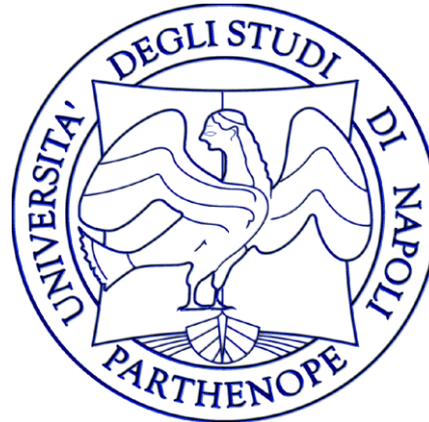


***CORSO DI LAUREA IN BIOLOGIA PER LA
SOSTENIBILITÀ***



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

LEZIONE 4

Prof. Paola Di Donato

Dipartimento di Scienze e Tecnologie

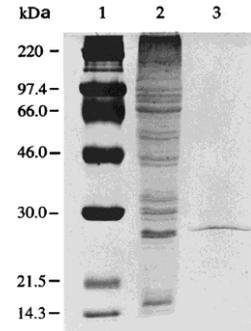
Stanza 520, V piano lato NORD

Tel. 081 547 6625

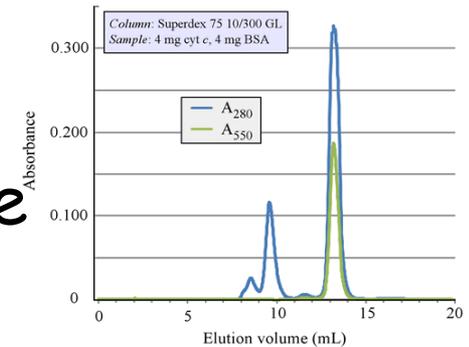
E-mail: paola.didonato@uniparthenope.it

Criteri di purezza

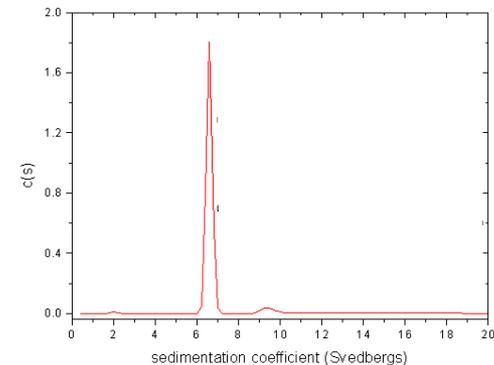
✓ Elettroforesi nativa e in SDS (SDS-PAGE)



✓ Cromatografia per esclusione molecolare

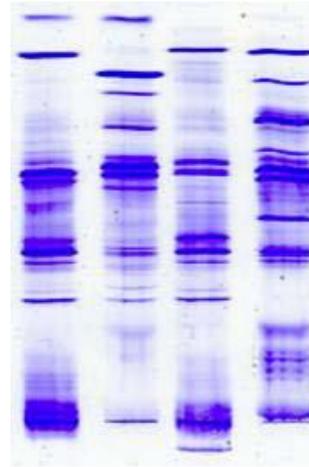


✓ Ultracentrifugazione analitica

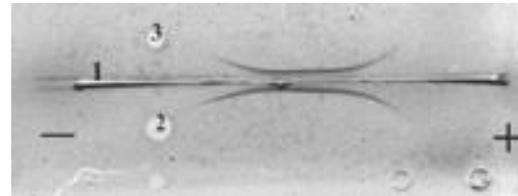


Criteri di purezza

✓ Focalizzazione al pI



✓ Metodi immunochimici



METODI IMMUNOCHEMICI

Metodologie che si basano sull'uso degli anticorpi a diversi scopi:

- Purificazione di macromolecole (ad esempio, per affinità) e complessi (ad esempio, attraverso immunoprecipitazione)
- Analisi ed identificazione di biomolecole
- Sviluppo di nuovi farmaci

METODI IMMUNOCHEMICI

Anticorpo (Ab): molecola prodotta dai linfociti B in risposta ad una stimolazione antigenica

Antigene (Ag): molecola complessa (peptide, zucchero, lipide, acido nucleico) che scatena una risposta immunitaria

Epitopo: frammento sulla molecola di antigene che viene riconosciuto dall'anticorpo

METODI IMMUNOCHEMICI

ANTICORPI

- Glicoproteine dette **Immunoglobuline** (IgG, IgA, IgM, IgE ed IgD)
- Nell'organismo hanno il compito di rilevare, legare e facilitare la rimozione degli antigeni

IMMUNOGLOBULINE: molecole anticorpali

Struttura : quattro catene polipeptidiche, a due a due uguali, legate da ponti disolfuro.

- due "catene leggere", aventi peso molecolare 20000 e costituite da circa 220 amminoacidi

- due "catene pesanti" con peso molecolare di circa 55000 e costituite da circa 430 amminoacidi.

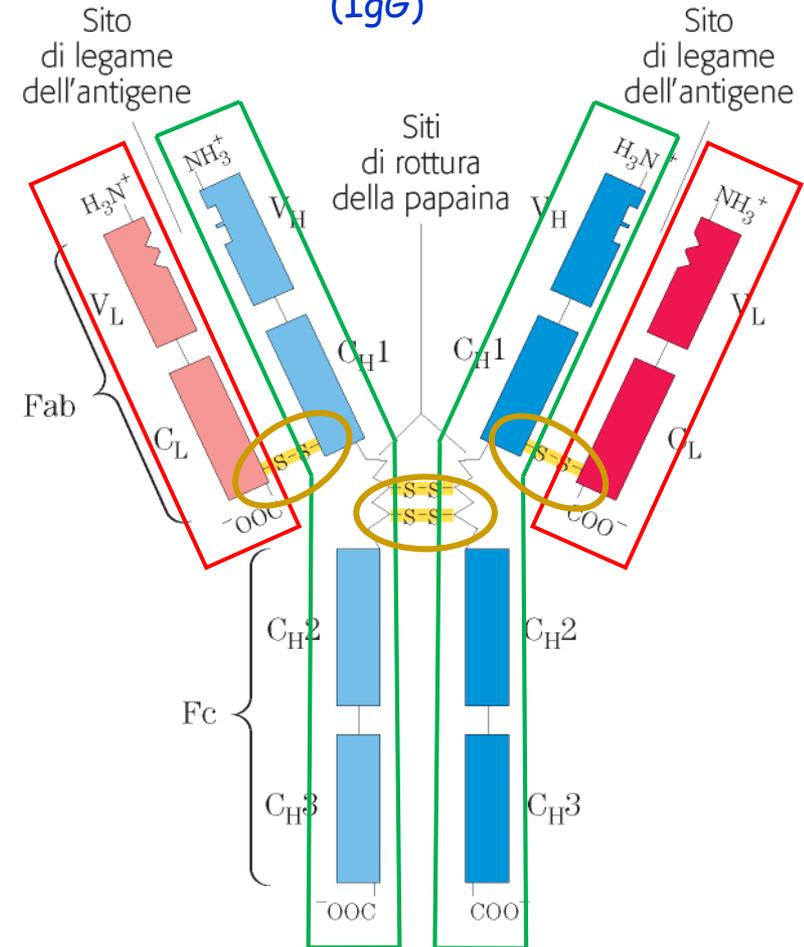
5 classi distinte in base alle catene pesanti:

- a → IgA
- d → IgD
- e → IgE
- g → IgG
- m → IgM

In ogni classe ci sono 2 tipi di catena leggera:

- κ
- λ

IMMUNOGLOBULINA G (IgG)



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

ANTICORPI

La produzione di anticorpi si ottiene per differenziazione delle plasmacellule a seguito della risposta immunitaria.

MONOCLONALI

- Anticorpo derivato dai cloni di una singola cellula B
- Presentano affinità per lo stesso epitopo di uno specifico antigene
- Poco potenti ma molto specifici

OLIGOCLONALI

- possono essere ottenuti attraverso la combinazione di una serie di anticorpi monoclonali, oppure immunizzando animali con specifiche regioni antigeniche
- sono un valido compromesso tra poli- e monoclonali, ovvero sensibilità comparabile ai poli- e specificità comparabile ai monoclonali.

POLICLONALI

- miscele di anticorpi che derivano da cloni plasmacellulari diversi
- presentano un insieme di cloni anticorpali, alcuni diretti contro determinati epitopi della proteina ed altri cloni contro altri epitopi.
- Potenti ma poco specifici

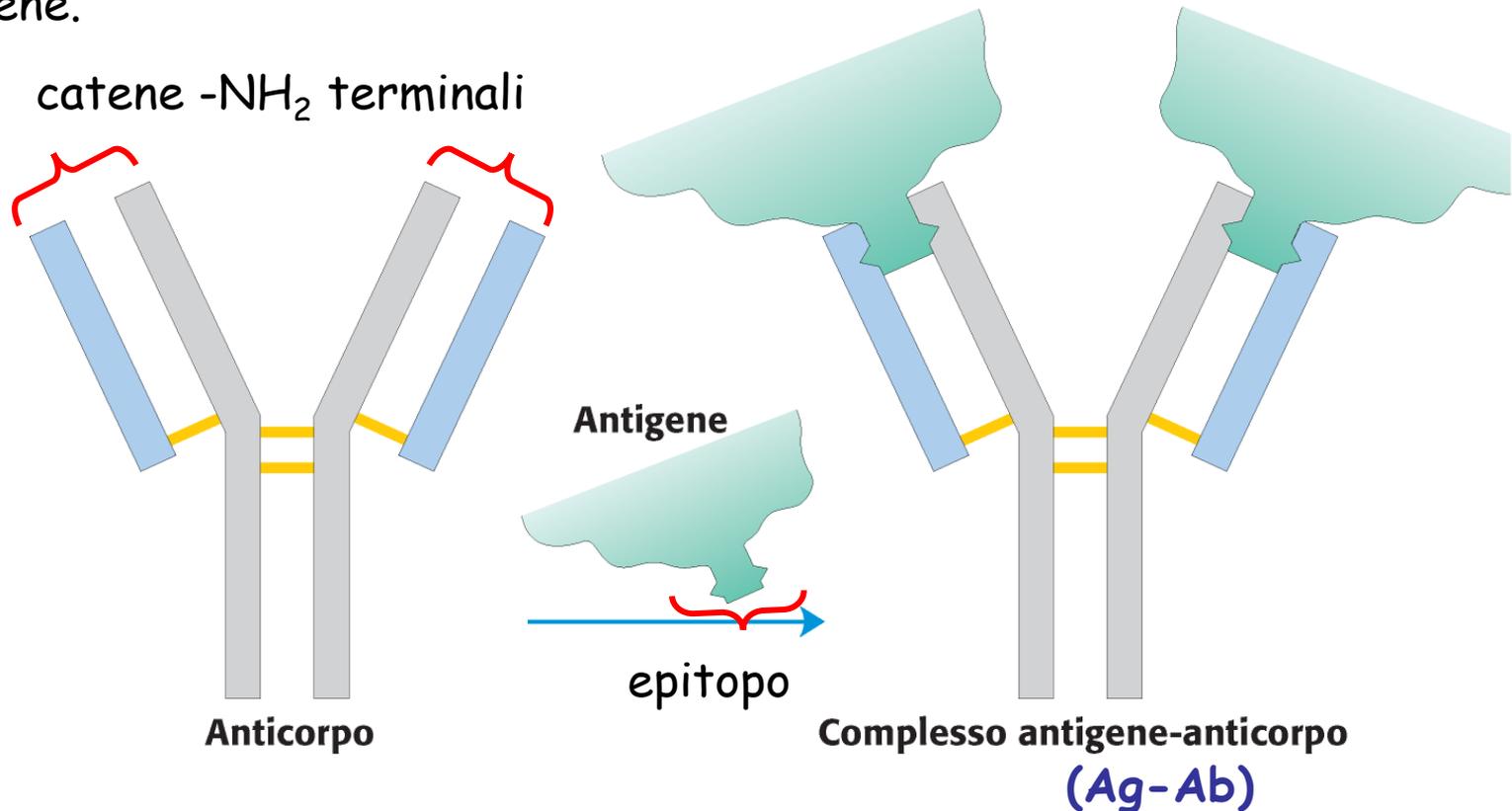
RICOMBINANTI

- Prodotti ad hoc per usi molto specifici

INTERAZIONE ANTIGENE-ANTICORPO: FORMAZIONE DELL'IMMUNOCOMPLESSO (Ag-Ab)

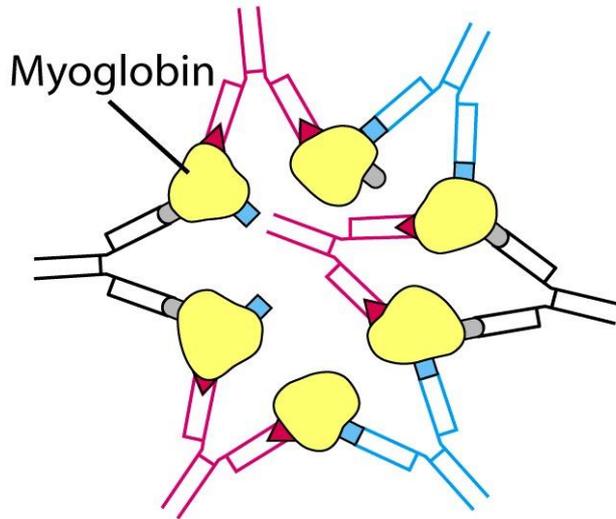
Gli anticorpi sono **molecole normalmente bivalenti**, sono quindi capaci di legare molecole di antigene con un **rapporto 1:2**.

