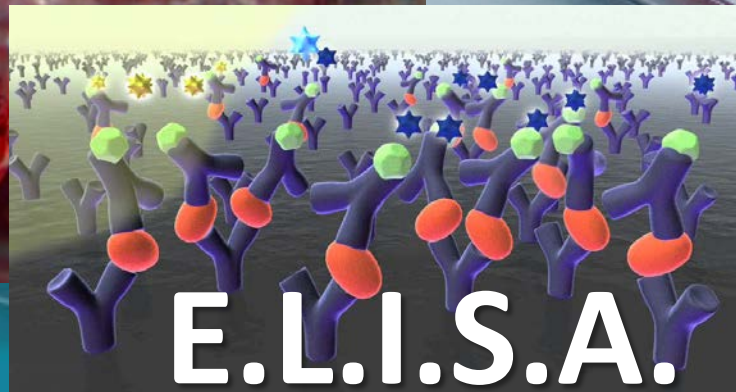
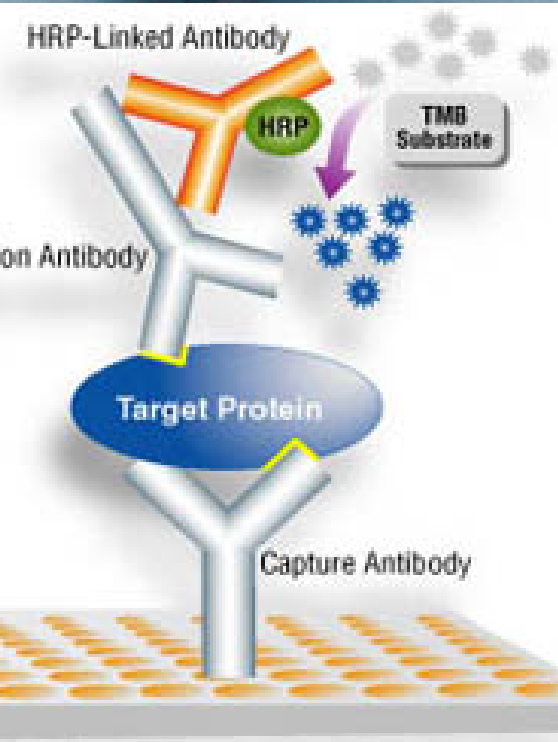


# IMMUNODOSAGGI o DOSAGGI IMMUNOLOGICI



## E.L.I.S.A.



# Alcune applicazioni degli anticorpi in ricerca (tecniche immunochimiche)

## Scopo sperimentale:

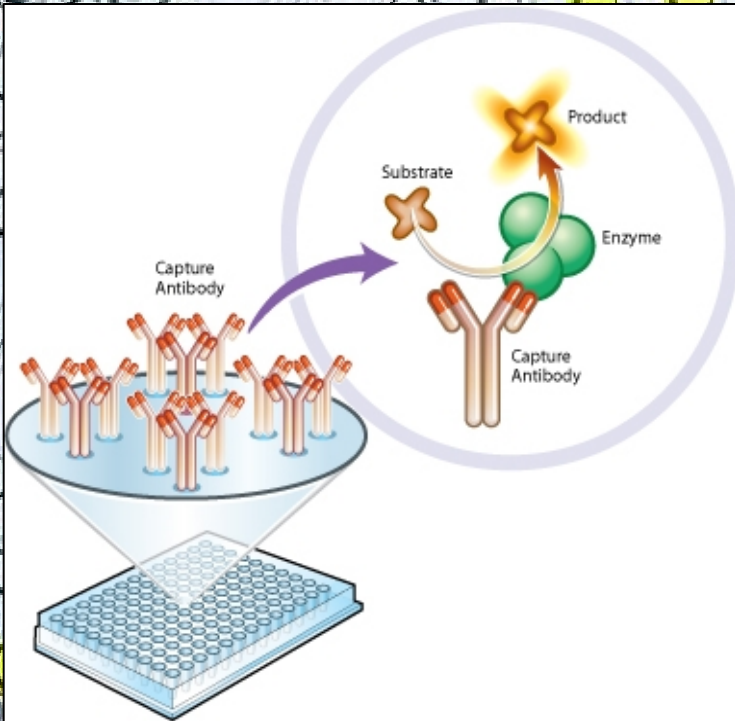
- ❑ **IDENTIFICARE** un determinato antigene (tecnica **QUALITATIVA**)
- ❑ **QUANTIFICARE** un determinato antigene (tecnica **QUANTITATIVA**)

## **Approccio** sperimentale:

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

# ELISA

## Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay



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

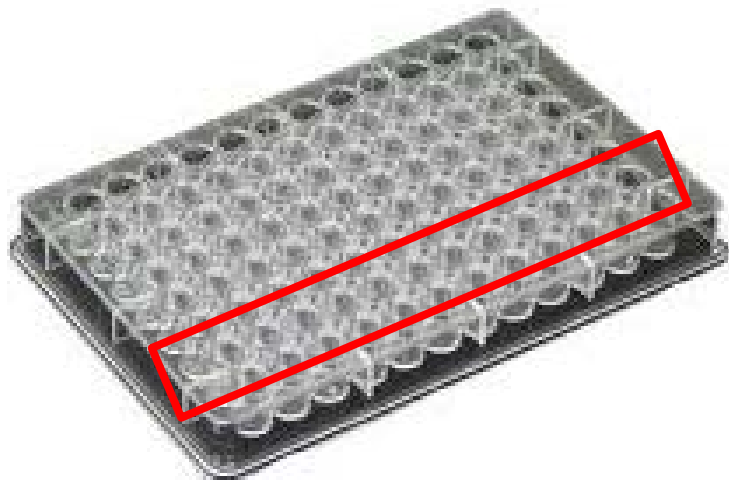
# ELISA

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

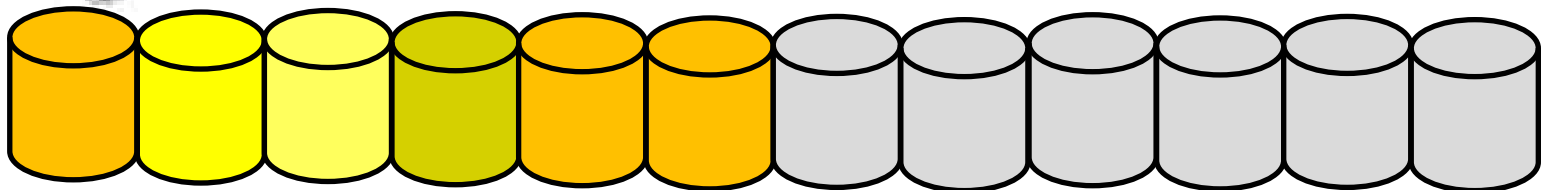
# ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

Tecnica immunochimica **QUANTITATIVA** che consente di determinare la **concentrazione** di un antigene (**quantificare**)

Eseguita in piastre costituite da pozzetti all'interno dei quali avvengono le reazioni di **interazione antigene-anticorpo**

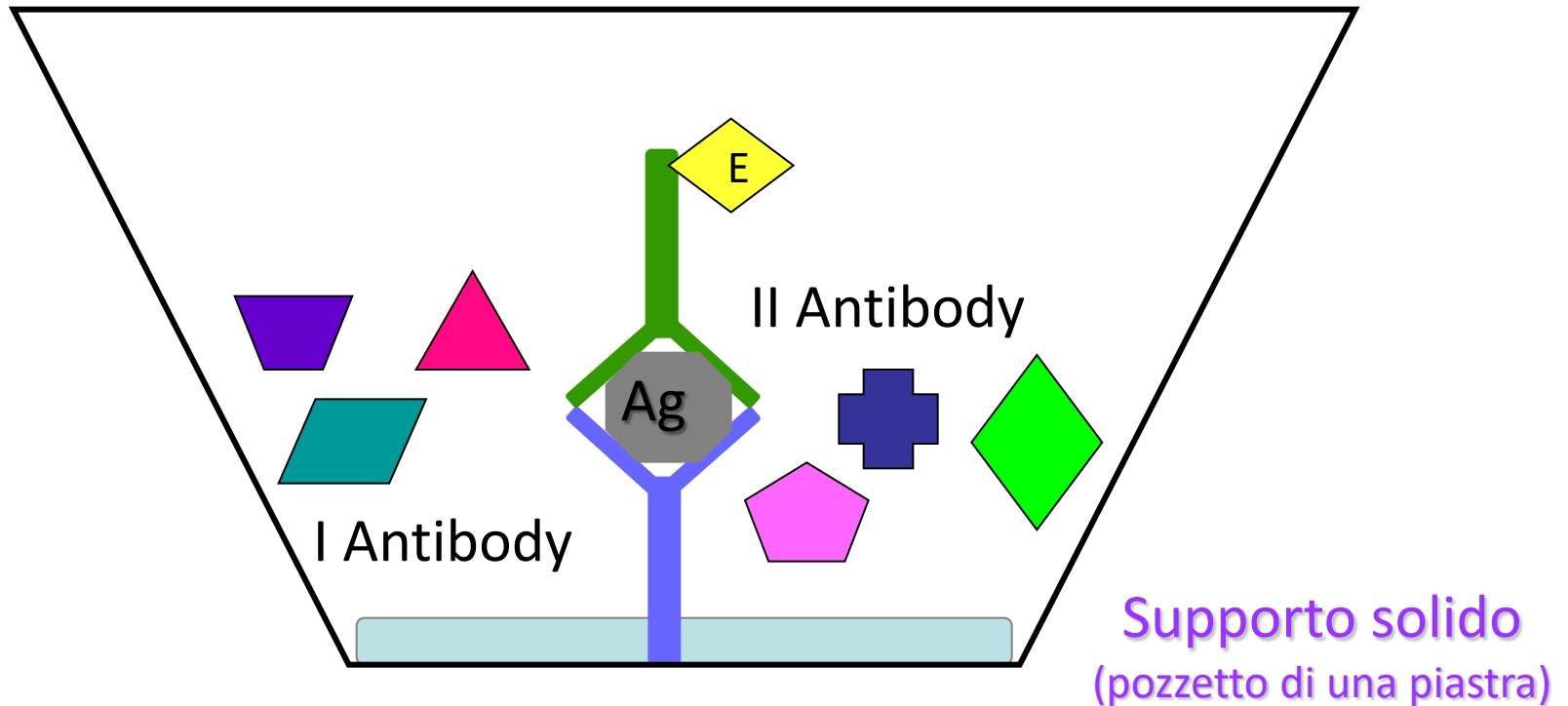


Il segnale generato viene letto tramite uno **spettrofotometro** e i risultati vengono elaborati e interpretati utilizzando come riferimento una **curva di taratura**



