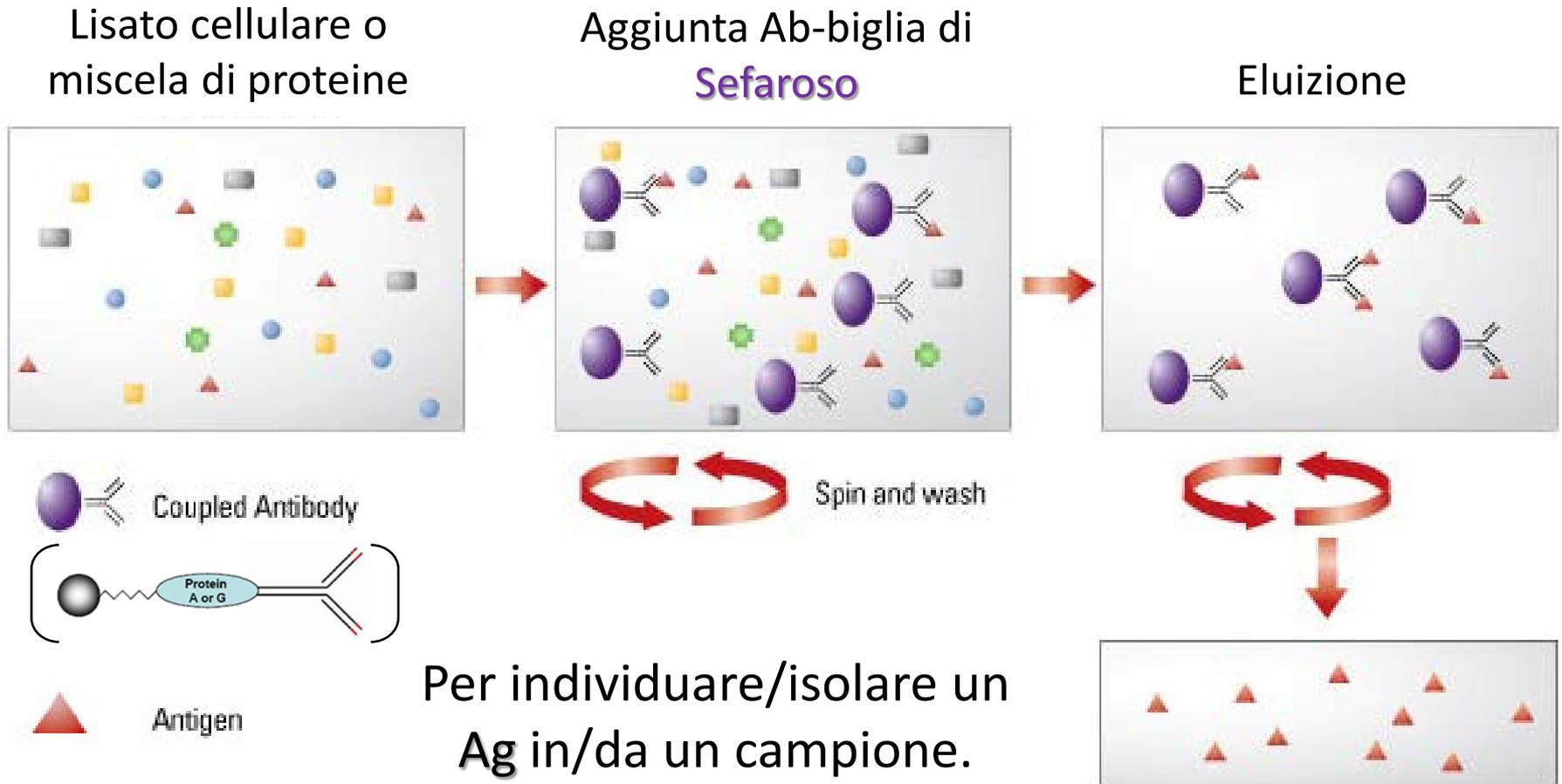
## AUMENTO DELL'EFFICIENZA (1)



In questo caso, l'Ab può essere sia policlonale che monoclonale

# IMMUNOPRECIPITAZIONE IN SOLUZIONE - OGGI

## AUMENTO DELL'EFFICIENZA (1)



In questo caso, l'Ab può essere sia policlonale che monoclonale

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

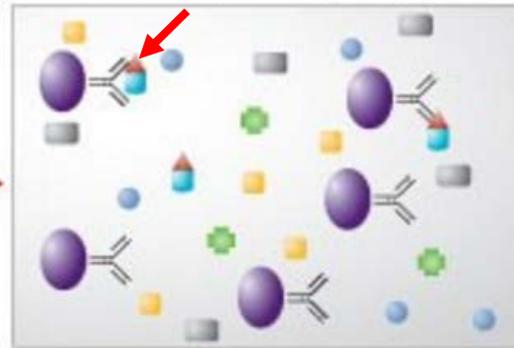
# ESTENSIONE DELLA IMMUNOPRECIPITAZIONE

## CO-IMMUNOPRECIPITAZIONE

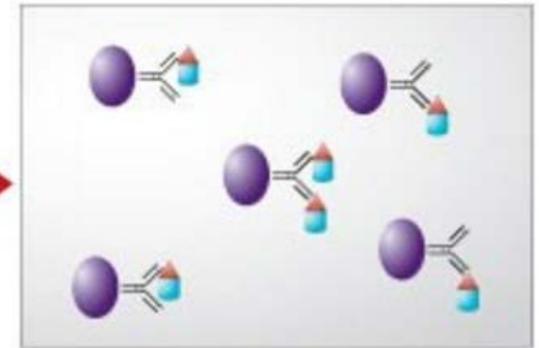
Lisato cellulare o  
miscela di proteine



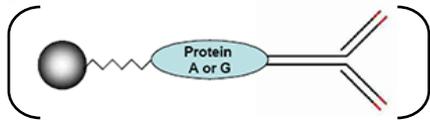
Aggiunta Ab-biglia di  
Sefaroso



Centrifugazione



 Coupled Antibody

 Protein  
A or G

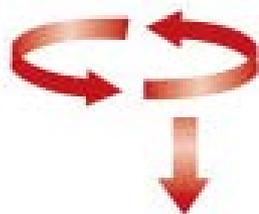
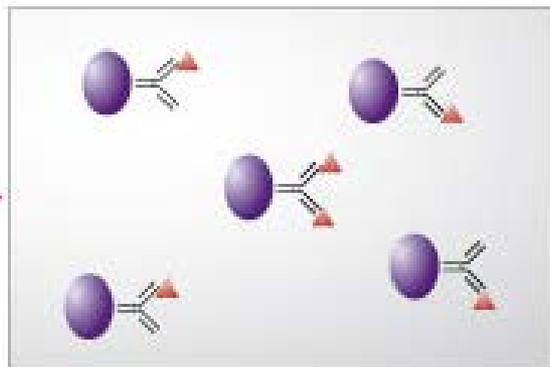
 Antigen

 Protein Interacting  
with Antigen

Per isolare il target primario (l'Ag) e altre  
molecole che con esso interagiscono

# IMMUNOPRECIPITAZIONE vs CO-IMMUNOPRECIPITAZIONE

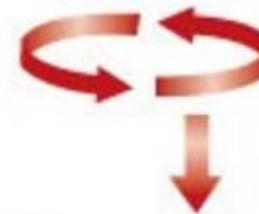
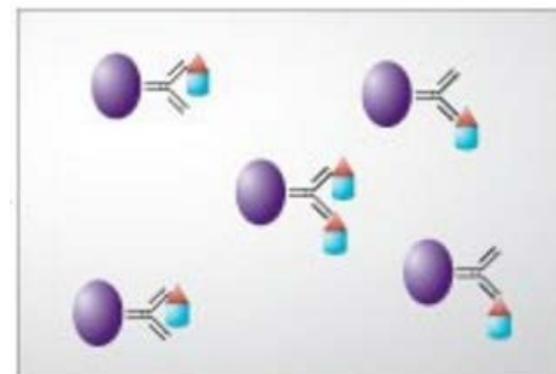
## IP



