

Laboratorio di fotonica per la medicina

Prof. Marco Consales

Laboratorio 05

Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)



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 – mat.177470

Martina Rainone

m.rainone@studenti.unimol.it – mat.177471

Fabrizio Ravelli

f.ravelli@studenti.unimol.it – mat.177085

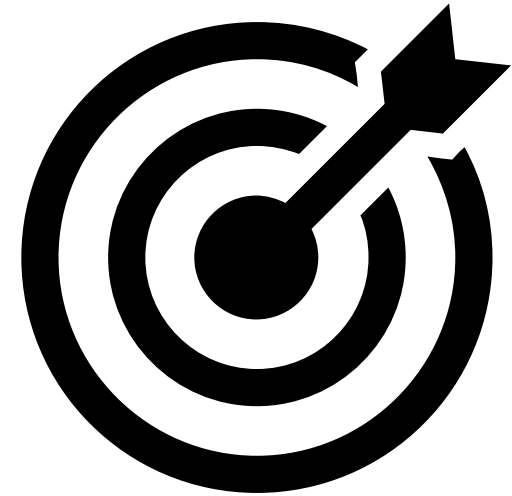


INDICE

1. Obiettivo
2. Introduzione teorica
3. Strumentazione utilizzata
4. Procedura operativa
5. Analisi dati

OBIETTIVO

Saggio ELISA indiretto per valutare e quantizzare la presenza di anticorpi all'interno di un campione biologico attraverso l'acquisizione di misure di fluorescenza.

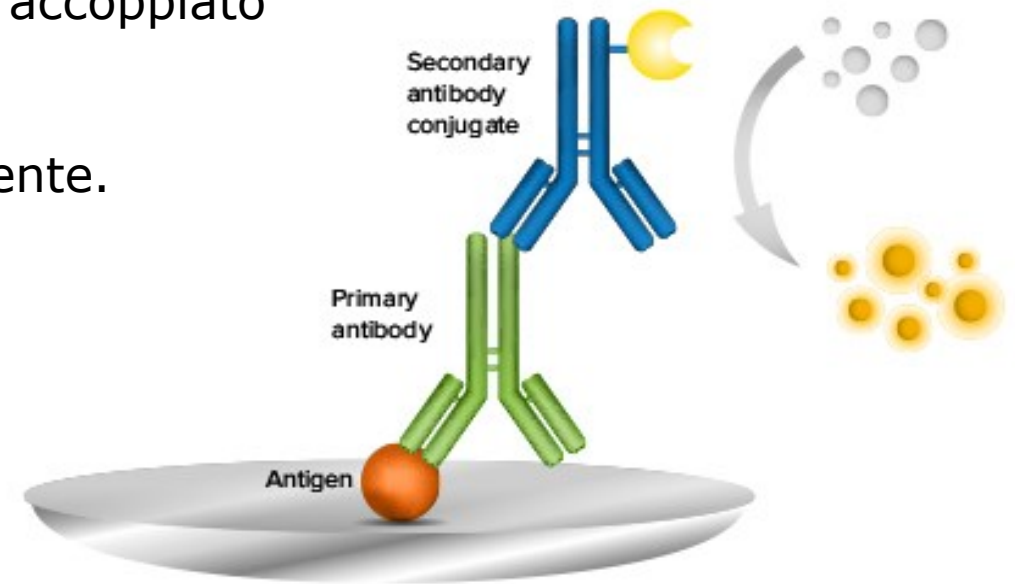


INTRODUZIONE TEORICA

Il saggio ELISA indiretto è impostato in modo tale che:

- l'antigene blocca l'anticorpo target sul pozzetto;
- l'anticorpo secondario lega l'enzima con il quale è accoppiato all'anticorpo target;
- il substrato serve all'enzima per renderlo fluorescente.

Il risultato finale è influenzato dalla quantità di enzima e di conseguenza l'anticorpo secondario è correlato al target.



