

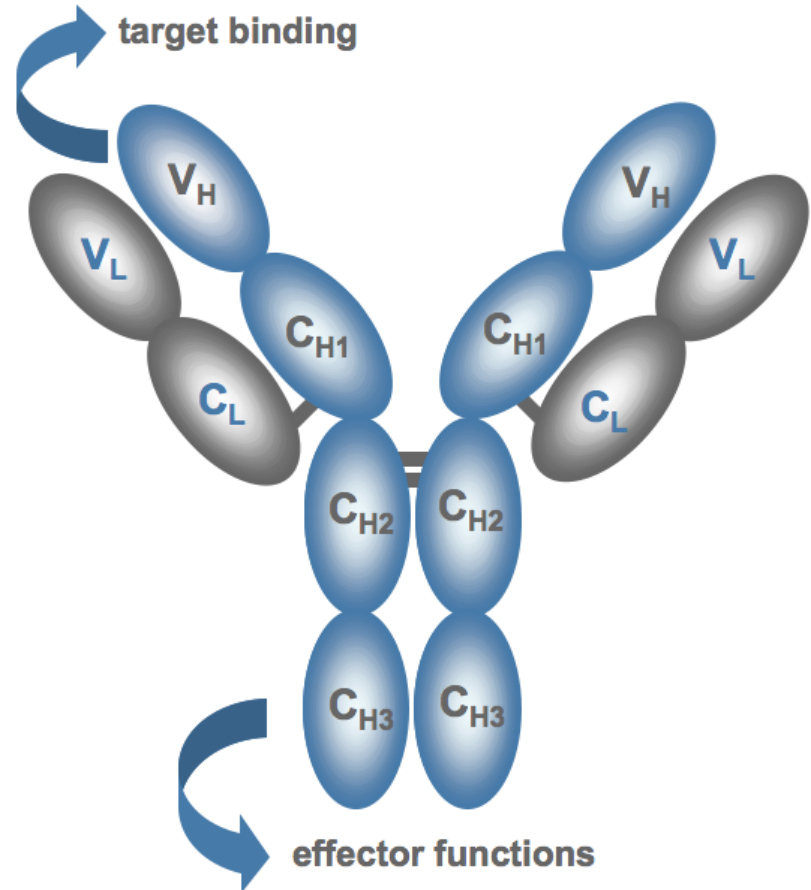
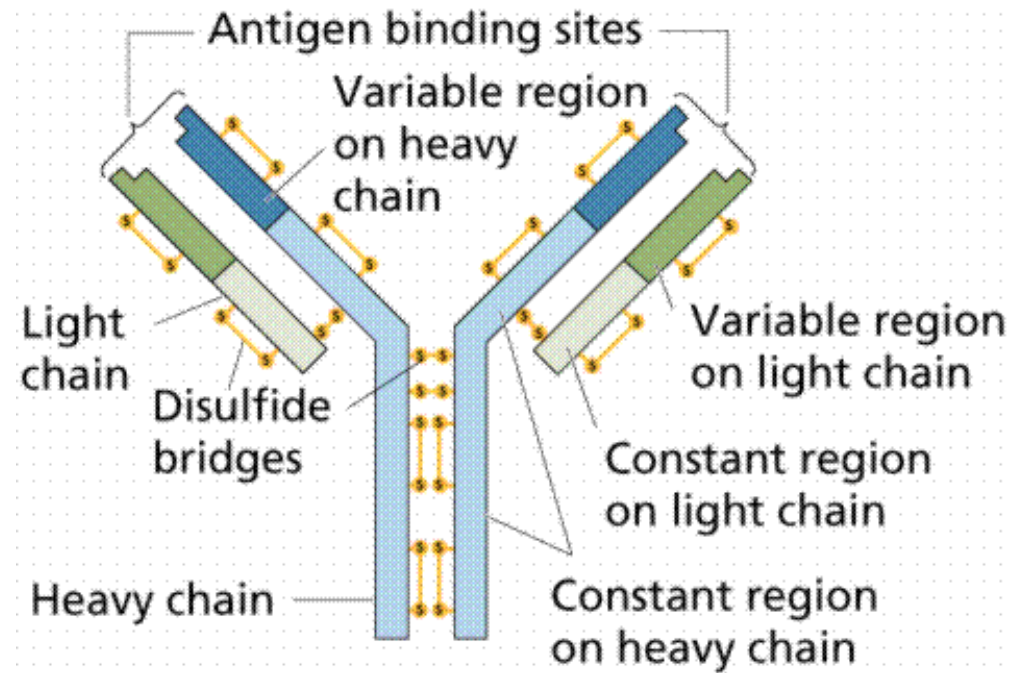
DOSAGGI IMMUNOCHEMICI