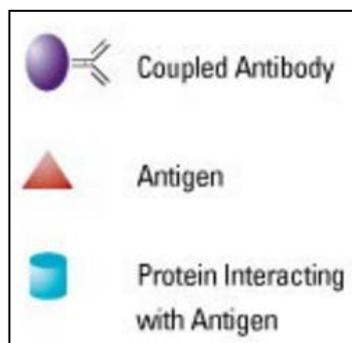
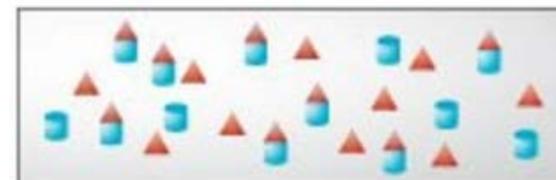
Elute



## Co-IP



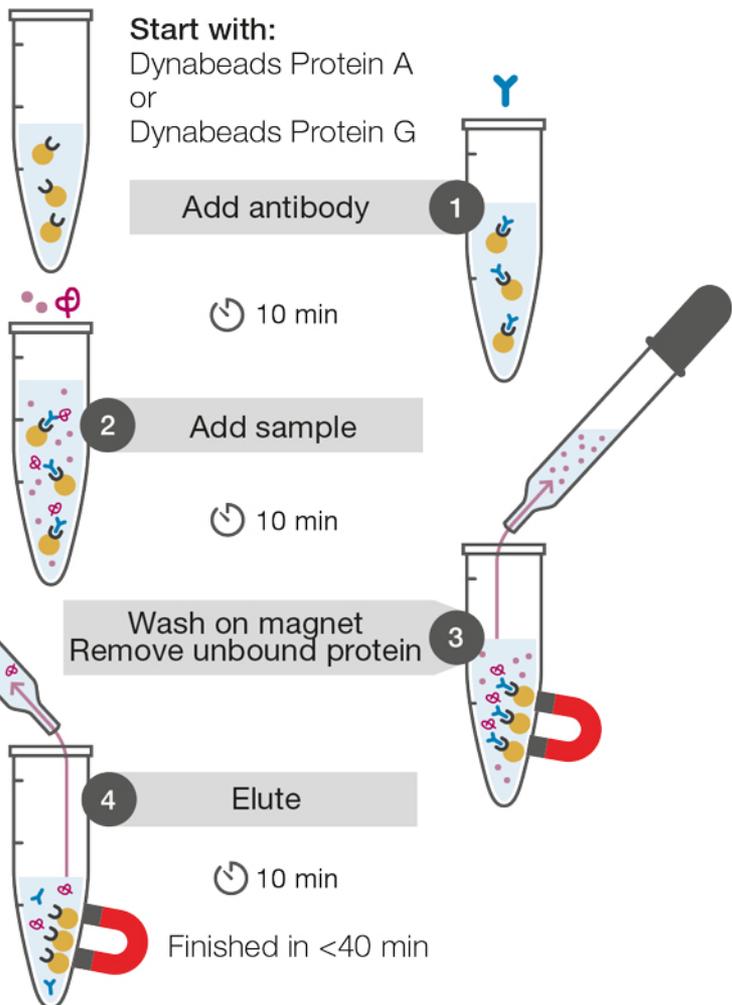
Elute



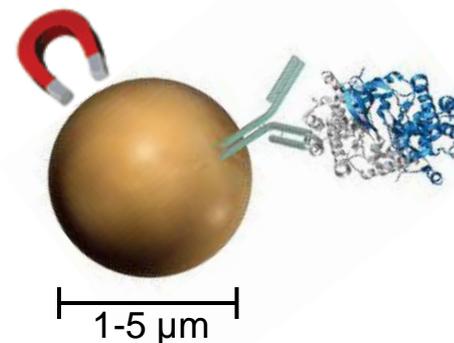
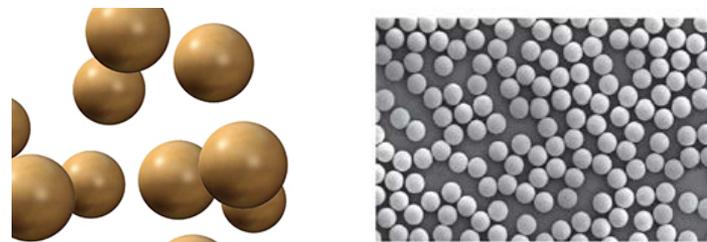
Si parla di **IP** o **Co-IP** se la molecola di interesse nell'esperimento è il **target primario (Ag)** o **secondario (proteina complessata)**

# IMMUNOPRECIPITAZIONE IN SOLUZIONE - OGGI

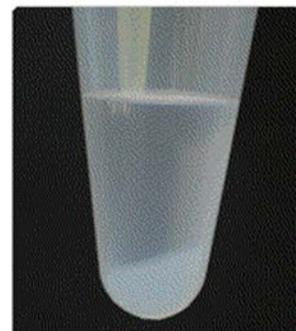
## AUMENTO DELL'EFFICIENZA (2)



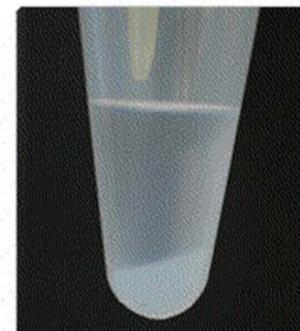
- Dynabeads
- Antibody
- Protein A or G
- Target protein
- Nonspecific protein



Loss of sepharose & sample



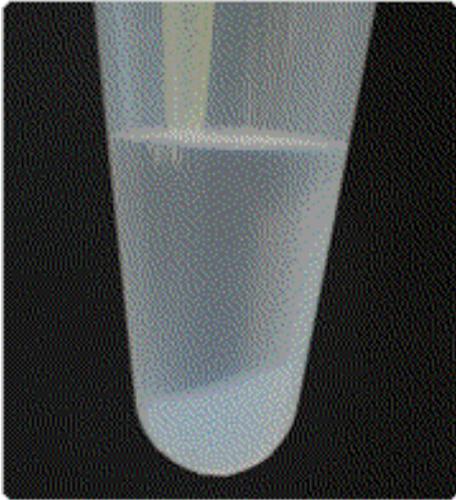
Unwanted remaining buffer



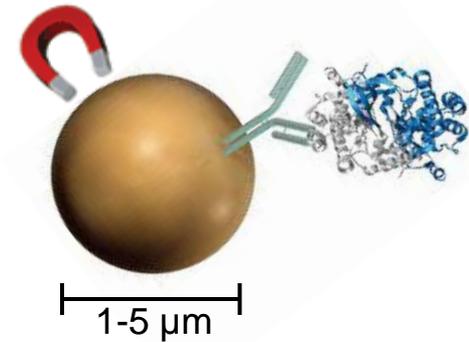
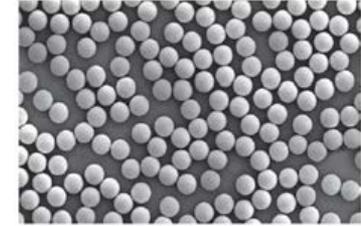
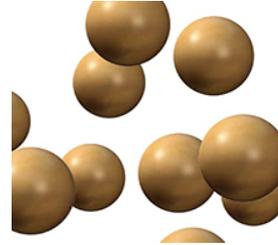
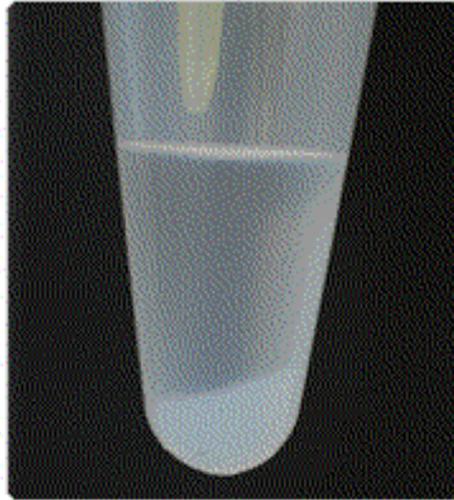
# IMMUNOPRECIPITAZIONE IN SOLUZIONE - OGGI

