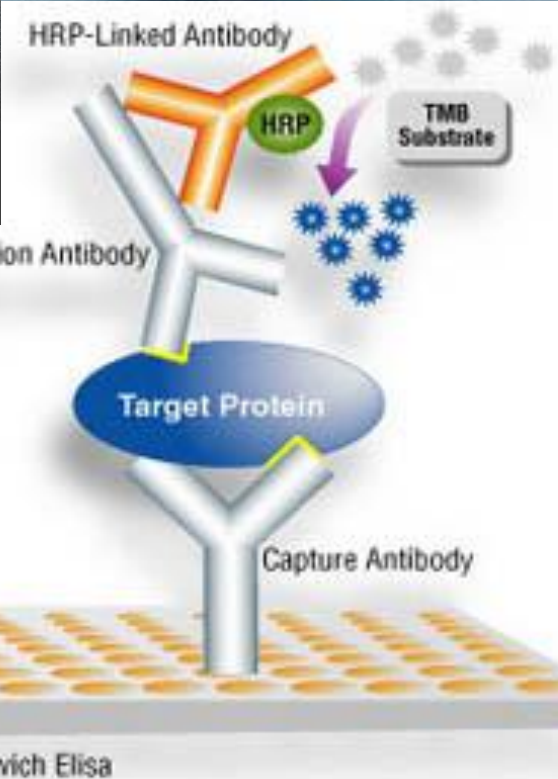
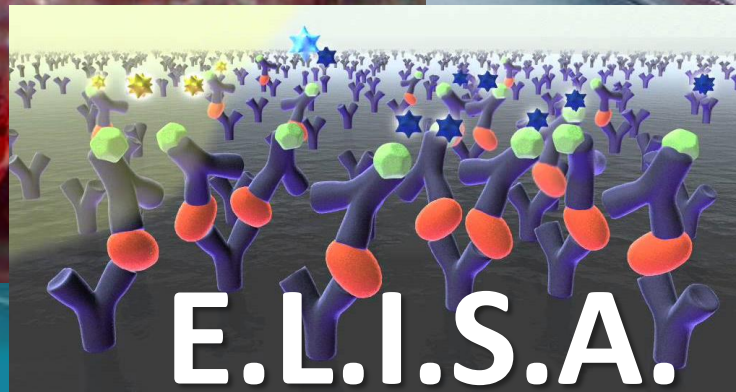


IMMUNODOSAGGI o DOSAGGI IMMUNOLOGICI

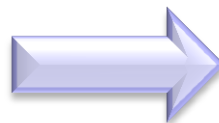


QUANTIFICAZIONE DEI CAMPIONI

Metodi colorimetrici

VS

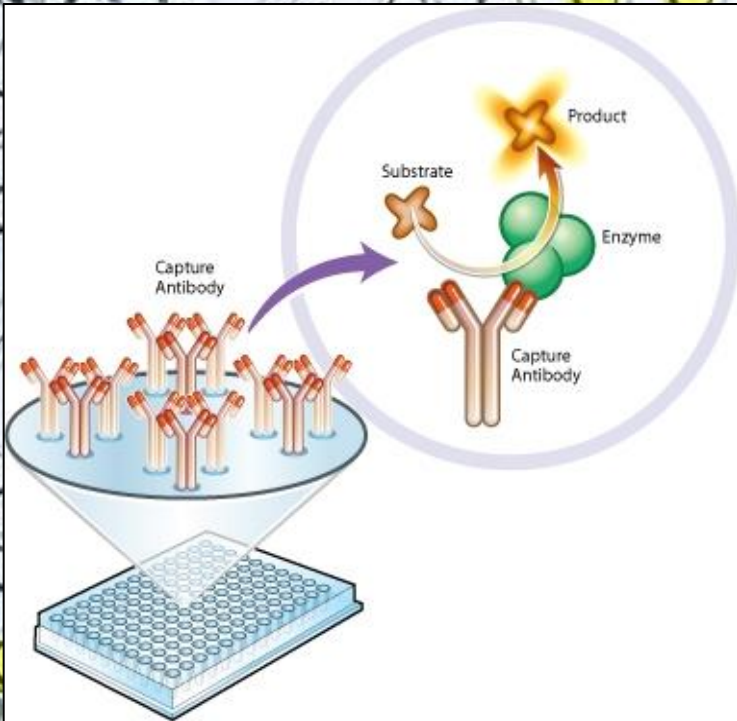
Determinazione
spettrofotometrica
diretta



Metodi
immunochimici

ELISA

Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay



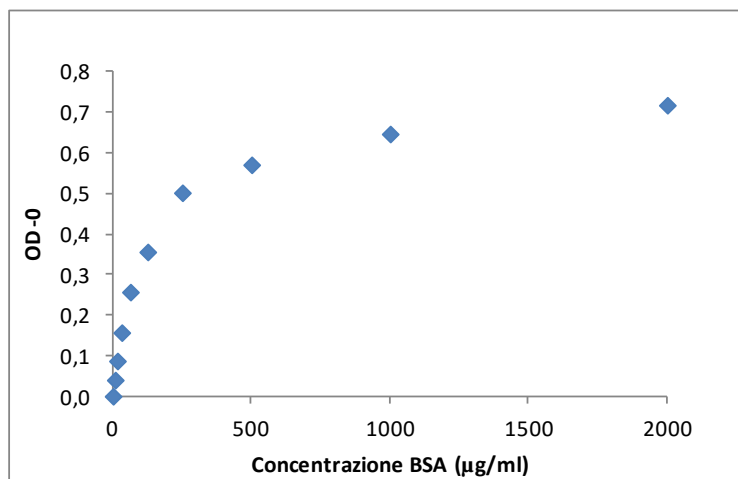
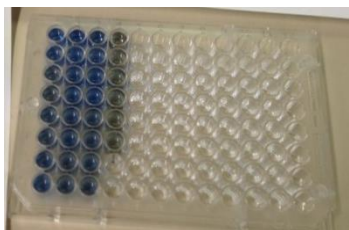
Engvall E, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).
Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*. **1971** Sep;8(9):871-4.

ELISA

È un immunodosaggio, dunque si basa sull'uso di anticorpi (**Ab**).

Confronto tra **COLORAZIONE** e **QUANTIFICAZIONE** con anticorpi

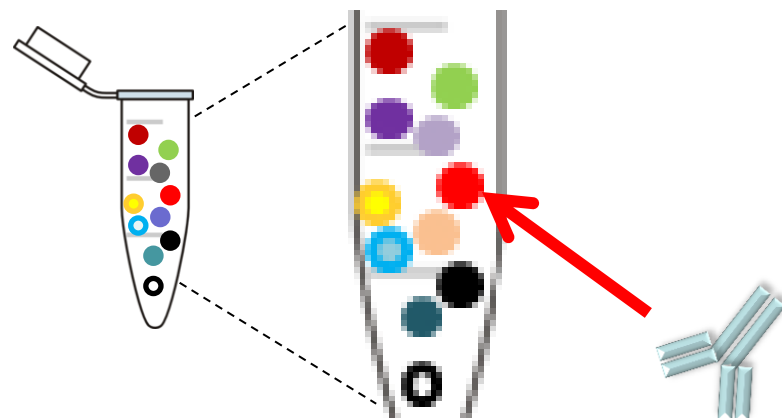
Colorazione



ASPECIFICA

- Proteine in soluzione
- Utilizza un colorante
- Quantificazione di **TUTTE** le proteine

Quantificazione con anticorpi (E.L.I.S.A.)



Vs

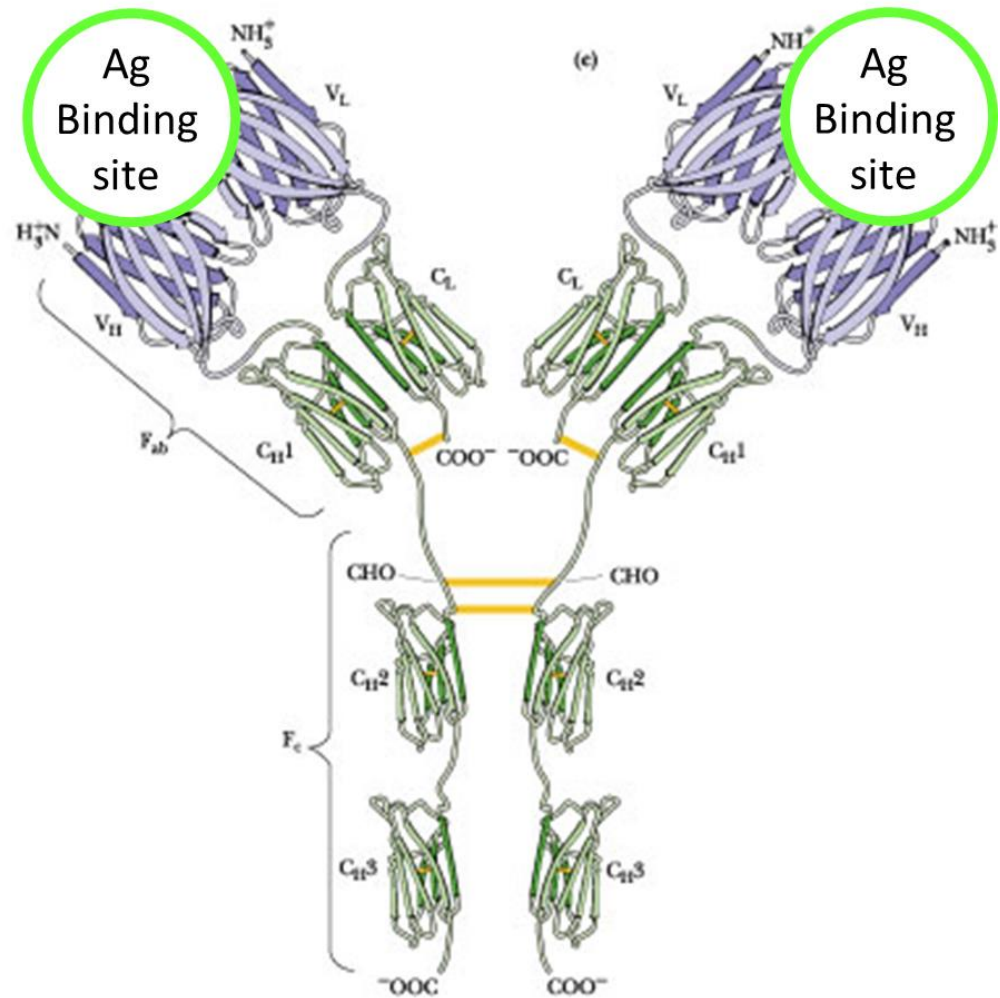
SPECIFICA

- Proteine in soluzione
- Utilizza ANTICORPI
- Quantificazione di **UNA** proteina

ELISA

Informa su **presenza e quantità** di un analita, ma **non** sulle proprietà biochimiche (es PM) o sulla distribuzione spaziale nei tessuti

Per questo vi sono altre tecniche come il WB, la immunistochimica...



Perché si fa un ELISA?

Altamente specifico

Sensibile

Riproducibile

Automatizzabile



Permette di **quantificare**

- Uno specifico analita all'interno di miscele complesse (sangue, urina...)
- Molecole presenti in cellule, o sulla loro superficie
- Rilevare la presenza di proteine legate ad infezione (es. proteine virali)
-

Strumenti necessari



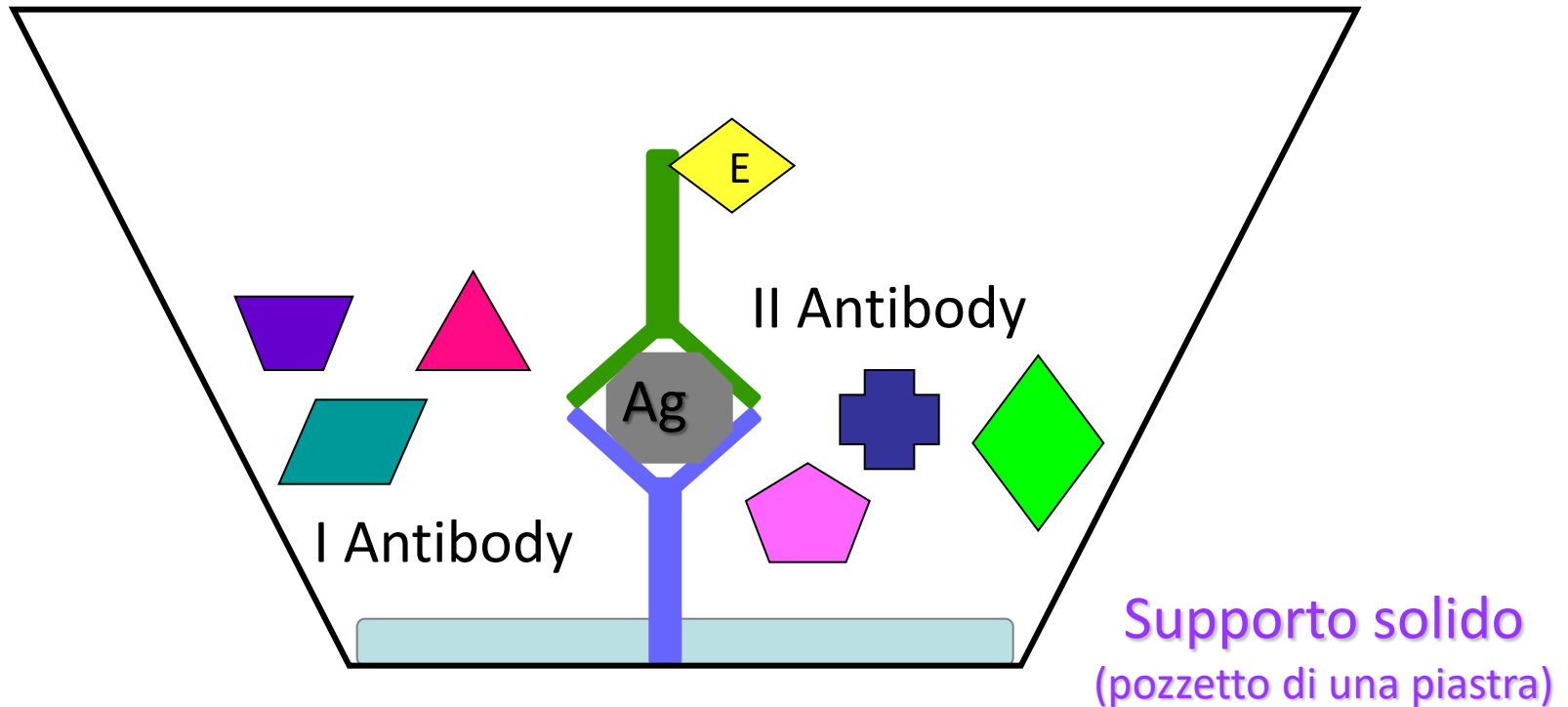
Multichannel pipette and single-channel pipette



Letture di micropiastre

ELISA SANDWICH

Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

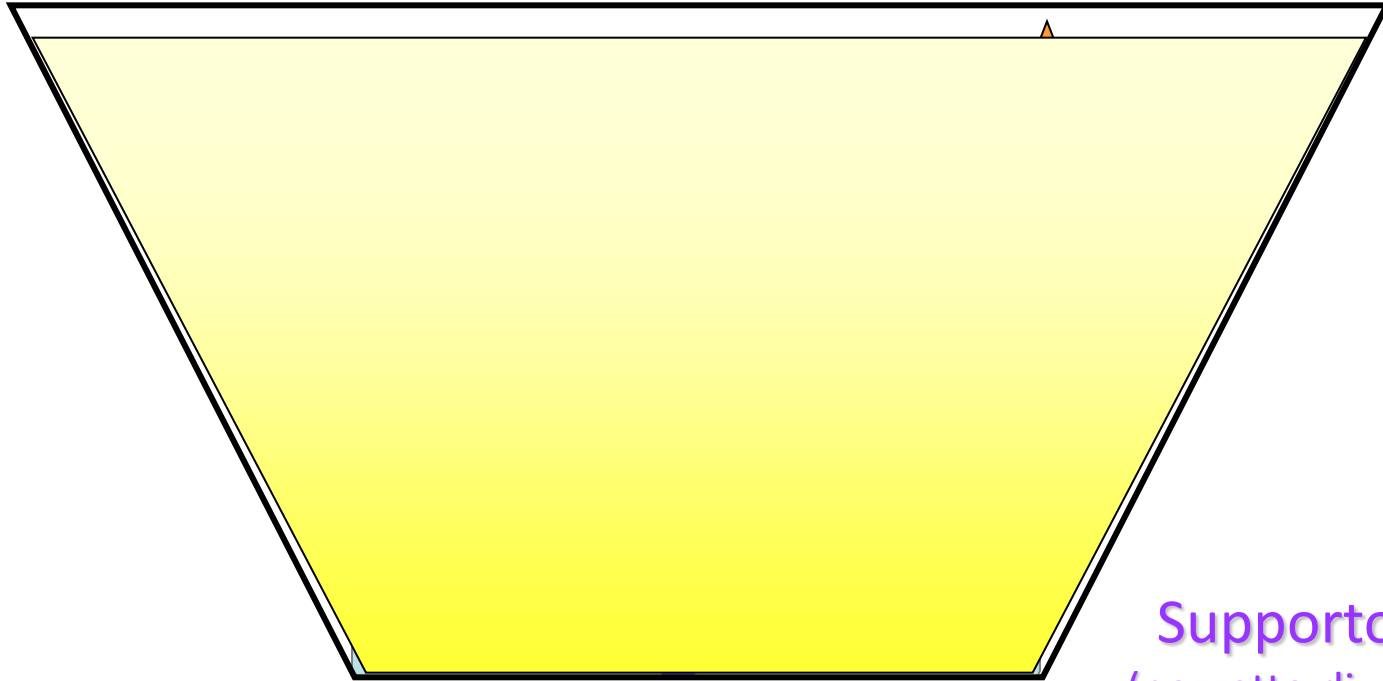


Il **1° Ab** lega le molecole di Ag presenti nel campione.

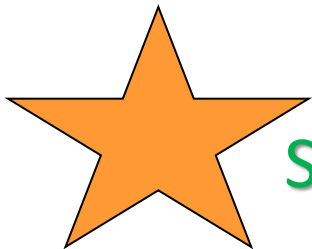
Il **2° Ab** è coniugato con un **enzima**.

ELISA SANDWICH

Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay



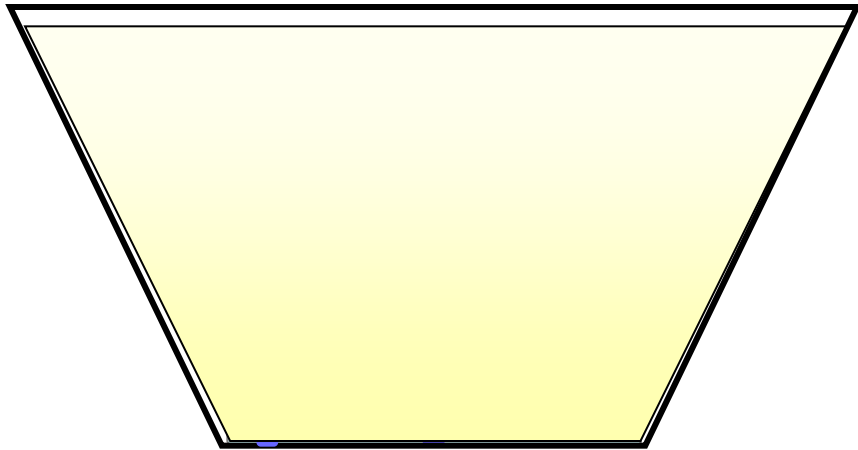
Supporto solido
(pozzetto di una piastra)



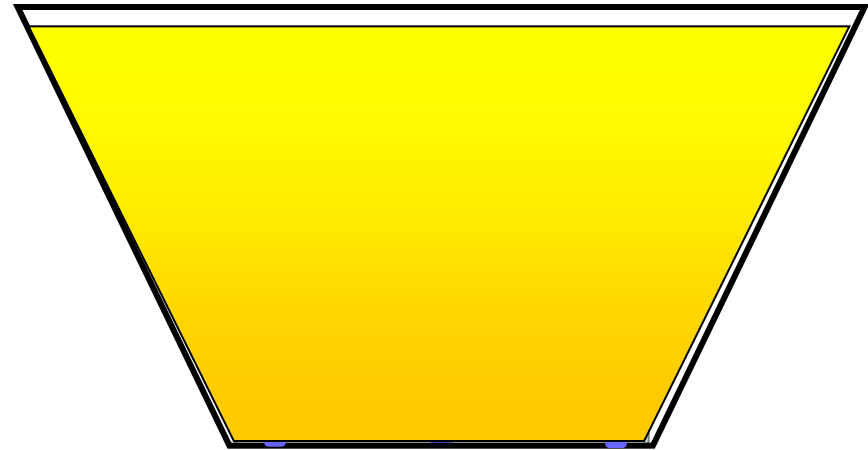
Substrato: molecola cromogenica

PROPORZIONALITÀ DEL COLORE

L'intensità del colore è proporzionale al **numero di complessi antigene-anticorpo** formati e quindi alla **concentrazione dell'antigene** nel campione analizzato.



