

## Laboratorio di fotonica per la medicina

Prof. Marco Consales

### Laboratorio 03

# Rilevazione antigenica in SPR tramite Biacore 8K



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DEL MOLISE



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI  
DEL SANNIO Benevento



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI  
DI CASSINO E DEL  
LAZIO MERIDIONALE

Benedetta Masone

[b.masone@studenti.unimol.it](mailto:b.masone@studenti.unimol.it) – mat.177470

Martina Rainone

[m.rainone@studenti.unimol.it](mailto:m.rainone@studenti.unimol.it) – mat.177471

Fabrizio Ravelli

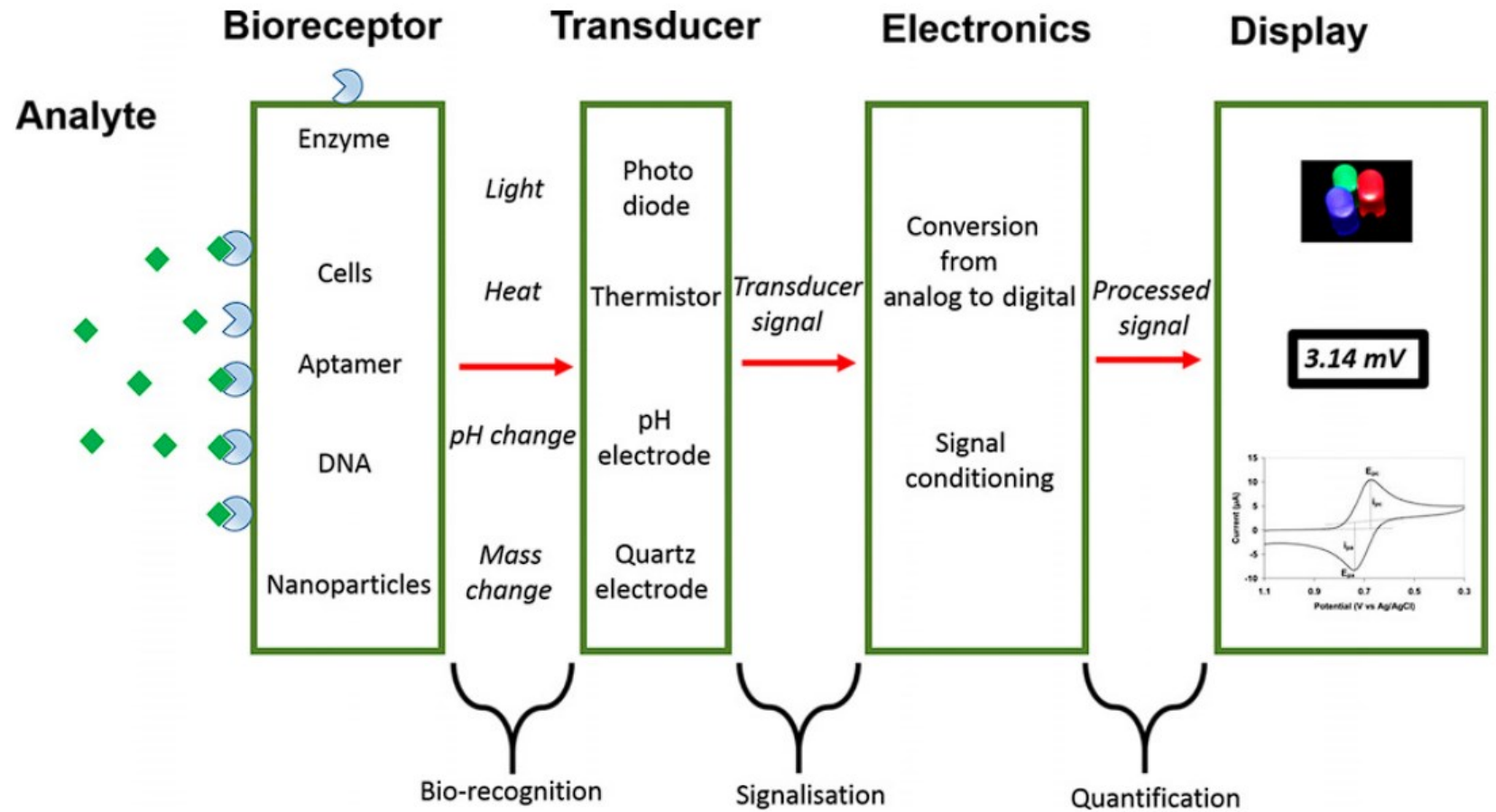
[f.ravelli@studenti.unimol.it](mailto:f.ravelli@studenti.unimol.it) – mat.177085