STRUMENTAZIONE UTILIZZATA

- Pipettor
- Piastre
- Buffer PBS
- EnSight



STRUMENTAZIONE UTILIZZATA

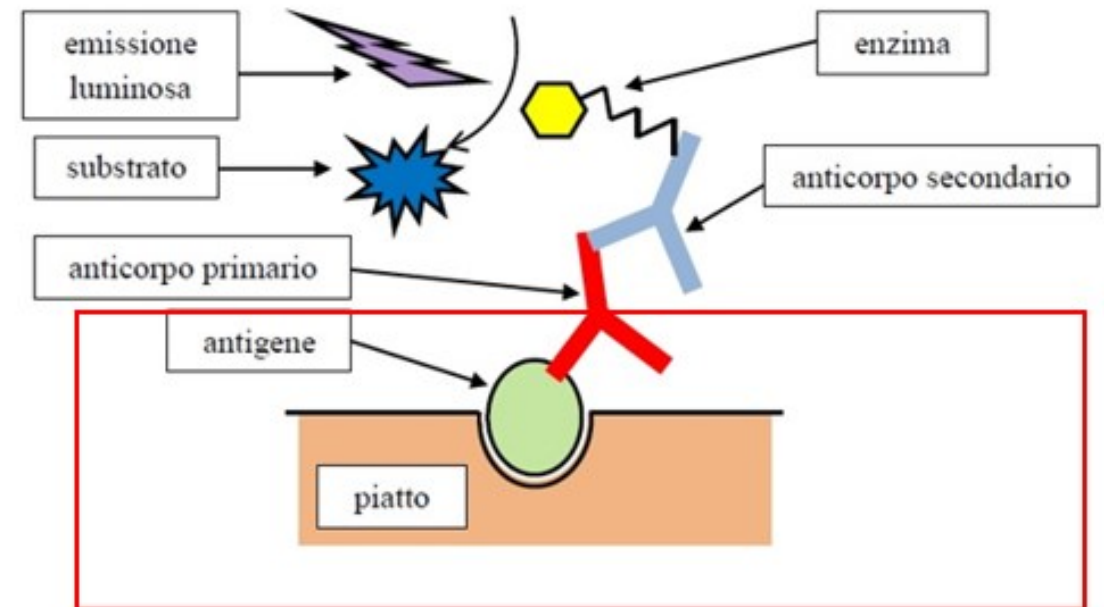
EnSight Multimode Plate Reader

Features	Details	Assays
Absorbance	High Speed Monochromators	ELISA, DNA, protein quantification
Fluorescence	Filter based QuadX Monochromator based Fusion Optics (filter + monochromator)	<ul style="list-style-type: none">• Fluorescence Intensity• Fluorescence Polarization• Time-Resolved Fluorescence• HTRF®, LanthaScreen®• 3D spectral scans
Luminescence	Dedicated PMT - single photon counting Multi-color monochromator (40 filters)	Glow , flash, multicolor assays, and spectral scans; BRET™, DLR™
AlphaScreen®	High performance laser excitation IR sensor based temperature correction	AlphaScreen®, AlphaLisa®, AlphaPlex®
Imaging	Brightfield imaging 4x objective	Cell imaging Confluence assessment Cell Counting



PROCEDURA OPERATIVA

1. Coating antigene riferimento
2. Blocking
3. Inserimento del campione biologico
4. Inserimento dell'anticorpo secondario
5. Aggiunta del substrato e reazione fluorogena.
6. Lettura della fluorescenza

