

***CORSO DI LAUREA IN BIOLOGIA PER LA  
SOSTENIBILITÀ***



***BIOCHIMICA APPLICATA  
(6 CFU)***

**LEZIONE 5**

**Prof. Paola Di Donato**

**Dipartimento di Scienze e Tecnologie**

**Stanza 520, V piano lato NORD**

**Tel. 081 547 6625**

**E-mail: [paola.didonato@uniparthenope.it](mailto:paola.didonato@uniparthenope.it)**

# DOSAGGI IMMUNOLOGICI

## Tipologia saggio

### COMPETITIVO

-Ag nel campione compete con antigene marcato ( $Ag^*$ ) per il legame con Ab in quantità limitante

### NON COMPETITIVO

-Anticorpo marcato  $Ab^*$  per testare Ag in quantità incognita

## Tipologia marcatura

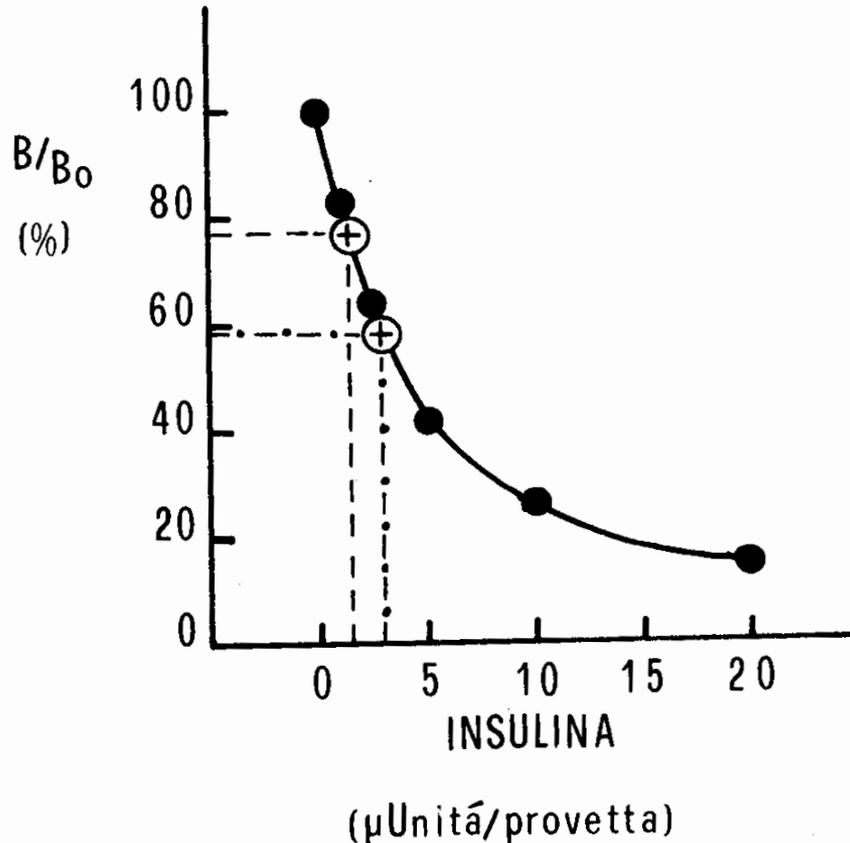
### DIRETTA

-Ab marcato con tracciante radioattivo, fluorescente o enzimatico

### INDIRETTA

-Anticorpo primario non marcato evidenziato con  $Ab^*$  secondario

# The principle of a simple example of radioimmunoassay (RIA)



- One of the most sensitive techniques for measuring hormones, drugs, & vitamins at conc. of  $10^{-12}$  M first discovered by Rosalyn Yalow and Solomon Aaron Berson in the 1950s.
- The principle involves competitive binding of radiolabeled Ag and unlabeled Ag to the limited supply of a high affinity Ab.

-  $B/B_0 \times 100$  in funzione di quantità crescenti di ormone non radioattivo. L'interpolazione nella curva dei valori  $B/B_0$  ottenuti con  $Sx_1$  (---) e  $Sx_2$  (- . - . -) fornisce i corrispondenti valori di concentrazione di insulina nei rispettivi campioni di plasma.

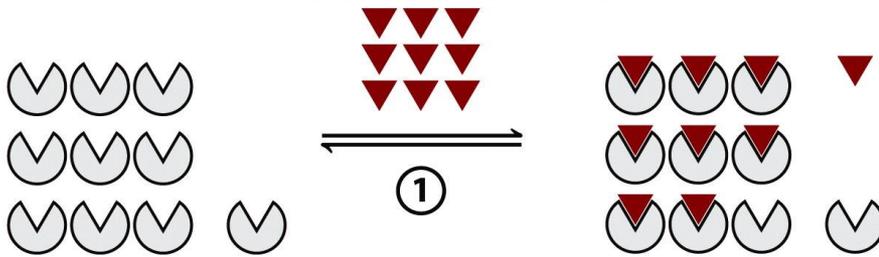
$$B/B_0 = \text{Ag}^* \text{ bound} / \text{Ag}^*$$

METODO COMPETITIVO

MARCATURA DIRETTA

A radioimmunoassay for adrenocorticotrophic hormone (ACTH; called corticotropin)

Radiolabeled hormone



Antibody

Radiolabeled and unlabeled hormone

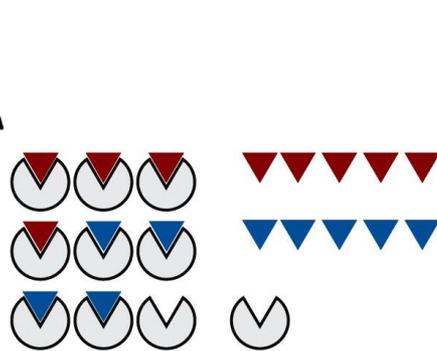


Figure 23-3a  
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition  
© 2008 W.H. Freeman and Company

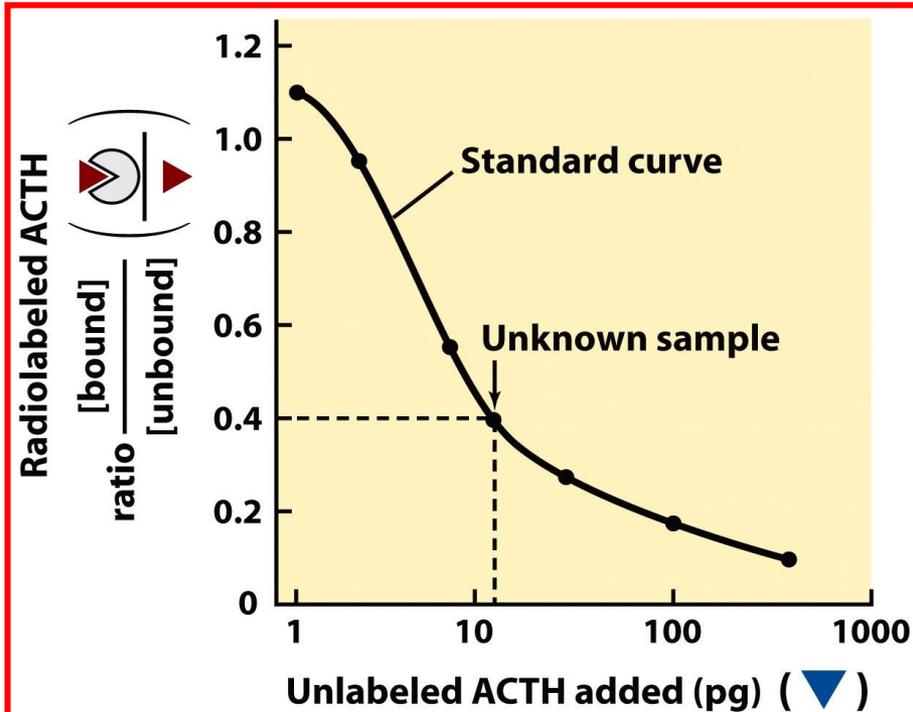


Figure 23-3b  
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition  
© 2008 W.H. Freeman and Company

Dosaggio delle proteine: metodi immunochimici



# The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1977

The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1977 was divided, one half jointly to Roger Guillemin and Andrew V. Schally "for their discoveries concerning the peptide hormone production of the brain" and the other half to **Rosalyn Yalow** "for the development of radioimmunoassays of peptide hormones."

**Radioimmunoassay: A Probe for Fine  
Structure of Biological Systems**

# Rosalyn Yalow

## Banquet speech

Rosalyn Yalow's speech at the Nobel Banquet, December 10, 1977

Your Majesties, Your Royal Highnesses, Ladies, Gentlemen and you, the Students, who are the carriers of our hopes for the survival of the world and our dreams for its future. Tradition has ordained that one of the Laureates represent all of us in responding to your tribute. The choice of one among the several deemed truly and equally distinguished must indeed be difficult. Perhaps I have been selected for this privilege because there is certainly one way in which I am distinguishable from the others. This difference permits me to address myself first to a very special problem.

Among you Students of Stockholm and among other students, at least in the Western world, **women are represented in reasonable proportion to their numbers in the community; yet among the scientists, scholars and leaders of our world they are not.** No objective testing has revealed such substantial differences in talent as to account for this discrepancy. The failure of women to have reached positions of leadership has been due in large part to social and professional discrimination. In the past, few women have tried and even fewer have succeeded. **We still** live in a world in which a significant fraction of people, including women, **believe that a woman belongs and wants to belong exclusively in the home; that a woman should not aspire to achieve more than her male counterparts and particularly not more than her husband.** Even now women with exceptional qualities for leadership sense from their parents, teachers and peers that they must be harder-working, accomplish more and yet are less likely to receive appropriate rewards than are men. These are real problems which may never disappear or, at best, will change very slowly.

Rosalyn Yalow  
Banquet speech

We cannot expect in the immediate future that all women who seek it will achieve full equality of opportunity. But if women are to start moving towards that goal, **we must believe in ourselves or no one else will believe in us**; we must match our aspirations with the competence, courage and determination to succeed; and we must feel a personal responsibility to ease the path for those who come afterwards. **The world cannot afford the loss of the talents of half its people if we are to solve the many problems which beset us.**

If we are to have faith that mankind will survive and thrive on the face of the earth, we must believe that **each succeeding generation will be wiser than its progenitors**. We transmit to you, the next generation, the total sum of our knowledge. Yours is the responsibility to use it, add to it, and transmit it to your children.