# INDICE

1. Introduzione teorica
2. Strumentazione utilizzata
3. Procedura operativa
4. Analisi dei risultati

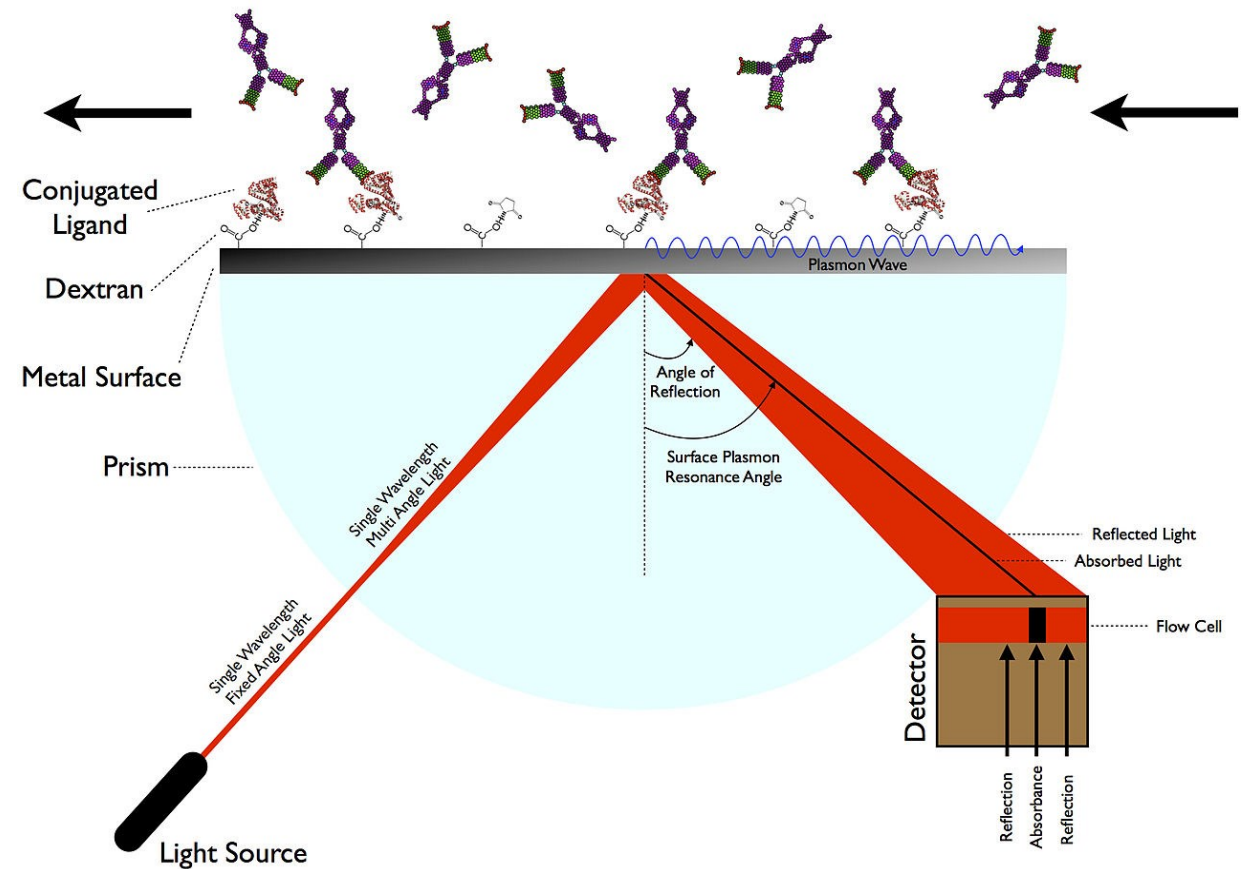
# INTRODUZIONE TEORICA

Architettura generale  
di un biosensore



# INTRODUZIONE TEORICA

Una delle tecnologie che permette la caratterizzazione di un biosensore è la **Surface Plasmon Resonance (SPR)**



# STRUMENTAZIONE UTILIZZATA

## Technical specifications and characteristics

Detection technology	Surface plasmon resonance (SPR) biosensor
Information provided	Kinetic and affinity data ( $k_a$ , $k_d$ , $K_D$ ), specificity, selectivity and screening data
Data presentation	Result tables, result plots, and real-time monitoring of sensorgrams
Analysis time per cycle	Typically 2 to 15 min
Automation	60 h unattended operation
Sample type	Small molecule drug candidates to high molecular weight proteins (also DNA, RNA, polysaccharides, lipids, cells, and viruses) in various sample environments (e.g., in DMSO containing buffers, plasma, and serum)
Required sample volume	Injection volume plus 20 to 50 $\mu$ L (application dependent)
Injection volume	1 to 200 $\mu$ L
Flow rate range	1 to 100 $\mu$ L/min
Flow cell volume	40 nL
Flow cell height	70 $\mu$ m
Data collection rate	1 or 10 Hz
Sample/reagent capacity	4 $\times$ 96- or 384-well microplates, normal and deep-well.