# ELISA SANDWICH

Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

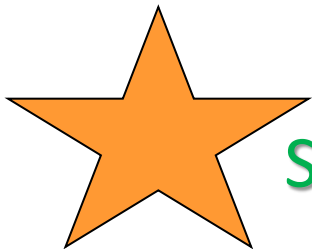
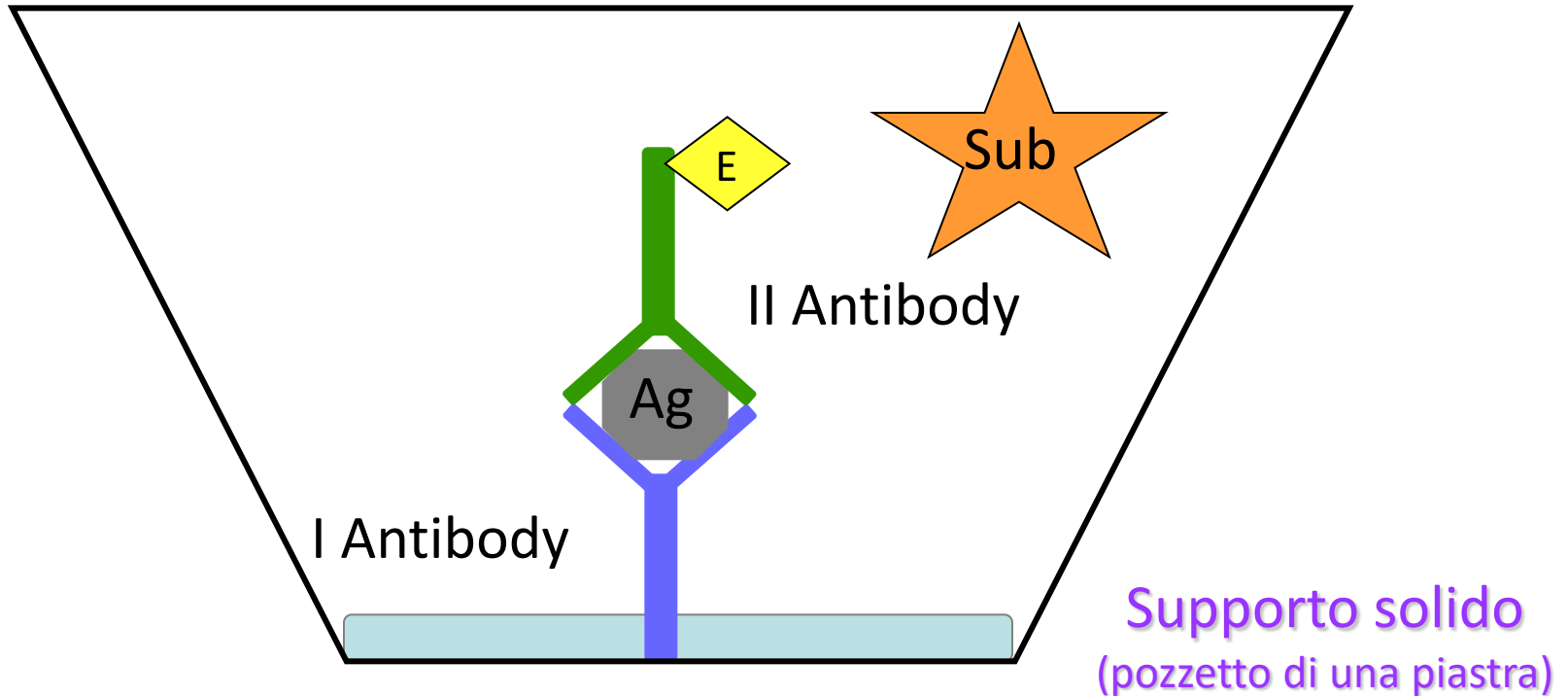


Il 1° Ab lega le molecole di Ag presenti nel campione.

Il 2° Ab è coniugato con un enzima.

# ELISA SANDWICH

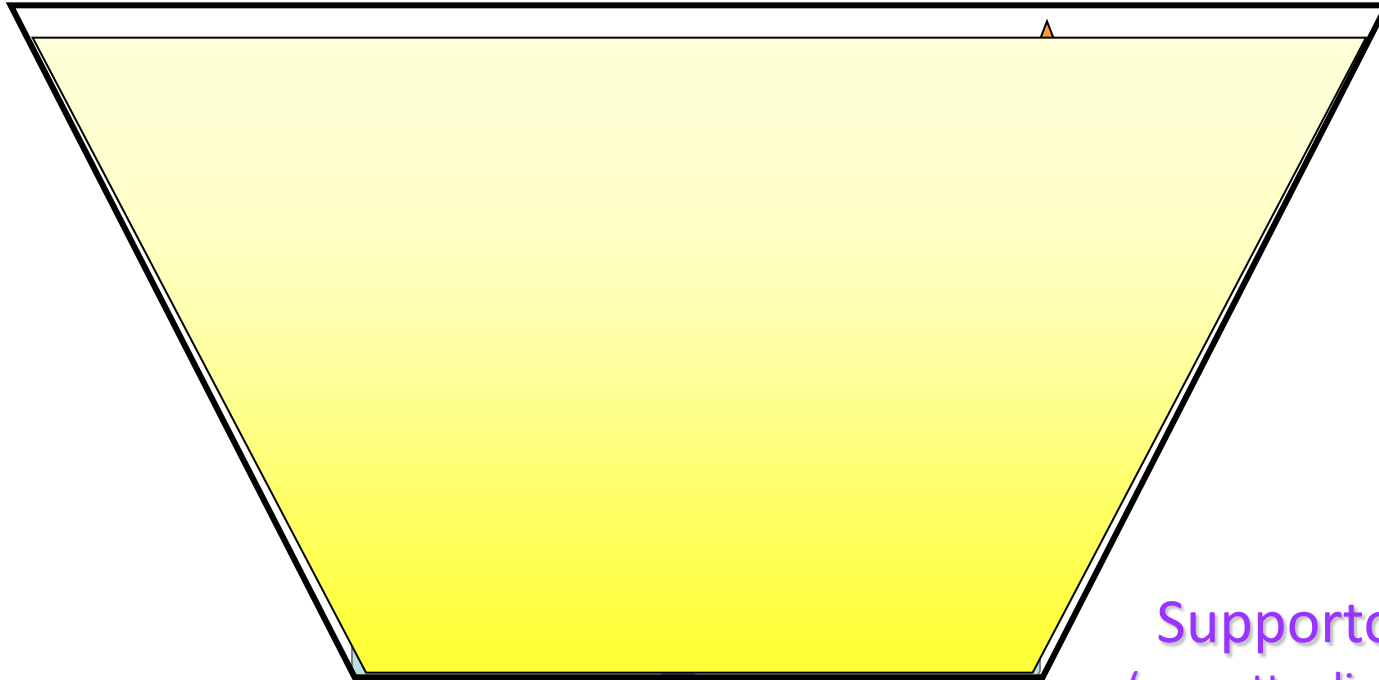
Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay



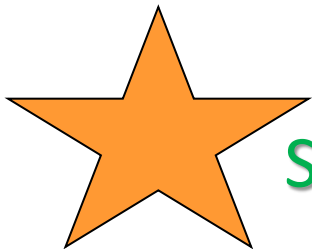
**Substrato: molecola cromogenica**

# ELISA SANDWICH

Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay



Supporto solido  
(pozzetto di una piastra)