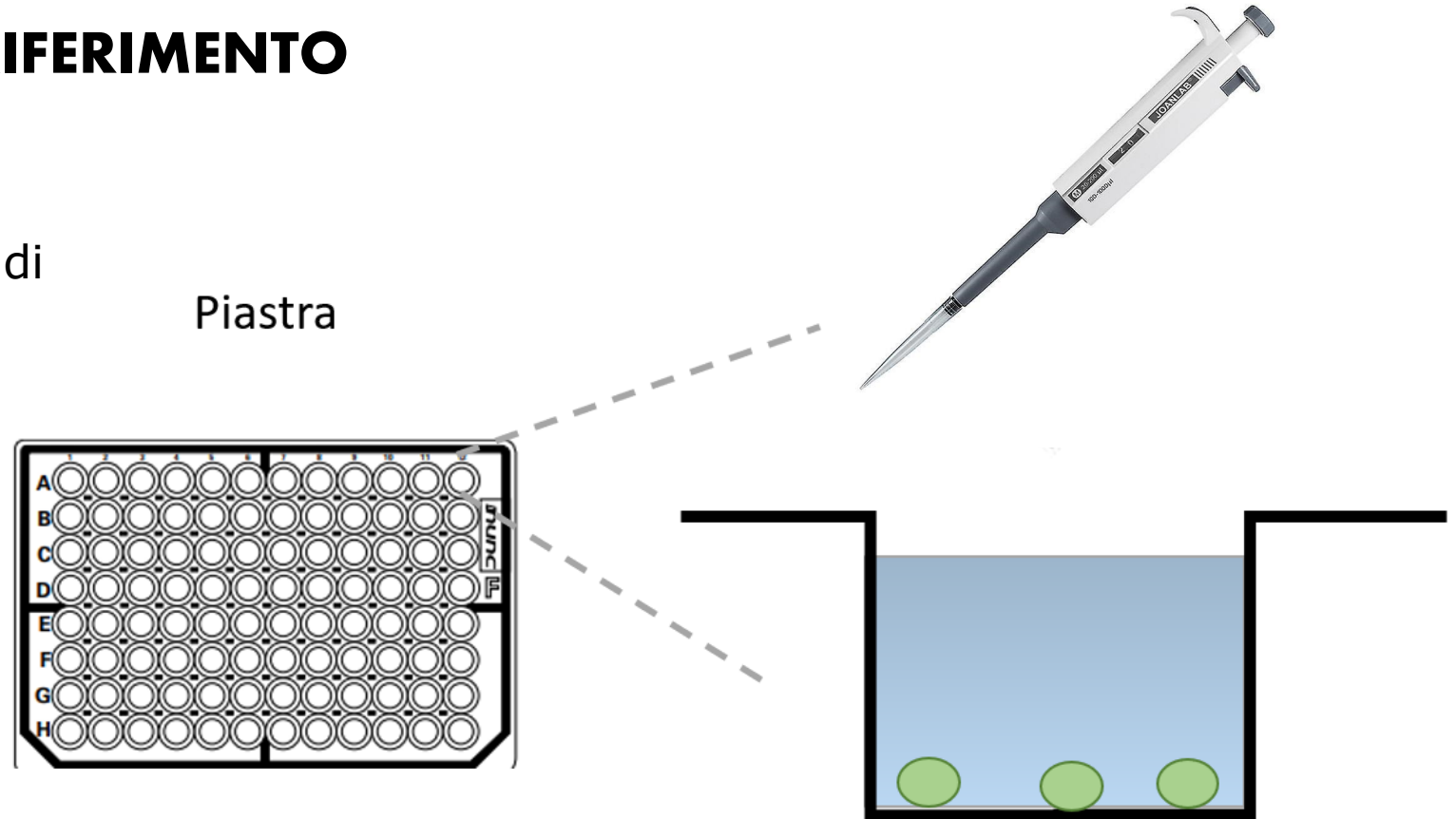
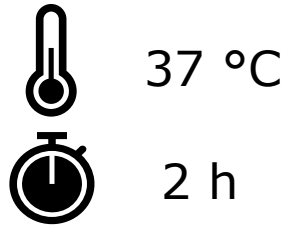


PROCEDURA OPERATIVA

1. COATING ANTIGENE RIFERIMENTO

Caricamento dei pozzetti
(A1-A12 e B1-B6) con 100 μ L di
antigene primario

Adsorbimento:



PROCEDURA OPERATIVA

2. BLOCKING

Aggiunta di un volume di 120 μL a pozzetto di soluzione contenente BSA (Bovine Serum Albumin) per saturare parte del pozzetto non ricoperto dall'antigene

