

Tecniche immunochimiche

4.1 Introduzione

Il sistema immunitario degli animali è responsabile della risposta immunitaria contro le molecole riconosciute come estranee (*non-self*). L'immunologia è la scienza che studia tali reazioni e il sistema immunitario che le mette in atto.

Il sistema immunitario protegge gli animali dai microrganismi infettivi (virus, batteri, micoplasmi, funghi e protozoi); inoltre, aiuta l'organismo a eliminare parassiti e tossine, combatte tumori e cellule neoplastiche e può determinare il rigetto di cellule trasfuse o organi trapiantati da animali geneticamente non identici. Il suo ruolo fisiologico è quello di mantenere l'organismo animale esente da forme e sostanze biologiche rischiose per la vita (la parola "immunologia" deriva dal latino *immunitas* = libertà da). Una risposta immunitaria impropria (ossia indesiderata) può causare disturbi clinici come allergie, reazioni del trapianto contro l'ospite e malattie autoimmuni. La risposta immunitaria può essere classificata come innata o acquisita. L'immunità innata non richiede precedente esposizione alla sostanza estranea ed è mediata, in primo luogo, da cellule discendenti da monociti (per esempio macrofagi) e da leucociti polimorfonucleati. È relativamente aspecifica, sebbene normalmente distingue chiaramente tra *self* e *non-self*; costituisce una prima linea di difesa, potente e rapida, contro invasioni e infezioni indesiderate. Le procedure di laboratorio basate sull'immunità innata hanno un'utilità limitata perché si prestano ad applicazioni a carattere generale nelle metodologie biochimiche.

L'immunità acquisita, mediata principalmente da linfociti, richiede l'esposizione (*priming*) alla sostanza *non-self*; può essere ulteriormente suddivisa in risposta immunitaria mediata dalle cellule e umorale. L'immunità mediata dalle cellule può essere attribuita principalmente all'attività dei linfociti T, che interagiscono con le sostanze estranee (antigeni) in modo specifico e mediano una serie diversa di processi immunobiologici; per esempio, le cellule T citotossiche "uccidono" specificamente cellule o microrganismi indesiderati. Le metodologie basate sui meccanismi dell'immunità mediata dalle cellule possono essere utili per lo studio dell'immunologia cellulare e per alcuni aspetti dell'immunologia clinica, ma di solito la loro applicazione alla biochimica non è semplice né utile.

L'immunità umorale è mediata principalmente da proteine solubili, dette anticorpi, che circolano nel sangue e permeano la maggior parte degli organi corporei. Gli anticorpi possono anche essere presenti sulla superficie cellulare, dove fungono da recettori di antigeni e proteine di legame. Gli anticorpi vengono prodotti e secreti dai linfociti B, anche sotto l'influenza dell'attività di altri tipi di cellule (soprattutto linfociti T helper). Le cellule B al termine della

differenziazione, dette plasmacellule, sono le più potenti secretrici naturali di anticorpi. Lo studio degli anticorpi (e di altre molecole immunitarie importanti dal punto di vista immunologico, come i componenti del complemento) prende il nome di immunochimica. Tali anticorpi possono presentare una spiccata specificità e sensibilità per gli antigeni, anche se non sempre questo avviene; tali proprietà vengono sfruttate da molte procedure e metodologie biochimiche. Questi metodi, noti come tecniche immunochimiche, sono ovviamente molto importanti per studiare lo stesso sistema immunologico, ma rappresentano anche un prezioso strumento per indagini in quasi tutte le discipline biologiche (in particolare la biochimica). La tabella 4.1 riporta la definizione di alcuni termini immunochimici di comune impiego.

4.1.1 Anticorpi

Gli anticorpi sono un gruppo di proteine globulari, dette immunoglobuline. Tali proteine sono costituite da monomeri, o multimeri, di una struttura a simmetria bilaterale composta da quattro catene, due leggere e due pesanti (Fig. 4.1). Nei vertebrati superiori si trovano cinque tipi di catene pesanti (catene γ , μ , α , δ e ϵ), le quali definiscono le classi di immunoglobuline (le cosiddette IgG, IgM, IgA, IgD e IgE; Tab. 4.2). Tutte le classi possono legare l'antigene, anche se le funzioni immunobiologiche mediate dalle molecole immunoglobuliniche sono diverse. Nei mammiferi, le classi IgG e IgA sono suddivise in sottoclassi, cui corrispondono diverse sequenze di aminoacidi delle catene pesanti (ma con maggiori analogie rispetto alle sequenze delle varie classi); il numero di sottoclassi individuate varia a seconda delle specie. Le catene leggere non mediano una significativa attività biologica, ma contribuiscono al legame dell'antigene e alla stabilità della struttura molecolare superiore delle immunoglobuline. Le IgG, IgE e IgD sono perlopiù monomeri della struttura di base a quattro catene; le IgA, invece, almeno nei mammiferi, sono spesso dimeriche e le IgM pentameriche. Le IgA e le IgM multimeriche contengono una piccola proteina aggiuntiva chiamata catena J, necessaria per la polimerizzazione; inoltre le IgA secrete contengono anche una proteina denominata componente secretoria.

Le molecole immunoglobuliniche possono essere tagliate da alcuni enzimi proteolitici per ottenere frammenti utilizzabili in procedure biochimiche, che rivelano anche importanti aspetti della struttura e della funzione degli anticorpi. La proteasi vegetale papaina taglia le IgG umane in tre frammenti, aventi all'incirca la stessa dimensione (approssimativamente 50000 Mr). Due frammenti sono identici tra loro, mentre l'altro è differente; si possono separare i primi due frammenti dal terzo mediante cromatografia a scambio ionico. I due frammenti identici hanno la capacità di legare l'antigene in modo monovalente, ma non possono precipitare l'antigene in soluzione o nel gel; nel gergo immunologico, sono noti come frammenti che legano l'antigene (*fragment antigen binding*) o Fab. Il terzo frammento non lega l'antigene, ma i primi studi biochimici hanno dimostrato che cristallizza più facilmente dei frammenti Fab (fenomeno che denota una maggiore omogeneità di struttura); per questo in immunochimica prende il nome di frammento cristallizzabile o Fc. A bassi valori di pH, la proteina di mammifero pepsina taglia le IgG umane, producendo un frammento grande, uno più piccolo e alcuni piccoli polipeptidi. Il frammento di maggiori dimensioni (100000 Mr) può legare l'antigene in maniera bivalente (purché l'antigene sia relativamente piccolo), può instaurare un legame crociato con l'antigene e può formare con esso complessi che precipita-

Tabella 4.1 Glossario di termini usati in immunochimica

Antigene

Sostanza riconosciuta e legata da un anticorpo.

Antisiero

Siero di un animale contenente anticorpi che reagiscono con particolari antigeni. Talvolta prende anche il nome di siero immune.

Autoanticorpi

Anticorpi che reagiscono con antigene/i self. Di norma non si trovano nel sangue né nei fluidi corporei; per questo la loro presenza è spesso indicativa di condizioni patologiche, dette malattie autoimmuni, per esempio l'artrite reumatoide, il lupus eritematoso sistemico, la cirrosi biliare primitiva, il diabete mellito insulino-dipendente.

Bivalente

Molecola in grado di legare due molecole di ligando; ossia, un anticorpo bivalente è in grado di legare due molecole di antigene.

Cellule di mieloma

Cellule tumorali discendenti da linee di plasmacellule; talora sono dette anche cellule plasmocitoma.

Clone

Una popolazione di cellule in crescita, derivanti da una singola cellula progenitrice. Il clone deriva da divisioni cellulari continue, asessuali, e tutte le cellule sono geneticamente identiche, a meno che non avvengano mutazioni durante la crescita.

Determinante antigenico

Vedi Epitopo.

Epitopo

Sito dell'antigene riconosciuto e legato dall'anticorpo. In genere è costituito da circa sei aminoacidi o da una pari dimensione di residui di carboidrati. Gli epitopi degli antigeni proteici possono non essere continui nella struttura. Sono talora detti determinanti antigenici.

Immunogeno

Sostanza o miscela di sostanze utilizzata per indurre una risposta immunitaria.

Linfociti

Cellule associate responsabili dello sviluppo e del mantenimento dell'immunità specifica; sono una suddivisione dei leucociti, nonché i principali costituenti dei tessuti linfoidei.

Monovalente

Molecola capace di legare solo una molecola di ligando.

Multivalente

Molecola capace di legare più di una molecola di ligando.

Paraproteina

Immunoglobulina monoclonale secreta dalle cellule di mieloma (vedi sopra). Queste molecole assomigliano molto alle immunoglobuline prodotte da "normali" plasmacellule/linfociti. Sono dette anche proteine del mieloma.

Peptide

Molecola costituita da alcuni residui aminoacidici uniti da legami peptidici. I peptidi più grandi prendono anche il nome di polipeptidi e/o proteine.

Piastra di microtitolazione

Piastra di plastica contenente molti pozzetti (di solito 96) in cui si possono eseguire molti dosaggi immunologici, quindi più conveniente dei singoli tubi. I pozzetti possono essere a fondo piatto per dosaggi ELISA, a forma di U per i RIA, o a forma di V per i test di emoagglutinazione; inoltre, possono essere rigidi o flessibili.

Plasma

Liquido ottenuto dal sangue non coagulato dopo la rimozione delle componenti cellulari. È diverso dal siero (vedi oltre) in quanto contiene tutte le componenti del sistema di coagulazione. La sua preparazione richiede l'uso di un anticoagulante, per esempio eparina o citrato.

Siero

Liquido che si ottiene dal sangue coagulato dopo la rimozione dei coaguli e delle componenti cellulari.

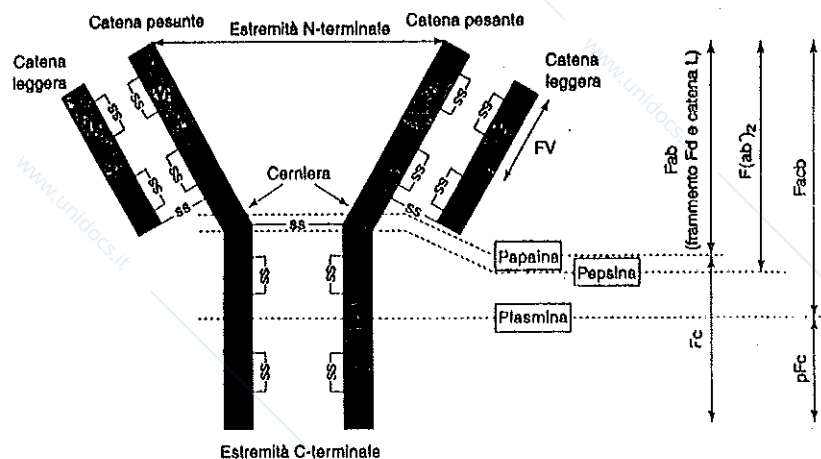


Figura 4.1 Struttura generale delle IgG, in cui sono riportati i siti di taglio degli enzimi e i frammenti risultanti. Si noti che il numero di legami -S-S- nella regione cerniera varia nelle diverse sottoclassi e specie.

no. Dal punto di vista strutturale, è molto simile al dimero del frammento Fab prodotto dalla digestione con papaina, per cui è detto $F(ab')_2$. Analogamente, il frammento più piccolo è una versione trunca del frammento Fc, ed è quindi chiamato Fc' . Tanto la papaina quanto la pepsina tagliano la molecola di IgG nella regione cerniera, ma la papaina taglia al lato N-terminale della cerniera mentre la pepsina a quello C-terminale (Fig. 4.1). Questo spiega la produzione di frammenti Fab monovalenti da parte della papaina e di frammenti dimerici leganti l'antigene $F(ab')_2$ da parte della pepsina: i due componenti Fab' che comprendono $F(ab')_2$ sono legati da ponti di disolfuro che costituiscono la regione cerniera. Per produrre frammenti di immunoglobuline si possono utilizzare anche altri enzimi, ma papaina e pepsina sono quelli adoperati più spesso. Si possono produrre frammenti simili anche da IgG non umane, anche se la suscettibilità alla digestione varia moltissimo nelle diverse specie. Inoltre, è possibile produrre frammenti derivati da enzimi di altre classi di immunoglobuline (vedi la bibliografia al termine di questo capitolo e 4.13).

Le IgG sono le immunoglobuline più utilizzate come reagenti in molte procedure immunochimiche.

4.1.2 Struttura e geni delle immunoglobuline e generazione della diversità anticorpale

Le catene di immunoglobuline delle diverse classi, o tipi, contengono regioni distinte che possono avere una sequenza molto conservata, oppure più variabile. Le catene sono formate da domini che presentano una struttura tridimensionale simile (Fig. 4.1). Le catene pesanti sono costituite da tre (catene γ , α o δ) o quattro (catene μ e ϵ) domini costanti e da uno variabile, mentre le catene leggere hanno un dominio costante e uno variabile (Fig. 4.1 e Tab. 4.2). Le regioni costanti degli anticorpi, importanti per la struttura tridimensionale delle immuno-

Tabella 4.2 Composizione della catena polipeptidica delle immunoglobuline umane

Classe/ sottoclasse	Concentrazione normale nel siero (mg ml ⁻¹)	M_r ($\times 10^3$)	Domini delle catene H (pesanti)	Composizioni delle catene	Totale	Peptide	M_r ($\times 10^3$)	% dei carboidrati nelle catene (n. di gruppi)	Aminoacidi della cerniera	Legami disolfuro all'interno della catena pesante
IgG1	5-10	146	4	2 γ 1	51	49	49	3-4(1)	15	2
IgG2	1.8-3.5	146	4	2L($\kappa\lambda$:2:1)	23	23	23	<0.5		
IgG3	0.6-1.2	170	4	2 γ 2	51	49	49	3-4(1)	12	4
IgG4	0.3-0.6	146	4	2L($\kappa\lambda$:2:1)	23	23	23	<0.5		
IgM	0.5-2.0	900	5	2 γ 3	60	57	57	3-4(1)	62	11
IgA1**	0.8-3.4	160	4	2L($\kappa\lambda$:1:1)	23	23	23	<0.5		
IgA2**	0.2-0.6	160	4	2 γ 4	51	49	49	3-4(1)	12	2
IgA1 o IgA2 secretorie****	-	390	4	2L($\kappa\lambda$:1:1)	23	23	23	<0.5	0	1*
IgD	0.003-0.3	165	4	1 μ 1	15	14	14	7.5	20	2***
IgE	0.0001-0.0007	185	5	2 α 1	56	50	50	10-15(5)	7	2***
				2L($\kappa\lambda$:1:1)	23	23	23	<0.5		
				2L($\kappa\lambda$:1:1)	23	23	23	<0.5		
				4 α	53-56	48-50	48-50	10-15		
				4L	23	23	23	<0.5		
				1 μ	15	14	14	7.5		
				ISC****	75	63	63	15-16		
				2 δ	60	51	51	14-71(3)	64	1
				2L($\kappa\lambda$:1:10)	23	23	23	<0.5		
				2 ϵ	70	59	59	13-16(6)	0	2
				2L	23	23	23	<0.5		

* C'è un legame disolfuro aggiuntivo nella catena pesante, che lega le cisteine tra i domini C μ 2 e C μ 3; ci sono ulteriori legami disolfuro tra le unità monomeriche.
 ** I dati si riferiscono alla forma monomerica, predominante nel siero umano. Esistono anche forme polimeriche (fino a pentameri) che contengono una molecola di catena J per polimero, oltre alle catene α e L.
 *** C'è un legame disolfuro aggiuntivo dalla cisteina nella regione terminale verso entrambe le cisteine corrispondenti nell'altra catena pesante o a una cisteina nella catena J o una componente secretoria nelle IgA secretorie.
 **** I dati riguardano il dimero; anche la forma tetramerică è comune nell'uomo.
 ***** SC, componente secretoria, derivata da un recettore poli(Ig) legato alla membrana, usato per il trasporto delle IgA attraverso le cellule epiteliali durante la loro secrezione.
 Fonte: M.A. Kerr, R. Thorpe, *Immunotechnology* Lathfax (1994), Bios Scientific, Oxford.

globuline, sono responsabili della maggior parte delle funzioni immunobiologiche, come la fissazione del complemento, e interagiscono con i recettori per le immunoglobuline, presenti in molti tipi di cellule; le regioni variabili, invece, sono responsabili del legame dell'antigene. All'interno delle regioni variabili, ci sono tre sequenze relativamente brevi, che dimostrano una variabilità di sequenza particolarmente alta, deputate alla diretta interazione con l'antigene. Esse prendono il nome di regioni ipervariabili o regioni che determinano la complementarità (CDR, Complementarity-Determining Regions): ve ne sono tre per ogni catena, sia pesante sia leggera. Le porzioni più costanti delle regioni variabili sono importanti per il mantenimento dell'appropriata struttura degli anticorpi, soprattutto per un efficiente legame dell'antigene.