Caso A

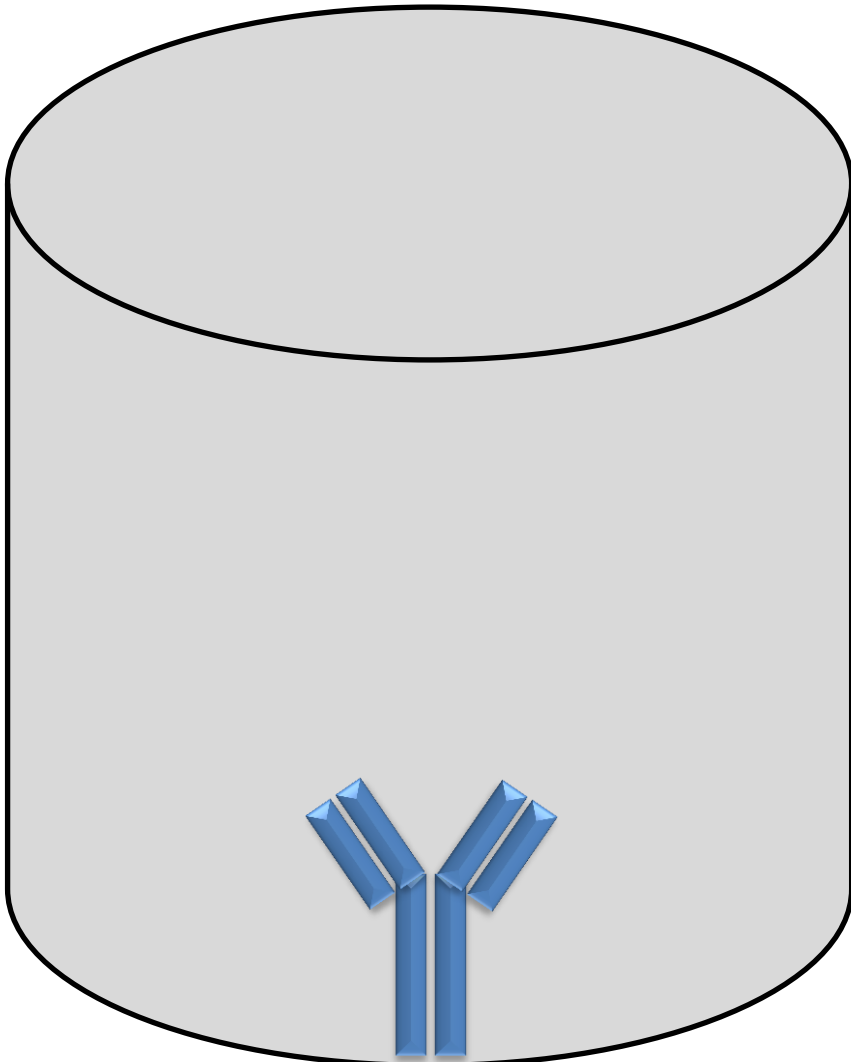


Caso B

Saggio ELISA - Fasi sperimentali

1

Immobilizzazione di un anticorpo sul fondo dei pozzetti (procedimento denominato **Coating**)



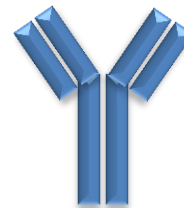
Anticorpo secondario
marcato



Antigene



Proteina bloccante

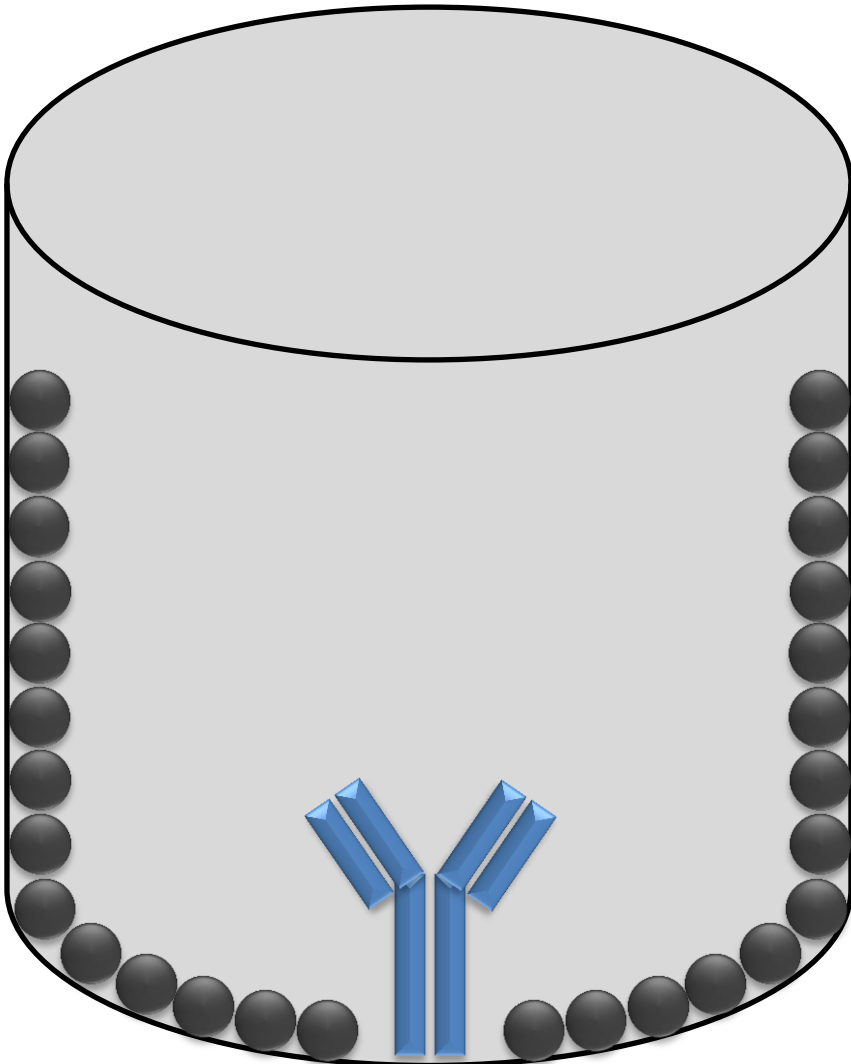


Anticorpo immobilizzato

Saggio ELISA - Fasi sperimentali

2

Saturazione dei siti di legame aspecifico presenti sulla plastica del pozzetto (fase chiamata **Blocking**)



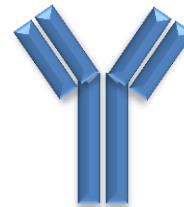
Anticorpo secondario
marcato



Antigene



Proteina bloccante

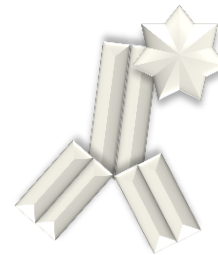
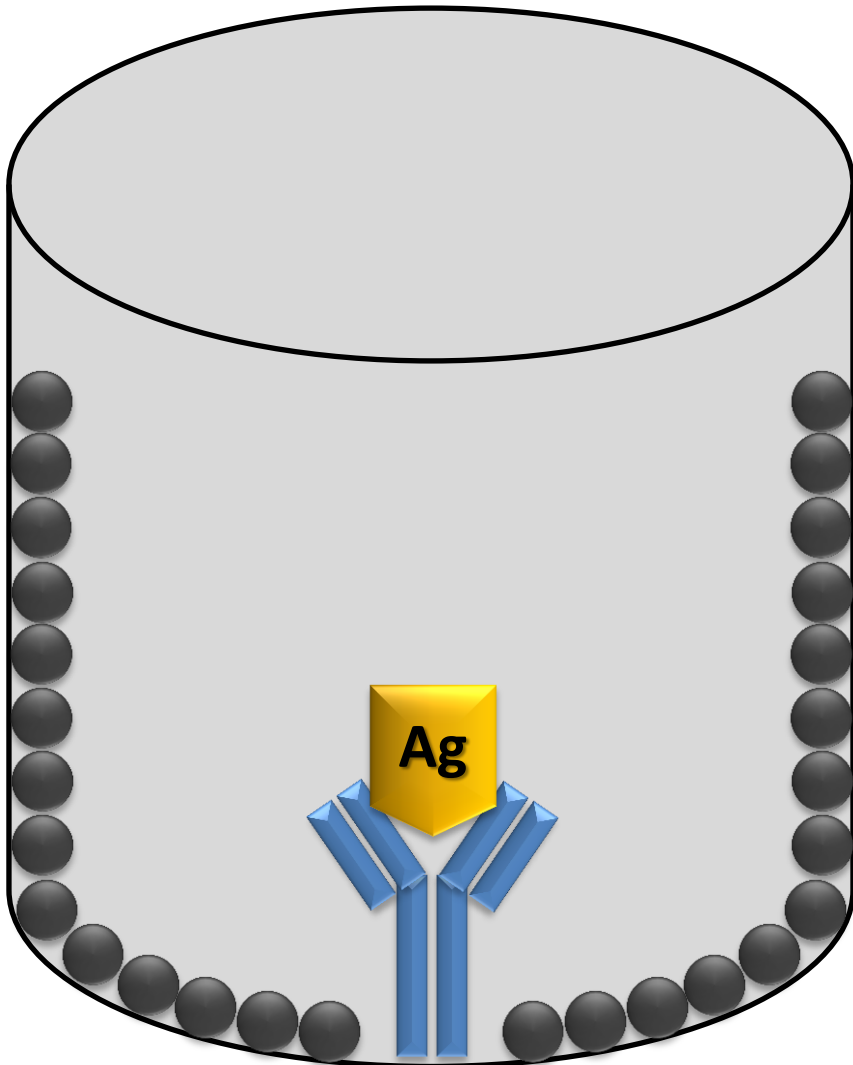


Anticorpo immobilizzato

Saggio ELISA - Fasi sperimentali

3

Aggiunta dell'antigene (normalmente presente in miscele complesse come plasma, lisati cellulari, mezzi di coltura...)



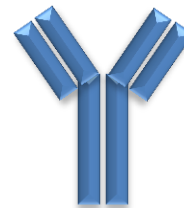
Anticorpo secondario
marcato



Antigene



Proteina bloccante

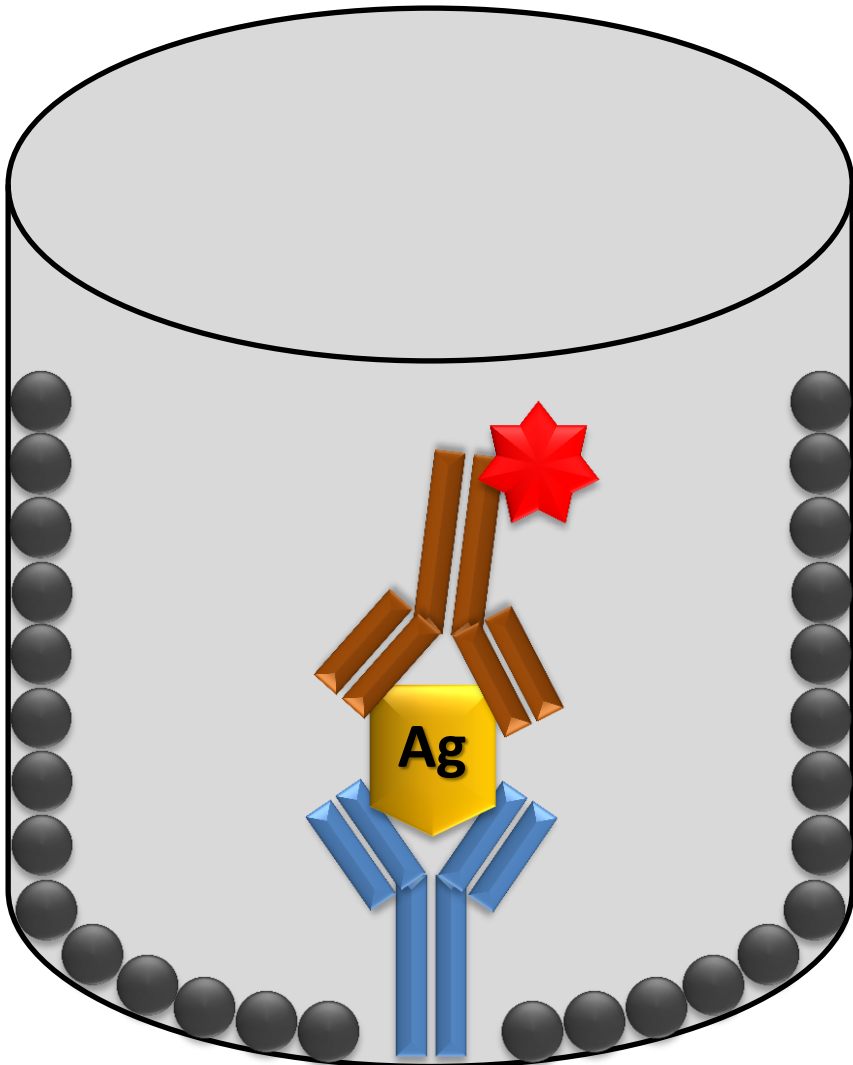


Anticorpo immobilizzato

Saggio ELISA - Fasi sperimentali

4

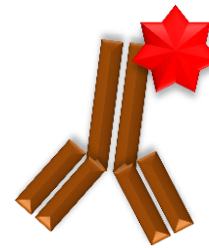
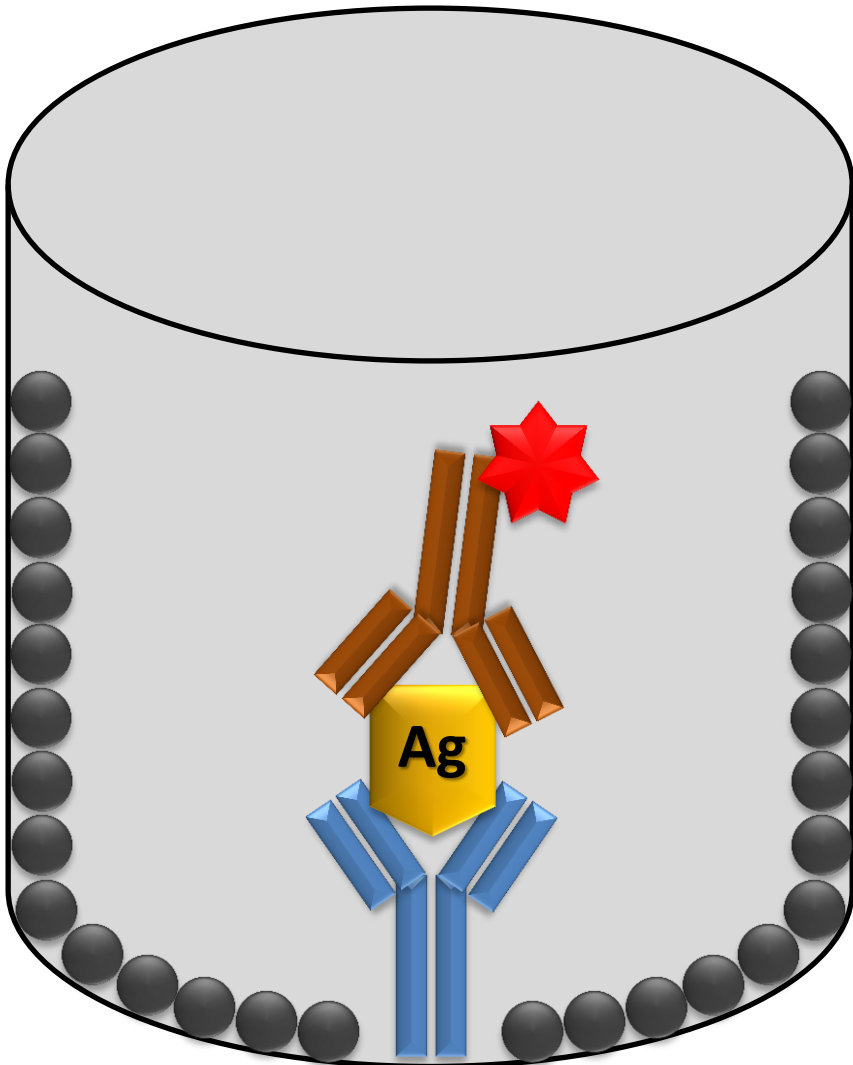
Aggiunta del secondo anticorpo che sull'antigene riconosce un epitopo DIVERSO da quello riconosciuto dal primo anticorpo



Il secondo anticorpo
(**anticorpo secondario**) è
marcato (es. enzima)

Saggio ELISA - Fasi sperimentali

Enzima = Anticorpo secondario = Antigene



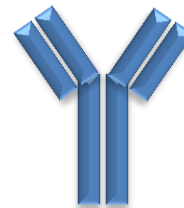
Anticorpo secondario
marcato



Antigene



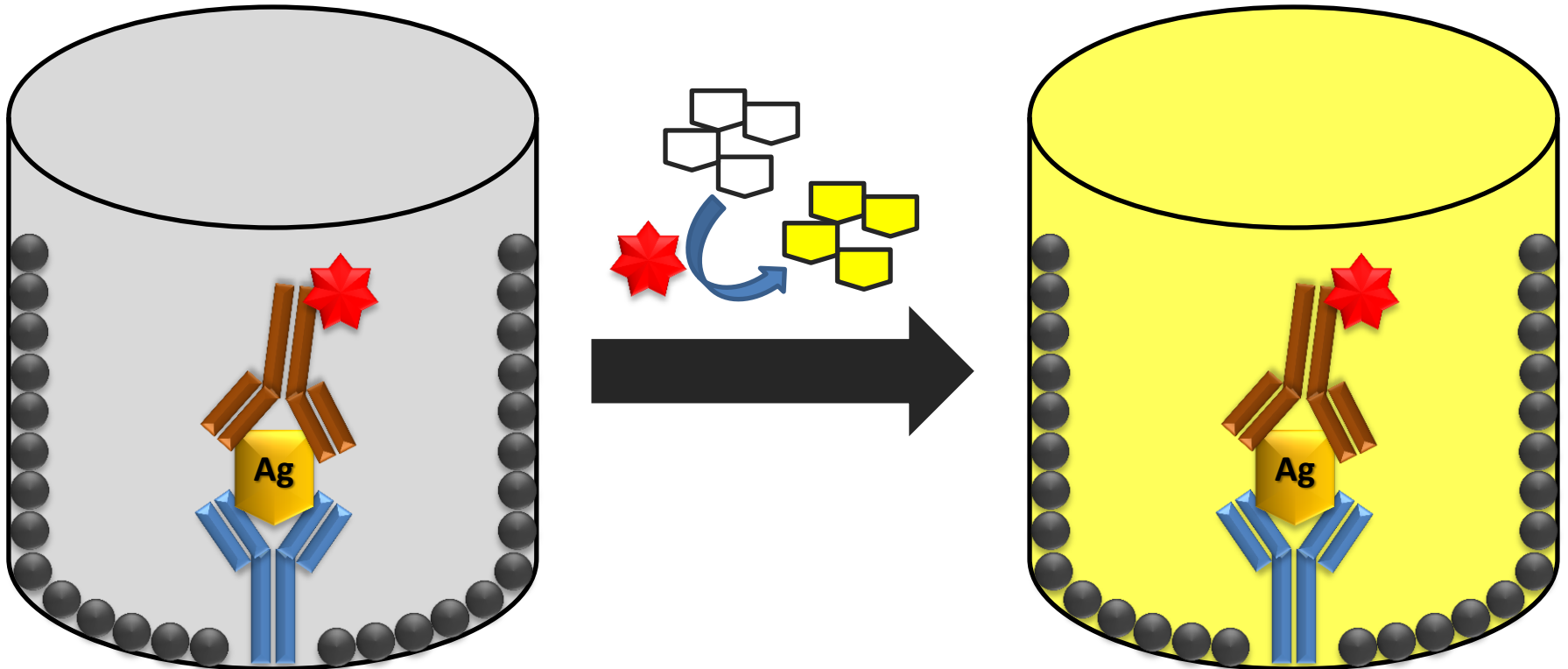
Proteina bloccante



Anticorpo immobilizzato

Saggio ELISA - Fasi sperimentali

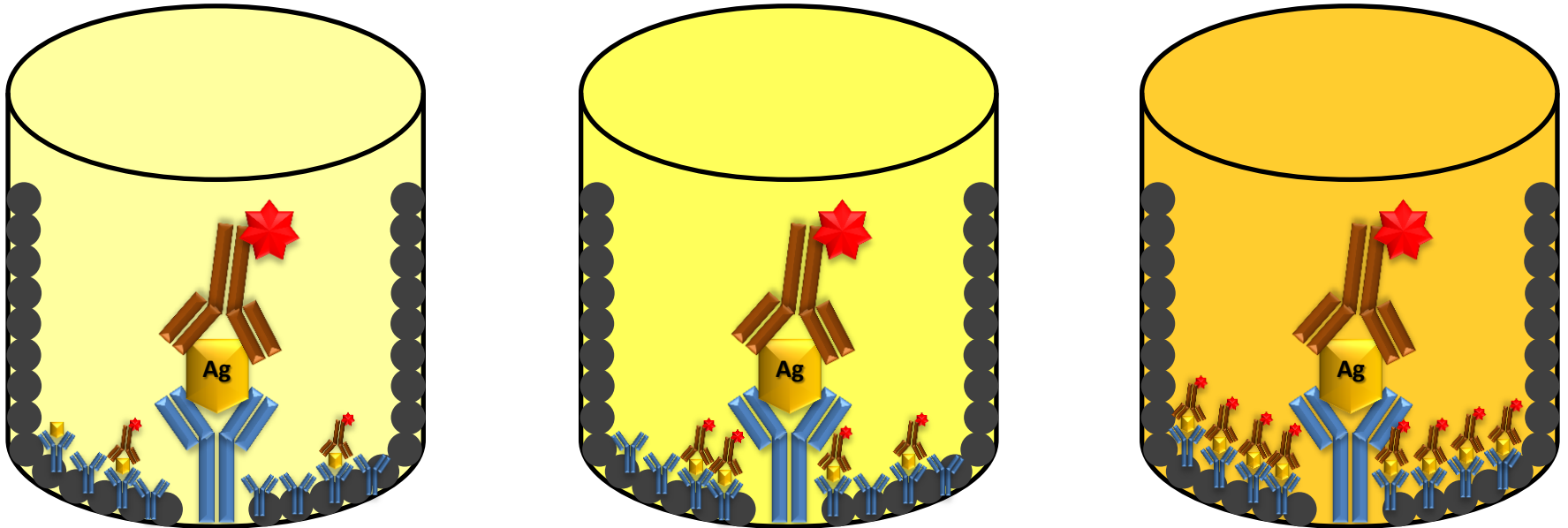
La rilevazione è data dall'aggiunta di una **quantità costante** di **substrato** all'interno di ogni pozzetto in cui si sono formati, o meno, gli immunocomplessi



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

Saggio ELISA - Fasi sperimentali

5 Blocco della reazione con acido forte

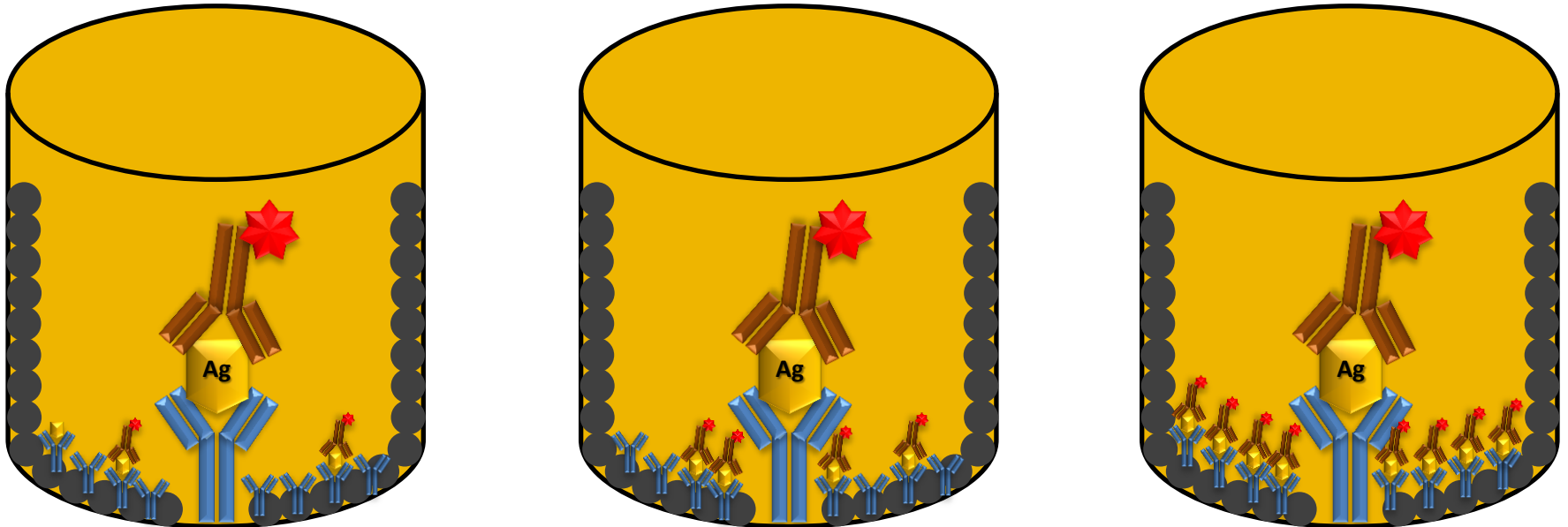


Concentrazione Antigene

Saggio ELISA - Fasi sperimentali

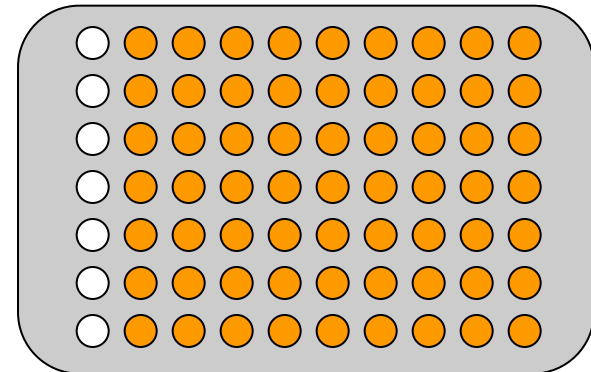
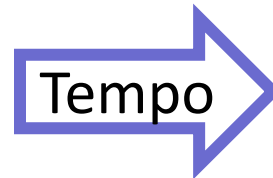
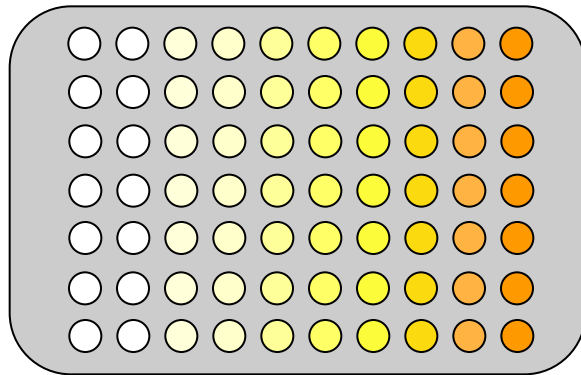
5