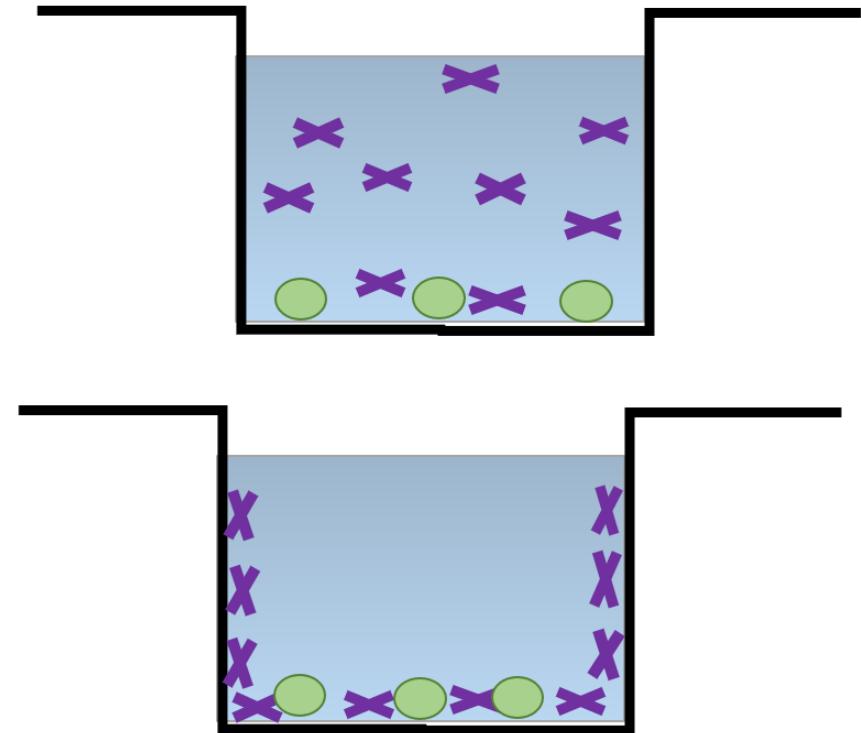
Incubazione:



37 °C



1 h



PROCEDURA OPERATIVA

3. CAMPIONE BIOLOGICO

Aggiunta di 100 μL di siero contenente la molecola target e altri componenti in ogni pozzetto.

Incubazione:

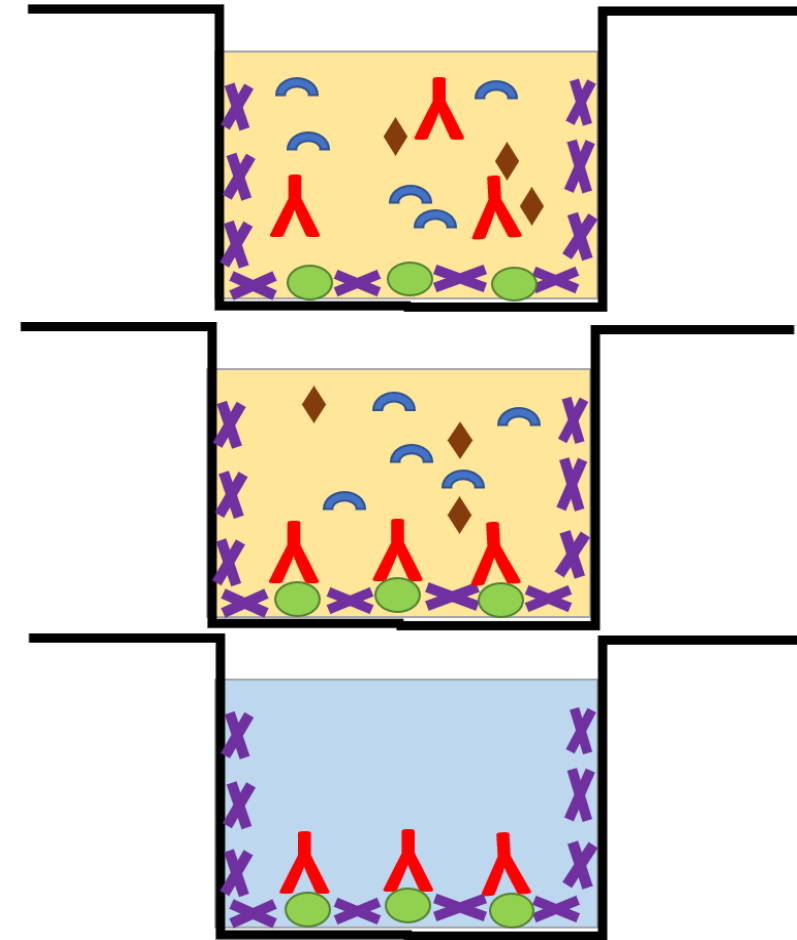


37 °C



1 h

Al termine dell'incubazione, si effettuano dei lavaggi per rimuovere le componenti che non hanno interagito



PROCEDURA OPERATIVA

4. ANTICORPO SECONDARIO CON ENZIMA AP (FOSFATASI ALCALINA)

Aggiunta di un anticorpo secondario marcato con l'enzima AP.