## AUMENTO DELL'EFFICIENZA (2)

Loss of sepharose & sample



Unwanted remaining buffer

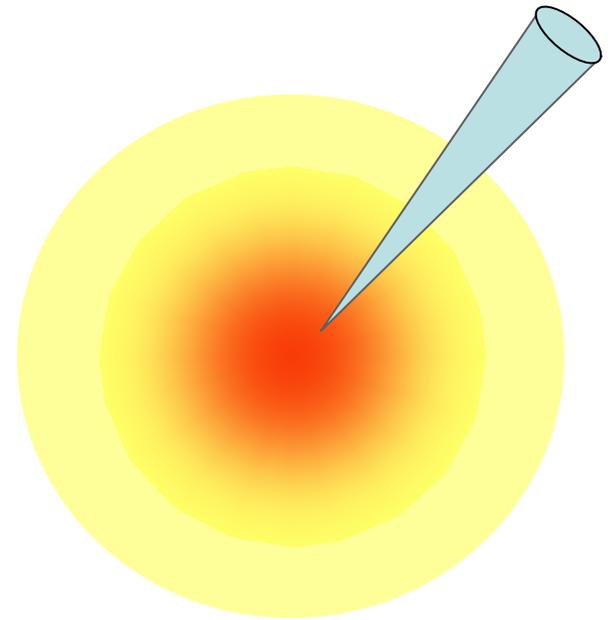


# INDAGINI QUANTITATIVE: IMMUNOPRECIPITAZIONE SU GEL IMMUNODIFFUSIONE (ID)

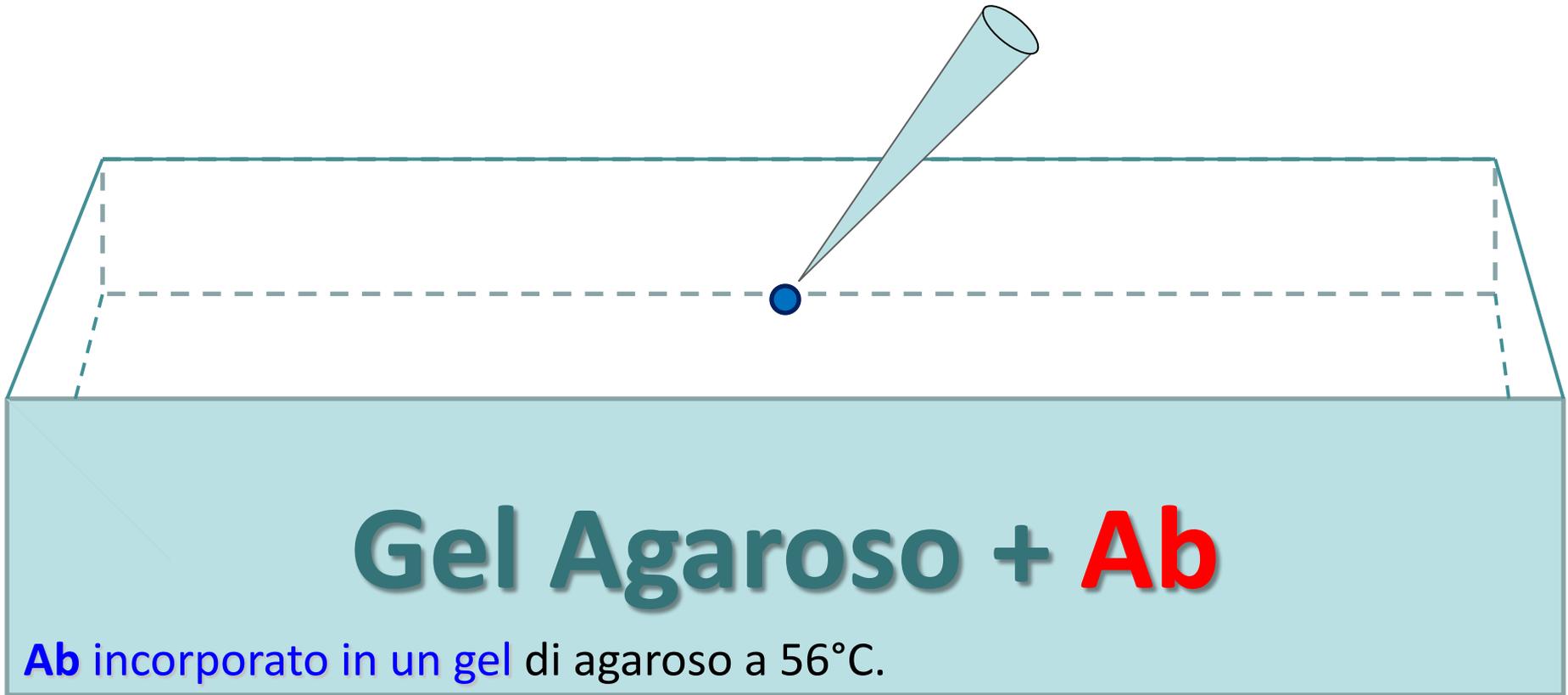
**Concetto** : antigeni solubili diffondono in gel di agarosio creando un gradiente di concentrazione.

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

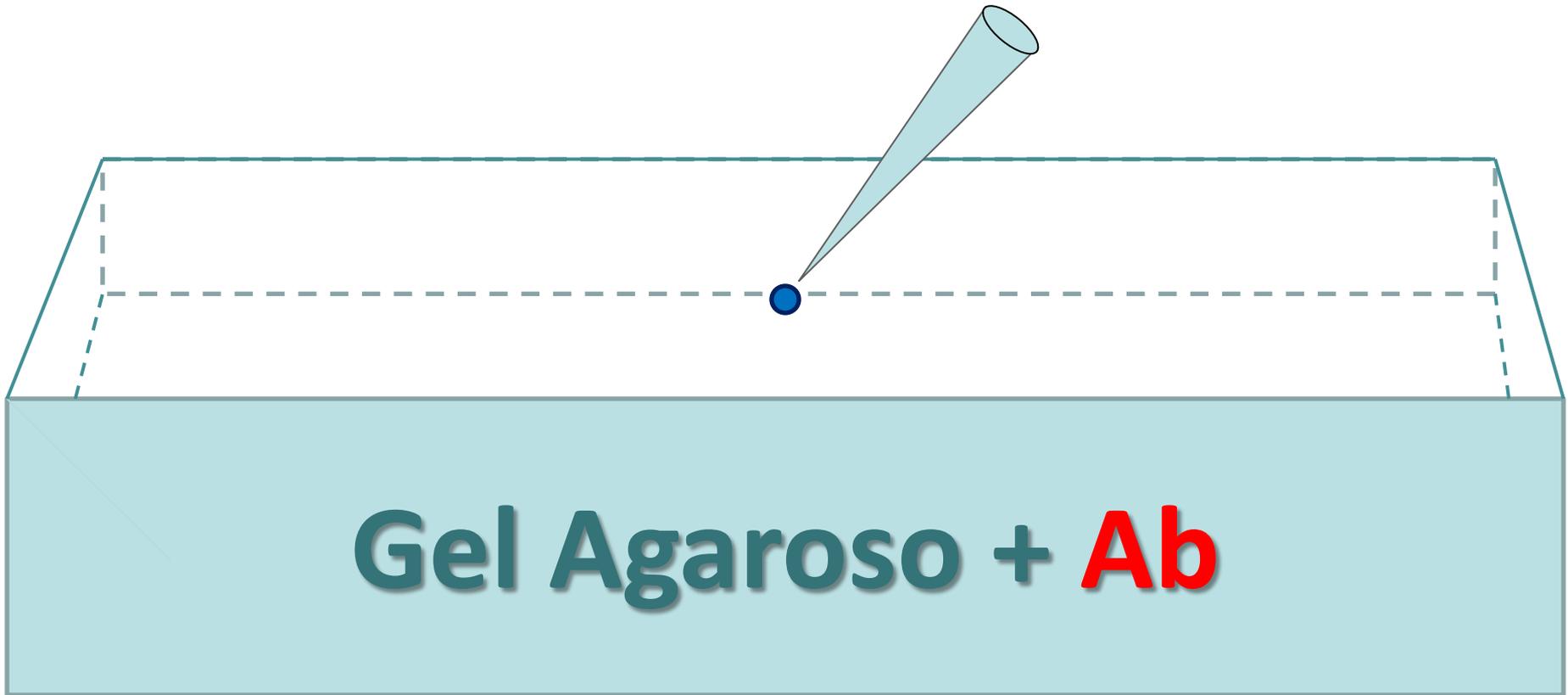
**Min [Ag]**: alla massima distanza dal punto di deposizione dell'Ag.