Blocco della reazione con acido forte, indispensabile perché altrimenti ogni pozzetto, in cui differisce la concentrazione di antigene (e quindi di enzima), raggiungerebbe la **STESSA intensità di colore**



Concentrazione Antigene

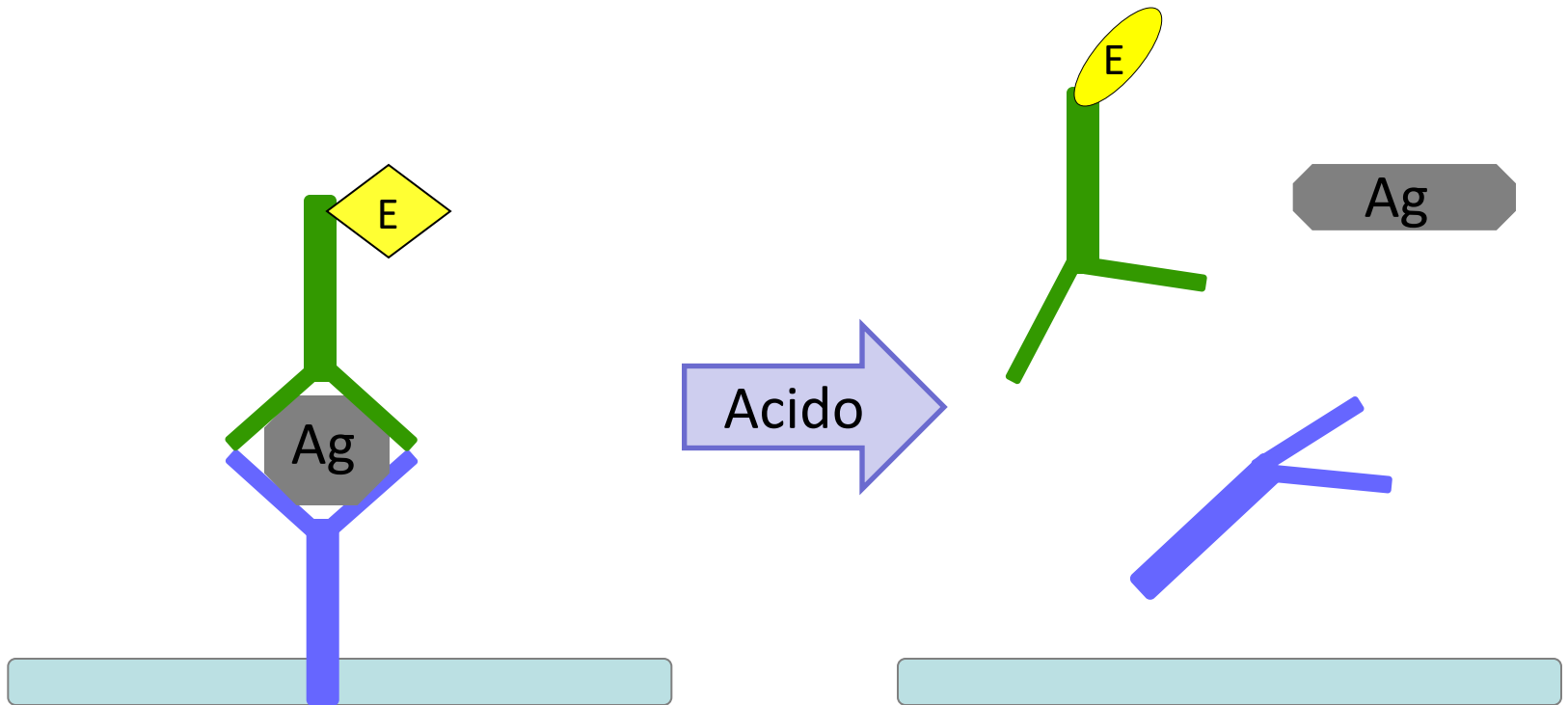
IMPORTANZA DELLO STOP!



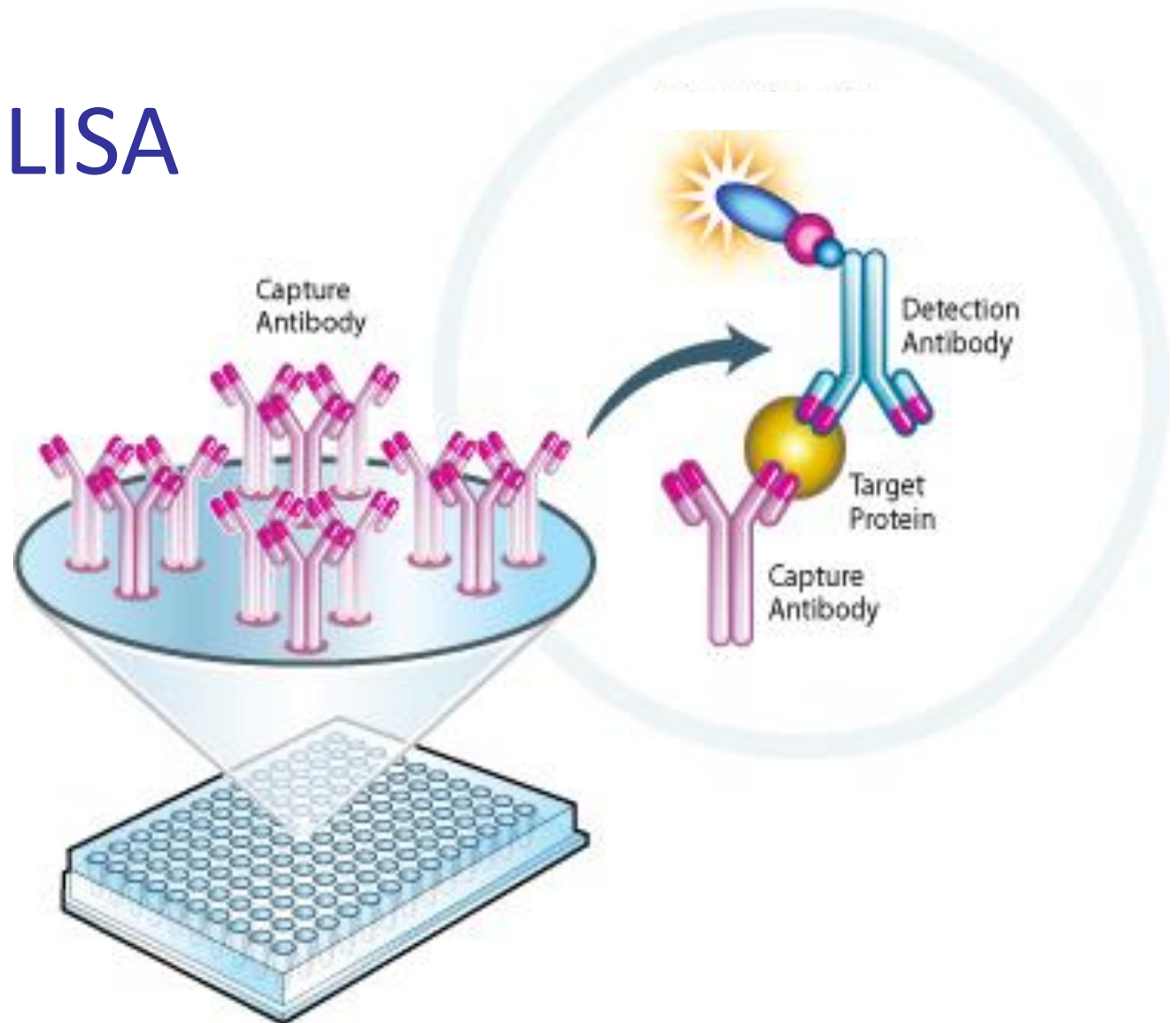
Micropiastra
(96 pozzetti)

STOP ELISA CON ACIDO

DENATURAZIONE

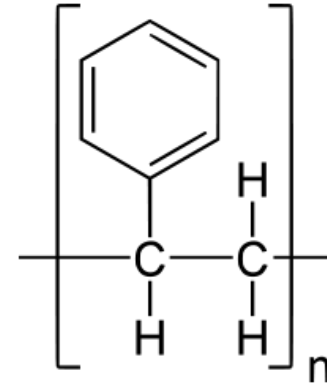


COMPONENTI DI UN SAGGIO ELISA



Piastra

Materiale: **Polistirene**, superficie **idrofobica** low binding.
Modificato per irraggiamento
o aggiunta di gruppi reattivi (maleimide, hydrazine,
N-oxysuccinimide groups).



Pozzetti: 8 righe e 12 colonne - 96 (o 384, o 1536),
2.5 cm² di superficie interna,
350 uL di volume.

- Resistente a sostanze chimiche.
- Trasparente.

Piastra



Fondo piatto (90°)

Classici, facilmente
reperibili ed economici.

Recupero dei liquidi + facile.



Fondo semisferico

Migliori lavaggi.

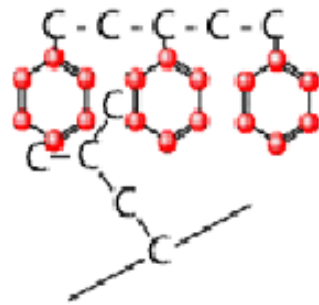
Superficie di adsorbimento
omogenea.



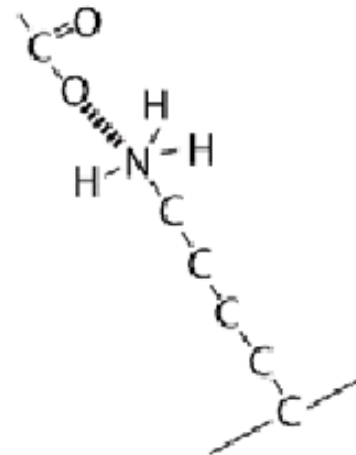
Fase di legame alla piastra (coating)

Forces Holding Proteins on a Plate

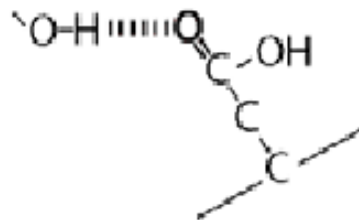
Hydrophobic Interaction



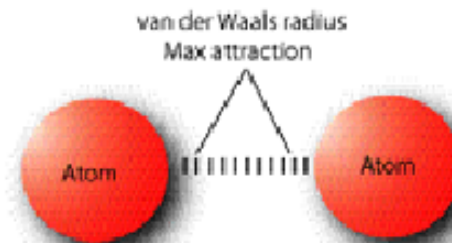
Ionic Interaction



Hydrogen Bonding



van der Waals Force



Coating

Vi si possono legare **200-500 ng** di proteine (es. Ab).

50 mM carbonato pH 9.2 - 9.6

10 mM Tris pH 8.5

10 mM PBS pH 7.2

Condizioni vicine al PI ed atte a favorire
l'**interazione** degli Ab.

Assenza di **detergenti** o **proteine estranee**.

Tempi (t) e temperatura (T)

Sono i più importanti fattori che controllano la quantità di proteina **adsorbita**.

- Massimo adsorbimento a **4°C** (camera fredda, frigorifero) per 16-18 h (overnight), minima evaporazione.
- Velocizzabile a **T amb** per 4-8 ore.
Oppure
- A **37°C** per 2-4 ore.

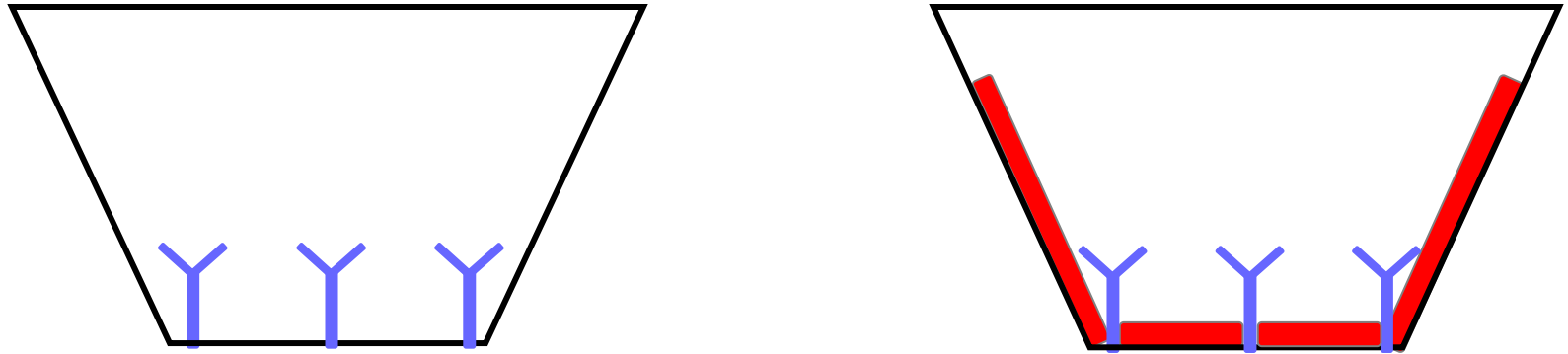
Il polistirene
non è un buon
conduttore di
calore.

Sono parametri **sempre** fondamentali in tutte le fasi di un ELISA.

Blocking

FASE
OBBLIGATORIA

Fase in cui si limitano i siti idrofobici sulla plastica non occupati da Ab.



Ci sono **2 classi** di sostanze utilizzate:

- Detergenti
 - ~~Ionici~~
 - ~~Zwitterionici~~
 - Non ionici
- Proteine
 - Albumina da siero bovino (BSA)
 - Latte privo di grassi e disidratato (NFDM)
 - Caseina



Lavaggi

Fase
caratterizzante

Non denaturanti

Preservano la funzione dell'enzima

Eliminano le interazioni deboli

Frequentemente :

- a base di **Tris**, **Hepes** o **Fosfati** (PBS),
- con pH vicino alla **neutralità**,
- con **detergenti** non ionici a **bassa** [].



Lavaggi

Fase
caratterizzante



Proper position of manual washer needles for dispensing wash solution



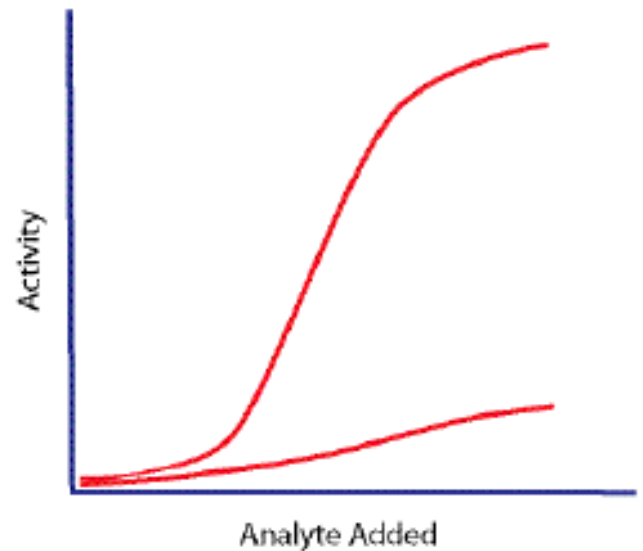
Proper position of manual washer needles for aspirating liquid

Possibilità di effettuarli anche in modo automatizzato

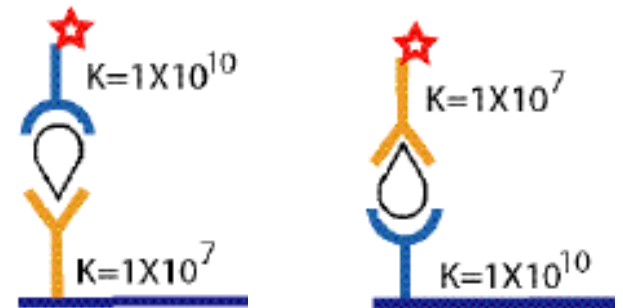
Anticorpi

Sono necessari anticorpi (Ab) con differenti specificità.

Fortissima differenza in sensibilità a seconda di quale Ab sia adsorbito e quale usato in soluzione.



K = costante di associazione

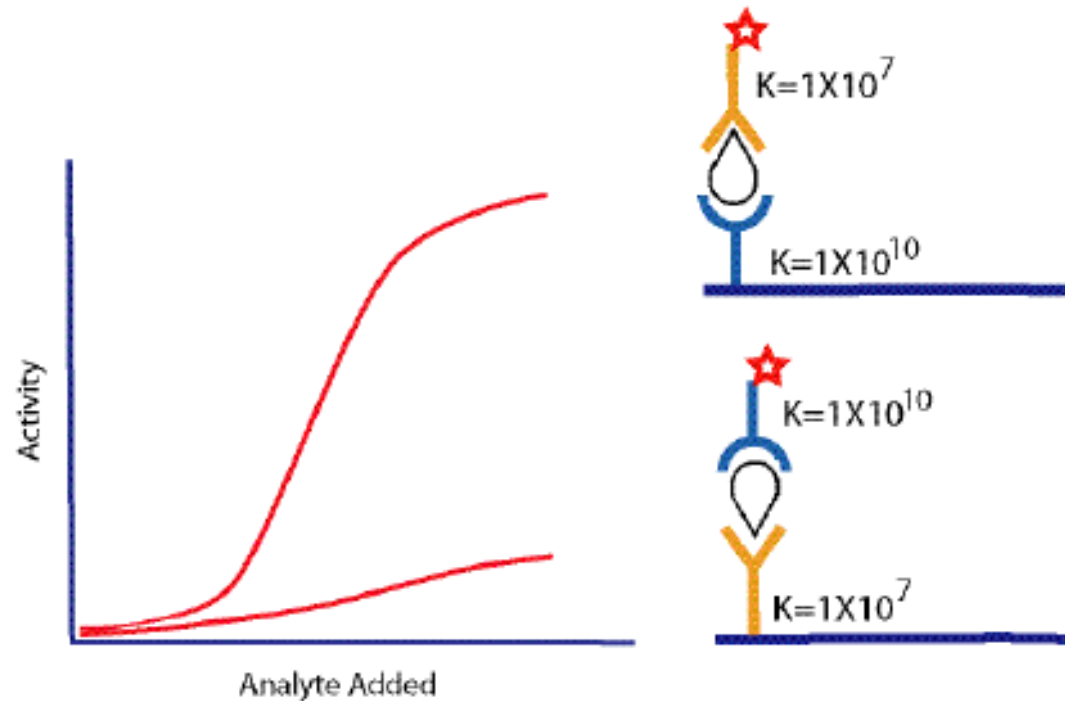


Anticorpi

Sono necessari anticorpi (Ab) con differenti specificità.

Fortissima differenza in sensibilità a seconda di quale Ab sia adsorbito e quale usato in soluzione.

K = costante di associazione



Enzimi e Substrati

FOSFATASI ALCALINA

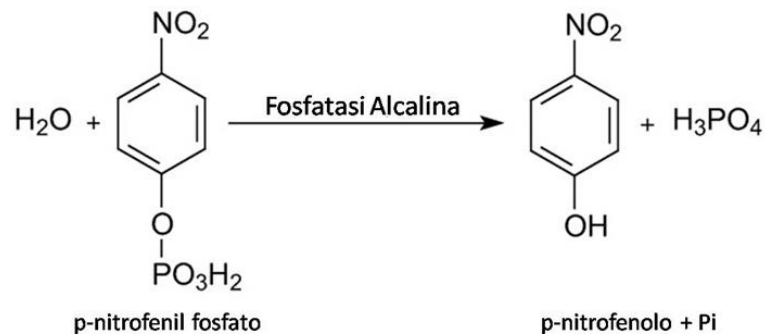
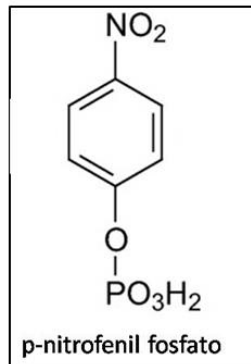
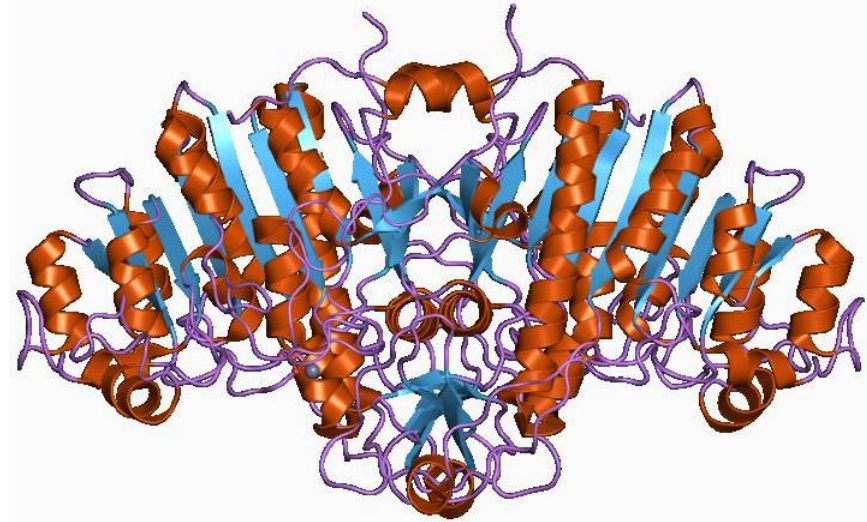
Metalloenzima contenente
2 atomi di zinco e 1 di magnesio.

PM ~160 KDa.

Catalizza l'idrolisi del gruppo fosforico
presente sul substrato.

Substrato tipico:

pNPP: p-nitrofenil fosfato,
massimo assorbimento a 450 nm.



Enzimi e Substrati

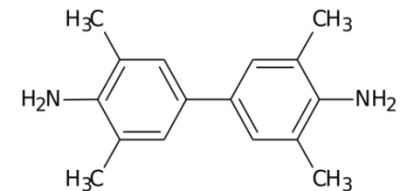
PEROSSIDASI

Horseradish peroxidase (**HRP**), enzima di 44 KDa. Catalizza l'ossidazione di un substrato in presenza di H_2O_2 .

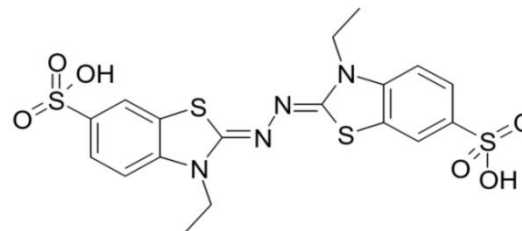
Substrati: Fenoli aromatici o ammine.