I siti di legame sono rappresentati, rispettivamente, dalle due coppie di catene $-NH_2$ terminali per l'anticorpo e dallo specifico epitopo per l'antigene.



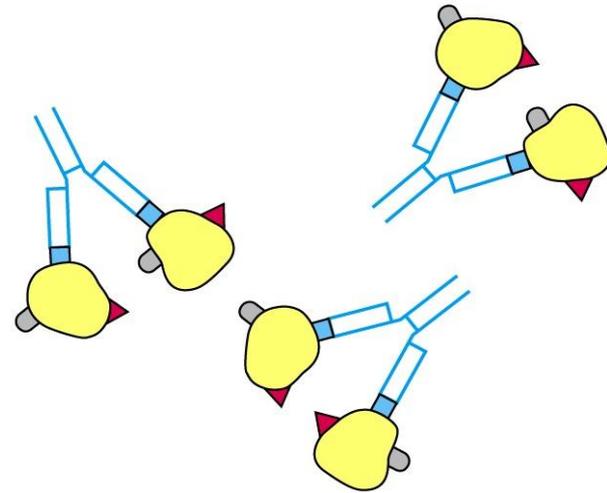
FORMAZIONE DELL'IMMUNOCOMPLESSO: reazioni di IMMUNOPRECIPITAZIONE

POLYCLONAL ANTISERUM



**Matrice reticolare
o grossi aggregati**

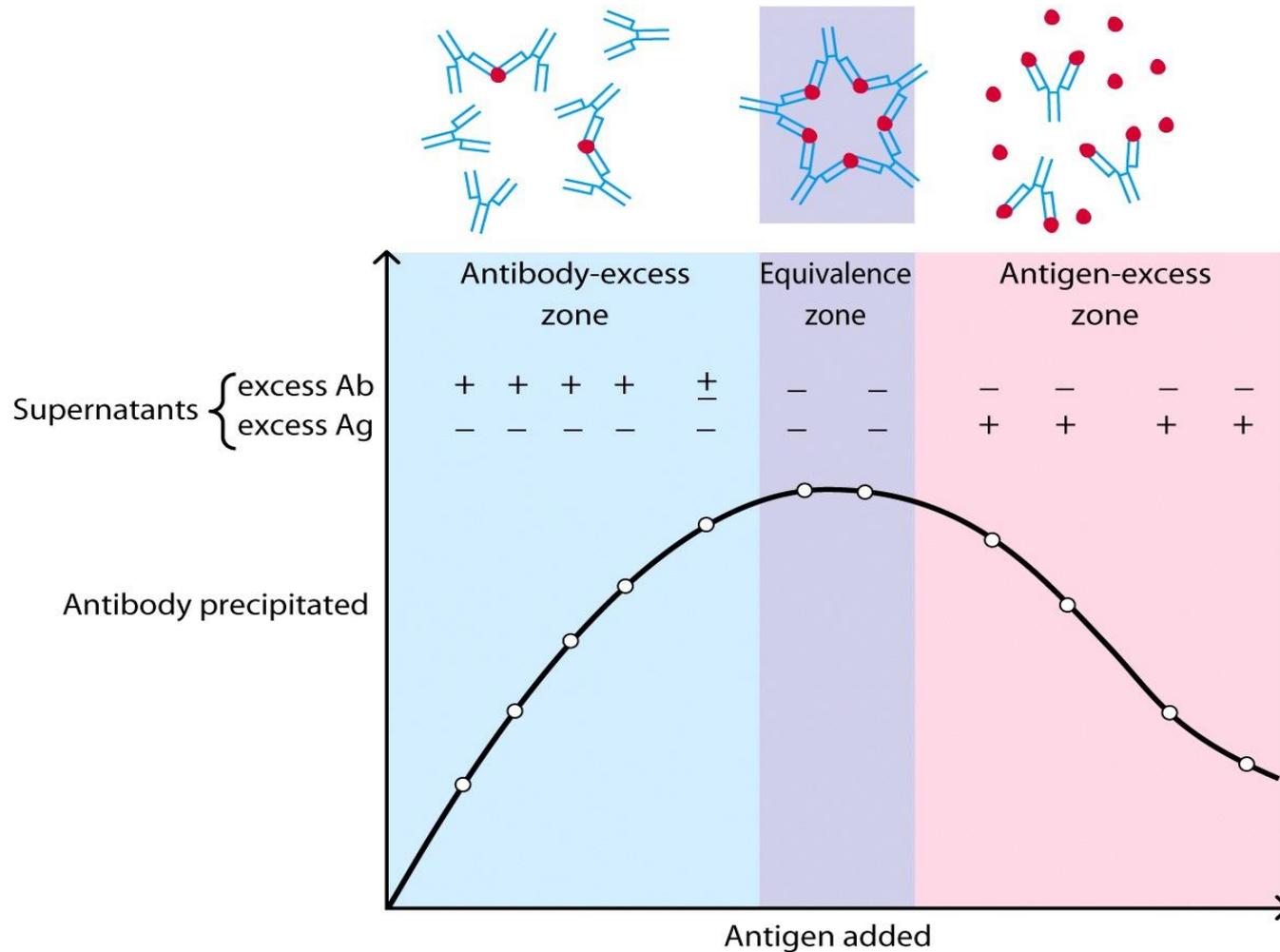
MONOCLONAL ANTIBODY



**Nessuna formazione di
precipitato se Ag contiene
una sola copia dell'epitopo**

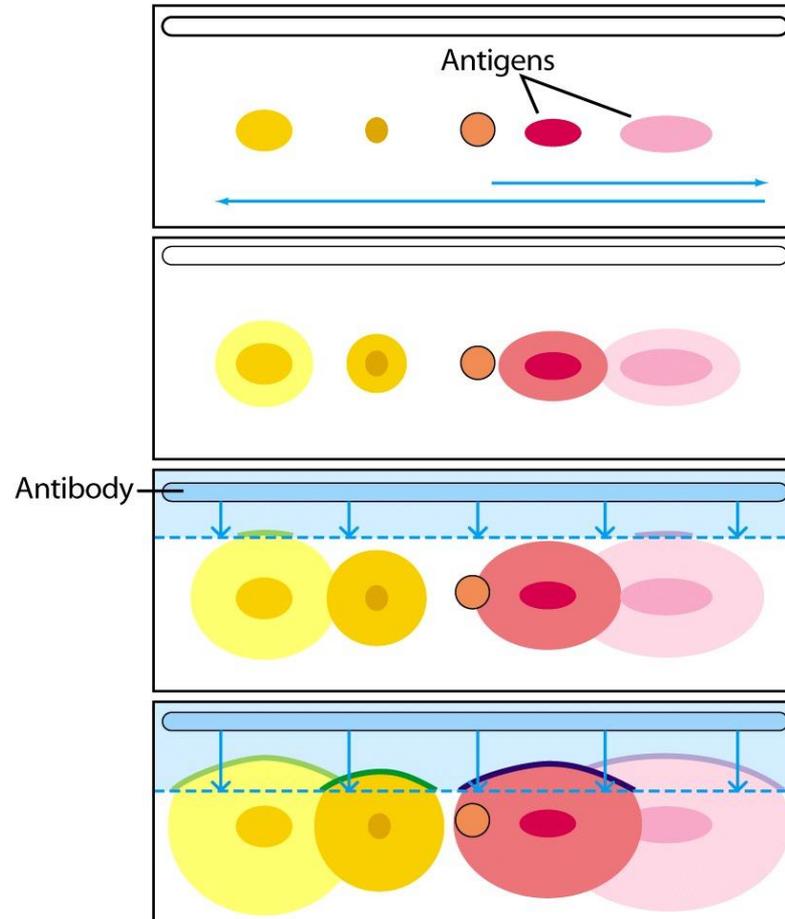
La formazione dell'immunocomplesso Ab-Ag è il processo che è alla base di diverse tecniche immunochimiche; alcune di queste dipendono dalla precipitazione di tale complesso in soluzione

Curva di precipitazione antigene-anticorpo in soluzione



Effetto del rapporto Ab/Ag sulla precipitazione del complesso Ab-Ag

Immunolettroforesi: elettroforesi ed immunoprecipitazione

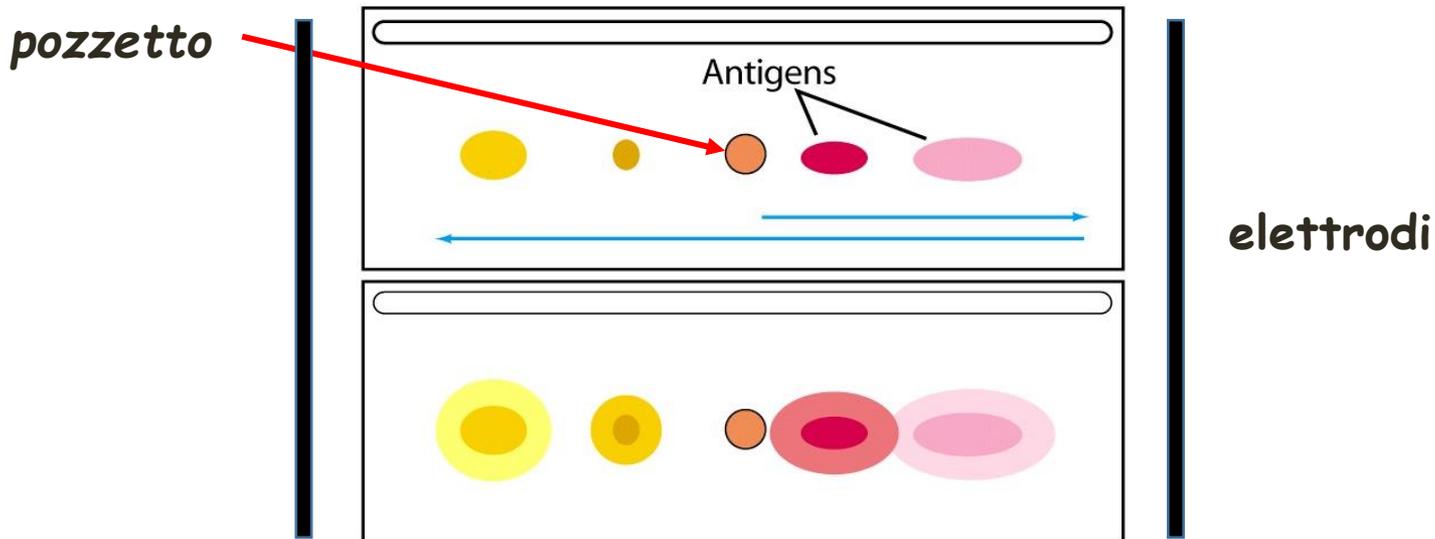


Immunolettroforesi:

Si realizza su gel di agarosio e combina separazione elettroforetica con immuno-precipitazione

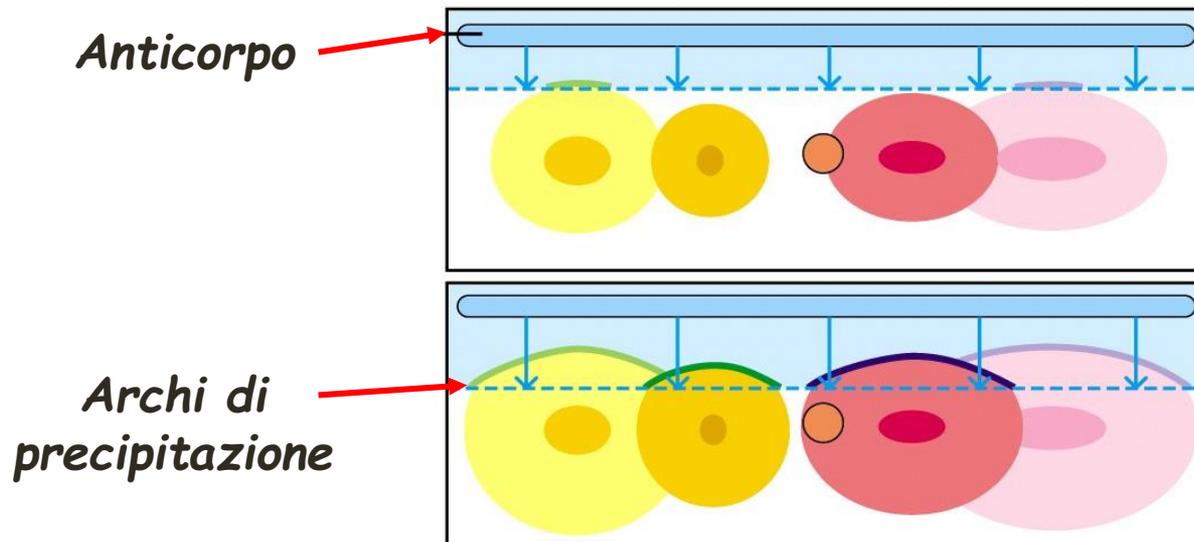
La miscela di antigeni di natura proteica viene posta in un pozzetto all'interno del gel e separata nelle sue componenti mediante elettroforesi

Gli antigeni migrano in base alla propria carica nativa ed alla propria dimensione, separandosi in bande



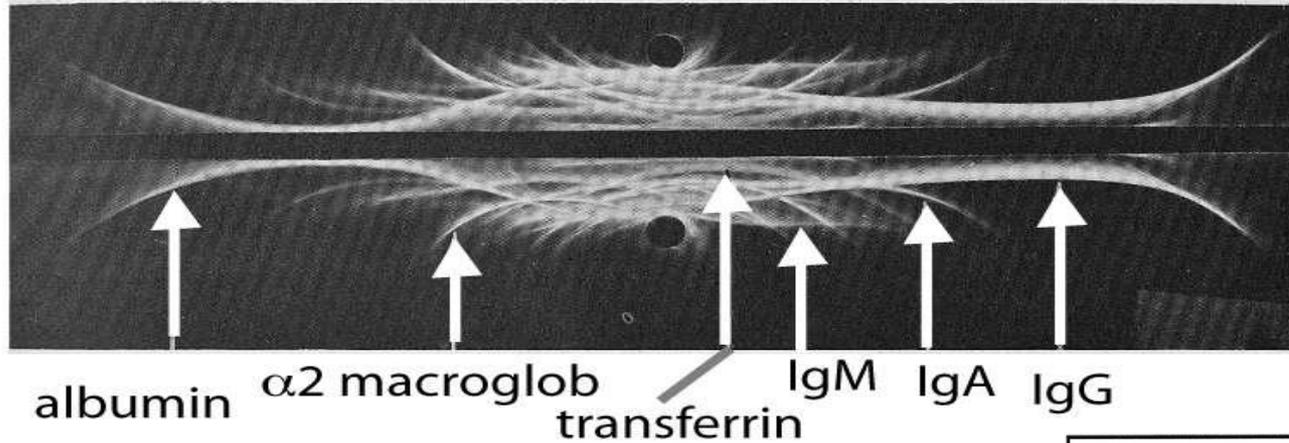
Immunolettroforesi:

Ai lati, su dei solchi viene introdotto la soluzione contenente l'**anticorpo**

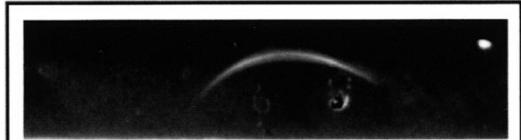


All'unione tra antigeni separati precedentemente e i rispettivi anticorpi, si formano degli **archi** caratteristici.

