

IMMUNOGLOBULINE: STRUTTURA E FUNZIONE

APPLICAZIONI NELLA RICERCA

SISTEMA IMMUNITARIO

- posseduto da quasi tutti gli organismi per rispondere agli attacchi dei patogeni ambientali.
- È adattabile, produzione di un grandissimo numero di cloni cellulari distinti, ciascuno dei quali esprime una variante proteica che riconosce e lega una determinata struttura chimica.
- distingue le molecole proprie, “self”, da quelle estranee, “non self”
- distrugge ciò che identifica come estraneo, eliminando virus, batteri, altri patogeni, e molecole.
- La risposta immunitaria richiede l'intervento di tutta una serie di interazioni coordinate tra molte classi di molecole, proteine e tipi cellulari.
- la risposta immunitaria è un sistema biochimico sensibile e specifico che si basa su interazioni reversibili tra proteine e ligandi

Il nostro organismo ha due linee di difesa:

- un **sistema immunitario innato** (aspecifico): risponde rapidamente riconoscendo le caratteristiche molecolari comuni a molti patogeni. Prima linea di difesa contro gli agenti patogeni estranei, identificati ed eliminati in base alle loro caratteristiche molecolari comuni assenti nell'organismo ospite (es: glicolipidi specifici o alcune forme di acidi nucleici). I suoi componenti comprendono l'epitelio di rivestimento, che circonda le cellule dell'ospite, e i fagociti che possono fagocitare e distruggere i patogeni senza l'intervento del sistema immunitario adattativo.
- un **sistema immunitario adattativo** (acquisito): risponde riconoscendo le caratteristiche molecolari specifiche di un dato patogeno.

Il sistema innato e il sistema adattativo agiscono identificando le caratteristiche degli organismi patogeni per poi eliminarli o neutralizzarli.

CELLULE COINVOLTE NELLA RISPOSTA IMMUNITARIA

Vari tipi di **leucociti** tra cui i **macrofagi** e i **linfociti**, che derivano tutti da cellule staminali indifferenziate presenti nel midollo osseo.

RISPOSTA IMMUNITARIA:

2 sistemi complementari, il **sistema immunitario umorale** e **quello cellulare**.

SISTEMA IMMUNITARIO UMORALE: contro le infezioni batteriche e i virus extracellulari (quelli presenti nei fluidi corporei), e singole proteine estranee. Mediata da proteine solubili dette anticorpi (Ab) o immunoglobuline (Ig). Le immunoglobuline legano batteri, virus o molecole molto grandi identificate come estranee e li portano alla distruzione. Esse rappresentano circa il 20% delle proteine del sangue e sono prodotte dai **linfociti B**, così chiamati perché completano il loro differenziamento nel midollo osseo (**bone marrow**)

SISTEMA IMMUNITARIO CELLULARE: distrugge le cellule dell'organismo infettate da virus, alcuni parassiti e i tessuti estranei.

- **Linfociti T citotossici** (killer) (o cellule T_C , ultima fase del loro differenziamento avviene nel timo). Riconoscono cellule infettate o parassiti mediante dei recettori presenti sulla loro superficie.
- **Linfociti T helper** (linfociti T_H): producono segnali proteici solubili, chiamati citochine (ad es: interleuchine). I linfociti T_H interagiscono con i macrofagi. Partecipano in modo indiretto alla distruzione delle cellule infettate e degli agenti patogeni, stimolando la proliferazione selettiva di quei linfociti T_C e B che si legano a un particolare antigene. Questo processo, chiamato selezione clonale, aumenta il numero delle cellule del sistema immunitario in grado di rispondere a un particolare agente patogeno.

CELLULE DELLA MEMORIA

Un organismo ospite necessita di qualche tempo, spesso di giorni, per produrre una risposta immunitaria contro un nuovo antigene, ma le cellule della memoria permettono una risposta rapida nei confronti di agenti patogeni precedentemente incontrati.

Un **vaccino** contro una particolare infezione è costituito spesso dal virus attenuato o ucciso, o da proteine isolate dal rivestimento proteico virale (o batterico). Quando viene inoculato in una persona, il vaccino di norma non causa un'infezione o una malattia, ma “insegna” efficacemente al sistema immunitario quale aspetto abbiano le particelle virali, stimolando la produzione di cellule della memoria. In caso di un successivo contatto con il patogeno, queste cellule potranno legarsi al virus e scatenare una rapida risposta immunitaria. L'importanza dei linfociti T è dimostrata dall'infezione dovuta al virus dell'immunodeficienza umana (HIV, Human Immunodeficiency Virus), che causa la sindrome da immunodeficienza acquisita (AIDS, Acquired Immune Deficiency Syndrome). Il bersaglio principale dell'infezione da HIV sono i linfociti T_H , la cui eliminazione inattiva progressivamente l'intero sistema immunitario.

Antigene = molecola, o patogeno, capace di indurre una risposta immunitaria.
Es: un virus, una parete cellulare batterica, una singola proteina o un'altra macromolecola.

Un antigene con una struttura complessa può essere legato da un certo numero di anticorpi diversi.

Un singolo anticorpo o un singolo recettore dei linfociti T riconosce solo una **particolare struttura all'interno dell'antigene**, che viene detta **determinante antigenico** o **epitopo**.

Apteni = molecole con $M < 5000$ non sono, in genere, antigeniche. Se legate covalentemente ad altre più grandi possono indurre una risposta immunitaria.

Gli anticorpi prodotti in risposta ad un aptene legato a una proteina si possono legare alla stessa molecola di aptene anche quando è in forma libera. Questi anticorpi sono spesso usati per sviluppare test analitici o come ligandi specifici per la cromatografia di affinità.

STRUTTURA DEGLI ANTICORPI

Molti vertebrati (fra cui l'essere umano) hanno 5 classi di immunoglobuline.

Le Ig sono costituite da catene pesanti e leggere

Ogni classe ha un caratteristico tipo di catena pesante, α , δ , ϵ , γ , e μ presente nelle immunoglobuline IgA, IgD, IgE, IgG e IgM.

In tutte le classi di Ig ci sono due tipi di catene leggere, κ e λ .

IgG: costituite da due catene pesanti (γ) e due leggere

IgD e IgE: struttura simile a quella delle IgG.

IgM: forma monomerica legata alla membrana, oppure vengono secrete in forma di pentamero unito da molti legami trasversali

IgA: nelle secrezioni come la saliva, le lacrime e il latte, possono essere monomeriche, dimeriche o trimeriche.

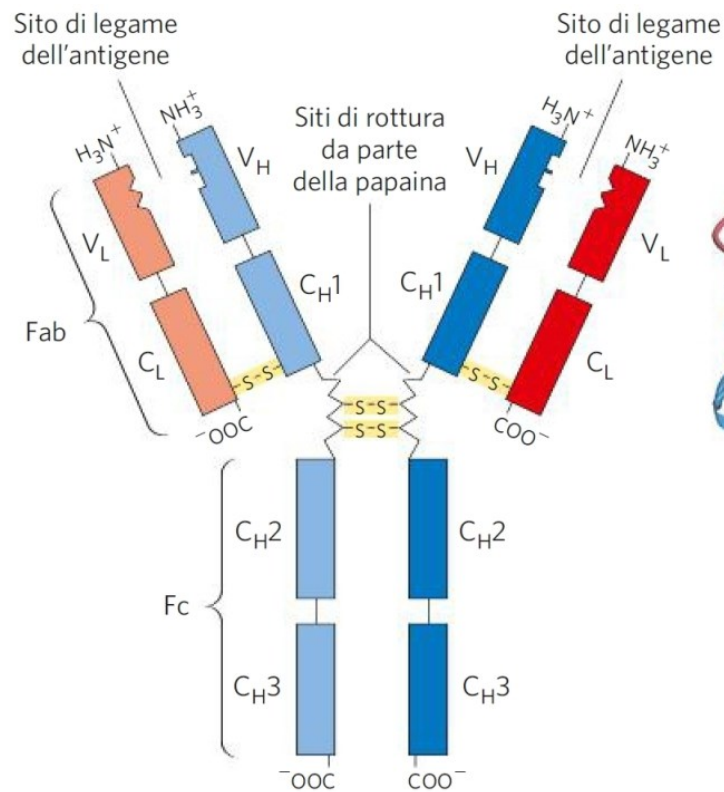
STRUTTURA DEGLI ANTICORPI

Immunoglobuline G (IgG) = classe principale di anticorpi, tra le proteine più abbondanti nel siero.

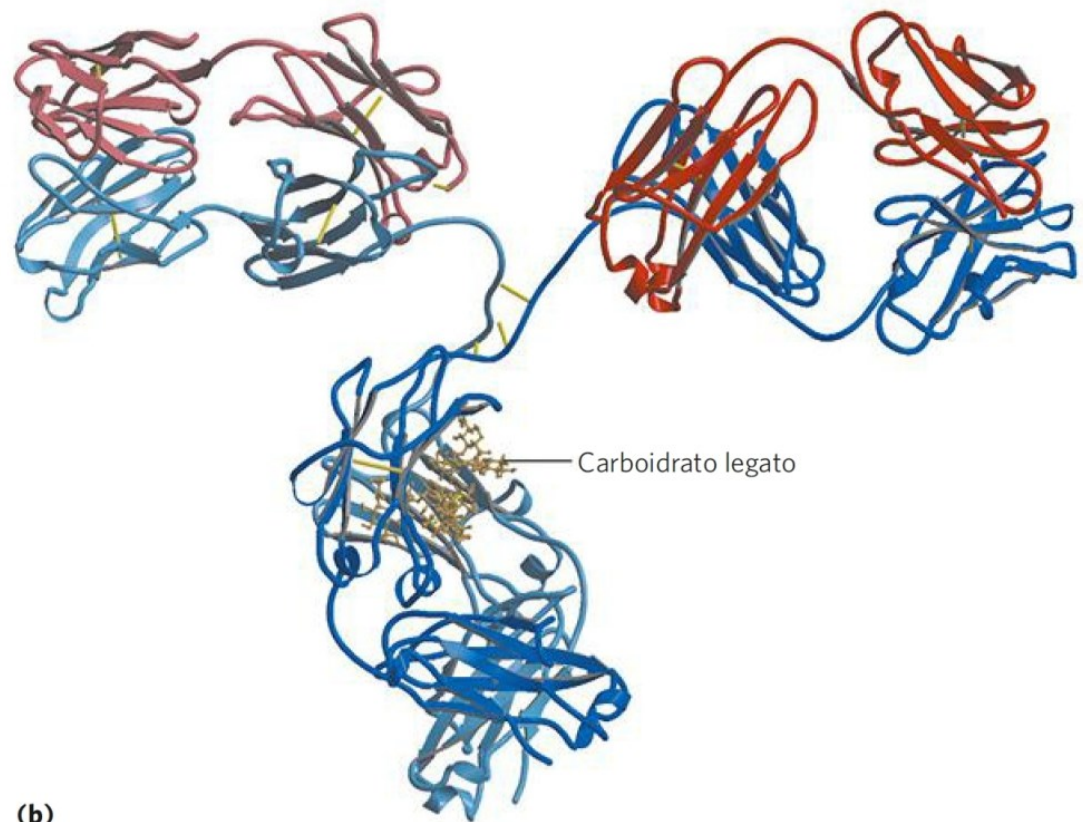
Le IgG hanno 4 catene polipeptidiche: due catene pesanti e due catene leggere unite da legami non covalenti e legami disolfuro in un complesso con $M = 150000$. Le catene pesanti e le catene leggere di una molecola di IgG interagiscono tra loro formando una molecola a forma di Y