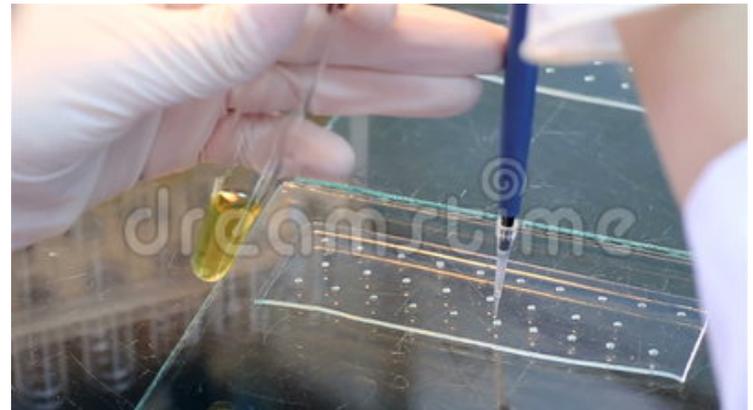
# IMMUNODIFFUSIONE RADIALE SEMPLICE (SRID)



# IMMUNODIFFUSIONE RADIALE SEMPLICE (SRID)



● = Concentrazione  
massima



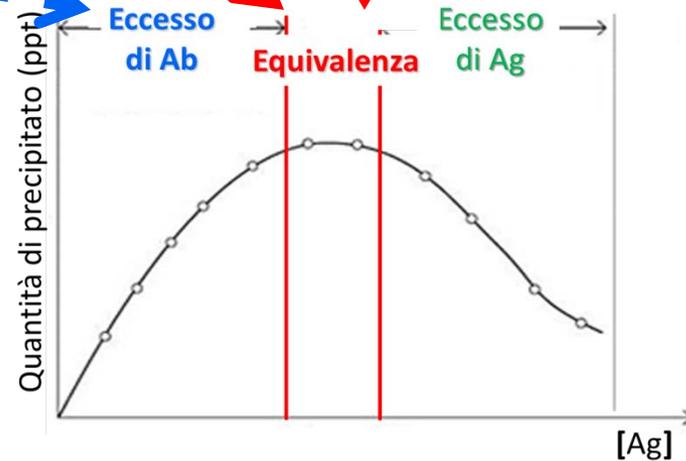
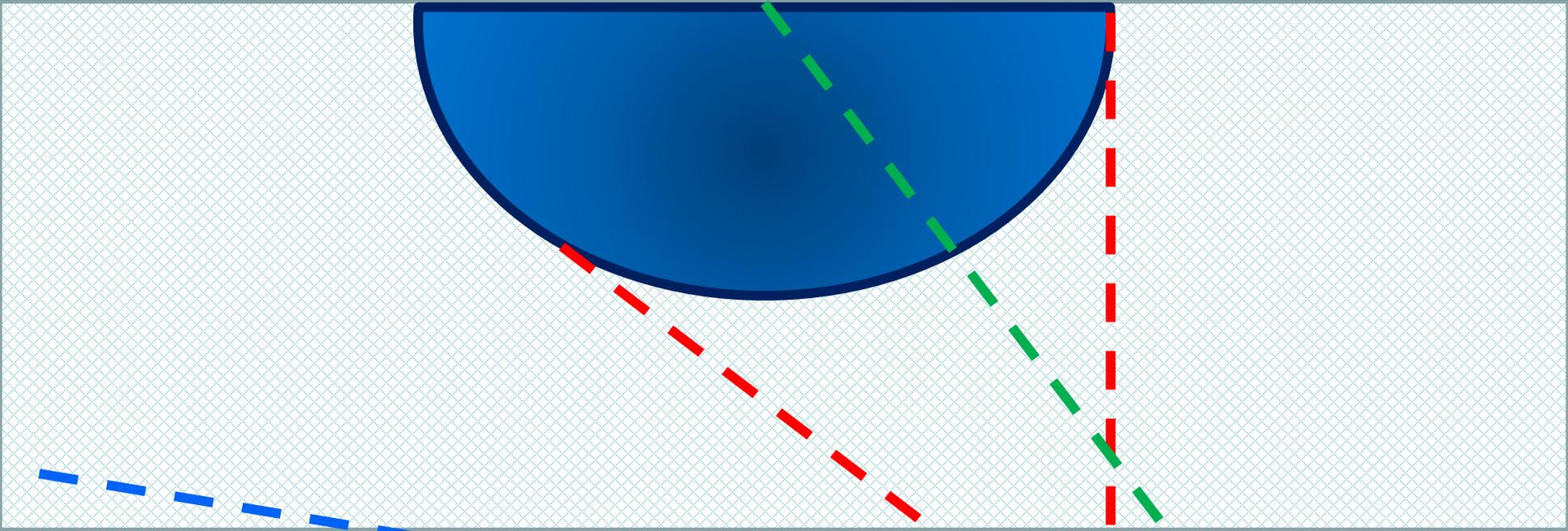
# IMMUNODIFFUSIONE RADIALE SEMPLICE (SRID)



● = Concentrazione  
massima

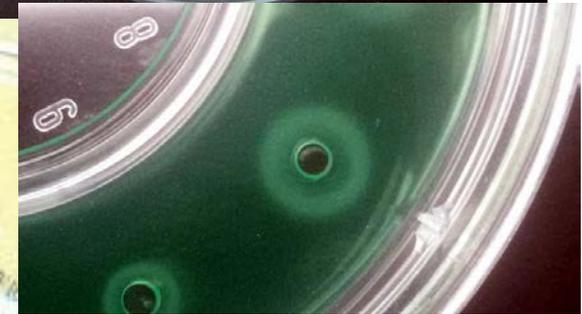
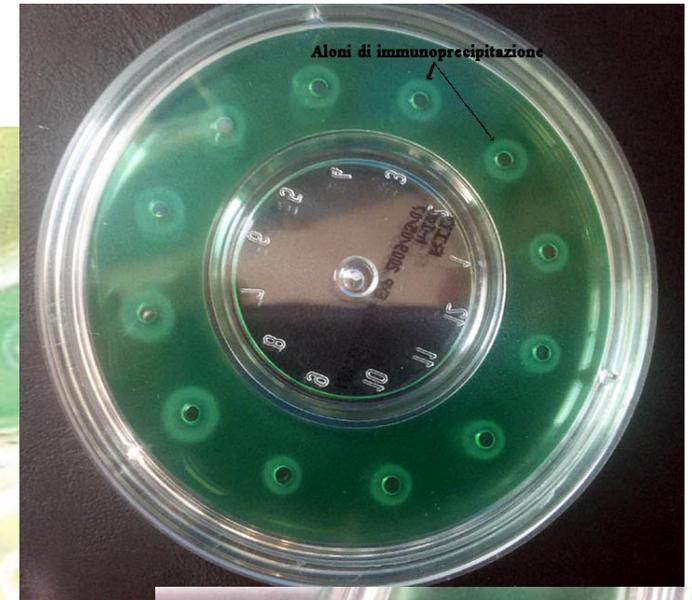
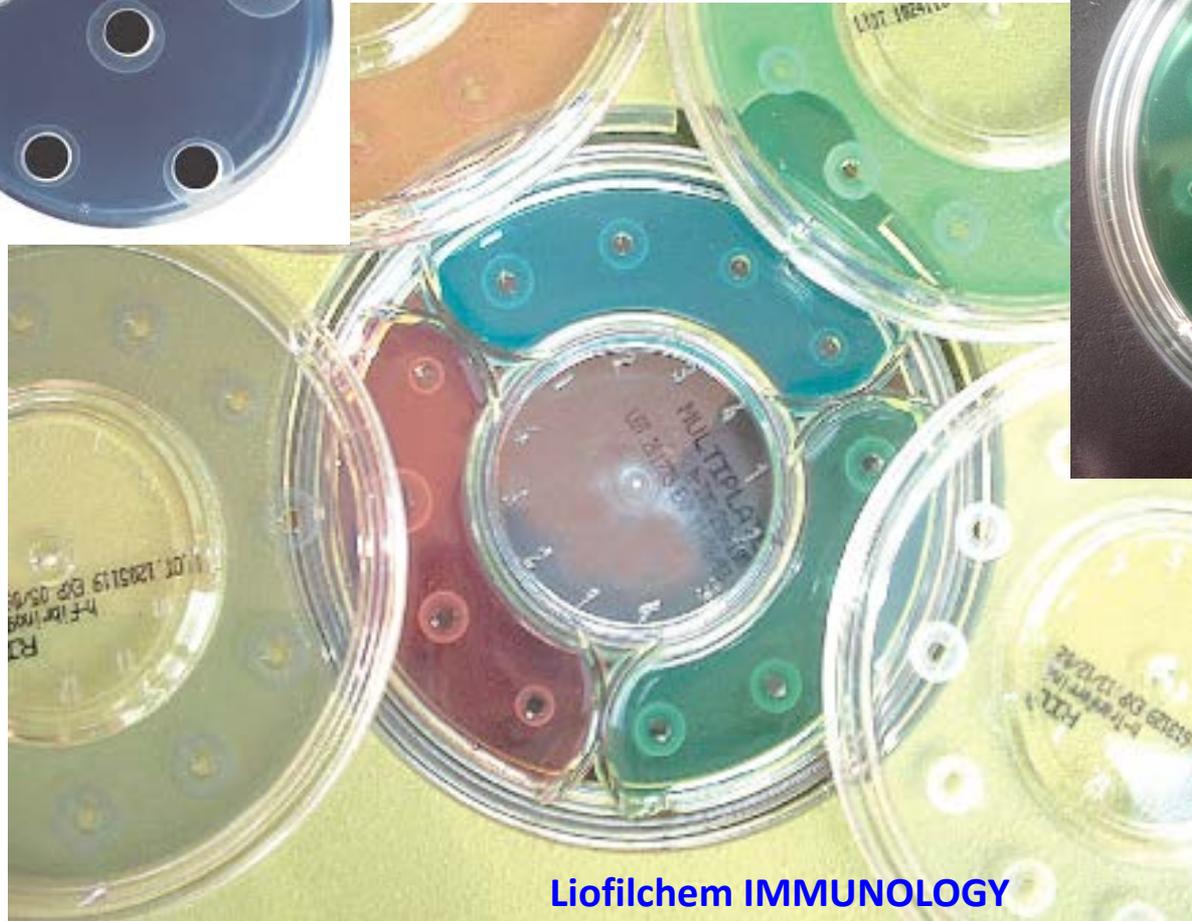
○ = Zona di equivalenza