Immunolettroforesi



Ig A



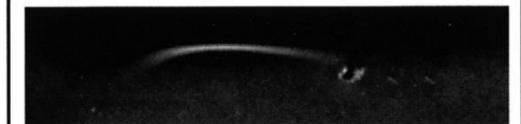
Ig G



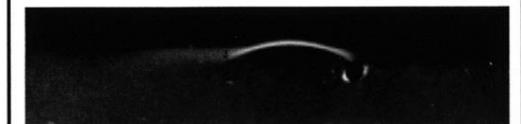
Ig M



κ



λ



Criteria di purezza: immunochimica

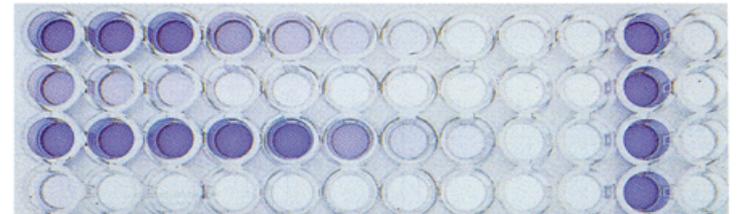
Dosaggio delle proteine

✓ metodi spettrofotometrici* (diretti) $A = \epsilon_{\lambda} c l$

✓ metodi colorimetrici * (indiretti)

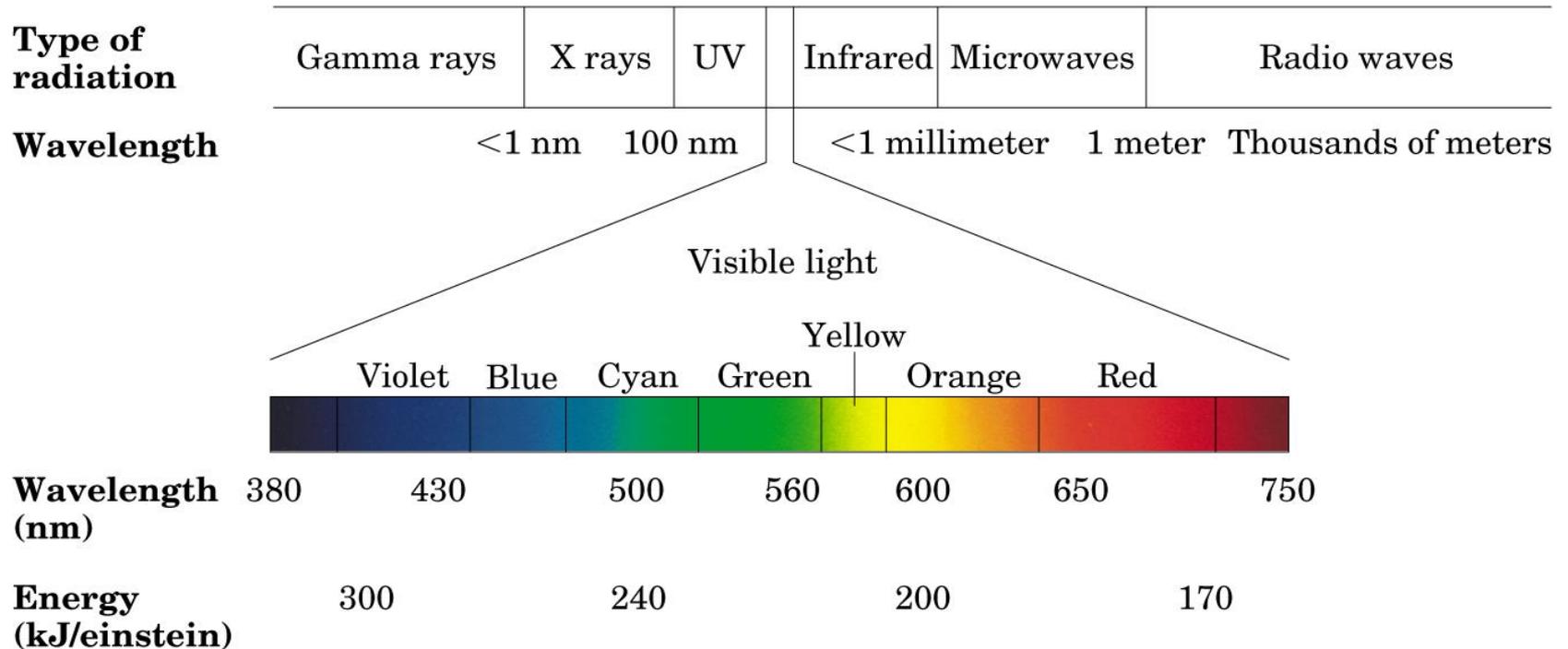


✓ metodi immunochimici (indiretti)



* lezione di ricapitolazione: spettrofotometria

Rappresentazione diagrammatica dello spettro elettromagnetico con in evidenza le bande del visibile



La lunghezza d'onda λ è inversamente correlata alla frequenza dalla relazione $\lambda = c/\nu$ e alla energia $E = h\nu$ (da cui $E = hc/\lambda$)

$$c = 3 \times 10^8 \text{ ms}^{-1}$$

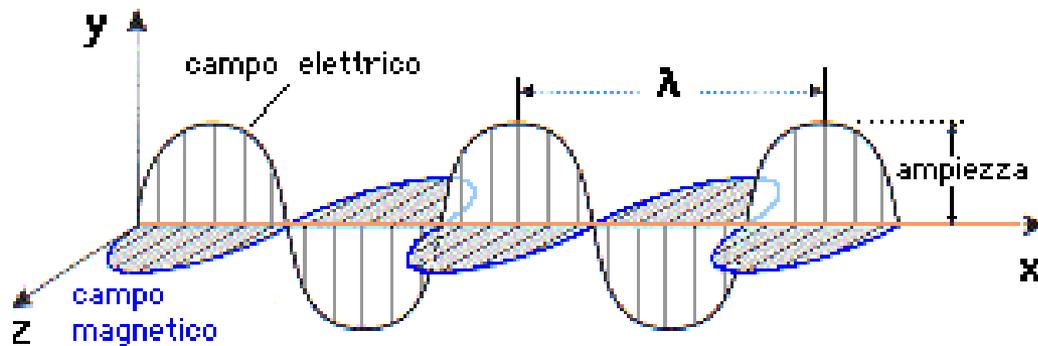
$$h = 6.63 \times 10^{-34} \text{ Js}$$

Tecniche spettroscopiche

Le tecniche spettroscopiche consentono di ottenere informazioni sulla struttura delle molecole e si basano sull'interazione tra la materia e la radiazione elettromagnetica.

La radiazione elettromagnetica ha una natura dualistica ovvero ad essa può essere attribuita sia natura ondulatoria che corpuscolare.

Secondo la descrizione ondulatoria la radiazione elettromagnetica è costituita da campi elettrici e campi magnetici che oscillano perpendicolarmente tra di loro e rispetto alla direzione di propagazione dell'onda stessa.



λ = **lunghezza d'onda** distanza tra un picco e quello successivo (lunghezza di un ciclo completo dell'onda) ($100 \text{ nm} = 1 \mu\text{m}$)

ν = **frequenza** ovvero numero di cicli per secondo (sec^{-1})

c = **velocità** della luce nel vuoto ($3 \times 10^{10} \text{ cm/sec}$)

$$\nu = \frac{c}{\lambda}$$

L'**ampiezza** è l'altezza dell'onda rispetto all'asse orizzontale centrale; il quadrato di tale ampiezza determina l'**intensità**, ossia la brillantezza, della radiazione.

Tecniche spettroscopiche

Secondo la descrizione corpuscolare la radiazione elettromagnetica è costituita da un treno di particelle dette fotoni che si muovono lungo la direzione di propagazione dell'onda alla velocità della luce nel vuoto.

Ciascun fotone trasporta una quantità di energia costante e definita ovvero quantizzata e che è pari a

$$E = h \nu = h \frac{c}{\lambda}$$

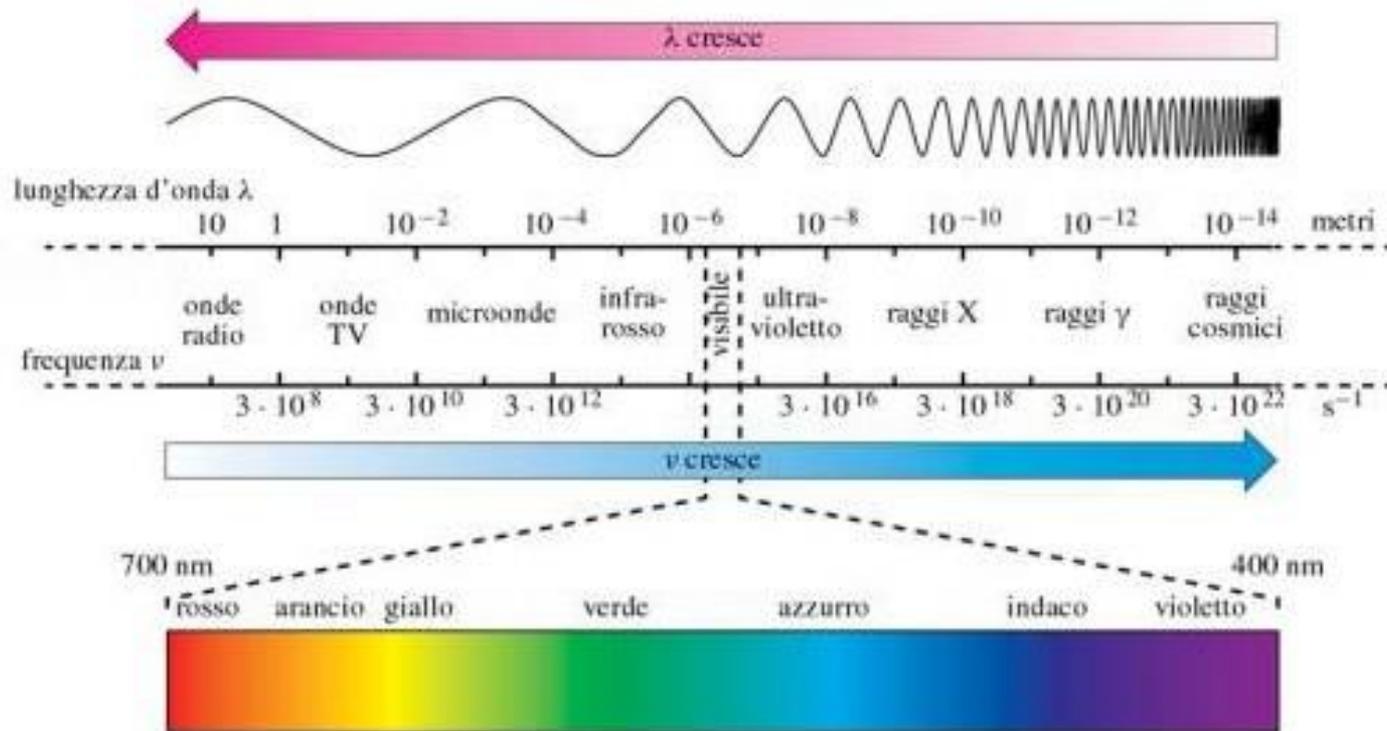
h = **costante di Planck** (6.62×10^{-34} Jsec)

c = **velocità** della luce nel vuoto (3×10^{10} cm/sec)

L'energia trasportata da una radiazione elettromagnetica è inversamente proporzionale alla lunghezza d'onda pertanto le radiazioni più energetiche sono quelle che presentano un minor valore di λ .

Le diverse lunghezze d'onda della radiazione elettromagnetica costituiscono il cosiddetto **spettro della radiazione elettromagnetica**.