A decade ago during the period of world-wide student uprisings there was deep concern that too many of our young people were so disillusioned as to feel that the world must be destroyed before it could be rebuilt. Even now, it is all too easy to be pessimistic if we consider our multiple problems: the possible depletion of resources faster than science can generate replacements or substitutes; hostilities between nations and between groups within nations which appear not to be resolvable; unemployment and vast inequalities among different races and different lands. Even as we envision and solve scientific problems – and put men on the moon – **we appear ill-equipped to provide solutions for the social ills that beset us.**

**We bequeath to you, the next generation, our knowledge but also our problems.**

**While we still live, let us join hands, hearts and minds to work together for their solution so that your world will be better than ours and the world of your children even better.**

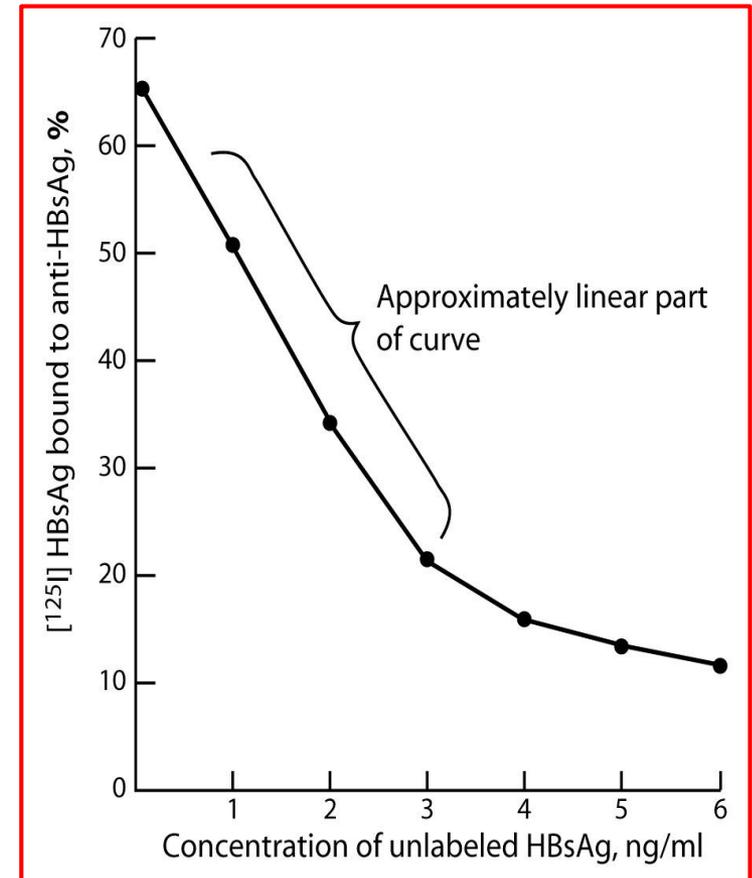
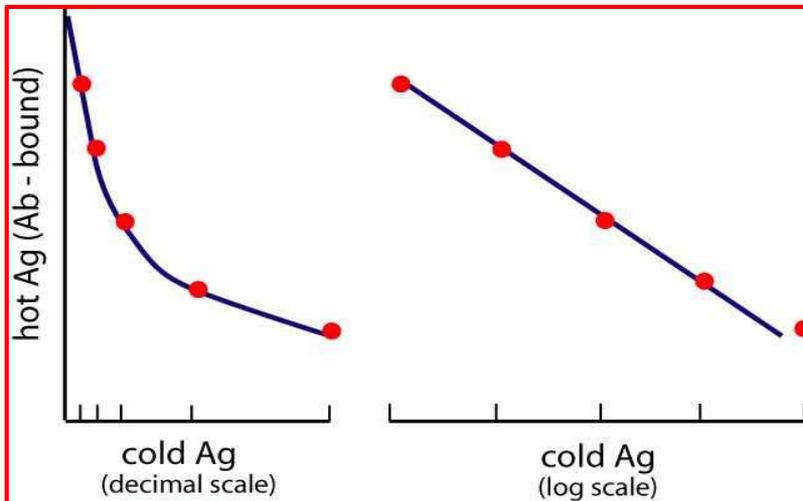
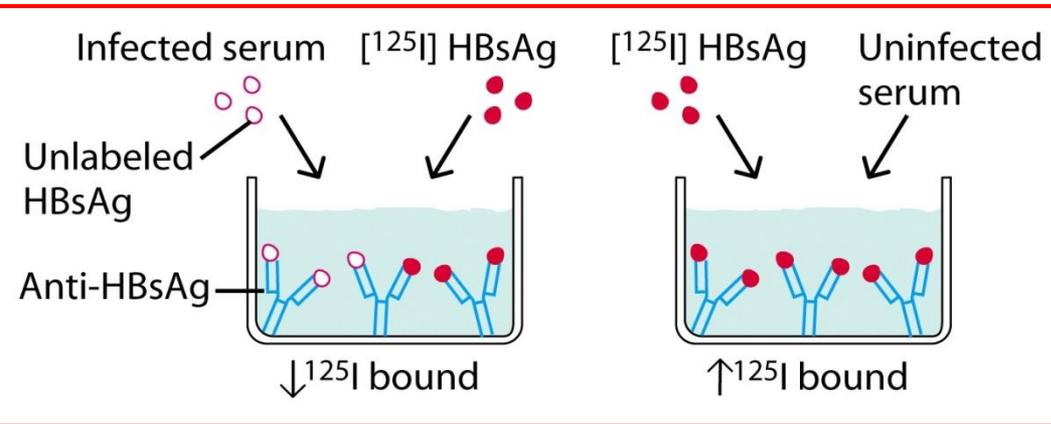
Rosalyn Yalow  
Banquet speech

# A solid-phase radioimmunoassay (RIA) to detect hepatitis B virus in blood samples

METODO COMPETITIVO

MARCATURA DIRETTA

## A standard curve to determine the conc. of HBsAg in unknown serum.



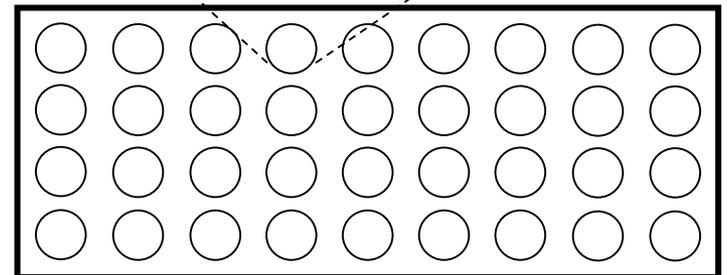
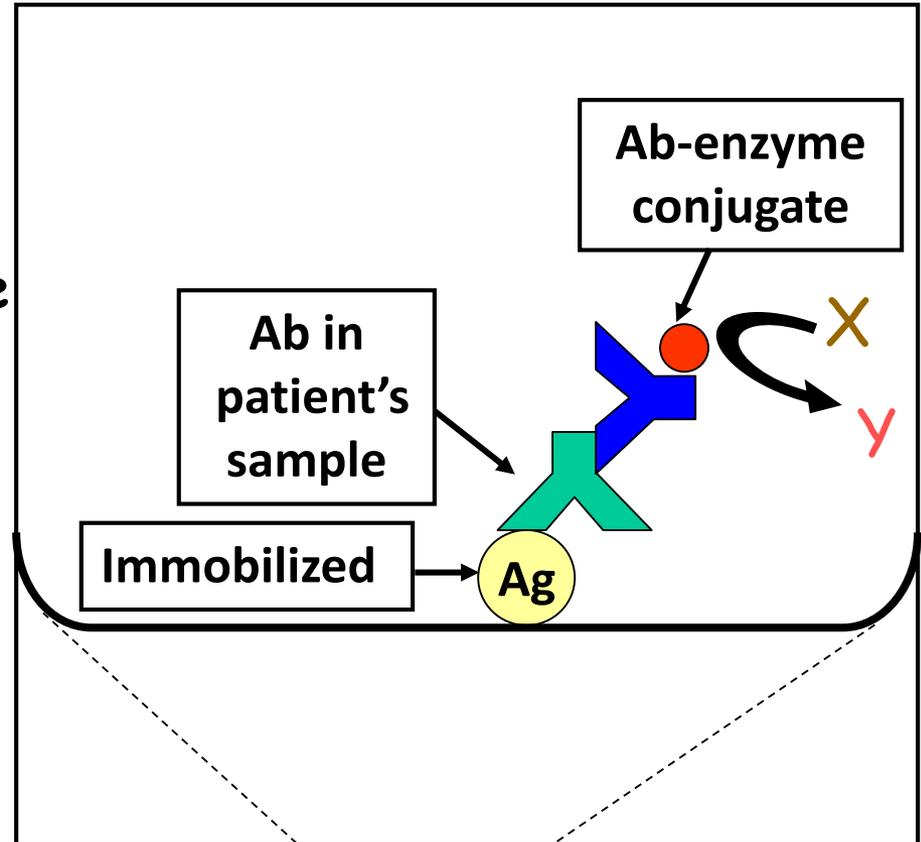
# Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

METODO NON COMPETITIVO

MARCATURA INDIRECTA

Used for Ab detection

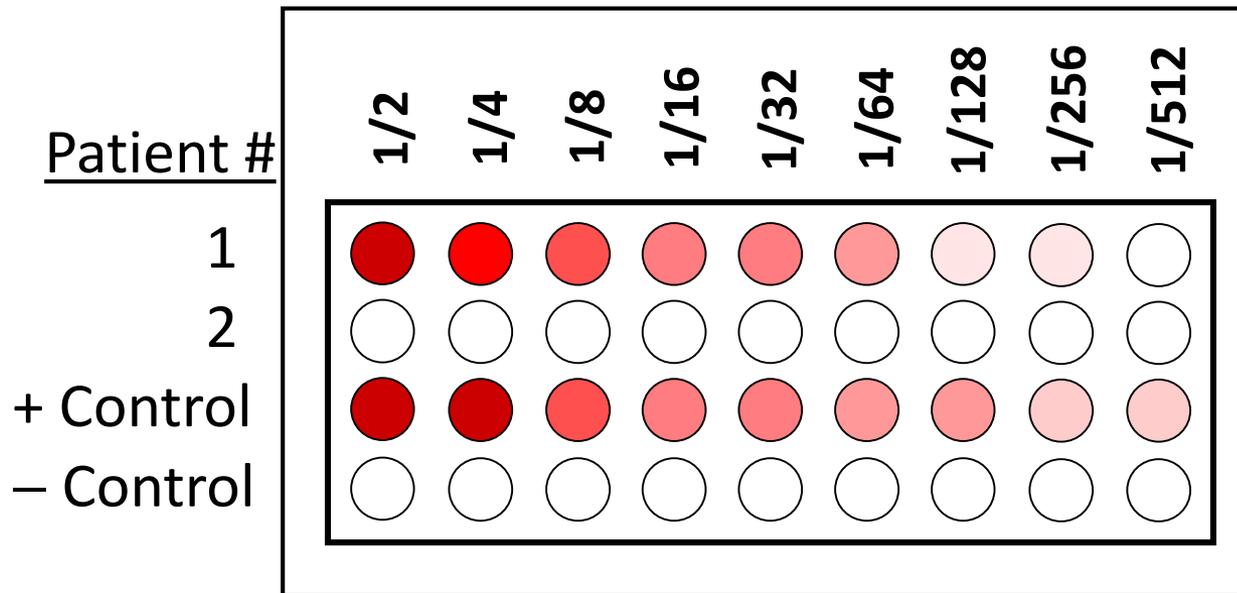
- Immobilize Ag
- Incubate with patient sample
- Add **antibody-enzyme conjugate**
- Amount of **antibody-enzyme conjugate** bound is proportional to amount of **Ab** in the sample
- Add **substrate** of enzyme
- Amount of **color** is proportional to amount of **Ab** in patient's sample