La digestione con papaina genera il frammento basale Fc, così chiamato in quanto è facile da cristallizzare, e due frammenti Fab che legano l'antigene (antigen-binding). Ogni frammento Fab ha un singolo sito di legame per l'antigene.

Ogni catena polipeptidica è costituita da numerosi domini; alcuni sono presenti in tutte le IgG e sono noti come ripiegamento immunoglobulinico, un motivo strutturale ben conservato della classe tutto β . In ogni catena è presente anche un dominio variabile, nel quale si riscontra la maggior parte della variabilità nella sequenza amminoacidica. I domini variabili si associano generando il sito che lega l'antigene in modo da permettere la formazione del complesso antigene-anticorpo.



C = dominio costante
V = dominio variabile
H, L = catena pesante, catena leggera



(a)

(b)

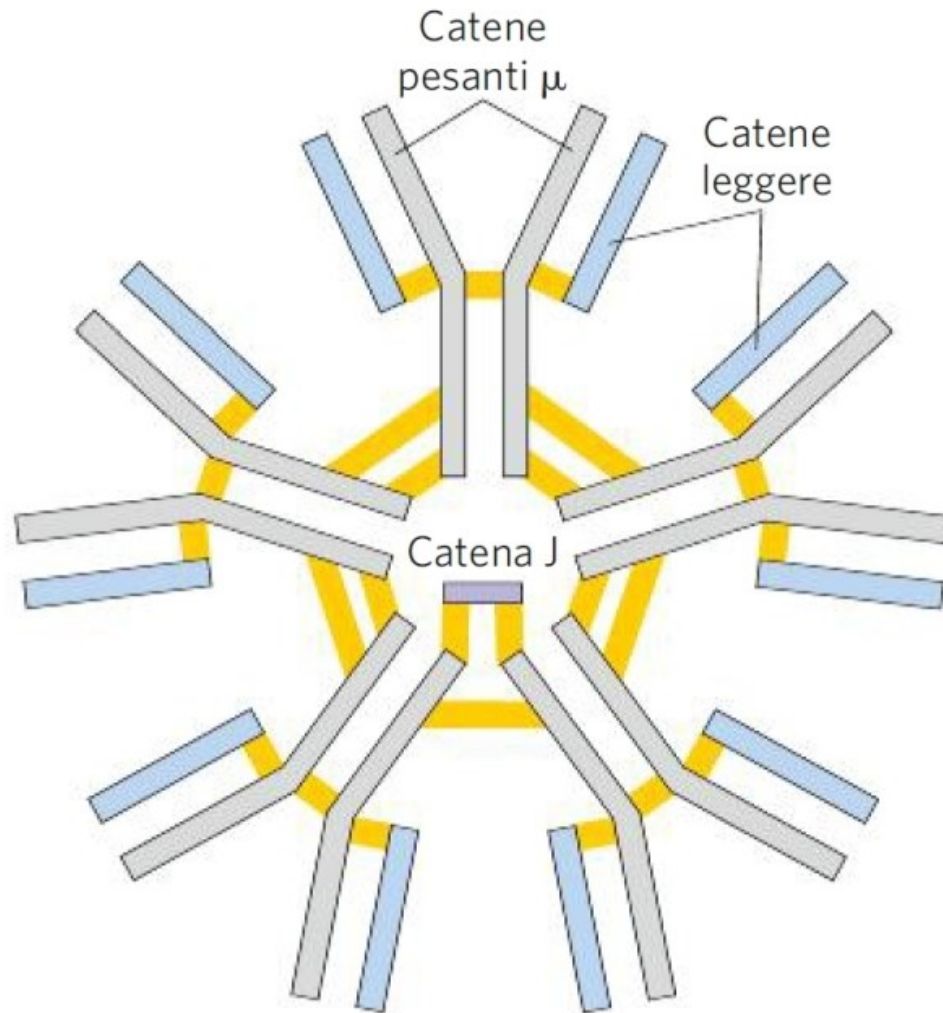
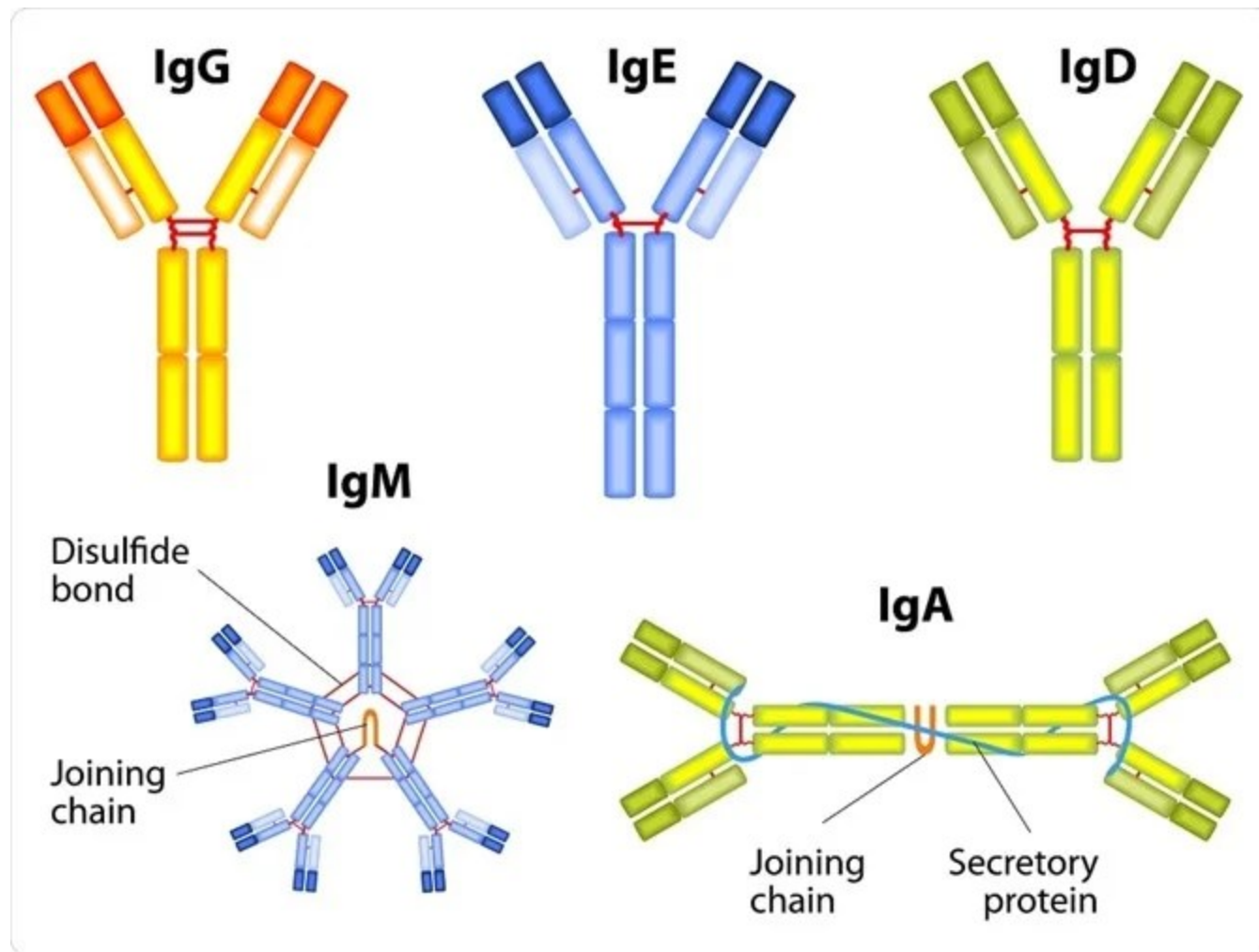


Figura 5.22 Il pentamero di unità immunoglobuliniche tipico delle IgM. Il pentamero contiene molti legami disolfuro trasversali (in giallo). La catena J è un polipeptide con M_r pari a 20 000, presente nelle IgM e anche nelle IgA.