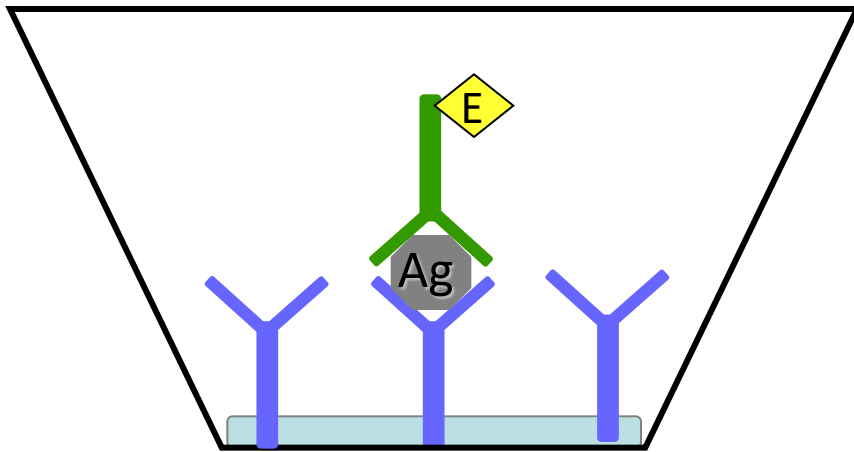


Substrato: molecola cromogenica

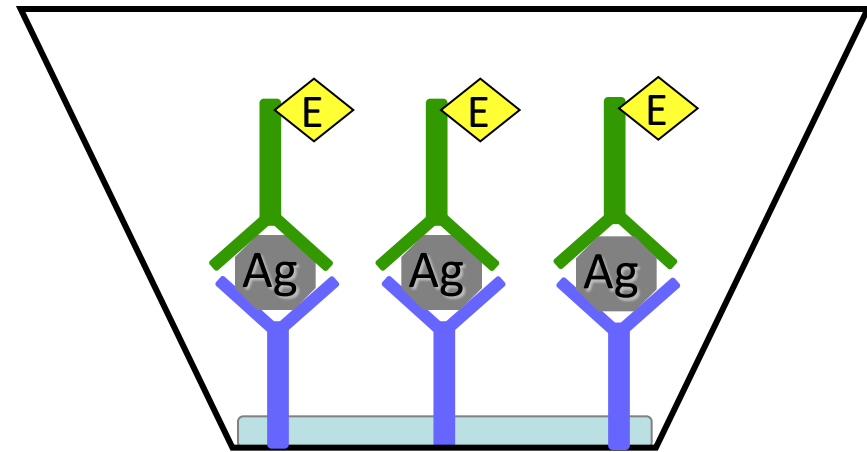


# PROPORZIONALITÀ DEL COLORE

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



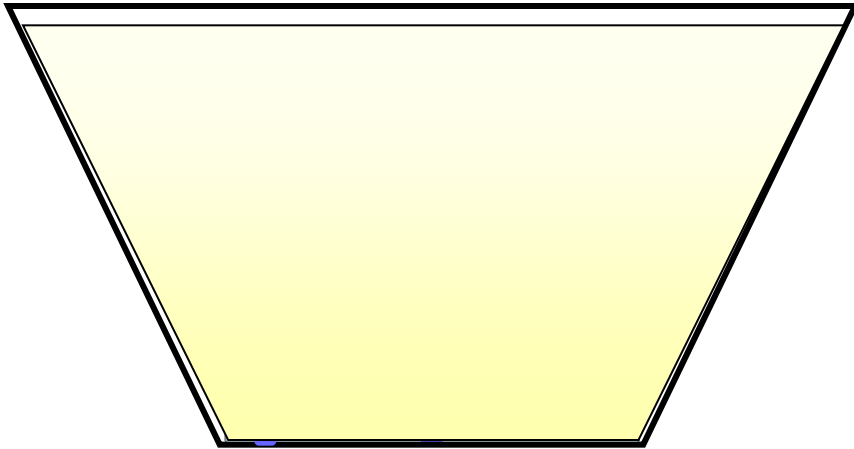
Caso A



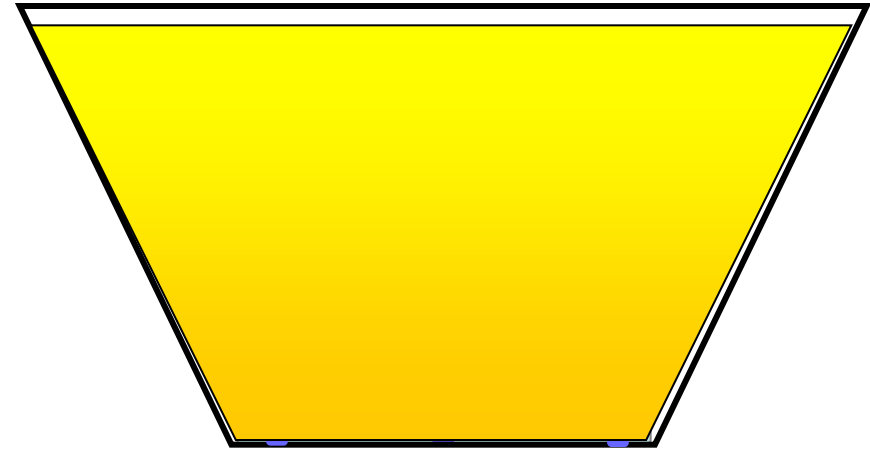
Caso B

# 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



# 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

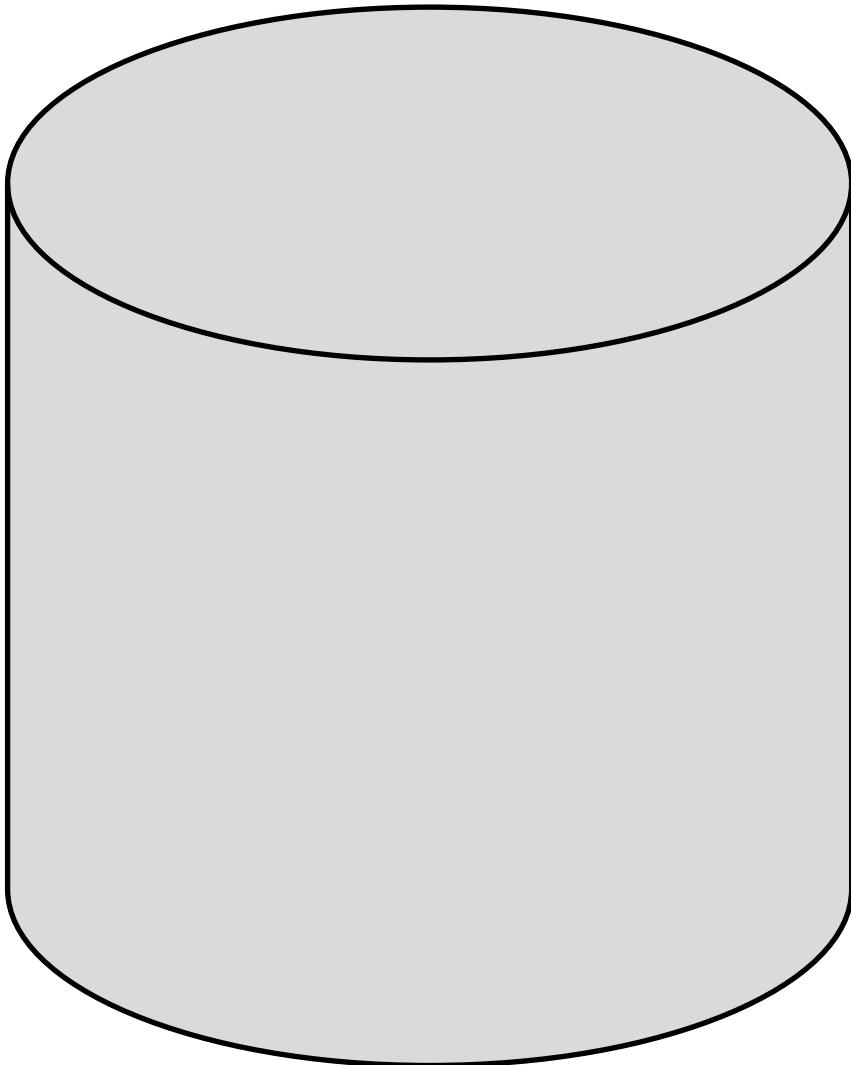


Proper position of manual washer needles for aspirating liquid

Possibilità di effettuarli anche in modo automatizzato

# Saggio ELISA - Fasi sperimentali

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



Anticorpo secondario  
marcato



Antigene



Proteina bloccante



Anticorpo immobilizzato

# Piastra



## Fondo piatto (90°)

Classici, facilmente  
reperibili ed economici.

Recupero dei liquidi + facile.



## Fondo semisferico

Migliori lavaggi.

Superficie di adsorbimento  
omogenea.

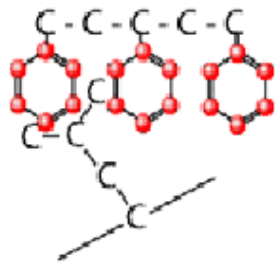


# Fase di legame alla piastra (coating)

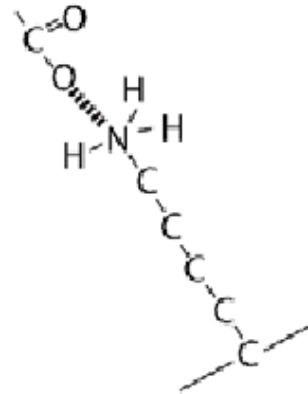
Procedimento che consente di immobilizzare gli anticorpi sul fondo dei pozzetti della piastra