Incubazione:

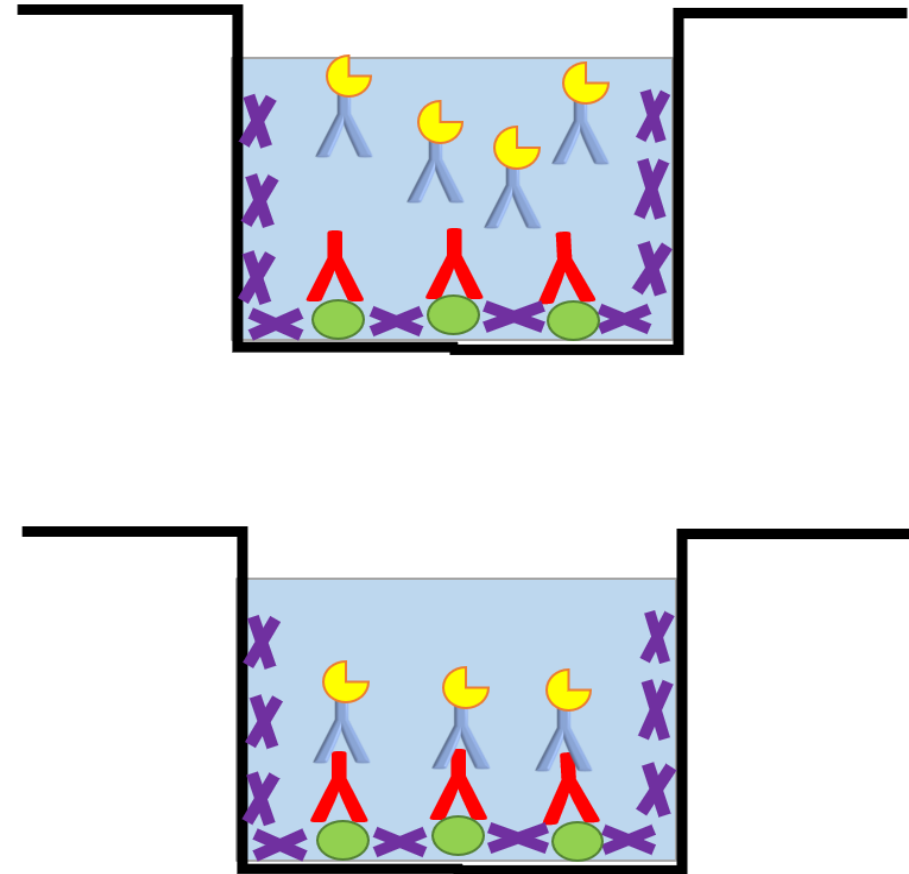


37 °C



1 h

Al termine dell'incubazione, si effettuano dei lavaggi con una soluzione salina.



PROCEDURA OPERATIVA

5. REAZIONE CON SUBSTRATO FLUOROGENICO

Aggiunta in ogni pozzetto di 100 μ l di substrato MUP.

Incubazione:

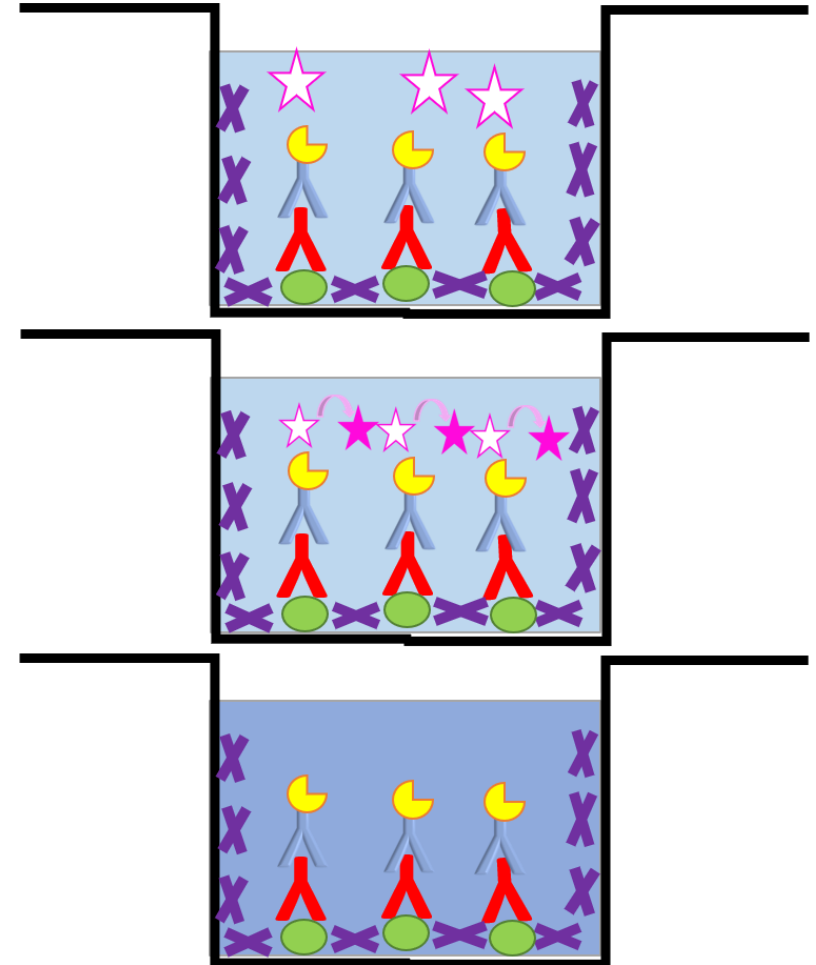


25 °C



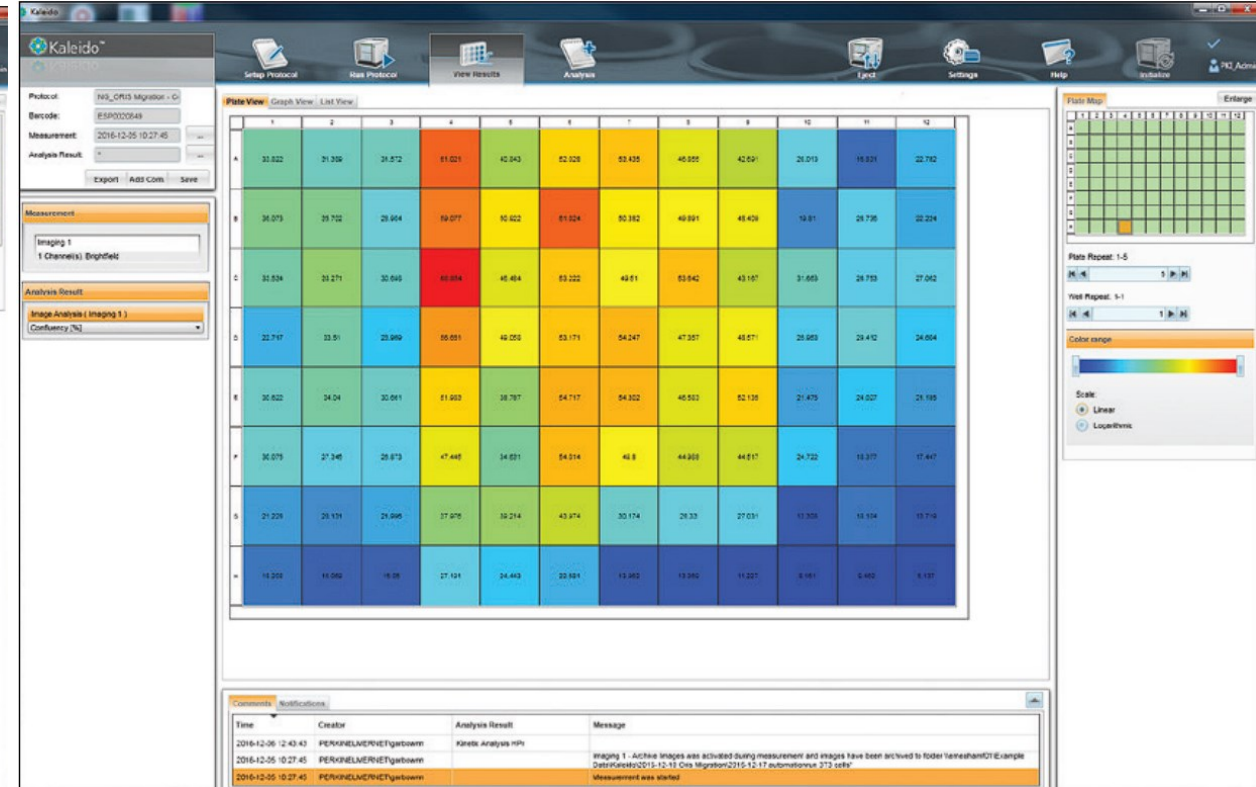