## Typical working ranges

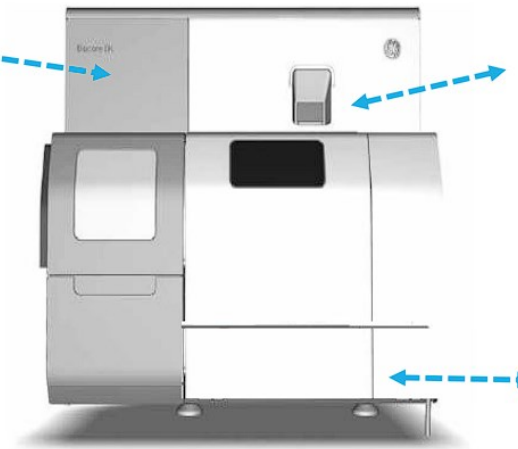
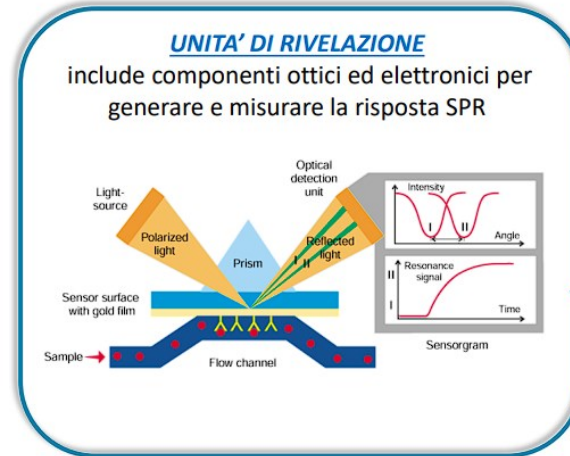
Association rate constant ( $k_a$ )	Proteins: up to $10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ LMW molecules: up to $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
Dissociation rate constant ( $k_d$ )	$10^{-6}$ to $0.5 \text{ s}^{-1}$
Sample concentration	$\geq 1 \text{ pM}$
Molecular weight detection	No lower limit for organic molecules
Baseline noise	Typically $< 0.02 \text{ RU (RMS)}$
Baseline drift	Typically $< 0.3 \text{ RU/min}$
Blank subtracted drift	$< \pm 0.03 \text{ RU/min}$
Immobilized interactant consumption	Typically 0.03 to 3 $\mu\text{g/flow cell}$



# STRUMENTAZIONE UTILIZZATA

- Label free
- Contact free
- Real time

## Biacore 8K



### SENSOR CHIP

presenta una superficie biospecifica dove hanno luogo le interazioni tra analita e ligando



### INTEGRATED MICROFLUIDIC CARTRIDGE

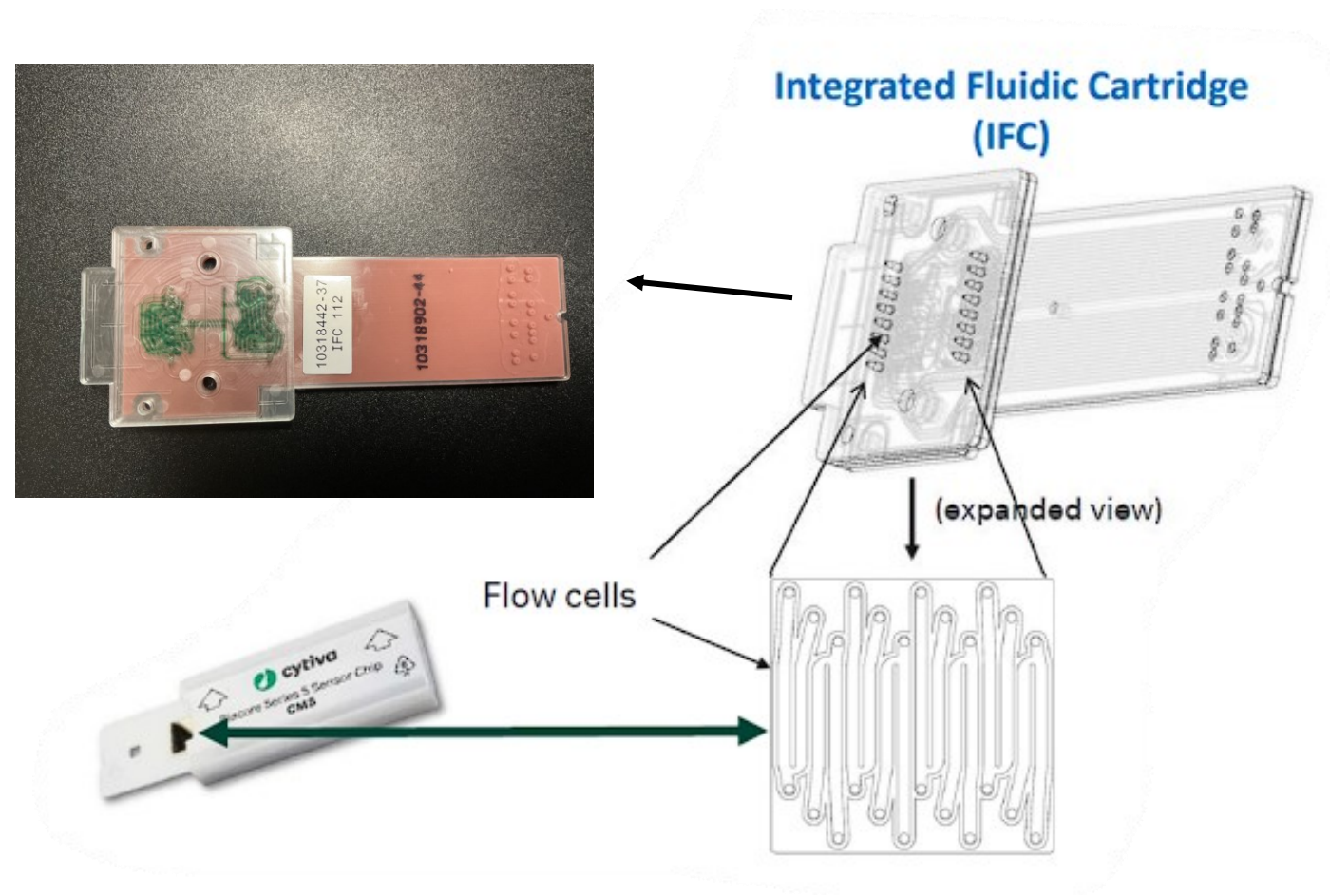
i microtubi che trasportano il tampone, il loop per il caricamento del campione e le valvole.