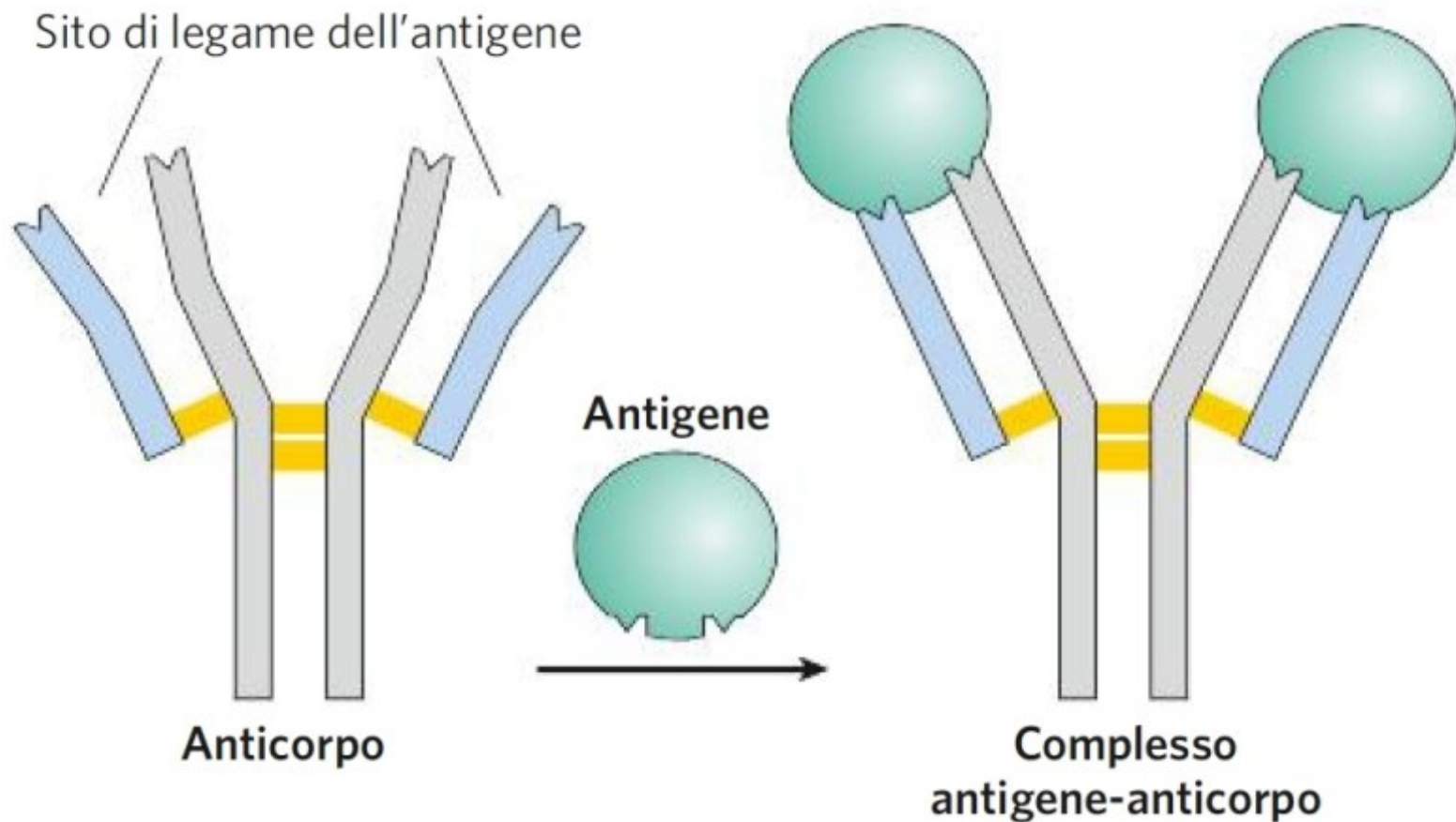


Figura 5.21 Legame di una IgG a un antigene. Per ottenere un adattamento ottimale con l'antigene, i siti di legame delle IgG spesso subiscono piccoli cambiamenti conformazionali. Questo adattamento indotto avviene comunemente in seguito a molte interazioni proteina-ligando.

PRODUZIONE DEGLI ANTICORPI

IgM: il primo anticorpo prodotto dai linfociti B e il principale anticorpo della fase iniziale della risposta immunitaria primaria.

IgG: principali anticorpi della risposta immunitaria secondaria, che ha inizio per opera dei linfociti B della memoria. Sono le più abbondanti nel sangue, rappresentano parte dell'immunità acquisita nei confronti di un antigene già incontrato e trattato.

Si legano a un virus o a un batterio, portando all'attivazione dei macrofagi, che ingeriscono e distruggono l'invasore, e di altri componenti della risposta immunitaria.

Dei recettori sulla superficie dei macrofagi riconoscono e legano la regione Fc di una IgG. Quando questi recettori per Fc legano una IgG unita a un patogeno, il macrofago ingerisce il complesso per fagocitosi

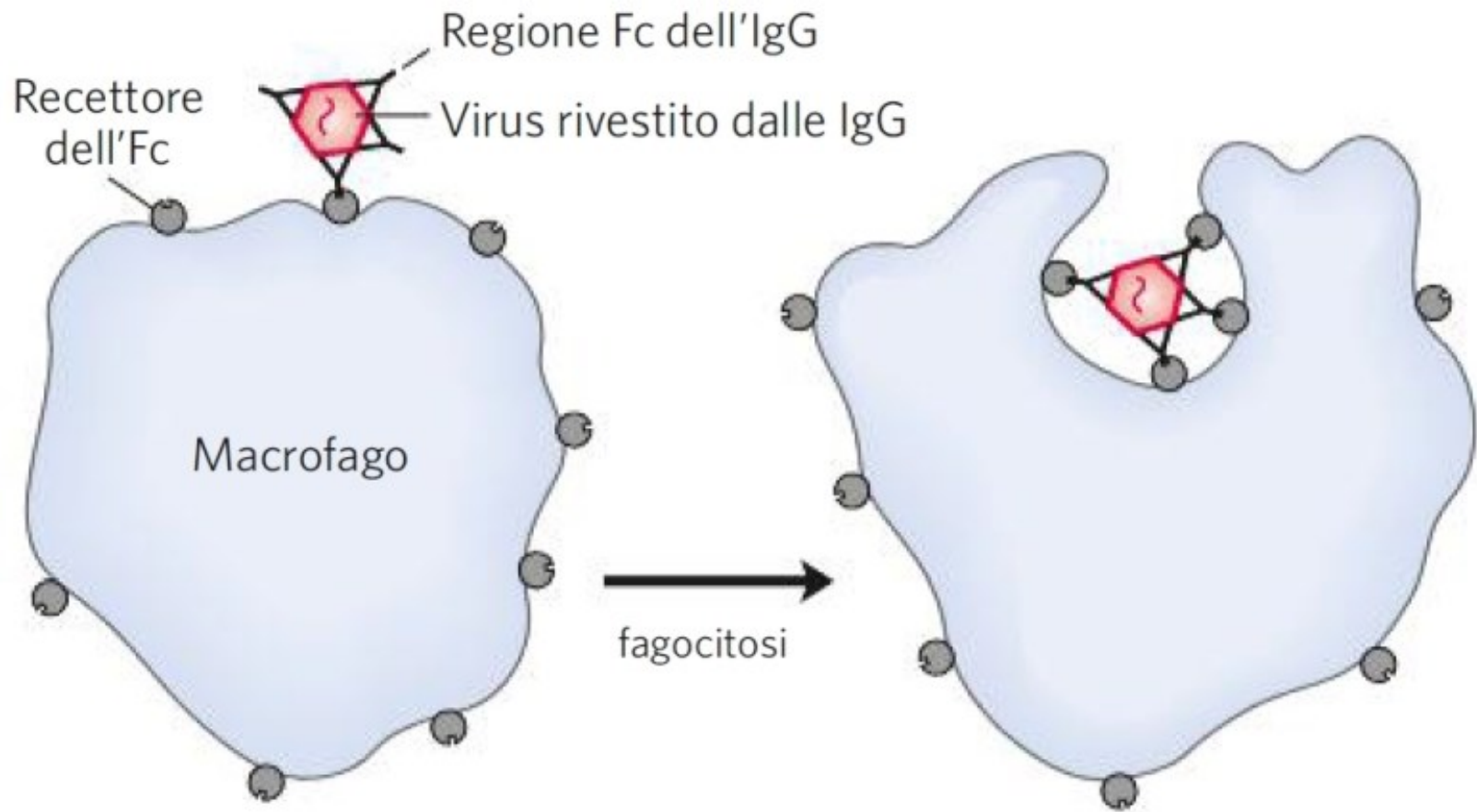


Figura 5.23 Fagocitosi di un virus legato agli anticorpi da parte di un macrofago. Le regioni Fc degli anticorpi legati al virus si legano al recettore dell'Fc sulla superficie del macrofago, stimolando il macrofago a inglobare e distruggere il virus.

SPECIFICITÀ DI LEGAME ANTIGENE - ANTICORPO

- Definita dalla sequenza di aa nei domini variabili della catena leggera e della catena pesante.
- AA variabili e ipervariabili si trovano sul sito che lega l'antigene
- La specificità di legame dipende dalla complementarità strutturale tra l'antigene e il suo sito di legame su Ig.
- Adattamento indotto: cambiamenti conformazionali in un anticorpo o nel suo antigene per consentire una corretta interazione.
- Una tipica interazione antigene-anticorpo è piuttosto forte e caratterizzata da valori di K_d molto bassi, 10^{-10} M (un basso valore di K_d corrisponde ad una interazione molto forte). Legami coinvolti: coppie ioniche, legami idrogeno, interazioni idrofobiche e interazioni di van der Waals.

Il complesso costituito da un peptide derivato dall'HIV (un modello antigenico) e una molecola di Fab mostra l'adattamento indotto.