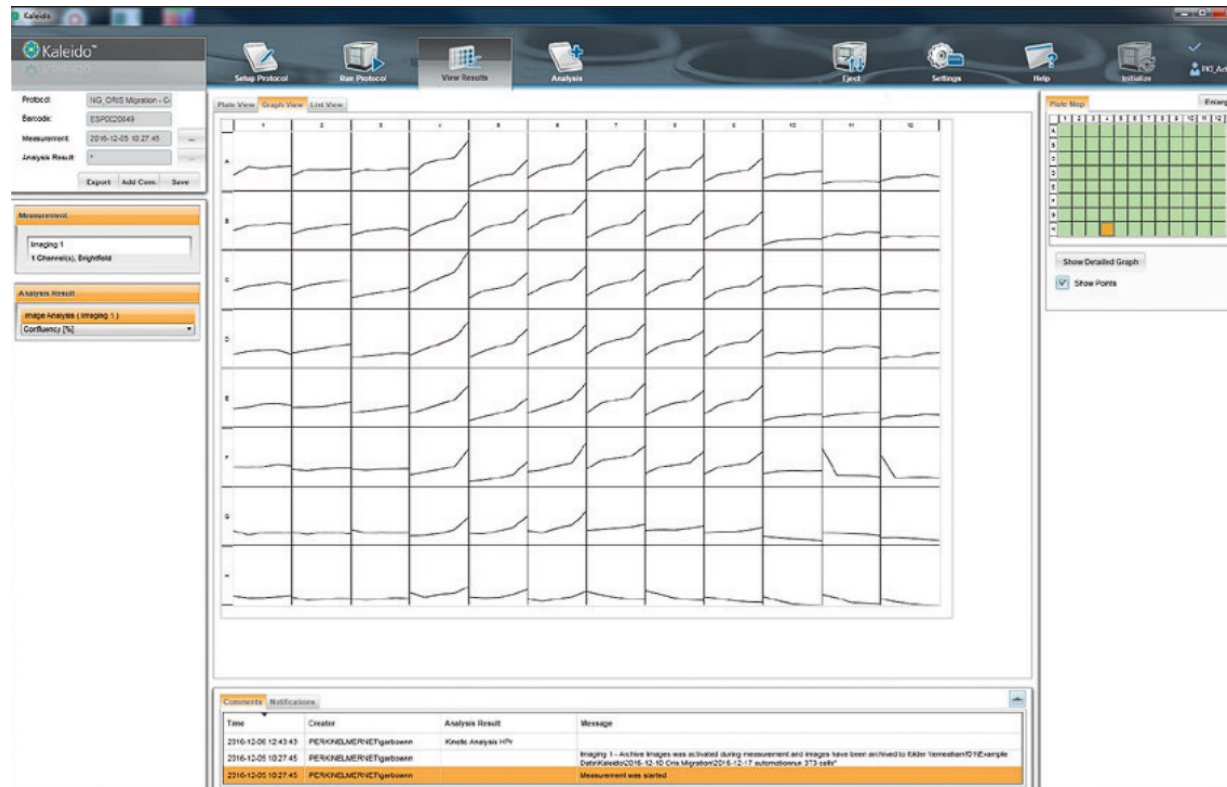
30 min

Al termine dell'incubazione, i campioni sono stati trasferiti in una piastra nera.