# STRUMENTAZIONE UTILIZZATA

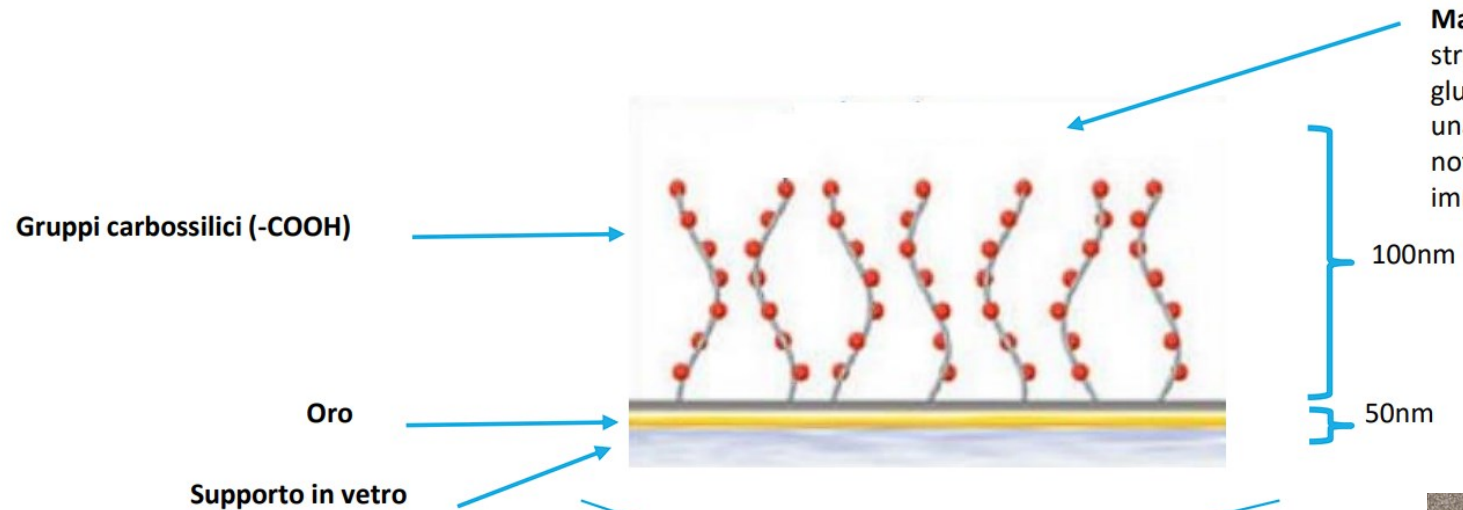
Sistema microfluidico di 8 canali  
ognuno costituito da 2 Flow cell (FC):