Tecniche spettroscopiche



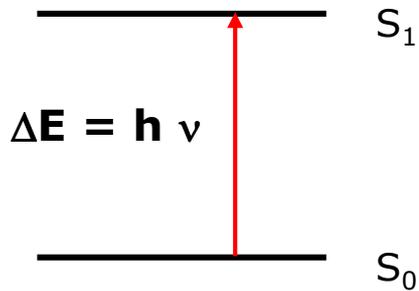
Lo spettro della radiazione elettromagnetica

I nostri occhi percepiscono la radiazione elettromagnetica di lunghezza d'onda compresa tra 700 nm (luce rossa) e 400 nm (luce violetta), chiamata **luce visibile**; la frequenza della luce visibile ne determina il colore. La luce bianca, che comprende quella solare, è una miscela di tutte le lunghezze d'onda della luce visibile.

Tecniche spettroscopiche

La spettroscopia sfrutta **l'interazione tra materia e radiazione elettromagnetica**, in particolare essa studia l'assorbimento o l'emissione delle radiazioni elettromagnetiche da parte delle molecole: nel primo caso si parla di spettroscopia di assorbimento, nel secondo di spettroscopia di emissione. Il dato sperimentale che si ottiene (rispettivamente **spettro** di assorbimento o di emissione) mette in relazione l'intensità della radiazione assorbita o emessa con la variazione della frequenza o della lunghezza d'onda.

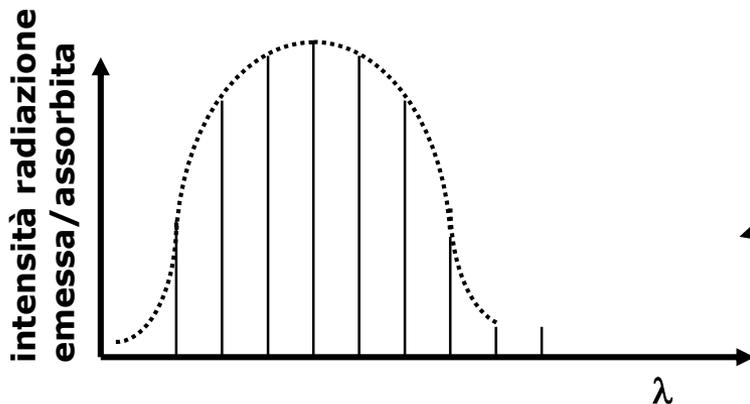
Da tali spettri si possono ottenere informazioni sia di carattere qualitativo (tipo di elemento, composto) che di tipo quantitativo (concentrazione delle specie analizzate).



La quantità di luce assorbita o emessa dalla materia sono quantizzate e comportano un passaggio da uno stato fondamentale (S_0) o eccitato (S_1) a seconda dei casi

assorbimento: si misura la perdita d'intensità della radiazione che attraversa il campione, al variare della λ

emissione: si registra l'intensità della radiazione emessa dal campione dopo l'irraggiamento al variare della λ della radiazione



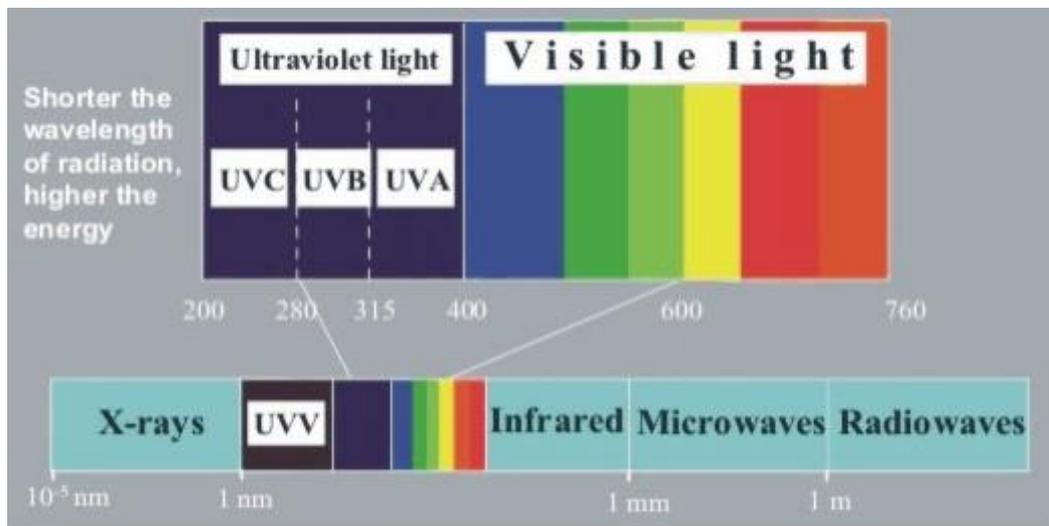
spettro di assorbimento o di emissione: rappresentazione schematica

Spettroscopia UV-Vis

La spettroscopia **UV-vis**, detta anche spettroscopia ultravioletta, studia l'interazione tra le molecole e la regione dello spettro elettromagnetico che comprende le radiazioni delle regioni dell' Uv e del visibile, ovvero radiazioni con lunghezze d'onda che vanno **dai 200nm ai 750nm**.

L'energia associata alle radiazioni appartenenti a queste due regioni è tale da promuovere un elettrone da un orbitale nello stato fondamentale ad un orbitale di uno stato eccitato a più elevata energia: lo spettro Uv-vis è dovuto a **transizioni elettroniche**.

I composti che assorbono la luce nella regione del visibile (e quindi a λ più alte ed E minore) hanno elettroni più facilmente eccitabili di quelle che assorbono nella regione dell'UV che comprende radiazioni più energetiche.



raggi **UVC**: λ tra 280 e 100 nm

raggi **UVB**: λ tra 320 e 280 nm

raggi **UVA**: λ tra 400 e 320 nm

VIS λ da 400nm fino a 750nm circa

Spettroscopia UV-Vis

Quando una radiazione UV o visibile attraversa un campione la sua intensità si riduce in modo proporzionale al numero ed al tipo di molecole incontrate dal raggio lungo il suo cammino. La legge sperimentale che descrive in modo quantitativo tale fenomeno è la **legge di Lambert-Beer** secondo cui:

$$A = \varepsilon \times l \times c$$

Legge di Lambert-Beer

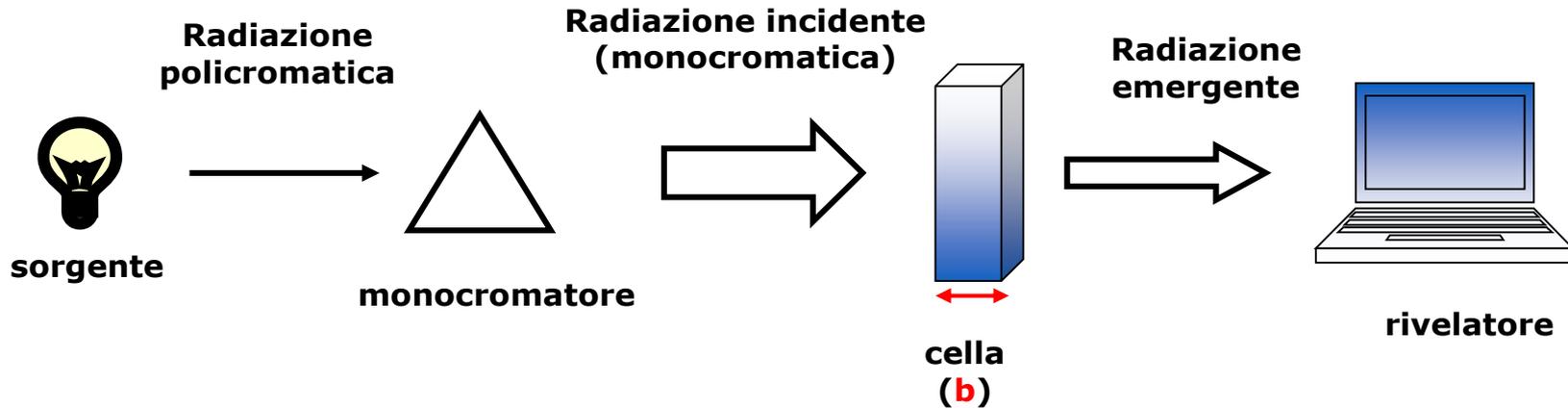
A è l'**assorbanza**, quantità direttamente proporzionale alla concentrazione delle specie in esame

$\varepsilon = a/2.303$ coefficiente di estinzione molare, assorbanza di una soluzione 1 M ($M^{-1}cm^{-1}$)

l = lunghezza cammino ottico

c = concentrazione molare della specie

Misura dell' assorbimento delle radiazioni nell'UV-Vis



Sorgente: lampade a filamento di tungsteno per il campo del visibile (da 930 nm a 330 nm) e lampade al deuterio per l'UV che emettono uno spettro continuo al di sotto dei 400 nm

Monocromatore: scompone la radiazione policromatica in bande monocromatiche

$$A = \varepsilon \times l \times c$$

$$c = \frac{A}{\varepsilon \times l}$$

$$\Delta c = \frac{\Delta A}{\varepsilon \times l}$$

calcolo utile per i saggi di attività enzimatica!!

Spettri di assorbimento di singoli amminoacidi

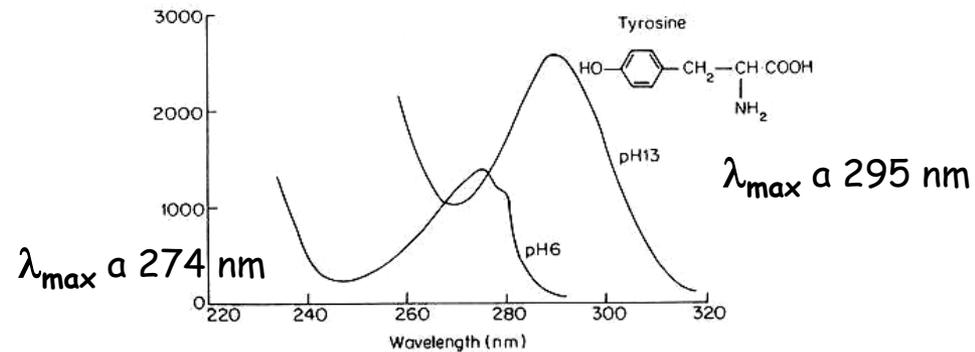
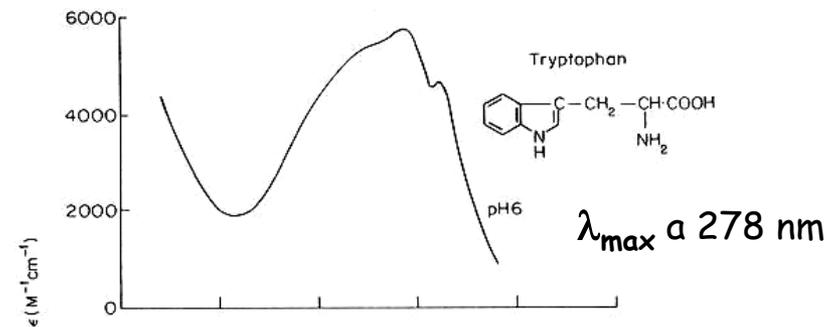
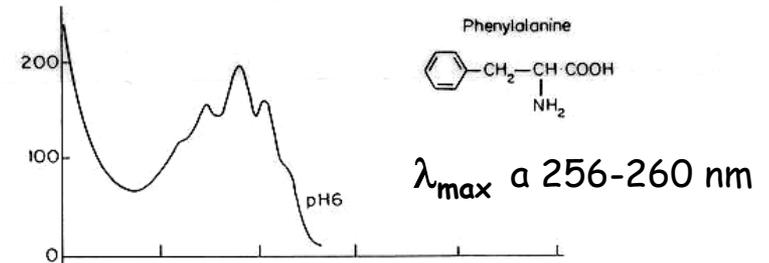
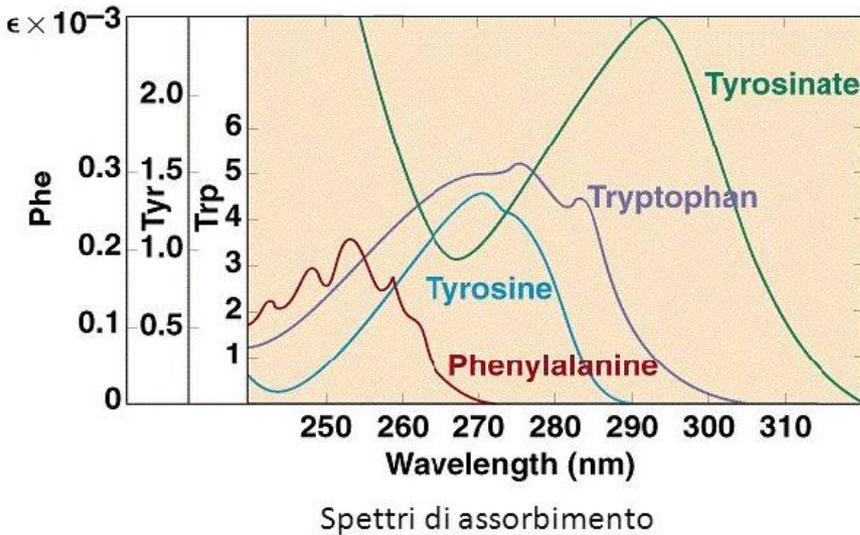
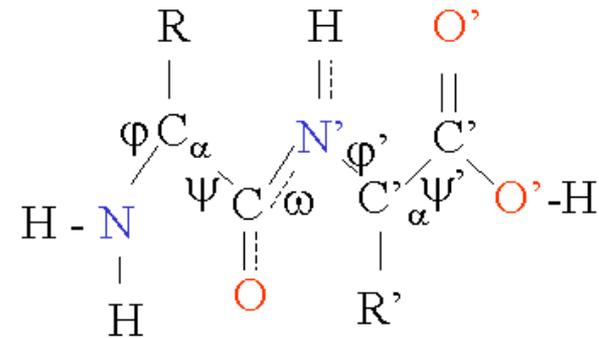
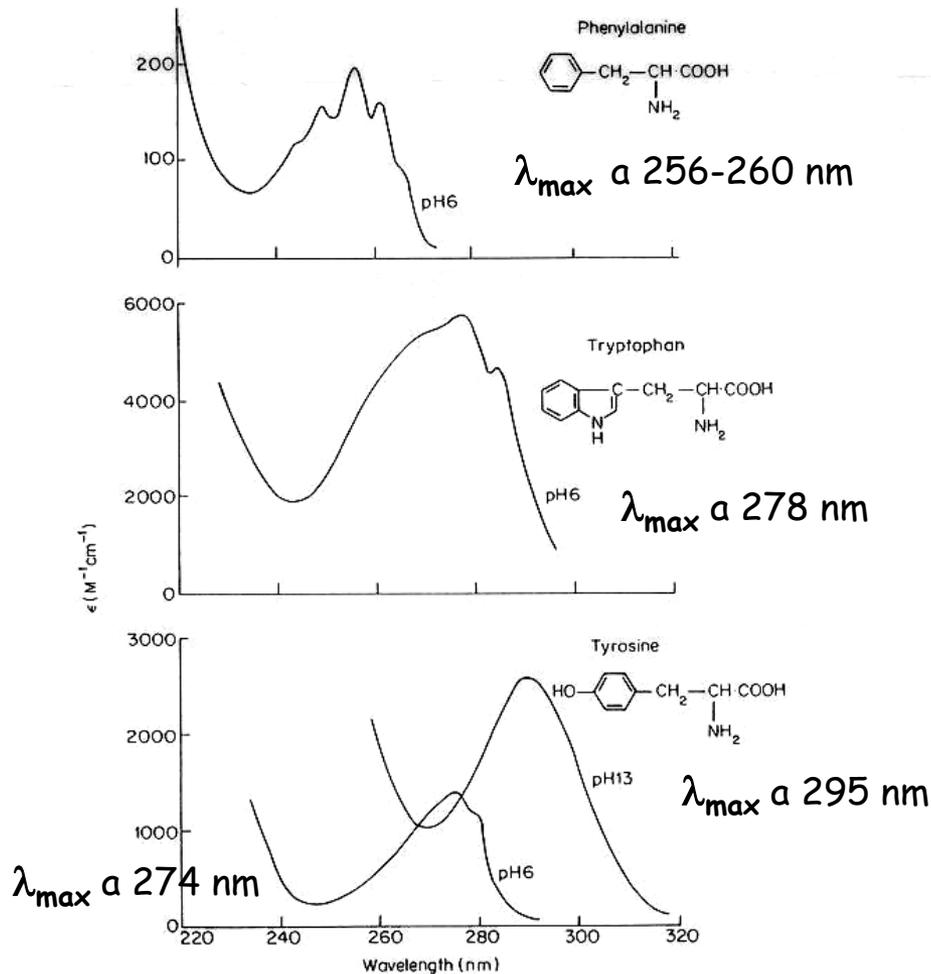