## Forces Holding Proteins on a Plate

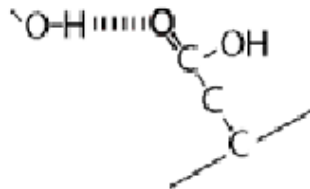
Hydrophobic Interaction



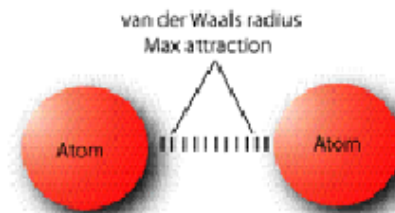
Ionic Interaction



Hydrogen Bonding

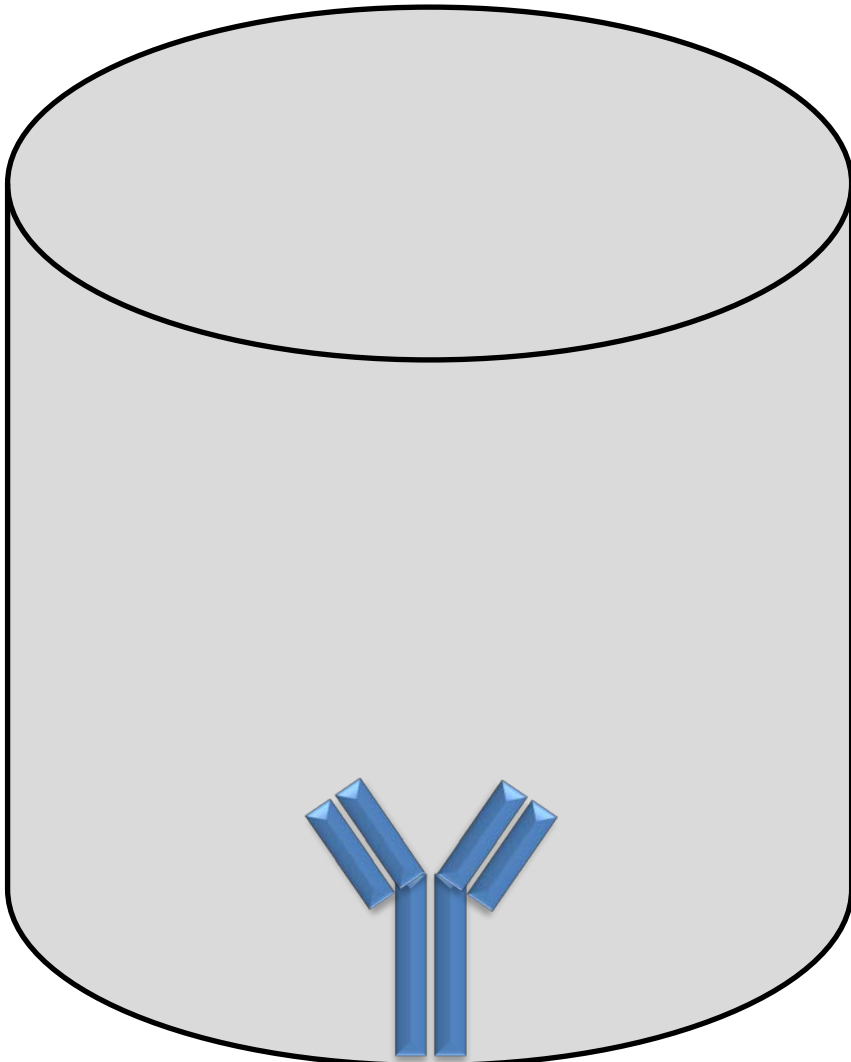


van der Waals Force



# Saggio ELISA - Fasi sperimentali

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



Anticorpo secondario  
marcato



Antigene



Proteina bloccante



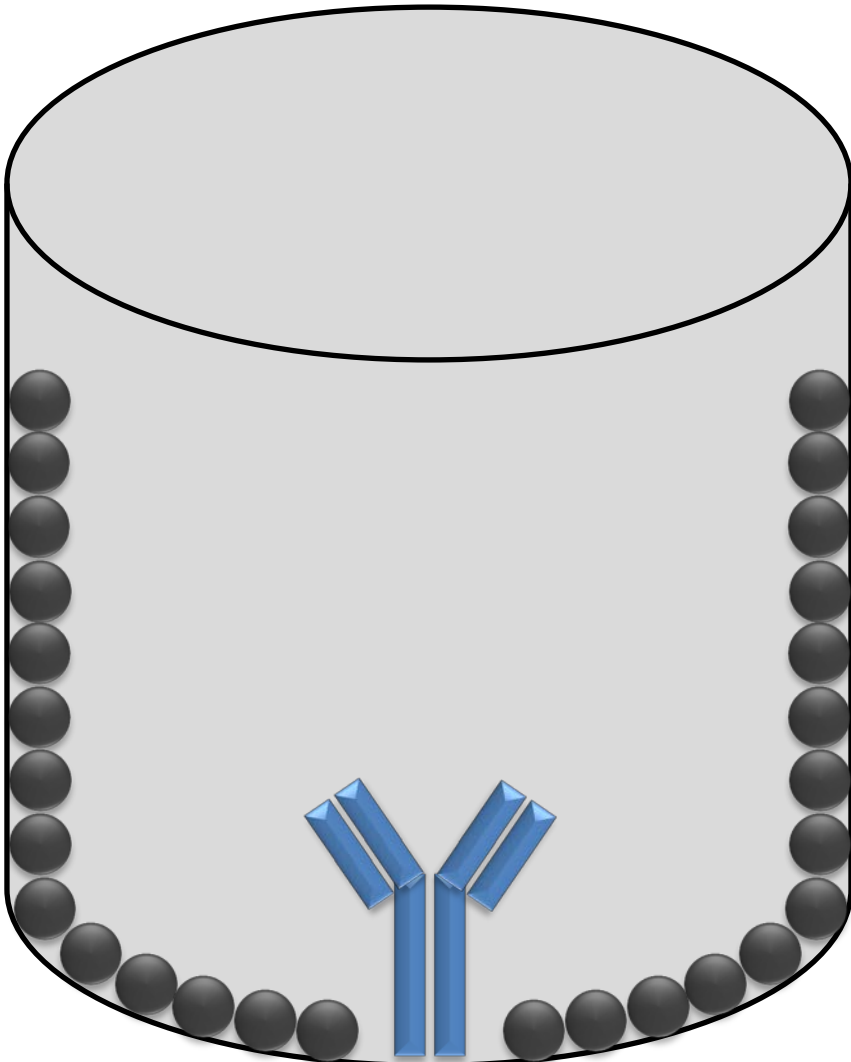
Anticorpo immobilizzato



# 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

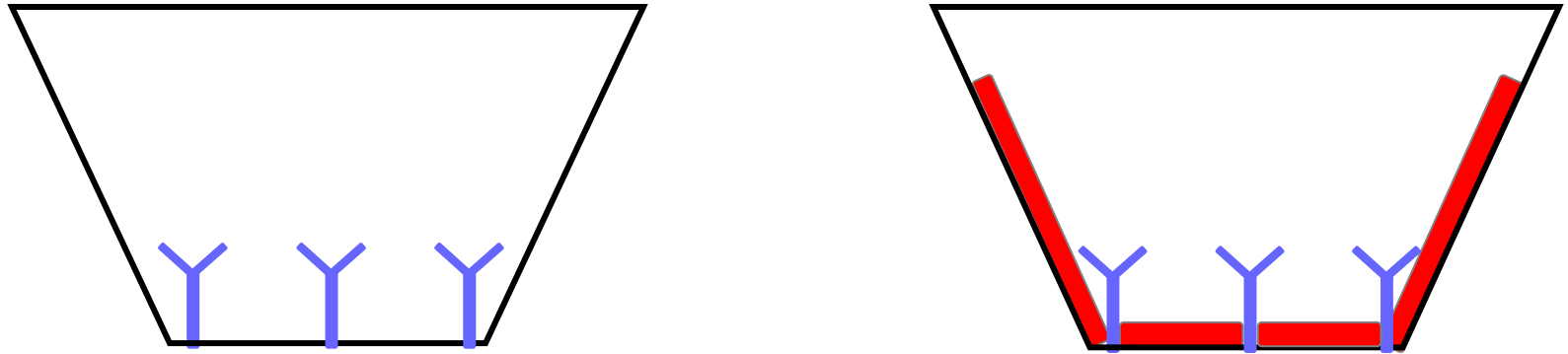


Anticorpo immobilizzato

# Blocking

FASE  
OBBLIGATORIA

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



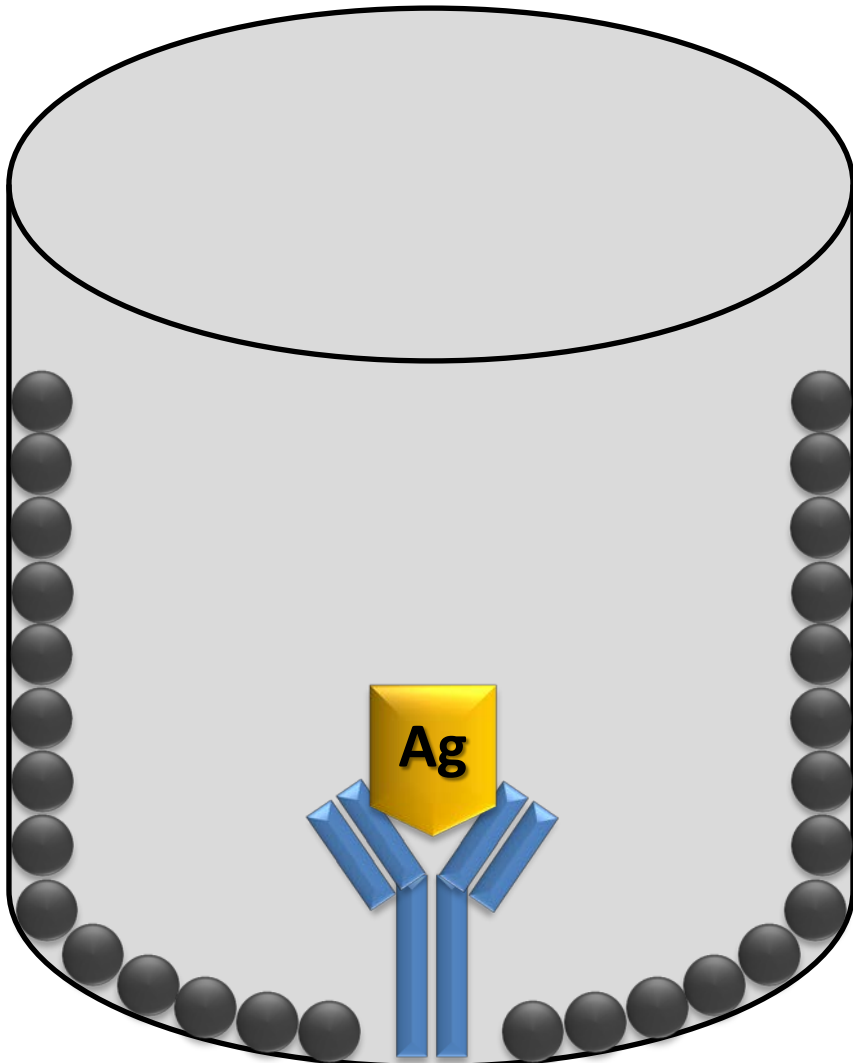
Ci sono **2 classi** di sostanze utilizzate:

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

# 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

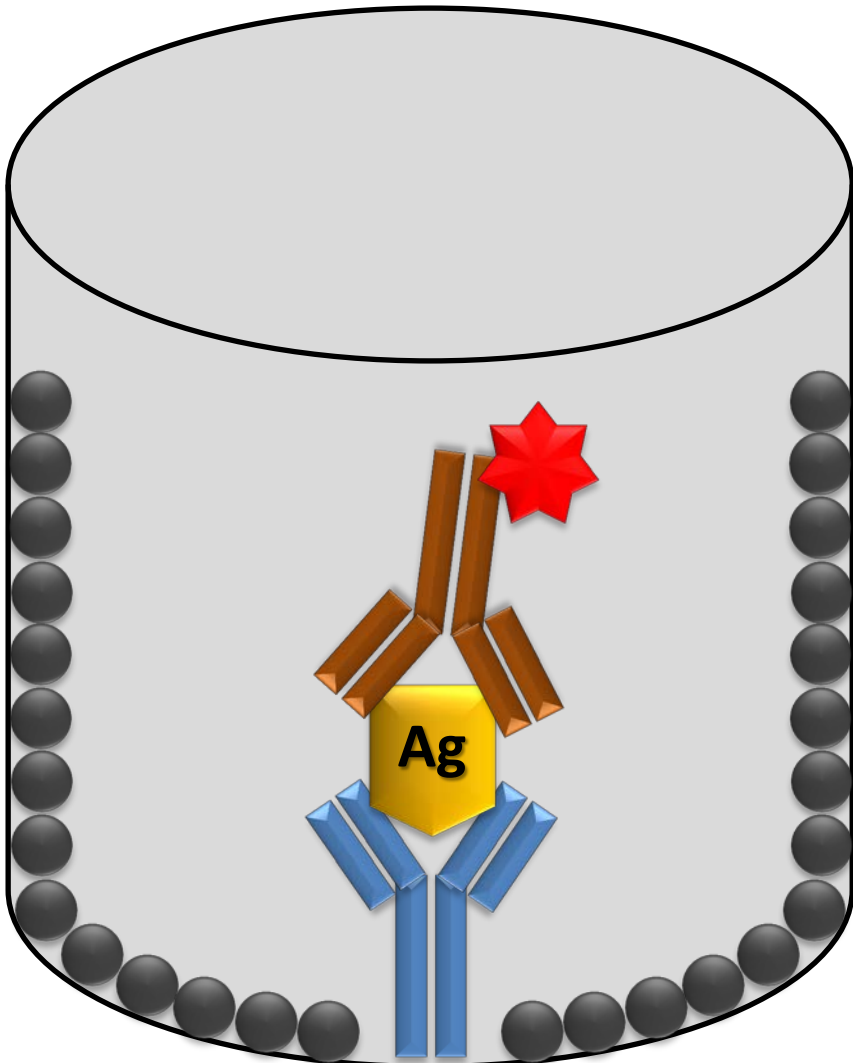


Anticorpo immobilizzato

## Saggio ELISA - Fasi sperimentali

4

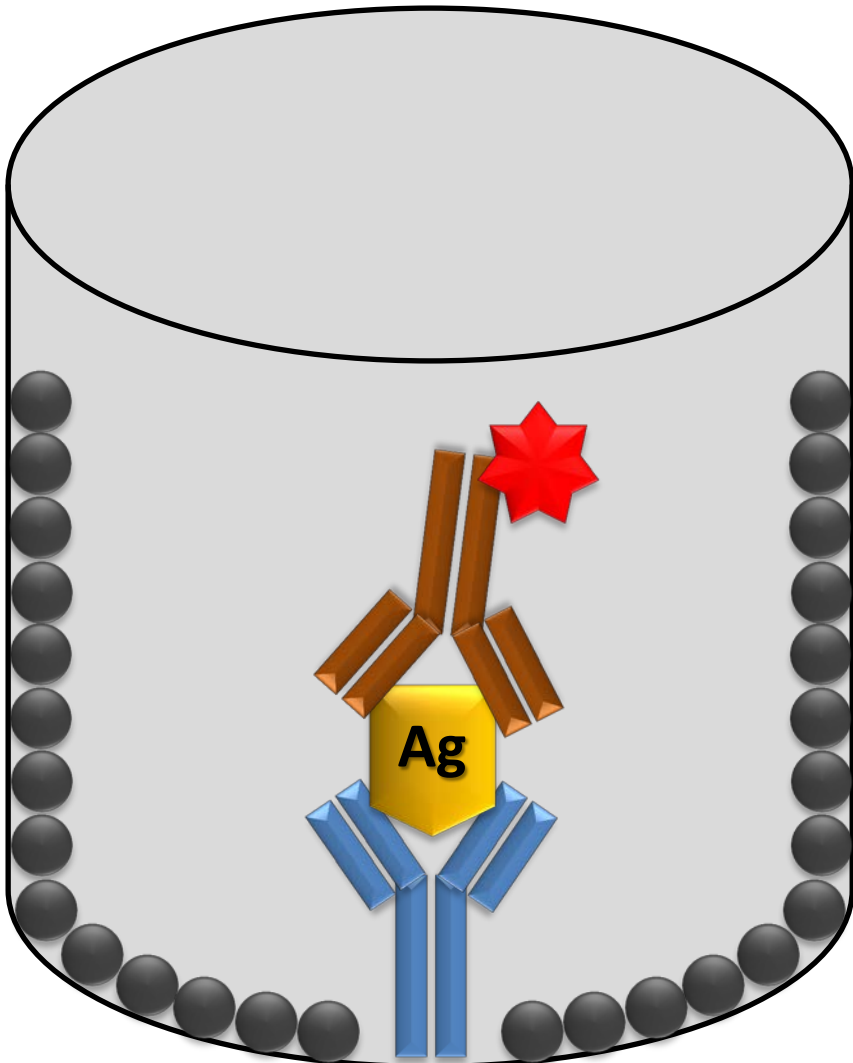
Aggiunta del secondo anticorpo che sull'antigene riconosce un epitopo DIVERSO da quello riconosciuto dal primo anticorpo



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

# Saggio ELISA - Fasi sperimentali

**Enzima = Anticorpo secondario = Antigene**



Anticorpo secondario  
marcato



Antigene

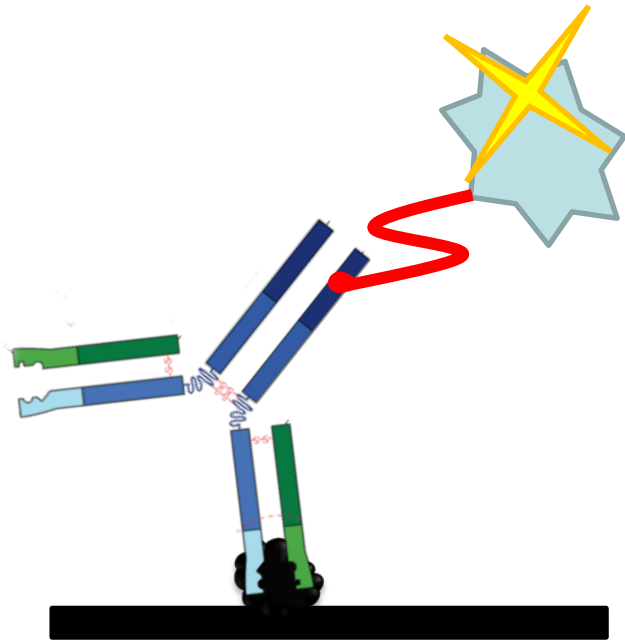


Proteina bloccante



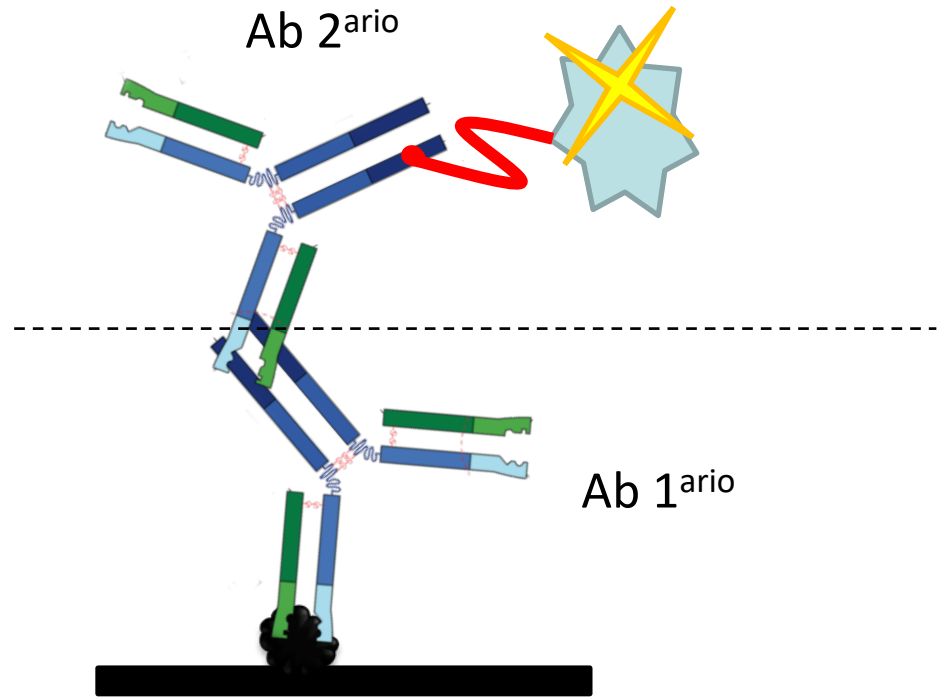
Anticorpo immobilizzato

# IL RICONOSCIMENTO MEDIANTE Ab PUÒ ESSERE DIRETTO O INDIRETTO



## Riconoscimento diretto

L'epitopo è riconosciuto da un solo anticorpo direttamente coniugato con il sistema di rilevazione