ABTS: acido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonico)

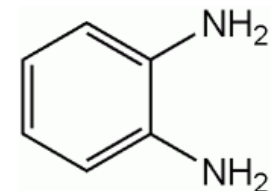


TMB: 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina

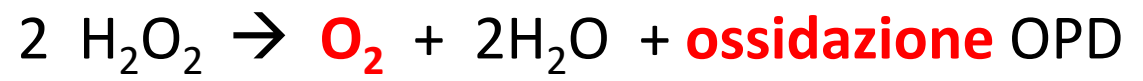
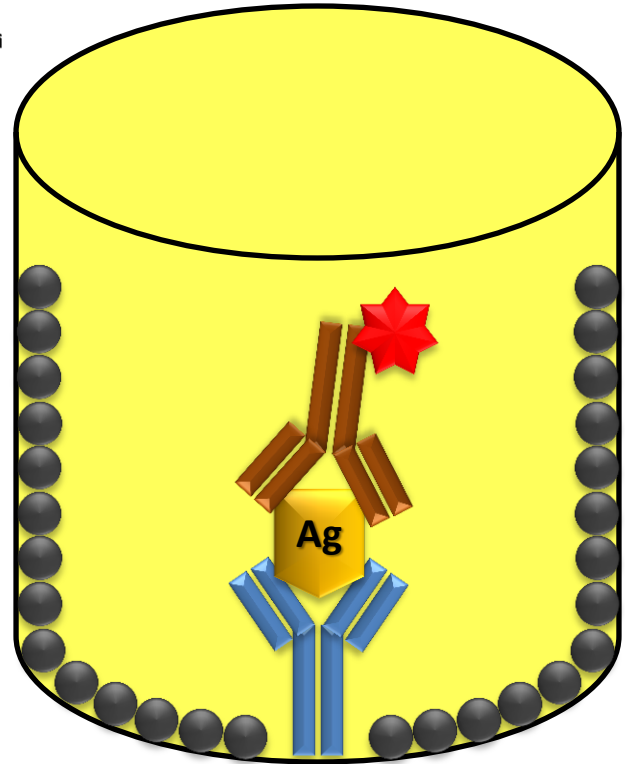
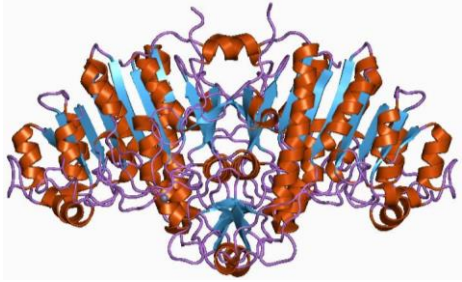
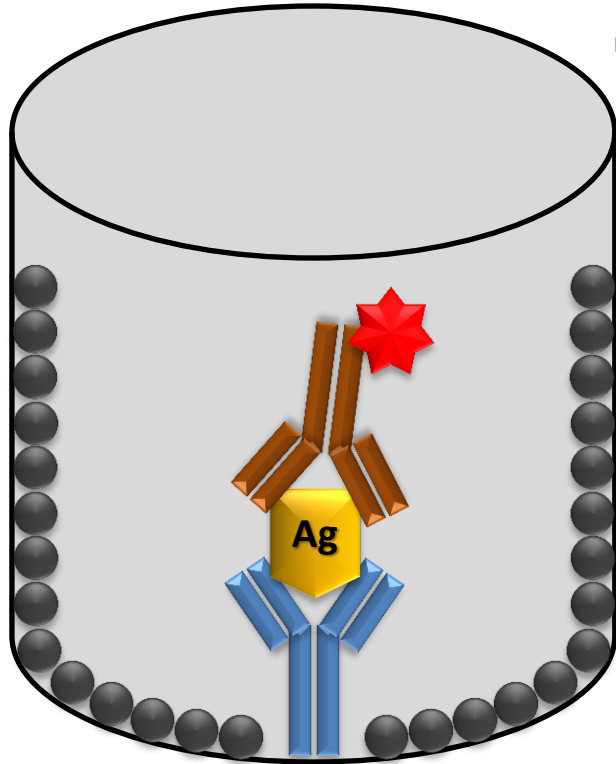
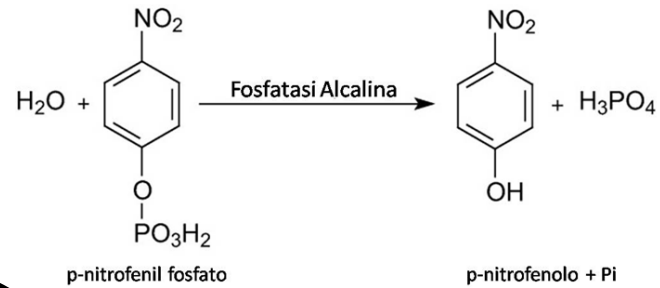


OPD: o-phenylenediamine. (Cancerogena).

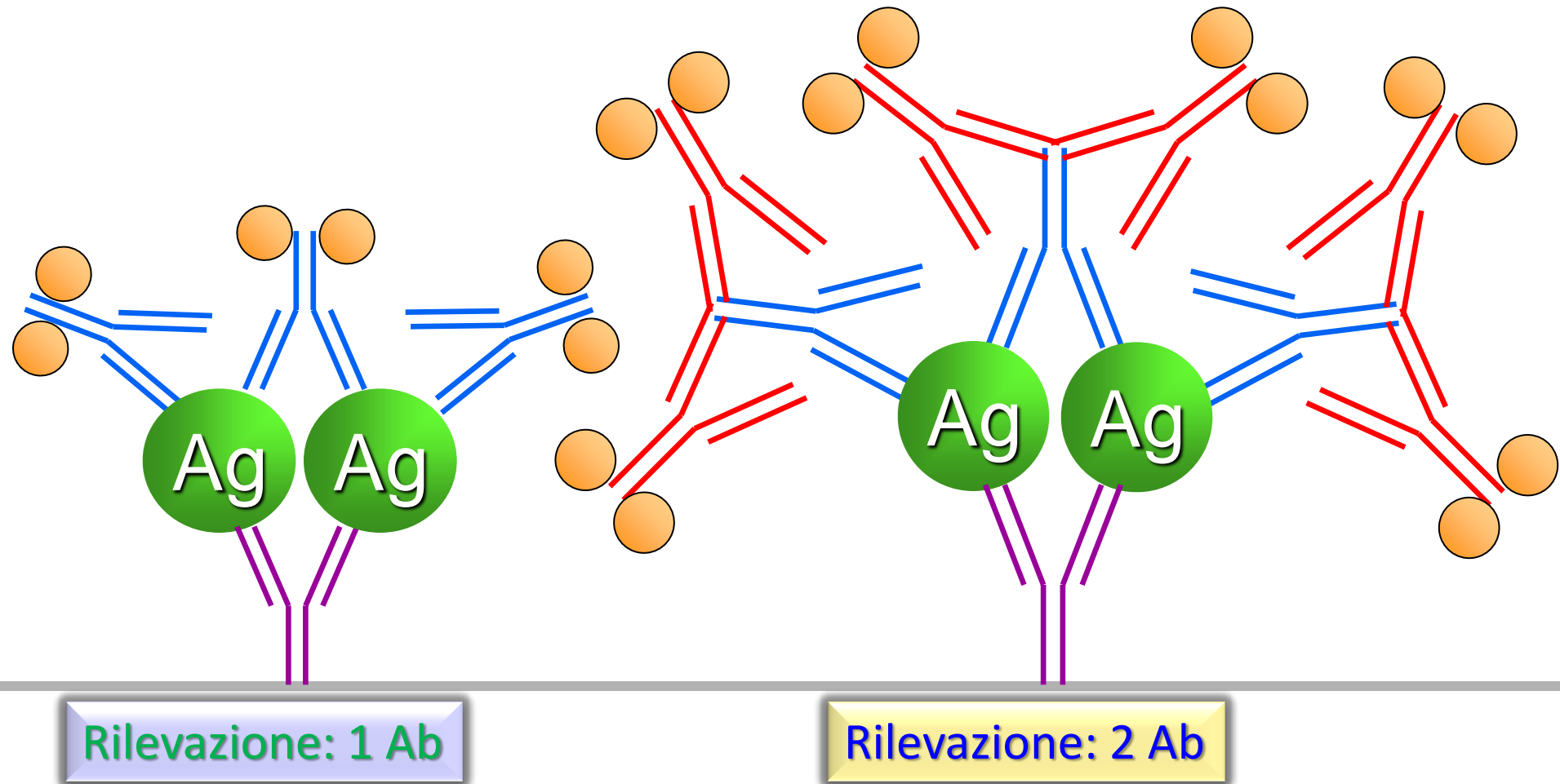
Massima assorbanza a 450 nm.



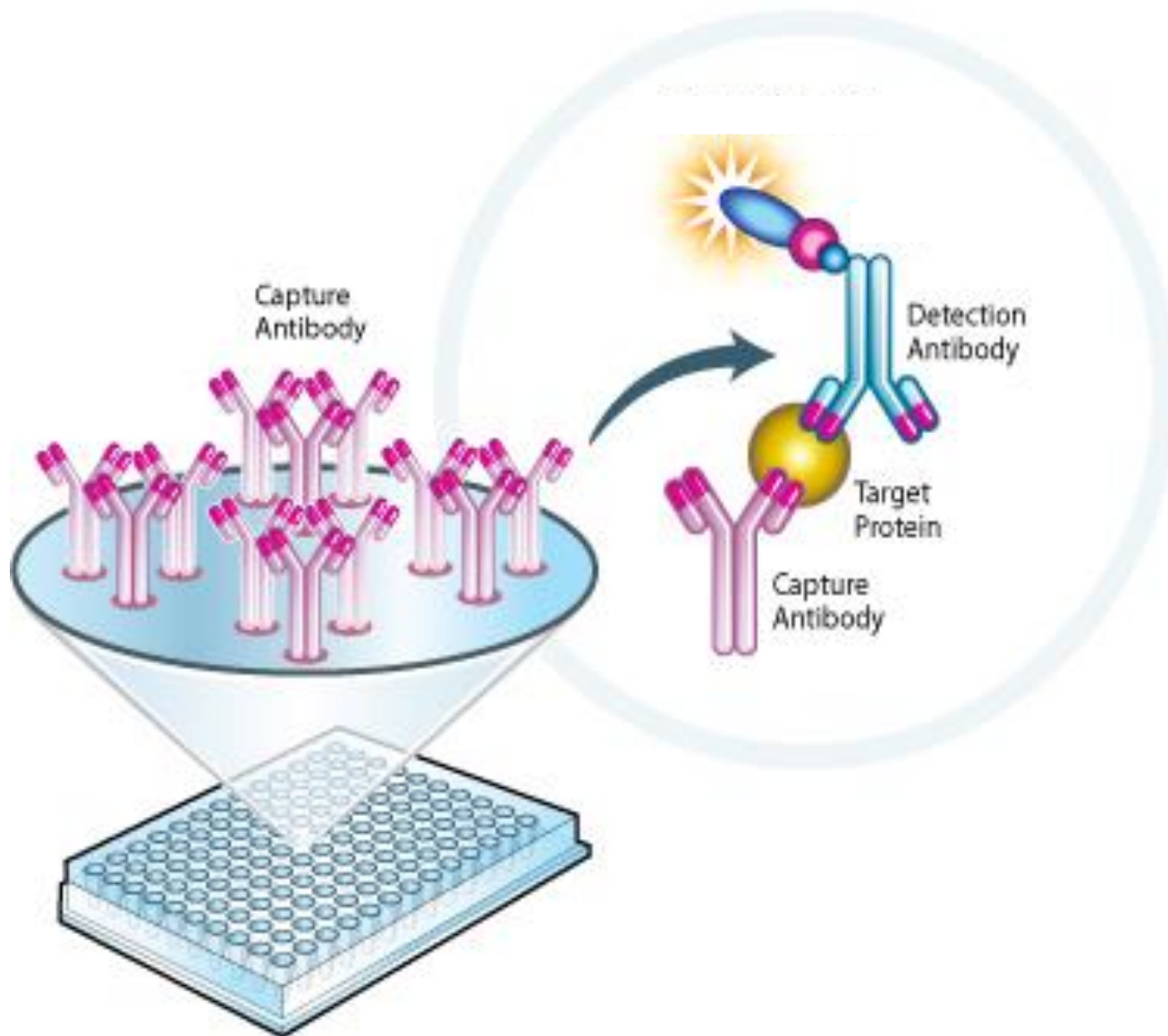
Enzimi e Substrati - Aggiunta del **substrato**



Amplificazione del segnale (sensibilità)



PROTOCOLLO DI UN E.L.I.S.A. A 2 SITI



PROTOCOLLO DI UN E.L.I.S.A. A 2 SITI

Coating: Coat microtiter plate with **70 μL /well** solution of capture/coating antibody diluted 1:1250 (Monoclonal sheep Ab **anti-PROTEIN X**) in **carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.2)**. Incubation must be done overnight at **+4°C**.

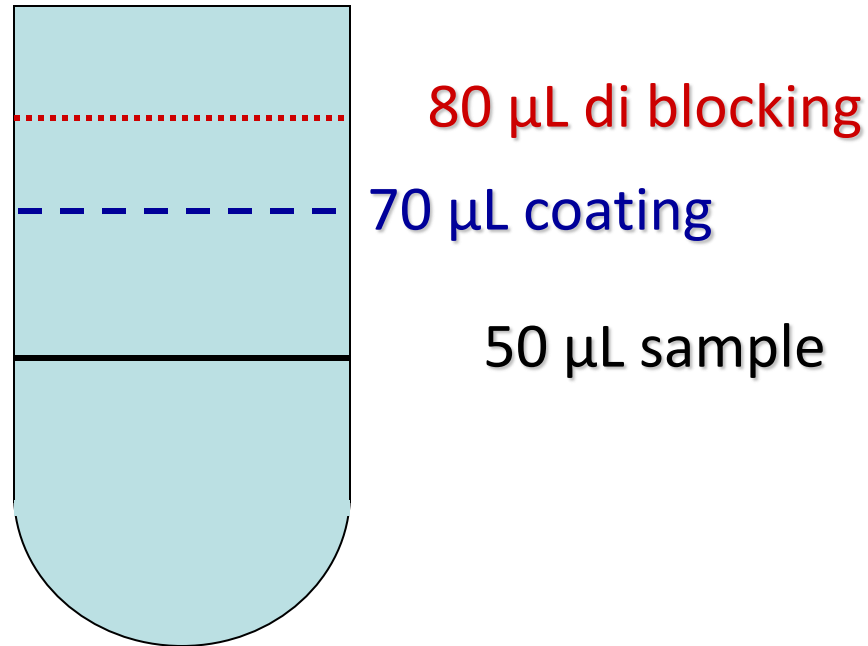
Blocking: After incubation wash the wells 3 times with a solution of TBS and **Tween 0.1%** (v/v). Saturation of protein binding sites on the plate was performed with a solution (**80 μL /well**) of TBS + **BSA 5%** (w/v) incubated for 60' at room temperature.

Sample: Wash 3 times with TBS and Tween 0.1%.

Add **50 μL /well** of sample solution (containing **PROTEIN X**) or **standard curve**. All dilution should be done in the **HBS-BSA 0.2%** (w/v) buffer and incubated for 90' at room temperature.

PROTOCOLLO DI UN E.L.I.S.A. A 2 SITI

VOLUMI UTILIZZATI IN E.L.I.S.A.



First Ab: Wash 3 times with TBS and Tween 0.1%.

Add **50 μL** /well of the antibody (**Polyclonal** rabbit **anti-PROTEIN X** Ab) diluted 1/500 in HBS-BSA 0.2% (w/v) buffer. Incubation: 60' at room temperature.

PROTOCOLLO DI UN E.L.I.S.A. A 2 SITI

Second Ab: Wash 3 times with TBS and Tween 0.1%.

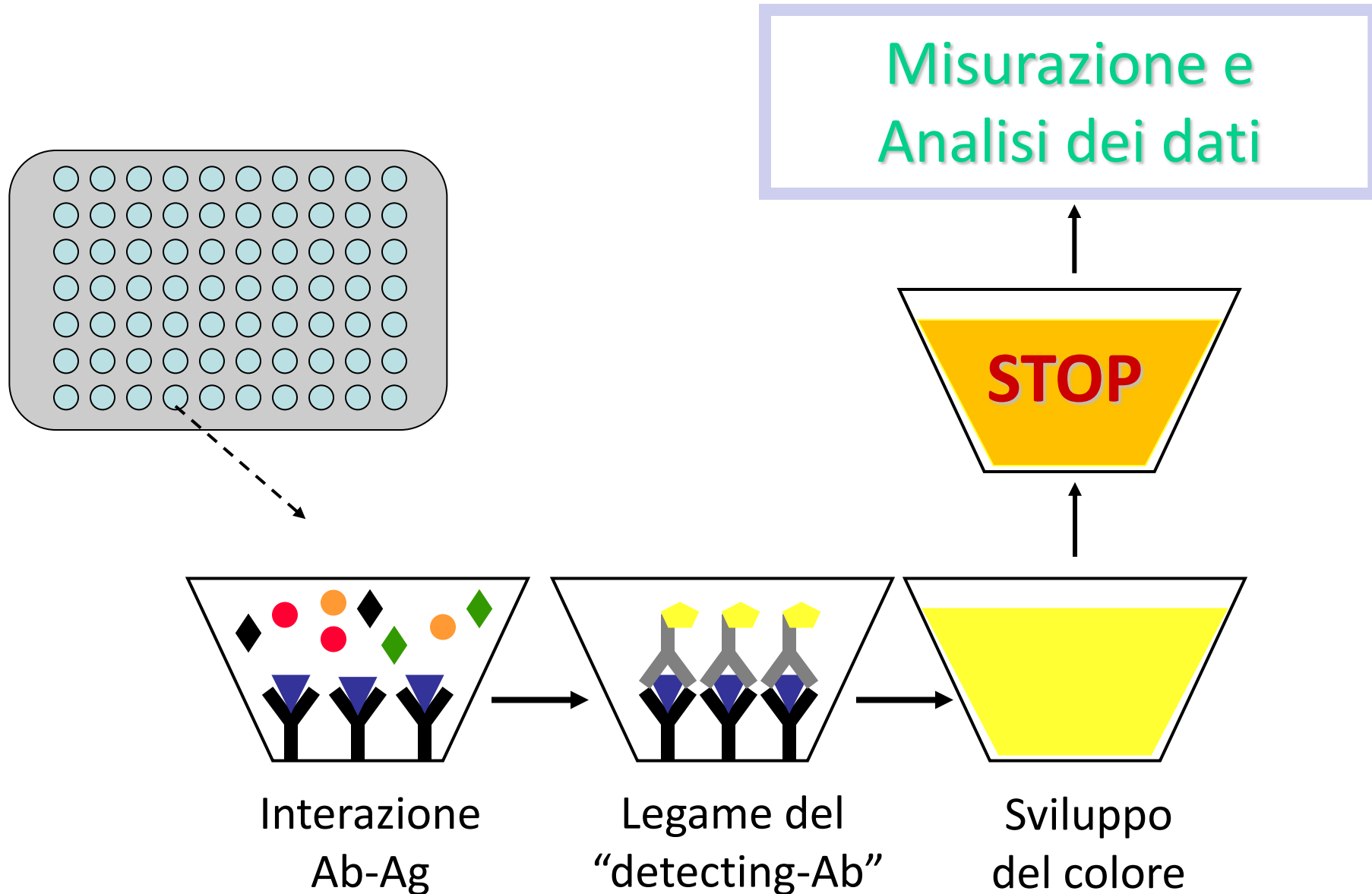
Add **50 μL /well** of antibody (polyclonal mouse Ab **anti-rabbit HRP conjugated**) diluted 1/1000 in HBS-BSA 0.2% (w/v) buffer.
Incubation: 60' at room temperature.

Substrate: Wash 3 times with TBS and Tween 0.1% and adding **50 μL /well** of **substrate solution** (**OPD**, buffer and **3% H_2O_2**).

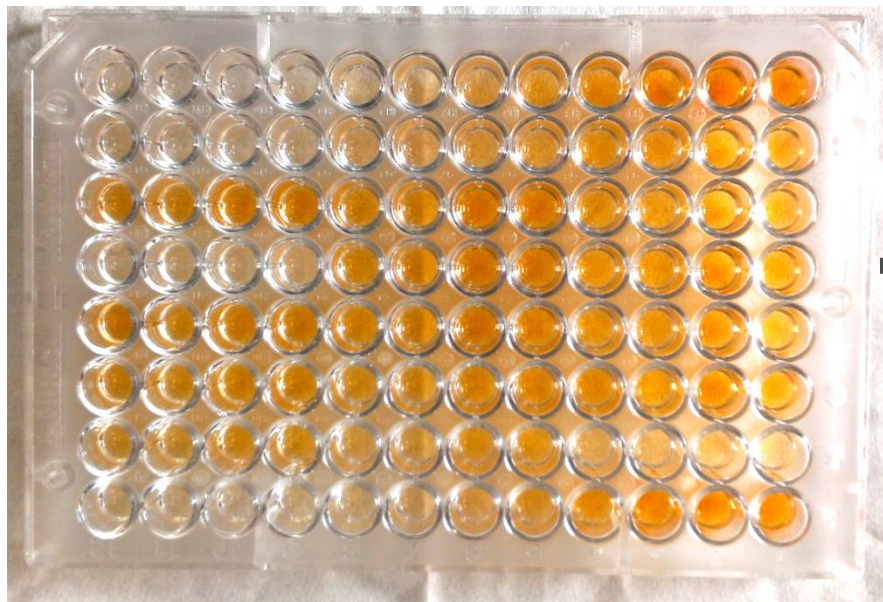
Stop Color Reaction: Stop color reaction after **XX** min with **25 μL /well** of **H_2SO_4 2,5 M**.

Optical Density Measurement: **Measure OD** sample at **492 nm** after 30 min from substrate addition.