Fig. Ultraviolet absorption spectra of amino acids and proteins. A. UV spectra of aromatic amino acids. Phenylalanine and tryptophane at pH 6, tyrosine at pH 6 and pH 13 (tyrosinate): see Table 3 (Brown, 1980). Reproduced by permission from Brown (1980), *An Introduction to Spectroscopy for Biochemists*. Copyright: Academic Press Inc. (London) Ltd.

Dosaggio delle proteine: metodi spettrofotometrici

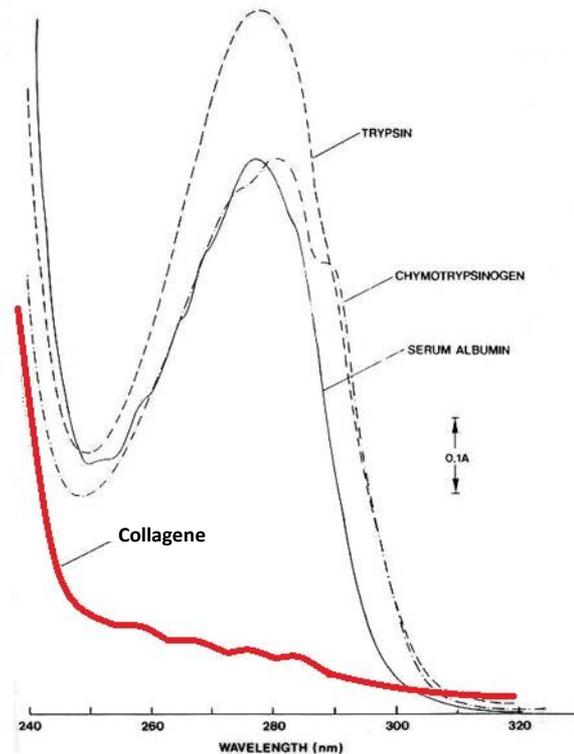
Spettri di assorbimento di singoli amminoacidi



214 nm, lontano UV

Fig. Ultraviolet absorption spectra of amino acids and proteins. A. UV spectra of aromatic amino acids. Phenylalanine and tryptophane at pH 6, tyrosine at pH 6 and pH 13 (tyrosinate): see Table 3 (Brown, 1980). Reproduced by permission from Brown (1980), *An Introduction to Spectroscopy for Biochemists*. Copyright: Academic Press Inc. (London) Ltd.

Spettri di assorbimento di proteine

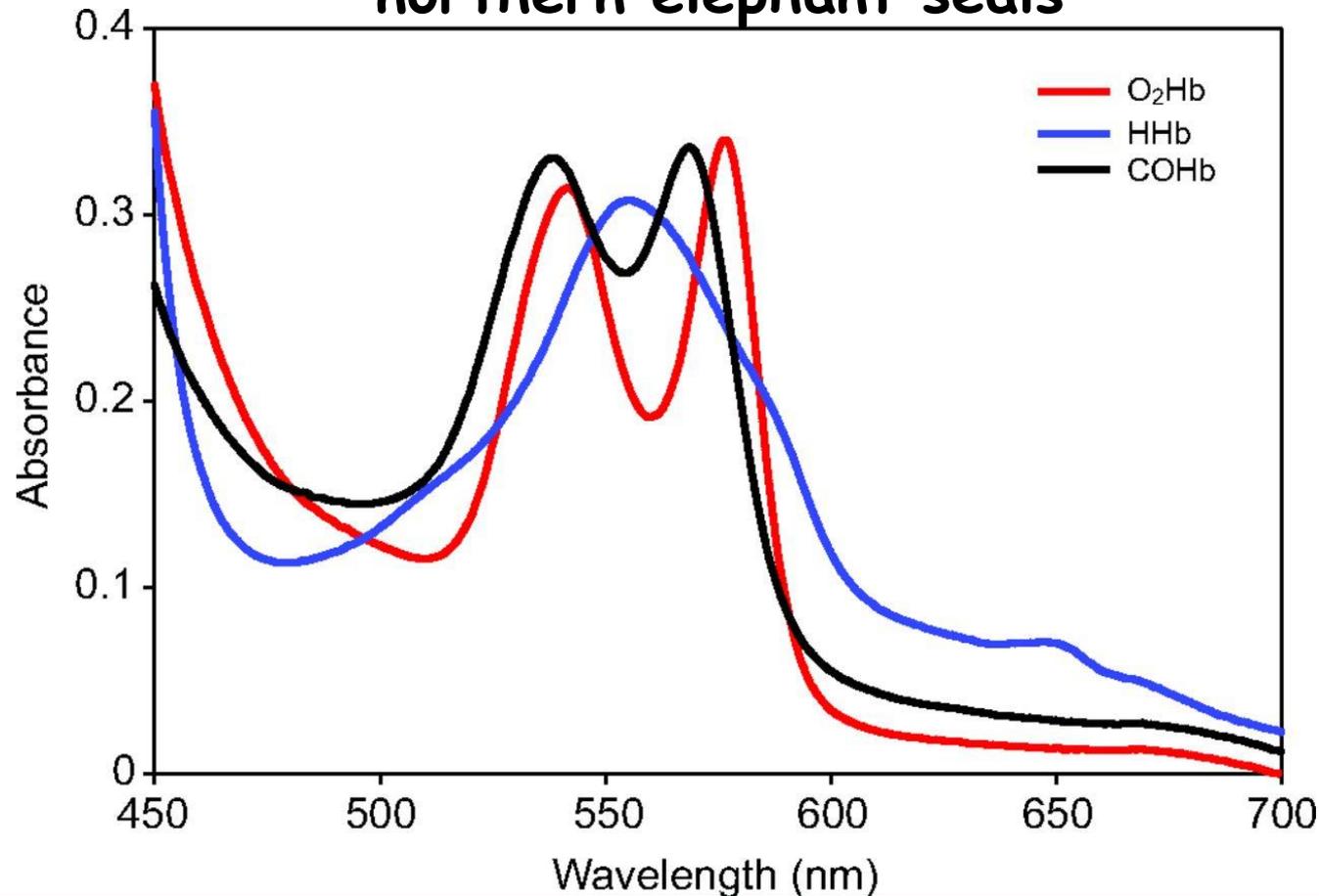


Spettro di assorbimento di quattro proteine: la **tripsina** ha un alto contenuto in tirosina, l'**albumina** in fenilalanina, il **chimotripsinogeno** in triptofano e il collagene ha un basso contenuto in tutti e tre questi aminoacidi.

Absorption Maxima (λ_{\max}) and Molar Absorption Coefficients (ϵ) for Various Substances at Neutral pH Encountered in Biological studies.

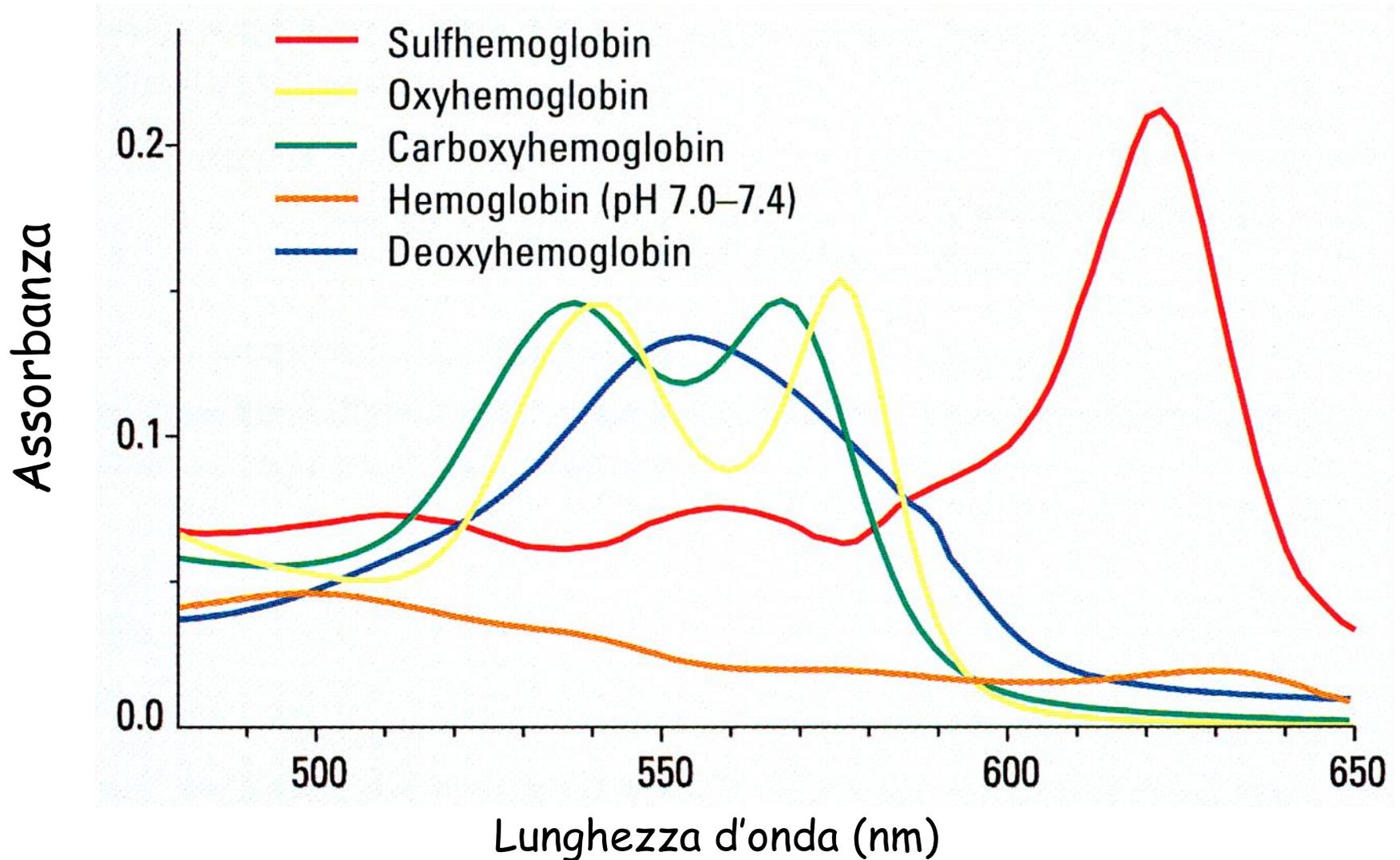
Molecule	λ_{\max} (nm)	$10^{-3} \times \epsilon$ at λ_{\max} ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$)
Tryptophan*	280	5.6
	219	47.0
Tyrosine*	274	1.4
	222	8.0
	193	48.0
Phenylalanine*	257	0.2
	206	9.3
	188	60.0