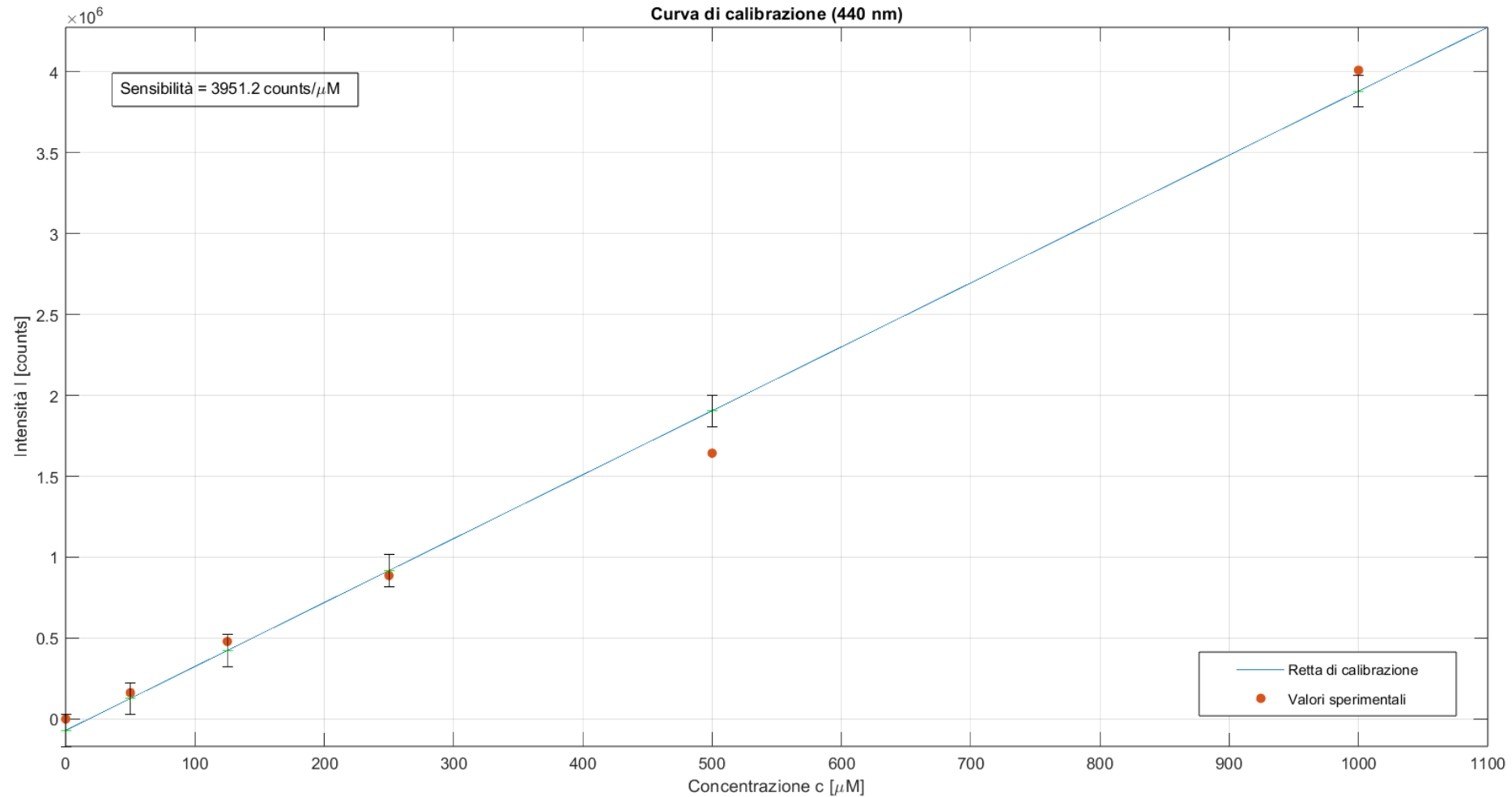


PROCEDURA OPERATIVA

6. LETTURA DELLA FLUORESCENZA



ANALISI DATI



ANALISI DEI DATI E CONCLUSIONI

La concentrazione incognita è stata ricavata tramite la funzione *polyval*.

```
c = polyval(p_inv, unknow);
```

```
>> c_1
```

```
c_1 = 343.61 [g/ml]
```

```
>> c_2
```

ERRORE