Le immunoglobuline sono un'evidente eccezione alla regola secondo cui un gene codifica un unico polipeptide; inoltre, molti geni della linea germinale sono coinvolti nella codificazione di ogni catena pesante e leggera. Le regioni costanti delle catene pesanti vengono codificate da singoli geni, uno per ogni classe o sottoclasse, noti come geni C_H , che nella linea germinale sono distinti dai geni per la regione variabile delle catene pesanti (geni V_H). Si formano gruppi costituiti da un numero relativamente alto di geni per le regioni variabili (nell'uomo ci sono circa 100 geni V_H per le catene pesanti) e compresi tra questi e i geni per le regioni costanti ci sono altri brevi geni che codificano per la regione d'unione (geni J ; nell'uomo ce ne sono sei per le catene pesanti) e sequenze associate alla diversità (geni D ; nell'uomo, quattro per le catene pesanti). Le catene leggere presentano un'organizzazione genica simile (segmenti genici V_L , J_L e C_L), tranne la sequenza D che non esiste per le catene leggere; nell'uomo vi sono circa 70 geni V_L e 4 J per le catene leggere κ . In una fase precoce della maturazione delle cellule B si verifica una traslocazione genica, tale da dar luogo a un insieme lineare di ogni gene V con un gene J , con un gene D (soltanto nelle catene pesanti) e con un gene C ; questo codifica per una catena completa dell'immunoglobulina. Il processo rende l'animale in grado di produrre una serie di molecole di immunoglobuline che differiscono soprattutto nella sequenza della regione ipervariabile, cioè nella parte della molecola che lega l'antigene. Tale diversità può aumentare utilizzando un numero variabile di regioni D (nelle catene pesanti), e mediante mutazioni somatiche durante la maturazione della risposta immunitaria. Da tutte queste combinazioni, almeno nei vertebrati superiori, dipende la capacità di produrre un numero molto elevato di anticorpi diversi (in via teorica, si calcola che gli essere umani possano produrre 10^8 anticorpi diversi), oltre alla diversa specificità e affinità delle immunoglobuline per gli antigeni. Inoltre, questo processo consente la produzione di anticorpi che in teoria riconoscono qualsiasi antigene estraneo di dimensioni appropriate. Tali proprietà degli anticorpi vengono utilizzate in metodi d'analisi immunochimici.

4.2 Produzione di anticorpi

Tutte le tecniche immunochimiche si basano di fatto sull'uso di anticorpi, quindi la loro efficacia dipende dalla qualità dell'anticorpo o degli anticorpi utilizzati. La natura dell'anticorpo influenza sia la specificità dei metodi (ossia la capacità di discriminare tra la sostanza desiderata e altre sostanze presenti), sia la sensibilità (la capacità di rivelare e misurare basse concentrazioni delle sostanze da analizzare), per la quale è importante l'avidità dell'anticorpo per l'antigene (4.9). Alcuni anticorpi utilizzati nei metodi immunochimici si trovano "natu-

ralmente", per esempio alcuni autoanticorpi, ma di norma è necessario stimolarne la produzione immunizzando alcuni animali (4.2.6 per un'importante eccezione). A tal fine, sono state messe a punto diverse procedure.

4.2.1 La risposta immunitaria; anticorpi policlonali e monoclonali

Tutti i vertebrati possono produrre anticorpi contro antigeni estranei; tuttavia, nei vertebrati inferiori le risposte sono molto limitate (sebbene anche gli animali più primitivi, come misinoidi e lamprede, possano instaurare risposte immunitarie contro alcune proteine *non-self*) e solitamente gli anticorpi prodotti da tali specie non sono utilizzabili nei metodi immunochimici. Nei mammiferi avvengono risposte immunitarie umorali più utili, ai fini dell'isolamento di anticorpi per le tecniche immunochimiche. In casi particolari, tuttavia, si impiegano anche gli anticorpi da uccelli. La maggior parte delle tecniche immunochimiche sfrutta gli anticorpi IgG, ma in alcune procedure si possono utilizzare anche IgM e IgA. Le IgE sono limitate a studi relativi alle allergie e allo shock anafilattico, mentre, di solito, le IgD non sono usate poiché non sono state identificate funzioni specifiche delle IgD secrete.

È ora chiaro che ogni linfocita B maturo secerne un anticorpo con un'unica sequenza; la risposta umorale all'antigene comporta l'attivazione di una popolazione eterogenea di cellule B che producono immunoglobuline diverse. La maturazione della risposta consiste nell'espansione clonale di queste cellule inizialmente esposte, a produrre popolazioni di plasmacellule che secerne una serie di immunoglobuline leganti l'antigene, spesso di diverse classi e sottoclassi. All'interno della frazione di anticorpi che lega l'antigene sono presenti immunoglobuline che mostrano specificità e avidità variabili per l'antigene; di solito sono presenti numerosi anticorpi diversi, che riconoscono molti differenti epitopi dell'antigene. Questa risposta è definita policlonale, in quanto gli anticorpi derivano da più di un clone di linfociti B, e inoltre si osserva eterogeneità di sequenze aminoacidiche nelle immunoglobuline presenti che legano l'antigene. Nelle tecniche immunochimiche si utilizzano spesso preparazioni di tali anticorpi policlonali, sia non purificati dal siero immune sia purificati (4.3). Recentemente, tuttavia, sono stati sviluppati metodi che consentono di ricavare anticorpi monoclonali, derivanti da un singolo clone di cellule B, dotati della stessa sequenza aminoacidica. Le preparazioni di anticorpi monoclonali presentano caratteristiche omogenee (comprese specificità e avidità per l'antigene, per cui essi riconoscono un singolo epitopo) e possono rivelarsi vantaggiosi per gli scopi dell'immunochimica, se selezionati e caratterizzati accuratamente. La produzione di anticorpi monoclonali è discussa nel paragrafo 4.2.3.

4.2.2 Produzione di anticorpi policlonali (antisieri)

È possibile produrre anticorpi che legano proteine, peptidi, carboidrati e acidi nucleici, anche se questi ultimi mostrano poca o nessuna specificità per la sequenza, quindi sono di scarsa utilità per le tecniche immunochimiche. Per lavori analitici si può fare ricorso ad anticorpi contro i carboidrati, che tuttavia possono avere specificità limitata, tranne in alcuni casi particolari. In generale, la maggior parte dei metodi immunochimici è stata sviluppata con anticorpi che riconoscono proteine e polipeptidi.

La maggior parte dei vertebrati superiori produce una risposta immunitaria umorale contro una proteina "estranea". L'ampiezza di tale risposta dipende da diverse variabili: di particolare importanza sono le dimensioni della proteina, o del polipeptide, e la distanza filogenetica tra l'origine dell'antigene e l'animale usato per produrre l'anticorpo; in genere, maggiore è la differenza filogenetica, migliore è la risposta. Comunque, la scelta delle specie per la produzione dell'anticorpo dipende anche dalla quantità di antigene disponibile e dalle quantità e qualità di antisiero richieste. In alcuni casi, si possono avere anticorpi con particolari proprietà/specificità scegliendo specie strettamente correlate o addirittura ceppi diversi della stessa specie per la derivazione dell'antigene e la produzione di anticorpi. Il fattore più importante da considerare, per l'immunogenicità, è la differenza della sequenza aminoacidica (quindi della struttura) dell'antigene usato come immunogeno e di quello equivalente (se presente) nell'animale prescelto per la produzione di anticorpi; in genere, maggiore è la differenza, più immunogenico sarà l'antigene. In alcuni casi, regioni particolari dell'antigene producono risposte immuni molto potenti: tali epitopi sono detti immunodominanti.

I peptidi con M_r inferiore a circa 2000, di norma sono poco o per nulla immunogenici. L'immunogenicità tende a crescere man mano che aumentano le dimensioni: proteine con M_r superiore a 10 000 sono di solito immunogeniche, se riconosciute come estranee dalle reazioni immunitarie dell'animale.

Si possono produrre anticorpi che legano piccoli polipeptidi (e altre piccole molecole non immunogeniche, come steroidi e farmaci) unendo, o coniugando, queste sostanze a proteine più grandi (dette proteine carrier, o trasportatrici). Gli antisieri prodotti conterranno anticorpi che riconoscono la proteina carrier, ma anche altri che si legano alla piccola molecola coniugata. Alcune proteine sono carrier particolarmente efficaci (come emocianina e tireoglobulina di patella), mentre altri producono una risposta umorale limitata contro il carrier, come il derivato proteico purificato PPD dal bacillo di Calmette-Guérin (BCG). Le sostanze che non sono immunogeniche in sé, ma lo diventano solo se coniugate, prendono il nome di apteni.

Per la produzione di anticorpi potenti, efficaci nelle tecniche immunochimiche, è di solito necessario usare un adiuvante come parte dell'immunogeno; queste sostanze potenziano la risposta immunitaria formando un deposito di antigene a lento rilascio, stimolando le cellule T helper o favorendo la presentazione dell'antigene. Alcuni adiuvanti suppliscono a più d'uno di questi effetti (Tab. 4.3 per un elenco di alcuni adiuvanti di uso comune in immunochimica). Di solito, una singola immunizzazione con l'antigene dà luogo alla produzione di anticorpi; tuttavia questi antisieri non sono in genere ottimali, in quanto contengono anticorpi a bassa avidità e un'alta proporzione di IgM, il cui uso in immunochimica può essere limitato. Nella pratica comune si ripetono varie immunizzazioni successive (richiami), intervallate in modo che la risposta immunitaria sia talmente elevata da produrre un animale iperimmune, ossia con un'alta concentrazione ematica di anticorpi ad alta avidità, specifici per l'antigene. Questi "sieri iperimmuni" (in realtà antisieri di animali iperimmuni) sono di solito i reagenti policlonali d'elezione per le tecniche immunochimiche. In dettaglio la precisa quantità di antigene usata e l'intervallo tra i richiami sono fattori molto variabili, in base all'antigene e alla specie utilizzata; per alcuni principi generali si rimanda alla tabella 4.4. In genere, per immunizzare animali più grandi si rende necessaria una quantità maggiore di antigene; tuttavia, poiché essi hanno più sangue (quindi anche più siero/plasma), occorre disporre di maggiori quantità di immunogeno per la produzione di anticorpi, ma il loro organismo produrrà più

Tabella 4.3 Alcuni adiuvanti di impiego comune

Adiuvante	Composizione e utilizzo
Adiuvante di Freund completo (FCA, Freund's Complete Adjuvant)	Olio minerale contenente micobatteri inattivati al calore (<i>Mycobacterium tuberculosis</i> o <i>M. butyricum</i>) Utilizzato come emulsione con antigeni in soluzione acquosa
Adiuvante di Freund incompleto (FIA, Freund's Incomplete Adjuvant)	Olio minerale Utilizzato come emulsione con antigeni in soluzione acquosa
Allume	Sali complessi di alluminio. Esistono diverse versioni di adiuvante: alcune sono vendute pronte all'uso (per esempio Alhydrogel); altre si possono preparare in laboratorio, mescolando vari sali, per esempio NaHCO ₃ e solfato di potassio e alluminio. L'antigene acquoso è adsorbito al gel
Bentonite	Bentonite di sodio del Wyoming (montmorillonite) in gel. L'antigene acquoso si adsorbe alla superficie
Quil A	Saponina derivata dalla <i>Quillaja saponaria</i> Molina (albero del Sud America). Miscelato per formare un complesso con l'antigene acquoso
Muramili dipeptide (MDP)	N-acetilmuramili-L-alanil-D-isoglutamina. Mescolato con l'antigene acquoso. Si utilizzano anche vari derivati del MPD come adiuvanti
Lipide A monofosforilico (MPL)	Utilizzato in varie formulazioni, spesso come emulsione con oli. L'antigene è incluso nell'emulsione
<i>Bacillus pertussis</i>	Organismo ucciso mescolato all'antigene acquoso

Probabilmente l'FCA è l'adiuvante più potente, ma può essere inadeguato per alcuni scopi. (Da: M.A. Kerr, R. Thorpe, *Immunochimistry Labfax*, Bios Scientific, Oxford 1994.)

antisiero (i topi ne producono solo pochi millilitri mentre le pecore e i cavalli ne possono produrre molti litri).

4.2.3 Anticorpi monoclonali

Gli anticorpi monoclonali possono rivelarsi particolarmente utili per le metodiche immunochimiche. Questi anticorpi sono secreti da cloni, cioè da cellule monoclonali. È possibile clonare i linfociti maturi, secernenti anticorpi, dagli animali immunizzati, che in genere sopravvivono in coltura solo per un breve periodo, quindi non forniscono quantità utili di anticorpi. Sono state comunque messe a punto procedure che consentono di ottenere elevate quantità di anticorpi monoclonali, producendo linee cellulari a crescita continua (immortali) che secernono anticorpi in maniera efficiente. Questo comporta la generazione di cellule ibride, la trasformazione dei linfociti con un virus oppure procedure di DNA ricombinante.

4.2.4 Produzione di ibridomi

Nel 1975 Köhler e Milstein idearono una procedura per produrre cellule ibride che secernono anticorpi e crescono continuamente in coltura (Fig. 4.2), mediante fusione dei linfociti di un topo immune con cellule di mieloma murino. Tali cellule ibride fuse, inizialmente dette

Tabella 4.4 Esempi di protocolli d'immunizzazione utilizzati con successo

Specie	Esposizione (priming)	Periodo di riposo (settimane)	Primo richiamo	Periodo di riposo (settimane)	Richiamo successivo
Topi, ratti e cavie	5-100 µg antigene in FCA (o altro adiuvante), s.c. o i.m.	2-3	50-100 µg antigene in FIA, altro adiuvante o PBS, s.c. o i.m.	3	50-100 µg antigene in FIA o PBS, i.p., s.c., i.m. o e.v.
Conigli	50-250 µg antigene in FCA o altro adiuvante. I.d., i.m. o s.c.	3-4	50-250 µg antigene in FIA, altro adiuvante o PBS, i.m. o s.c.	4 o più	50-250 µg antigene in FIA o PBS, i.m., s.c. o e.v.
Pecore e capre	250 µg-10 mg antigene in FIA o altro adiuvante, s.c. o i.d.	4	250 µg-10 mg antigene in FIA o altro adiuvante, i.m. o s.c.	4-8 o più	250 µg-10 mg antigene in FIA o altro adiuvante, i.m. o e.v.
Cavalli e asini	250 µg-50 mg antigene in FIA o altro adiuvante, i.m., s.c. o i.d.	4	250 µg-50 mg antigene in FIA o altro adiuvante, i.m. o s.c.	4-8 o più	250 µg-50 mg antigene in FIA o altro adiuvante, i.m. o s.c.
Primati	50 µg-1 mg antigene in adiuvante, i.m. o s.c.		50 µg-1 mg antigene in adiuvante o PBS, i.m., s.c. o e.v.	4-8 o più	50 µg-1 mg antigene in adiuvante o PBS, i.m., s.c. o i.d.
Polli	30-200 µg a antigene in FCA o altro adiuvante, i.m.	2-3	30-200 µg antigene in FIA o altro adiuvante, i.m.	3 o più	30-200 µg in FIA o altro adiuvante o PBS, i.m.

FCA, Adiuvante di Freund completo; FIA, Adiuvante di Freund incompleto; PBS, Phosphate-Buffered Saline (tampone fosfato salino); i.p., intraperitoneale; s.c., sotto cute; i.m., intramuscolare; e.v., endovenosa; i.d., intradermico.
(Da: M.A. Kerr, R. Thorpe. *Immunochimistry Labfax*, Bios Scientific, Oxford 1994.)