- FC1 → Controllo interno
- FC2 → Active Flow Cell





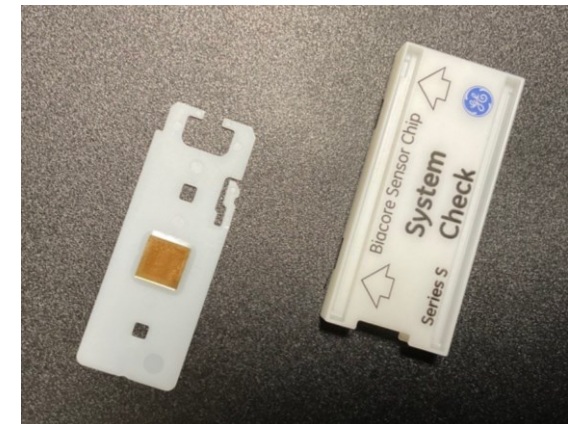
# STRUMENTAZIONE UTILIZZATA



**Matrice di destrano:** Polisaccaride a struttura ramificata formato da unità di glucosio, che ci permette di ottenere una struttura 3D aumentando notevolmente il numero di ligandi da immobilizzare

## Sensor chip CM5

Chip con matrice in destrano per applicazioni general purpose.





# PROCEDURA OPERATIVA

## **OBBIETTIVO**

Caratterizzazione di un biosensore per interleuchina 8 (IL-8)

## **STEP PRINCIPALI**

1. Preparazione del buffer e iniezione
2. Preparazione dei campioni e immobilizzazione
3. Definizione del protocollo e analisi – SCK
4. Rigenerazione
5. Definizione del protocollo e analisi - Enhancing

# PROCEDURA OPERATIVA

## 1. PREPARAZIONE DEL BUFFER E INIEZIONE

Il buffer utilizzato è 1 L di HBS (HEPES Buffer Solution) a concentrazione 1x.

Sono stati preparati 500 mL aggiuntivi a partire da una soluzione stock a concentrazione 10x.

$$10 \cdot C_i V_i = C_i \cdot 500 \text{ mL} \rightarrow V_i = \frac{C_i}{10 \cdot C_i} \cdot 500 \text{ mL} = 50 \text{ mL}$$

Inserimento nella macchina tramite routine *Change solution*.



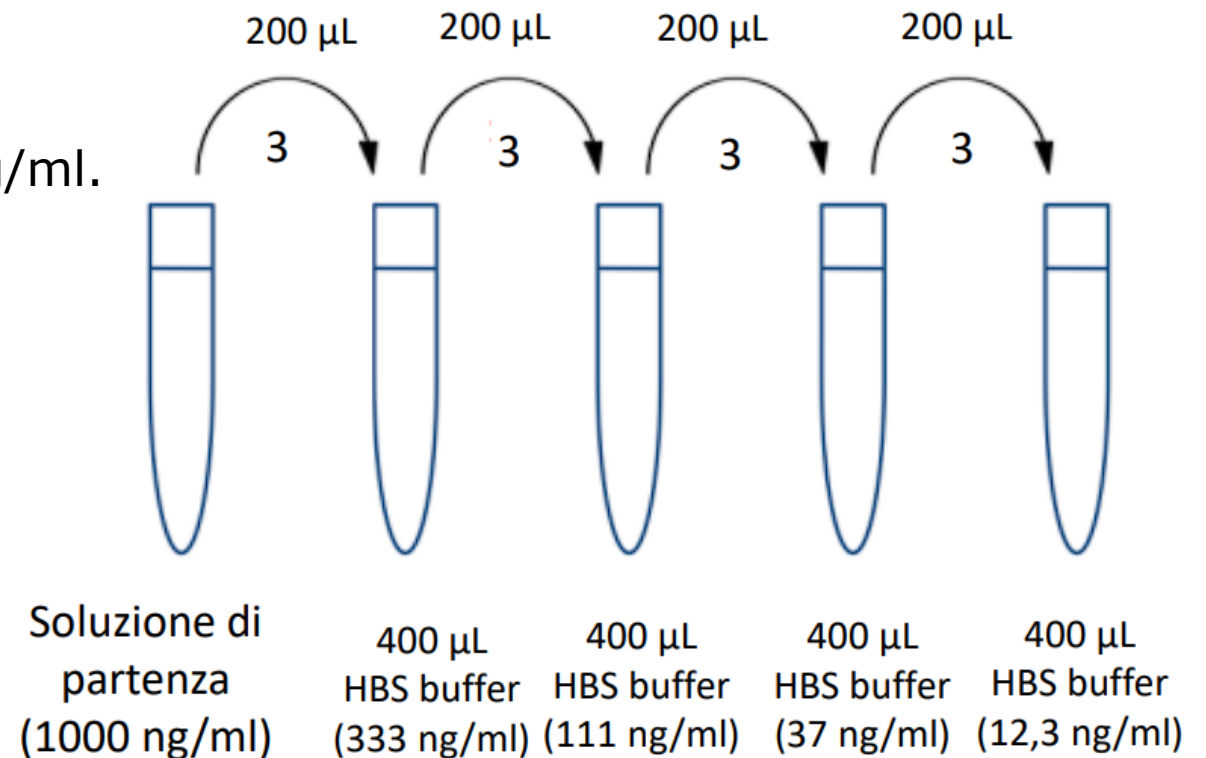
# PROCEDURA OPERATIVA

## 2. PREPARAZIONE DEI CAMPIONI E IMMOBILIZZAZIONE

I quattro campioni sono stati ottenuti dalla soluzione stock di IL-8 a concentrazione 250  $\mu\text{g/ml}$ .