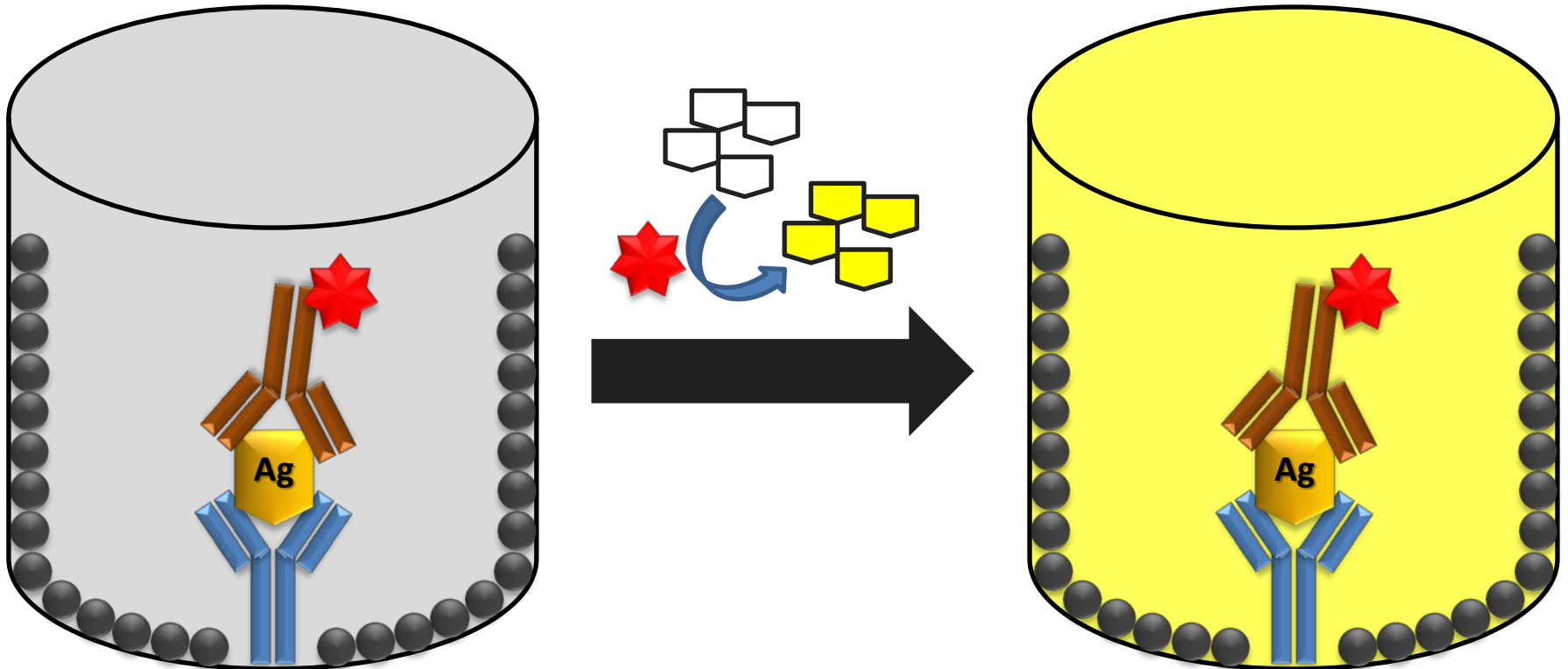


## Riconoscimento indiretto

Il riconoscimento avviene mediante due anticorpi. L'epitopo è riconosciuto da un primo anticorpo, a sua volta riconosciuto e legato dal secondo anticorpo coniugato con il sistema di rilevazione

## 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**

# Enzimi e Substrati

## FOSFATASI ALCALINA

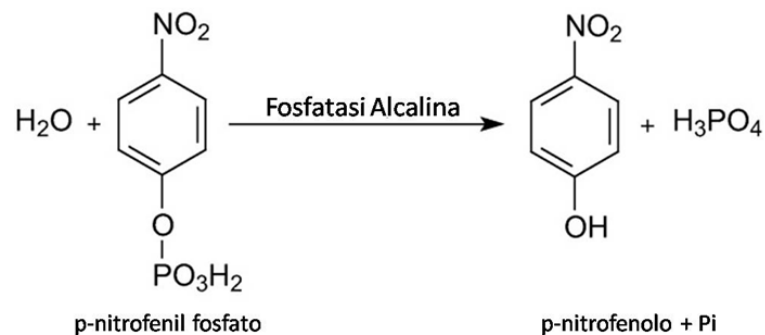
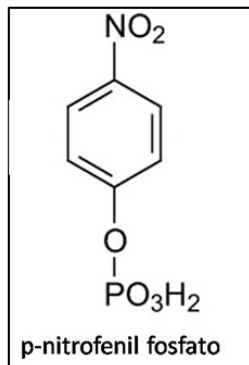
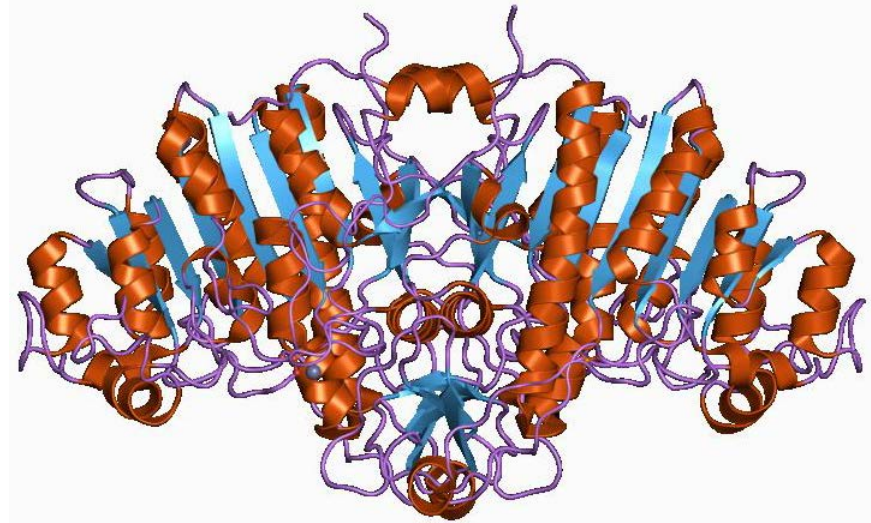
Metalloenzima contenente  
2 atomi di zinco e 1 di magnesio.

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

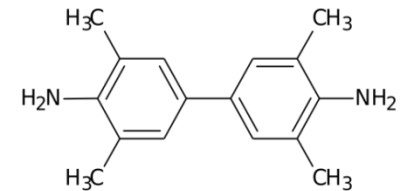
## PEROSSIDASI

Horseradish peroxidase (**HRP**), enzima di 44 KDa. Catalizza l'ossidazione di un substrato in presenza di  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

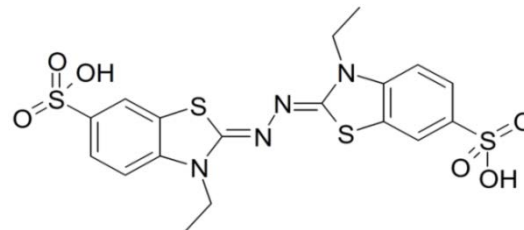
**Substrati:** Fenoli aromatici o ammine.