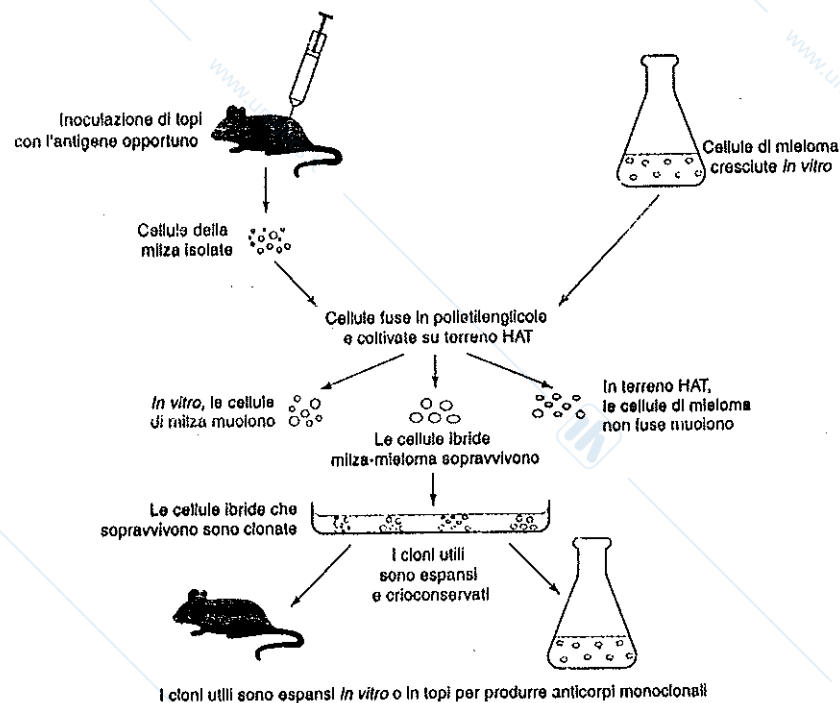


Figura 4.2 Rappresentazione schematica di una tipica procedura per la produzione di anticorpi monoclonali murini.

fusomi e successivamente ibridomi, ereditano la capacità di secernere anticorpo dal linfocita e la capacità di crescere continuamente dalla cellula di mieloma. Sono state prodotte linee cellulari di mieloma che non secernono più paraproteina (la proteina del mieloma), vantaggiose per la tecnologia dell'ibridoma (l'ibridoma derivato non secerne più paraproteina).

Si mescolano assieme, ad alta densità, linfociti e cellule di mieloma, trattati con un agente di fusione (oggi polietilenglicolo, mentre in passato si utilizzava il virus di Sendai). A tali condizioni si producono cellule fuse, anche se predominano linfociti e cellule di mieloma non fuse; se non vengono rimosse, queste ultime crescono notevolmente e possono sommergere gli ibridomi. A tal scopo, in genere, si fa ricorso a un terreno selettivo, in cui le cellule di mieloma muoiono mentre gli ibridomi sopravvivono. Il sistema selettivo più utilizzato prevede l'aggiunta, al mezzo di coltura, dell'antibiotico aminopterina, in grado di inibire le vie metaboliche di sintesi *de novo* di nucleotidi, in cui i nucleotidi (e in definitiva gli acidi nucleici) sono prodotti a partire da piccole molecole. Le cellule normali sopravvivono in questo terreno in quanto sono in grado di utilizzare il percorso di recupero per la sintesi di acidi nucleici, in cui sono riciclati i nucleotidi prodotti dalla degradazione degli acidi nucleici. Invece, se le cellule non so-

no in grado di produrre l'enzima ipoxantina-guanina fosforibosiltransferasi (HGPRT), non possono usare il percorso metabolico di recupero, quindi muoiono in terreno contenente aminopterina. Poiché queste cellule possono essere prodotte in coltura con 8-azaguanina, si sono stabilizzate molte linee cellulari di mieloma murino HGPRT-negative.

Dopo la fusione dei linfociti con cellule di mieloma HGPRT-negative, si aggiunge terreno contenente aminopterina, addizionato con ipoxantina e timidina per assicurare un adeguato supporto di substrati per il percorso di recupero (terreno HAT); questo terreno uccide le cellule di mieloma, ma consente la sopravvivenza di ibridomi che abbiano ereditato la HGPRT dal linfocita. I linfociti residui che non si sono fusi muoiono dopo un breve periodo in coltura, per cui si ottiene una preparazione pura di ibridomi, che può essere clonata secondo tre procedure:

1. **Clonaggio per diluizione limitata:** una singola sospensione cellulare di ibridomi viene diluita e distribuita in pozzetti di piastre per coltura, circa una cellula per pozzetto (o quantità simili). Si analizzano i pozzetti per determinare la clonalità e, dopo coltura, si procede ad analizzare il surnatante cellulare per la presenza dell'anticorpo appropriato. Di norma, questa procedura viene ripetuta (spesso più d'una volta) per ottenere una linea monoclonale di ibridoma.
2. **Clonaggio in soft agar:** una singola sospensione cellulare di ibridomi viene diluita in agar fuso allo 0.25% circa, distribuito su agar solido 0.5% e lasciato solidificare. I cloni crescono in coltura come focolai che possono essere visualizzati (utilizzando un microscopio invertito). Quando raggiungono le dimensioni opportune, i gruppi di cellule che si formano vengono prelevati dall'agar usando una sottile pipetta Pasteur, quindi coltivati su terreno; si analizza così il contenuto anticorpale del surnatante.
3. **Clonaggio mediante separatori di cellule a fluorescenza:** le cellule vengono marcate con fluorocromi per il tipo di anticorpo secreto (per esempio tramite antigeni marcati con fluoresceina isotiocianato), quindi isolate individualmente mediante citometria a flusso con separazione di cellule in base alla fluorescenza (FACS, *Fluorescence-Activated Cell Sorter*). Una volta coltivate *in vitro* le cellule adatte, si analizza il surnatante per la presenza di anticorpi.

Tutti i metodi di clonaggio sono stati ideati per produrre colture di ibridomi monoclonali, ma certo non lo garantiscono. Ovviamente la ripetizione delle tecniche di clonaggio aumenta la probabilità che le cellule risultanti siano monoclonali, ma occorre eseguire controlli per accertarsi di aver ottenuto la monoclonalità. A questo scopo, si preparano "subcloni" di linee di ibridomi (seguendo la procedura già descritta) e si calcola la percentuale di cellule che secernono anticorpi con definita specificità appropriata. Se la linea parentale è monoclonale, tale percentuale dovrebbe essere prossima al 100%; in caso contrario la linea d'ibridoma non sarà monoclonale, oppure sarà instabile rispetto alla secrezione di anticorpi monoclonali.

Per produrre un surnatante contenente anticorpi monoclonali, si possono crescere tali linee cellulari monoclonali in coltura (da fermentatori industriali o supporti per colture in fibre cave si possono ottenere chilogrammi di anticorpi), oppure nella cavità peritoneale di topi per produrre un liquido ascitico ad alta concentrazione di anticorpi (circa 5-10 mg ml⁻¹). Le linee cellulari possono essere crioconservate per assicurarsi una fonte stabile di anticorpi monoclonali.

Si può usare un approccio simile per produrre anticorpi monoclonali di ratto, con la differenza che a volte l'azaserina (o-diazacetil-L-serina) sostituisce l'aminopterina nel mezzo di coltura selettivo; essa inibisce una serie di reazioni di aminazione, alcune delle quali sono es-

senziali per la sintesi *de novo* di purine. Si possono inoltre produrre eteroibridomi di criceto per fusione di linfociti di criceto con cellule di mieloma murino HGPRT-negative. La tecnologia degli ibridomi è in genere meno efficace nei mammiferi superiori, a causa della mancanza di linee cellulari di mieloma adatte alla fusione e dell'instabilità degli eteroibridomi di linfociti di topo e di specie superiori. È stata descritta una linea cellulare di mieloma di coniglio adatta per la produzione di ibridomi di coniglio.

4.2.5 Trasformazione di linfociti con virus; produzione di anticorpi monoclonali umani

In alcuni casi, è preferibile o addirittura necessario, impiegare anticorpi monoclonali umani anziché di roditori. Per esempio, è meglio utilizzare anticorpi umani per scopi terapeutici *in vivo*, poiché sono meno immunogenici e mediano le funzioni immunitarie biologiche, mentre può essere molto difficile, se non impossibile, produrre anticorpi monoclonali di roditori contro alcuni antigeni, tra cui l'antigene contro il gruppo sanguigno umano Rh. Sono stati prodotti pochi anticorpi monoclonali umani derivati da ibridomi (quasi sempre eteroibridomi), ma questo approccio è difficoltoso e inefficiente. Tuttavia, l'infezione di linfociti B umani con virus di Epstein-Barr comporta la trasformazione di una sottopopolazione di cellule, che consente la produzione di una linea cellulare a crescita continua, suscettibile di clonazione. Alcuni di questi cloni secernono anticorpi monoclonali, utilizzabili per scopi terapeutici e immunochimici. Un numero relativamente alto di tali linee cellulari secerne anticorpi IgM, ma si possono produrre linee cellulari che secernono immunoglobuline di tutte le classi e sottoclassi. Alcune linee cellulari denotano instabilità e bassi livelli di secrezione di anticorpi, problemi talvolta risolvibili mediante fusione con eteroibridomi stabili che non producono anticorpi, o con linee di mieloma.

4.2.6 Anticorpi ingegnerizzati

Anche se si possono produrre anticorpi monoclonali di topo o di ratto, con determinate proprietà di legame per l'antigene in animali di laboratorio appositamente immunizzati, il loro impiego clinico è problematico negli esseri umani, per esempio in pazienti oncologici, in quanto possono scatenare una risposta immunitaria nel ricevente, essendo riconosciuti come "estranei". Inoltre, alcune potenziali applicazioni degli anticorpi monoclonali possono richiedere particolari funzioni effettrici (mediate dalla porzione Fc di determinate sottoclassi) associate a una particolare specificità (determinata dalla porzione variabile), che non possono essere prodotte facilmente mediante la semplice immunizzazione. Per altre applicazioni cliniche potrebbero essere preferibili piccoli frammenti di anticorpi, piuttosto che molecole intere relativamente grandi, per esempio se si desidera penetrare nel tessuto. Si sono quindi sviluppati metodi di ingegneria genetica nel tentativo di superare queste limitazioni. Mediante la reazione polimerasica a catena (PCR, *Polymerase Chain Reaction*) si possono amplificare i geni che codificano per le catene pesanti e leggere degli anticorpi, per poi clonarli in vettori adatti per l'espressione e la manipolazione, per esempio l'unione della regione variabile di un anticorpo con la regione costante di un altro. Di solito, per l'espressione di anticorpi interi si usano cellule di mammifero (al fine di consentire la glicosilazione e il corretto ripiegamento e assemblaggio della proteina), mentre i frammenti di anticorpi possono essere espressi in *Escherichia coli*. È ora possibile anche ripro-

durre *in vitro* la risposta anticorpale che avviene *in vivo*, esprimendo sulla superficie di batteriofagi (esposizione in fagi, *phage display*) frammenti di anticorpi derivanti dalla collezione genica, allo scopo di consentire la selezione di determinate specificità.

Amplificazione di geni per anticorpi mediante la reazione polimerasica a catena

È possibile amplificare velocemente i geni per gli anticorpi mediante PCR; quest'amplificazione prevede cicli ripetuti di estensione tra due primer oligonucleotidici che ibridizzano le sequenze alle estremità 5' e 3' del gene. Si distinguono tre passaggi:

1. Preparazione di un lisato cellulare ed estrazione dell'RNA (questa frazione conterrà l'mRNA codificante le catene pesanti e leggere degli anticorpi).
2. Sintesi di DNA complementare (cDNA) a singolo filamento catalizzata dall'enzima trascrittasi inversa; l'ibrido RNA/cDNA viene poi utilizzato come stampo per la PCR.
3. Amplificazione specifica del gene, o dei geni, presenti nello stampo di RNA/cDNA con primer specifici che si legano alle sequenze esterne alla regione di cui si cercano informazioni (di solito la regione variabile; Fig. 4.3). Si possono progettare primer per amplificare in PCR la maggior parte delle famiglie di geni per le regioni variabili, in quanto le sequenze nucleotidiche fiancheggianti questi geni sono relativamente conservate. L'incorporazione di un sito di restrizione nel primer consente il successivo clonaggio del gene, o dei geni, amplificati.

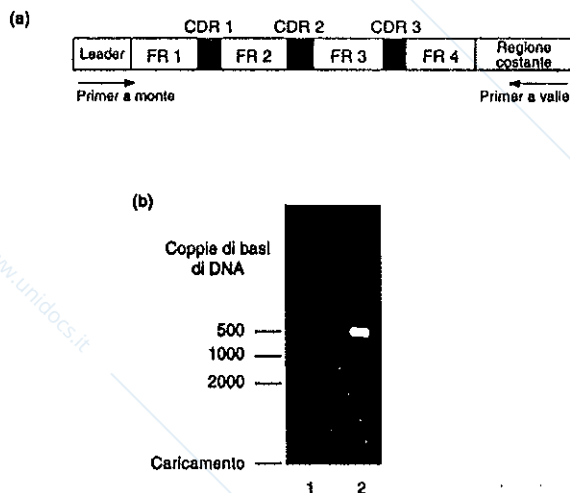


Figura 4.3 Amplificazione in PCR di un gene della regione variabile per la catena pesante. (a) Posizione dei primer relativamente alla regione variabile. FR, regione codificante; CDR, regione che determina la complementarità. (b) Fotografia dell'analisi elettroforetica, in gel di agarosio, dei prodotti dell'amplificazione in PCR di un gene della regione variabile per la catena pesante (corsia 2). In corsia 1 sono mostrati dei marcatori di DNA. Il gel è stato colorato con bromuro di etidio (colorante fluorescente che si lega agli acidi nucleici) e visualizzato con luce ultravioletta.

Il materiale di partenza può essere un ibridoma che produce un anticorpo monoclonale, per esempio al fine di consentirne la manipolazione genica; in alternativa, si può utilizzare RNA dei linfociti del sangue periferico per preparare una collezione di geni per le regioni variabili delle catene pesanti e leggere, allo scopo di creare collezioni geniche di frammenti di anticorpi ed esposizione in fagi (vedi oltre).

Collezione genica e phage display

Le collezioni di amplificati di geni per le catene pesanti e leggere delle regioni variabili (V_H e V_L , rispettivamente) possono essere unite tramite un tratto di DNA sintetico che codifica un peptide di connessione (*linker*), a formare collezioni geniche di frammenti di anticorpi Fv a singola catena (sc) (i frammenti Fv sono i più piccoli frammenti di anticorpi che conservano un sito di legame per l'antigene intatto; Fig. 4.4b). L'uso di linker impedisce la dissociazione delle porzioni V_H e V_L , che altrimenti non sarebbero legate covalentemente. La collezione scFv viene quindi amplificata nuovamente, con primer contenenti siti di restrizione appropriati per la successiva digestione con endonucleasi e ligazione in un vettore fagico adatto per l'esposizione, per esempio pHEN-1, in seguito espresso in *E. coli*. Si crea quindi una "libreria" fagica di anticorpi. Il vettore fagico per l'esposizione consente l'espressione dei frammenti scFv sulla superficie del fago, come prodotto di fusione con una proteina fagica dell'involucro. Questo consente di selezionare i fagi codificanti i frammenti desiderati, mediante separazione su un supporto solido cui è legato l'antigene. In alternativa, si possono esprimere i frammenti solubili scFv (a seconda del ceppo di *E. coli* usato come ospite). Un potenziale vantaggio di questa tecnologia è la produzione di anticorpi da parte di individui non immunizzati; ciò dipende dalla creazione di un numero elevato di collezioni di geni per anticorpi, dall'esposizione in fagi e dalla selezione con l'antigene di interesse.

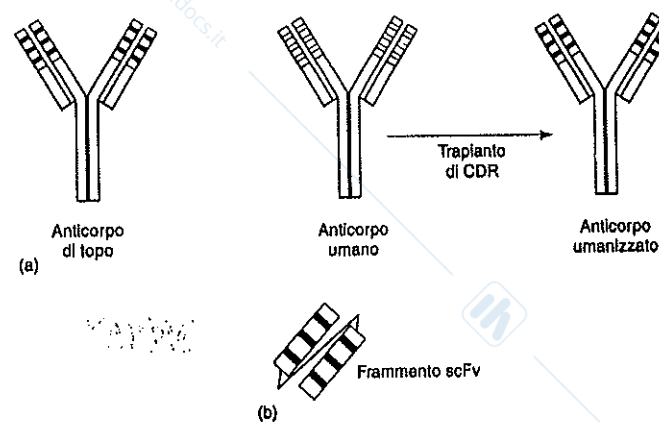


Figura 4.4 Anticorpi e frammenti anticorpali geneticamente ingegnerizzati. (a) Trapianto di CDR (regione che determina la complementarità) per produrre anticorpi umanizzati; (b) frammento Fv a singola catena.