Anticorpi

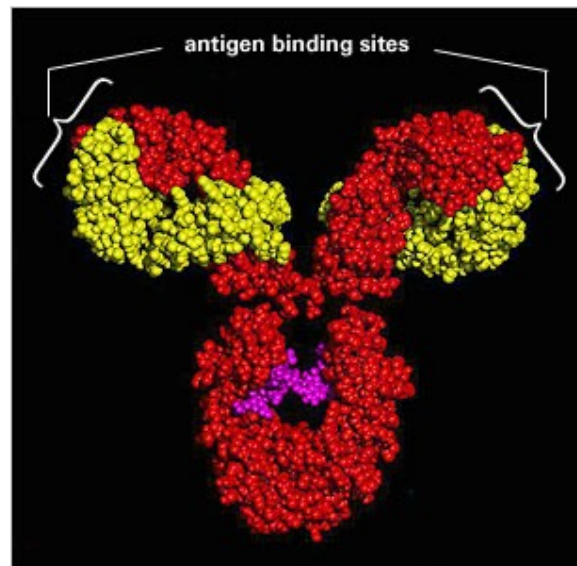
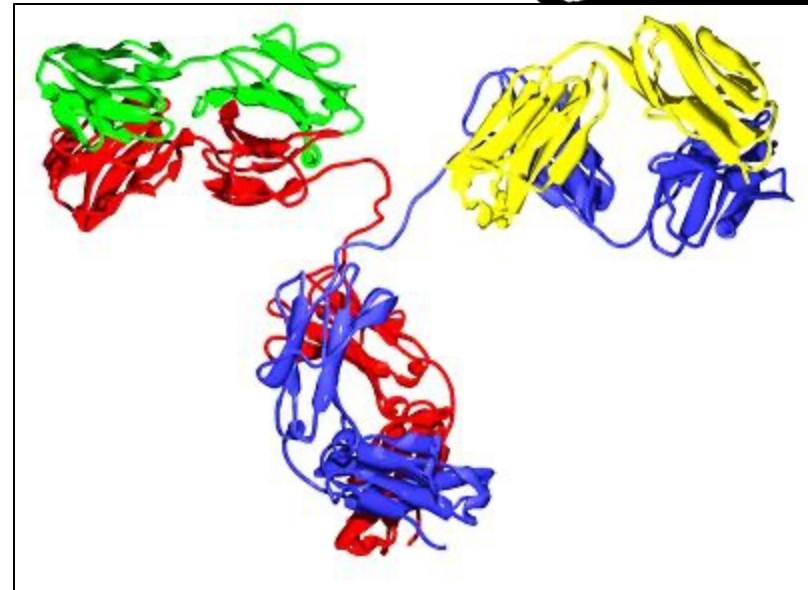
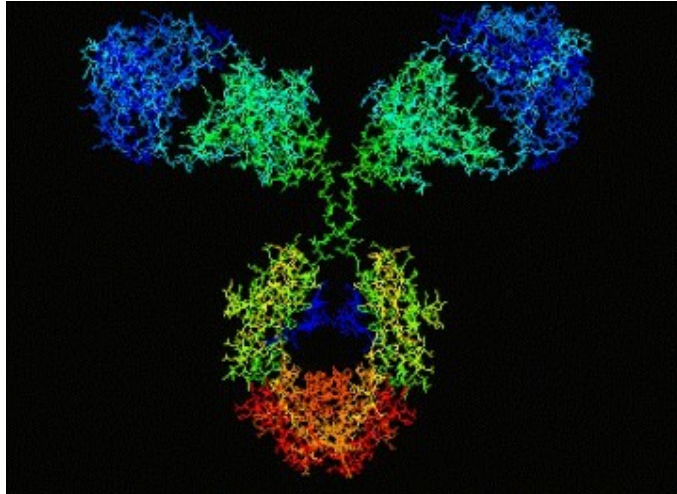
“Un anticorpo (più propriamente immunoglobulina) è una proteina con una peculiare struttura quaternaria che le conferisce una forma a "Y". Gli anticorpi hanno la funzione, nell'ambito del sistema immunitario, di neutralizzare corpi estranei come virus e batteri, riconoscendo ogni determinante antigenico o epitopo legato al corpo come un bersaglio. In maniera schematica e semplificata si può dire che ciò avviene perchè al termine dei bracci della "Y" vi è una struttura in grado di "chiudere" i segmenti del corpo da riconoscere. Ogni chiusura ha una chiave diversa, costituita dal proprio determinante antigenico; quando la "chiave" (l'antigene) è inserita, l'anticorpo si attiva..... Gli anticorpi sono una classe di glicoproteine del siero, il cui ruolo nella risposta immunitaria specifica è di enorme importanza. Hanno la capacità di legarsi in maniera specifica agli antigeni (microorganismi infettivi come batteri, tossine, o qualunque macromolecola estranea che provochi la formazione di anticorpi). Vengono prodotte dai linfociti B degli organismi a sangue caldo”.