Dosaggio delle proteine: metodi immunochimici

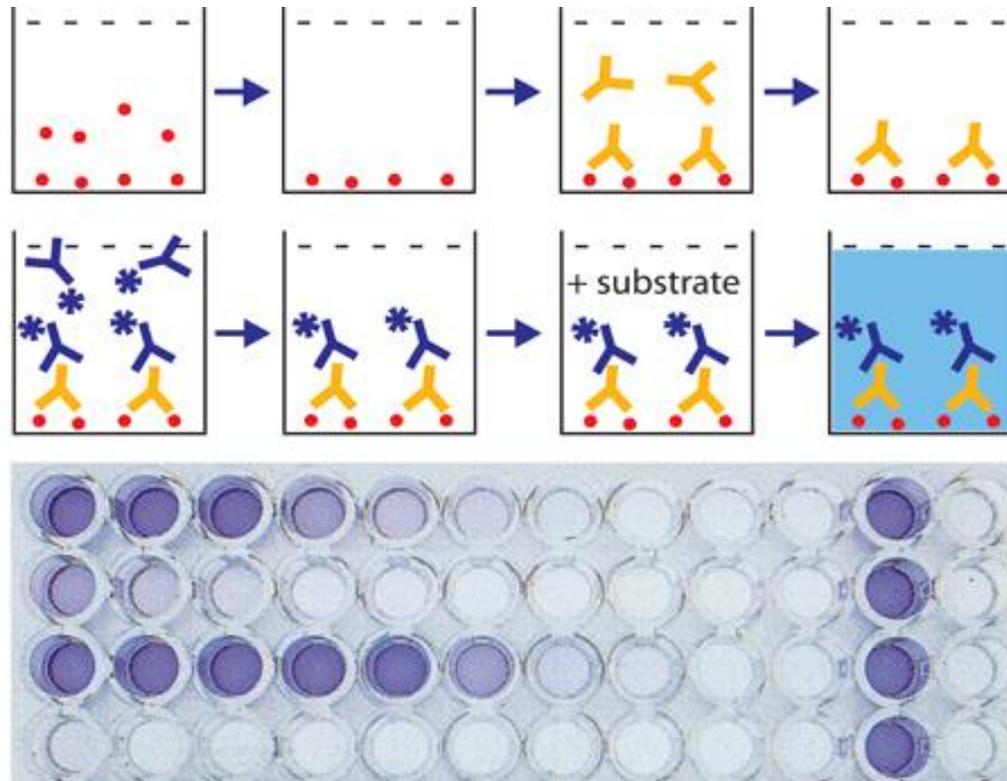
# ELISA

Dilutions of patient sample are placed in adjacent wells of microtiter plate



More intense color = more Ab present

# An example of enzyme-linked immunosorbent assay.



# Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)



Partially purified, inactivated HIV antigens pre-coated onto an ELISA plate



Patient serum which contains antibodies. If the patient is HIV+, then this serum will contain antibodies to HIV, and those antibodies will bind to the HIV antigens on the plate.

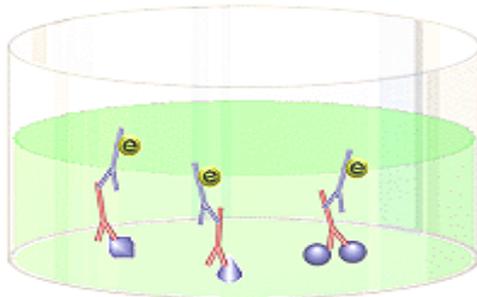


Anti-human immunoglobulin coupled to an enzyme. This is the second antibody, and it binds to human antibodies.

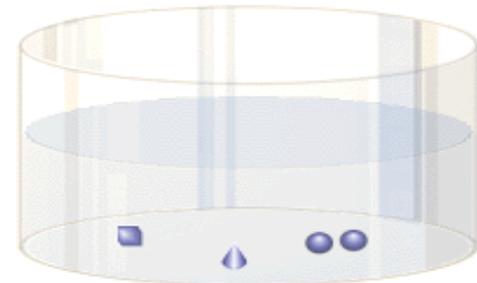


Chromogen or substrate which changes color when cleaved by the enzyme attached to the second antibody.

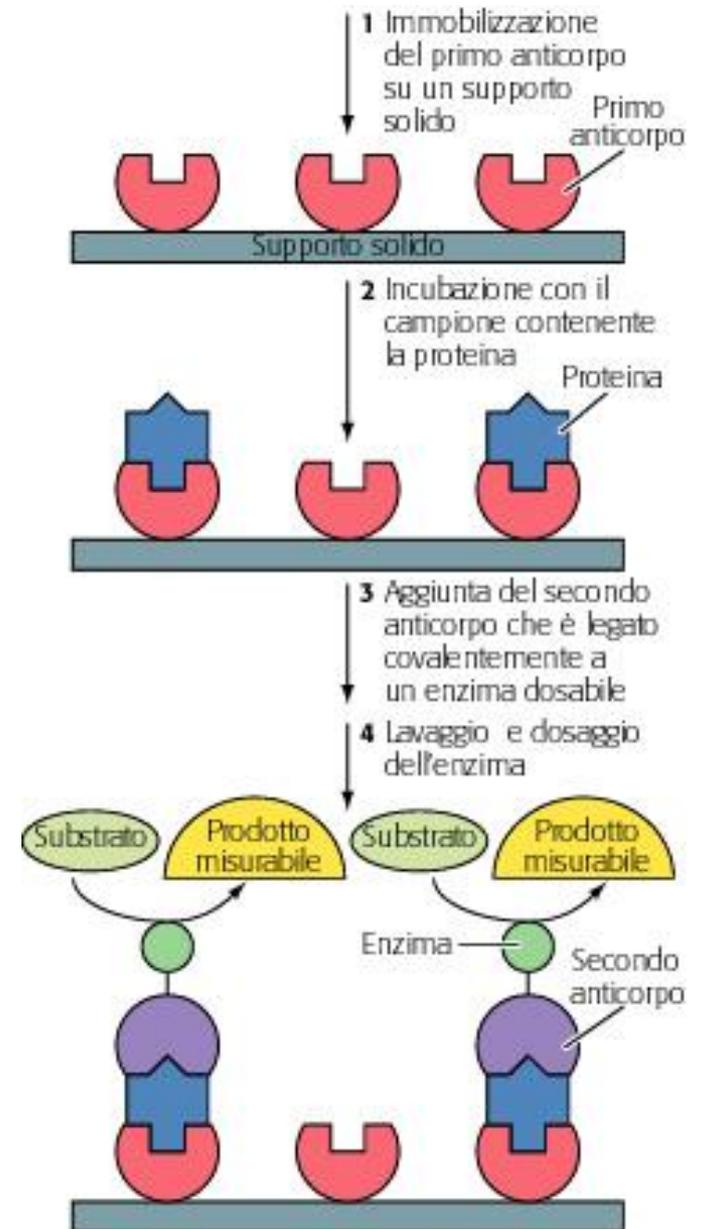
***Positive ELISA Test***



***Negative ELISA Test***



L'utilizzo di *anticorpi monoclonali* o *policlonali*, prodotti contro un particolare enzima, può fornire la base per un dosaggio enzimatico, basato sul metodo **ELISA**, altamente specifico, in grado di distinguere *isoenzimi* o *enzimi diversi* che catalizzano reazioni identiche. Questi metodi sono di notevole importanza diagnostica



# Saggi enzimatici

- ✓ principi
- ✓ metodi di saggio
  - ✓ spettrofotometrici
  - ✓ spettrofluorimetrici
  - ✓ chemiluminescenza
  - ✓ bioluminescenza
  - ✓ radioattivi

# Dosare un enzima

- Misurare l'attività enzimatica x la quantificazione e la caratterizzazione delle proprietà cinetiche
- Enzimi nella diagnostica clinica
- Dosare metaboliti
- Indicatore della formazione di un complesso (ELISA; Western blotting)

# Dosare un enzima

- **Attività enzimatica:** è espressa in base alla velocità della reazione promossa dall'enzima, misurando una grandezza determinabile sperimentalmente che possa essere assunta come misura della velocità stessa.
  - **Unità internaz. (UI):** quantità di enzima che converte 1  $\mu\text{mol}$  substrato in 1 min a pH e forza ionica ottimali e alla T di 25°C ( $\mu\text{mol}/\text{min}$ ).
  - **katal (SI):** quantità di enzima che converte 1 mol substrato in 1 sec ( $\text{mole}/\text{sec}$ )  $6 \times 10^7$  UI
  - **Attività specifica:** (UI)/mg proteine aumenta nel corso della purificazione dell'enzima

# Come si misura l'attività di un enzima ?



- Velocità di reazione: quantità di substrato trasformato nel tempo

$$v = -d[S]/dt = d[P]/dt$$

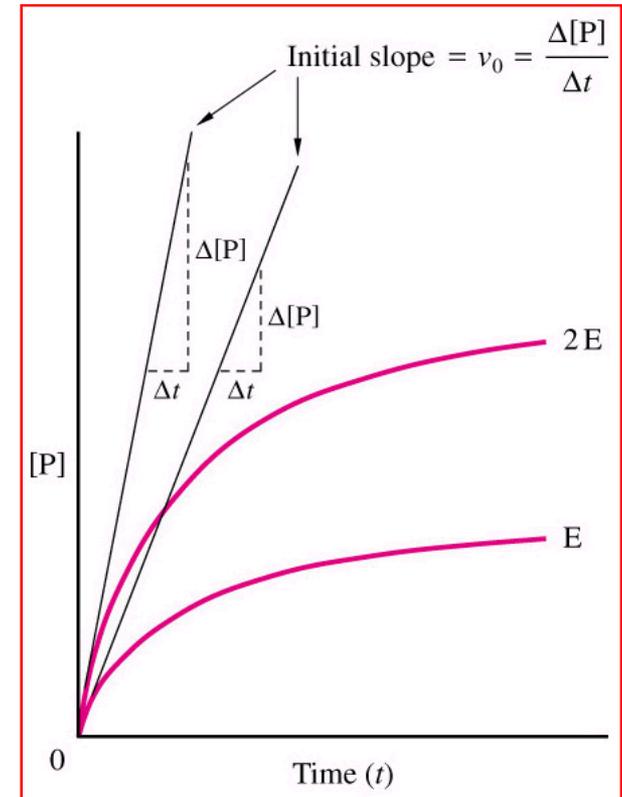
- Si misura la variazione nel tempo di una qualsiasi grandezza correlata alla concentrazione del substrato o del prodotto

# Misurazione della velocità iniziale ( $v_0$ )

- La velocità è legata alla [ ] dal substrato, ma [S] cambia nel tempo (si consuma)
- Per semplicità, la cinetica viene studiata in condizioni iniziali (tempo = 0)