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

Serve un

INTERPRETE

(curva di taratura)

per associare i
valori di OD a valori
di concentrazione

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	

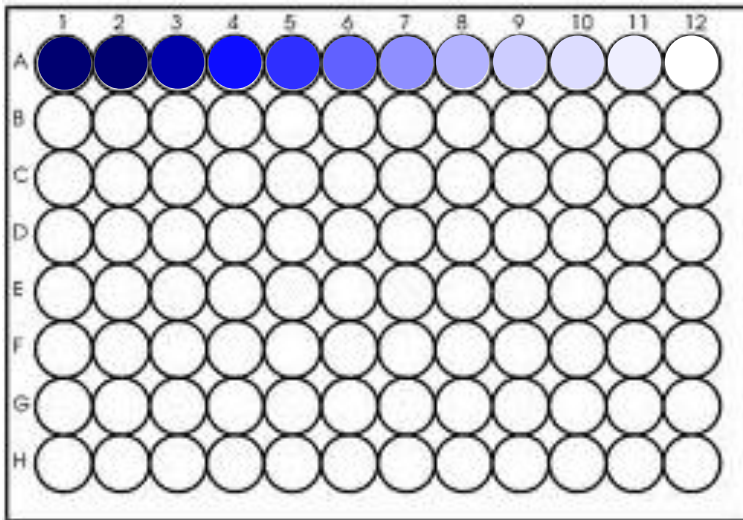
La curva di taratura

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

Contiene la _____ che si vuole ricercare e quantificare

Viene preparata con _____ della proteina di riferimento

Ogni singolo punto della curva di taratura è a _____ **NOTA**



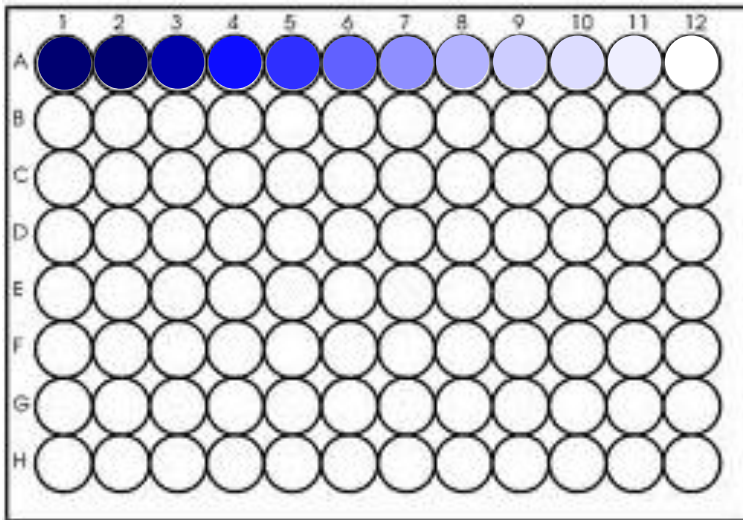
→ Pozzetti contenenti la curva di taratura

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

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**



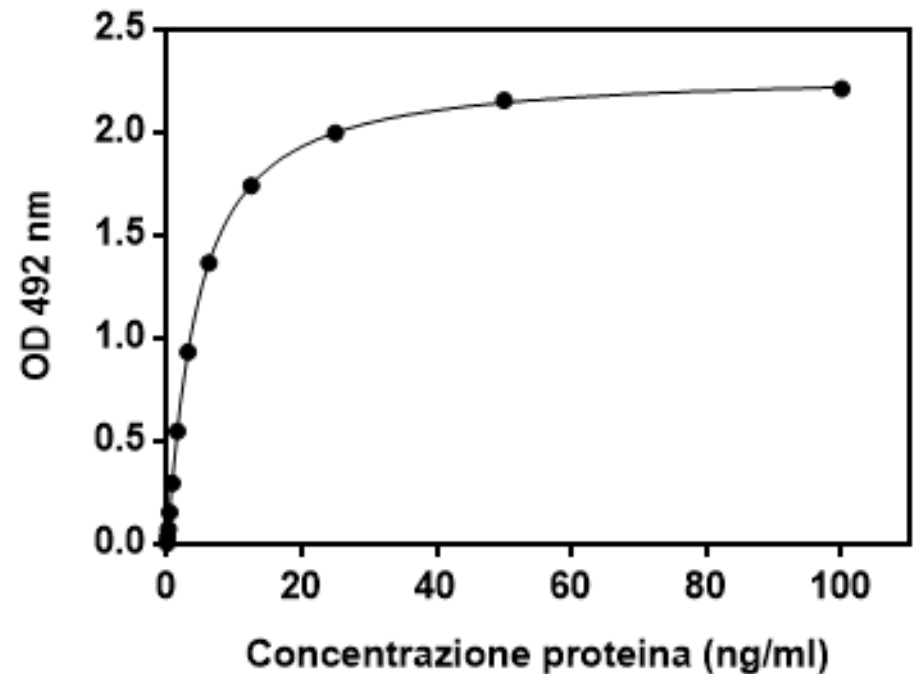
→ Pozzetti contenenti la curva di taratura

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

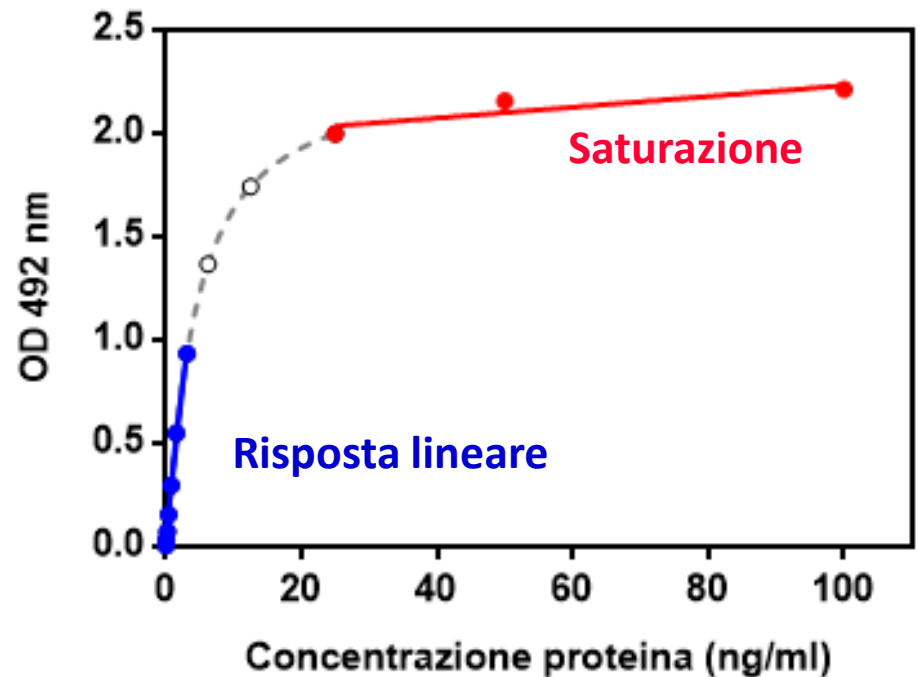
Pozzetto	[ng/ml]	OD	OD-bianco
A1	100	2,2920	2,2090
A2	50	2,2370	2,1540
A3	25	2,0770	1,9940
A4	12,5	1,8220	1,7390
A5	6,25	1,4470	1,3640
A6	3,125	1,0140	0,9310
A7	1,563	0,6280	0,5450
A8	0,781	0,3750	0,2920
A9	0,391	0,2340	0,1510
A10	0,195	0,1530	0,0700
A11	0,098	0,1160	0,0330
A12	0,000	0,0830	0,0000



Relazione tra segnale e concentrazione del campione

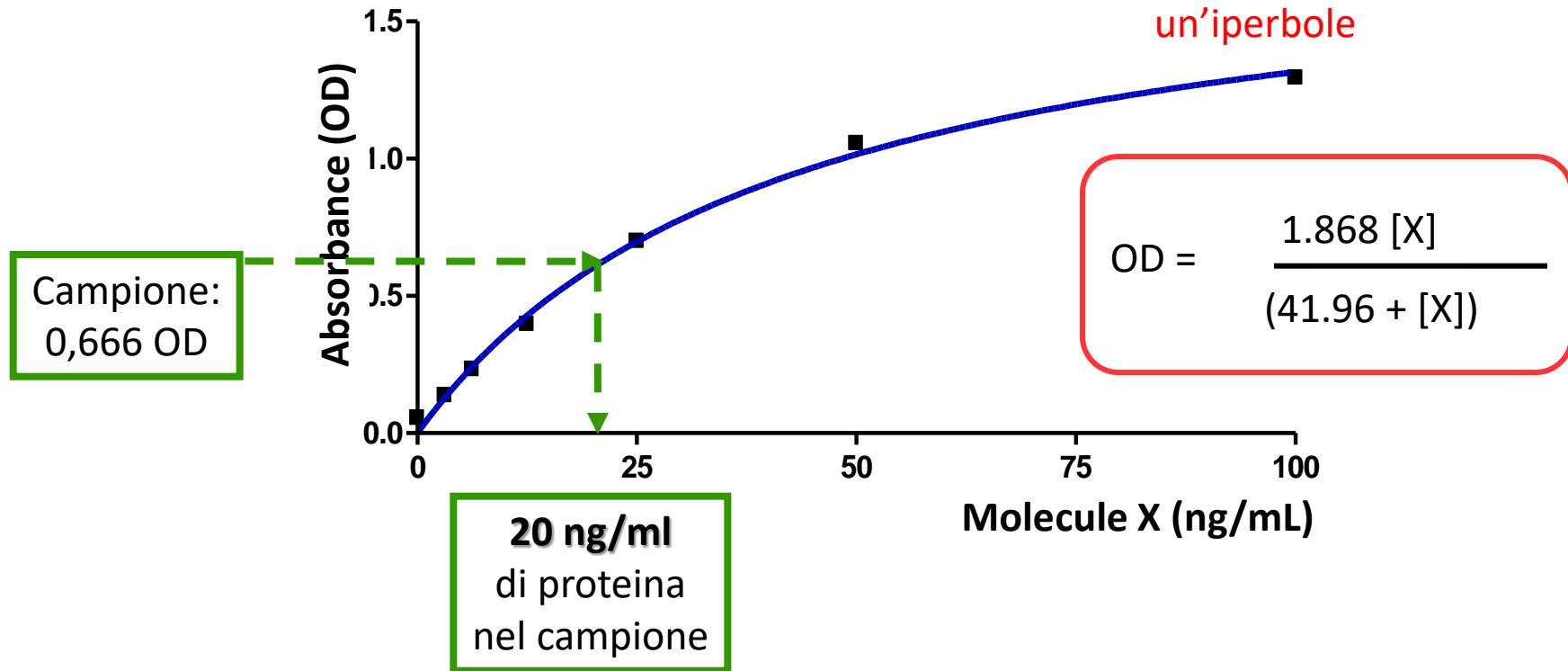
Si ottiene un grafico all'interno del quale il **valore sperimentale (OD, asse y)** viene posto **in funzione della concentrazione (NOTA, asse x)** dei punti della curva di taratura

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



Come si utilizza la curva di taratura

Curva descritta dall'equazione di un'iperbole

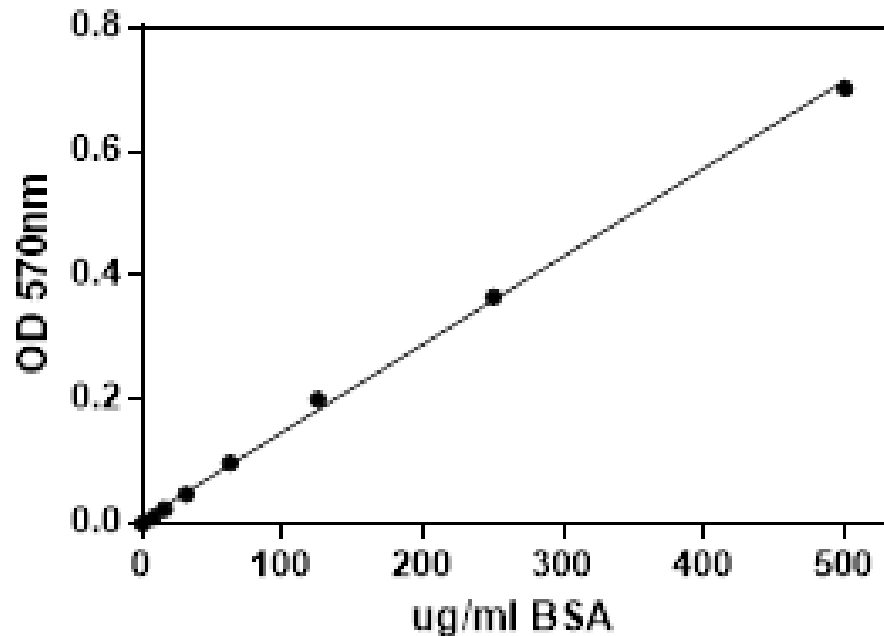


L'equazione che descrive la curva permette di **CALCOLARE** la **quantità** di **analita** presente nel **campione** di indagine.

Tornando al Confronto tra **COLORAZIONE** e **QUANTIFICAZIONE con anticorpi**

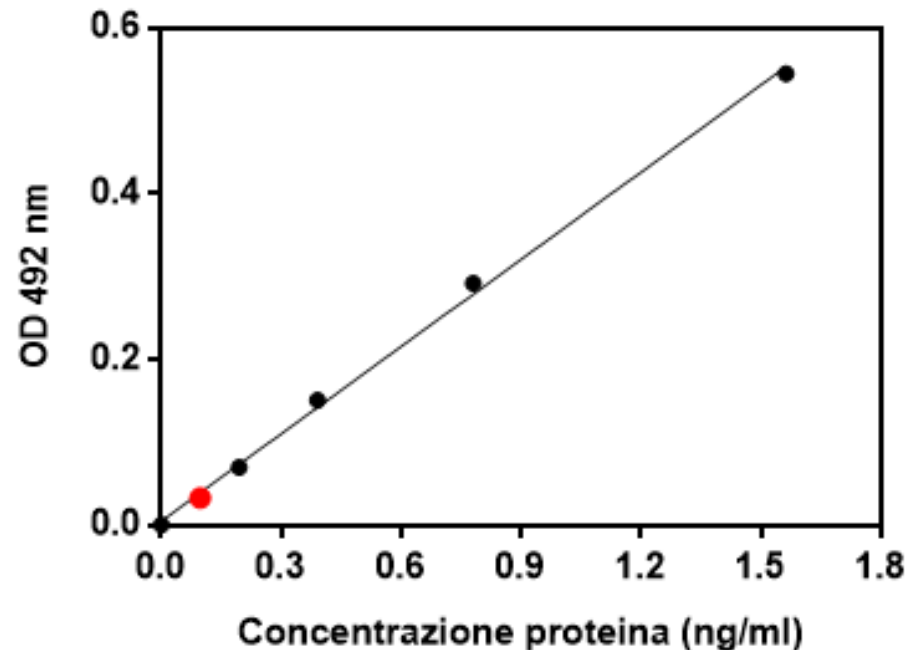
ASPECIFICA

- Proteine in soluzione
- Utilizza un colorante
- Quantificazione di **TUTTE** le proteine



SPECIFICA

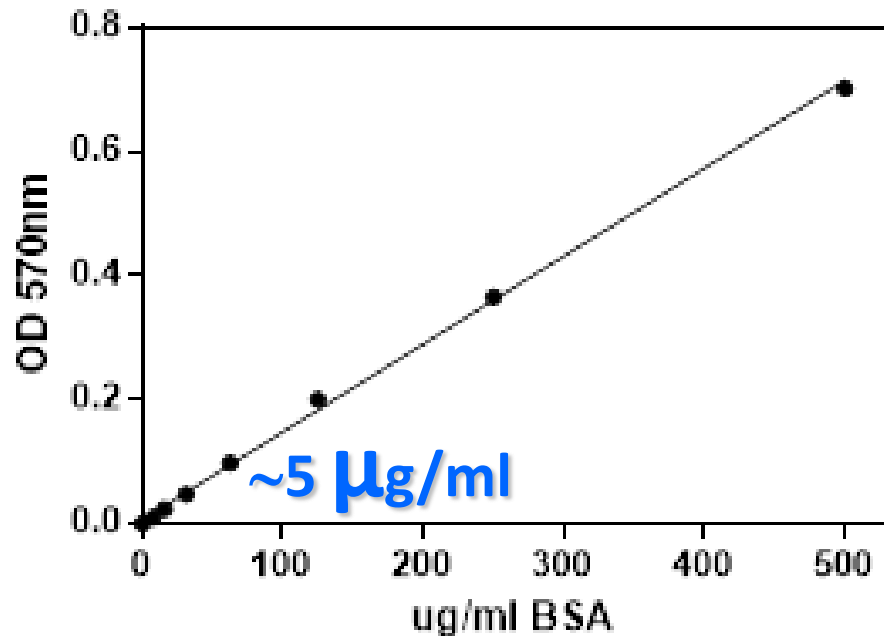
- Proteine in soluzione
- Utilizza ANTICORPI
- Quantificazione di **UNA** proteina



Tornando al Confronto tra **COLORAZIONE** e **QUANTIFICAZIONE con anticorpi**

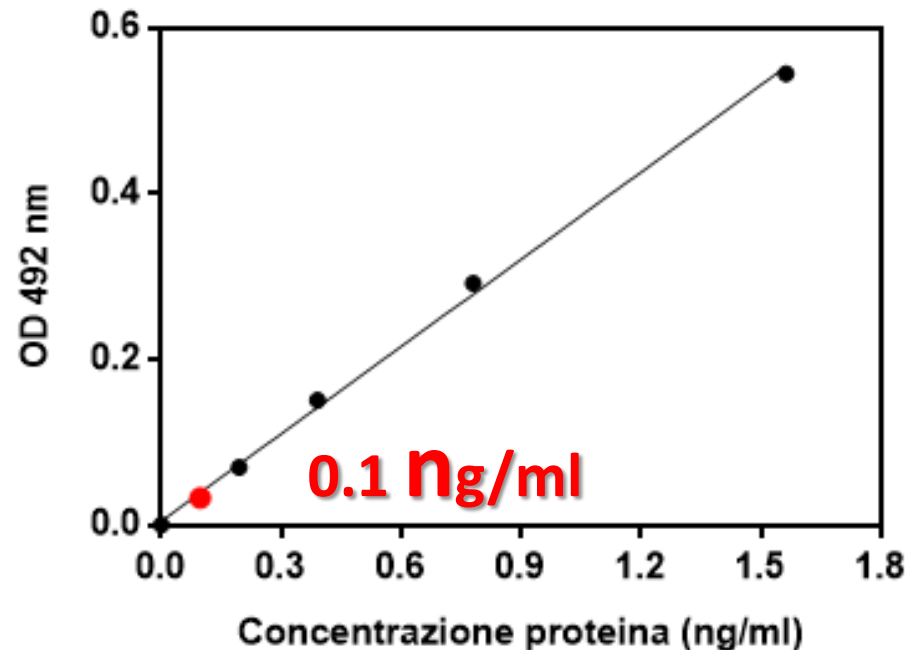
ASPECIFICA

- Proteine in soluzione
- Utilizza un colorante
- Quantificazione di **TUTTE** le proteine
- **BASSA** sensibilità

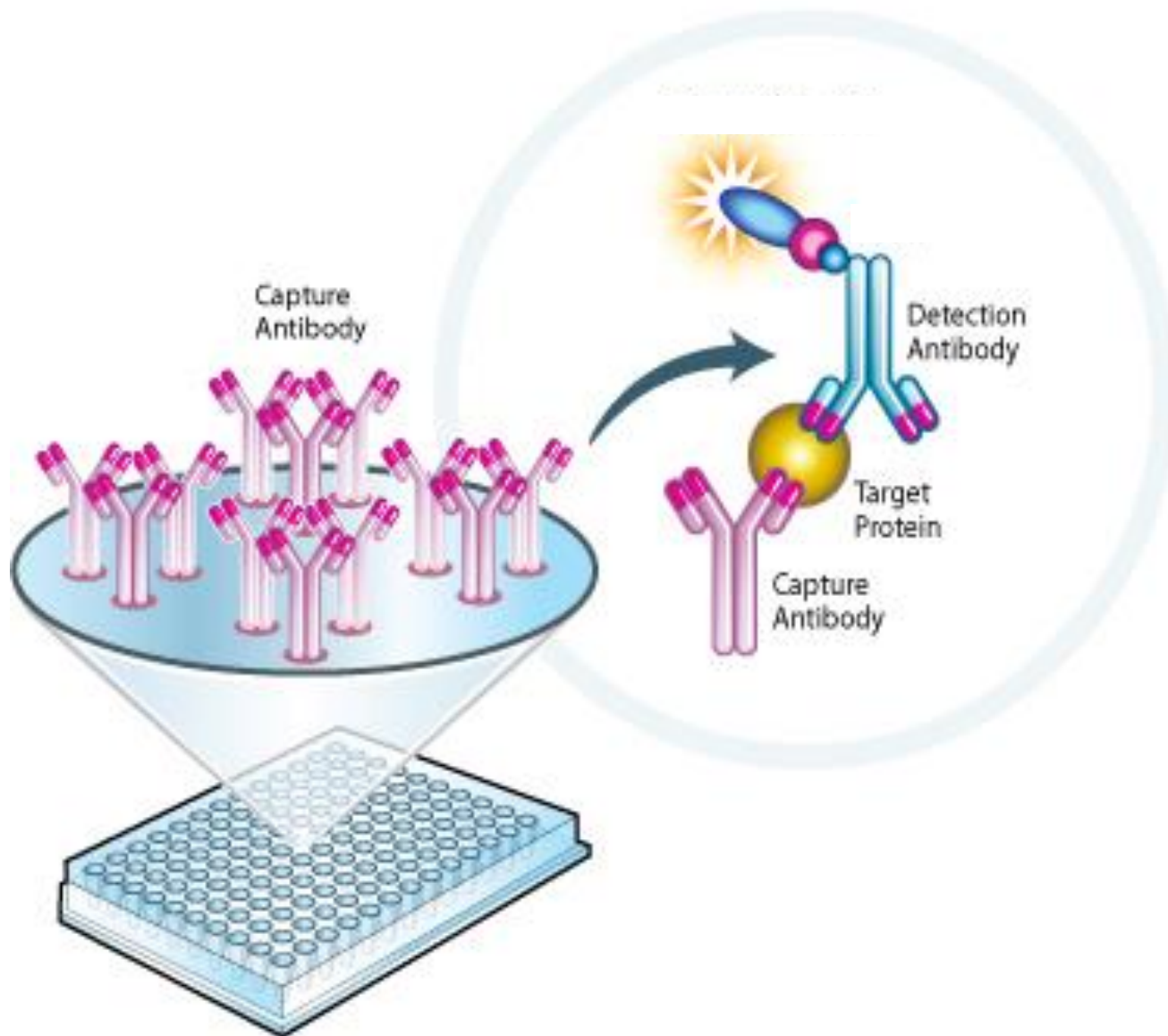


SPECIFICA

- Proteine in soluzione
- Utilizza ANTICORPI
- Quantificazione di **UNA** proteina
- **ELEVATA** sensibilità

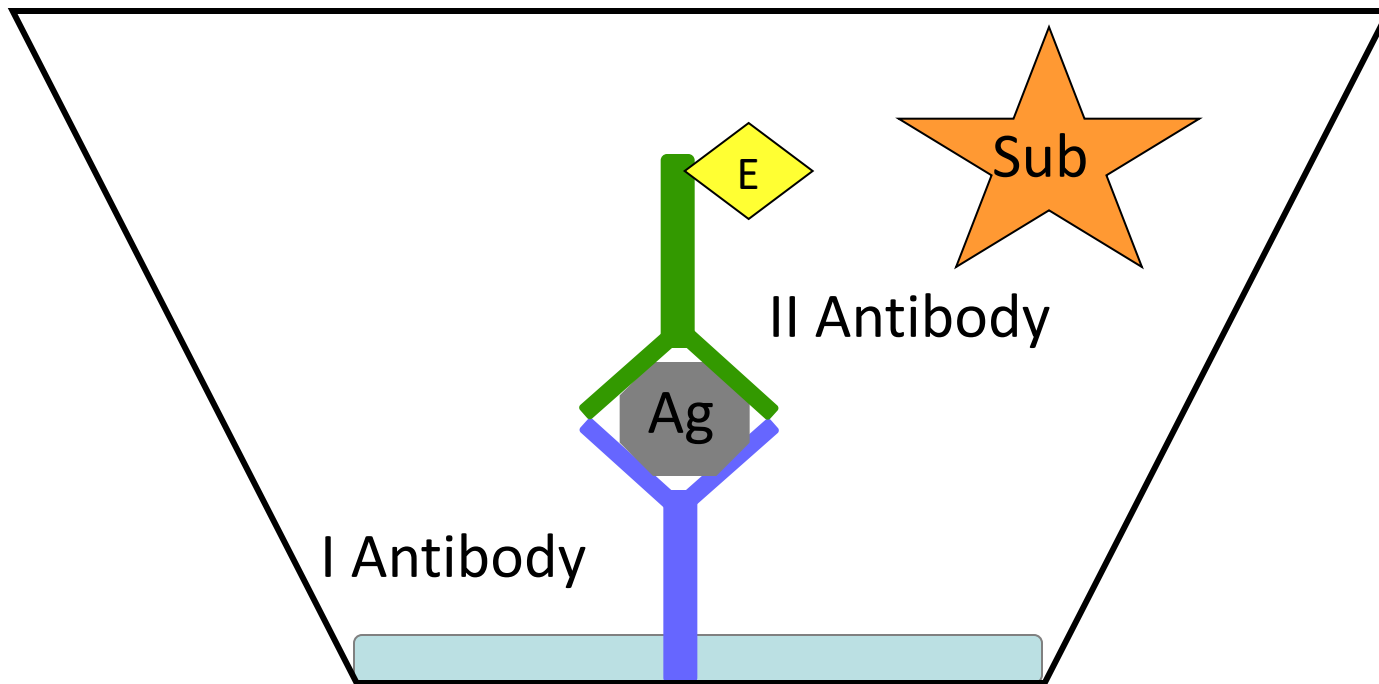


ALTRE TIPOLOGIE DI E.L.I.S.A.