L'utilizzo di frammenti di anticorpi può essere vantaggioso in certe applicazioni cliniche: per esempio, la loro piccola dimensione dovrebbe aumentare la penetrazione nel tumore; tuttavia, il loro impiego in laboratorio quali reagenti può essere problematico, in quanto essi tendono ad avere un'affinità funzionale relativamente bassa.

Strategie per ridurre l'immunogenicità

Sono state messe a punto molte strategie per rendere gli anticorpi meno immunogenici, pur facendo in modo che conservino le attività di legame dell'antigene. Negli anticorpi chimerici, i domini costanti degli anticorpi di topo o di ratto sono sostituiti da quelli della sequenza umana; questo conferisce anche le proprietà di efficacia mediate da Fc per l'utilizzo *in vivo* in esseri umani e nei metodi *in vitro* basati sul modello umano. I domini costanti possono addirittura essere sostituiti con una proteina non anticorpale, per esempio una tossina o un enzima. Un approccio alternativo consiste nell'umanizzare gli anticorpi di topo o di ratto, inserendo la CDR di topo nei geni umani per la regione variabile (Fig. 4.4a); questi anticorpi devono essere espressi in cellule di mammifero. Inoltre, può accadere che debbano essere cambiati o aggiunti residui aminoacidici per far sì che la regione variabile abbia la conformazione corretta.

Sequenziamento di anticorpi monoclonali

Il clonaggio mediante PCR dei geni per la regione variabile degli anticorpi ha reso molto più semplice la determinazione delle sequenze aminoacidiche codificate, in quanto è molto più semplice sequenziare l'acido nucleico codificante l'anticorpo e poi tradurlo in sequenza proteica, piuttosto che determinare la sequenza di aminoacidi delle immunoglobuline secondo il metodo di degradazione di Edman (cap. 6, 6.4.3). Quest'ultimo metodo di sequenziamento, oltre a richiedere una quantità abbastanza elevata di preparazione pura di anticorpo, è limitato a brevi tratti di sequenza, per cui si devono sequenziare molti peptidi sovrapposti per ottenere la sequenza completa. La determinazione della sequenza aminoacidica degli anticorpi consente di correlarne la struttura alle proprietà immunologiche (per esempio la capacità di legare l'antigene) e di predirne la struttura tridimensionale. La sequenza nucleotidica fornisce informazioni anche sull'uso dei geni della linea germinale per una determinata risposta anticorpale (si ricordi che i geni codificanti anticorpi si formano dall'unione di diversi segmenti di geni della linea germinale durante la maturazione dei linfociti, 4.1) e sul processo di maturazione dell'affinità (mutazione somatica).

I geni per gli anticorpi amplificati possono essere sequenziati direttamente; in alternativa, per evitare le sequenze contaminanti presenti nel prodotto di PCR, il materiale amplificato può essere clonato in un vettore fagico, con cui si trasformano cellule di *E. coli*, ottenendo così dati di sequenza più affidabili e riproducibili. Il metodo di sequenziamento basato sulla terminazione della catena è descritto nel capitolo 2, 2.14.

4.3 Purificazione e frammentazione di immunoglobuline

Molte tecniche immunochimiche, per esempio metodi su gel di agar o di immunoistochimica (4.4 e 4.8), possono essere eseguite utilizzando anticorpi non purificati presenti negli an-

tisieri, surnatanti di colture cellulari contenenti anticorpi monoclonali o liquidi ascitici di roditori. Altri metodi, invece, richiedono una purificazione parziale o totale degli anticorpi specifici, o almeno l'isolamento della frazione totale delle immunoglobuline, per esempio se si vuole marcarle (4.5) o immobilizzarle per utilizzarle in cromatografia di immunoaffinità (4.3.4), oppure analizzarle per focalizzazione isoelettrica (*isoelectric focusing*, cap. 12, 12.3.4) o per cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*) (cap. 10, 10.4). Ci sono molti metodi per purificare le immunoglobuline; il metodo ideale e i dettagli sperimentali dipendono dalla classe/sottoclasse, dalla specie che ha prodotto l'anticorpo, dall'uso che s'intende farne e dal tipo di materiale di partenza, per esempio siero per gli anticorpi policlonali, surnatante di coltura o liquido ascitico per quelli monoclonali. I metodi per la purificazione di immunoglobuline dalla miscela di proteine presenti nel siero, nel surnatante o nel liquido ascitico comprendono tecniche di precipitazione che sfruttano le diverse caratteristiche di solubilità degli anticorpi rispetto alle altre proteine: cromatografia a scambio ionico (che sfrutta le differenze di carica tra immunoglobuline e altre proteine), gel filtrazione (che separa le proteine in base alle dimensioni) e cromatografia d'affinità (che sfrutta le specifiche interazioni tra l'anticorpo e la molecola a cui si lega, detta "ligando", dal latino *ligare*, legare). Può essere necessario combinare due o più di queste procedure per ottenere la purezza desiderata, tuttavia, in genere solo la cromatografia d'affinità con antigeni immobilizzati è in grado di purificare gli anticorpi con una sola specificità, a meno che il materiale di partenza non contenga anticorpi monoclonali.

4.3.1 Tecniche di precipitazione

Alcuni sali, solventi e polimeri organici provocano la precipitazione di molecole di immunoglobuline in soluzione, contribuendo a formare un aggregato visibile e insolubile che può essere recuperato mediante centrifugazione, e successivamente risospeso nel tampone appropriato (cap. 6, 6.3.4). Le immunoglobuline in soluzione sono circondate da uno strato d'idratazione strettamente legato, perturbato dalle tecniche di precipitazione. Le immunoglobuline sono solubili a determinati valori di concentrazione salina, ma diventano insolubili a valori più alti o più bassi. Le alte concentrazioni saline allontanano lo strato di idratazione dalla proteina, in quanto gli ioni diventano solvatati, favorendo l'interazione delle parti idrofobiche delle immunoglobuline con regioni simili di altre molecole, causando un "raggruppamento" di molecole. Questo fenomeno, detto *salting out*, consente la precipitazione reversibile degli anticorpi; in questa tecnica gli ioni più efficaci sono anioni a carica multipla insieme a cationi monovalenti; i più usati sono solfato di ammonio e di sodio. La solubilità di alcune immunoglobuline, tuttavia, diminuisce anche all'abbassarsi della concentrazione salina, in quanto gli ioni che restano sono insufficienti per mantenere l'idratazione delle proteine immunoglobuliniche. Questa procedura, detta precipitazione di euglobuline, è particolarmente utile per la purificazione preliminare di IgM, sebbene di solito non sia molto efficace per le IgG. Per precipitare le immunoglobuline si possono usare anche solventi organici miscibili con acqua, che diminuiscono il potere solvatante dell'acqua. Su scala industriale, si utilizza la precipitazione con etanolo per frazionare le immunoglobuline dalle altre proteine del plasma. A questo scopo si può anche usare, in maniera analoga ai solventi organici, il polietilenglicole, un polimero organico idrosolubile ad alto peso molecolare.

La precipitazione delle immunoglobuline tende a essere più efficace al loro punto isoelettrico (il valore di pH a cui le immunoglobuline non hanno carica netta), in quanto si riduce al minimo la repulsione elettrostatica tra le molecole. Le tecniche di precipitazione sono economiche e di facile esecuzione, ma spesso vengono utilizzate solo come passo preliminare in un protocollo di purificazione a più passaggi, perché il prodotto di solito non è sufficientemente puro.

4.3.2 Gel filtrazione

La gel filtrazione separa le molecole in base alle dimensioni (cap. 13, 13.8); di solito si usa per purificare le IgM, secondo metodi convenzionali o in HPLC, in quanto le IgM sono considerevolmente più grandi delle altre sottoclassi di immunoglobuline e delle altre proteine del siero. La sola gel filtrazione non è molto efficace per la purificazione di IgG, ma può essere impiegata a questo scopo in combinazione con altri metodi, come la cromatografia a scambio ionico.

4.3.3 Cromatografia a scambio ionico

I sistemi di cromatografia a scambio ionico sia convenzionali che HPLC o FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*, cromatografia liquida rapida di proteine) utilizzano la carica superficiale delle immunoglobuline per separarle dalle altre componenti (cap. 13, 13.7). A pH neutro, la maggior parte delle immunoglobuline ha carica negativa, quindi legherà matrici anioniche con carica positiva. Le immunoglobuline possono poi essere eluite dalla matrice innalzando la concentrazione salina o variando il valore di pH del tampone (Fig. 4.5).

4.3.4 Cromatografia d'affinità

La cromatografia d'affinità sfrutta l'interazione, specifica ma reversibile, tra l'anticorpo da purificare e un ligando, attaccato covalentemente a un supporto inerte (cap. 13, 13.9). Il ligando può essere, per esempio, un antigene per la purificazione di anticorpi con particolare specificità, un anticorpo anti-immunoglobuline per purificare gli anticorpi di una particolare specie, classe o sottoclasse, oppure una proteina che lega anticorpi (molti ceppi batterici producono proteine che legano immunoglobuline con alta affinità) (Tab. 4.5). Tra le proteine batteriche leganti immunoglobuline, quelle più usate sono la proteina A e la proteina G, che legano la regione costante delle IgG (a seconda della specie e della sottoclasse). È stata descritta anche una proteina che lega catene leggere (proteina L), ma tale legame vale solo per alcuni tipi di catene leggere. La cromatografia d'affinità con proteina A o G immobilizzata è spesso il metodo d'elezione per la purificazione di IgG monoclonali dai surnatanti di colture. Il supporto inerte può essere agarosio, Sepharose, poliacrilammide, polistirene o un polimero acrilico stabile ad alta pressione quando venga usato in HPLC. In alternativa, il ligando può essere legato a sfere magnetiche, separabili con un magnete. Sono disponibili in commercio molti ligandi immobilizzati; in alternativa, i ligandi possono essere accoppiati in laboratorio a supporti attivati, tramite gruppi amminici primari, carbossilici o tiolici (Fig. 4.6). Quando la soluzione contenente un anticorpo è posta a contatto con il ligando immobilizzato, l'anticorpo si lega al ligando e viene, quindi, a sua volta immobilizzato (Fig. 4.7). Il materiale non legato può essere eliminato. Per eluire l'anticorpo, si spezza l'interazione specifica con il ligando (vedi oltre), il quale resta sul supporto inerte.

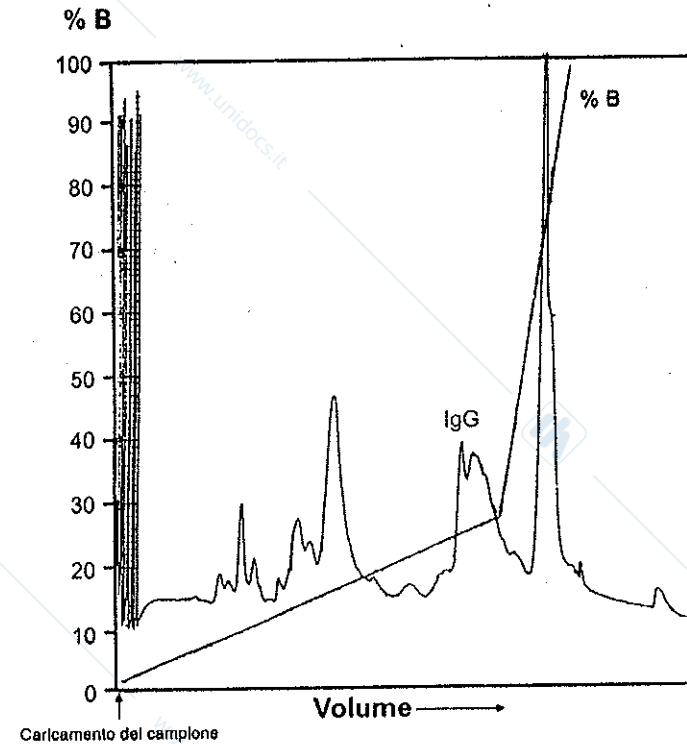


Figura 4.5 Cromatografia che mostra la purificazione di IgG di topo da liquido ascitico, utilizzando la cromatografia liquida rapida di proteine a scambio ionico. In precedenza, è stata eseguita una purificazione delle IgG mediante precipitazione con ammonio solfato dal liquido ascitico (4.3.1); il precipitato è stato risospeso ed equilibrato in 20 mM di trietanolamina a pH = 7,7 (tampone A). Anche la colonna per scambio ionico è stata equilibrata con tampone A. In seguito all'applicazione del campione, per eluire le immunoglobuline è stato usato un gradiente salino, formato da quantità crescenti di tampone B (tampone A + 1 M NaCl). Nella figura è indicato il picco corrispondente alle IgG.

Di solito, le condizioni per dissociare la specifica interazione ligando-anticorpo distruggono le interazioni elettrostatiche e/o i legami idrofobici (dovuti alle interazioni di van der Waals) coinvolti nel legame anticorpo-ligando (Tab. 4.6).

Le lectine sono glicoproteine di origine non immunitaria, isolate da piante e animali, che legano specifici carboidrati, come galattosio e fucosio; per esempio, la proteina legante mannosani (MBP) è una lectina che lega mannosio e *N*-acetilglucosamina presenti nel siero dei mammiferi. Accoppiate a un supporto inerte, possono essere utilizzate per purificare IgM di topo, che presentano dal 12 al 16% di carboidrati contenenti mannosio. Si può usare ialina, una lectina che lega galattosio, per purificare IgA1 umane.

Per purificare gli antigeni, sono ampiamente utilizzate tecniche di cromatografia d'affinità con anticorpi immobilizzati.

Tabella 4.5 Ligandi per cromatografia d'affinità

Tipo di ligando	Esempi	Purificazione dell'anticorpo
Aptene	DNP	Anticorpi che legano l'aptene
Antigene	Emoglobina, fattore VIII	Anticorpi a specificità singola
Proteine batteriche che legano immunoglobuline	Proteina A, proteina G	La maggior parte delle sottoclassi di IgG di molte specie
Anticorpi anti-immunoglobuline	Proteina L Anticorpi di capra anti-anticorpi umani	Alcune catene κ di molte specie Frazione di immunoglobuline specifiche per la classe e/o la specie
Lectine	Iacalina Proteina legante mannano	IgA umane IgM murine

DNP, dinitrofenolo.

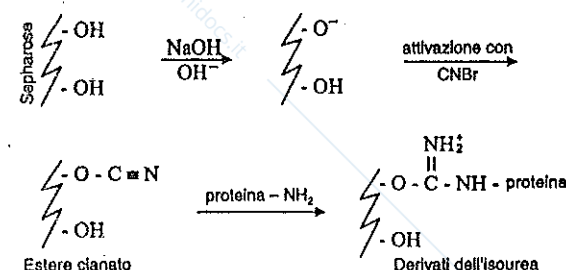
4.3.5 Frammentazione e dissociazione delle immunoglobuline

Per alcune applicazioni è necessario utilizzare frammenti di anticorpi anziché molecole intatte (4.11). Per esempio, la rimozione della porzione Fc impedisce il legame degli anticorpi ai recettori per Fc presenti su leucociti e altre cellule; questo potrebbe essere necessario se si devono valutare antigeni di superficie riconosciuti dall'anticorpo, per esempio mediante microscopia a immunofluorescenza. La preparazione dei frammenti di anticorpi in genere prevede l'uso di enzimi proteolitici per tagliare i legami peptidici. Si possono utilizzare diversi enzimi per tagliare la catena pesante in punti specifici, dando origine a frammenti differenti. Quelli di uso più comune sono i frammenti prodotti con papaina, pepsina e plasmina, i cui siti di taglio delle IgG sono illustrati nella figura 4.1, con la relativa nomenclatura dei frammenti. Questi enzimi sono disponibili sul mercato sia in soluzione sia legati covalentemente a *Sepharose* (un supporto inerte), che facilita l'eliminazione dell'enzima quando la digestione è completa (*Sepharose* e l'enzima immobilizzato possono essere rimossi mediante semplice centrifugazione). È inoltre possibile dissociare le catene costituenti gli anticorpi; le catene pesanti e leggere sono unite da ponti disolfuro, facilmente spezzati da agenti riducenti come il ditiotreitolo, in condizioni tali da lasciare intatti i legami disolfuro all'interno delle catene. Si può anche usare un agente alchilante, come la iodoacetamide, per assicurarsi che i legami non si riformino. Tuttavia, le catene leggere e pesanti si riassoceranno non covalentemente se non si aggiungerà un agente dissociante, come l'acido propionico. Le catene possono essere separate in base alle dimensioni mediante gel filtrazione (Fig. 4.8). Di solito, le catene di immunoglobulina isolate legano l'antigene con avidità minore delle molecole intatte e dei frammenti Fab e F(ab')₂.