# IMMUNODIFFUSIONE RADIALE SEMPLICE (SRID)



● = Concentrazione massima

# PIASTRE PER SRID



Contengono **coloranti** per evidenziare gli immunocomplessi.

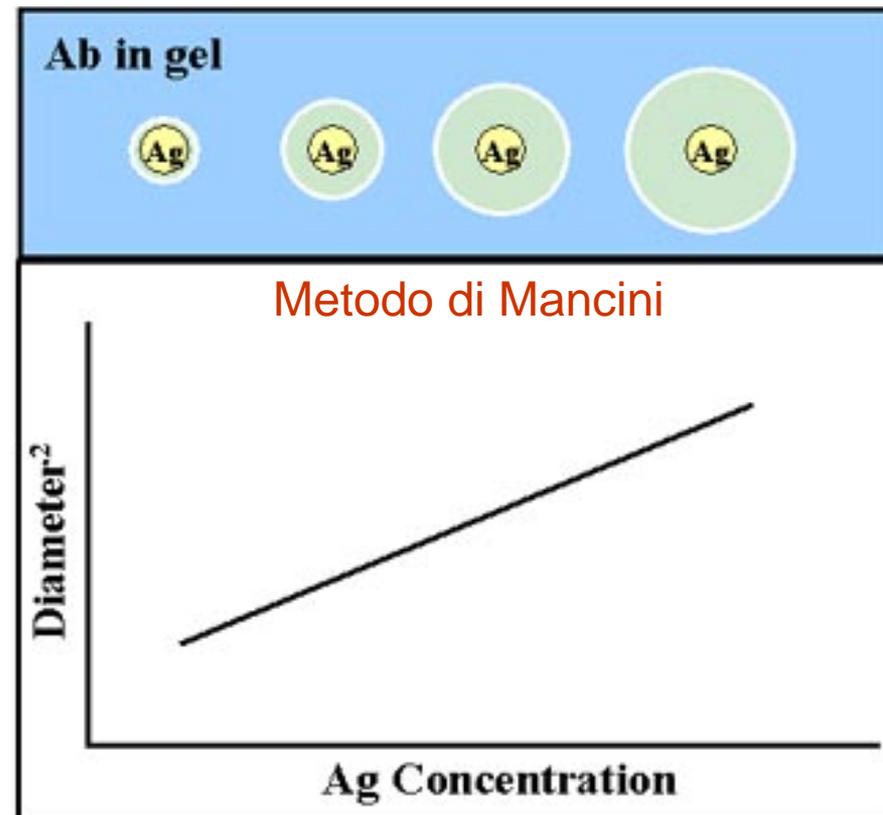
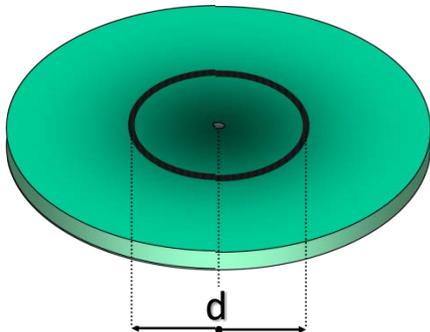
# IMMUNODIFFUSIONE RADIALE SEMPLICE (SRID)

- **Ab** incorporato in un gel di agarosio a 56°C.
- **Ag** aggiunto in pozzetti → **diffusione** → formazione di un **gradiente** → **anelli di precipitato** al punto di equivalenza.

- Possibile realizzazione di una curva standard →

**test quantitativo.**

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



# IMMUNODIFFUSIONE RADIALE SEMPLICE (SRID)

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



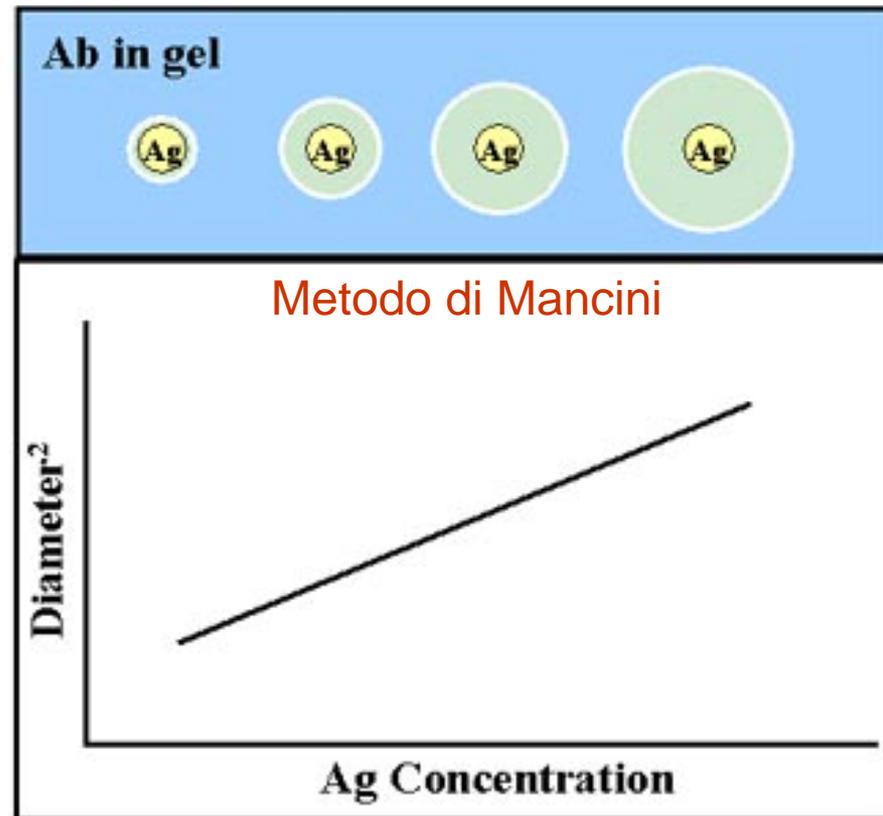
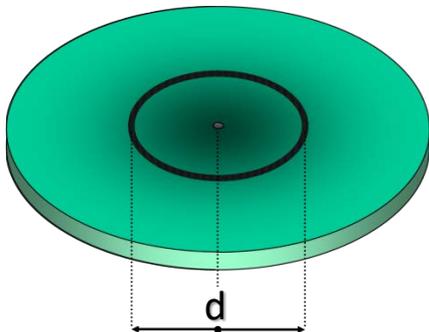
- **Ag** aggiunto in pozzetti → **diffusione** → formazione di un **gradiente** → **anelli di precipitato**

al punto di equivalenza.