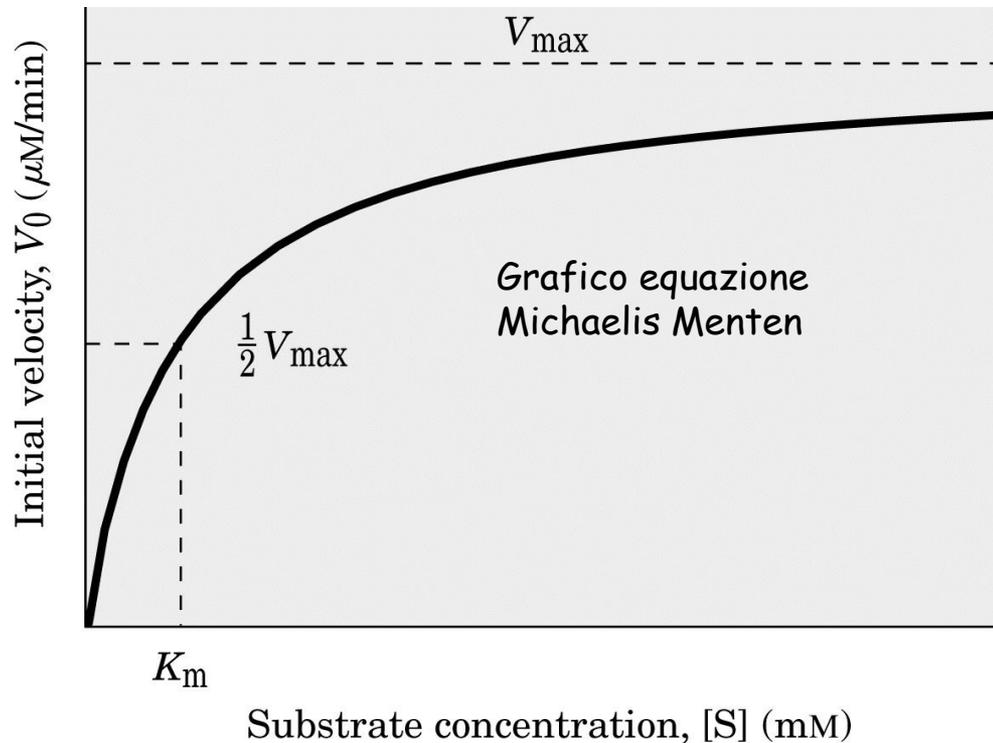
- In queste condizioni,
  - [S]  $\gg$  [E]
  - [P]  $\approx$  0 (la reazione inversa da P a S è trascurabile)

Per misurare l'attività enzimatica **si lavora in eccesso di substrato**



# IN QUALI CONDIZIONI FARE I DOSAGGI?

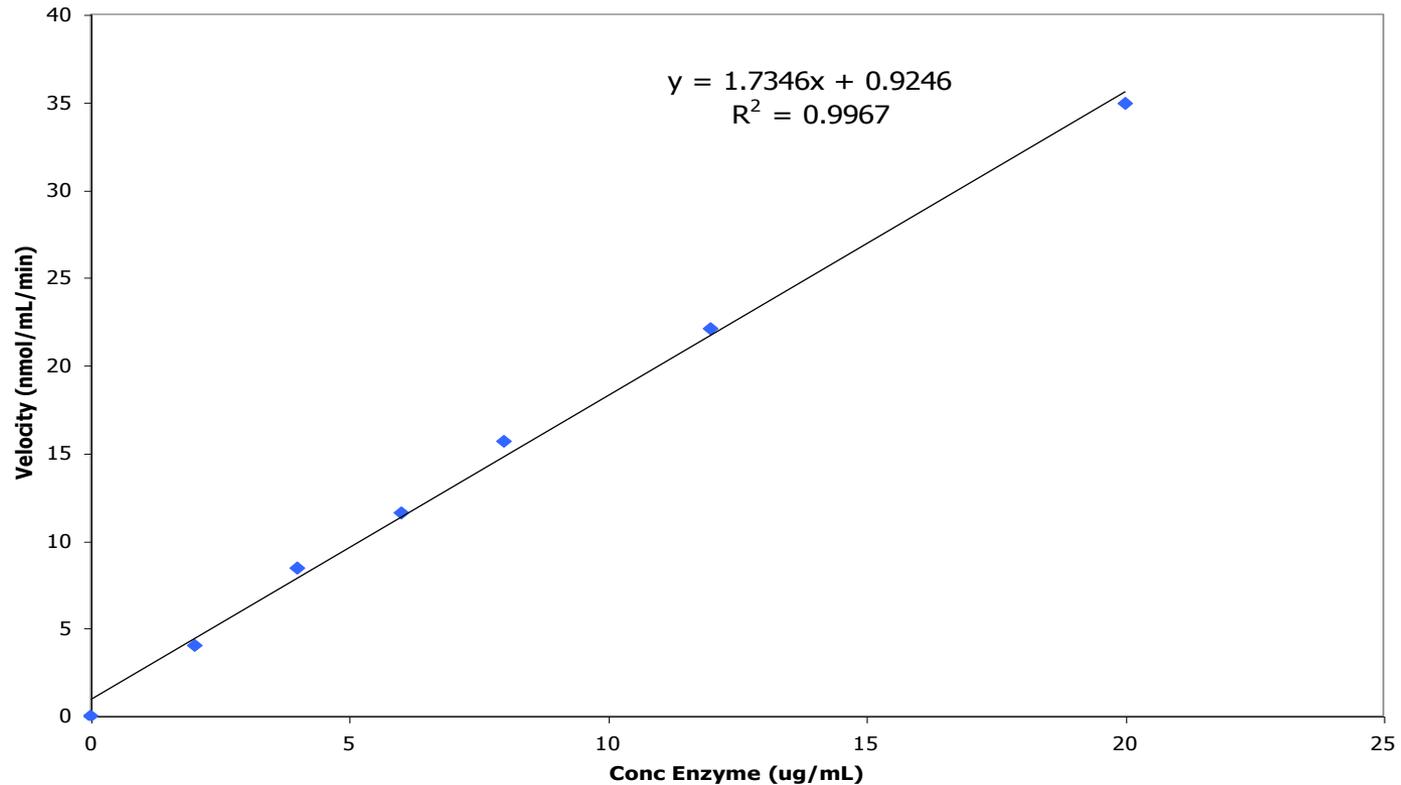
Per misurare l'attività enzimatica **si lavora in eccesso di substrato** (condizioni di  $V_{\max}$ )

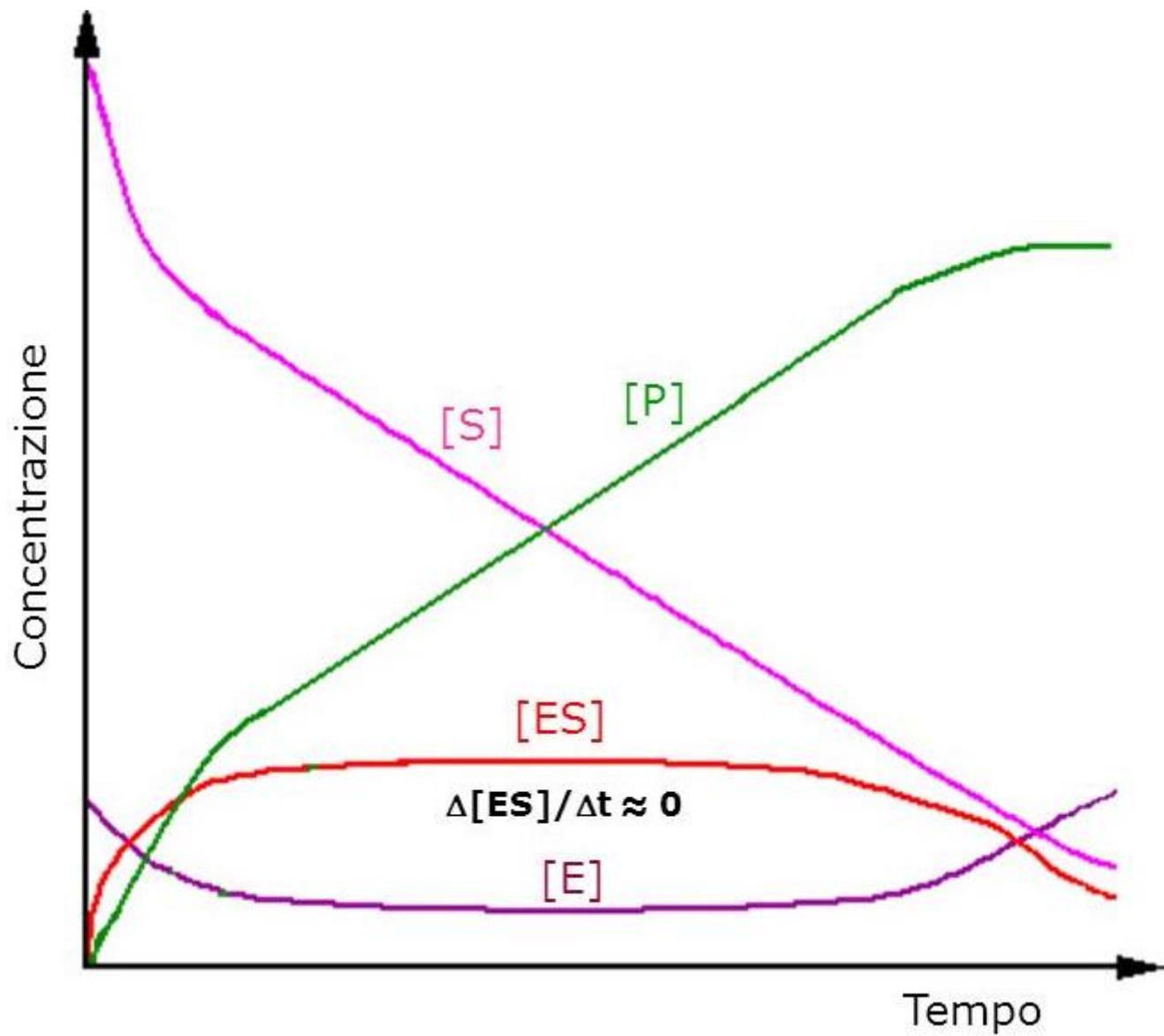


$$V_{\max} = k_{cat} [E_0]$$

# Effetto della concentrazione dell'enzima sulla velocità iniziale ( $v_0$ ) della reazione

AP Standard Curve





# *Come si ottengono i dati cinetici*

- ✓ Metodi spettrofotometrici (*visibile- UV substrati naturali, artificiali*)
- ✓ Metodi fluorimetrici (*substrati naturali, sintetici*)
- ✓ Metodi con luminescenza
- ✓ Metodi radioisotopici
- ✓ Metodi immunochimici

# *Come si ottengono i dati cinetici*

SAGGI DI ATTIVITA' { CONTINUO  
DISCONTINUI o A PUNTI FISSI

## SAGGI IN CONTINUO

- Sono più accurati e meno laboriosi di quelli discontinui
- Per lo più usano metodi spettrofotometrici

□ Reazioni accoppiate

# Precauzioni nei dosaggi enzimatici

- La velocità deve essere costante nell'intervallo considerato ( $v_0$ )
- Substrati, tamponi, ecc. di alta purezza
- Il campione non deve contenere composti che interferiscono col saggio
- L'enzima dovrebbe essere stabile
- Controllo di pH e temperatura
- Escludere la presenza di reazioni non enzimatiche
- Saggi accoppiati: enzima ausiliario puro e non limitante, se possibile con  $K_M$  piccola

# METODI SAGGIO

	moli/l
• Spettrofotometrico	$10^{-5} - 10^{-6}$
• Spettrofluorimetrico	$10^{-8}$
• Bioluminescenza	$10^{-8} - 10^{-13}$
• Chemiluminescenza	$10^{-8} - 10^{-10}$
• Radioisotopici	$10^{-8}$