4.4 Immunoprecipitazione

Una proprietà importante di molti anticorpi è la capacità di precipitare gli antigeni in soluzione. Gli anticorpi possono essere divalenti (IgG) o multivalenti (IgM) e, se anche gli antigeni sono multivalenti, le interazioni anticorpo-antigene danno origine a un reticolo mole-

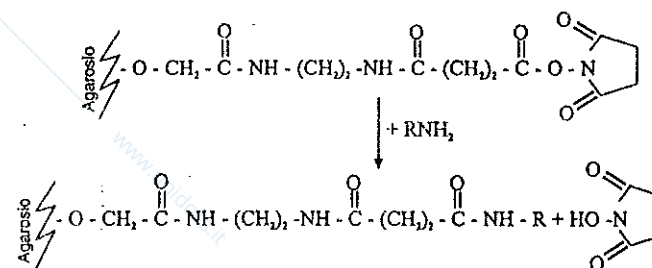
(a) Meccanismo d'attivazione del supporto *Sepharose* con CNBr per consentire il successivo accoppiamento di proteine tramite i gruppi amminici



A elevati valori di pH, CNBr reagisce con i gruppi ossidrilici del *Sepharose*, formando esteri cianati; questi, a loro volta, reagiscono con i gruppi amminici delle proteine, formando legami covalenti.

(b) Meccanismo d'immobilizzazione del ligando mediante accoppiamento con esteri della *N*-idrossisuccinamida, disponibile in commercio

(1) Affi Gel 10 (usato per accoppiare proteine basiche)



(2) Affi Gel 15 (usato per accoppiare proteine acide)

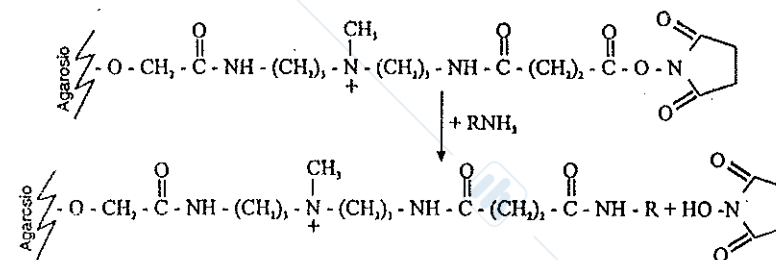


Figura 4.6 Accoppiamento di ligandi ai supporti per preparare colonne d'affinità.

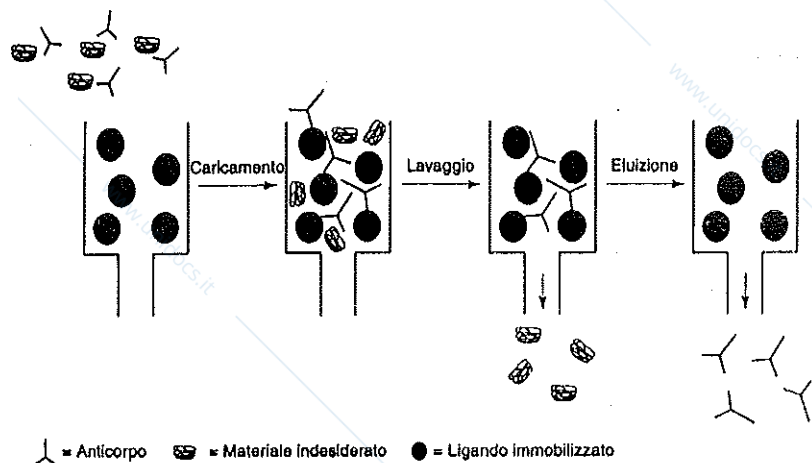


Figura 4.7 Rappresentazione schematica della purificazione di anticorpi mediante cromatografia d'affinità.

Tabella 4.6 Condizioni per l'eluizione di anticorpi da colonne d'affinità

Condizioni di eluizione	Modalità d'azione
Glicina-HCl, pH 2.2-2.8 1 M acido propionico 0.05 dietilamina, pH 11.5 1 M ammoniaca, pH 11	Modifica la conformazione e distrugge le interazioni elettrostatiche
2-8 M urea 5-6 M guanidina cloridrato	Fortemente denaturante
3.5 M sodio tiocianato 4 M potassio tiocianato 2-5 M MgCl ₂ , KI, NaI	Agenti caotropici
50% etilenglicole, pH 11.5 10% (v/v) diossano a pH acido	Distrugge le interazioni idrofobiche

colare che precipita, essendo troppo largo per restare in soluzione. La formazione del complesso insolubile anticorpo-antigene dipende strettamente dalle concentrazioni di anticorpo e di antigene e avviene all'interno di un ristretto intervallo di concentrazioni, noto come zona di equivalenza, che rappresenta le condizioni a cui si formano complessi proteici sufficientemente grandi da precipitare. Oltre alla concentrazione di equivalenza, si verifica una condizione denominata eccesso di antigene o di anticorpo, che porta alla formazione di piccoli complessi solubili (Fig. 4.9). Tuttavia, la precipitazione non avviene mai con alcuni anticorpi monoclonali che riconoscono un singolo epitopo su un antigene (cioè antigeni monovalenti), perché non si forma il reticolo molecolare.

Si può sfruttare l'immunoprecipitazione sia in tecniche su agar sia in soluzione.

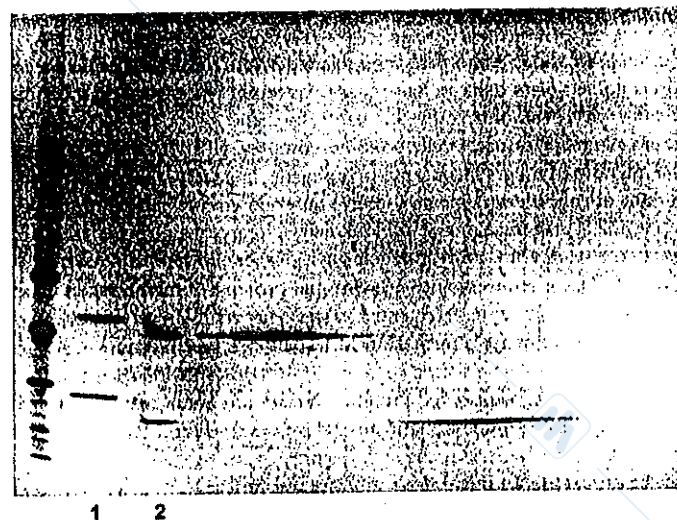


Figura 4.8 Analisi delle catene pesanti e leggere separate mediante elettroforesi su gel di poliaccrilammide con sodio dodecilsolfato (SDS-PAGE). Le IgG sono state ridotte e alchilate, quindi le catene pesanti e leggere sono state separate mediante gel filtrazione in acido propionico. Le frazioni sono state analizzate mediante SDS-PAGE in condizioni non riducenti. Nelle corsie 1 e 2 sono evidenti le IgG ridotte e alchilate prima della gel filtrazione, analizzate in condizioni riducenti e non riducenti, rispettivamente. Si noti l'apparente aumento delle dimensioni delle catene (corsia 1) quando sono analizzate in condizioni che riducono i legami disolfuro intracatena. A sinistra sono caricati marcatori di pesi molecolari.

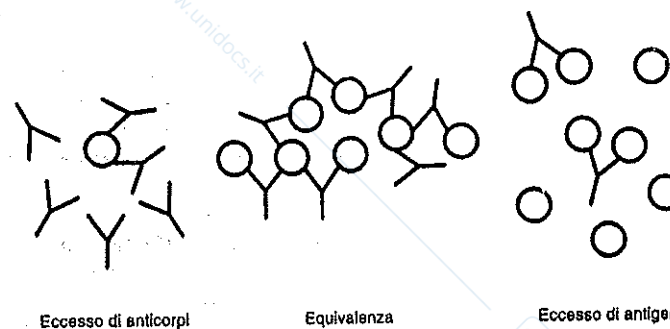


Figura 4.9 Rappresentazione schematica dei complessi immuni che si formano al variare dei rapporti antigene/anticorpo. L'immunoprecipitazione avviene solo quando si forma un reticolo di antigene-anticorpo insolubile al punto di equivalenza.

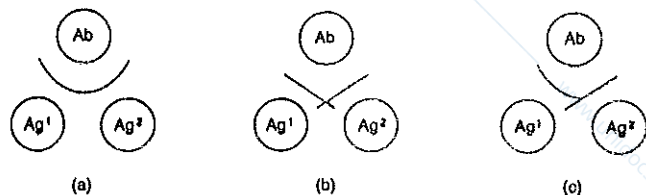


Figura 4.11 Interpretazione di bande di precipitazione formatesi in seguito a diffusione doppia. La fusione delle bande di immunoprecipitazione (a) indica l'uguaglianza immunochimica degli antigeni (Ag) 1 e 2, mentre l'incrocio delle bande (b) mostra la loro non uguaglianza. La fusione parziale o la formazione di uncini suggerisce un'uguaglianza parziale, ossia l'antigene 2 ha alcuni determinanti che non condivide con l'antigene 1, ma tutti gli epitopi riconosciuti dall'anticorpo (Ab) presenti sull'antigene 1 sono anche presenti sul 2.

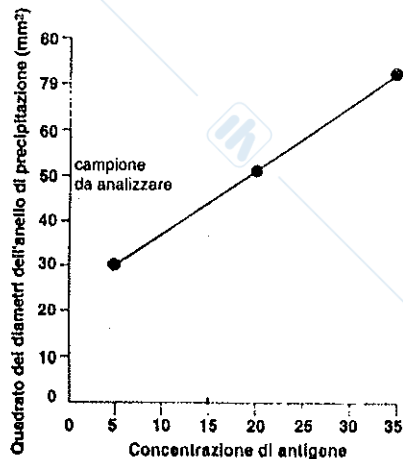


Figura 4.12 Utilizzo della diffusione radiale semplice per determinare la concentrazione di antigeni nei campioni analizzati. La curva standard è costruita riportando in grafico il quadrato del diametro dell'anello di precipitazione ottenuto da campioni di riferimento contenenti quantità note di antigene. Per ricavare la concentrazione di antigene nei campioni da analizzare, si può riportare il quadrato dei diametri di precipitazione dei campioni stessi sulla curva standard.

per rivelare gli anticorpi che precipitano. In ambito clinico, si esegue questa tecnica su campioni di siero, di urine concentrate e di liquido spinale dei pazienti per identificare anomalie nella concentrazione di antigeni e/o la presenza di proteine anomale rispetto ai campioni normali di controllo, analizzati contemporaneamente.

La *rocket immunoelettroforesi*, un adattamento dell'immunolettroforesi radiale semplice, prevede la migrazione elettroforetica dell'antigene dai pozzetti incisi nel gel contenente gli anticorpi (Fig. 4.10). All'equivalenza, si formano bande di precipitazione a forma di razzo (*rocket*), la cui area è proporzionale alla concentrazione di antigene. Si può usare questa tecnica per determinare le concentrazioni di antigeni in campioni ignoti (per esempio i livelli di proteine del siero) in riferimento a una curva standard come nella RID, oppure per analizzare le relazioni immunochimiche tra campioni diversi, posti in pozzetti adiacenti (vedi Fig. 4.11 per l'interpretazione dei profili delle bande di precipitazione).

Nell'immunolettroforesi bidimensionale, le proteine vengono dapprima separate mediante elettroforesi su gel di agar, poi sottoposte a elettroforesi in un gel contenente l'anticorpo, in direzione perpendicolare a quella della prima elettroforesi (Fig. 4.10). Questa tecnica è utile per analizzare le proteine del siero.

La sensibilità delle tecniche di precipitazione in agar varia notevolmente a seconda degli anticorpi e degli antigeni analizzati.

4.4.2 Immunoprecipitazione in soluzione

Si può usare un anticorpo per immunoprecipitare specificamente l'antigene da una miscela di proteine in soluzione, per esempio da un lisato cellulare. Se l'immunoprecipitato è insolubile, può essere analizzato dopo sedimentazione per centrifugazione; i complessi solubili anticorpo-antigene possono essere isolati per precipitazione con una proteina legante immunoglobulina, come la proteina A o G, con un anticorpo anti-immunoglobulina, oppure con reagenti legati covalentemente a un supporto insolubile, come l'agarosio (4.3.4). Questo metodo, che costituisce la base dei classici dosaggi radioimmunologici (RIA, *RadioImmunoAssays*) (4.7.1), consente anche l'isolamento di antigeni ignoti da una miscela di proteine; in questo caso, può essere necessario marcare la miscela di proteine, per esempio un lisato cellulare, con ¹²⁵I prima dell'immunoprecipitazione. Per avere informazioni sull'antigene, si può analizzare l'immunoprecipitato mediante SDS-PAGE (cap. 12, 12.3.1) e autoradiografia (cap. 14, 14.2.3). In alternativa, si possono analizzare gli immunoprecipitati non marcati radioattivamente mediante SDS-PAGE e *immunoblotting* con anticorpi a specificità nota (4.6), che consentono l'identificazione positiva delle proteine immunoprecipitate. Di norma l'immunoprecipitazione si esegue su cellule radioattive intatte o su membrane cellulari, per ottenere informazioni sugli antigeni di superficie (Fig. 4.13).

Anche se si può utilizzare un anticorpo per analizzare le singole proteine di una miscela, mediante SDS-PAGE e *immunoblotting* (4.6), l'immunoprecipitazione in soluzione presenta il vantaggio che l'anticorpo può reagire con l'antigene nativo, non parzialmente denaturato come nel caso degli *immunoblotting*. Infatti alcuni antigeni, in seguito a elettroforesi e *immunoblotting*, perdono la propria immunoreattività, o addirittura la solubilità (soprattutto gli antigeni di superficie). Questo si verifica quando gli epitopi dipendono dalla conformazione o si formano dalle interazioni di molte subunità/componenti della proteina.

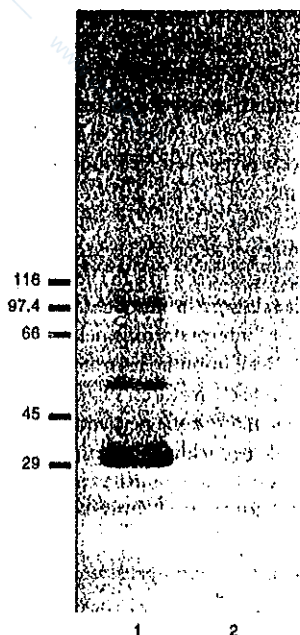


Figura 4.13 Autoradiografia dopo SDS-PAGE elettroforesi di immunoprecipitati monoclonali anti-Rh derivanti da membrane di eritrociti Rh-positivi e Rh-negativi marcate con ^{125}I . Gli eritrociti umani positivi o negativi per l'antigene Rh del gruppo sanguigno sono stati marcati sulla superficie con ^{125}I . Le cellule sono state lisate con shock ipotonico e le membrane incubate con un anticorpo monoclonale anti-Rh. Dopo lavaggi per rimuovere l'anticorpo non legato, le membrane sono state solubilizzate, poi sono stati isolati i complessi anticorpo-antigene mediante proteina A-Sepharose e sono stati analizzati con SDS-PAGE e autoradiografia. Il peso molecolare della principale proteina immunoprecipitata da membrane Rh-positive è di circa 31 000 (corsia 1), corrispondente al polipeptide Rh. Non è precipitata nessuna proteina dalle membrane Rh-negative (corsia 2). È indicata la posizione relativa delle proteine di riferimento del peso molecolare ($M_r \times 10^3$).

4.5 Marcatura di anticorpi

La specificità degli anticorpi li rende potenti strumenti analitici. Sebbene le tecniche di immunoprecipitazione in agar (4.4) diano un precipitato visibile del complesso anticorpo-antigene, nella maggior parte dei dosaggi immunochimici il legame dell'anticorpo all'antigene può essere visualizzato solo marcando l'anticorpo (a volte l'antigene) o, più comunemente, un anticorpo anti-immunoglobulina (4.5.1) con un marcatore che può essere rilevato qualitativamente e talvolta anche quantitativamente. Perciò, si può marcare un anticorpo con un isotopo radioattivo, per saggi radioimmunologici, o con un enzima da cui si ottiene un prodotto colorato in un dosaggio ELISA, oppure con un fluorocromo che emetta fluorescenza visibile per l'impiego in immunostochimica (Tab. 4.7). Con queste tecniche non sarebbe possibile rilevare il legame tra un anticorpo non marcato e un antigene. Spesso gli anticorpi marcati con fluorocromi o enzimi si dicono coniugati.