- Possibile realizzazione di una curva standard →

**test quantitativo.**

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

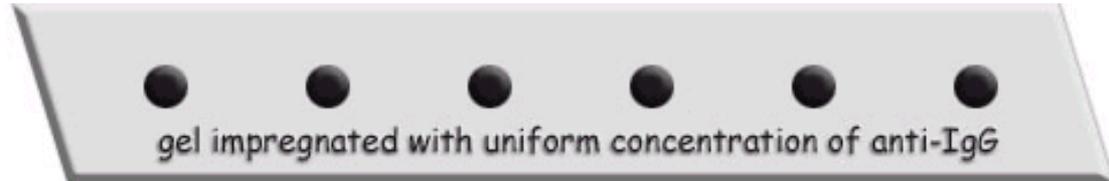


# ESEMPIO DI SRID

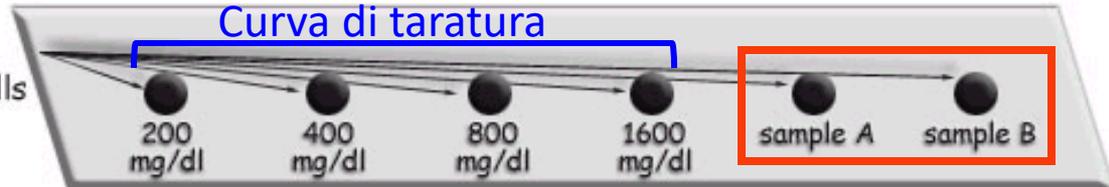
Usata per misurare i livelli sierici di IgG, IgM e IgA in alcune patologie. **L'Ag ricercato può essere un Ab!**

## REAGENTS:

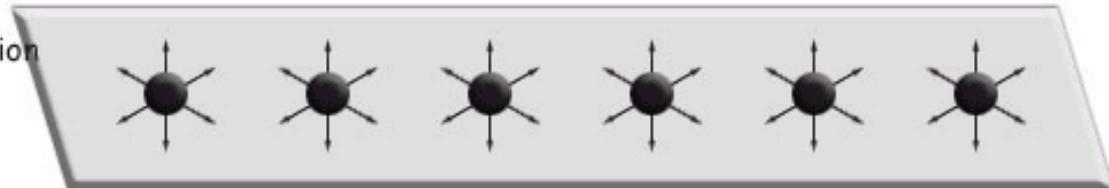
agar gel impregnated & with antiglobulins (anti-IgG)



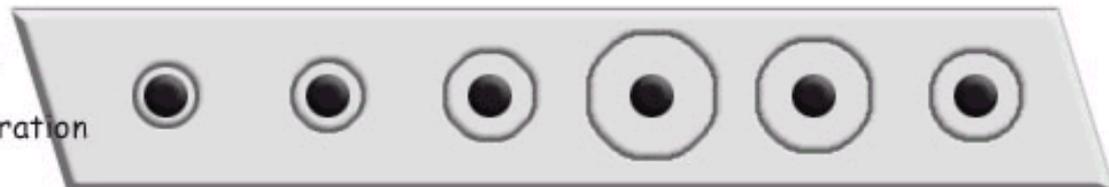
1. add serum sample & IgG standards to wells



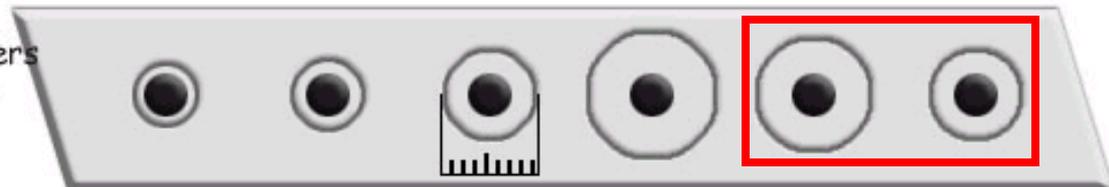
2. allow time for diffusion of IgG's into gel



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

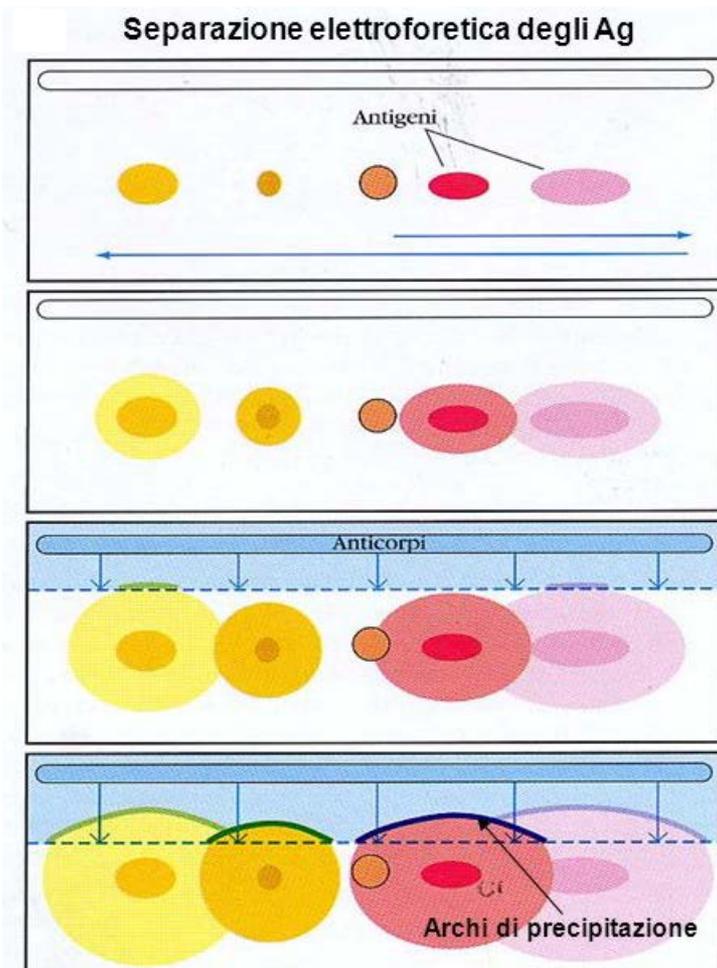


4. measure ring diameters (proportional to IgG concentrations)

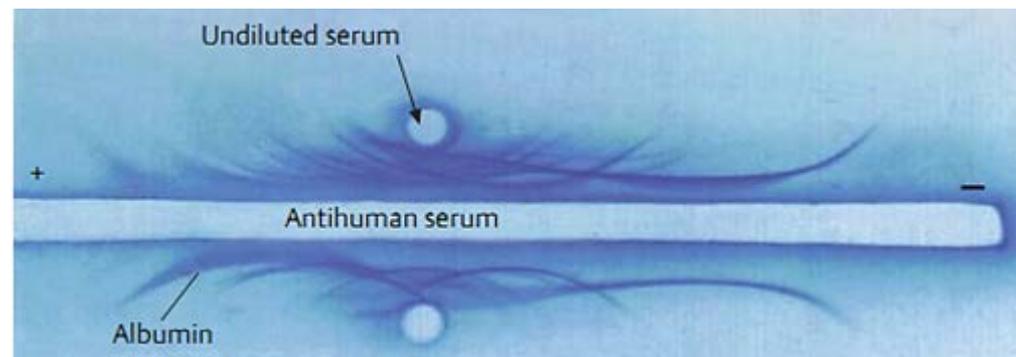


# IMMUNOELETTROFORESI

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

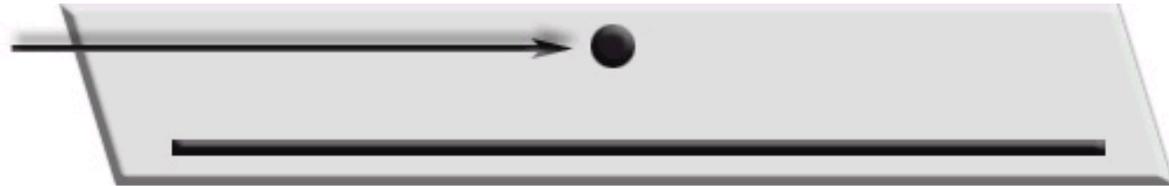


- Misura **qualitativa**.
- Possibile stima **quantitativa** (spessore delle bande di precipitazione).
- Es. analisi: le componenti seriche.