Absorption spectra for oxyhemoglobin (O_2Hb), deoxyhemoglobin (HHb) and carboxyhemoglobin (COHb) in northern elephant seals



Peaks for O_2Hb (542 and 577 nm), HHb (555 nm) and COHb (539 and 569 nm) match those of other mammalian species (human, cow, sheep)

Spettri di assorbimento di varie forme dell'Emoglobina



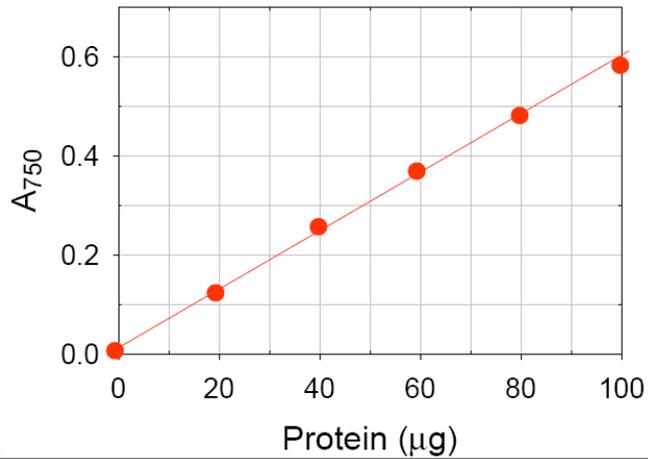
✓ metodi colorimetrici (indiretti)

Tabella 7.2 Saggi colorimetrici di uso comune

Sostanza	Reattivo	Lunghezza d'onda
Aminoacidi	(a) Ninidrina (b) Sali rameici	570 (prolina 420) 620
Legame peptidico	Biureto (NaOH, Tartrato di Na-K, CuSO ₄)	540
Fenoli, tirosina	Folin (fosfomolibdato, fosfotungstato, sali rameici)	660 o 750 (750 più sensibile)
Proteine	(a) Folin	660
	(b) Biureto	540
	(c) BCA	562
	(d) Blu Coomassie	595

Standard Curve

Lowry Assay Standard Curve
Protein amount vs. Absorbance

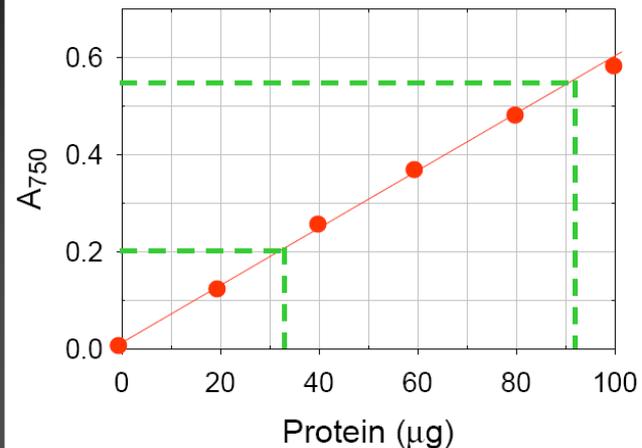


Protein standards:

Protein (µg)	A ₇₅₀
0	0.000
20	0.120
40	0.254
60	0.372
80	0.480
100	0.601

Using Standard Curve

Lowry Assay Standard Curve
Protein amount vs. Absorbance

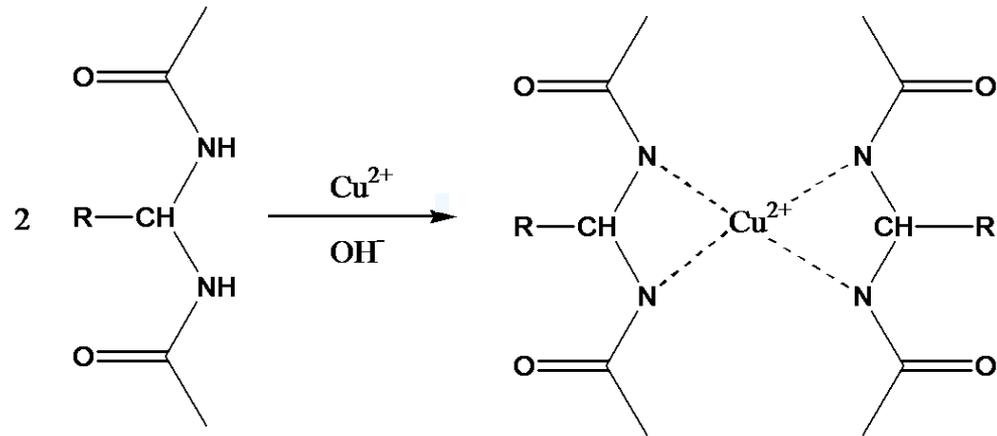


Protein unknowns:

Protein (µg)	A ₇₅₀
33	0.200
92	0.550

Dosaggio delle proteine: metodi colorimetrici

Biuret Test



Peptide Chains

Biuret Complexes (purple color)

- Il reattivo del biureto è costituito da una soluzione di solfato di rame contenente tartrato di sodio e potassio
- In condizioni alcaline gli ioni rameici Cu^{2+} formano un complesso di coordinazione con quattro gruppi $-\text{NH}$ presenti in altrettanti legami peptidici
- Il complesso che si forma assorbe luce nel visibile, con un picco a 540-550 nm

METODO DI LOWRY

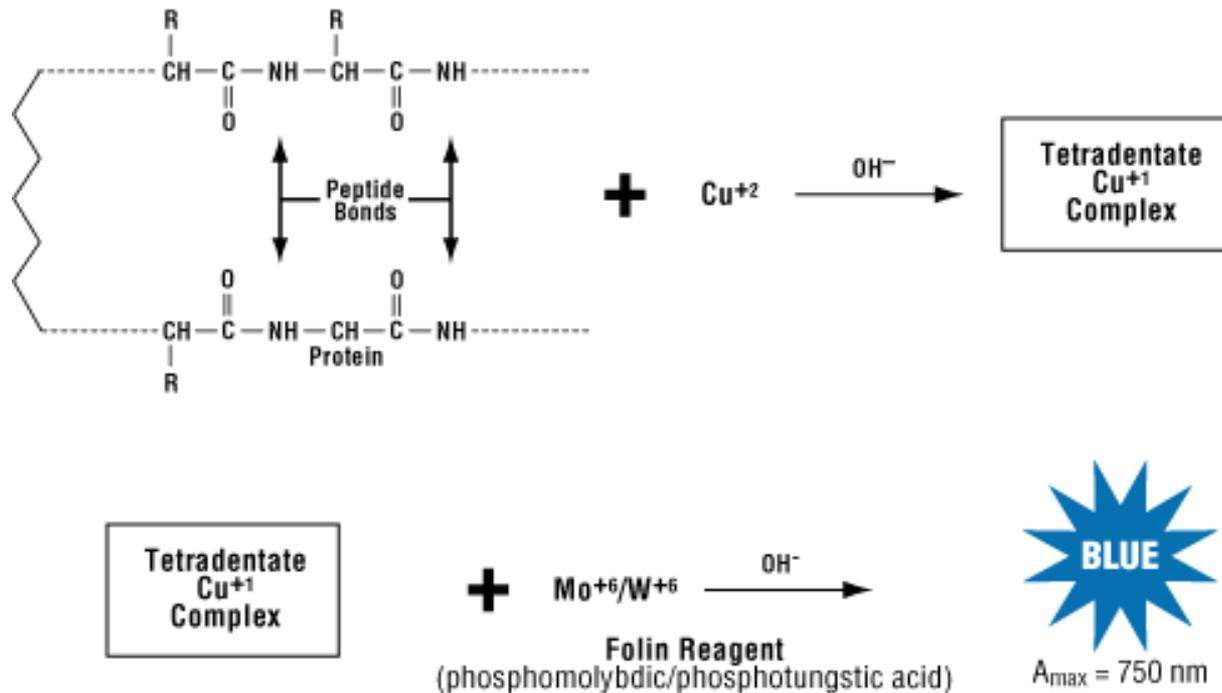
- Consiste nella reazione del biureto con una soluzione di solfato di rame, seguita dalla riduzione in condizioni alcaline del reagente di Folin-Ciocalteu (fosfomolibdato, sodiotungstato) e lo sviluppo di un colore blu
- Gli ioni di rame facilitano il processo di riduzione
- I gruppi cromogeni principali sono i legami peptidici complessati con rame (biureto) ed i molibdotungstati ridotti in gran parte da tirosina e triptofano
- Il prodotto della reazione, eteropolimolibdeno, ha una forte colorazione blu, con un massimo di assorbimento a circa 750 nm

METODO DI LOWRY

sensibilità: inferiore a $10 \mu\text{g/ml}$

Tris e tamponi zwitterionici (PIPES, HEPES) interferiscono.

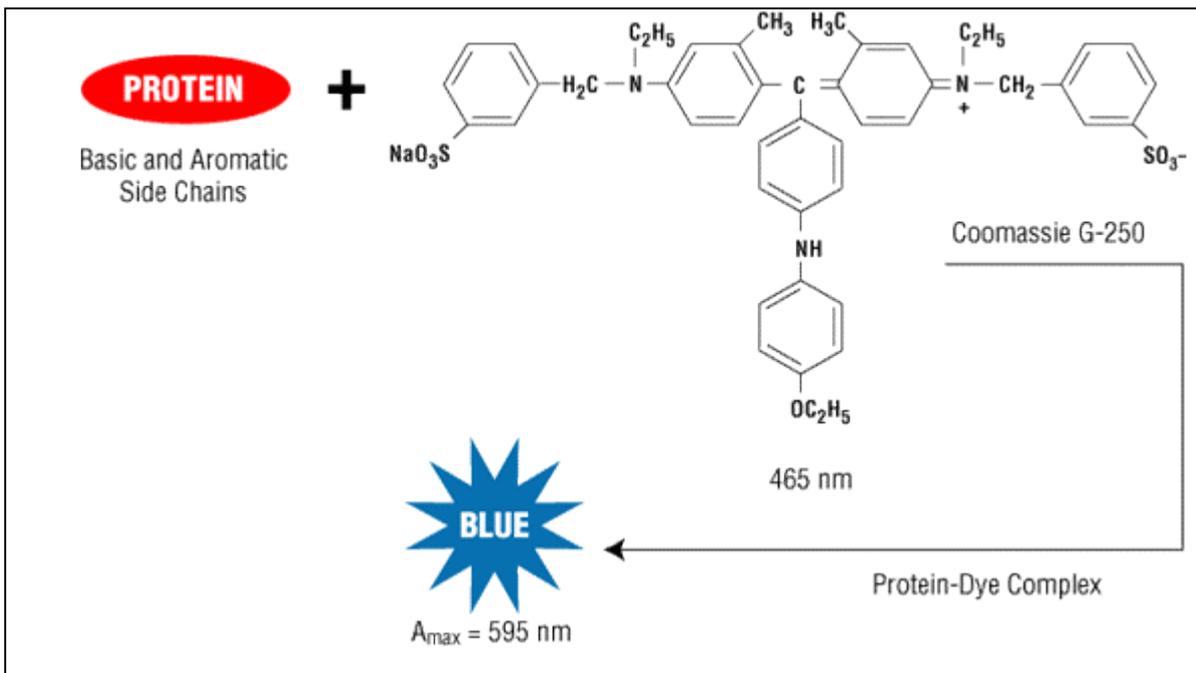
Si basa sulla reazione del Biureto dove i legami peptidici reagiscono con Cu^{++} che reagisce con il reagente di Folin. Il colore sviluppato dipende dal contenuto di tirosina e triptofano.



Reaction schematic for the Modified Lowry Protein Assay.

METODO DI BRADFORD

- Il legame del colorante *Coomassie Brilliant Blue G-250* alle proteine determina uno spostamento del massimo di assorbimento del colorante da 465 nm (rosso) a 595 nm (blu) in soluzioni acide (Bradford, 1976)
- Il colorante forma forti complessi non covalenti con le proteine tramite interazioni elettrostatiche con gruppi amminici e tramite forze di van der Waals
- Il colorante è preparato come soluzione *stock* in acido fosforico
- Il metodo è costituito da un unico passaggio in cui il colorante è aggiunto ai campioni e si determina l'assorbanza a 595 nm



Il colorante Coomassie Brilliant Blue G-250 si lega primariamente a residui amminoacidici basici (specialmente arginina) e aromatici

In condizioni acide, il colorante è prevalentemente nella forma cationica doppiamente protonata rossa ($\lambda_{\text{max}} = 470 \text{ nm}$). Quando il colorante lega le proteine è convertito nella forma stabile non protonata blue ($\lambda_{\text{max}} = 595 \text{ nm}$).

La quantità di colorante che si lega è proporzionale alla quantità di proteina presente in soluzione.

Pertanto l'intensità del colore blu (e dunque l'assorbimento) è proporzionale alla concentrazione proteica.