Wikipedia

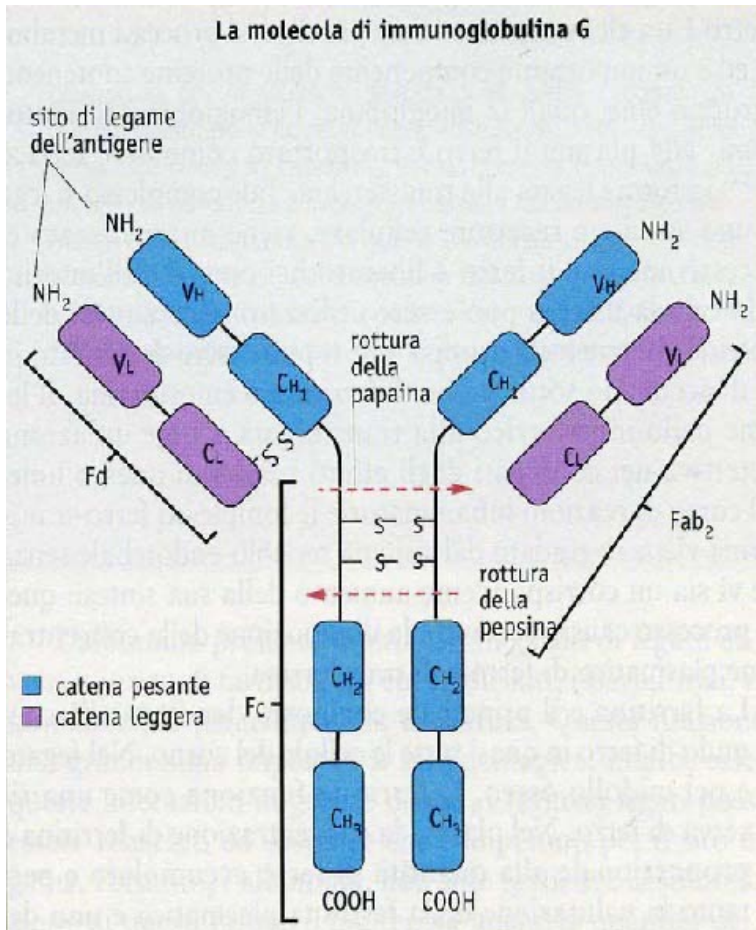
Anticorpi



Anticorpi



ANTICORPI PRIMARI



- **Anticorpi policlonali:**

diretti verso vari siti dell'antigene, si ottengono in vivo da conigli, ratti, etc