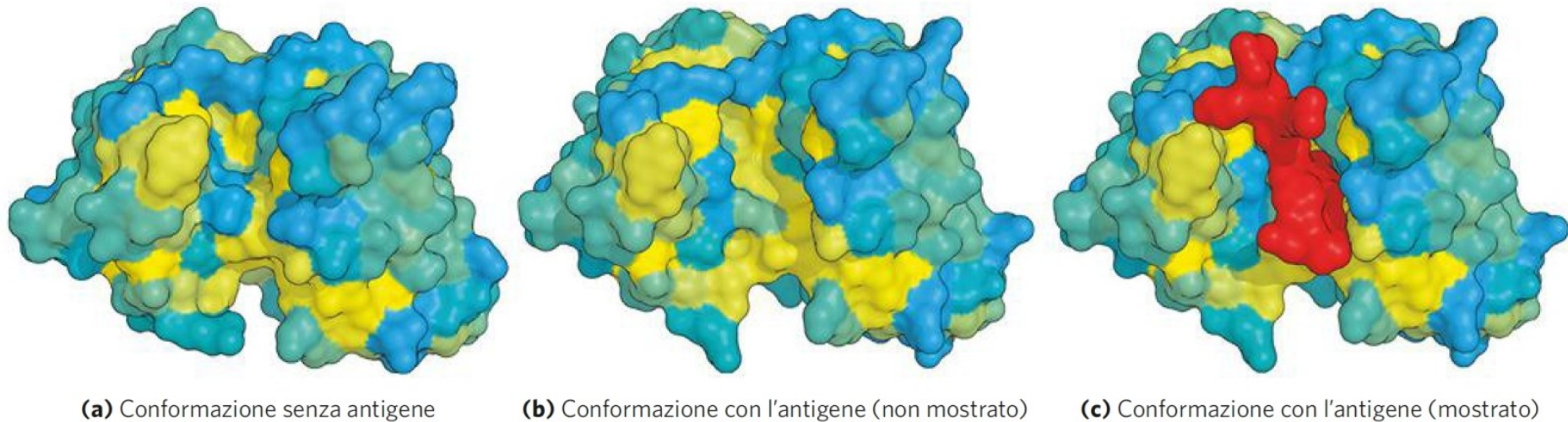


Figura 5.24 Adattamento indotto nel legame di un antigene a una IgG. In questa immagine è raffigurato il frammento Fab di una molecola IgG con la superficie colorata per mostrare la distribuzione dell'idrofobicità. Le superfici idrofobe sono gialle, le idrofile blu, con sfumature dal blu al verde al giallo fra le une e le altre. (a) Immagine del frammento Fab in assenza di antigene (un piccolo peptide che deriva dall'HIV), rivolta verso il sito di legame dell'antigene. (b) La stessa immagine, ma con il

frammento Fab legato all'antigene (non rappresentato per non ostacolare la vista del sito di legame modificato). Si noti che la cavità di legame idrofoba è più ampia e che diversi gruppi hanno cambiato posizione. (c) La stessa immagine di (b), ma con l'antigene (in rosso) nel sito di legame. [Fonti: (a) PDB ID 1GGC; Stanfield, R.L. et al., *Structure* **1**, 83 (1993). (b, c) PDB ID 1GGI; Rini, J.M. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 6325 (1993).]

Mammiferi come il topo e l'essere umano sono in grado di sintetizzare grandi quantità di anticorpi specifici praticamente contro ogni determinante estraneo entro pochi giorni dal momento dell'esposizione all'antigene.

La specificità anticorpale è determinata dalla sequenza amminoacidica delle regioni variabili delle catene L e H.

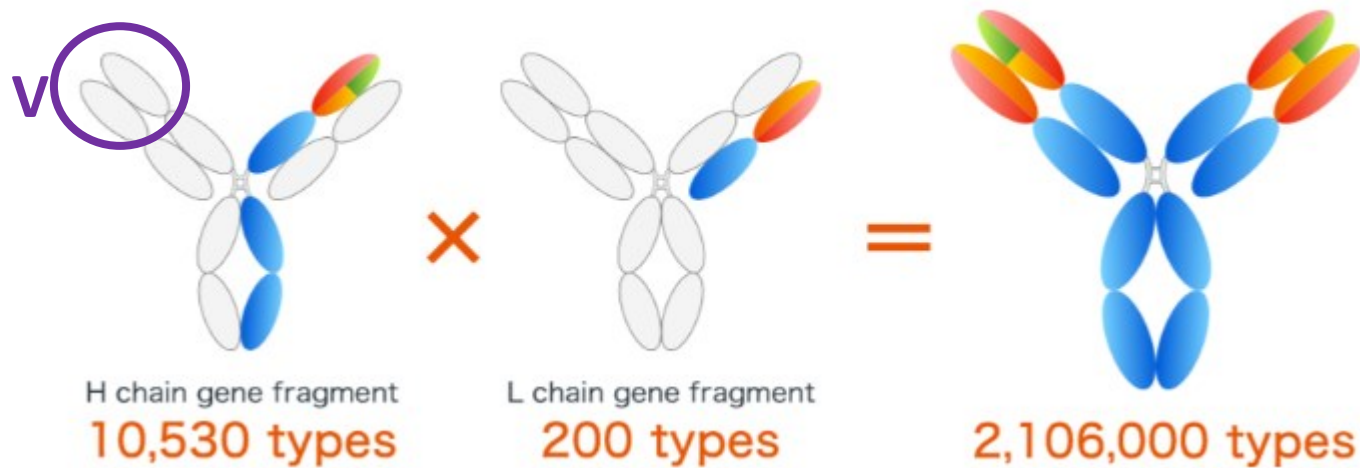
Come sono generate le differenti sequenze nelle regioni variabili?

DIVERSITÀ DEGLI ANTICORPI

Il nostro corpo risponde a vari agenti patogeni, come batteri e virus, producendo un'ampia varietà di anticorpi in grado di legarsi ad antigeni specifici.

La diversità degli anticorpi è creata dalla combinazione delle regioni variabili delle catene H e delle catene L.

Si ritiene che esistano 10.530 tipi di catene H e 200 tipi di catene L, che danno origine a 2.106.000 tipi diversi di regioni variabili. Inoltre, poiché esistono altri meccanismi per produrre diversità, come le mutazioni, è possibile produrre anticorpi in grado di legarsi virtualmente a qualsiasi antigene.

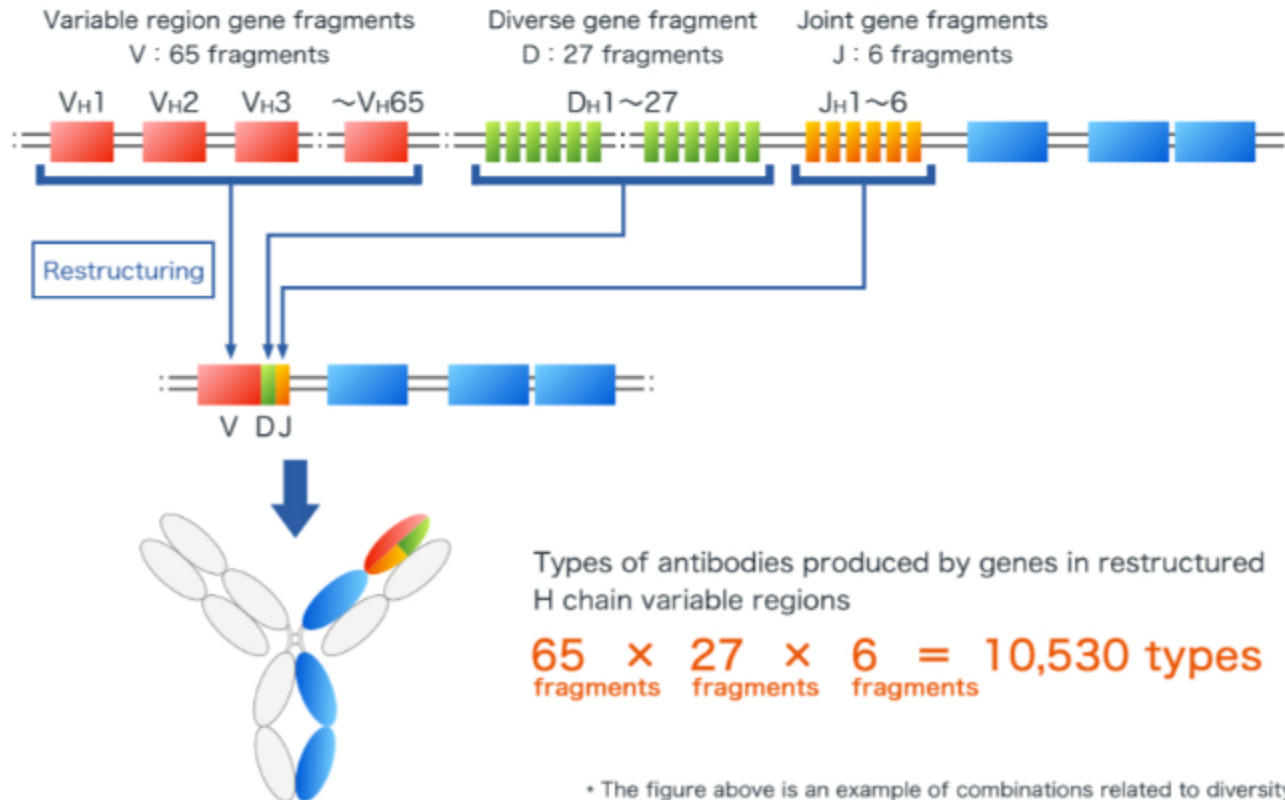


La diversità degli anticorpi è determinata da un meccanismo chiamato ricombinazione (restructuring) genica che ha luogo nella regione variabile.