In genere quantità uguali di proteine differenti legano la stessa quantità di colorante → **il saggio può essere dipendente dal tipo di proteina**

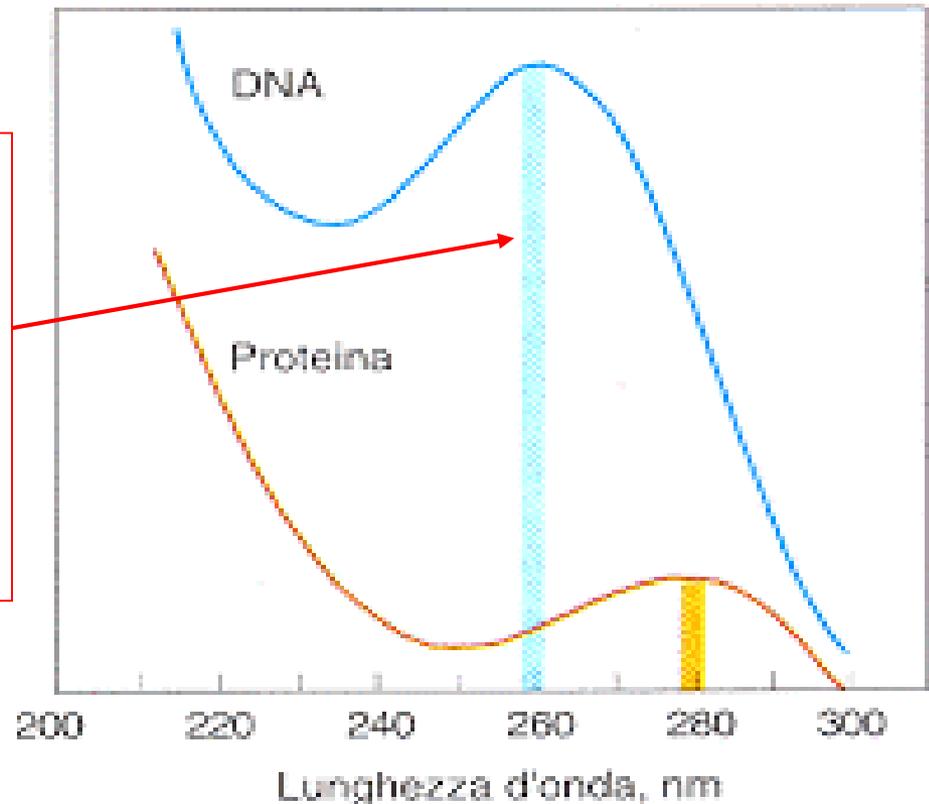
Metodo diretto per la determinazione della concentrazione proteica totale

• Assorbimento della luce ultravioletta a 280nm

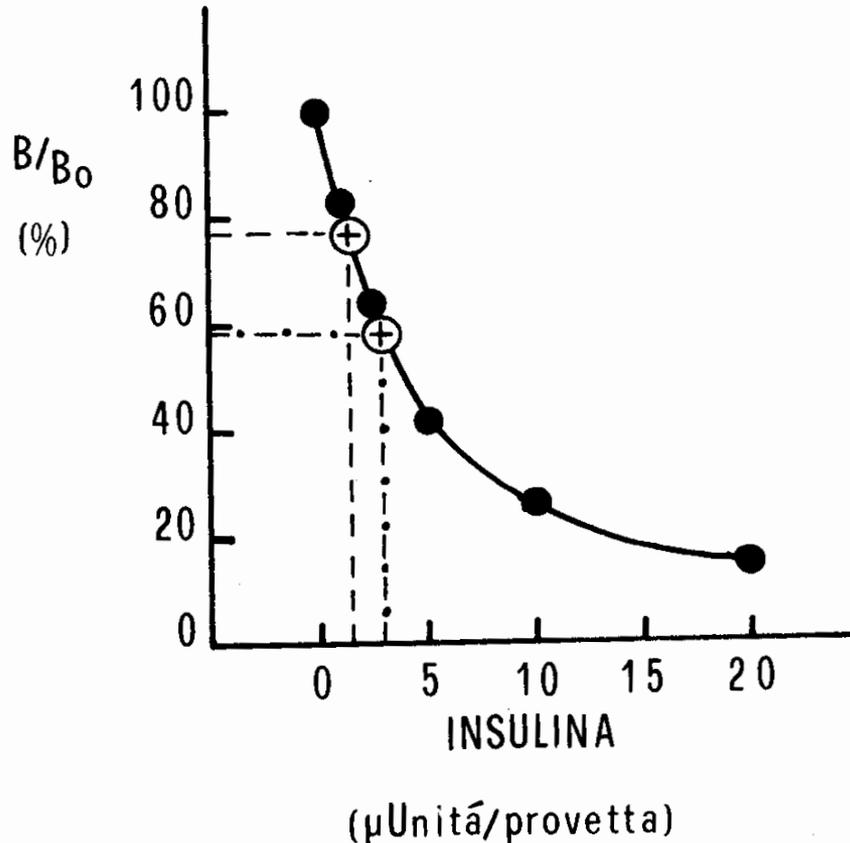
$$[\text{Proteine}] \text{ (mg/ml)} = 1.55 A_{280} - 0.76A_{260}$$

Dipende dalla presenza degli amminoacidi aromatici (Tyr, Phe e Trp) però soffre dell'interferenza degli acidi nucleici che a 280nm assorbono 10 volte in più: correzione a 260nm per sottrarne il contributo.

Metodo non distruttivo, utile per piccole quantità di proteina.



The principle of a simple example of radioimmunoassay (RIA)

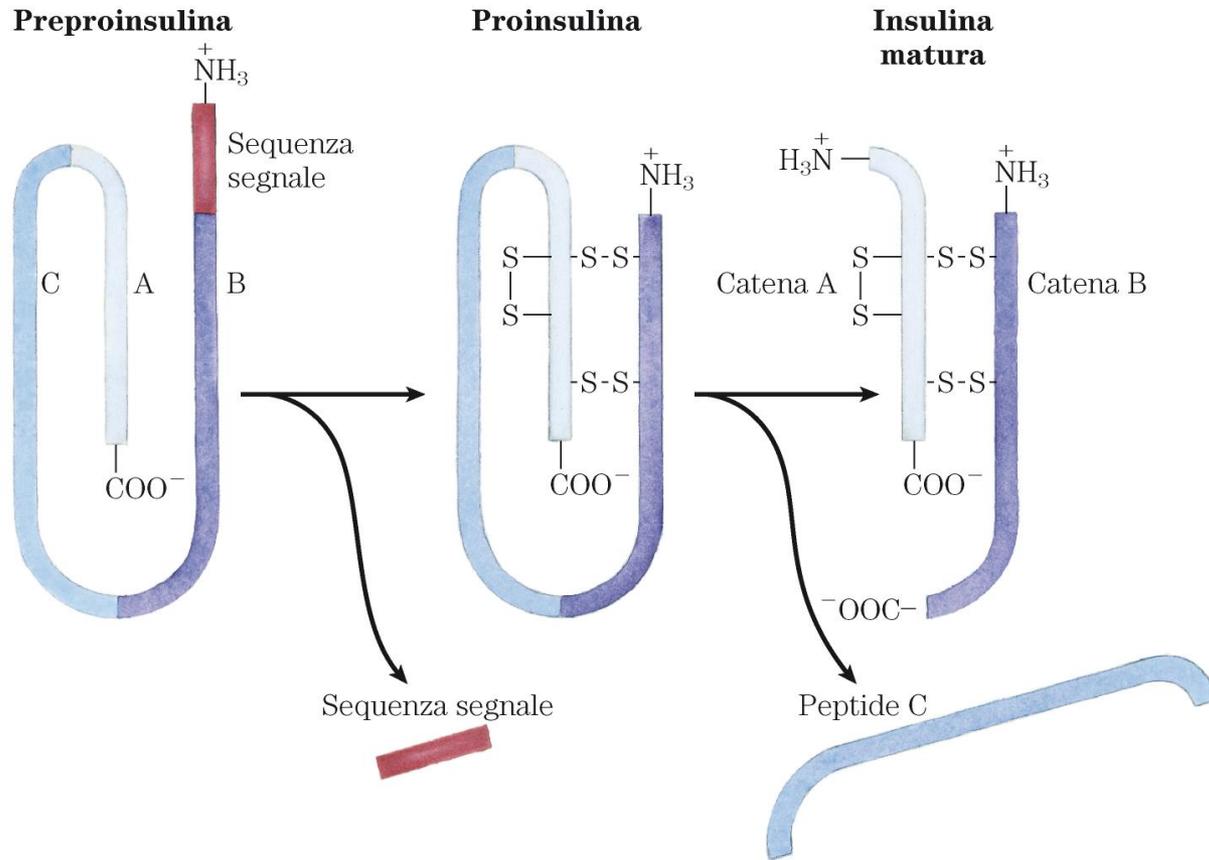


- One of the most sensitive techniques for measuring hormones, drugs, & vitamins at conc. of 10^{-12} M first discovered by Rosalyn Yalow and Solomon Aaron Berson in the 1950s.
- The principle involves competitive binding of radiolabeled Ag and unlabeled Ag to the limited supply of a high affinity Ab.

- $B/B_0 \times 100$ 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.

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

Struttura dell'insulina



Radiolabeled hormone

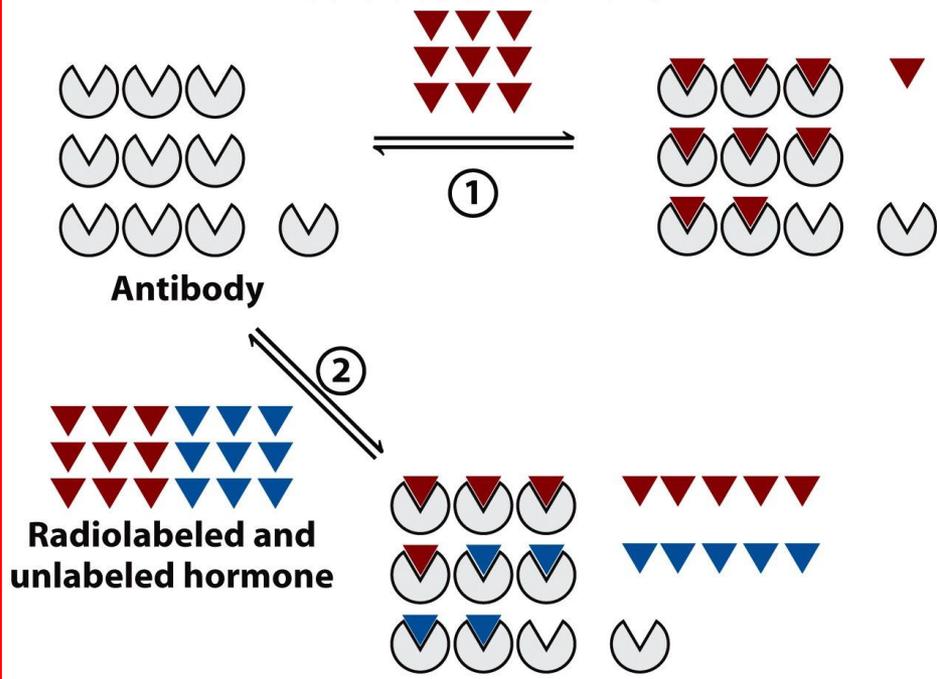


Figure 23-3a
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W.H. Freeman and Company

A radioimmunoassay for adrenocorticotrophic hormone (ACTH; called corticotropin)

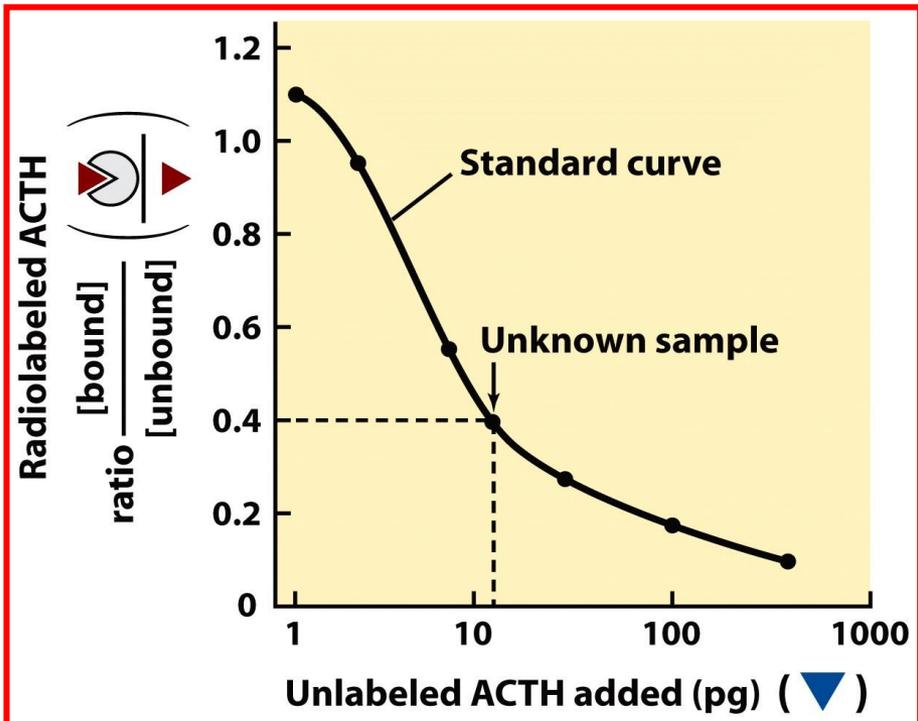


Figure 23-3b
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W.H. Freeman and Company