La soluzione stock è stata ricondotta ad una concentrazione pari 1  $\mu\text{g/ml}$  per agevolare la preparazione dei campioni.

La preparazione dei campioni tramite diluizione seriale (DF=3) permette di distribuire uniformemente eventuali errori di diluizione.

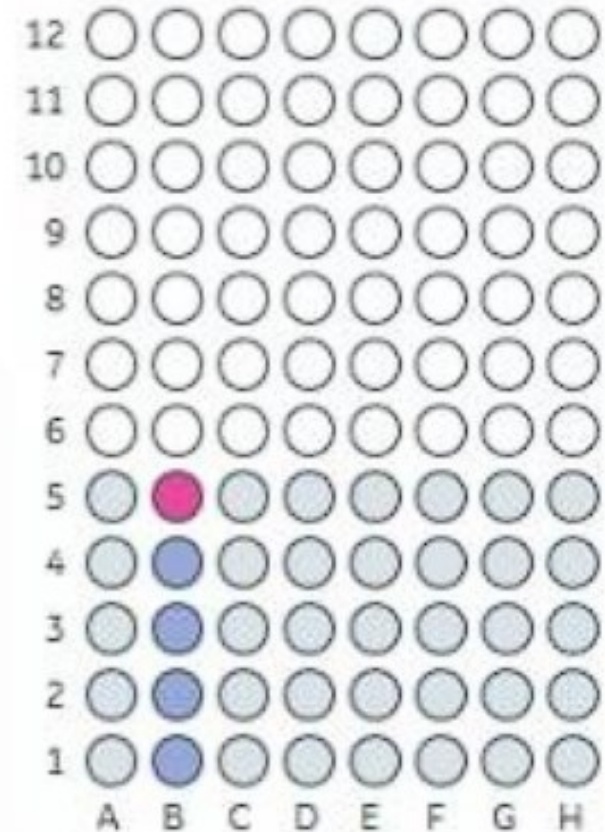


# PROCEDURA OPERATIVA

## 3. DEFINIZIONE DEL PROTOCOLLO E ANALISI - SCK

Sono stati settati i seguenti parametri:

- Contact time → 120 s
- Dissociation time → 600 s
- Flow rate → 30  $\mu\text{l}/\text{min}$
- Concentrazioni per ciclo → 4
- Posizionamento sample → B1 ÷ B5
- Flow cell → FC1, FC2



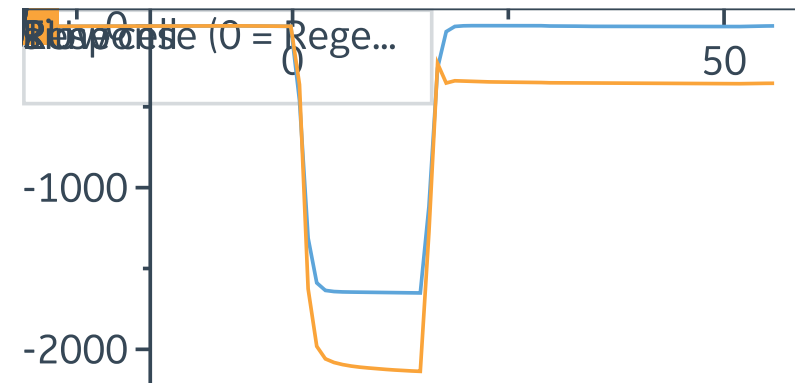
# PROCEDURA OPERATIVA

## 4. RIGENERAZIONE

Iniezione di glicina (pH = 1.5)

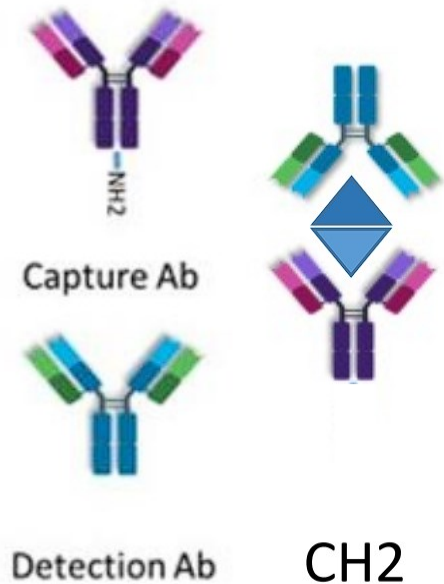
- Flow rate → 30 µl/min
- Contact time → 15 s