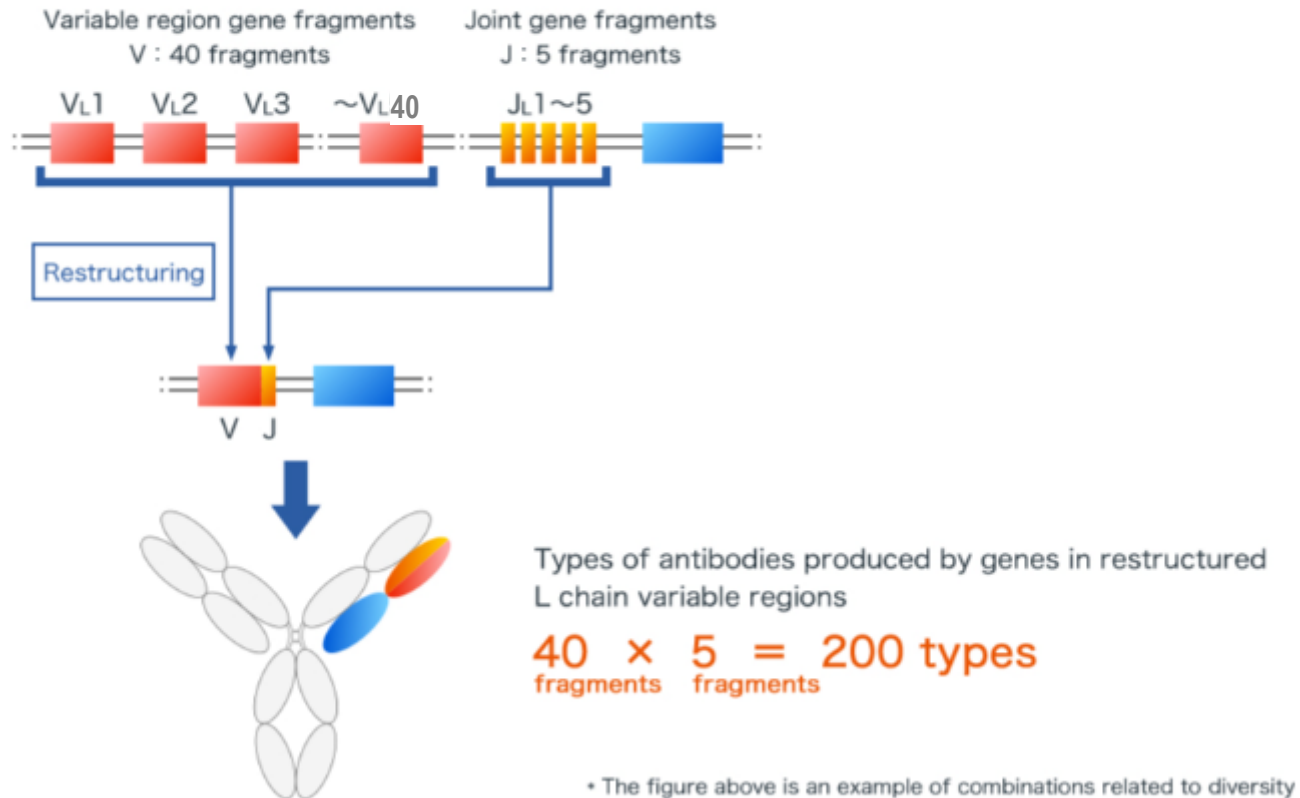
I geni della regione variabile della catena pesante (H) di un anticorpo sono divisi nelle regioni geniche VH, DH e JH. I geni della regione variabile della catena leggera (L) degli anticorpi sono divisi nelle regioni VL e JL. Queste regioni geniche vengono assemblate selezionando un tipo da più frammenti genici.

In questo modo, una varietà di anticorpi viene assemblata da frammenti genici della regione variabile della catena pesante e della regione variabile della catena leggera.

H chain



L chain



TECNICHE IMMUNOCHEMICHE

Metodi biochimici basati sull'uso di anticorpi: viene sfruttata la proprietà delle Ig di riconoscere uno o più epitopi presenti nella molecola antigene (Ag; molecola che suscita una risposta anticorpale).

La specificità del riconoscimento molecolare fra antigene e anticorpo consente di rivelare e dosare una determinata molecola in una miscela complessa senza purificarla dagli altri componenti, in qualche caso anche con notevole accuratezza e sensibilità.

TECNICHE IMMUNOCHEMICHE

Ig: per la straordinaria affinità e specificità di legame, sono ottimi reagenti analitici.

2 tipi di preparazione di Ig:

Policlonali: prodotti da molti linfociti B in risposta a un antigene, per esempio una proteina iniettata in un animale. Alcune delle cellule della popolazione di linfociti B producono anticorpi che legano in modo specifico diversi epitopi nella molecola dell'antigene. Quindi le preparazioni di anticorpi policlonali contengono una miscela di anticorpi che riconoscono diverse parti dello stesso antigene.

Monoclonali: sintetizzati da una popolazione di linfociti B identici (un clone) cresciuta in un terreno di coltura. Sono omogenei e riconoscono tutti lo stesso epitopo.

PRODUZIONE DI ANTICORPI

La produzione di anticorpi per l'impiego farmacologico o di laboratorio sfrutta il fatto che l'organismo reagisce all'incontro con un antigene estraneo stimolando un clone di linfociti B a proliferare, a differenziarsi in plasmacellule e a produrre e secernere anticorpi specifici contro quell'antigene (risposta primaria). Una successiva introduzione dello stesso antigene agisce su un sistema immunitario che conserva la memoria immunologica e, quindi, la risposta anticorpale secondaria è più pronta e più energica. Pertanto, per produrre un anticorpo contro una molecola antigene (spesso, ma non necessariamente, una proteina) è sufficiente procedere come descritto di seguito.

PRODUZIONE DI ANTICORPI POLICLONALI

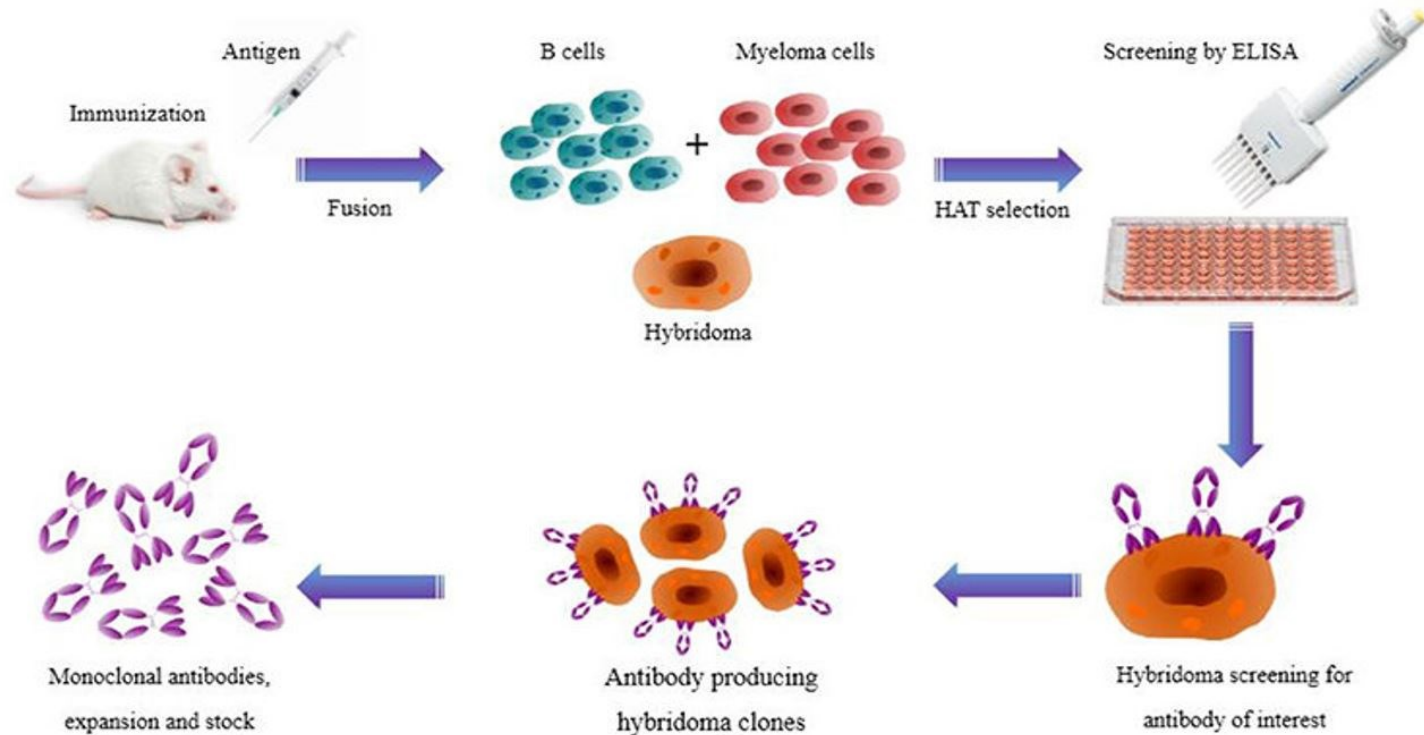
1. Purificare una piccola quantità della molecola di interesse (di solito decine di microgrammi), possibilmente con una purezza maggiore del 99% per evitare di stimolare la produzione di anticorpi contro antigeni contaminanti. (Es: una proteina contenuta in una banda ottenuta da un'elettroforesi su gel di poliacrilammide, oppure si possono usare come antigeni peptidi sintetici progettati in base alla sequenza della proteina di interesse).
2. Iniettare la molecola antigene in un organismo ospite (generalmente un mammifero di piccola taglia come il topo, il ratto, il coniglio o la capra). Lo schema di immunizzazione segue un po' quello che si utilizza nelle vaccinazioni, con una prima iniezione e 2-3 iniezioni di richiamo a distanza di qualche settimana. A volte si utilizzano adiuvanti, cioè sostanze che stimolano la risposta anticorpale.
3. Prelevare il siero dell'animale immunizzato, che contiene l'anticorpo. In genere è desiderabile "arricchire" la preparazione, purificando l'anticorpo, anche se solo parzialmente (per esempio mediante cromatografia di affinità).
4. Un anticorpo così ottenuto viene detto anticorpo policlonale, perché è una miscela di diverse popolazioni anticorpali, prodotte da diversi cloni linfocitari, che riconoscono epitopi diversi dello stesso antigene

PRODUZIONE DI ANTICORPI MONOCLONALI

- Per ottenere un riconoscimento molecolare e un segnale più specifici, può essere opportuno usare un anticorpo monoclonale, cioè prodotto da un unico clone cellulare, che, quindi, riconosce un unico epitopo.
- La produzione di anticorpi monoclonali è un po' più complessa e costosa di quella dei policlonali
- L'antigene purificato viene iniettato in un topo e si provoca la produzione di anticorpi, come per gli anticorpi policlonali. Poi viene prelevata la milza e le cellule vengono fuse con cellule di mieloma che (essendo cellule tumorali) in condizioni opportune si propagano virtualmente indefinitamente.
- Le risultanti cellule ibride (dette ibridomi) vengono cresciute e diluite tanto da potere isolare un certo numero di cloni cellulari, derivati da singole cellule, che vengono selezionati per la capacità di produrre anticorpi in grado di riconoscere l'antigene.
- Ogni clone, per definizione, produce un solo tipo di anticorpo, diretto contro un singolo epitopo presente sull'antigene.
- Procedura laboriosa, MA oggi viene impiegata sempre più spesso perché, una volta ottenuta, una buona linea di ibridoma può essere mantenuta indefinitamente e continuare per anni a rilasciare gli anticorpi nel mezzo di coltura, da cui poi vengono purificati