- **Anticorpi monoclonali:**

diretti verso uno stesso sito dell'antigene (più specifici ma meno sensibili), si ottengono in vitro da ibridomi (fusione di cellule di milza di un topo immunizzato con una linea cellulare di mieloma di topo)

Tecniche alternative: produzione in cellule o batteri di anticorpi ingegnerizzati

ANTICORPI SECONDARI

specie-specifici, diretti contro le regioni C= costanti degli Ab

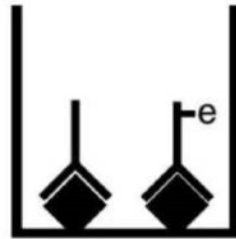
SISTEMI DI RIVELAZIONE

- Fluorescenti (FITC, TRITC, ALEXA FLUOR 488, 568)
- Leganti enzimi (perossidasi-HRP o fosfatasi alcalina-AP) che producono da substrati specifici sostanze colorate, fluorescenti o chemiluminescenti
- Biotinilati: reagiscono con complessi avidina-biotina leganti sostanze fluorescenti o enzimi (perossidasi)
- Radionuclidi: iodio 125, zolfo 35

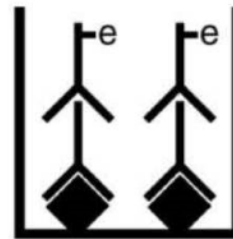
Enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA)

- Sviluppato nel 1970
- Sono effettuati su piastre di polistirene a 96 pozzetti (ora anche 384); Abs sec HRP, AP
- Esistono diversi tipi di ELISA:

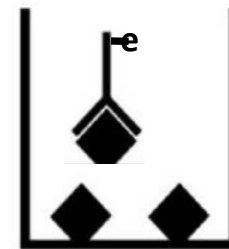
ELISA Diretto



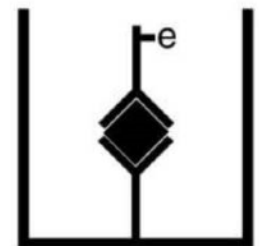
ELISA Indiretto



ELISA Competitivo



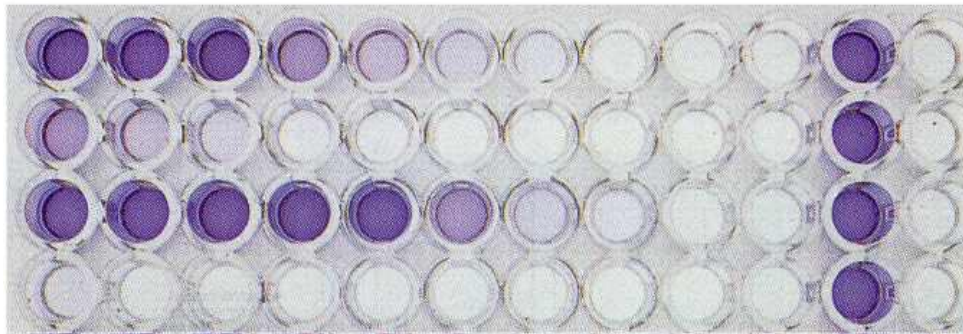
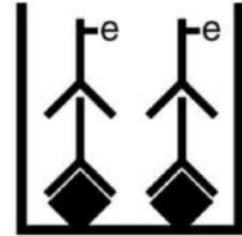
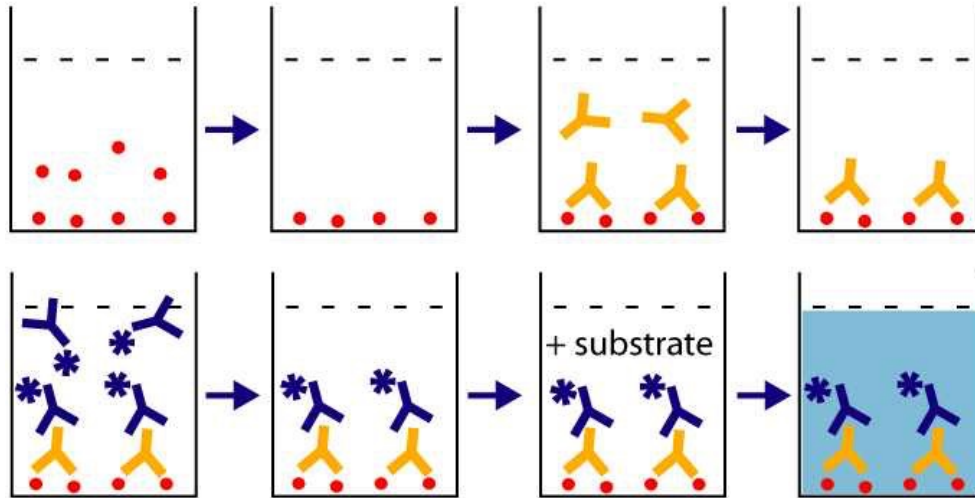
ELISA a Sandwich



Enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA)



Sistema di dosaggio ELISA



In ogni pozzetto della piastra si sviluppa colore in misura proporzionale alla quantità di antigene legato dall'anticorpo

Enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA)

VANTAGGI:

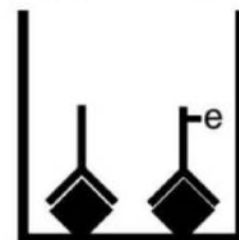
- Estremamente specifico e sensibile
- Rapido, no radioisotopi
- Completamente automatizzabile

SVANTAGGI

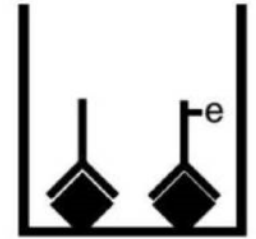
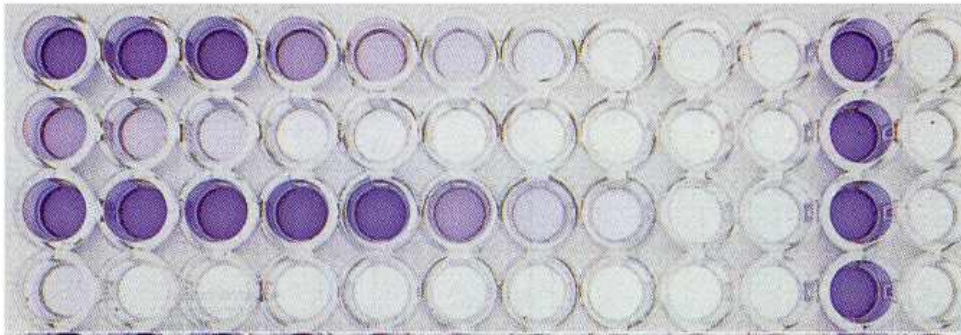
- Deve essere noto l'antigene o l'anticorpo di interesse

Enzyme linked Immune Sorbed Assay (ELISA)

0. pozzetti incubati ON con i campioni (curva standard e campione ignoto) in Tampone Tris a pH 9,6
1. aggiungere 0,2 ml di latte scremato al 2% in PBS ed incubare per 40 minuti a T ambiente
2. effettuare 3 lavaggi ciascuno con 0,2ml di PBS/Tween 0,1%.
3. aggiungere 0,1 ml di anti-Human IgG marcato con fosfatasi alcalina (1/10.000 in tamp di diluizione) ed incubare per 40 minuti a T ambiente
4. effettuare 3 lavaggi ciascuno con 0,2ml di PBS/Tween 0,1%.
5. aggiungere 0,2 ml di PNPP (1mg/ml in Tamp Glicina pH 9,6) ed attendere lo sviluppo della colorazione gialla (max 20 minuti)
6. leggere a 405nm