4.5.1 Procedure immunochimiche dirette e indirette

Nelle semplici procedure immunochimiche dirette viene marcato l'anticorpo contro l'antigene di interesse (anticorpo "primario"); invece, nelle procedure indirette, di più comune impiego, il legame di un anticorpo non marcato con l'antigene è rivelato da un anticorpo anti-immunoglobuline (o, meno frequentemente, da una proteina batterica legante immunoglobuline

Tabella 4.7 Marcature di anticorpi comunemente usate in tecniche immunochimiche

Marcatura	Esempi	Principale/i utilizzo/i
Fluorocromi	Fluoresceina	Immunoisto/citochimica; citofluorimetria a flusso; dosaggi fluorimetrici
	Rodamina	Immunoisto/citochimica; citofluorimetria a flusso
	Ficoeritrina	Citofluorimetria a flusso
	Rosso Texas	Citofluorimetria a flusso
	AMCA (7-amino-4-metilcoumarin-3-acetato)	Citofluorimetria a flusso
	Derivati di *BODIPY	Citofluorimetria a flusso
	*Cascade Blue	Citofluorimetria a flusso
Enzimi	AP	Immunoistochimica; EIA; immunoblotting
	β -galattosidasi	Come sopra
	HRP	Come sopra; microscopia immunoelettronica
	Glucosio ossidasi	Immunoistochimica
	Ureasi	EIA
Radioisotopo	^{125}I	RIA competitivo e non competitivo
Elettrodensità	Oro	Microscopia immunoelettronica
	Ferritina	Come sopra

BODIPY, (4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene); AP, fosfatasi alcalina; EIA, dosaggi immunometrici mediante anticorpi marcati con enzimi; HRP, perossidasi di rafano.
* Marchio della Molecular Probe Inc.

marcata, come la proteina A o G). Questo anticorpo secondario è, di solito, specifico per immunoglobuline della specie animale, da cui si è prodotto l'anticorpo primario, e può anche essere specifico per una classe o sottoclasse. Le procedure dirette e indirette sono schematizzate nella figura 4.14. I metodi indiretti, che utilizzano anticorpi anti-immunoglobuline marcati, presentano numerosi vantaggi rispetto alle procedure dirette: sono più sensibili, perché molte molecole anti-immunoglobulina marcate possono legarsi a ogni anticorpo primario non marcato, generando un segnale più forte; non è necessario che ogni anticorpo primario sia marcato singolarmente, in quanto, per esempio, gli anticorpi di coniglio anti-IgG di topo riconoscono tutte le IgG monoclonali di topo; inoltre, non c'è rischio di perdita di reattività dell'anticorpo primario conseguente alla marcatura. Tuttavia, in alcune situazioni è necessario utilizzare direttamente anticorpi marcati (4.8.3 e 4.8.5). Una procedura semidiretta, che sfrutta il vantaggio dell'interazione specifica ad alta affinità tra biotina e avidina/streptavidina (4.5.5), prevede l'uso di anticorpo primario biotinilato e preparazioni marcate con avidina/streptavidina.

4.5.2 Marcatura radioattiva

Radioiodinazione

Il radioisotopo più comunemente usato per la marcatura di anticorpi è lo ^{125}I . Questo isotopo è facilmente disponibile come Na^{125}I , abbastanza economico e dotato di alta attività spe-

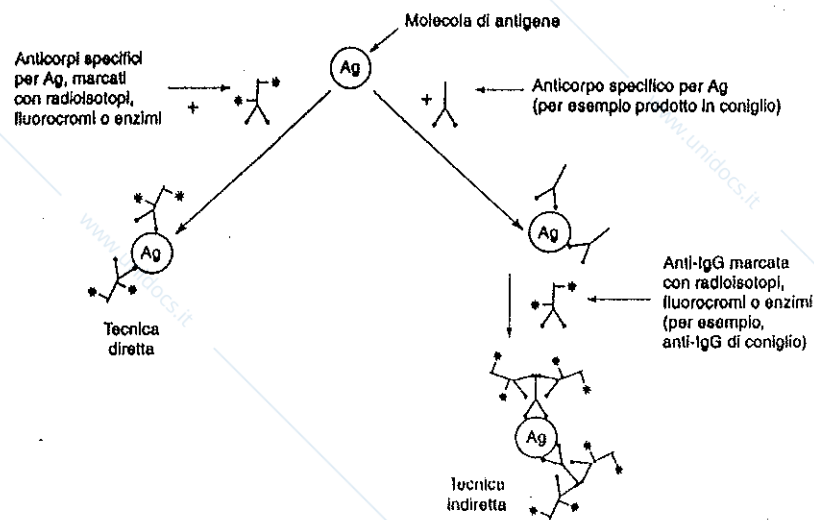


Figura 4.14 Rappresentazione schematica di metodologie immunochimiche dirette e indirette. Ag, antigene.

cifica; emette radiazioni γ , di facile rilevazione e quantificazione tramite un contatore di raggi γ , ed è particolarmente indicato per le radiografie. Tuttavia occorre prendere alcune precauzioni, per ridurre al minimo l'esposizione alle radiazioni sul posto di lavoro e per prevenire il contatto, la contaminazione e l'ingestione (la tiroide è particolarmente suscettibile). La marcatura covalente di proteine, direttamente con ^{125}I , comporta la generazione ossidativa di catione iodio (I^+), oltre alla sua spontanea addizione elettrofila ai residui di tirosina e, in misura minore, di triptofano e istidina. La principale sostituzione porta alla formazione di un residuo di mono-iodotirosina, ma si possono formare anche residui di di-iodotirosina (Fig. 4.15). Le concentrazioni dei reagenti dovrebbero consentire solo la marcatura con ^{125}I di uno o due residui di tirosina per molecola di anticorpo, perché, altrimenti, si potrebbe verificare perdita di immunoreattività e/o danno da radiazioni.

Ci sono molti metodi ormai sperimentati per la radioiodinazione e differiscono in base all'agente ossidante prescelto per produrre I^+ . Poiché i forti agenti ossidanti possono distruggere la reattività degli anticorpi, occorre trovare un compromesso tra l'efficiente produzione di I^+ e la conservazione della capacità di legare l'antigene.

La cloramina T (*N*-cloro-*p*-toluene sulfonamide) è un agente ossidante aromatico usato comunemente per la iodinazione ad alta attività specifica di anticorpi e altre proteine. La iodinazione con cloramina T è molto rapida (45 s), ma può denaturare gli anticorpi e causare la perdita della capacità di legame all'antigene. La reazione dev'essere bloccata rapidamente dopo appropriata iodinazione, mediante aggiunta di un agente riducente, come il sodio metabisolfito, o un eccesso di tirosina per "raccolgere" lo iodio diventando iodotirosina. In seguito alla radioiodinazione, l'anticorpo viene separato dallo ^{125}I libero (non legato) mediante

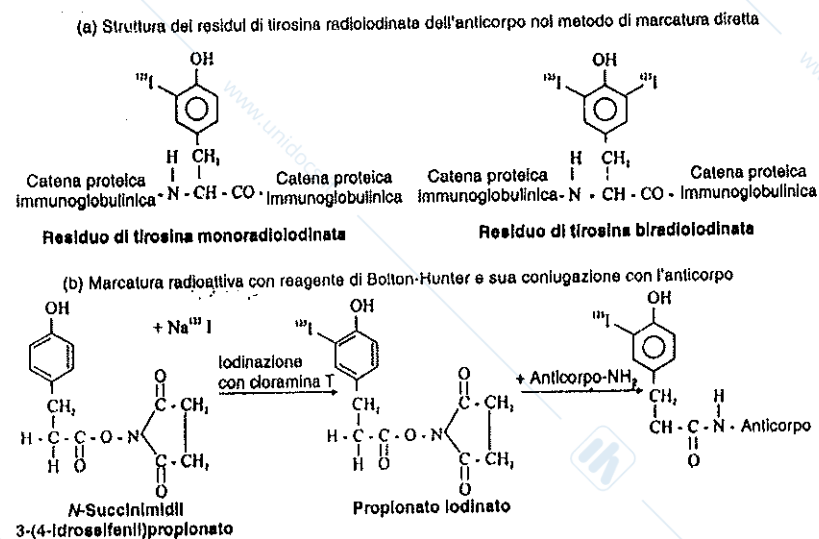


Figura 4.15 Marcatura diretta e indiretta di anticorpi con ^{125}I .

gel filtrazione, oppure, in caso di marcatura di IgG, usando uno scambiatore con un anione fortemente basico che può essere utilizzato per adsorbire la iodotirosina. L'impiego di cloramina T, immobilizzata su sfere, rappresenta un'alternativa più delicata, in quanto la reazione può essere interrotta con la semplice rimozione del materiale solido.

Un altro agente ossidante comunemente usato per la radioiodinazione è lo iodogen (1,3,4,6-tetracloro-3 α , 6 α -difenilglicolouril), più blando della cloramina T. Lo iodogen è insolubile in solventi acquosi, perciò, per poterlo utilizzare, è necessario scioglierlo in cloroformio o benzene, di solito in un tubo di plastica; i solventi organici vengono poi fatti evaporare, in modo che lo iodogen resti sulle pareti del tubo. Si procede, infine, alla iodinazione nel tubo rivestito dallo iodogen; per bloccare la reazione si toglie la soluzione dal tubo.

La radioiodinazione di anticorpi con l'enzima lattoperossidasi è una procedura molto delicata che provoca danni minimi agli anticorpi, ma non produce anticorpi marcati con elevata attività specifica. Pertanto la reazione catalizzata dalla lattoperossidasi viene usata, di solito, solo per marcare componenti della superficie cellulare, in quanto minimizza la diffusione di reagenti attraverso la membrana cellulare che marcherebbero componenti interni.

Gli anticorpi possono anche essere coniugati a composti fenolici a basso peso molecolare, precedentemente radioiodinati. Di solito, *N*-succinimidil 3-(4-idrossifenil)propionato (il reagente di Bolton-Hunter) è radioiodinato con cloramina T; il 5-[^{125}I] iodofenil che ne deriva, viene quindi coniugato ai gruppi amminici dell'anticorpo (Fig. 4.15). La marcatura indiretta degli anticorpi presenta il vantaggio di evitare danni ossidativi, anche se, come per la marcatura diretta, si dovrebbero marcare con i derivati dello iodiofenile solo uno o due residui per molecola di anticorpo.

4.5.3 Marcatura con composti fluorescenti

I fluorocromi emettono luce fluorescente se illuminati con ultravioletti. In soluzione, la fluorescenza degli anticorpi marcati con fluorocromi è quantificabile utilizzando un fluorimetro; comunque, i campi in cui gli anticorpi marcati con composti fluorescenti trovano maggiore impiego sono l'immunoistochimica e la citochimica, dove si può visualizzare, con un microscopio a fluorescenza, il loro legame alle sezioni di tessuto o alle cellule (4.8.3). Gli anticorpi marcati con fluorocromi sono molto usati nelle tecniche di citometria a flusso (4.8.5).

Sono disponibili molti composti fluorescenti con differenti spettri di eccitazione e di emissione, ma quelli più comunemente impiegati in microscopia sono la fluoresceina, che emette fluorescenza verde, e la tetrametilrodamina, che emette fluorescenza rossa. Per la coniugazione, di solito si utilizzano fluoresceina e tetrametilrodamina isotiocianato, in quanto esse formano facilmente legami covalenti con i gruppi amminici primari sui residui di lisina delle molecole di anticorpo (Fig. 4.16), sebbene siano disponibili anche i derivati con iodoacetamide di fluoresceina e rodamina, in grado di coniugarsi tramite gruppi sulfidrilici. Altri fluorocromi, prevalentemente usati in citofluorimetria a flusso e coniugabili ai gruppi amminici (o sulfidrilici), sono Rosso Texas (sulforodamina; Fig. 4.16), 7-amino-4-metilcumarin 3-acetato (AMCA) e BODIPY (4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene).

Le ficobiliproteine sono un gruppo di proteine intensamente fluorescenti presenti nelle alghe e nei cianobatteri, di comune impiego nella citofluorimetria di flusso; rientrano in questo gruppo la

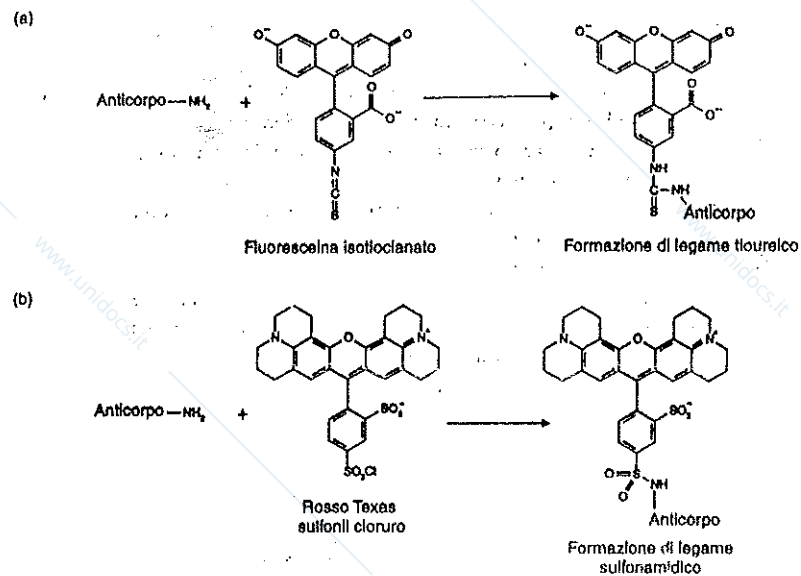


Figura 4.16 Coniugazione di (a) fluoresceina isotiocianato e (b) Rosso Texas (sulforodamina) con i gruppi amminici dell'anticorpo.

B- e R-ficoeritrina (M_r 240000), C-ficocianina (M_r 72000) e alloficocianina (M_r 110000). Le ficobiliproteine possono essere attaccate ai gruppi tiolici degli anticorpi mediante il proprio gruppo amminico, utilizzando agenti chimici eterobifunzionali in grado di formare legami crociati (4.5.4).

4.5.4 Marcatura con enzimi

Gli anticorpi marcati con enzimi sono ampiamente utilizzati in dosaggi immunologici (per esempio ELISA), immunoblotting, immunoistochimica e citochimica. In ognuno di questi casi il legame, diretto o indiretto (4.5.1), tra l'anticorpo marcato e l'antigene (che può essere nella sezione di tessuto, sulla membrana o nei pozzetti di una piastra da microtitolazione) viene visualizzato eseguendo una reazione enzimatica, che converte un substrato incolore in un prodotto colorato. Nei dosaggi immunoenzimatici, il prodotto deve essere solubile per consentire la quantificazione spettrofotometrica; nelle metodiche di immunoblotting e immunoistochimica, il prodotto deve essere insolubile per consentire la precisa localizzazione dell'iniziale interazione antigene-anticorpo, visibile a occhio nudo o al microscopio. L'impiego di anticorpi marcati con enzimi consente l'amplificazione catalitica del segnale, in quanto ogni molecola di enzima può convertire molte molecole di substrato in prodotti colorati. Le proprietà degli enzimi comunemente usati nella coniugazione sono elencate nella tabella 4.8. Gli enzimi sono proteine, perciò devono essere coniugati agli anticorpi da reagenti chimici in grado di instaurare legami crociati, dei quali esistono due tipi: reagenti omobifunzionali, che reagiscono con lo stesso gruppo chimico sia sull'enzima sia sull'anticorpo, e reagenti eterobifunzionali, che reagiscono con differenti gruppi chimici di ogni proteina.