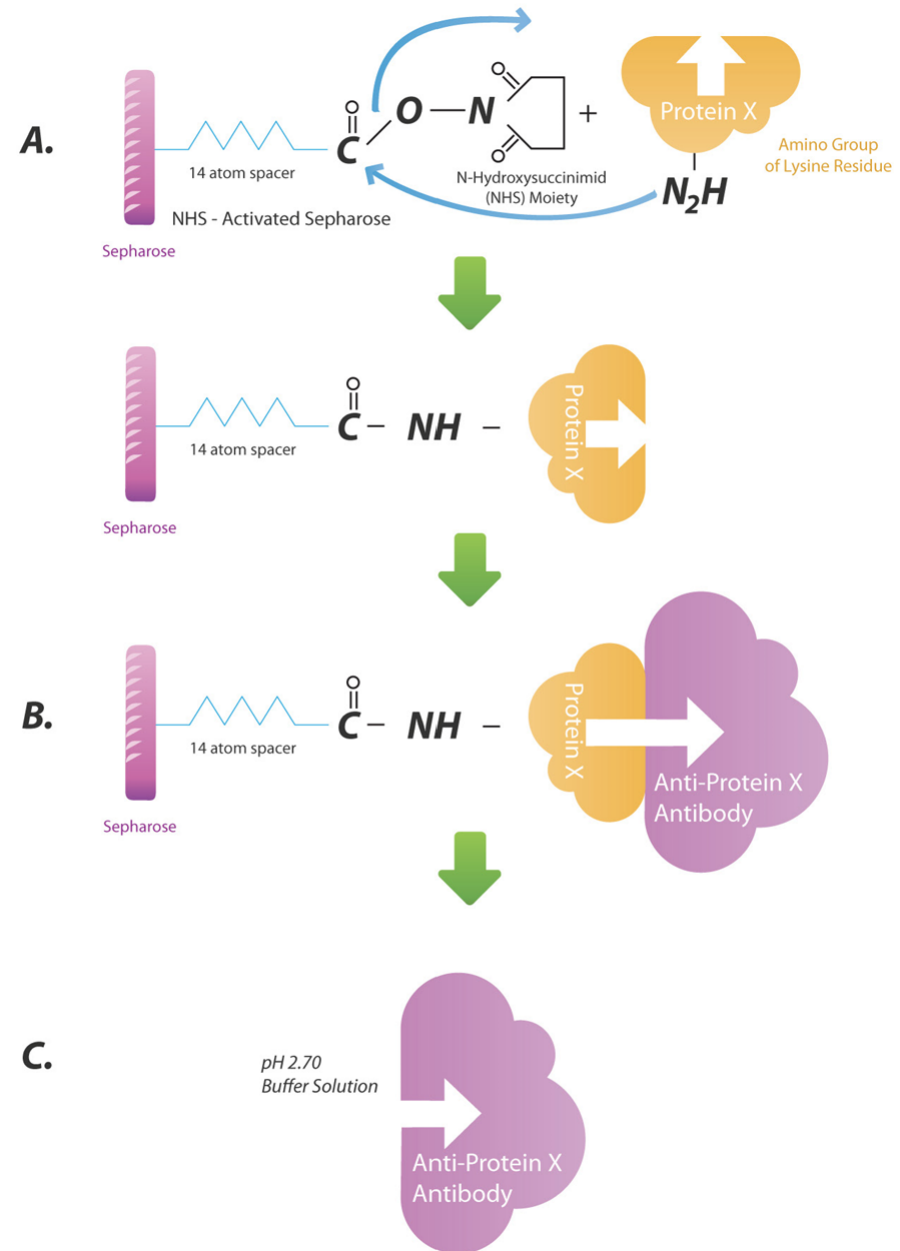
Tecnologia degli ibridomi

Sviluppata da Kohler e Milstein



Nel 1984 a Niels Jerne *Premio Nobel per la Medicina* per il lavoro sul sistema immunitario e la produzione degli anticorpi monoclonali

PURIFICAZIONE DI ANTICORPI

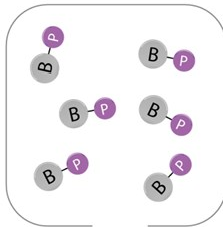


PURIFICAZIONE DI ANTICORPI

Figure I-3 - Schematic illustration of column chromatography setup for antigen affinity purification of antibodies.

A.

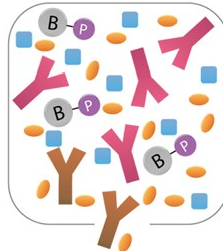
Column chromatography setup containing antigen-bound beads.



B - Solid support Bead
P - Antigenic Protein

B.

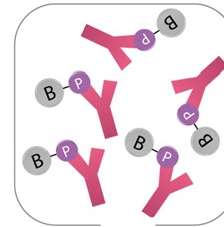
Anti-serum is passed through the column.



Unrelated serum constituents

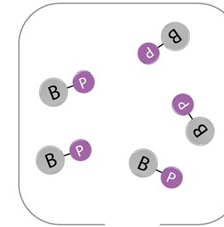
C.

Column after serial washing at pH 7.2 and pH 5.0.



D.

Release (elution) of Antigen-specific antibodies with acidic buffer (pH 2.7).



Antigen-specific Antibodies

WESTERN BLOT O (IMMUNOBLOT)

Tecnica largamente impiegata per visualizzare e dosare semi-quantitativamente una proteina presente in una miscela (un estratto cellulare o un siero) immobilizzata su una membrana.

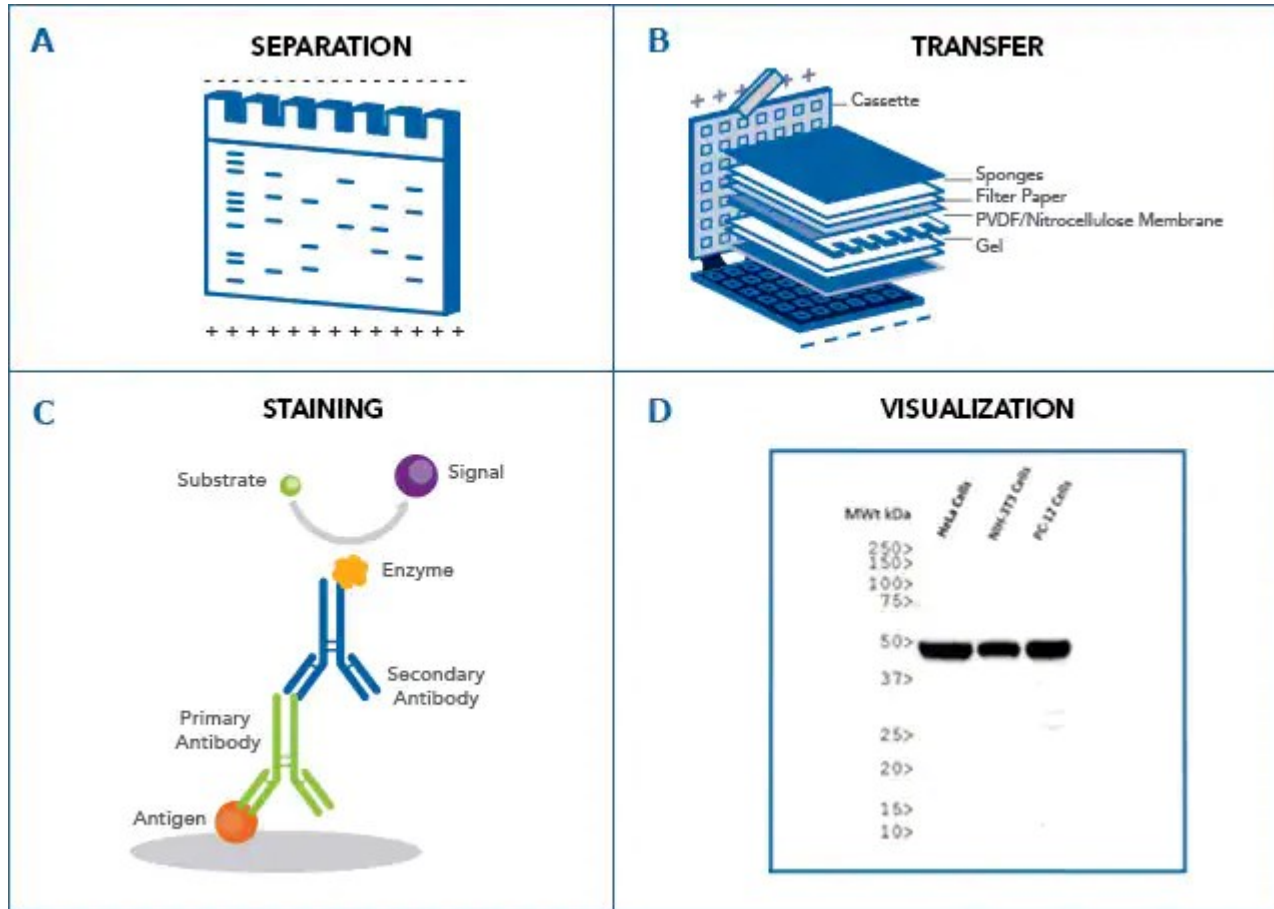
1. La miscela proteica viene sottoposta a elettroforesi di solito si utilizza SDS-PAGE senza colorare le proteine con blu di Coomassie o altri metodi.
2. Dopo la corsa, si trasferiscono le bande proteiche dal gel a una membrana di nitrocellulosa o PVDF (polivinildenfluoruro). Il gel viene messo a contatto con la membrana in un sandwich fra due strati di spugna e carta da filtro. Il sandwich viene poi posto in un piccolo apparato che consente la migrazione delle proteine per elettroforesi, ma con il campo elettrico indirizzato ortogonalmente al sandwich (electroblotting);
3. A trasferimento avvenuto, la membrana viene prelevata dal sandwich e incubata prima con una soluzione di blocco per saturare la membrana e, poi, con un anticorpo diretto contro la proteina di interesse (anticorpo primario), a cui si lega specificamente, in un opportuno tampone di binding. Si può controllare che il trasferimento sia stato efficiente colorando il gel e verificando che sia privo di bande proteiche.