Sistema di dosaggio ELISA

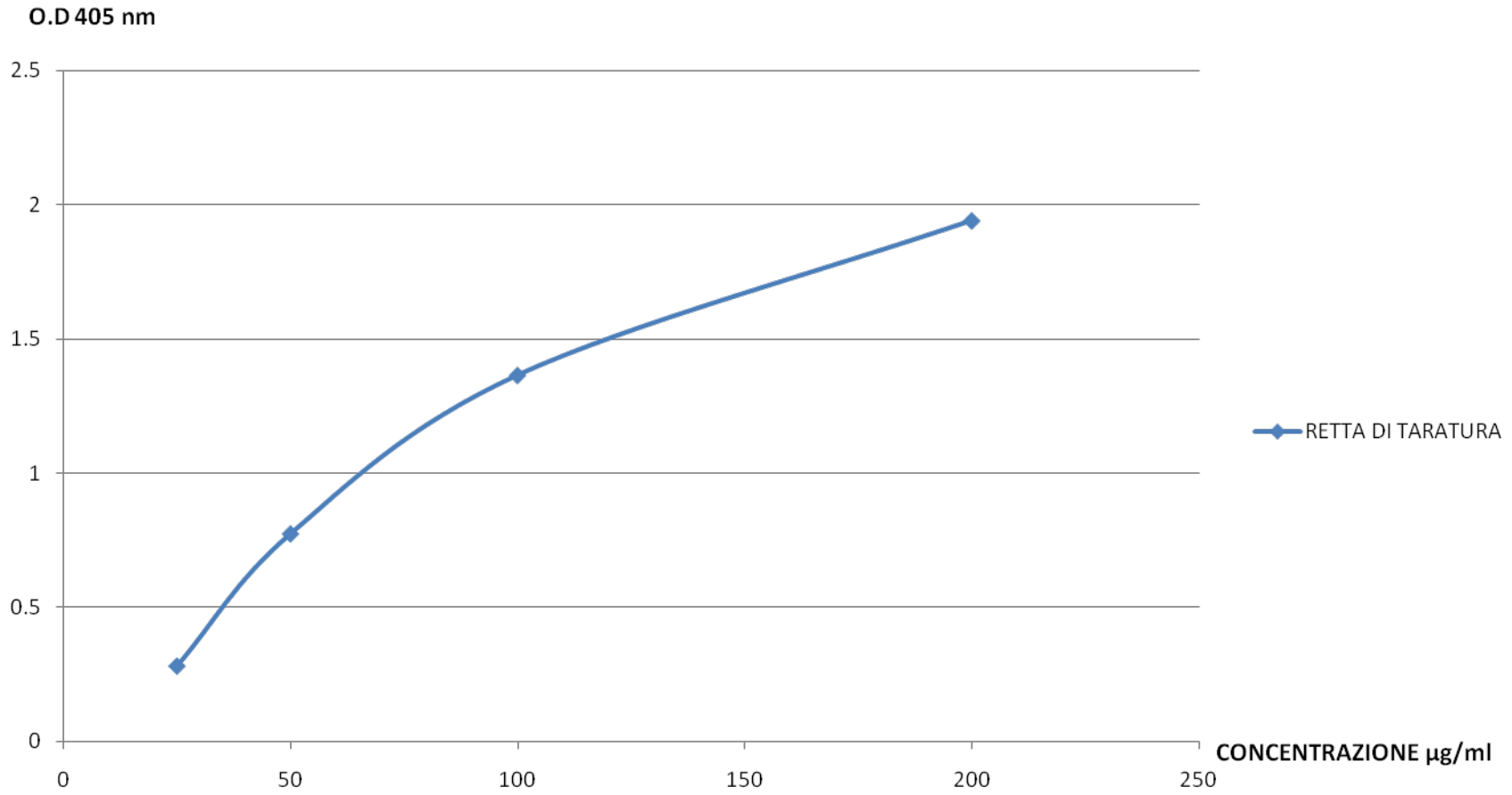


In ogni pozzetto della piastra si sviluppa colore in misura proporzionale alla quantità di antigene legato dall'anticorpo