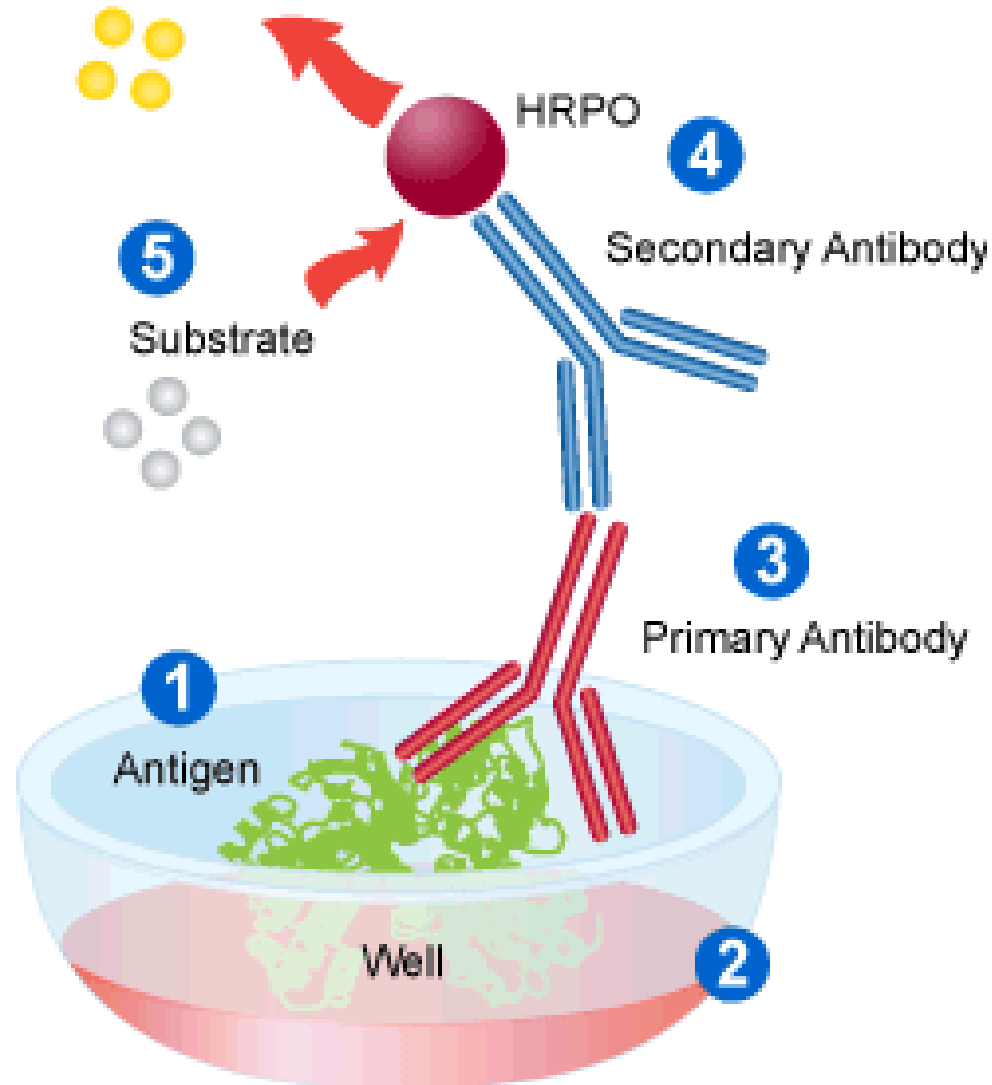
ELISA SANDWICH

(o indiretto o a 2 siti)



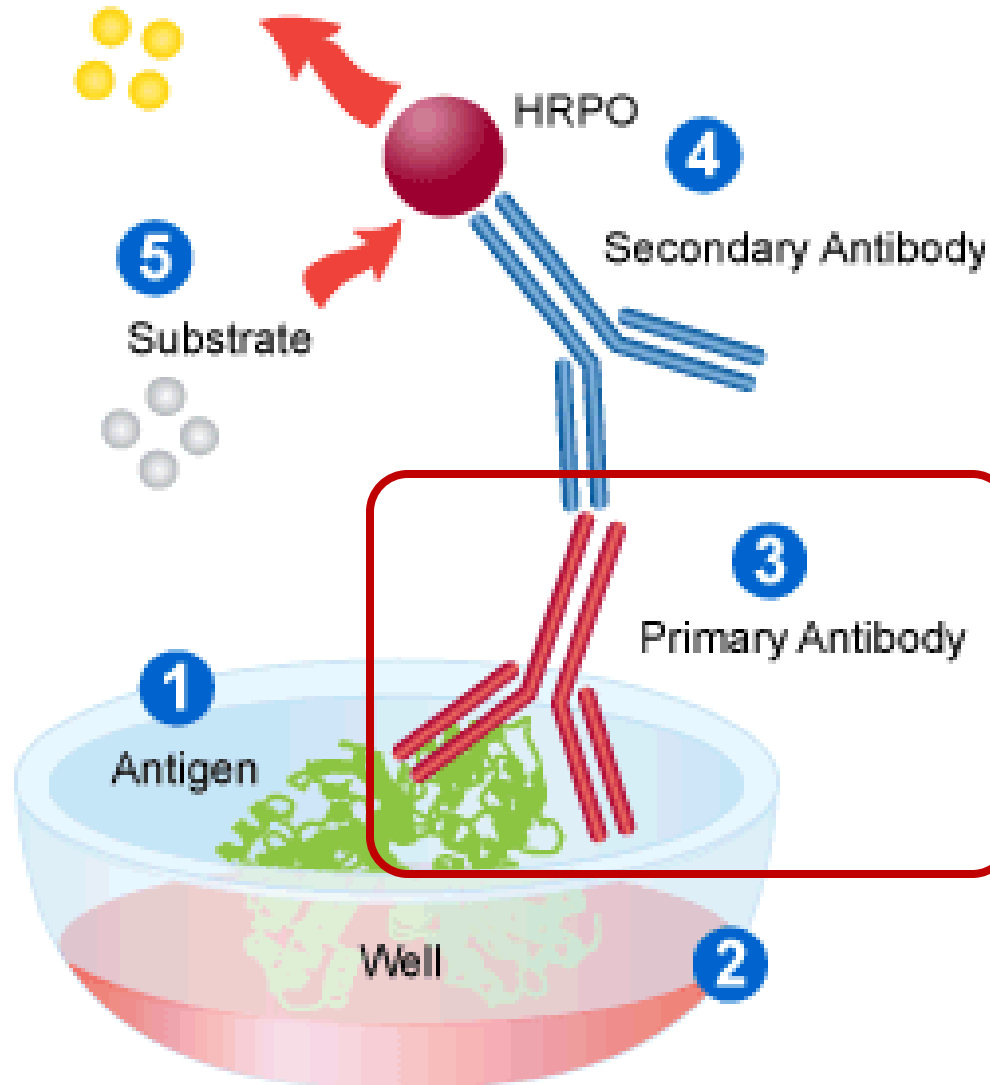
ELISA SANDWICH (o indiretto o a 2 siti)

La proteina legata al supporto **non** deve essere limitante



ELISA SANDWICH (o indiretto o a 2 siti)

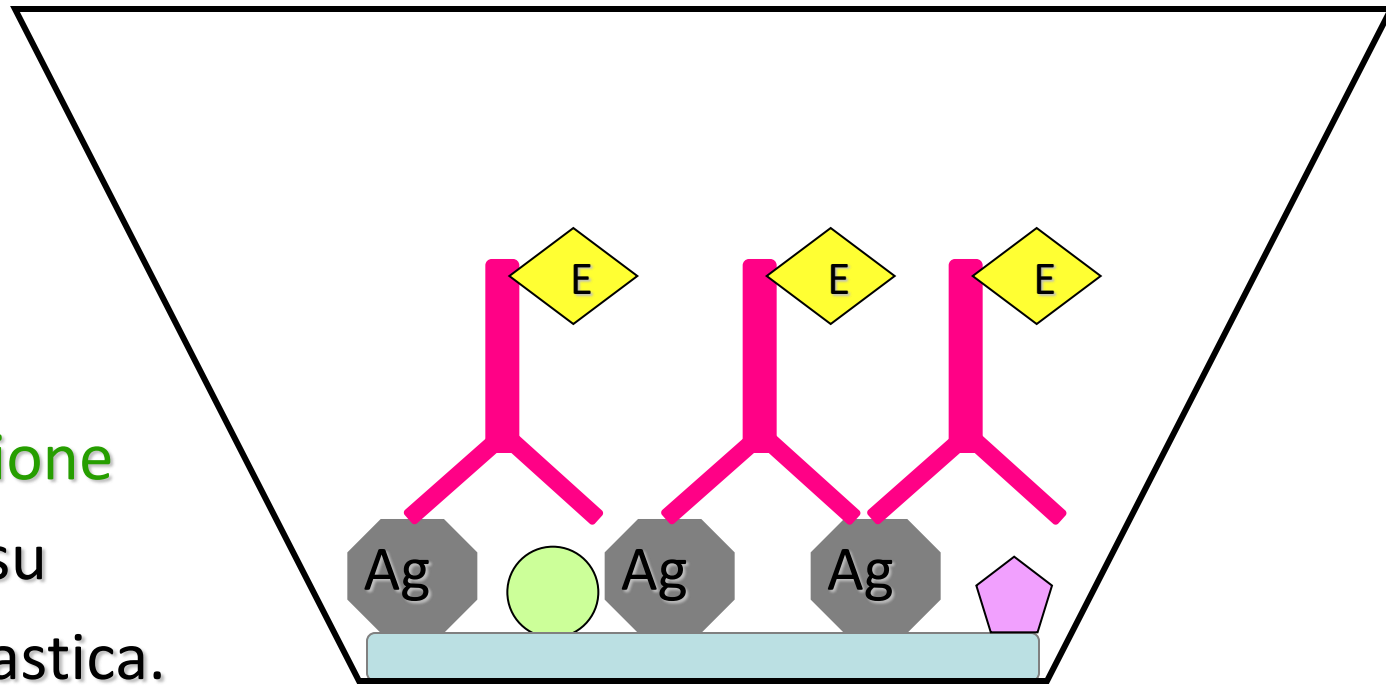
La proteina legata al supporto **non** deve essere **limitante**



Questo è l'Ag cercato

ELISA DIRETTO O A UN SITO

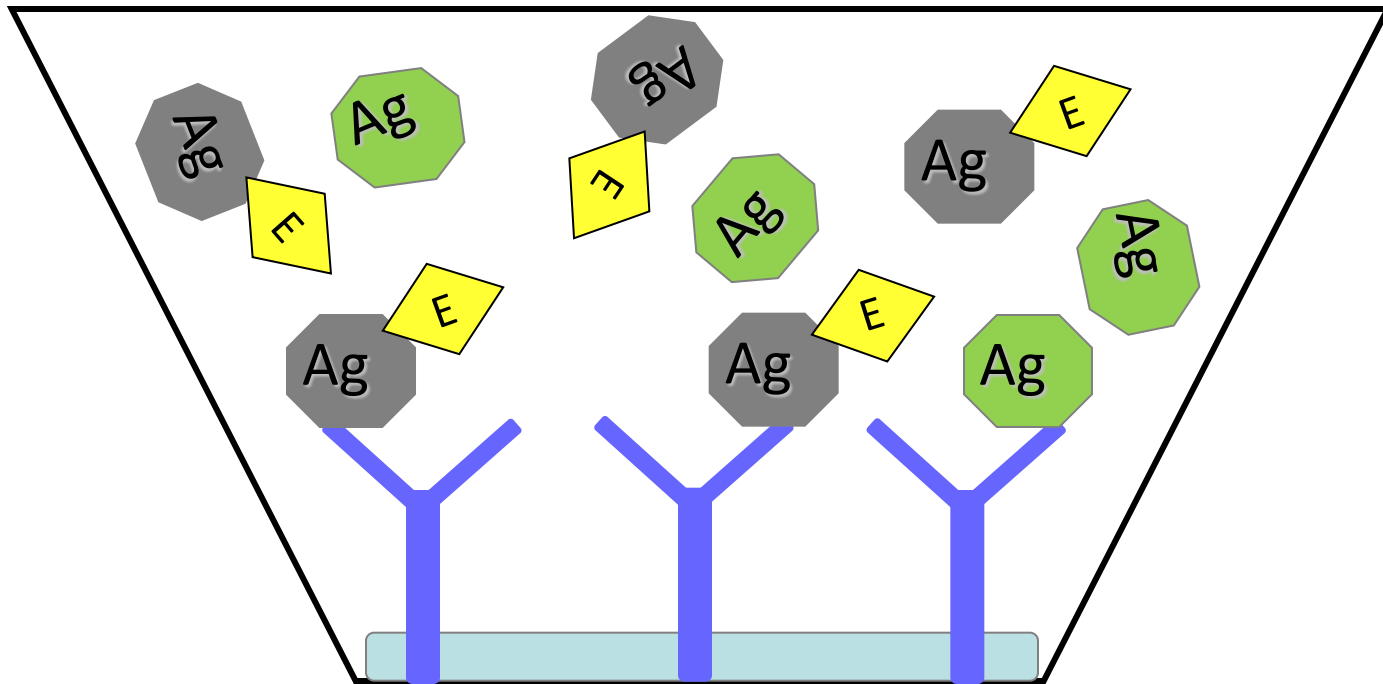
- Facile, veloce ed economico.
- Si lega il campione contenente l'Ag su una superficie plastica.
- Aggiunta di un anticorpo marcato.



Metodo meno preciso e meno efficiente di un saggio ELISA a sandwich.

ELISA COMPETITIVO

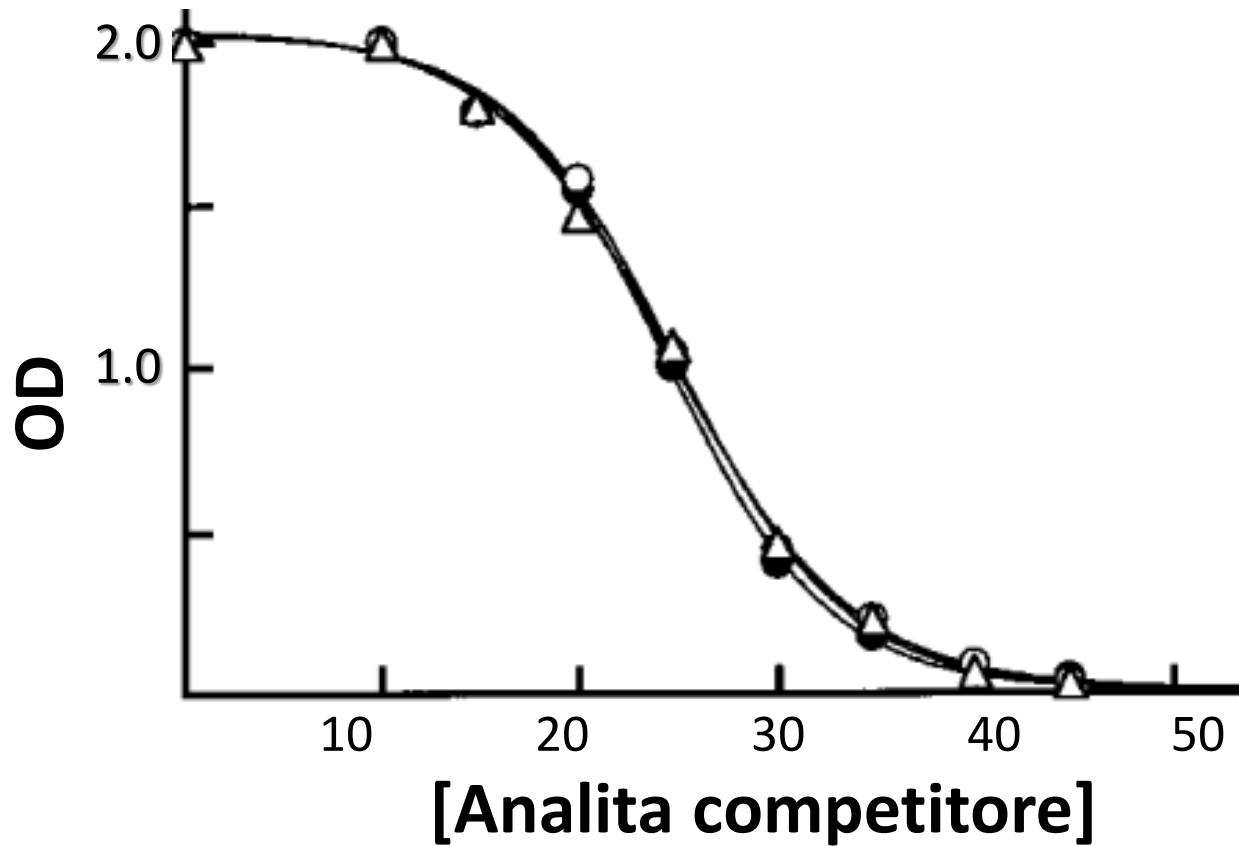
Competizione fra antigeni



Quantità sconosciuta di analita miscelato con **quantità nota di analita marcato**, che competono per un **numero limitato di anticorpi**.

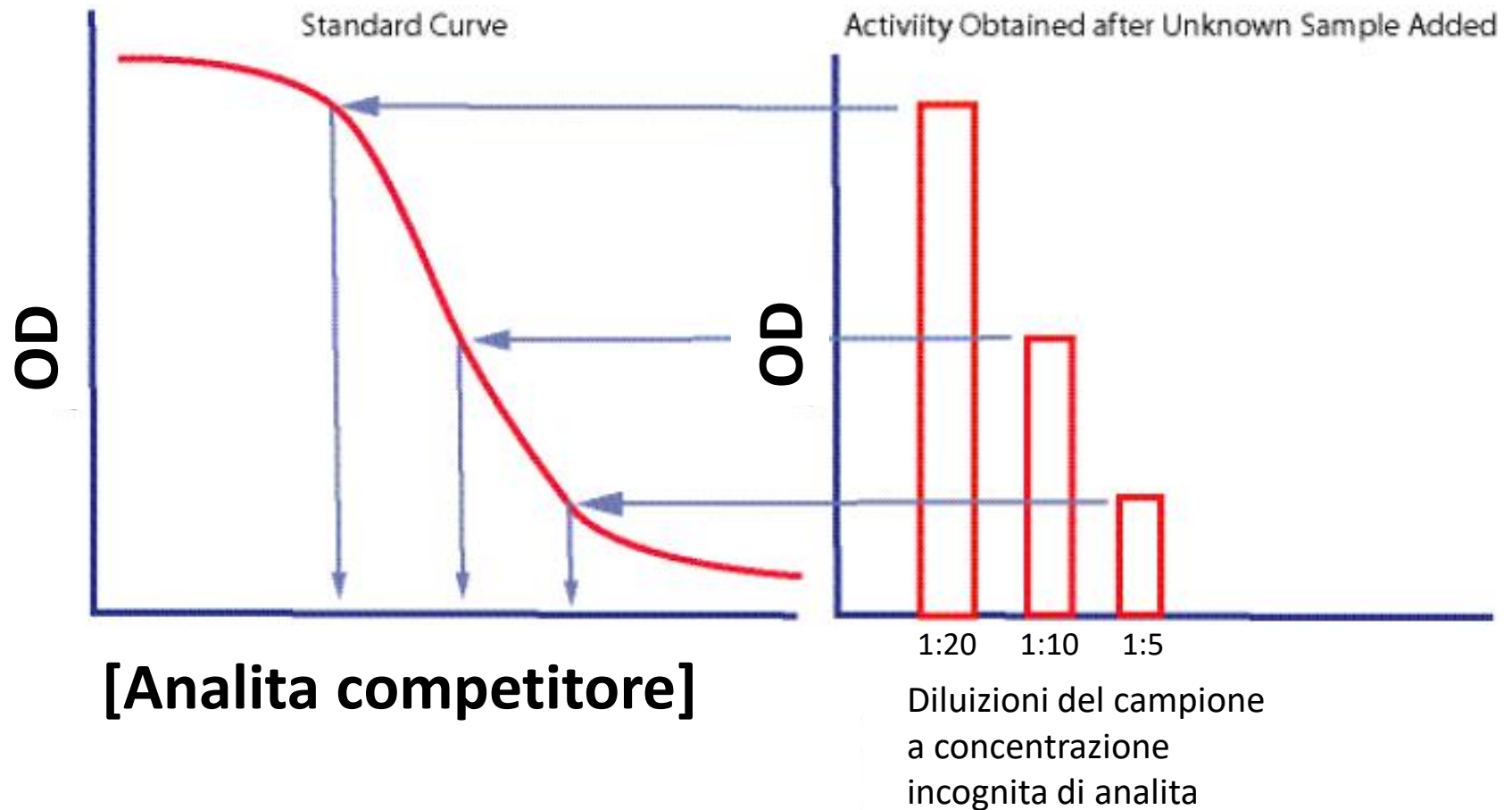
ELISA COMPETITIVO

Andamento



ELISA COMPETITIVO

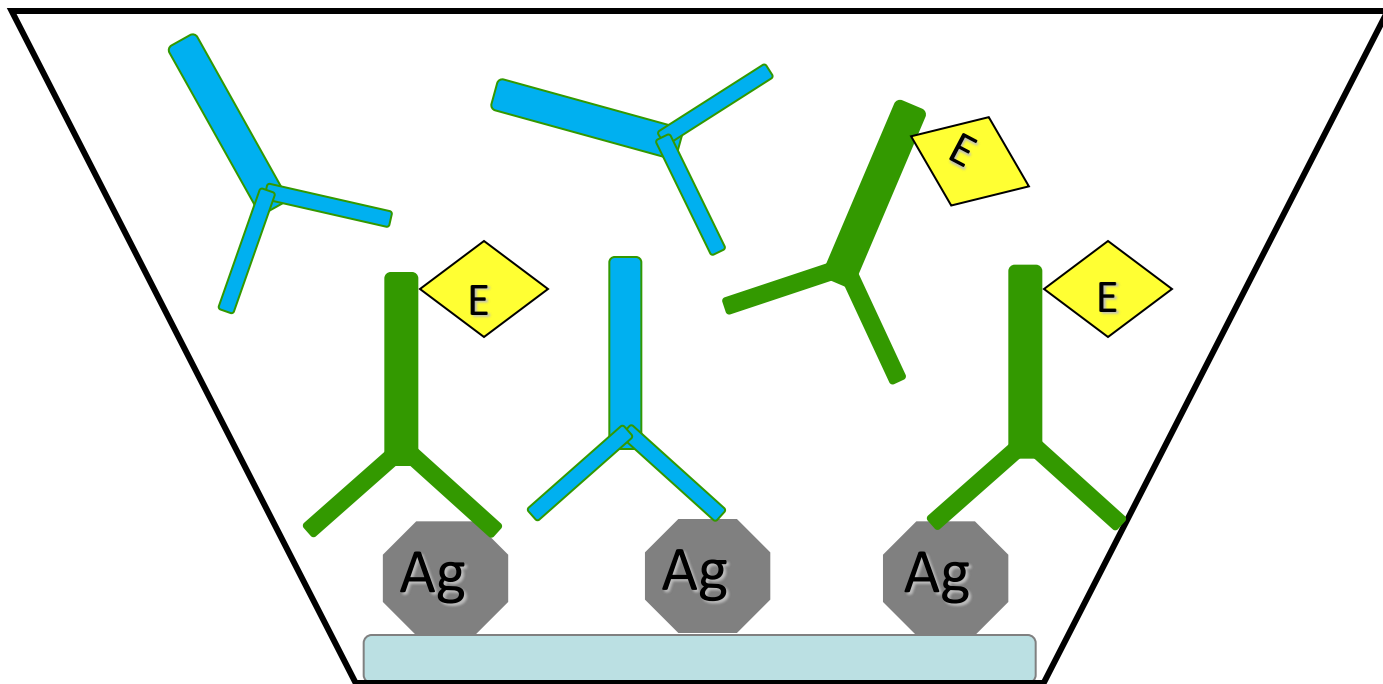
Andamento



Come **tutti gli ELISA** permette di quantificare solo se si usa una **curva di riferimento**.