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.**

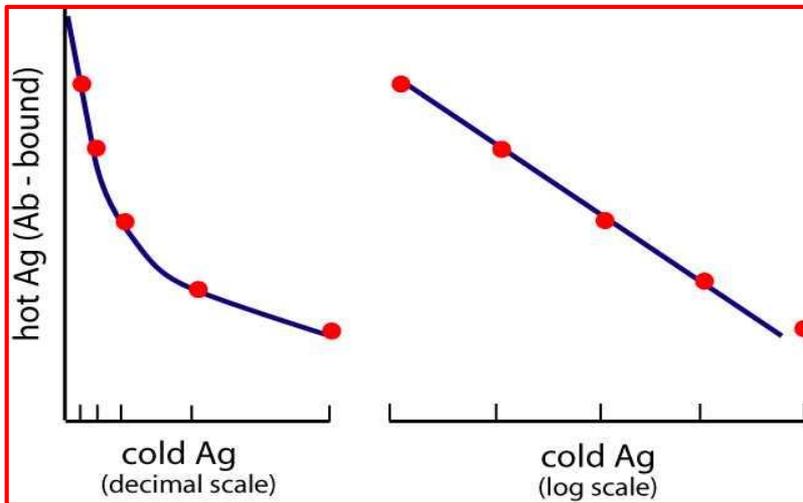
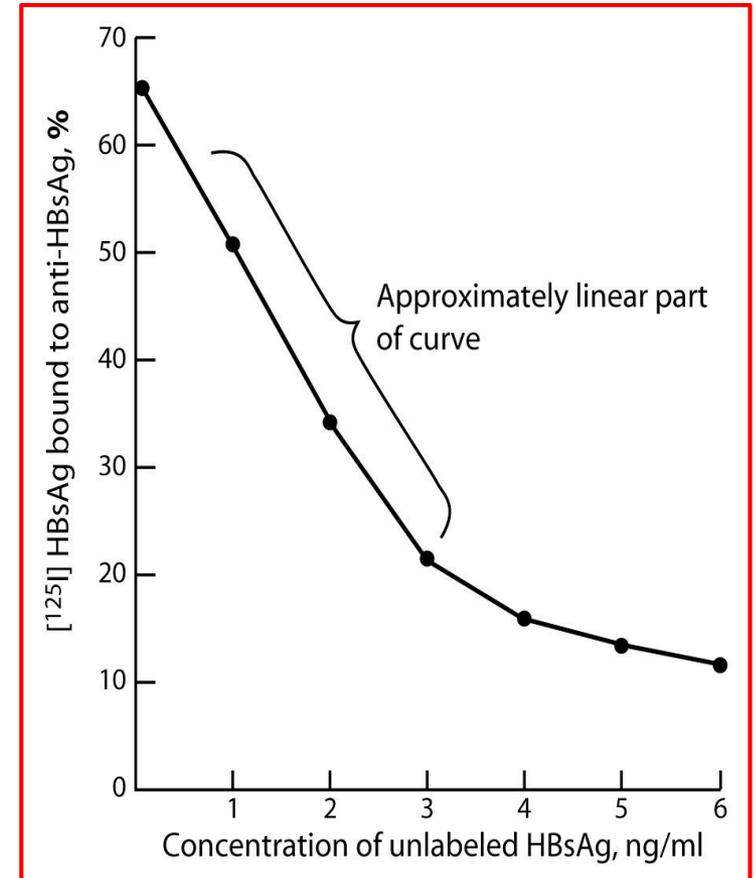
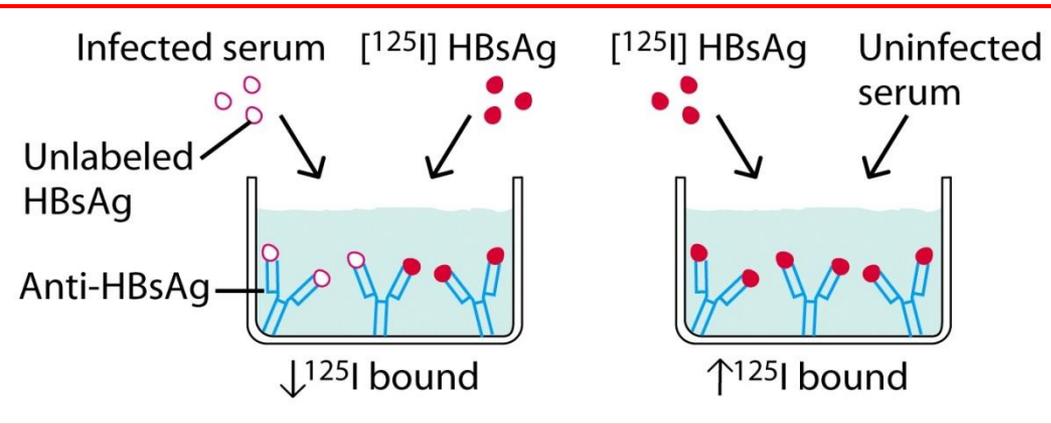
We bequeath to you, the next generation, our knowledge but also our problems.

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

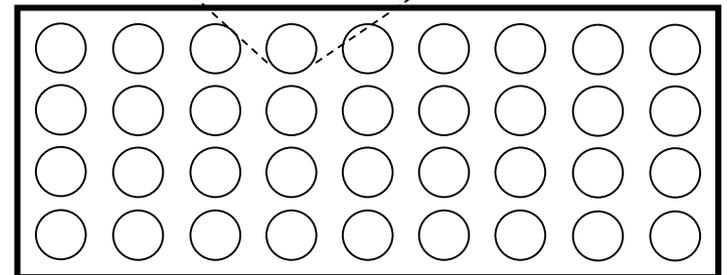
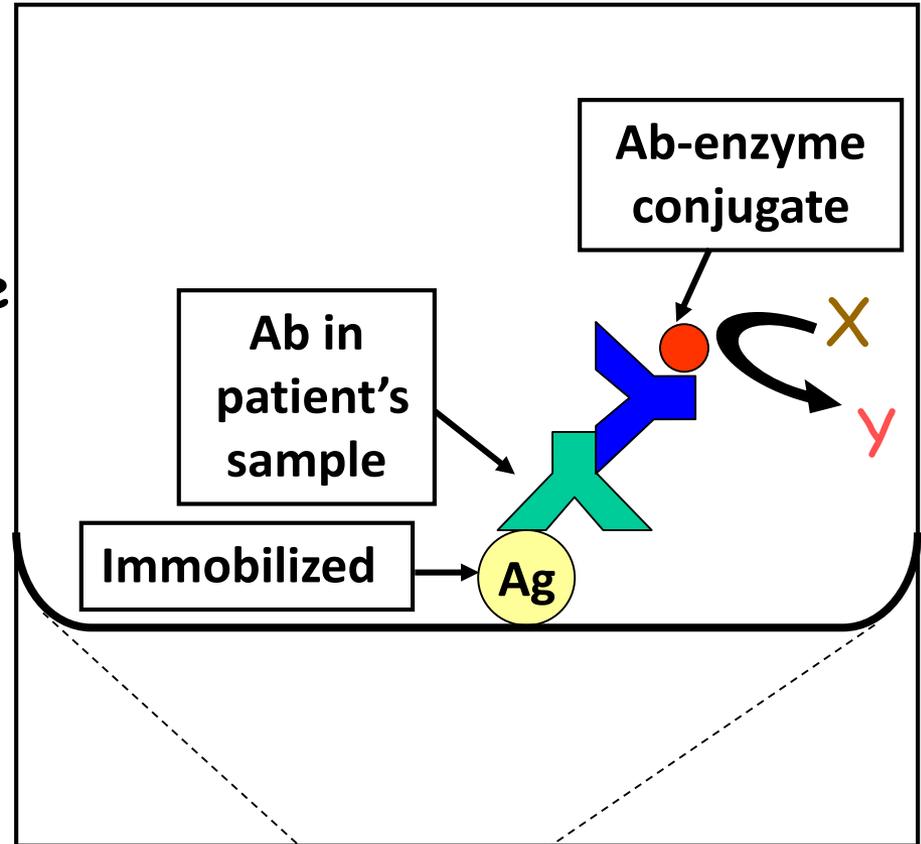
A standard curve to determine the conc. of HBsAg in unknown serum.



Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

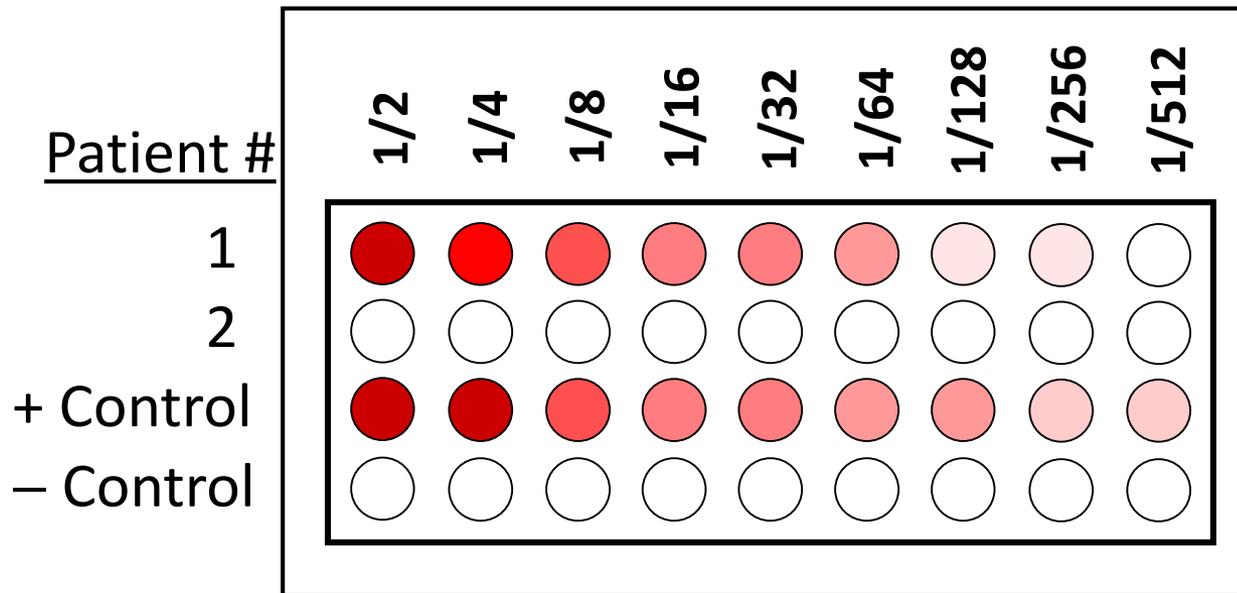
Used for Ab detection

- 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



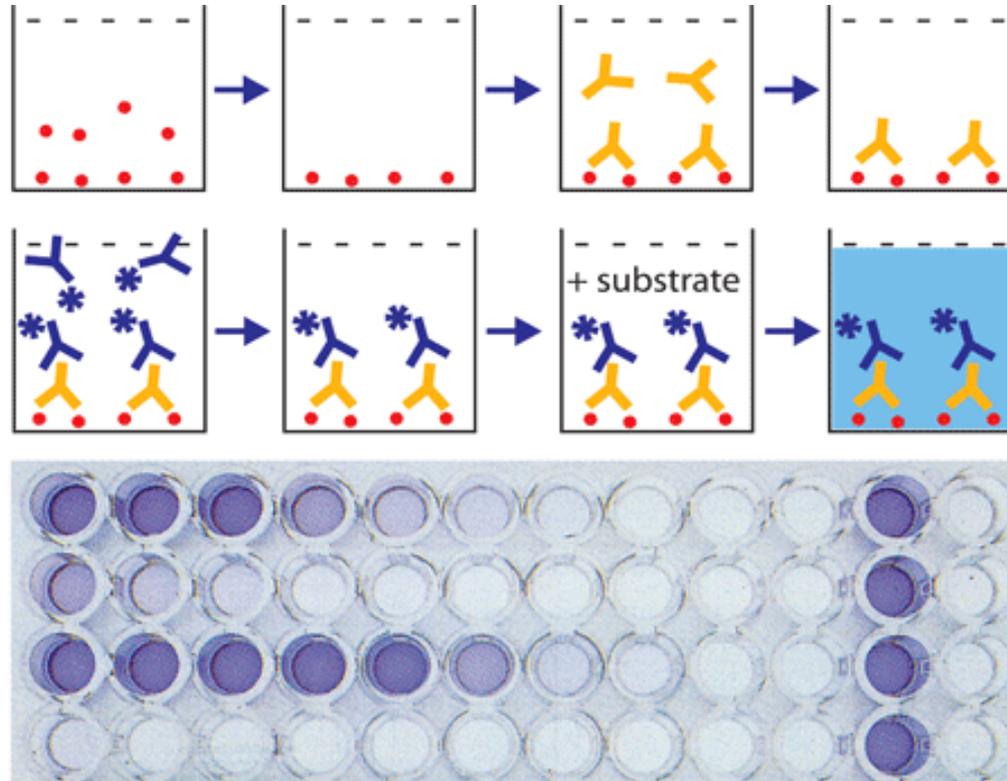
ELISA

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.

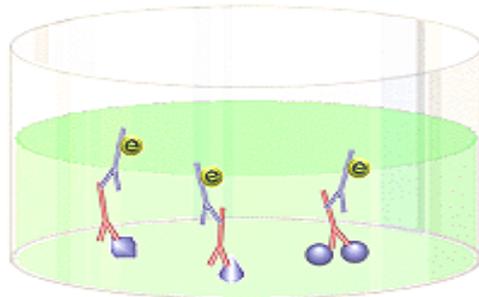


Anti-human immunoglobulin coupled to an enzyme. This is the second antibody, and it binds to human antibodies.

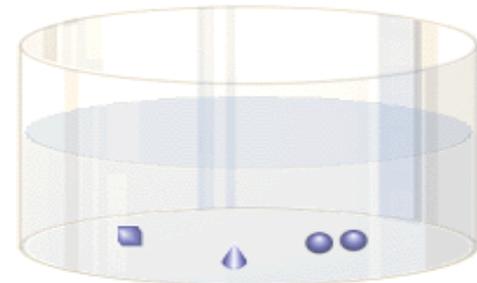


Chromogen or substrate which changes color when cleaved by the enzyme attached to the second antibody.

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