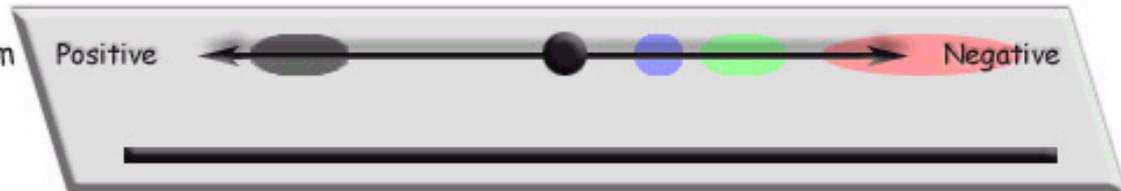
# IMMUNOELETTROFORESI - FASI

1. Add serum to well



2. Electrophorese serum proteins

Positive ← ● ● ● ● → Negative

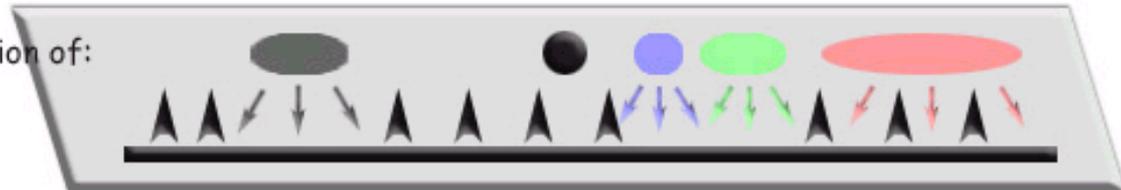


3. Add antiserum to slot



4. allow time for diffusion of:

- serum proteins
- Ab's in antiserum



5. stain gel & read precipitin lines



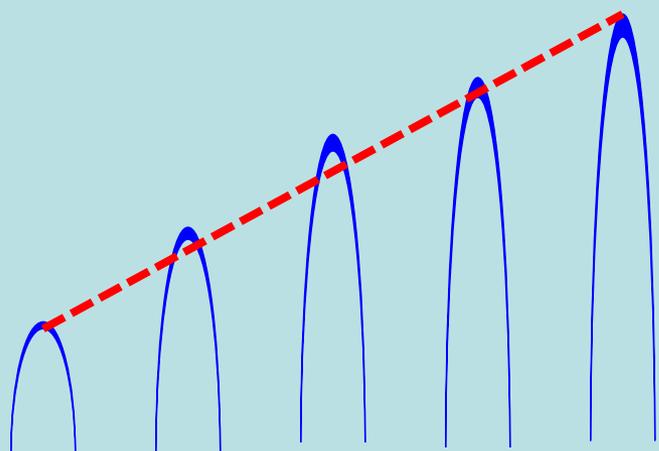
Usata su campioni di **siero**, **urina**, e liquido spinale.

# IMMUNOELETTROFORESI ROCKET

**Bande di precipitazione** a forma di **razzo**, la cui **altezza** è proporzionale alla **[Ag]**. **Tecnica quantitativa.**

+

[Ab] costante nel gel (agaroso)



Ag: pl basso per garantire una carica **negativa**

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

Pozzetti per l'Ag

Concentrazione  
crescente di Ag

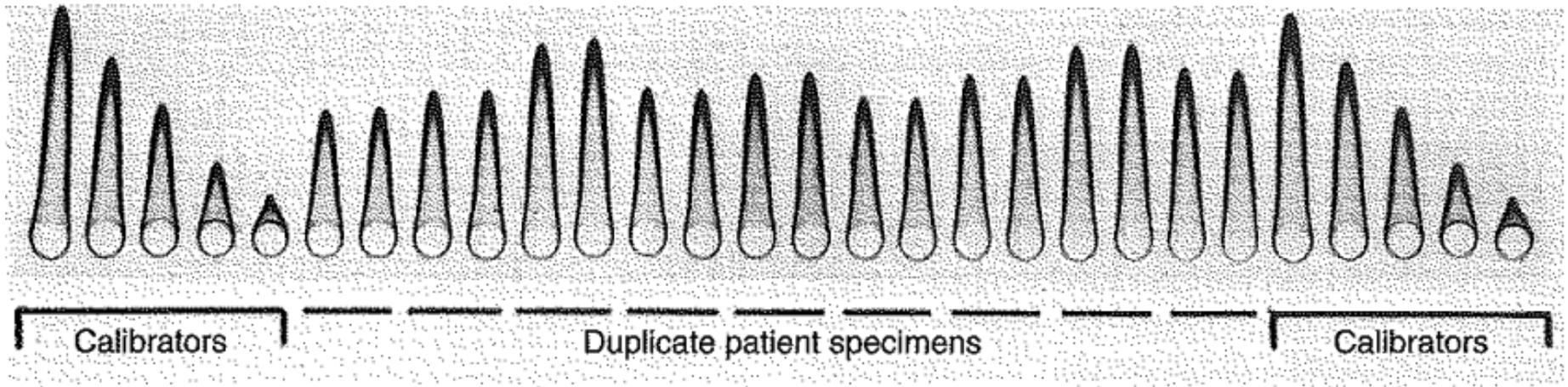
pH 8.6

Modificazione della SRID

# IMMUNOELETTROFORESI ROCKET

**Bande di precipitazione** a forma di **razzo**, la cui **altezza** è proporzionale alla **[Ag]**. **Tecnica quantitativa.**

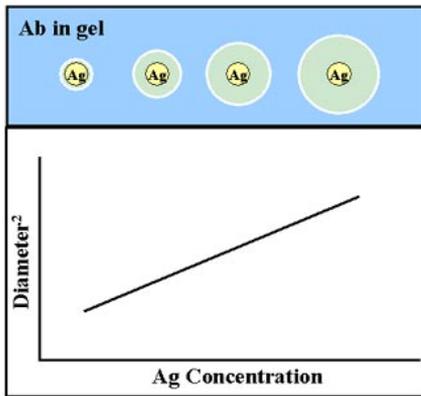
Human Serum Albumin, pI ~4.7



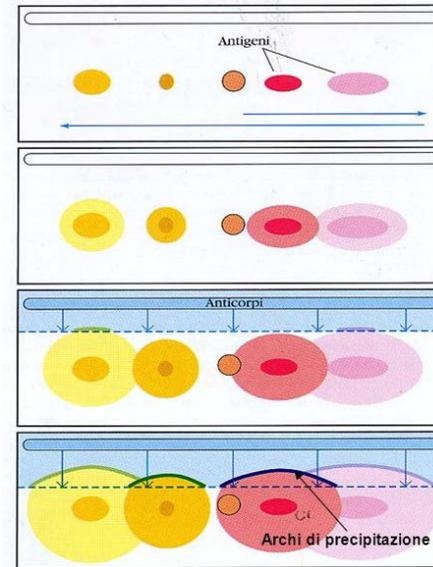
**Figure 10-11** Rocket immunoelectrophoresis of human serum albumin. Patient samples were applied in duplicate. Calibrators were placed at opposite ends of the plate.