La glutaraldeide è un semplice reagente omobifunzionale che instaura legami crociati tra i gruppi amminici (della lisina, per esempio; Fig. 4.17) delle proteine. La coniugazione può essere svolta con una procedura a un singolo passaggio, in cui si aggiunge glutaraldeide a una miscela di enzimi e proteine (perossidasi da rafano [HRP], fosfatasi alcalina e β -galattosidasi) o, per la coniugazione della HRP, con una procedura in due fasi in cui prima viene fatta reagire con l'enzima, e successivamente l'enzima accoppiato alla glutaraldeide viene fatto reagire con l'anticorpo. È disponibile un'ampia gamma di reagenti eterobifunzionali, tipicamente costituiti da un gruppo che reagisce con amine e uno che reagisce con tioli, separati da un braccio spaziatore; essi stabiliscono legami crociati tra i gruppi amminici degli anticorpi e i gruppi sulfidrilici degli enzimi. Ne è un esempio il succin-imidil-4-(*N*-maleimidometil)cicloesano 1-carbossilato (SMCC; Fig. 4.17). Un altro metodo di coniugazione comporta l'uso del periodato, per generare gruppi aldeidici attivi, mediante taglio delle catene di carboidrati degli enzimi glicoproteici; questi gruppi reagiscono poi con i gruppi amminici primari degli anticorpi, formando basi di Schiff, in seguito ridotte a produrre legami stabili.

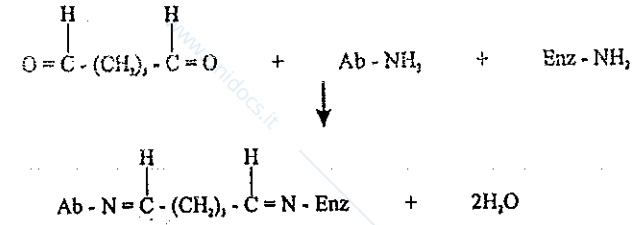
4.5.5 Anticorpi biotinilati

L'interazione ad altissima affinità (costante d'affinità $> 10^{15} M^{-1}$) tra biotina (vitamina H; M_r 244) e avidina (proteina dell'albume) o streptavidina (proteina del batterio *Streptomyces avidinii*) può essere sfruttata nelle tecniche immunochimiche, coniugando la biotina agli anticorpi e utilizzando avidina/streptavidina coniugate a fluorocromi o enzimi, oppure marcate con radioattivo (Fig. 4.18). Gli anticorpi possono essere facilmente coniugati con i derivati della biotina,

Tabella 4.8 Proprietà degli enzimi che vengono coniugati con gli anticorpi

Enzima	Fonte	Struttura	Reazione catalizzata
Perossidasi	Rafano	Glicoproteina monomerica M_r 40 000	H_2O_2 + substrato ossidabile \rightarrow prodotto ossidato + $2H_2O$
Fosfatasi alcalina	Intestino di vitello (di solito)	Glicoproteina contenente Zn^{2+}	$R-O-P + H_2O \rightarrow R-OH + Pi$ monofostato ortofosforico
β -Galattosidasi	<i>E. coli</i>	Proteina multimerica (4 subunità) M_r 540 000	β -D-Galattoside + $H_2O \rightarrow$ galattosio + alcol
Glucosio ossidasi	<i>Aspergillus niger</i>	Proteina multimerica (4 subunità) M_r 540 000	β -D-Glucosio + $O_2 \rightarrow H_2O_2$ + acido gluconico
Ureasi	<i>Canavalia ensiformis</i>	Flavoglicoproteina M_r 480 000	$(NH_2)_2CO + 3H_2O \rightarrow CO_2 + 2NH_4OH$

(a) La glutaraldeide è un reagente omobilunzionale che instaura legami crociati tra i gruppi amminici



(b) SMCC è un reagente eterobilunzionale che instaura legami crociati tra gruppi amminici e gruppi sulfidrici

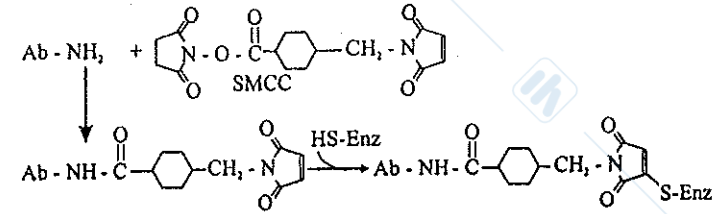


Figura 4.17 (a) e (b) Struttura e modalità d'azione dei reagenti che formano legami crociati. Ab, anticorpo; Enz, enzima.

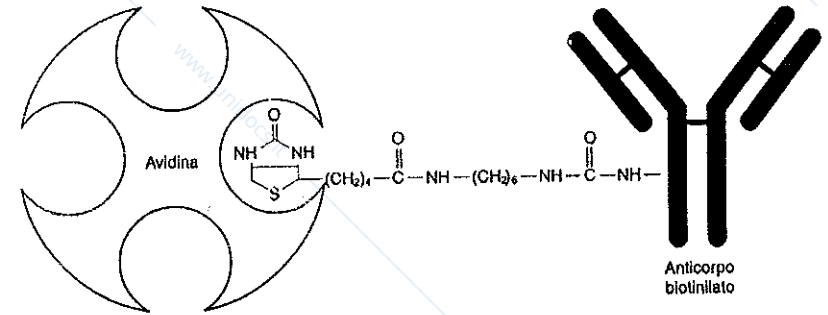


Figura 4.18 Interazione tra una IgG coniugata a biotina e l'avidina. Il legame è molto forte e ogni molecola di avidina ha quattro siti di legame per la biotina. Nella struttura qui presentata, l'accoppiamento tra biotina e immunoglobulina avviene grazie all'estere N-idrossisuccinimide biotinamidocaproico.

il più delle volte *N*-idrossisuccinimidobiotina o analoghi, con incorporato un braccio spaziatore, che riduce l'impedimento sterico aumentando la distanza tra biotina e anticorpo. La maggior parte di questi derivati della biotina reagisce con i gruppi aminici primari, sebbene alcuni di essi reagiscano con i gruppi tiolici o i residui di carboidrati delle immunoglobuline.

4.6 Immunoblotting

In molti casi è importante accertare la specificità degli anticorpi studiando la loro capacità di riconoscere componenti presenti in una miscela complessa. Si possono usare anche anticorpi specifici per identificare tali componenti e per stabilire la reattività crociata che può manifestarsi tra specie molecolari correlate dal punto di vista immunochimico. Per tali metodi, è evidentemente necessario separare le componenti antigeniche con un metodo analitico. In teoria, a tale scopo può essere utilizzata qualsiasi tecnica biochimica, ma l'alto potere di risoluzione dei metodi elettroforetici su gel di poliacrilamide (soprattutto SDS-PAGE e focalizzazione isoelettrica; cap. 12, 12.3.1 e 12.3.4) rende questi ultimi senz'altro preferibili. Le tecniche più comunemente adottate prevedono il trasferimento delle proteine separate in gel di poliacrilamide su membrane porose, e la successiva analisi delle membrane con anticorpi (si possono applicare direttamente anticorpi sul gel, ma la metodica è inefficiente e richiede molto tempo, a causa della limitata permeabilità dei gel di poliacrilamide). I complessi antigene-anticorpo sono poi rivelati sia mediante reagenti anti-immunoglobuline marcati, sia mediante marcatura diretta dell'anticorpo con radioisotopi (di solito si usa ^{125}I) o con enzimi (4.5). Di conseguenza, gli antigeni riconosciuti dall'anticorpo appaiono come "bande" sull'autoradiografia o sui filtri sviluppati con il substrato; il confronto tra questo profilo e le proteine totali colorate su gel consente l'identificazione degli antigeni riconosciuti dall'anticorpo (Fig. 4.19). Questo processo, simile sotto alcuni aspetti al *Southern* e al *Northern blotting* utilizzati per gli acidi nucleici, viene detto immunoblotting o *Western blotting* (cap. 12, 12.3.9).

Di solito, la membrana porosa per gli immunoblotting è di nitrocellulosa, ma talvolta si usano anche altri materiali. Si può aumentare la sensibilità degli immunoblotting mediante sviluppo con amplificazione della chemiluminescenza (ECL, *Enhanced ChemiLuminescence*), in cui si impiegano anti-immunoglobuline coniugate a perossidasi per individuare i complessi antigene-anticorpo (cfr. ELISA; 4.7.3). L'enzima genera un peracido, scindendo il perossido d'idrogeno, il quale a sua volta ossida un substrato in modo che emani luce, normalmente rivelata utilizzando una pellicola a raggi X (come nell'autoradiografia). Di solito, il substrato è il luminolo; si aggiungono inoltre composti fenolici "intensificanti" per aumentare la produzione di fotoni. Sono stati messi a punto anche altri sistemi ECL da utilizzare con anticorpi coniugati con fosfatasi alcalina. La rivelazione ECL è sensibile e veloce rispetto all'impiego diretto di anticorpi coniugati con enzimi o radioisotopi. Sono inoltre disponibili altri sistemi di amplificazione della chemiluminescenza, adatti per immunoblotting, che comportano l'uso di differenti enzimi, substrati e amplificatori.

4.7 Dosaggi immunologici

Molte tecniche immunochimiche permettono una determinazione quantitativa della concentrazione della sostanza analizzata, sia in soluzioni pure che in una miscela complessa, in par-

- determinazioni quantitative

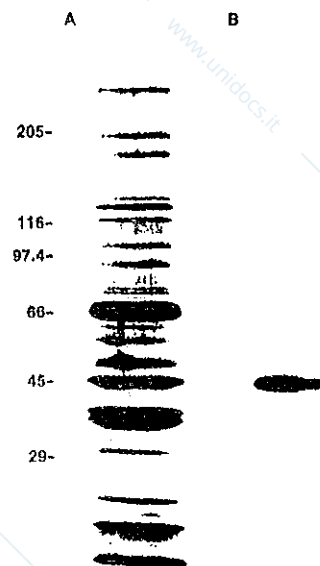


Figura 4.19 Utilizzo dell'immunoblotting per dimostrare come si possano sfruttare anticorpi specifici per identificare i loro antigeni in miscele complesse. Le componenti di un omogenato di muscolo liscio sono state separate mediante SDS-PAGE, eseguita in duplicato su due corsie. In una corsia le proteine sono state colorate per permettere la visualizzazione di tutte le componenti dell'omogenato (corsia A); le componenti della seconda corsia sono state trasferite mediante elettroforesi su nitrocellulosa e incubate con anticorpo monoclonale di topo contro la α -actina del muscolo liscio seguita dall'anticorpo contro l'IgG da topo marcato con ^{125}I . Nella successiva autoradiografia, viene immunocolorata una banda proteica (corsia B) corrispondente alla α -actina del muscolo liscio. Nella figura sono indicate le posizioni relative delle proteine di riferimento del peso molecolare ($\times 10^3$).

ticolare l'immunodiffusione radiale semplice o la *rocket* immunoelettroforesi (4.4.1). Tuttavia, l'enorme potenziale di applicazione dell'immunochimica a dosaggi sensibili e specifici per una vasta gamma di molecole chimiche e biologiche, ha indotto a concentrare gran parte degli sforzi in quest'area: esistono ora molte versioni dei principi base dei dosaggi immunochimici; queste metodiche sono chiamate dosaggi immunologici per sottolineare il loro carattere quantitativo.

Il perfezionamento delle metodiche degli immunodosaggi a scopo di ricerca è dovuto principalmente alla necessità di una crescente specificità e di una particolare sensibilità. I dosaggi immunologici sono ampiamente usati a scopi diagnostici/prognostici di routine e in altre applicazioni (per esempio nella misurazione dei livelli di contaminanti ambientali, quali pesticidi e sottoprodotti tossici di processi industriali); si sono sviluppate tecniche che consentono di analizzare parecchi campioni, facilmente automatizzabili (spesso si usa un analizzatore robotizzato), economiche, robuste, precise e accurate, inoltre la ricerca in questo campo continua. Una descrizione esauriente di tutte le possibili tecniche e dei tipi di dosaggio immunologico richiederebbe parecchi volumi; di seguito sono riportati i principi generali e alcune delle opzioni di più frequente impiego.

4.7.1 Immunodosaggio competitivo

Nell'immunodosaggio competitivo, l'antigene presente nei campioni da analizzare compete con una quantità fissa di antigene marcato, in presenza di una quantità limitante di anticorpo. Una volta che il sistema ha raggiunto l'equilibrio, l'antigene libero viene separato da

quello legato all'anticorpo e la quantità dell'antigene marcato, presente in quest'ultimo, viene determinata mediante scintillazione (emissione β) o conteggio dei raggi γ . Questo valore è inversamente proporzionale alla concentrazione dell'antigene presente nei campioni (Fig. 4.20). Attraverso una serie di diluizioni della soluzione standard dell'antigene noto, è possibile costruire una curva dose-risposta (spesso chiamata curva standard), che può essere utilizzata per ricavare, mediante confronto, la concentrazione di antigene nel campione. I primi dosaggi immunologici erano di questo tipo e utilizzavano di solito radioisotopi (^3H e ^{125}I); questi dosaggi prendono il nome di dosaggi radioimmunologici (RIA, *RadioImmunoAssays*), anche se dovrebbero essere chiamati dosaggi radioimmunologici per competizione, per distinguerli dai dosaggi di legame radioattivi (4.7.3). Il primo RIA è stato descritto per l'insulina, contemporaneamente si sono sviluppati approcci simili per le proteine e non per anticorpi, per esempio per la vitamina B_{12} . La sensibilità di questi dosaggi varia notevolmente in relazione a diversi fattori, come per esempio il tipo di marcatura adottata. I RIA che utilizzano ^{125}I in teoria possono raggiungere una sensibilità di 10^{-14} M, ma in pratica, di solito, hanno valori $\leq 10^{-12}$ M. Nella messa a punto di un RIA, innanzitutto, è necessario costruire una curva di legame dell'anticorpo rispetto all'antigene marcato, per stabilire le concentrazioni adatte di anticorpo e antigene marcato da usare nel dosaggio. Di norma per RIA competitivi si selezionano condizioni nelle quali il 50-70% dell'antigene marcato sia legato all'anticorpo. Sono state messe a punto varie strategie per separare l'antigene libero da quello legato (vedi Tab. 4.9).

Sono stati messi a punto dosaggi RIA per un'ampia gamma di sostanze, da piccole molecole (per esempio steroidi, ormoni peptidici del siero/plasma umano o animale) a grandi proteine (per esempio livelli sierici di α_2 -macroglobulina, immunoglobuline). Tali dosaggi possono essere precisi, accurati ed economici in quanto richiedono solo piccolissime quantità di anticorpo. Tuttavia, non si prestano ad essere automatizzate, comportano un certo dispendio

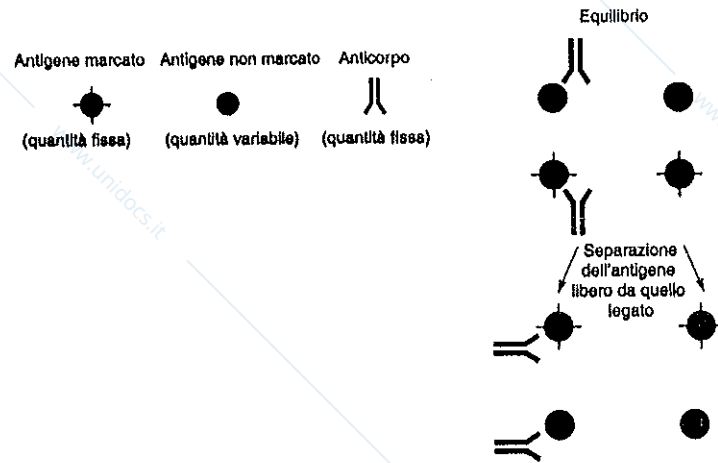


Figura 4.20 Rappresentazione schematica di immunodosaggio competitivo (inibizione).

Tabella 4.9 Metodi di separazione del ligando legato da quello libero, nei dosaggi radioimmunologici

Metodo	Principio
Carbone vegetale rivestito	Adsorbimento della frazione legata o di quella libera
Florisil	
Proteina A di <i>S. aureus</i>	
Polietilenglicole	Precipitazione frazionata della parte legata
Etanolo	
Solfato di ammonio	
Anticorpo secondario solubile	Precipitazione della frazione legata
in fase solida	- cellulosa - particelle magnetiche
Anticorpo primario	Precipitazione della frazione legata
in fase solida	- pozzetti e tubi rivestiti - cellulosa - particelle magnetiche

di tempo e, in genere, la curva dose-risposta copre solo un intervallo relativamente ristretto di concentrazione della sostanza analizzata. Inoltre, possono essere meno sensibili di altri immunodosaggi. È infine necessario stabilire sistemi per il contenimento e lo smaltimento di reagenti radioattivi e per l'assistenza medica del personale che li esegue. Queste procedure di sicurezza hanno comportato una riduzione dell'uso di tecniche RIA.