WESTERN BLOT O (IMMUNOBLOT)

4. L'anticorpo non legato viene rimosso mediante diversi lavaggi con il tampone di binding.
5. Il complesso antigene-anticorpo, presente sul filtro viene rivelato utilizzando un anticorpo secondario, diretto contro l'anticorpo primario. L'anticorpo secondario viene scelto a seconda della specie animale che ha fornito l'anticorpo primario (per esempio, se l'Ab primario era stato preparato in topo, l'Ab secondario deve riconoscere gli Ab di topo e, quindi, deve essere stato preparato in un altro ospite, per esempio pecora).
6. L'anticorpo secondario viene scelto anche a seconda del metodo di rivelazione che si intende utilizzare. Infatti queste molecole sono fornite in forma modificata, coniugate covalentemente alla biotina o a un enzima (es: fosfatasi alcalina o perossidasi di rafano). Alla fine dell'incubazione, quando si è formato il **complesso Ag-Ab primario-Ab secondario**, la membrana viene incubata con il substrato degli enzimi che vengono trasformati in un prodotto insolubile (che quindi rimane in prossimità del complesso) e colorato o luminescente. Poiché una singola molecola di enzima (legato all'anticorpo secondario) reagisce con più molecole di substrato e produce molte molecole di prodotto colorato, l'enzima amplifica il segnale.

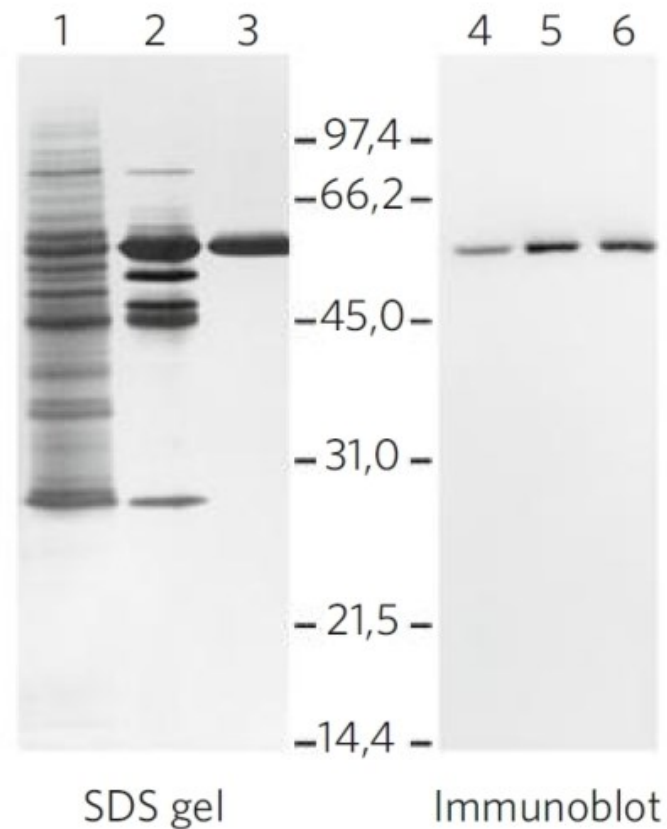
WESTERN BLOT O (IMMUNOBLOT)

Rilevazione delle bande con un sistema ottico ed, eventualmente, una misura densitometrica per ottenere una stima **semi-quantitativa** delle bande.



Questa tecnica, anche a causa dell'elevato numero di variabili sperimentali dovute alla complessità delle manipolazioni e al numero di reagenti, deve essere considerata semi-quantitativa e affidabile per misure quantitative relative, cioè di confronto tra campioni diversi, ma difficilmente in grado di fornire misure quantitative assolute

Una comune applicazione dell'immunoblot. Le corsie da 1 a 3 derivano da un'elettroforesi su gel in presenza di SDS; le proteine presenti in campioni raccolti nelle successive tappe di purificazione di una proteina chinasi sono state separate e colorate con il blu di Coomassie. Le corsie da 4 a 6 mostrano gli stessi campioni che, dopo la separazione elettroforetica, sono stati trasferiti su una membrana di nitrocellulosa. La membrana è stata quindi trattata con un anticorpo contro la proteina chinasi. I numeri tra l'SDS gel e l'immunoblot si riferiscono ai valori delle M_r , indicate in migliaia. [Fonte: (b) State of Wisconsin Lab of Hygiene, Madison, WI.]

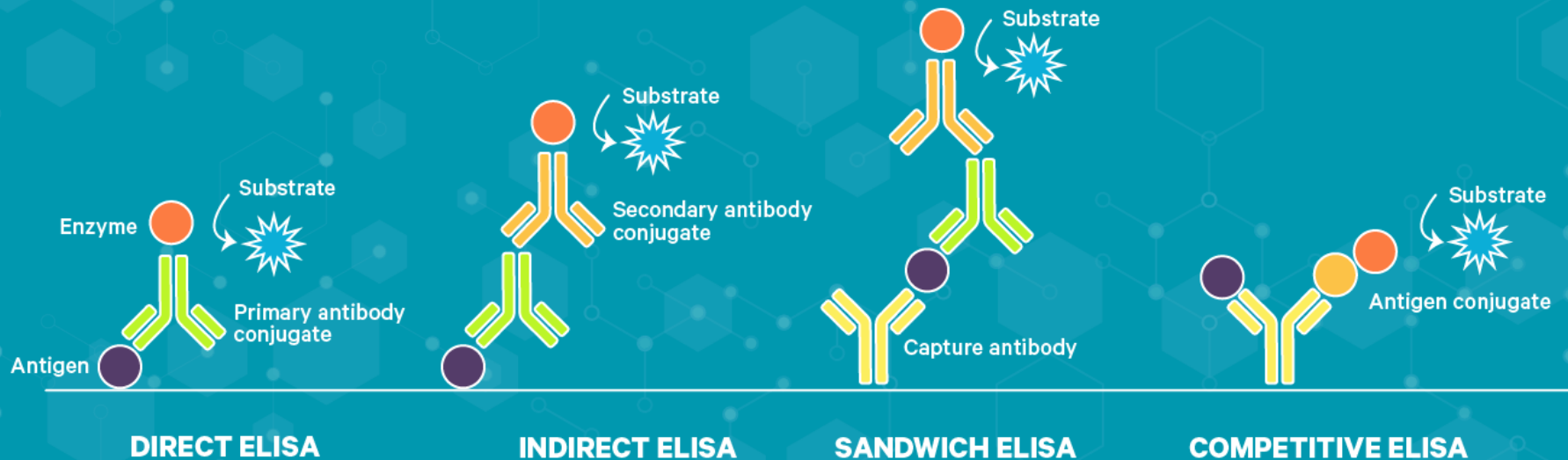


ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA)

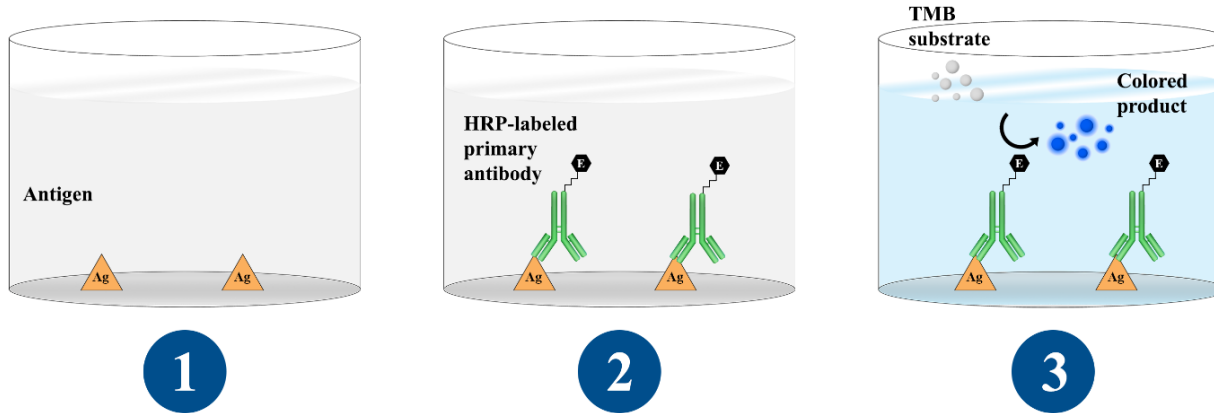
Tecnica immunochimica molto diffusa che consente misure quantitative assai più precise. Utilizzata per dosare qualsiasi composto immunogenico per il quale si disponga di un anticorpo specifico. La tecnica può essere utilizzata in maniera qualitativa (per esempio per rilevare la presenza di un allergene in un siero) o quantitativa (per esempio per misurare la quantità di una citochina in un terreno di coltura cellulare).

Il principio dell'ELISA è quello di immobilizzare l'antigene su un supporto solido (generalmente il fondo di un pozzetto in una micropiastra). Una volta immobilizzato, l'antigene può essere misurato utilizzando un anticorpo legato a un enzima che fornisce un prodotto evidenziabile colorimetricamente oppure, analogamente a quanto descritto per il Western blot, consentendo il riconoscimento con un anticorpo primario, a sua volta riconosciuto da un anticorpo secondario legato a un enzima che fornisce un prodotto evidenziabile colorimetricamente.

TIPI DIVERSI DI ELISA



ELISA DIRETTO



Adatto per la rilevazione qualitativa e quantitativa dell'antigene nei campioni di interesse, per lo screening degli anticorpi e per la mappatura degli epitopi.

L'antigene viene immobilizzato sui pozzetti di una piastra di polistirene a 96 pozzetti mediante adsorbimento passivo.

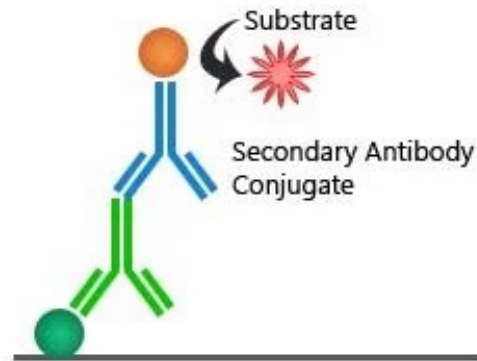
Un anticorpo primario marcato con un enzima (ad esempio un anticorpo primario marcato con HRP) specifico per l'antigene target viene aggiunto ai pozzetti e si lega direttamente all'antigene.