# CONFRONTO FRA TECNICHE

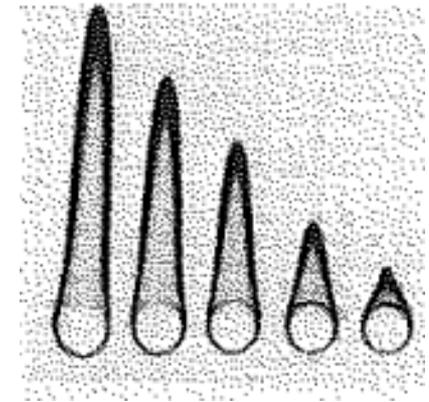
## SRID



## IMMUNOELETTROFORESI



## IMMUNOELETTROFORESI ROCKET

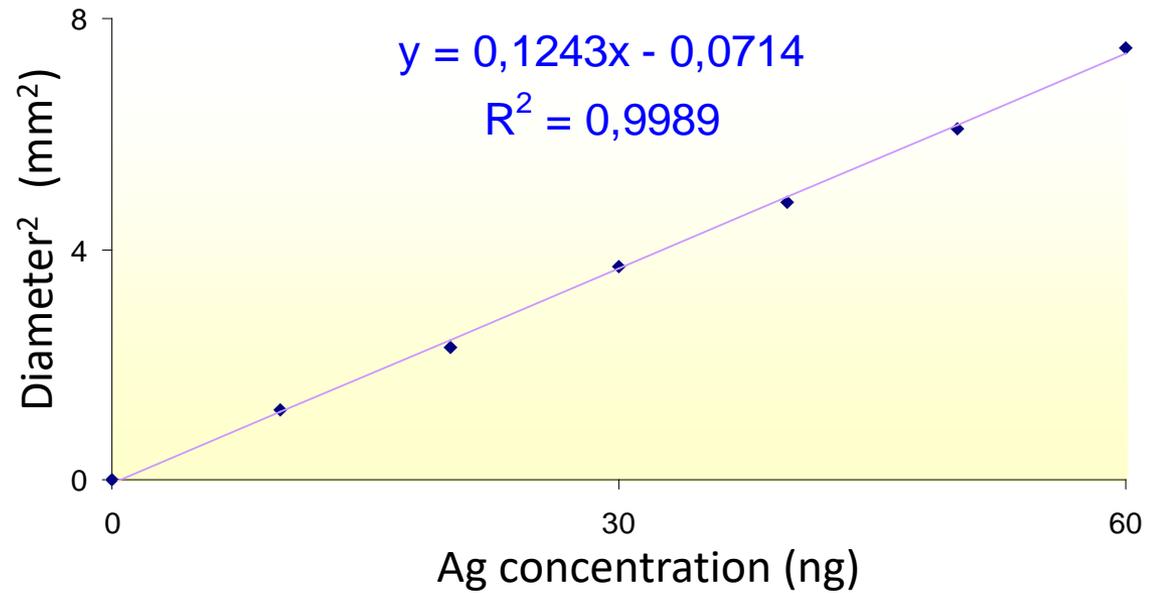
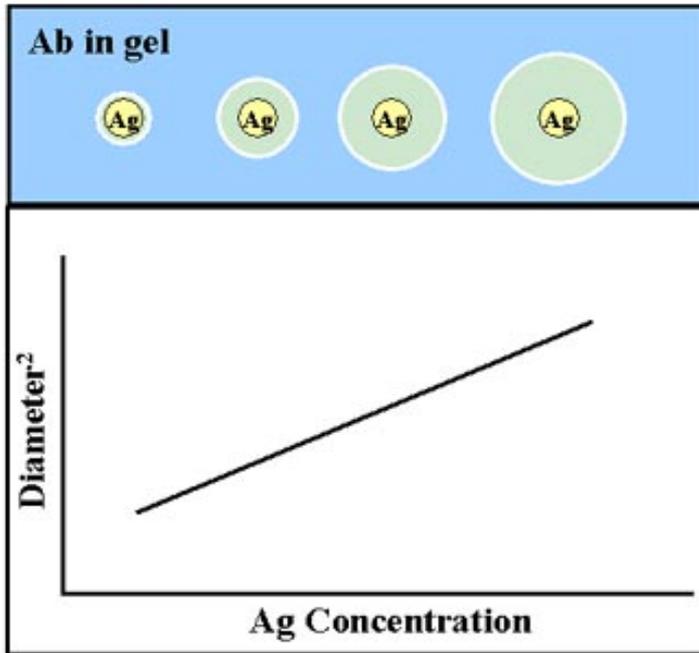


**Diffusione**  
**e**  
**precipitazione**

**Elettroforesi,**  
**poi**  
**diffusione**  
**e**  
**precipitazione**

**Elettroforesi**  
**e**  
**precipitazione**

# ESERCIZIO SULLA SRID

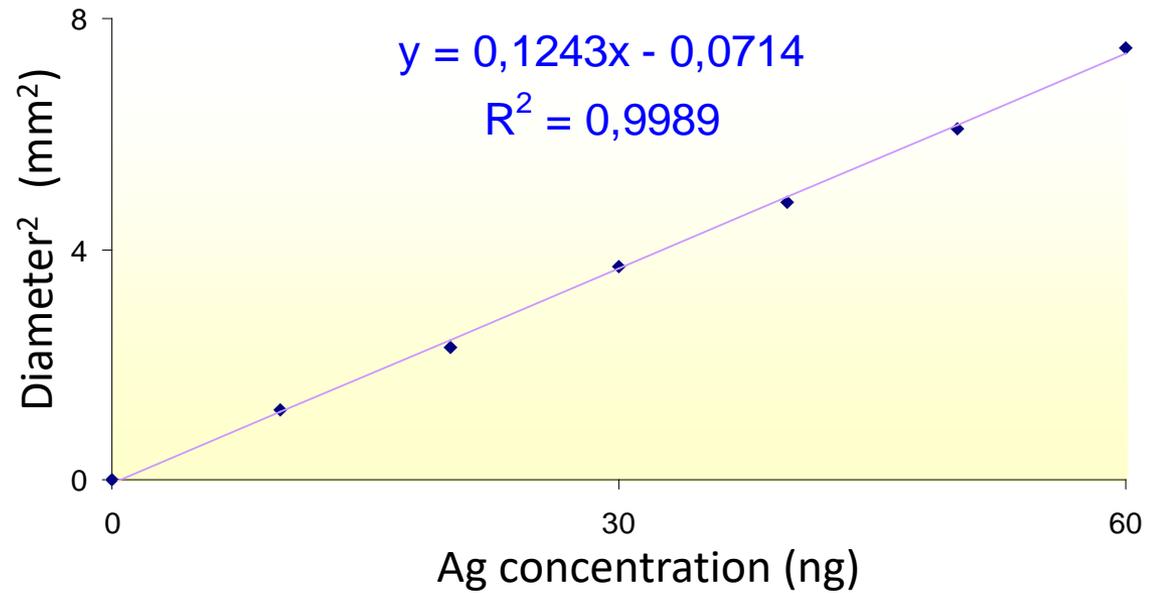
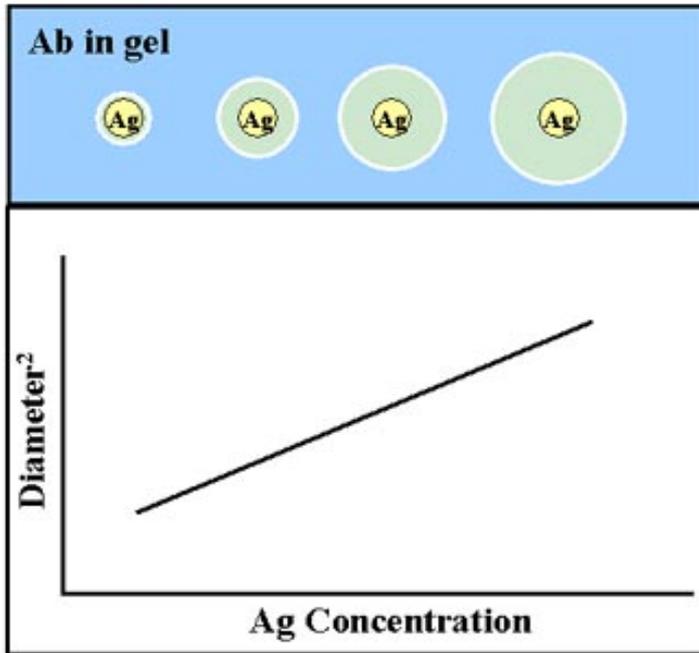


$$Y = 4.2 \text{ mm}^2$$

$$X =$$



# ESERCIZIO SULLA SRID



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

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