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

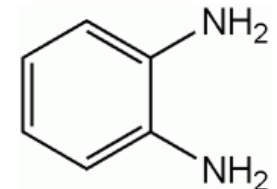


**TMB:** 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina

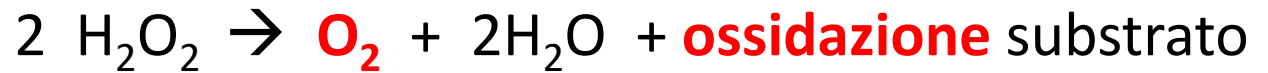
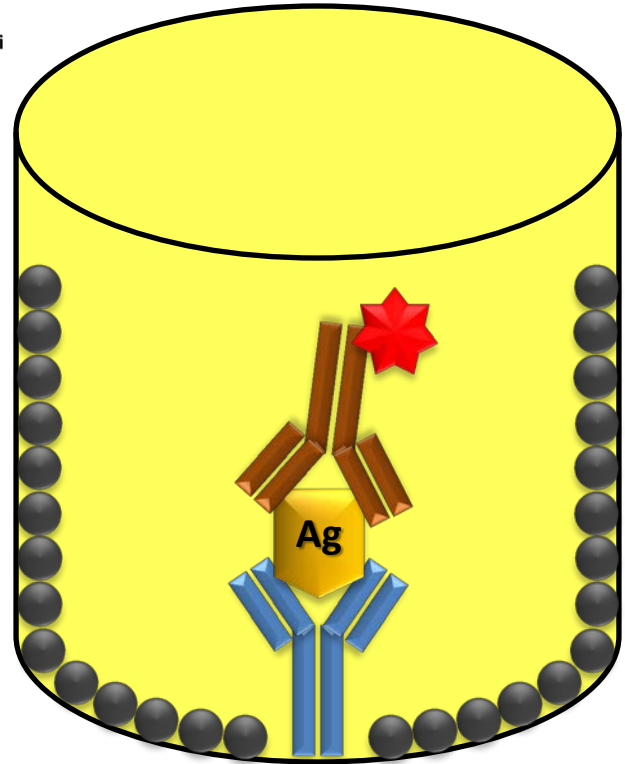
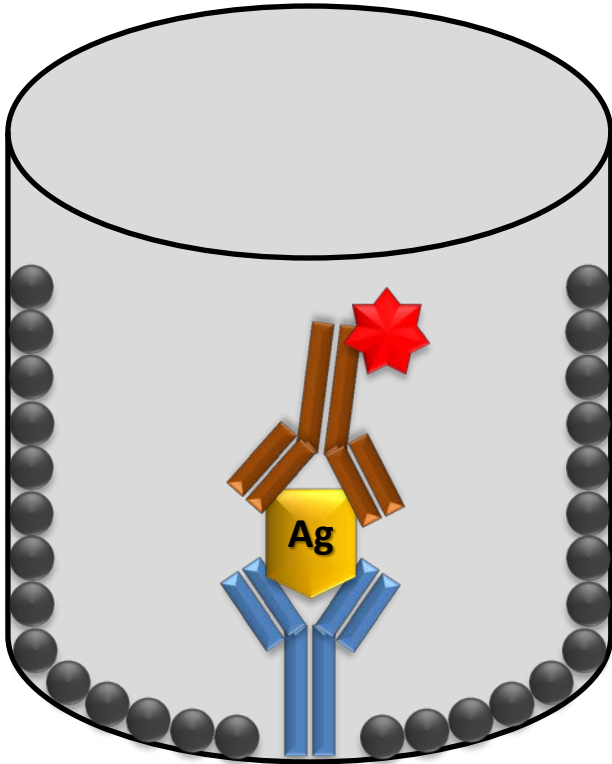
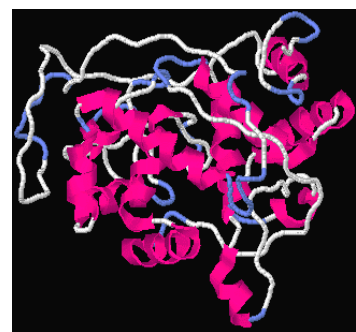
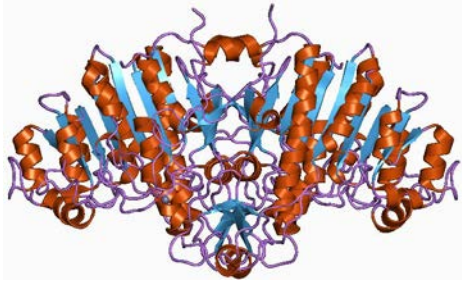
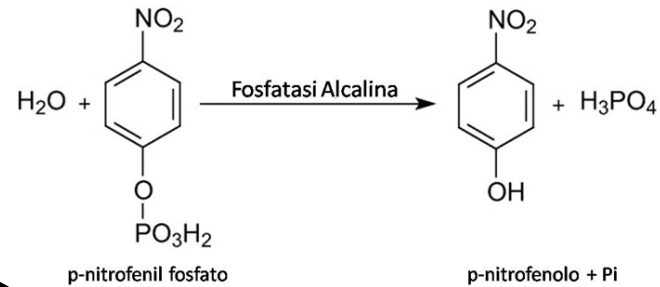


**OPD:** o-phenylenediamine. (Cancerogena).

Massima assorbanza a 450 nm.



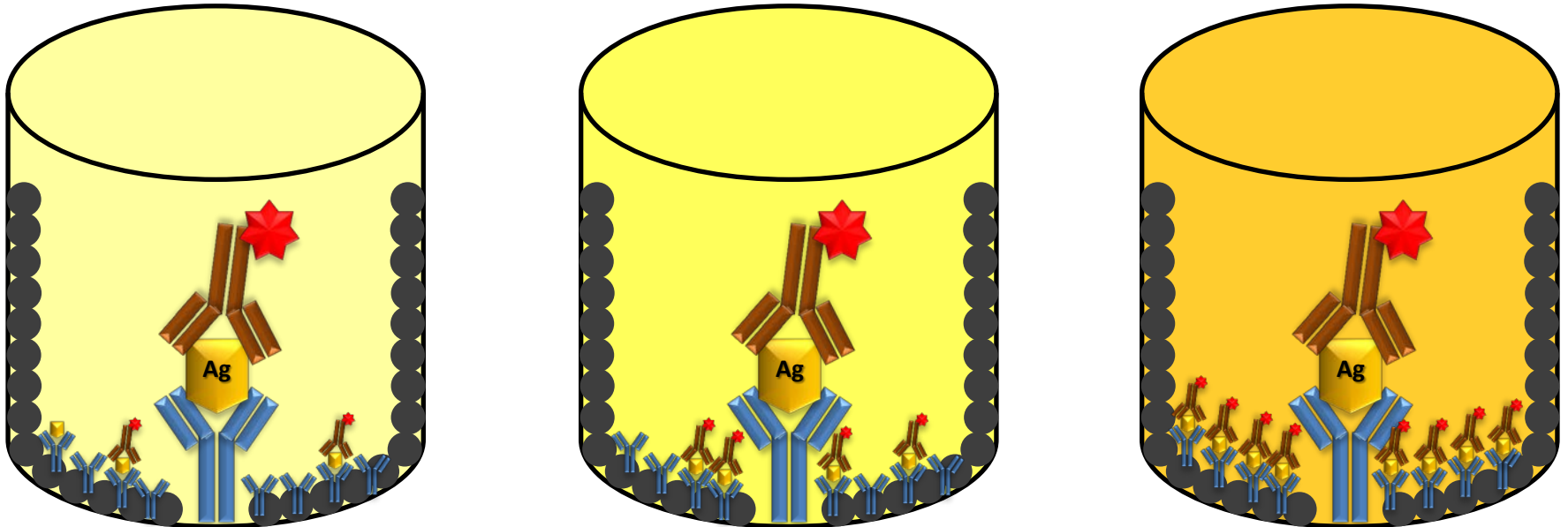
# Enzimi e Substrati - Aggiunta del **substrato**



# Saggio ELISA - Fasi sperimentali

5

Blocco della reazione con acido forte

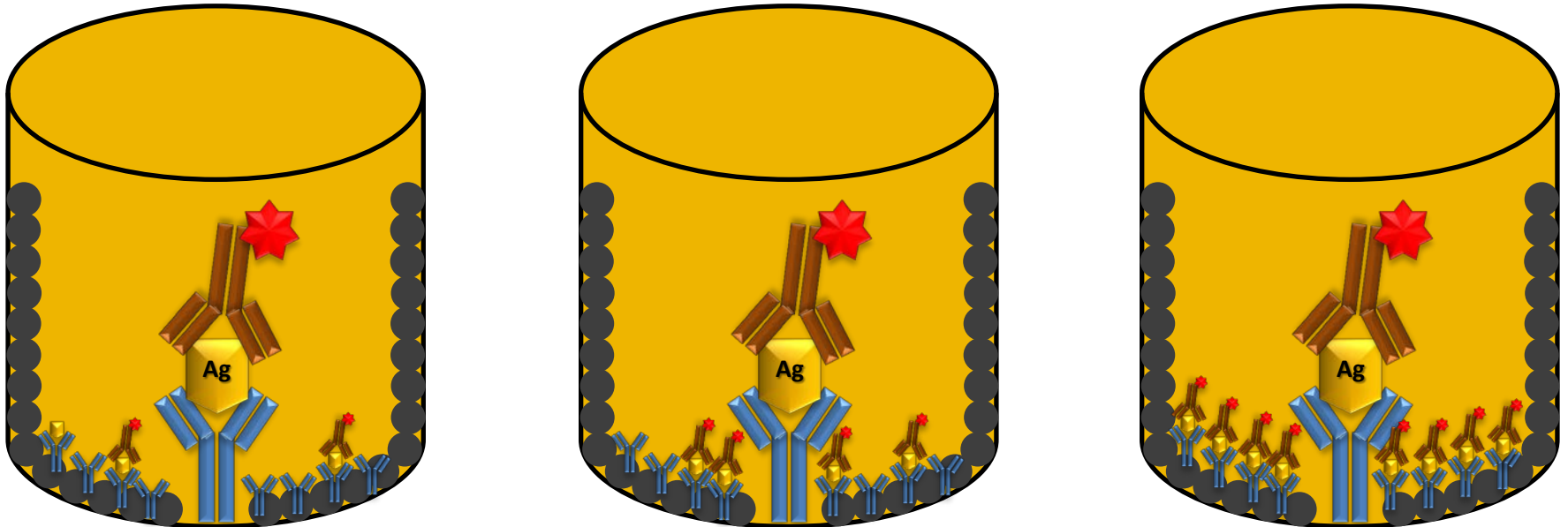


Concentrazione Antigene

## Saggio ELISA - Fasi sperimentali

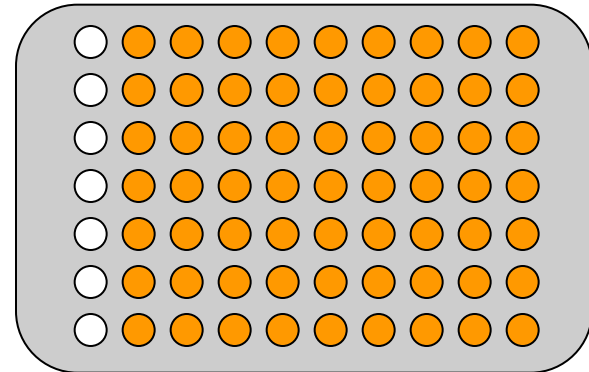
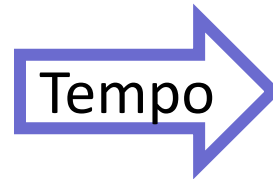
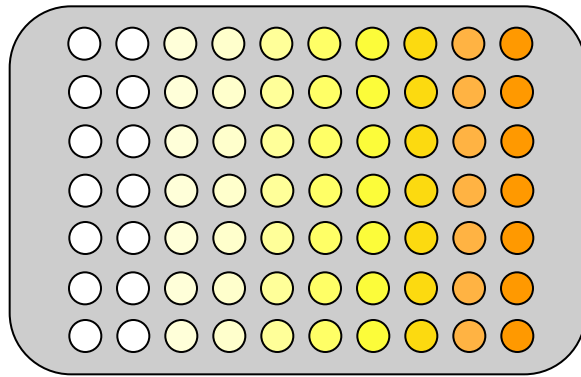
5