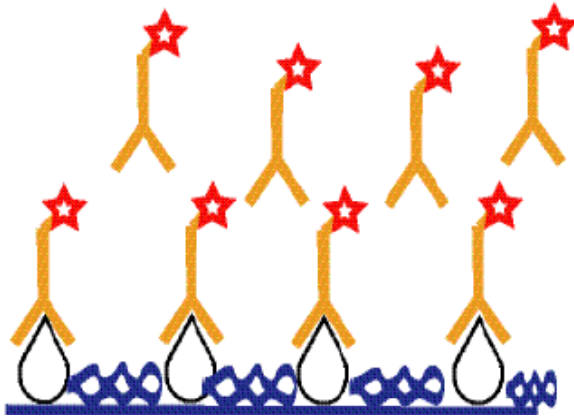
ELISA COMPETITIVO

Competizione anticorpale

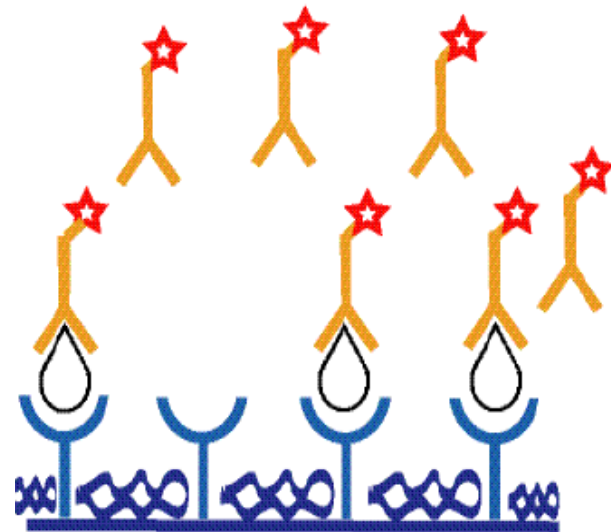


Riassunto

ELISA non competitivo

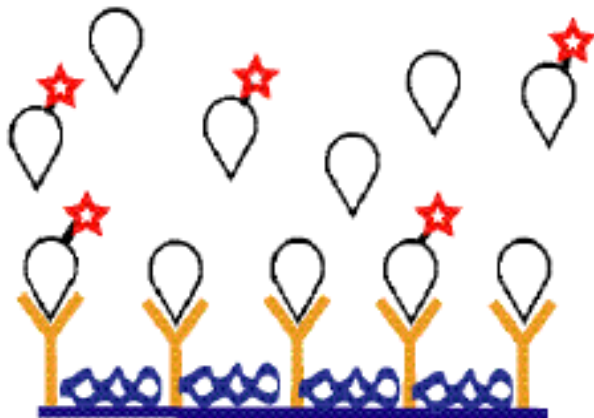


Diretto

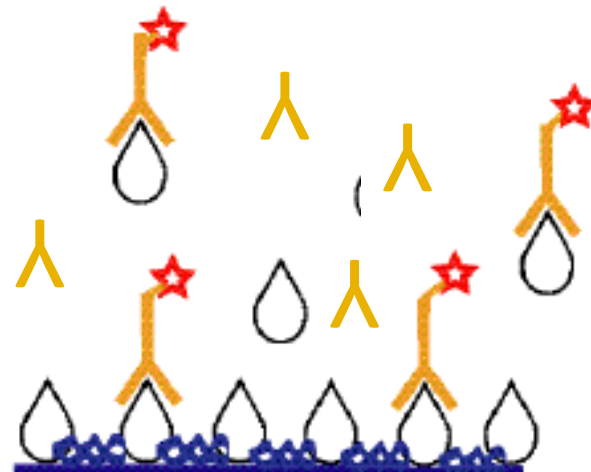


Sandwich

ELISA competitivo

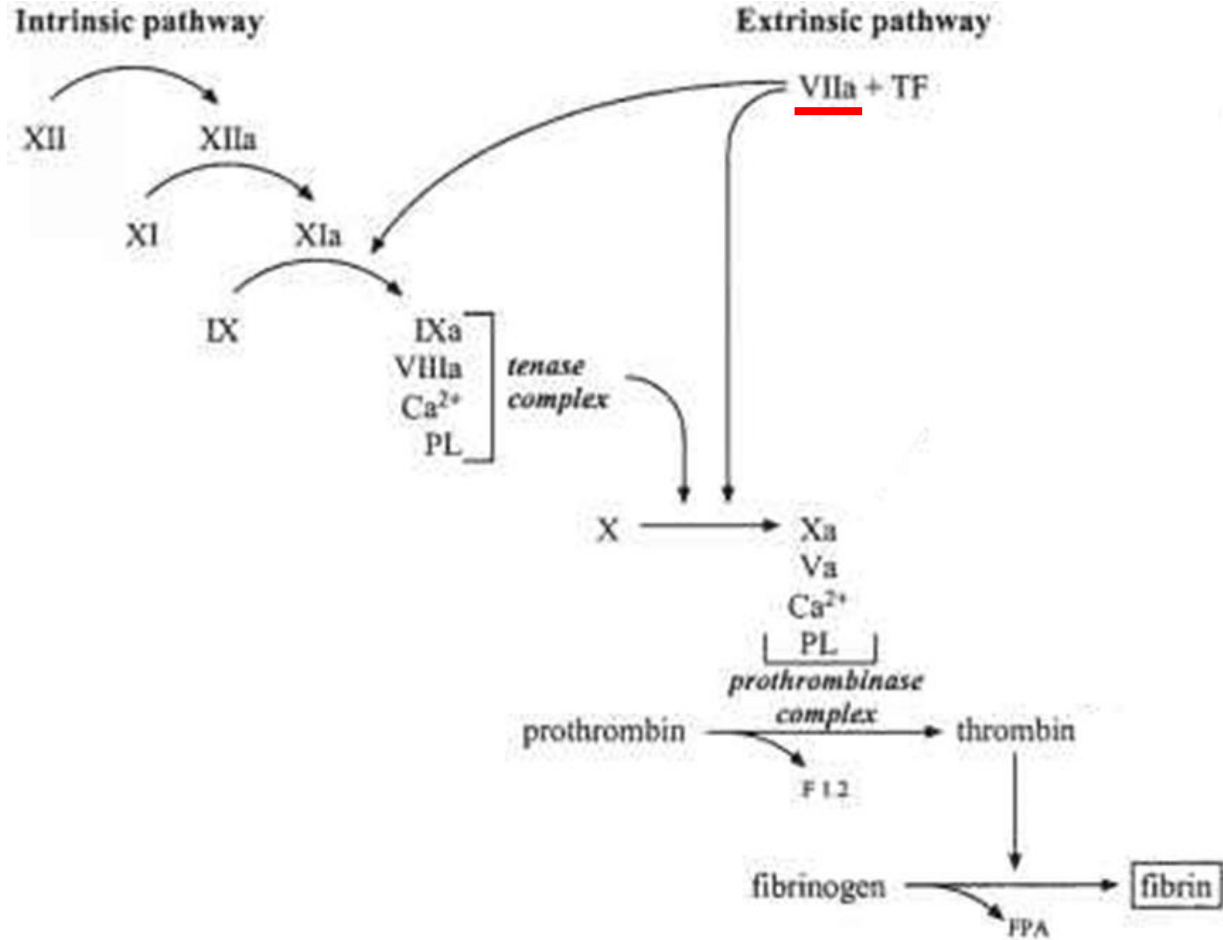
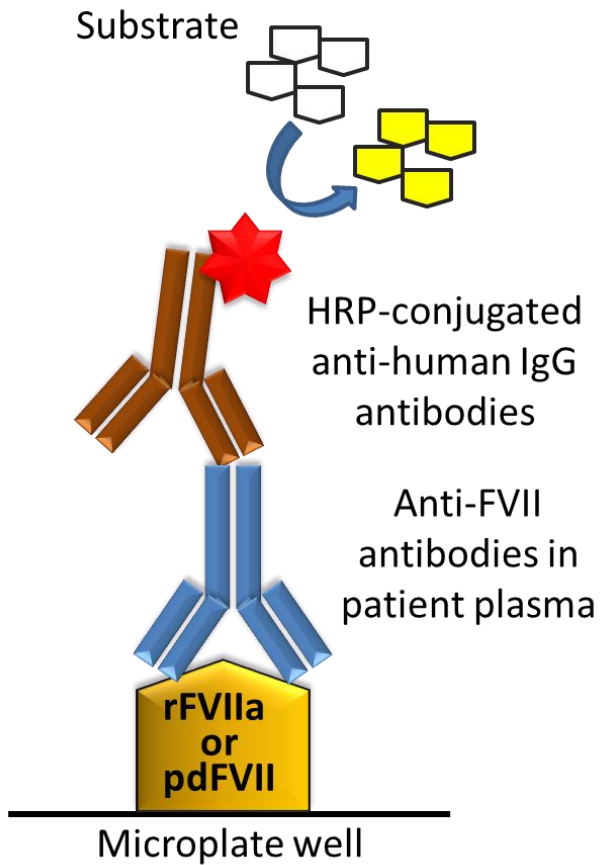
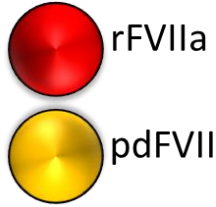


Labeled Analyte

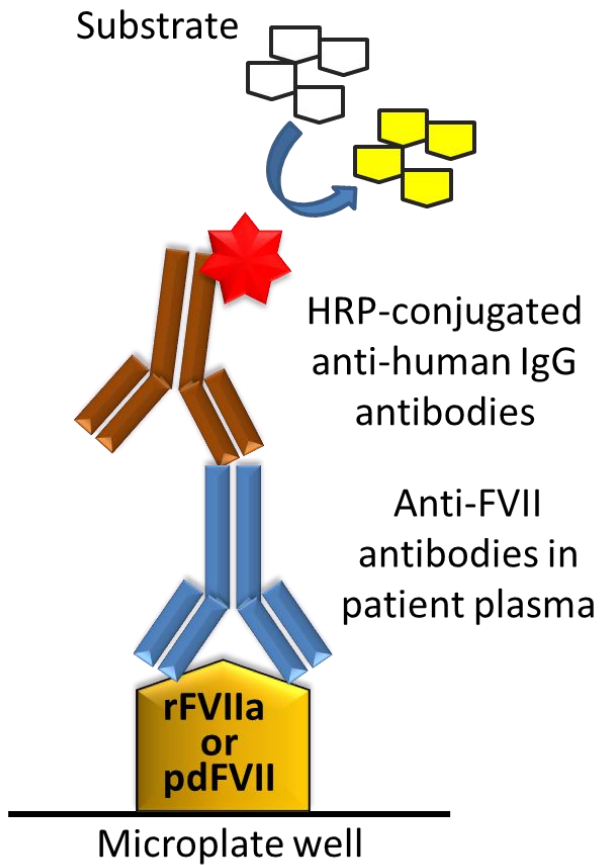
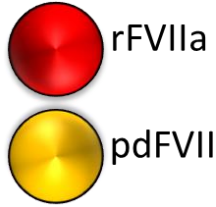


Labeled Antibody

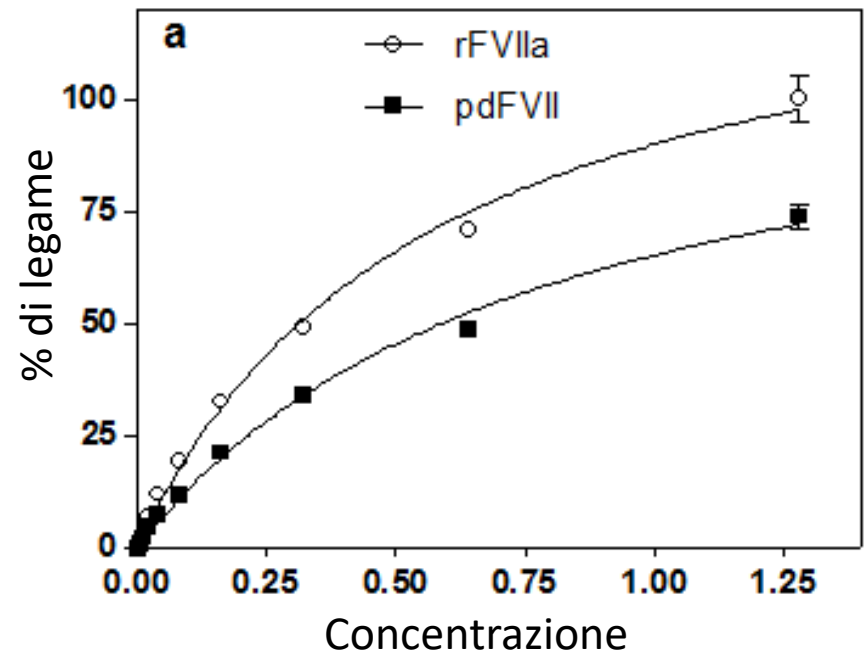
Esempio reale di saggio di competizione



Esempio reale di saggio di competizione

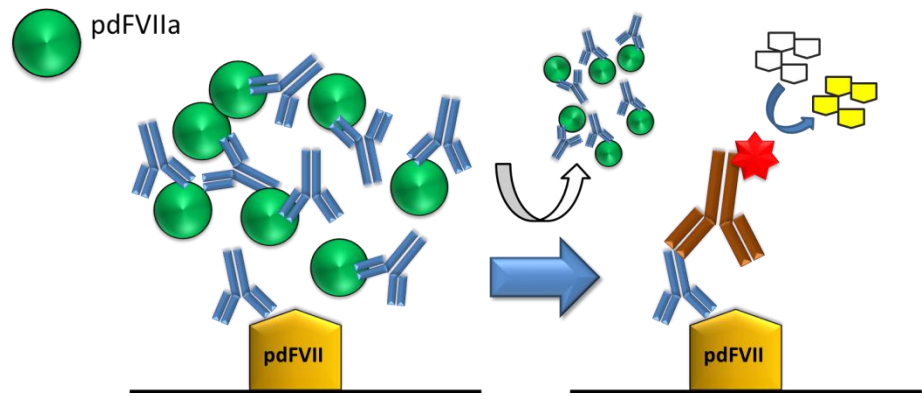
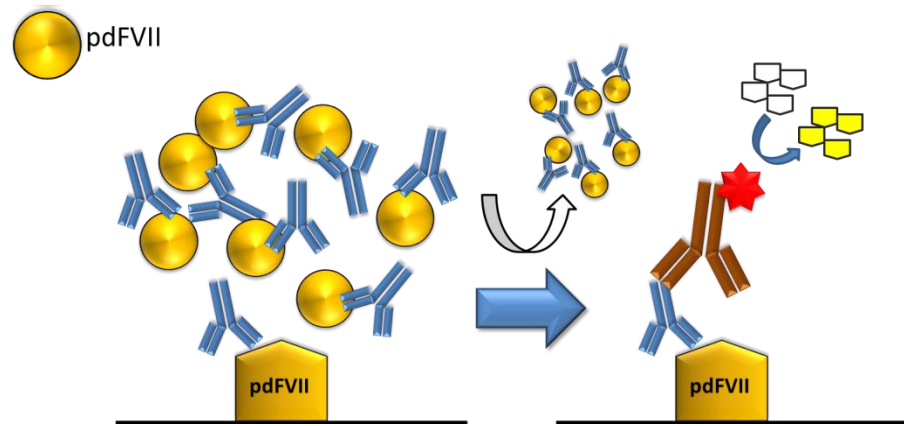
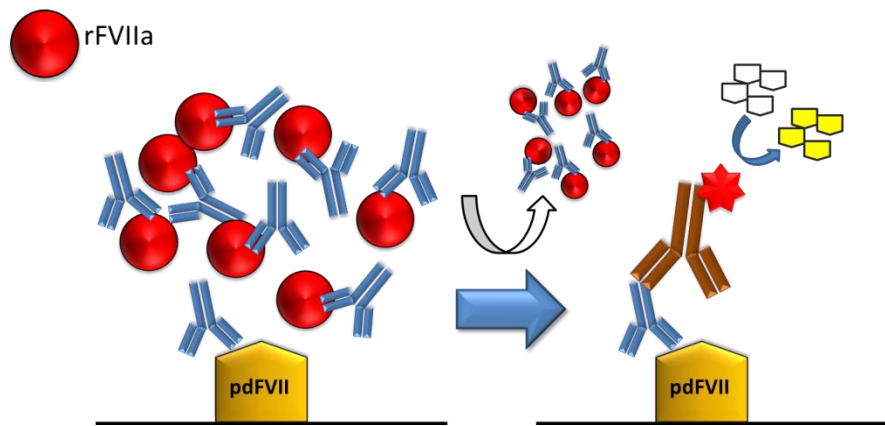
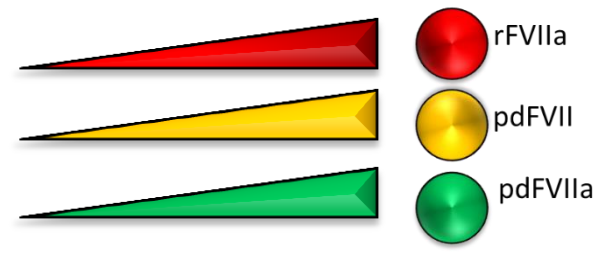
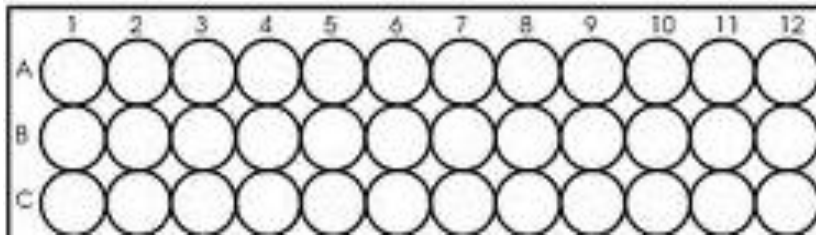
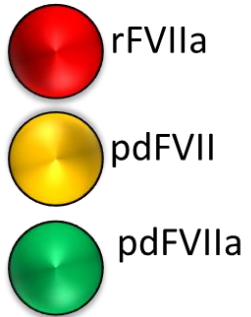


Binding assay

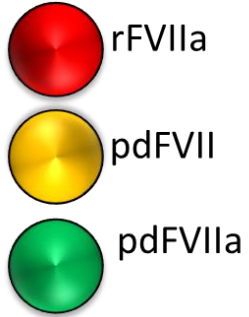


Chi è il miglior competitore?

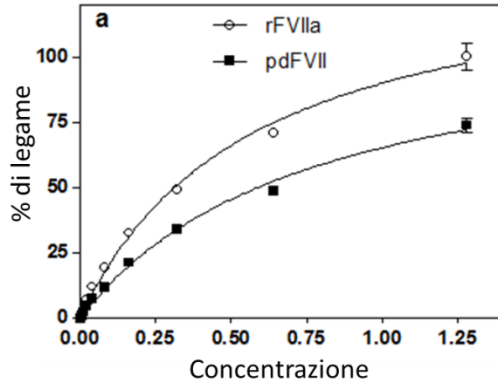
Esempio reale di saggio di competizione



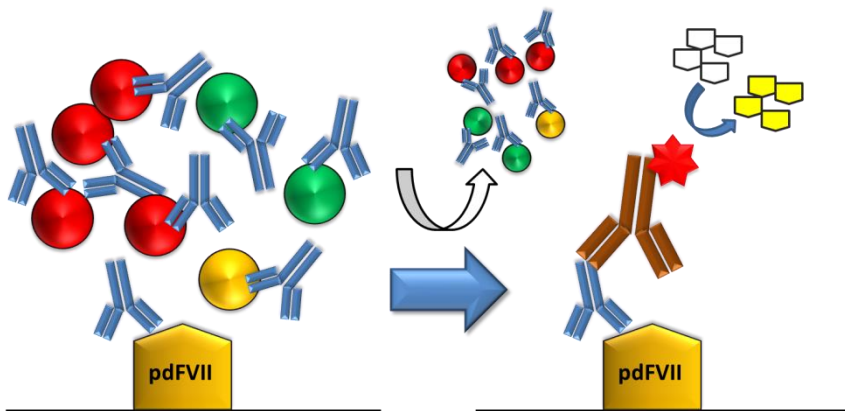
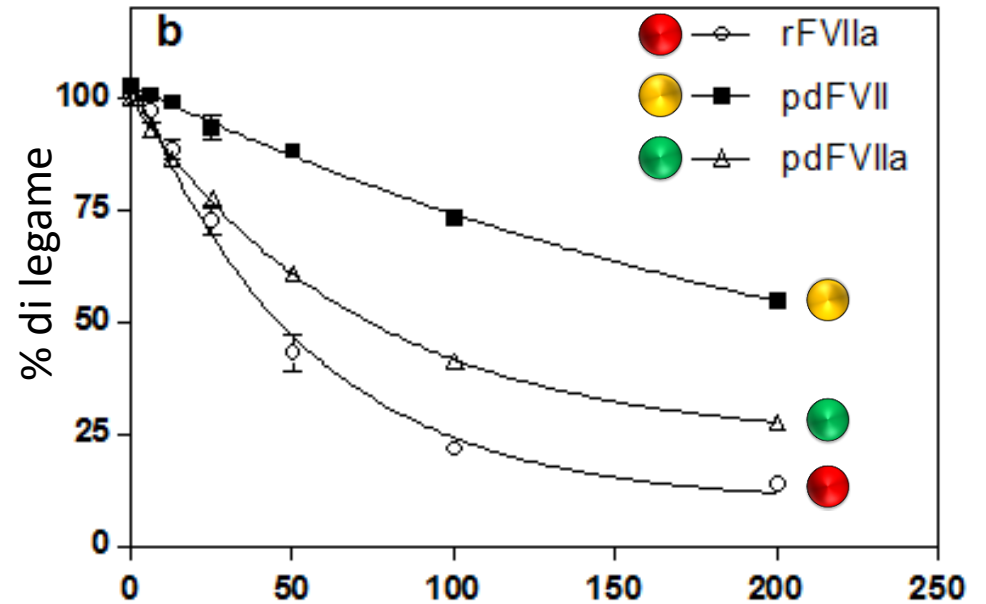
Esempio reale di saggio di competizione