# FATTORI DA CUI DIPENDE L'ATTIVITA' DI UN ENZIMA

- ❖ Concentrazione di substrato
- ❖ Temperatura
- ❖ pH
- ❖ Forza ionica
- ❖ Presenza di altre molecole

# Metodi spettrofotometrici

- Occorre che substrato e prodotto abbiano assorbimenti diversi in qualche zona spettrale
- Se questo non si verifica, occorre usare un metodo accoppiato

# DOSAGGI ENZIMATICI

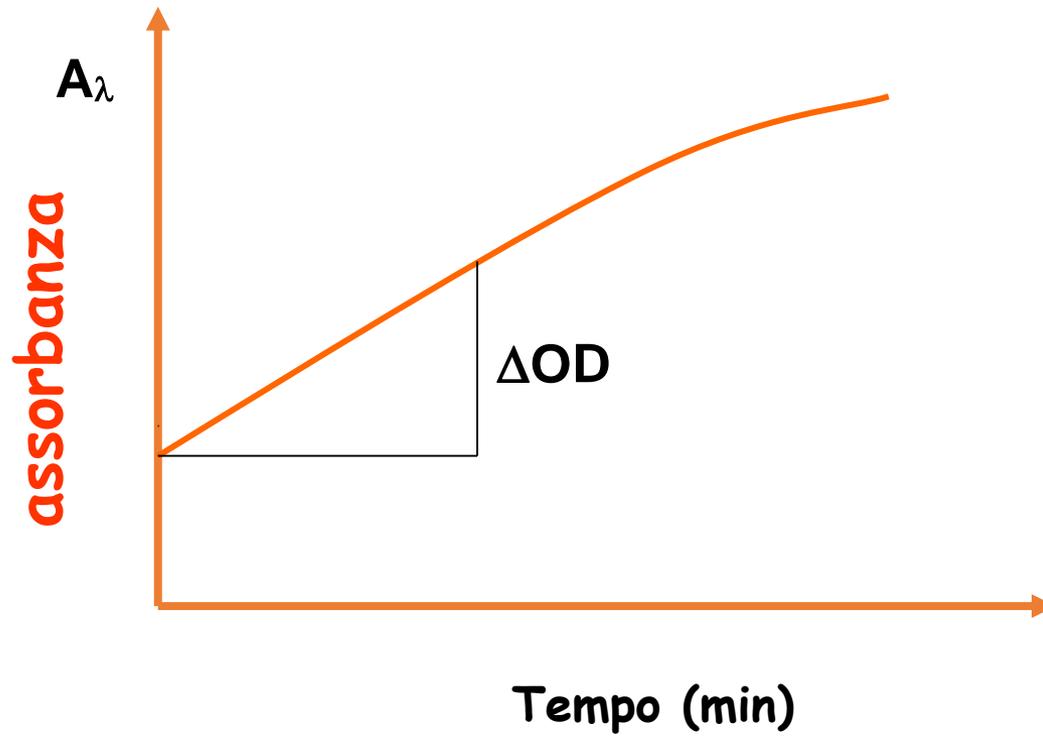


miscela di reazione (tampone a pH e  $\mu$  ottimali, [S] saturante, E) termostatazione (T ottimale)

Spettrofotometrici  
(Legge di Lambert Beer)

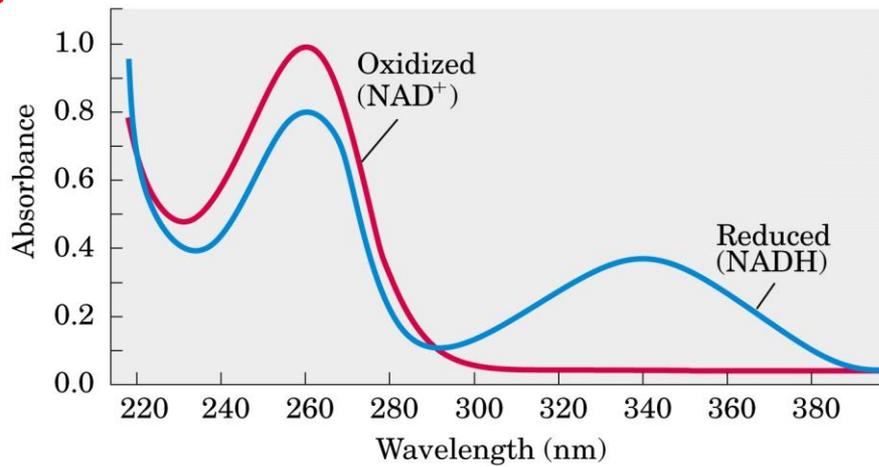
$$A = \varepsilon_{\lambda} c l$$

$$c = \frac{A/\text{min}}{\varepsilon_{\lambda} l} = c/\text{min}$$



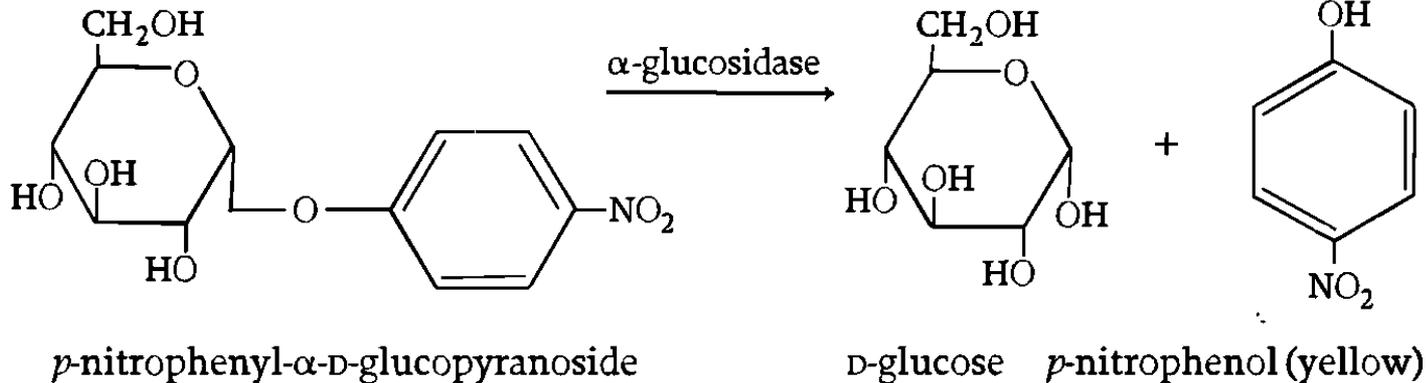
$$c = \Delta OD / \text{min} / \epsilon_{mMl}$$

# DOSAGGI SPETTROFOTOMETRICI



I nucleotidi piridinici ridotti hanno un massimo di assorbimento a 340 nm le forme ossidate no