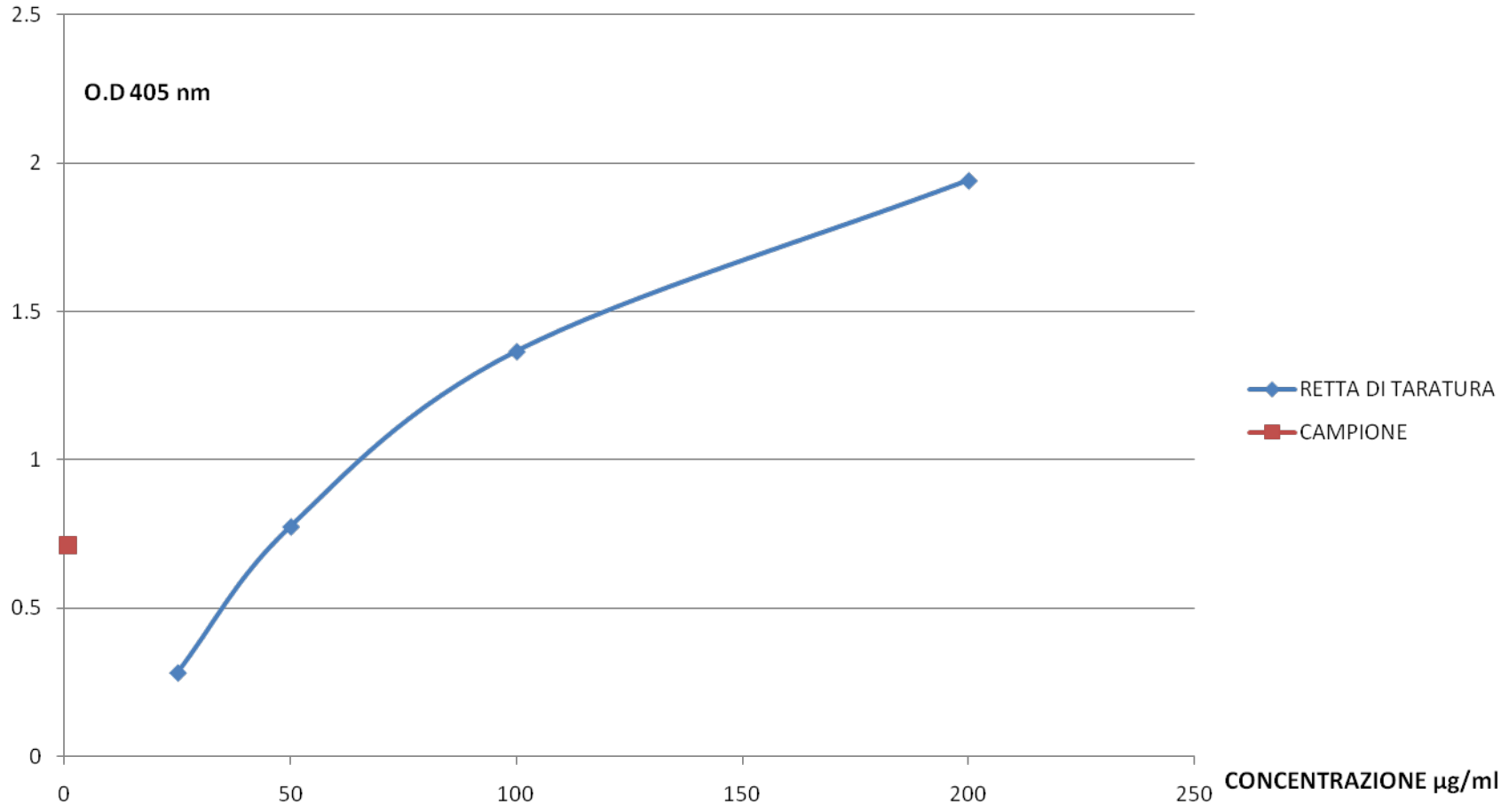
Enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA)