Viene aggiunto un rispettivo substrato enzimatico (TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine), un substrato adatto per l'HRP) che, reagendo con l'enzima, produce un risultato colorimetrico visibile che può essere misurato da uno spettrofotometro o da un lettore di micropiastre ad assorbanza.

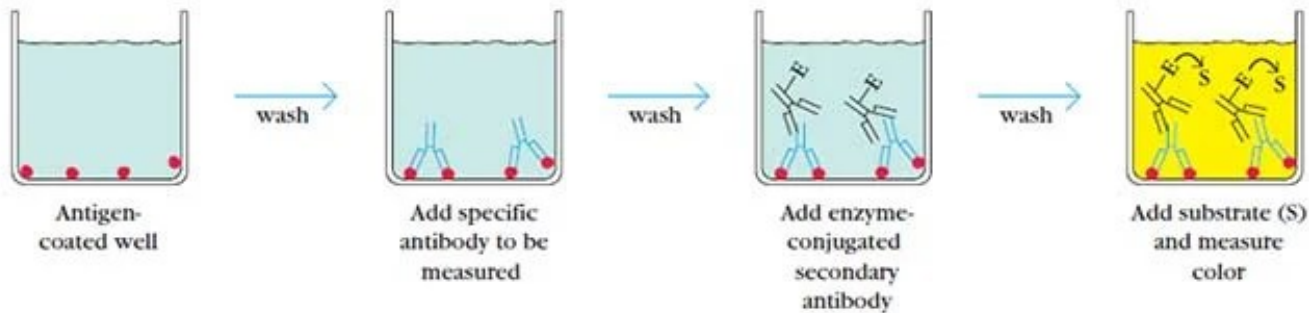
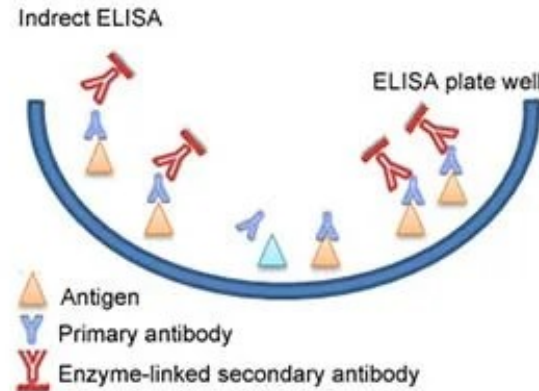
Vantaggi: Protocollo semplice e veloce

Svantaggi: Meno specifico poiché si utilizza solo 1 anticorpo. Devo coniugare l'Ab all'enzima. Potenziale elevato background se tutte le proteine di un campione sono immobilizzate nel pozzetto.

ELISA INDIRECTO



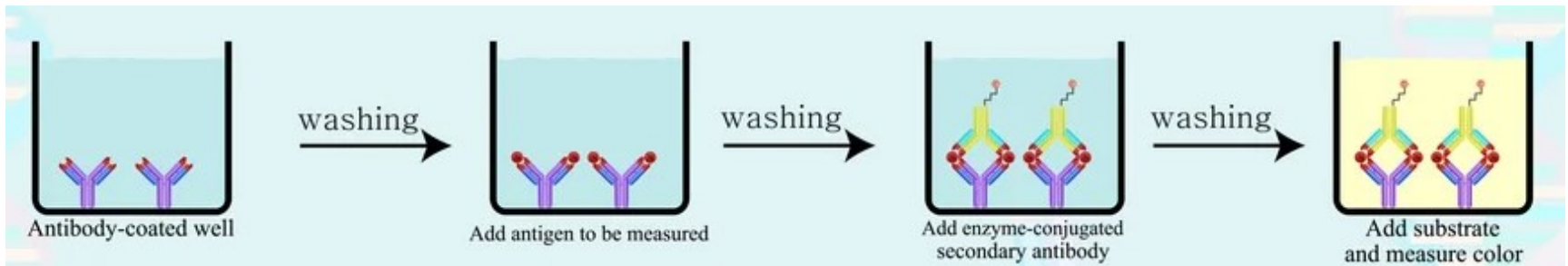
INDIRECT ELISA



Alta sensibilità: Per ogni molecola di antigene si lega più di un anticorpo marcato;
Flessibilità: È possibile utilizzare diversi anticorpi primari di rilevazione con un singolo anticorpo secondario marcato;
Risparmio di costi: Sono necessari meno anticorpi marcati.

ELISA A SANDWICH

Il legame dell'antigene al supporto è mediato da un anticorpo contro lo stesso antigene. Il vantaggio del sistema a sandwich è che, poiché solo l'antigene è immobilizzato dal legame con gli anticorpi specifici, è possibile rimuovere mediante lavaggi successivi tutti i contaminanti non riconosciuti o riconosciuti solo debolmente dall'anticorpo, un'operazione che rende la tecnica molto specifica e precisa.

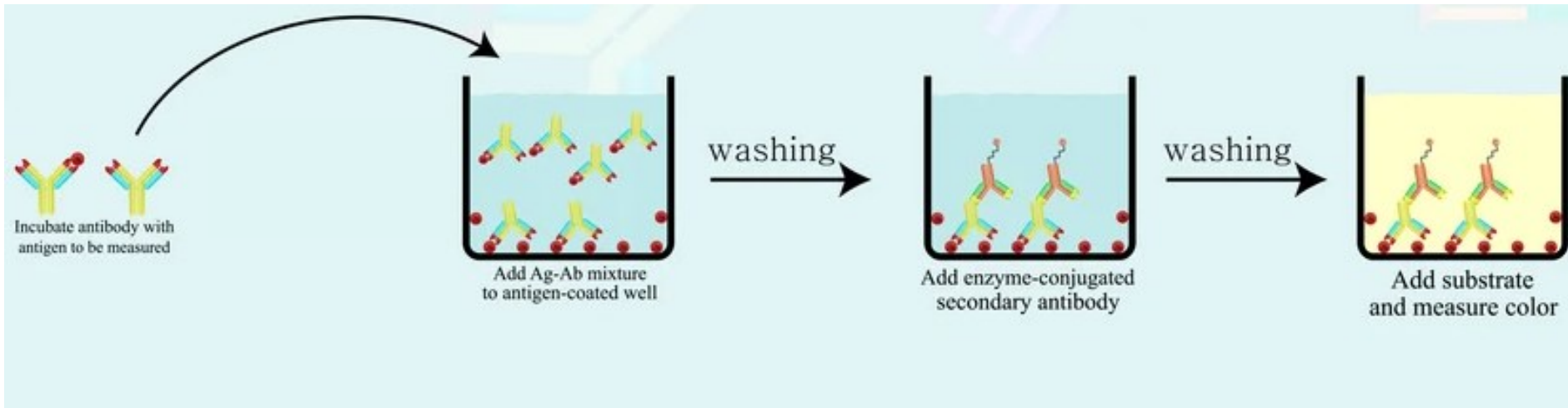


ELISA COMPETITIVO

ELISA di inibizione o immunodosaggio competitivo, misura la concentrazione di un antigene attraverso la rilevazione dell'interferenza del segnale. Ciascuno tipo di ELISA può essere adattato al formato competitivo.

- L'Ag nel campione compete con un Ag di riferimento per il legame con una quantità specifica di Ab.
- Una piastra a pozzetti multipli viene rivestita con l'Ag di riferimento
- Il campione viene pre-incubato con l'Ab e aggiunto ai pozzetti.
- A seconda della quantità di Ag presente nel campione, saranno disponibili più o meno Ab liberi per legare l'Ag di riferimento. Più Ag è presente nel campione, meno Ag di riferimento verrà rilevato e più debole sarà il segnale.

ELISA COMPETITIVO



RILEVAZIONE DEL SEGNALE

Qualunque sia la variante dell'ELISA impiegata, la misura quantitativa del segnale si ottiene leggendo l'assorbanza dei campioni a un'opportuna lunghezza d'onda in un lettore ottico simile a uno spettrofotometro (o colorimetro) in grado di ospitare piastre multipozzetto; i valori ottenuti vengono confrontati con quelli di una retta di calibrazione standard costruita con quantità note dell'antigene purificato (la procedura è identica a quella per la determinazione della concentrazione delle proteine con metodi colorimetrici).

Advantages		Disadvantages
Direct ELISA	■ Rapid ■ Secondary antibody cross-reactivity eliminated	■ Low sensitivity ■ Specific antibody for each ELISA; time-consuming and expensive
Indirect ELISA	■ High sensitivity ■ Cost-saving ■ Flexible; can use many primary antibodies	■ Risk of cross-reactivity between secondary antibodies
Sandwich ELISA	■ Minimal sample purification needed ■ High sensitivity and specificity	■ Must use 'matched pair' primary and secondary antibodies ■ Time consuming and expensive
Competitive ELISA	■ Minimal sample purification needed ■ Used to measure large range of antigens in a sample ■ Used for small antigens ■ Low variability	■ Low specificity so cannot be used in dilute samples

Antigene:	macromolecola capace di reagire con i prodotti del sistema immunitario
Determinante antigenico: (detto anche epitopo).	<u>Piccola parte</u> di antigene che lega un anticorpo specifico. Una singolo antigene può contenere molti epitopi simili riconosciuti da un particolare anticorpi, e anche molti epitopi differenti riconosciuti da anticorpi diversi
Antigenicità: (specificità antigenica)	Capacità dell'antigene di combinarsi specificamente con un anticorpo
Immunogenicità (potere "immunogeno"):	Capacità dell'antigene di indurre una risposta immunitaria
Aptene:	piccola molecola (<10 kDa) antigenica ma non immunogena. Diventa immunogena se legata a macromolecola <i>carrier</i>
Adiuvante:	sostanza in grado di stimolare e aumentare la risposta ad un antigene, senza manifestare essa stessa proprietà antigeniche.
Anticorpi policlonali:	miscela di anticorpi diversi fra loro ottenuti dall'immunizzazione di un animale con un antigene che contiene diversi epitopi. Ogni anticorpo deriva da un diverso clone di cellule B.
Anticorpi monoclonali: (mAb)	anticorpi identici fra loro prodotti da linee cellulari provenienti da un solo clone di cellule B (isolate specificatamente). I linfociti B sono immortalizzati fondendoli con cellule trasformate (ibridomi)