**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

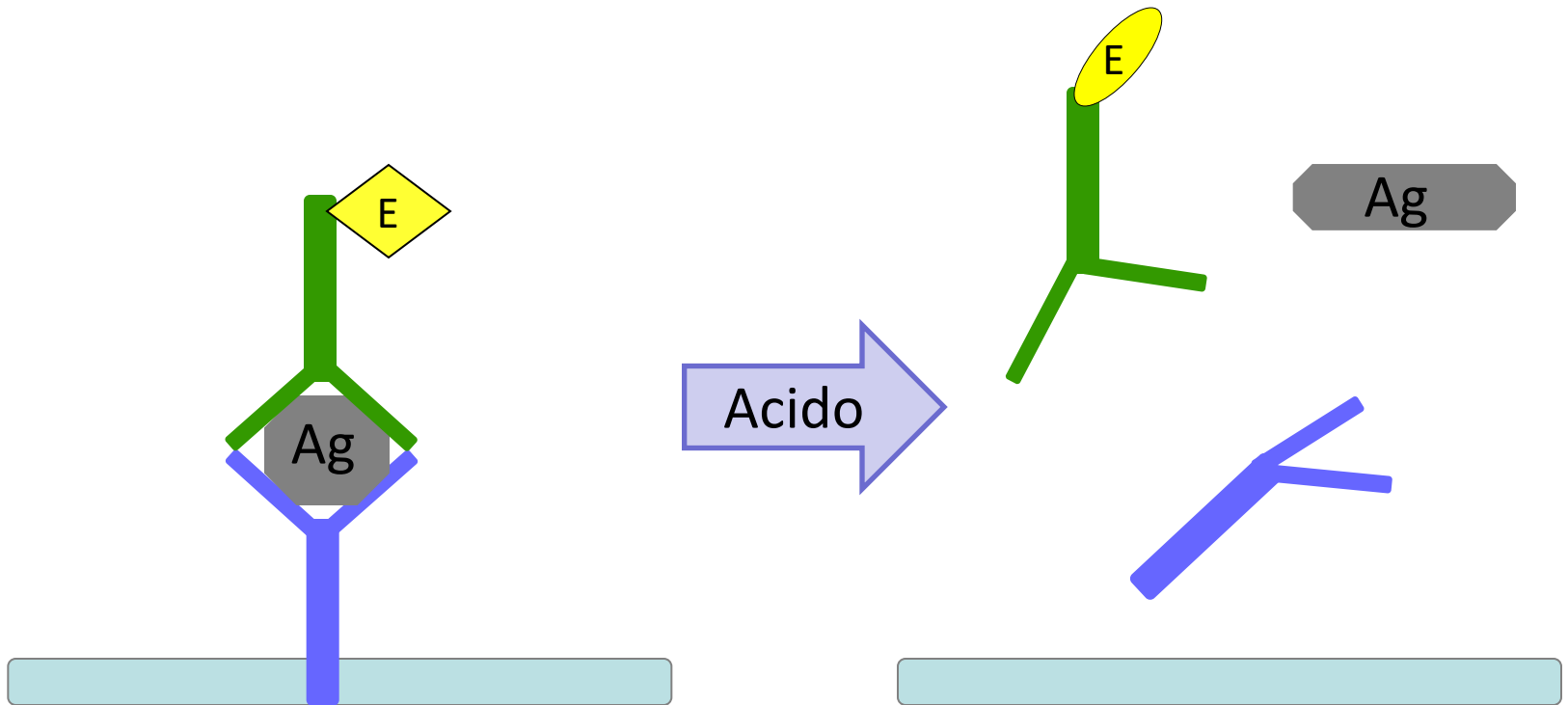
# IMPORTANZA DELLO STOP!



Micropiastra  
(96 pozzetti)

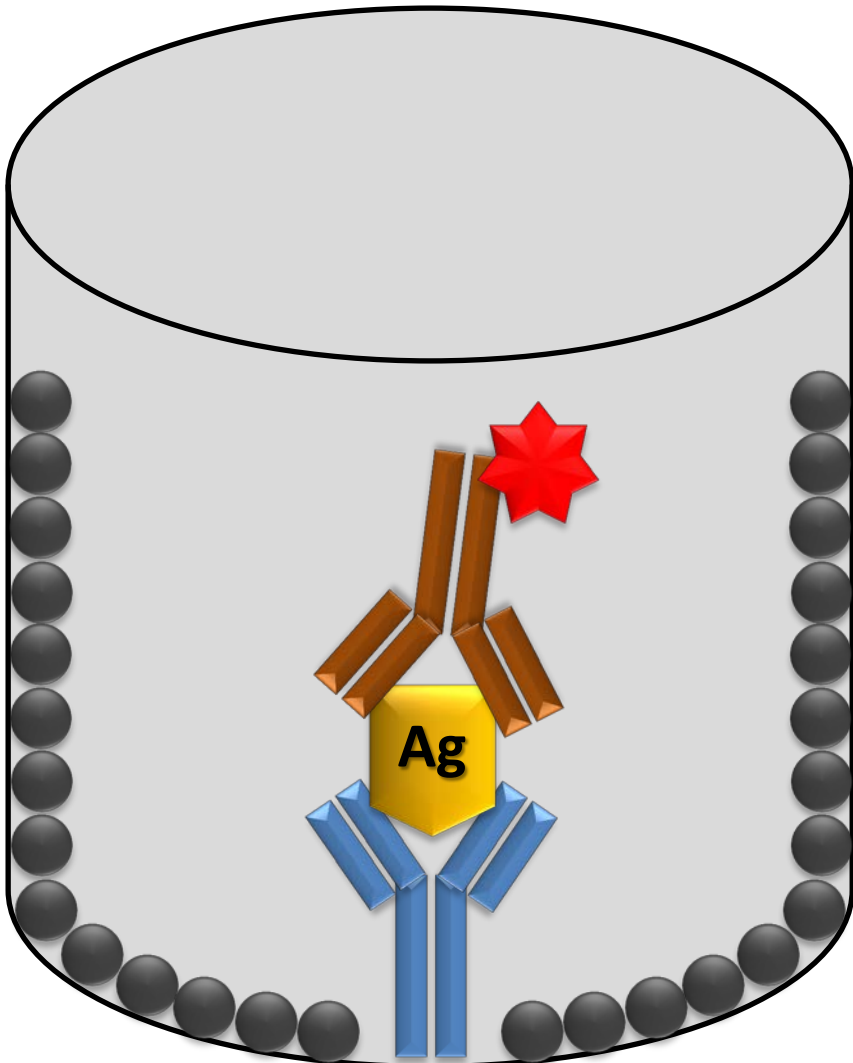
# STOP ELISA CON ACIDO

## DENATURAZIONE



# Saggio ELISA - Fasi sperimentali

**Enzima = Anticorpo secondario = Antigene**



Anticorpo secondario  
marcato



Antigene



Proteina bloccante



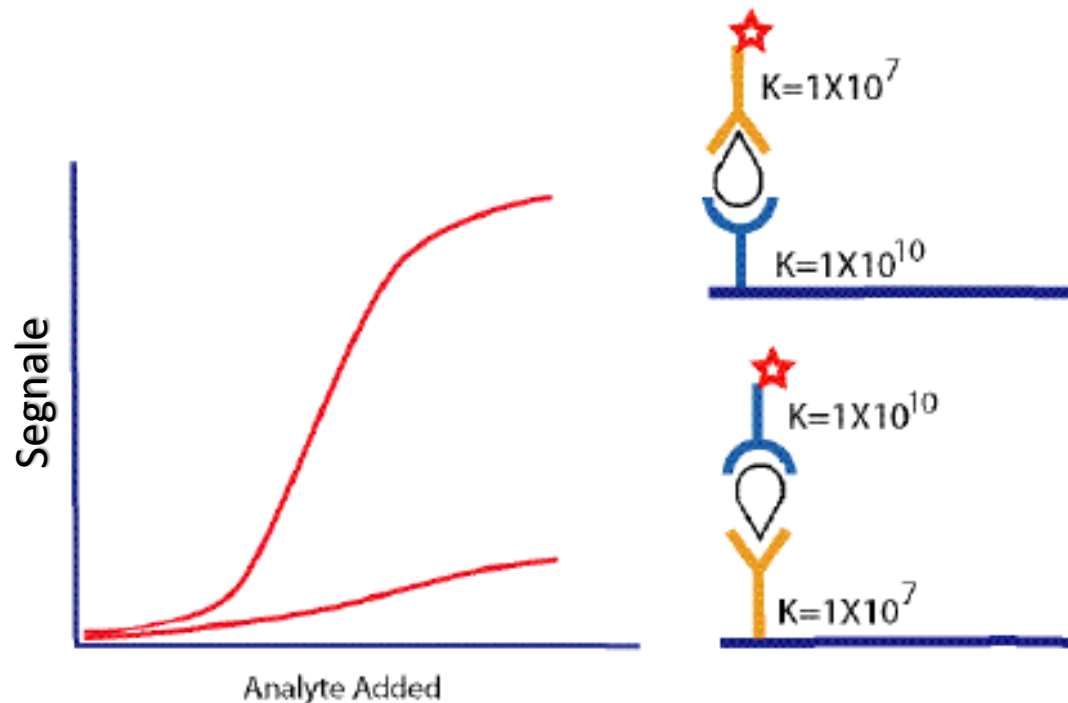
Anticorpo immobilizzato

# 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





# Schema sperimentale