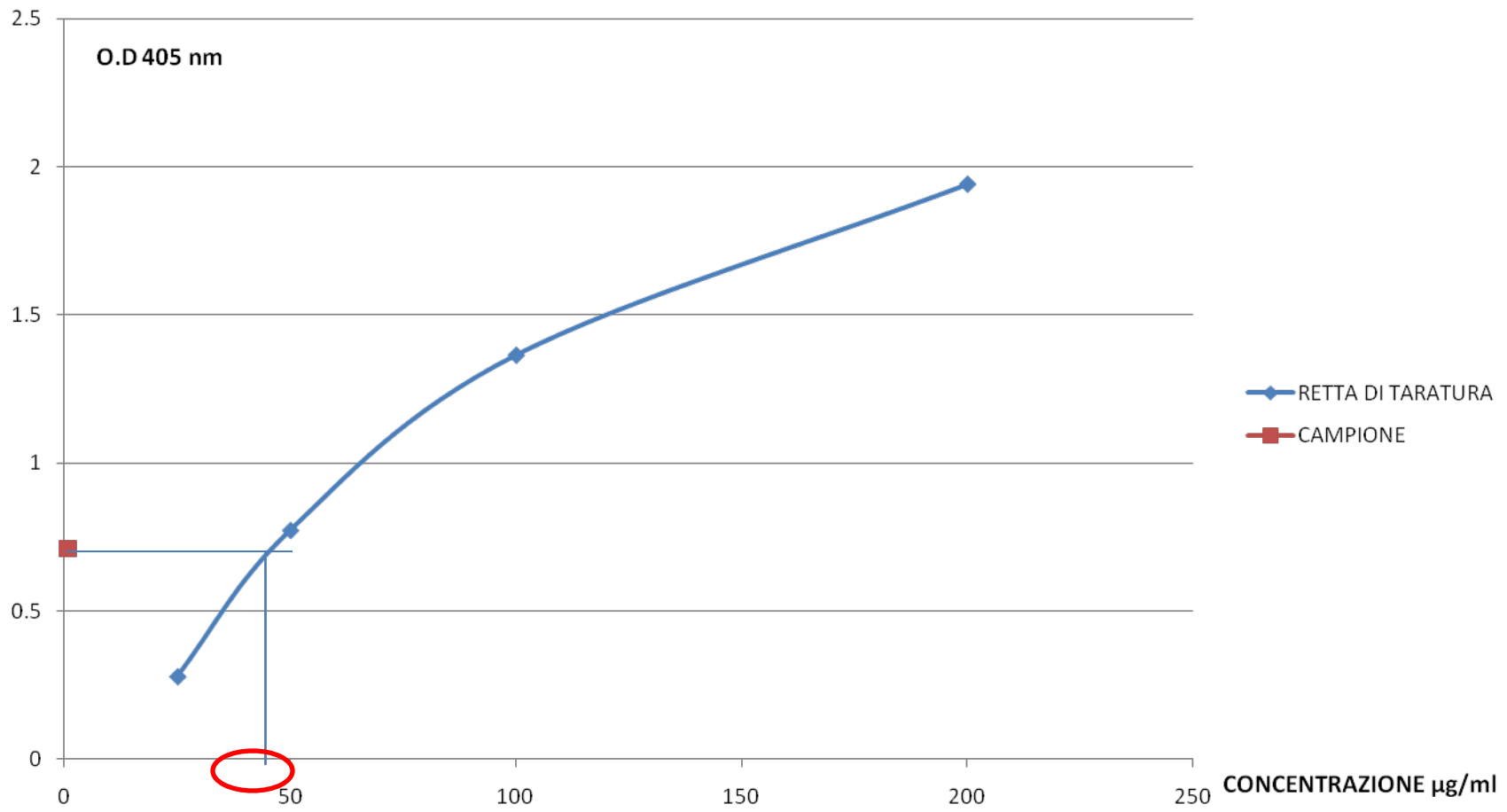
Disegno curva di taratura



Determinazione della concentrazione del campione ignoto



Determinazione della concentrazione del campione ignoto



CONCENTRAZIONE CAMPIONE IGNOTO: ??