La rigenerazione è stata effettuata su entrambe le FC per garantire uniformità



# PROCEDURA OPERATIVA

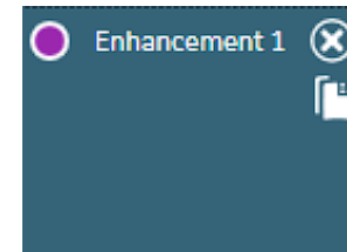
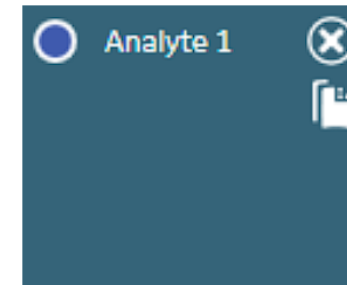
## 5. DEFINIZIONE DEL PROTOCOLLO E ANALISI - ENHANCING



La soluzione del ligando 2 (L2) è stata ottenuta diluendo la soluzione stock da 630  $\mu\text{g/ml}$  a 1  $\mu\text{g/ml}$ .

L'analisi è stata effettuata unicamente sul sample a concentrazione 37.3 ng/ml.

La definizione del protocollo è analoga a quella fatta per l'analisi SCK.

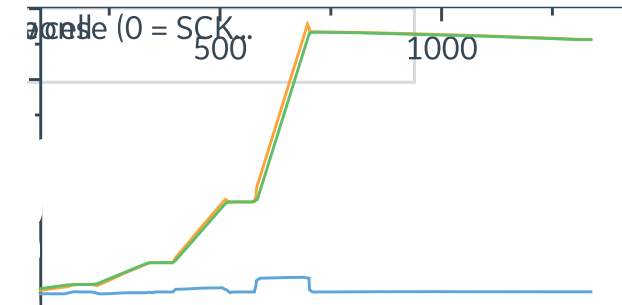
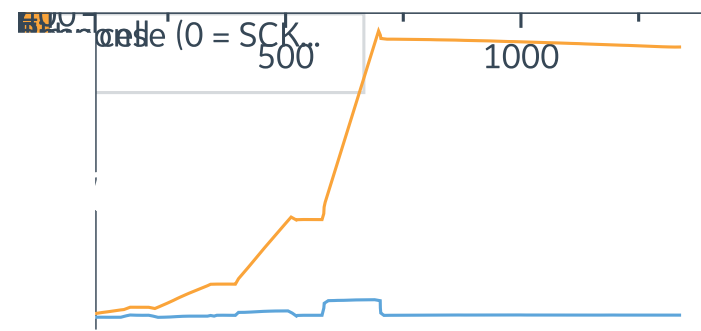
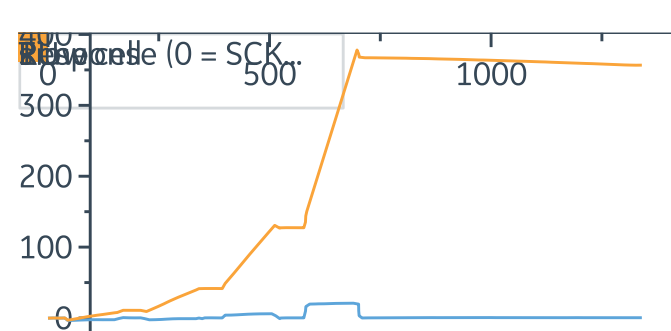


Contact time	<input type="checkbox"/>	120	s
Dissociation time	<input type="checkbox"/>	0	s
Flow rate	<input type="checkbox"/>	30	$\mu\text{l/min}$

Contact time	<input type="checkbox"/>	180	s
Flow rate	<input type="checkbox"/>	10	$\mu\text{l/min}$