## substrati artificiali

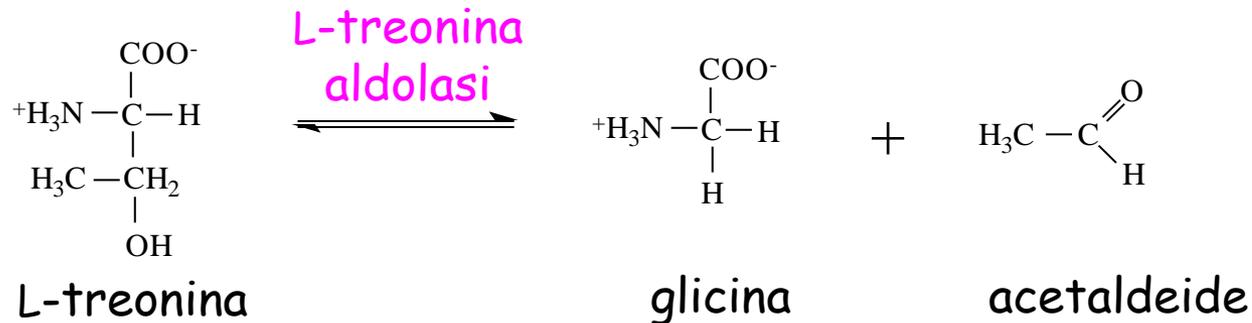


change in absorbance at 405 nm

## • SAGGI ACCOPPIATI



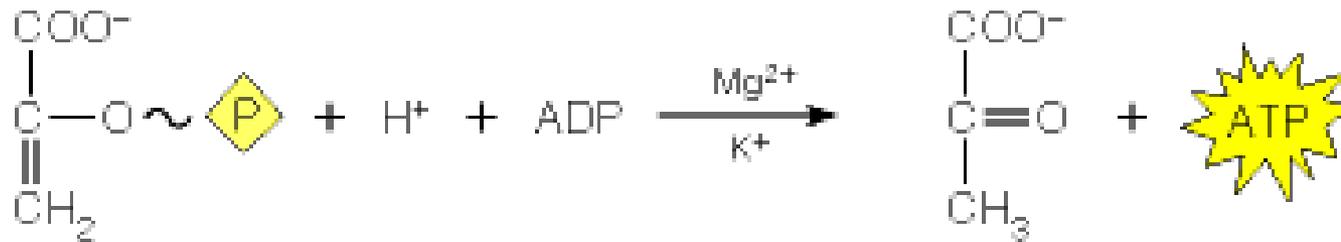
*Esempio:*



## ACCOPPIAMENTO CON REAZIONE IRREVERSIBILE



## Saggi Accoppiati: piruvato chinasi

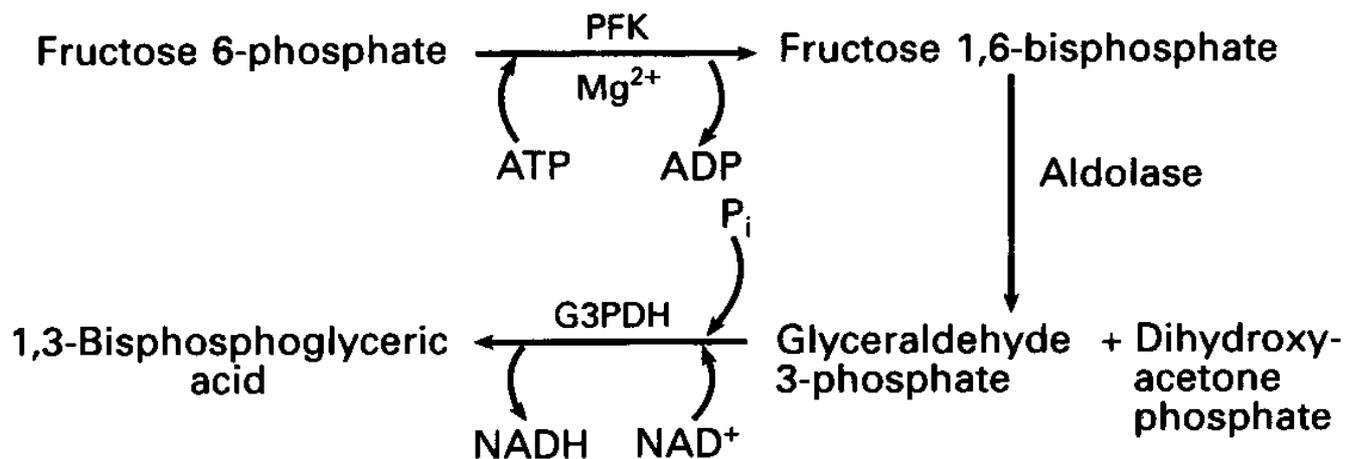


Phosphoenolpiruvate

Pyruvate

Si aggiunge un enzima **ausiliario** (LDH) e il NADH

**LDH**

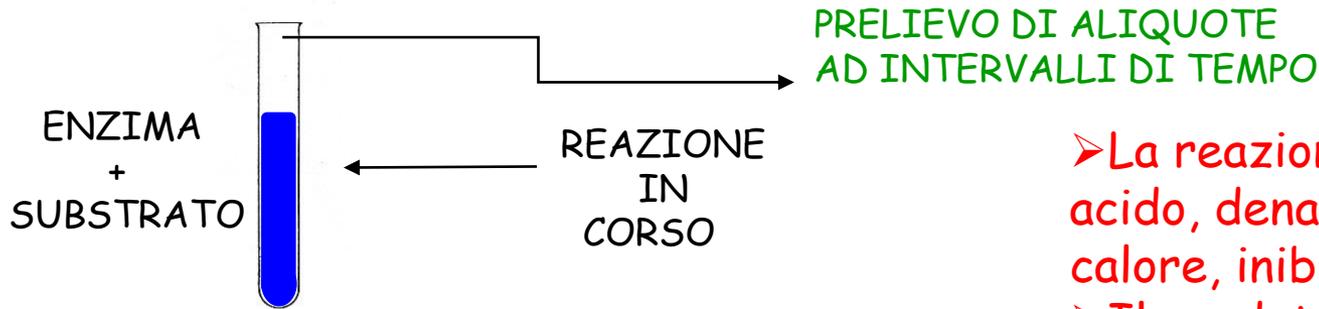


# SAGGI DISCONTINUI

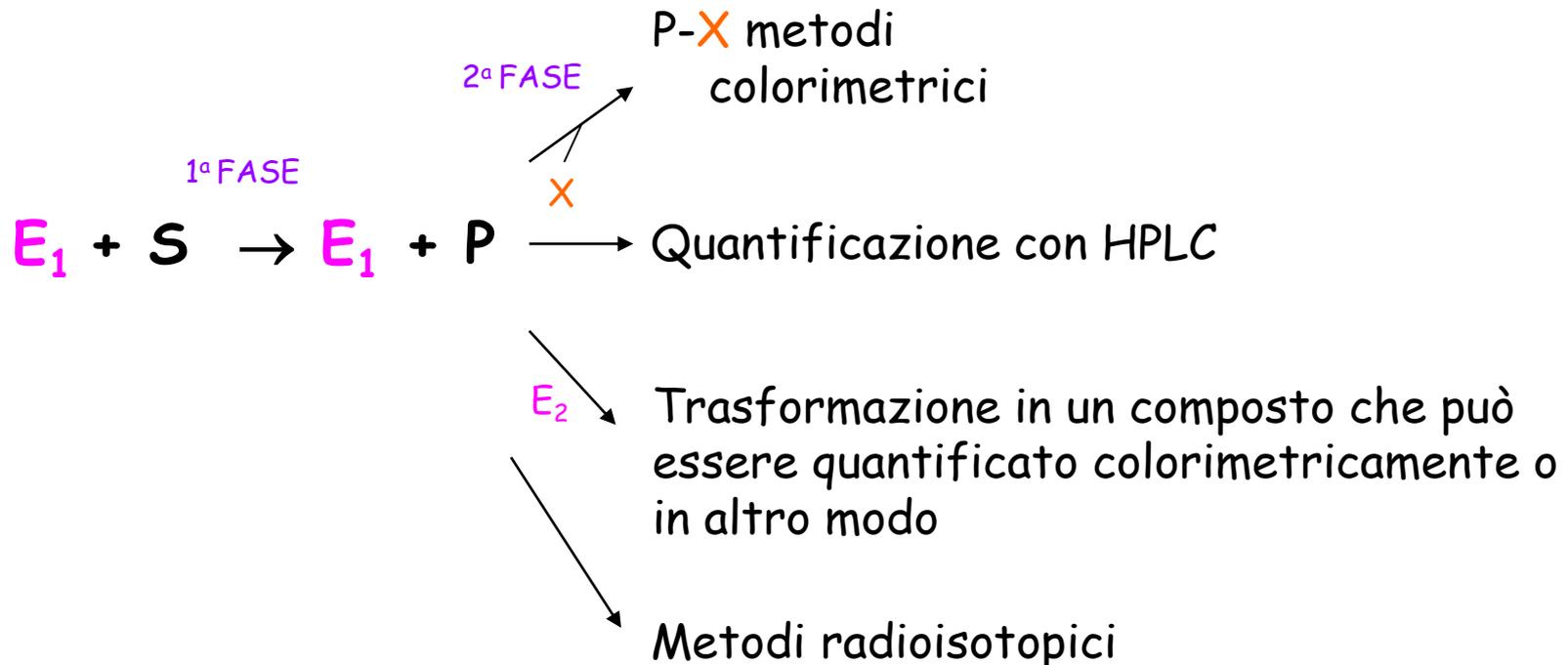
Alcuni sistemi non possono essere saggiati in modo continuo

- 1) Perché durante la reazione non si formano o consumano *cromofori* o *fluorofori* e le condizioni per far sviluppare colore o fluorescenza sono diverse da quelle del saggio.
- 2) Presenza di un fondo (*background*) elevato, ad esempio di assorbanza dovuta alle proteine in un omogenato o ad altre molecole che assorbono alla lunghezza d'onda di interesse, o soluzione non trasparente.
- 3) La misura del prodotto (o del substrato consumato) devono essere fatte con altri sistemi, ad esempio *HPLC*, *saggi biologici* o *immunologici*, si conduce il saggio e poi si elimina la fonte di interferenza

# ESEMPI DI SAGGI DISCONTINUI



- La reazione viene bloccata con acido, denaturanti delle proteine, calore, inibitori dell'enzima
- Il prodotto di reazione viene quantificato con vari metodi



# Saggi enzimatici

Dosaggi con Fluorescenza

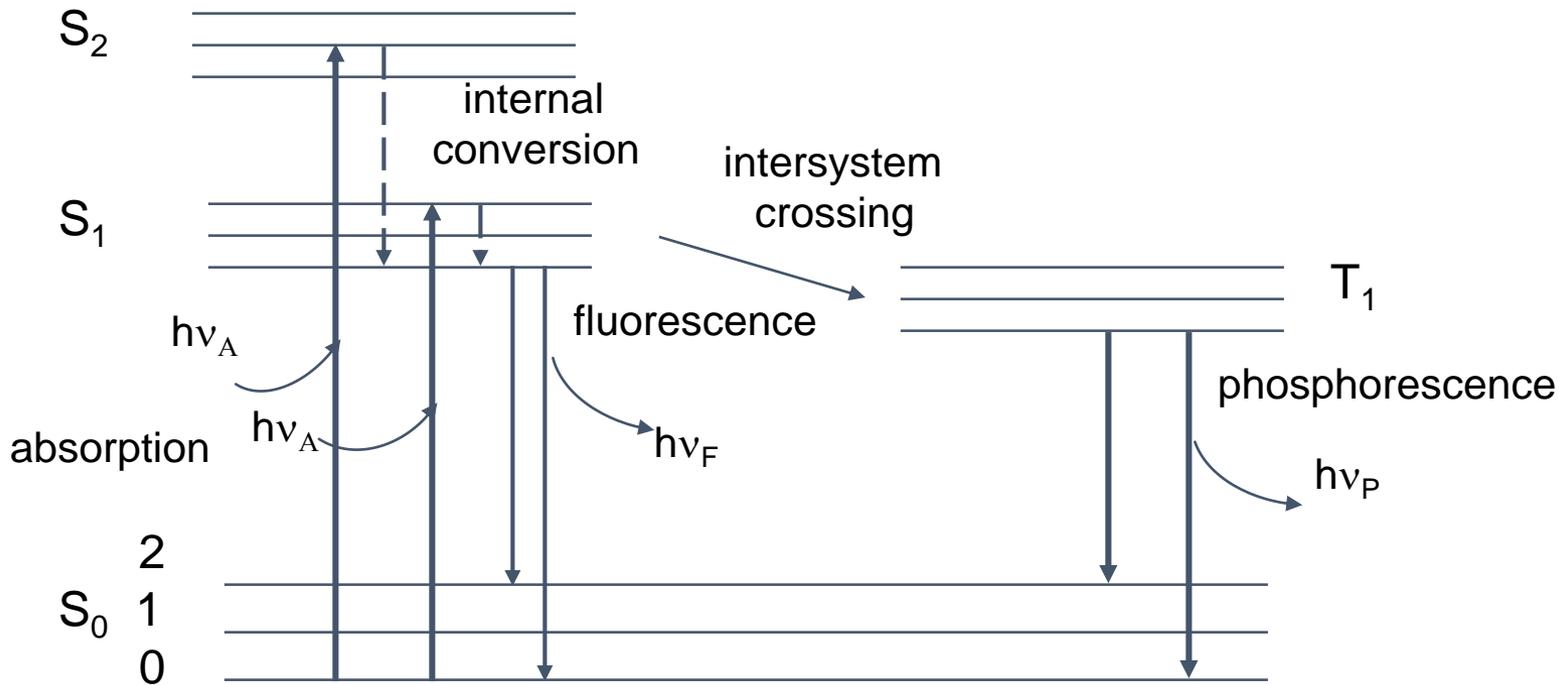
# Applicazioni della FLUORIMETRIA

- Analisi quantitative (diretta o indiretta)
- **Dosaggi enzimatici e analisi cinetica**
- Analisi qualitative
- Studi di struttura delle proteine
- Studi di legame
- Misure di trasferimento di energia (FRET)
- Misure di "quenching"
- Sonde fluorescenti e struttura/viscosità delle membrane