Binding assay

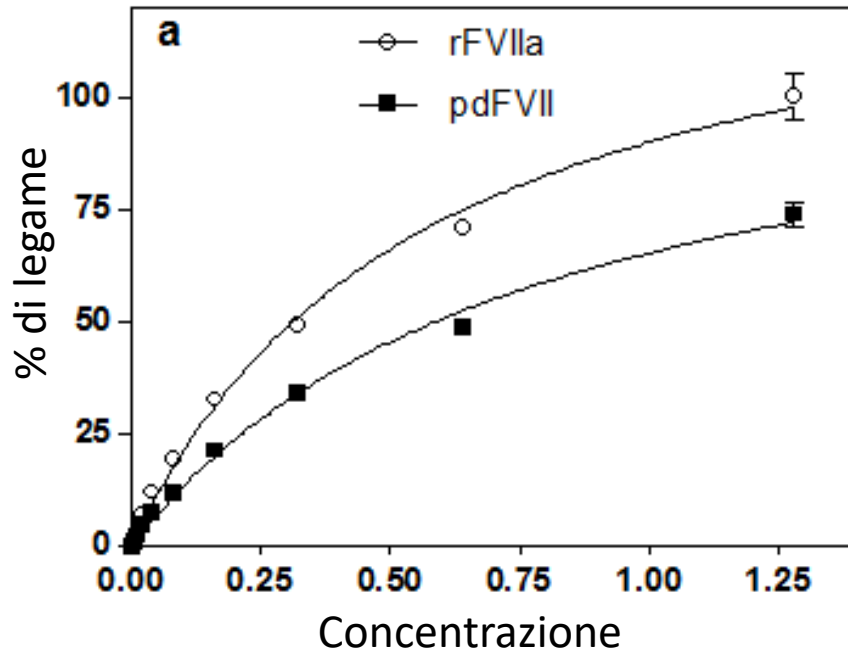


Competition assay

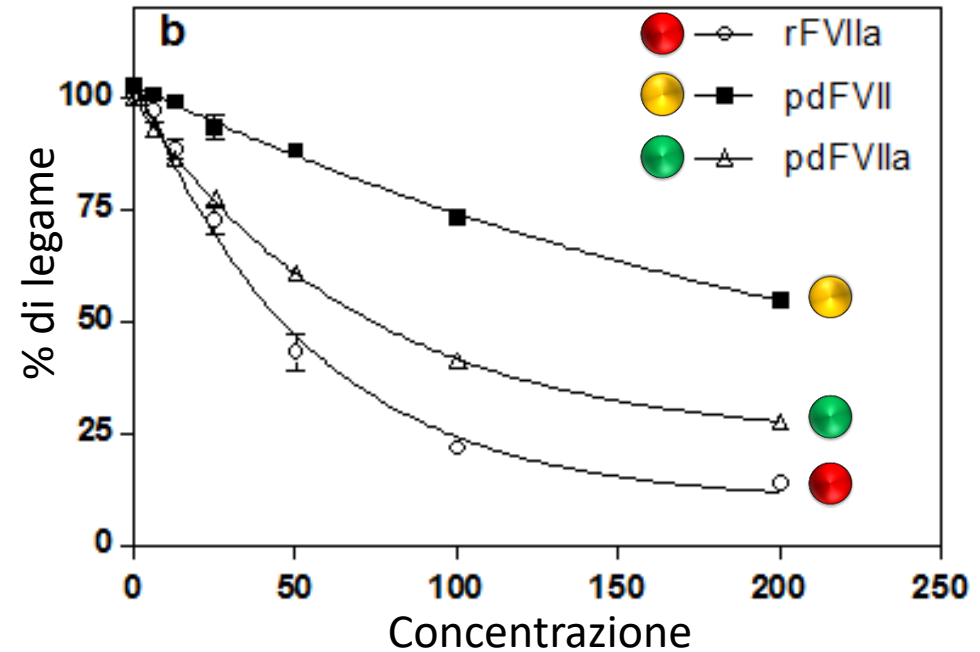


Esempio reale di saggio di competizione

Binding assay

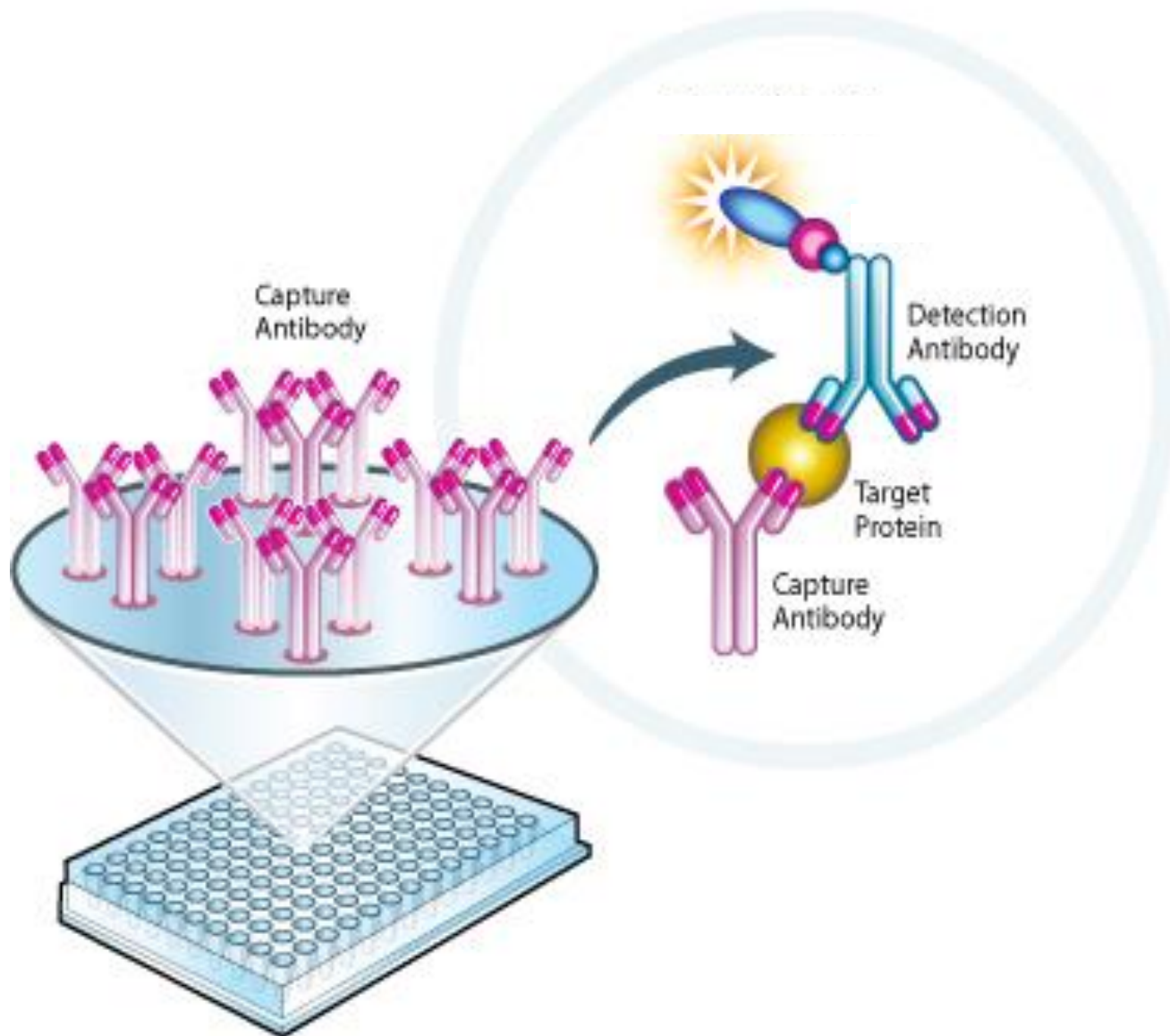


Competition assay

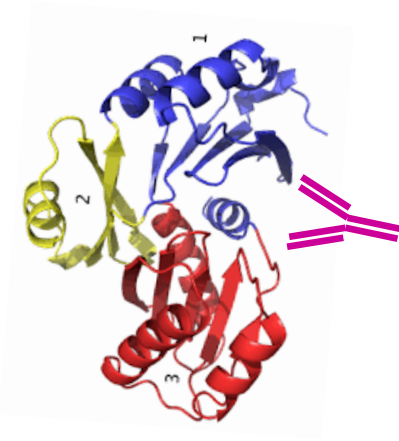


Chi è il miglior competitore?

ALTRE APPLICAZIONI DELLA TECNICA E.L.I.S.A.



Lo scopo di qualunque
E.L.I.S.A. è **quantificare** con
precisione un antigene



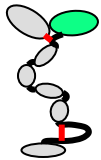
Usi alternativi:

- Studi di conformazione
- Studi di legame

STUDI DI CONFORMAZIONE MEDIANTE E.L.I.S.A.



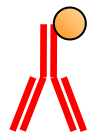
Ab monoclonale anti-dominio A



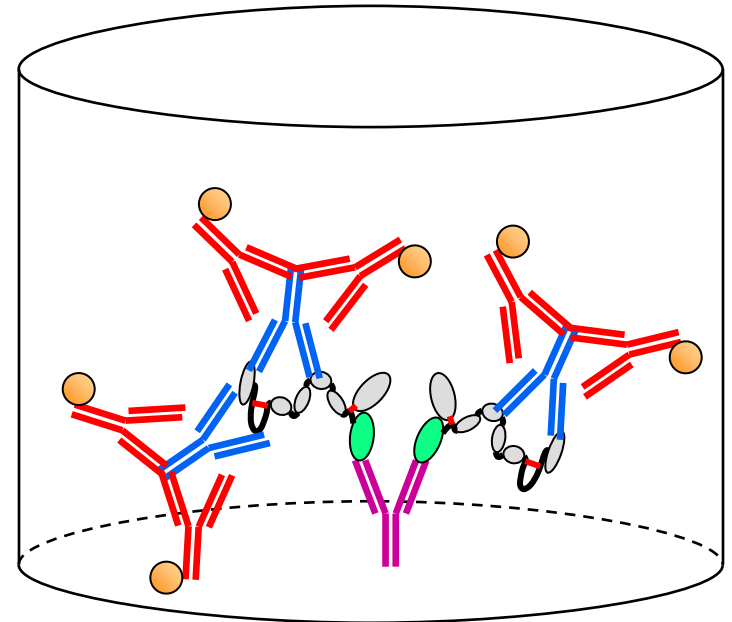
Proteina di interesse



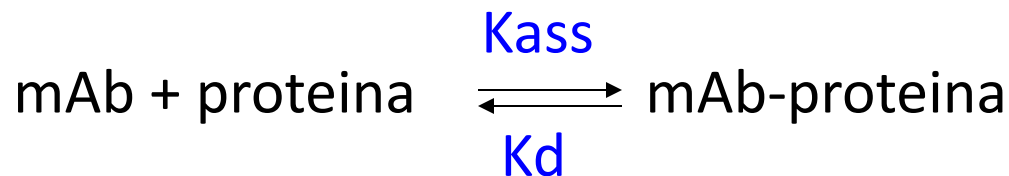
Ab mono/policonale anti-proteina d'interesse



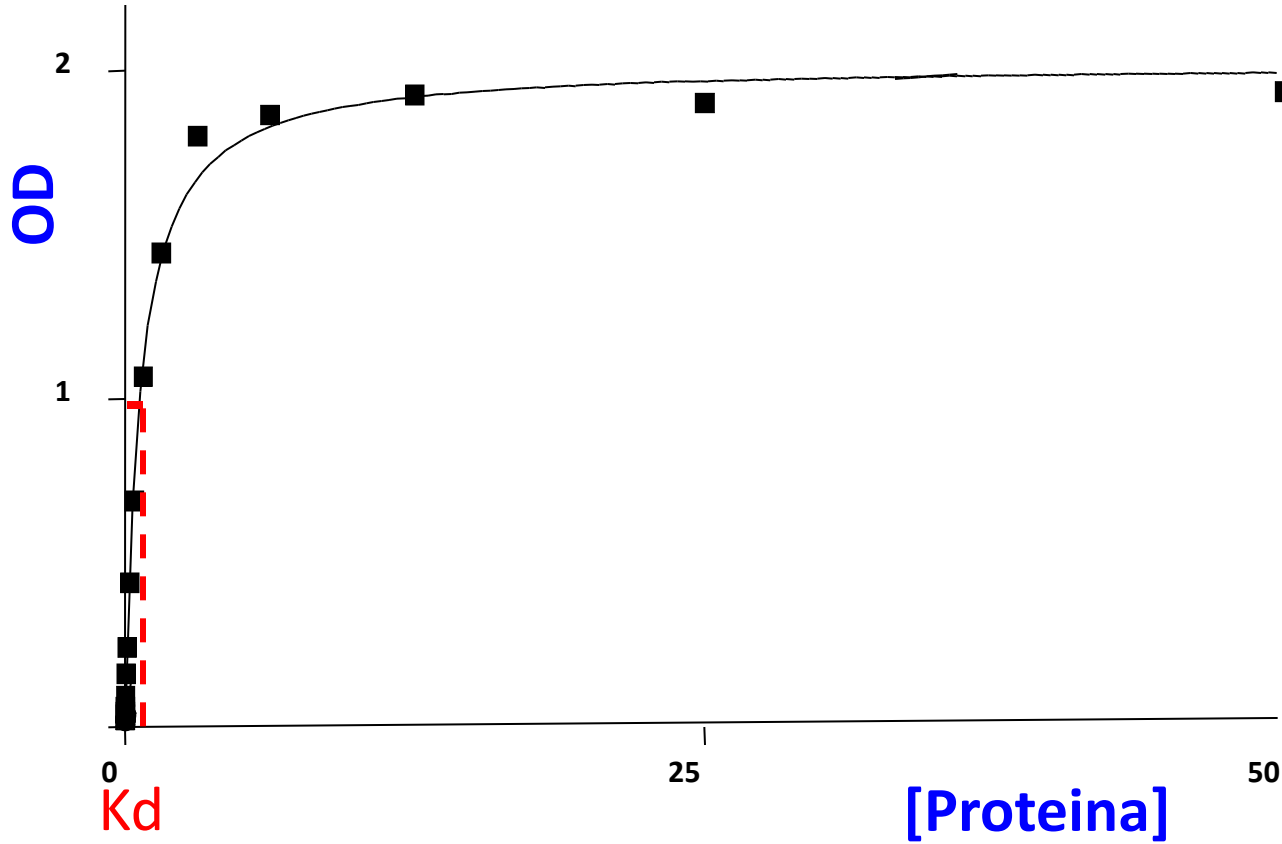
Ab policlonale anti-Ab coniugato con HRP






○ Dominio A wt
● Dominio A mut

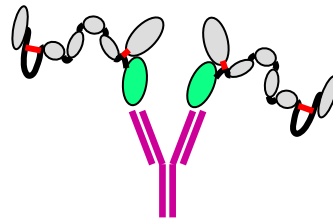


STUDI DI CONFORMAZIONE MEDIANTE E.L.I.S.A.

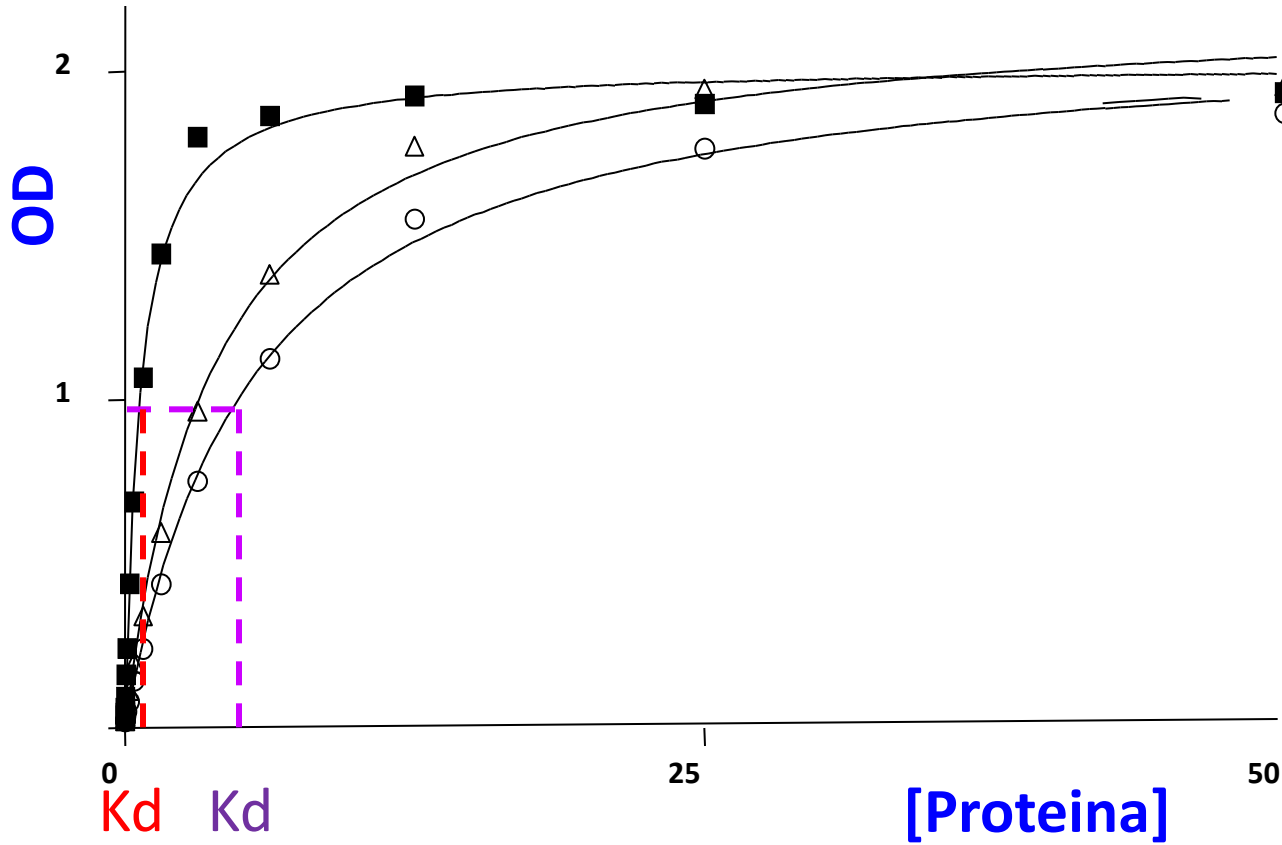


- Proteina wt 
- △ Mutante A 
- Mutante B 

Varianti di una proteina di interesse

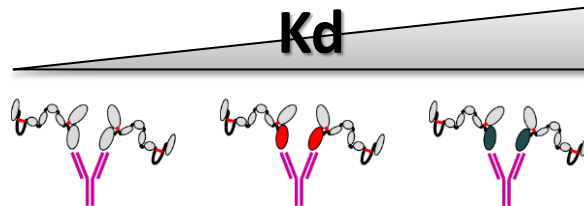


STUDI DI CONFORMAZIONE MEDIANTE E.L.I.S.A.



Kd **Kd**
Wt **Mutante B**

Costanti di
dissociazione

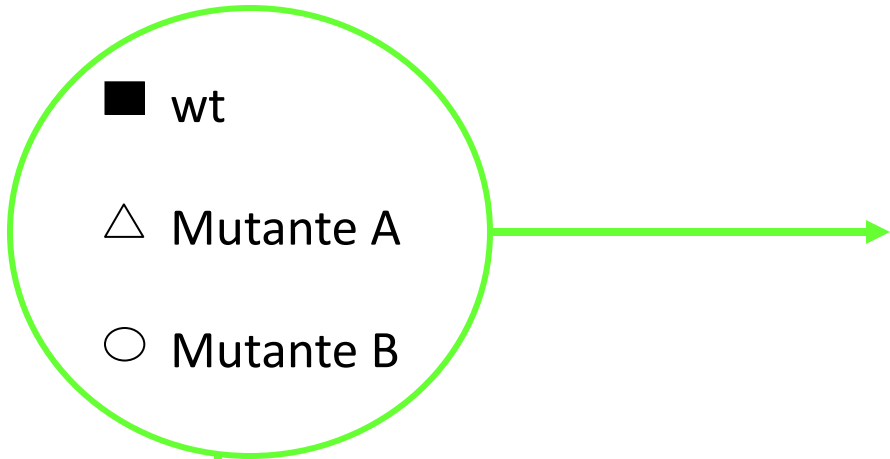


- Proteina wt ○
- △ Mutante A ●
- Mutante B ●

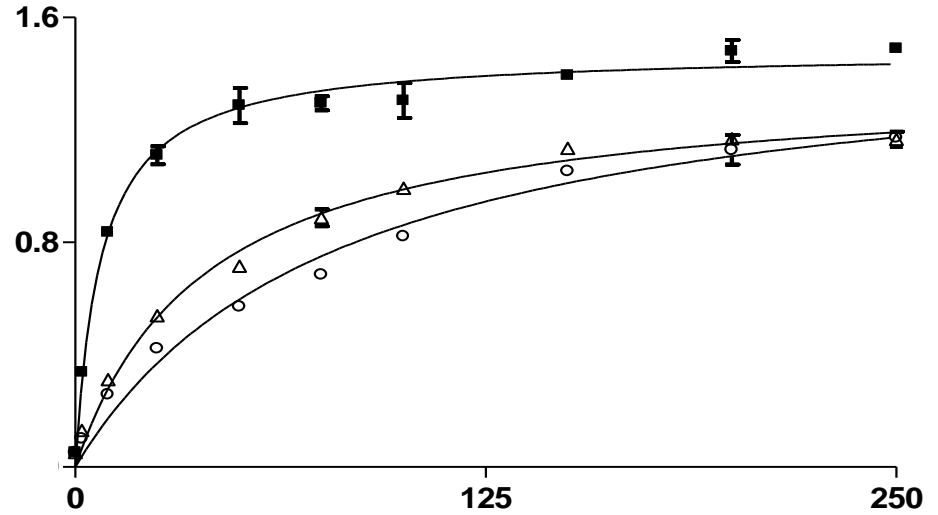
↑
Varianti di una
proteina di
interesse

STUDI DI LEGAME MEDIANTE E.L.I.S.A.

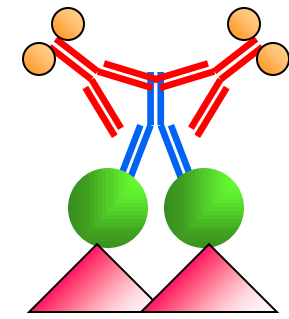
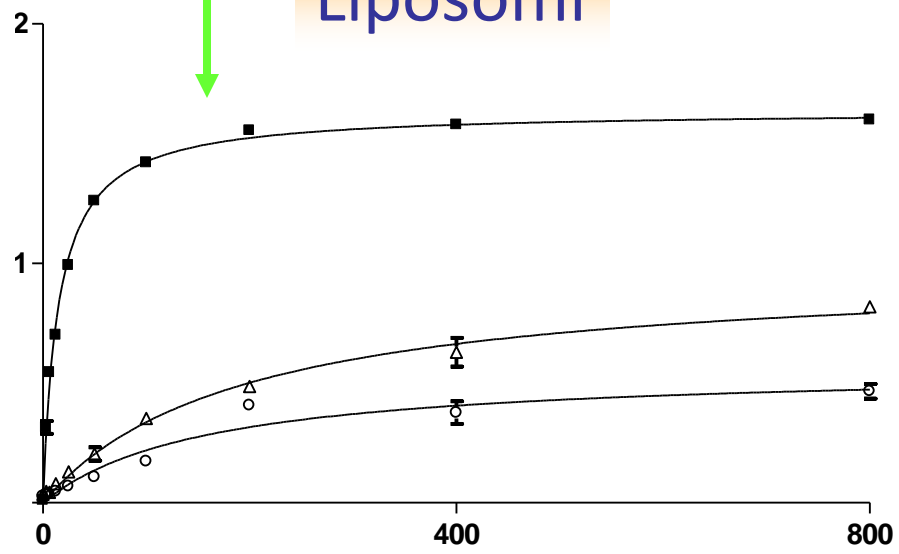
Proteina di interesse:



Recettore



Liposomi



Proteina di interesse

Molecola che lega la proteina di interesse