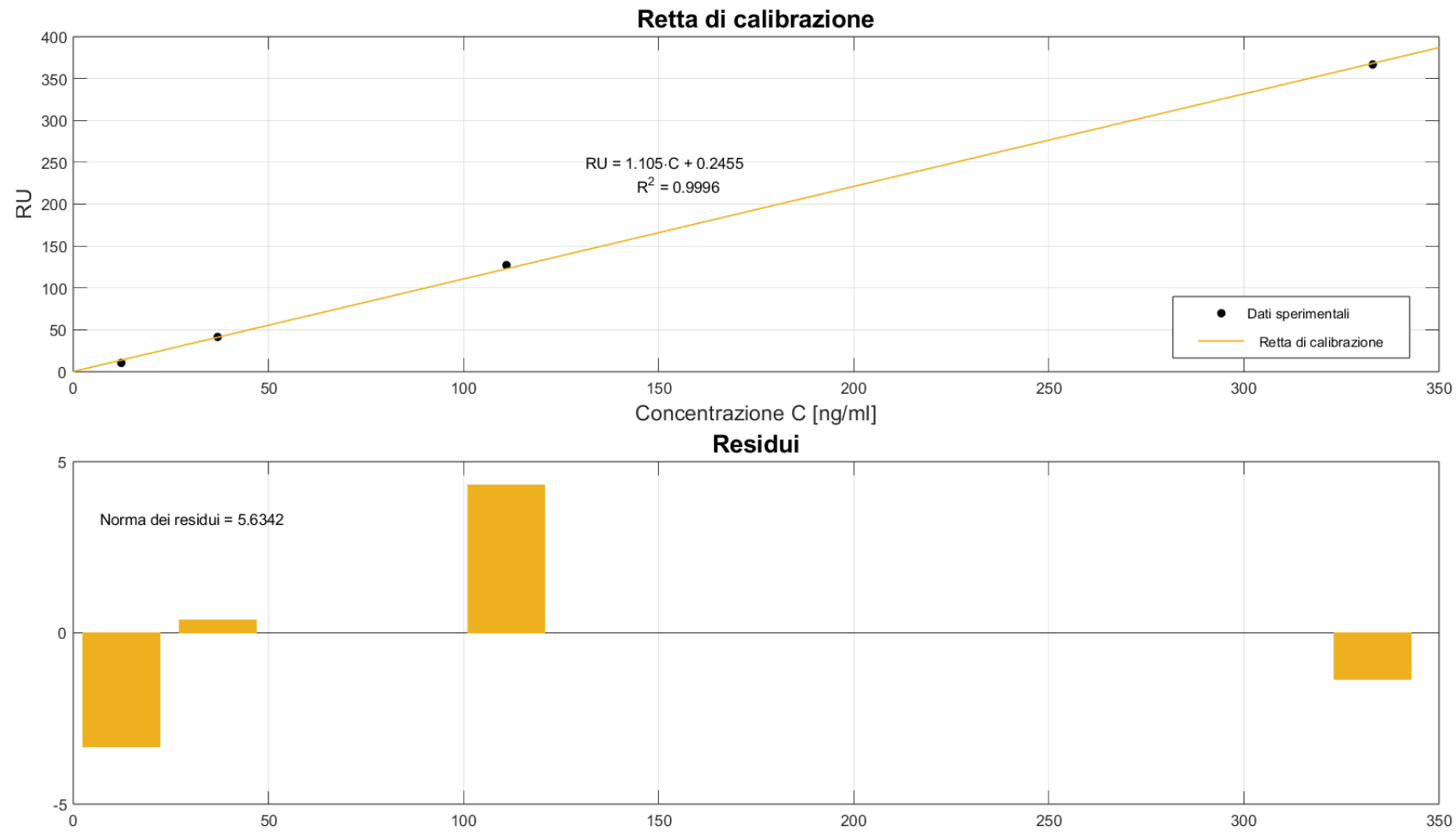


# ANALISI DEI RISULTATI

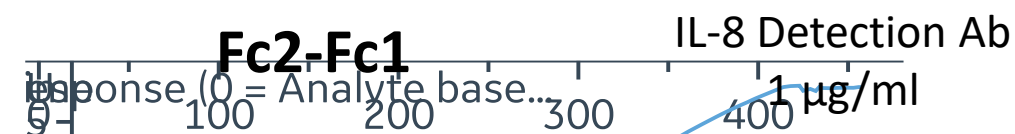
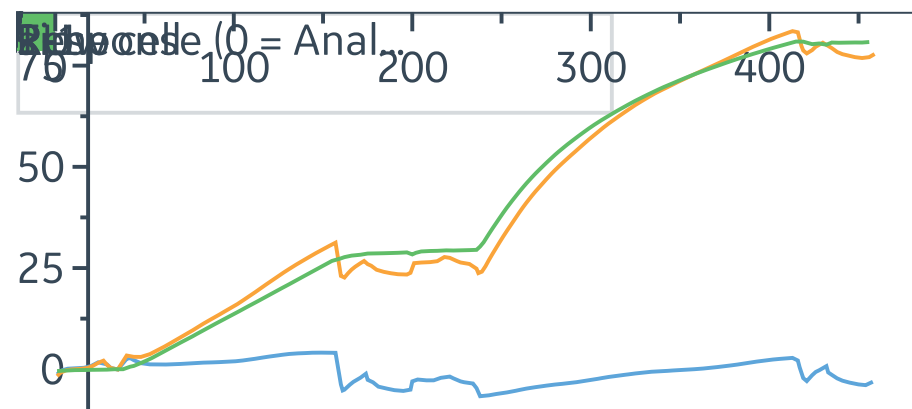


Channel	Immobilized ligand	Kinetics model	Single cycle kinetics 1 Solution	$k_a$ (1/Ms)	$k_d$ (1/s)	Rmax (RU)	$K_D$ (M)
2	IL-8 Ab Capture 30ug/mL	1:1 binding	IL-8 (antigen)	8,29E+05	7,11E-05	1599,5	8,58E-11

# ANALISI DEI RISULTATI



# ANALISI DEI RISULTATI



IL-8 37 ng/ml

	IL 8 (37 ng/ml)	Ab det (1 µg/ml)
RU	30	81,2