# Il fenomeno della fluorescenza

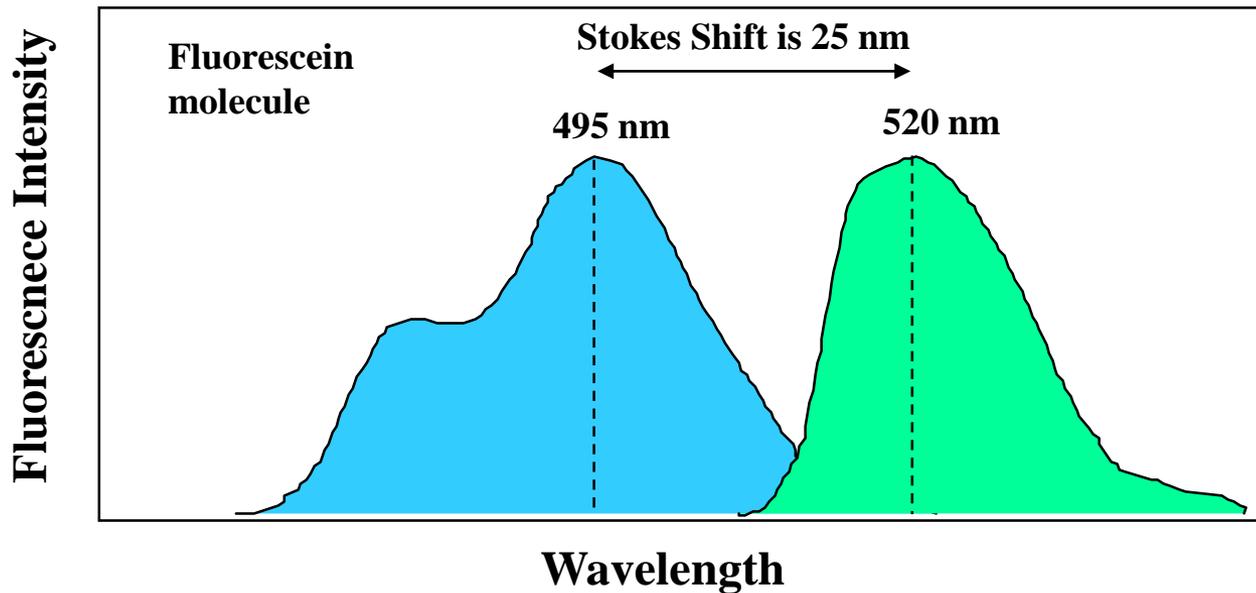
- Assorbimento di fotoni con eccitazione di stati elettronici molecolari seguito dalla emissione di una radiazione con  $\lambda$  (generalmente) maggiore (tipicamente tra l'UV e il visibile) di quella assorbita
- Rilassamento al più basso livello vibrazionale del primo stato eccitato ( $S_1$ ) (**conversione interna o rilassamento vibrazionale**) (**picosecondo**)
- La molecola rimane nello stato eccitato di singoletto ( $S_1$ ) in un periodo dell'ordine dei nanosecondi (il più lungo periodo di tempo nei meccanismi di fluorescenza) per poi passare allo stato fondamentale emettendo un fotone (**fluorescenza**)
- Altri fenomeni possono accadere dopo l'assorbimento di un fotone

# JABLONSKI DIAGRAM



# Stokes Shift

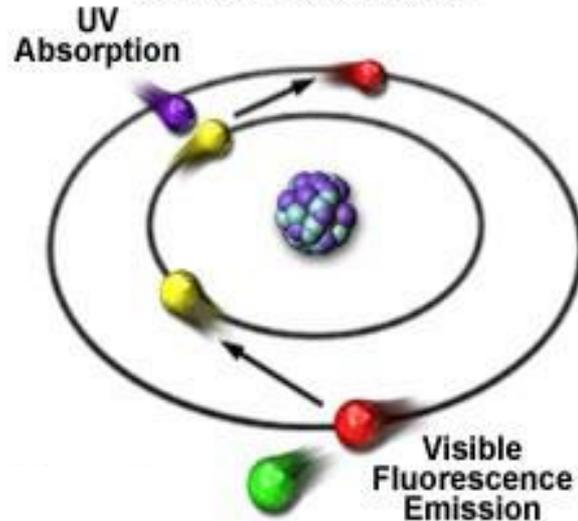
La differenza (misurata in termini di lunghezza d'onda o frequenza) tra la posizione dei massimi delle bande di assorbimento e di emissione



# Legge di Stokes

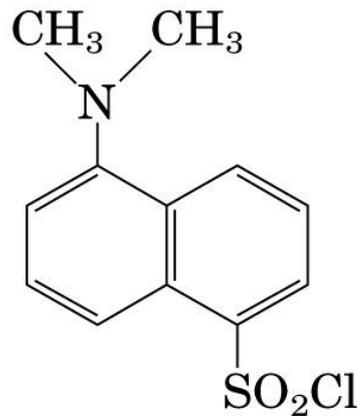
L'emissione ha sempre un'energia più bassa dell'assorbimento a causa del rilassamento nucleare nello stato eccitato

L'energia del fotone emesso per luminescenza appartiene ad una regione di spettro spostata a  $\lambda$  maggiori indipendente dalla radiazione eccitatrice



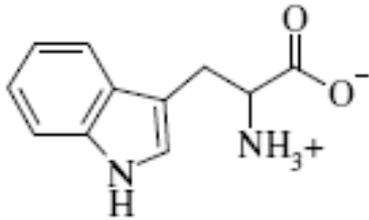
# Molecole fluorescenti di interesse biochimico

- Fluorofori naturali o intrinseci
- Coenzimi, substrati e analoghi
- Fluorofori estrinseci
  - sonde ambientali
  - reagenti di modificazione chimica (ad esempio, DNSC)

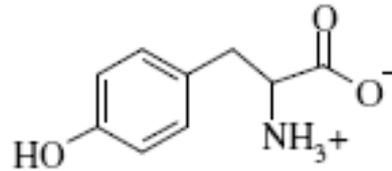


Dansyl chloride

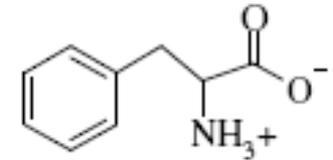
# Fluorofori naturali e coenzimi



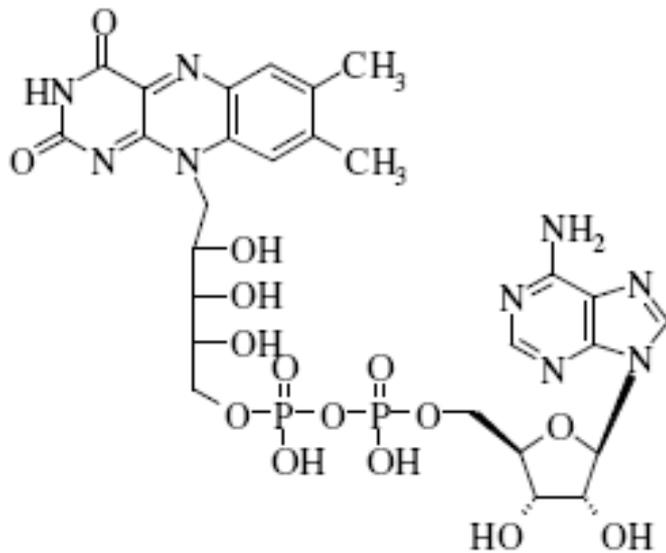
*Triptofano (W)*



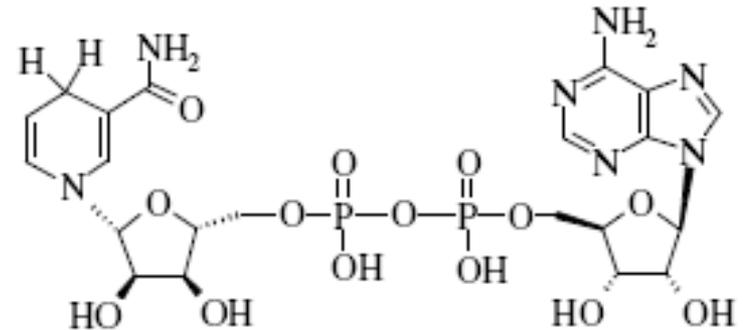
*Tirosina (Y)*



*Fenilalanina (P)*



*FAD*



*NADH*

# *Intensità di fluorescenza e misure quantitative*

- A basse concentrazioni della sostanza fluorescente (*fluoroforo*), l'intensità della fluorescenza ( $I_f$ ) è proporzionale alla concentrazione:

$$I_f = 2,3 I_0 \varepsilon_\lambda c d \Phi$$

$c$  è la *concentrazione del fluoroforo*

$d$  è il *cammino ottico* della luce nella soluzione fluorescente

$\varepsilon_\lambda$  è il *coefficiente di estinzione molare* del fluoroforo

$I_0$  è l'*intensità* della radiazione incidente

$\Phi$  è la *resa quantica*

# *Intensità di fluorescenza e misure quantitative*

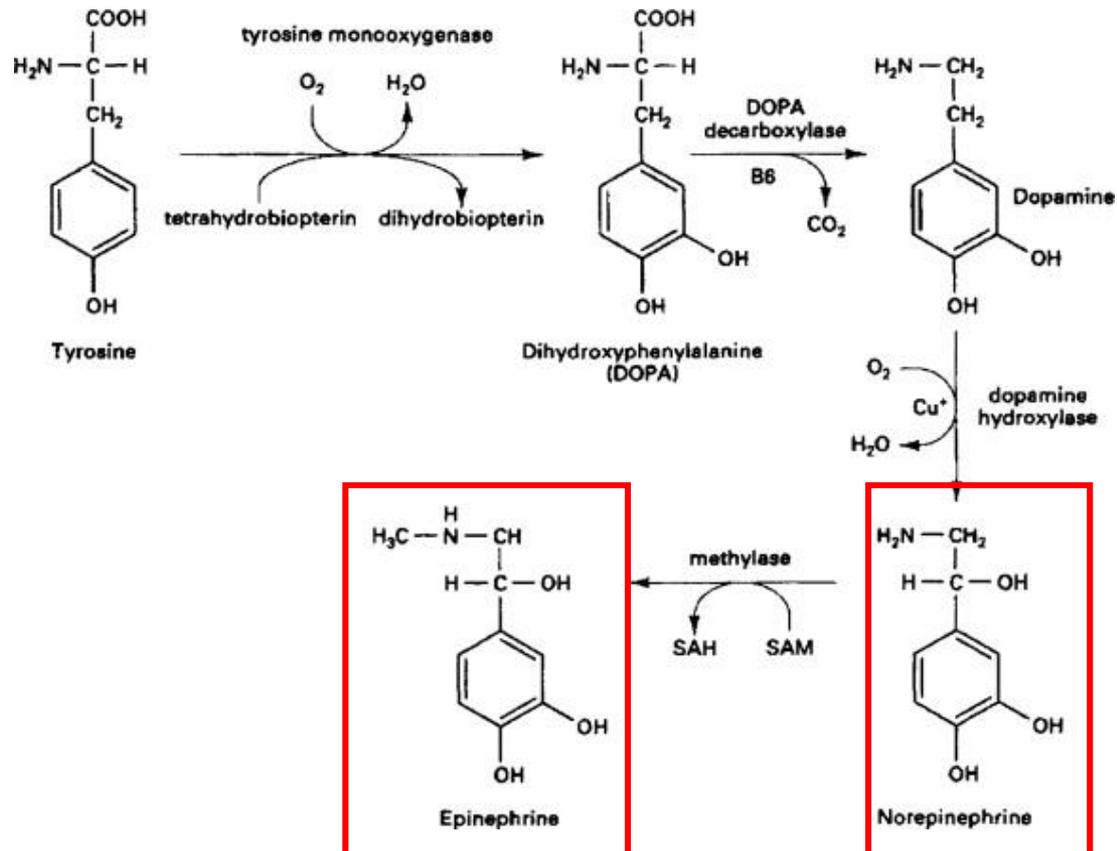
• La resa quantica di fluorescenza è definita come il rapporto tra numero di fotoni emessi in fluorescenza (quanti di fluorescenza) e numero di molecole eccitate nel campione, cioè numero di fotoni assorbiti (quanti assorbiti)

$$\Phi = \frac{\text{quanti di fluorescenza emessi}}{\text{quanti assorbiti}}$$

• La resa quantica è *indipendente* dalla lunghezza d'onda di eccitazione

Le tecniche spettrofluorimetriche sono accurate a basse concentrazioni, a differenza della spettrofotometria, es:

100  $\mu\text{g}$  catecolamine spettroscopia  
 100  $\text{pg}$  catecolamine spettrofluorimetria

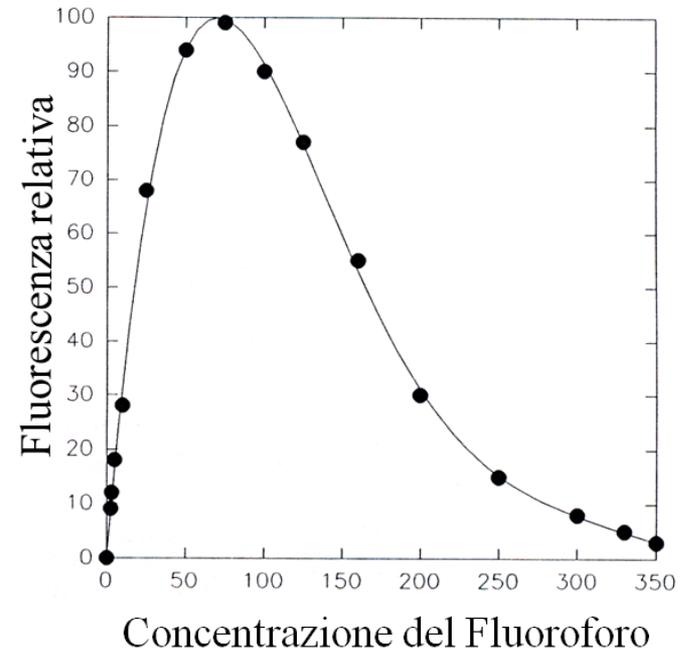


# Fattori che influenzano la resa quantica

- Temperatura
  - Aumenta la conversione interna all'aumentare dell'agitazione termica: all'aumentare di  $T$  diminuisce  $\Phi$
- Vie alternative alla fluorescenza
  - *Quenchers*, trasferimento di energia per risonanza...

# Fluorescenza: vantaggi

- Sensibilità
- Selettività
- Relazione semplice tra  $I_f$  e concentrazione
- Maggiore sensibilità ed accuratezza a basse concentrazioni

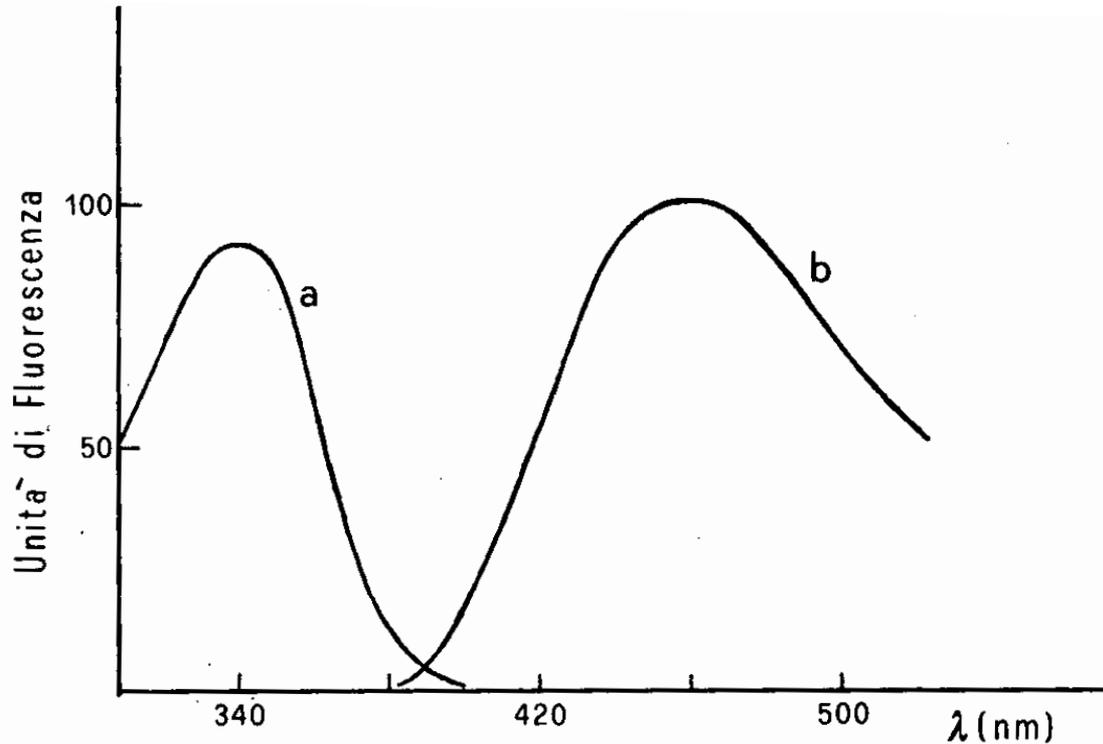


# Fluorescenza: svantaggi

- Non si può prevedere con certezza se una molecola è fluorescente
- Dipendenza dalle condizioni ambientali
- risente del fenomeno dello smorzamento della fluorescenza (quenching)
- "Effetto-filtro" ad alte concentrazioni

# DOSAGGI SPETTROFLUORIMETRICI

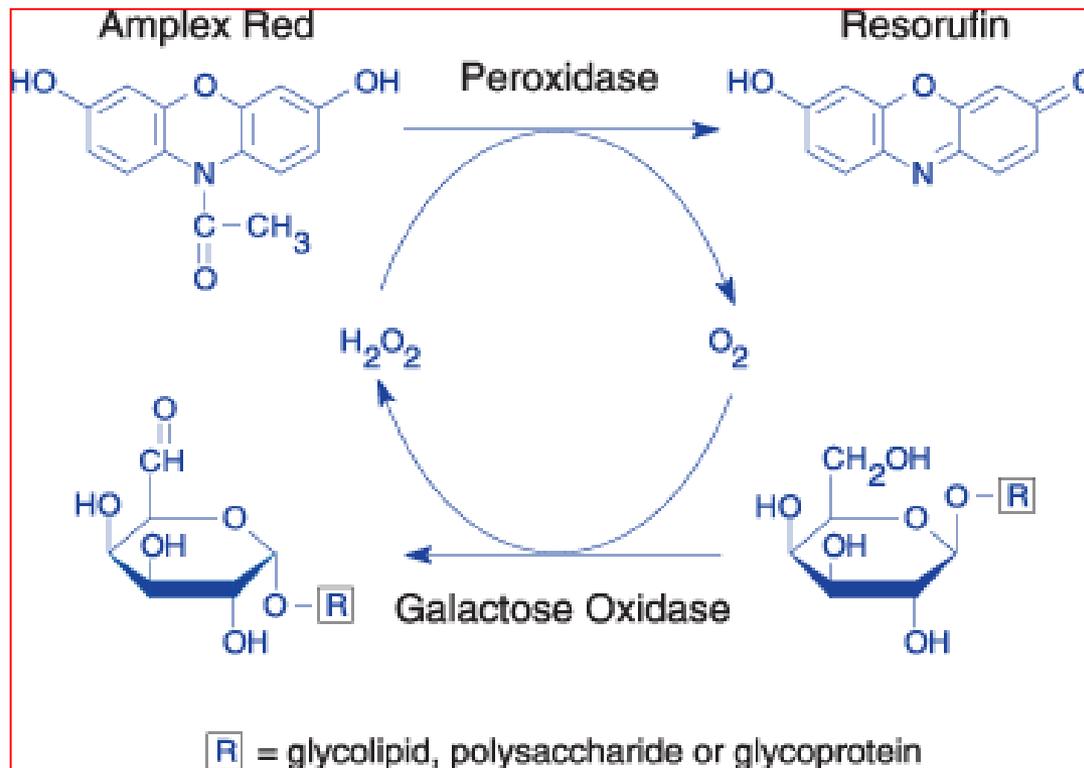
## Fluorescenza intrinseca del NADH



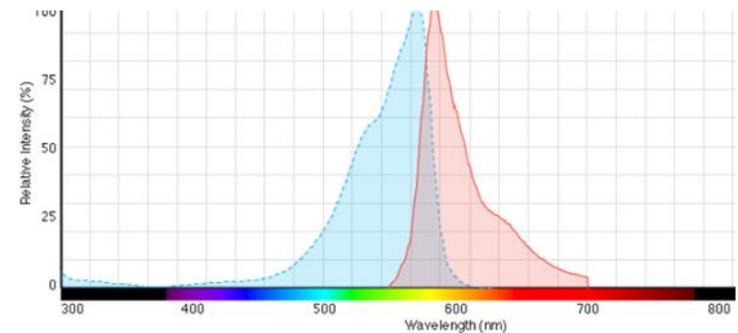
- Spettro di eccitazione e di fluorescenza del nicotinamide-adenin-dinucleotide ridotto (NADH). La curva a si riferisce allo spettro di eccitazione; la curva b a quello di fluorescenza o di emissione.

# Dosaggi enzimatici

- Si sfruttano reazioni che **formano prodotti fluorescenti**: ad esempio, dosaggio del galattosio

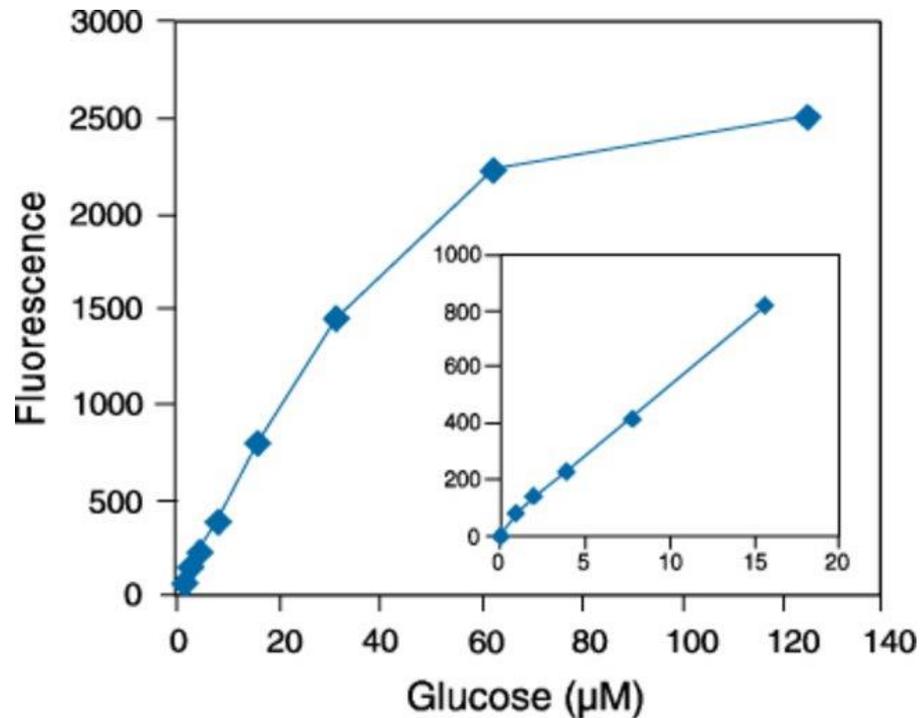


prodotto  
fluorescente



EC: 1.1.3.9

# Dosaggio del substrato



Detection of glucose using the Amplex Red Glucose Glucose Oxidase Assay