Le concentrazioni di anticorpo utilizzate sono limitanti, quindi il legame competitivo a volte prende il nome di immunodosaggio con eccesso di reagente (antigene) (cfr. dosaggi immunometrici; 4.7.2). Si sono sviluppati anche immunodosaggi competitivi con marcatura non radioattiva, ma quest'approccio si è rivelato piuttosto deludente: spesso l'impiego di marcatura con enzimi rende il dosaggio poco sensibile, mentre altre marcature possono produrre risultati poco attendibili, imprecisi e non sensibili. La ragione di questo non è sempre chiara, ma la marcatura dell'antigene con molecole d'enzima relativamente ingombranti (invece dei piccoli atomi usati nel RIA), può influire negativamente sul riconoscimento tra l'anticorpo e l'antigene marcato rispetto alle specie di antigene non marcato, causando problemi di dosaggio. Questa limitazione ha portato alla diminuzione dell'impiego della tecnica dell'immunodosaggio competitivo.

4.7.2 Dosaggi immunometrici

I dosaggi immunometrici si differenziano dagli immunodosaggi competitivi per vari aspetti, sebbene forniscano un'informazione quantitativa simile sulla concentrazione di antigene. Nel primo dosaggio immunometrico descritto, si consentiva a una quantità fissa di anticorpo marcato di reagire con una quantità variabile di antigene. L'anticorpo non legato era rimosso con lavaggi, poi si misurava il rimanente anticorpo marcato per determinare il contenuto di antigene (Fig. 4.21). Quest'approccio è oggi poco usato, ma l'idea di utilizzare un eccesso di anticorpo marcato (cioè un immunodosaggio con eccesso di anticorpo) invece di

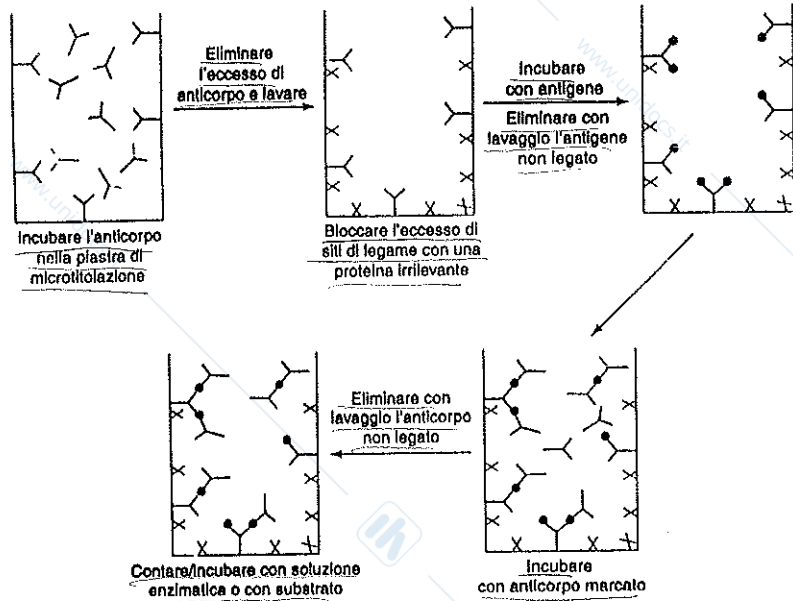


Figura 4.21 Rappresentazione schematica di un dosaggio immunometrico a due siti (IRMA o ELISA a due siti) per determinare il contenuto di antigeni. Questo particolare protocollo si svolge in piastre da microtitolazione a 96 pozzetti.

un eccesso di antigene marcato (immunodosaggio con eccesso di antigene, cioè immunodosaggio competitivo) presenta numerosi vantaggi e pochi svantaggi (vedi oltre).

Nei dosaggi immunometrici sviluppati più recentemente, si lascia reagire l'antigene con anticorpo insolubile o immobilizzato, ossia "catturato" rispetto alla soluzione; l'antigene legato viene poi rivelato con l'eccesso di un altro (in casi eccezionali lo stesso) anticorpo specifico per l'antigene. L'anticorpo catturato può essere immobilizzato mediante unione covalente a microsferi di agarosio, o mediante legame elettrostatico a sfere di plastica o di vetro, alla superficie di tubi di plastica o di piastre di microtitolazione (Fig. 4.22). Quest'ultima è la soluzione adottata più spesso; infatti sono disponibili piastre speciali trattate in modo da ottimizzare il legame con l'antigene. Alcuni metodi utilizzano immunoglobuline anti-Fc immobilizzate, per assicurare che l'anticorpo catturato venga immobilizzato nel corretto orientamento e quindi interagisca in modo ottimale con l'antigene.

L'anticorpo per la rivelazione può essere marcato direttamente o misurato indirettamente con reagenti anti-immunoglobuline marcati o con altri sistemi, per esempio mediante l'interazione avidina-biotina (4.5.5). Di solito i dosaggi immunometrici sono relativamente veloci da eseguire, possono rivelarsi molto sensibili e coprono una gamma più ampia di concentrazioni della sostanza analizzata, rispetto ai dosaggi competitivi. Tuttavia, richiedono maggiori quantità di anticorpo di questi ultimi e, di norma, sono necessari due anticorpi che ricono-

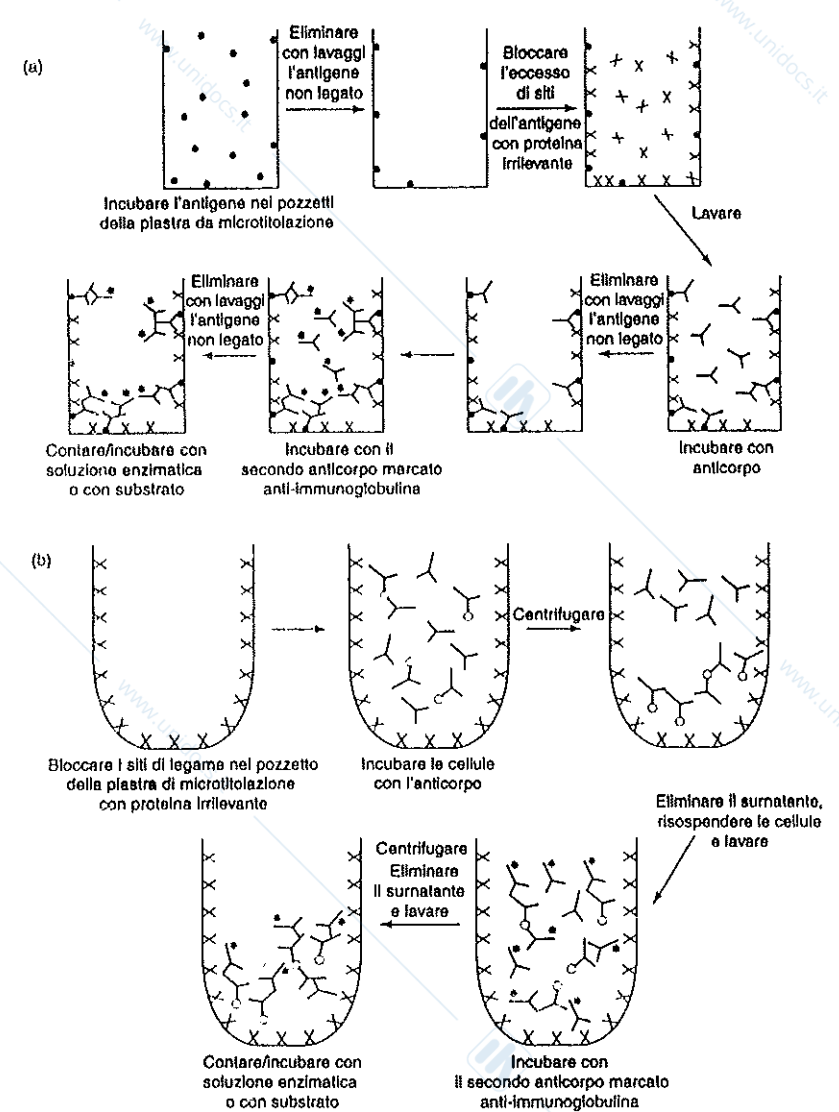


Figura 4.22 Rappresentazione schematica dell'immunodosaggio per legame in fase solida su piastra da microtitolazione: (a) per anticorpi diretti contro antigeni solubili; (b) per anticorpi diretti contro antigeni della superficie cellulare.

scono diversi determinanti sull'antigene. Alcuni protocolli di dosaggi immunometrici (soprattutto quelli eseguiti in piastre da microtitolazione; Fig. 4.21) possono essere automatizzati, quindi eseguiti e controllati da robot, consentendo l'analisi contemporanea di molti campioni.

Sono stati sviluppati dosaggi immunometrici, con anticorpi marcati radioattivamente, per una vasta serie di sostanze analizzate; i primi dosaggi, noti come dosaggi immunoradiometrici (IRMA, *ImmunoRadioMetric Assays*), erano del tipo sopra descritto. È stato messo a punto un numero ancora maggiore di dosaggi immunometrici mediante anticorpi marcati con enzimi (EIA o EIMA); sfortunatamente, questi ultimi sono spesso contrassegnati dalla sigla ELISA, che genera confusione con i dosaggi di immunobinding con enzimi (4.7.3). Nel tentativo di distinguerli dai "veri" ELISA, spesso prendono il nome di ELISA sandwich o ELISA a due siti. La maggior parte dei dosaggi immunometrici utilizza un substrato colorimetrico, misurato allo spettrofotometro, per determinare la concentrazione di antigene; tuttavia, i substrati fluorescenti possono essere utilizzati per alcuni enzimi (come la β -galattosidasi) poiché si suppone aumentino la sensibilità del dosaggio. Si stanno mettendo a punto nuovi sistemi di marcatura per i dosaggi immunometrici, alcuni dei quali sono descritti al paragrafo 4.7.4. Tutti i dosaggi immunometrici richiedono calibrazione con diluizioni di una soluzione standard della sostanza da analizzare a concentrazione nota (cfr. immunodosaggi competitivi). La necessità teorica di disporre di due anticorpi specifici per due diversi epitopi dell'antigene ha limitato l'applicazione di tali dosaggi, almeno finché non è stata messa a punto la tecnologia degli anticorpi monoclonali (4.2). Si possono usare anticorpi policlonali per i dosaggi immunometrici, ma, a meno che l'antigene non sia polimerico, questo approccio ha un'applicazione limitata, dovuta all'occupazione, in seguito alla cattura dell'anticorpo, dei siti di legame dell'anticorpo che sono riconosciuti dall'anticorpo usato per la rivelazione. I dosaggi immunometrici sono perfezionati dall'utilizzo di due anticorpi monoclonali che riconoscano diversi epitopi antigenici, in quanto eliminano l'impedimento sterico per il legame di entrambi gli anticorpi. La combinazione di anticorpi monoclonali (per la cattura) e anticorpi policlonali (per il riconoscimento) consente dosaggi immunologici sensibili e specifici. Per il successo dei dosaggi immunometrici sono fondamentali la selezione degli anticorpi più adatti e la produzione di preparazioni anticorpali di adeguata qualità.

4.7.3 Dosaggi mediante legame su fase solida (per la determinazione del contenuto di anticorpi)

I dosaggi di immunobinding sono dosaggi in fase solida che si eseguono con antigeni immobilizzati per determinare il contenuto di anticorpi di un campione; sono spesso considerati immunodosaggi, anche se il loro valore nell'accurata quantificazione della concentrazione di anticorpi è discutibile (quando è importante la precisione del risultato, è preferibile eseguire dosaggi immunometrici o di legame competitivo; 4.7.1 e 4.7.2). I dosaggi immunologici di legame, tuttavia, sono di facile esecuzione, veloci, economici e semplici, ideali per controllare il contenuto relativo di anticorpi del siero e di altri fluidi biologici, e soprattutto per analizzare il siero di animali immunizzati, il surnatante di colture di ibridomi, i fluidi ascitici e i campioni patologici. La soluzione contenente l'antigene è semplicemente incubata in un tubo di plastica o, più spesso, nei pozzetti di una piastra da microtitolazione in plastica, le

cui pareti vengono rivestite da una (piccola) quantità della proteina. Dopo aver lavato l'antigene o gli antigeni non legati, si mettono a incubare i campioni contenenti anticorpo, a concentrazione nota o ignota, nei tubi o nei pozzetti con pareti rivestite dall'antigene. L'anticorpo (se presente) si lega all'antigene o agli antigeni immobilizzati e, dopo lavaggio, può essere rivelato con anticorpi marcati anti-immunoglobuline o con proteine leganti anticorpi (Fig. 4.22). Queste analisi, che sfruttano anticorpi marcati o proteine che legano anticorpi, prendono il nome di dosaggi di legame con radioattivi su fase solida, anche se oggi la maggior parte dei dosaggi utilizza reagenti di rivelazione marcati con enzimi: in tal caso si parla di dosaggi ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) o, in alternativa, di dosaggi di legame con enzimi in fase solida. Sfortunatamente, anche i dosaggi immunometrici con enzimi spesso vengono denominati ELISA (4.7.2); per non generare confusione, per indicare la versione immunometrica si usa l'espressione "ELISA a due siti", mentre il dosaggio di legame è noto come ELISA a un sito. L'antigene viene semplicemente catturato sulla superficie del tubo o del pozzetto, con legame aspecifico, pertanto questi dosaggi a volte prendono il nome di dosaggi su piastre appiccicose o tecniche su piastre sporche (soprattutto quando si utilizza una soluzione non pura di antigene).

Una valutazione quantitativa è possibile attraverso il confronto con una soluzione standard a contenuto noto di anticorpo, anche se questa procedura è resa difficoltosa soprattutto dall'eterogeneità delle molecole di immunoglobulina presenti. È molto comune esprimere i risultati comparativi sotto forma di titolo derivato dalle curve dose-risposta, ricavate dall'analisi di diversi campioni. Di solito per calcolare il titolo si utilizzano i valori di mezza-titolazione, cioè la diluizione a cui si ottiene il 50% del massimo legame, ma questo richiede che il valore massimo della curva dose-risposta sia identico per tutti i campioni. L'utilizzo dei valori di titolo al limite inferiore, cioè la diluizione minima alla quale non si ha il segnale, non è affidabile e molto spesso si rivela non valido.

Occasionalmente si incontra una variante dei convenzionali dosaggi di immunobinding in fase solida, di solito nota come dosaggio *dot blot*. In questa tecnica, una piccola quantità di soluzione contenente antigene viene applicata su filtri di nitrocellulosa, essiccata e quindi incubata con campioni a contenuto ignoto di anticorpi. Ogni anticorpo specifico per l'antigene viene individuato attraverso le immunoglobuline o le proteine leganti anticorpi, marcate radioattivamente o con enzimi. I vantaggi di questo metodo sono costituiti dalla possibilità di concentrare l'antigene, mediante ripetute applicazioni in un singolo punto del filtro, e dal fatto che si possono incubare molti campioni di antigeni con un unico campione di anticorpo. Il principale svantaggio è che, nella pratica, è impossibile quantificare validamente il risultato. Il nome della tecnica è fuorviante, in quanto in realtà non si eseguono trasferimenti (*blotting*) in nessuna fase del dosaggio; probabilmente, la dicitura si riferisce alle molte somiglianze tecniche con l'immunoblotting (4.6); un'espressione più adeguata potrebbe essere dosaggio *dot* di immunobinding, che però non è usata spesso.

4.7.4 Immunodosaggi amplificati

La richiesta di dosaggi immunologici sempre più sensibili ha portato allo sviluppo di sistemi di amplificazione del segnale derivante dal dosaggio (cfr. immunoblotting; 4.6). La maggior parte di questi sistemi si basa sui protocolli di dosaggi immunoenzimatici

* ANTICORPI MARCATI RADIOATTIVAMENTE
 ① DOSAGGI IMMUNORADIOMETRICI IRMA
 ② DOSAGGI IMMUNOMETRICI LEGAME CON ENZIMI EIA (ELISA A DUE SITI)
 ③ DOSAGGI IMMUNOMETRICI LEGAME CON ENZIMI IN FASE SOLIDA ELISA (ELISA A UN SITO)
 L'antigene viene catturato sulle superficie di un tubo o pozzetto (dosaggi su piastre appiccicose)

(ELISA a due siti) e si può eseguire in piastre da microtitolazione. Sono stati messi a punto molti sistemi di amplificazione diversi, ma quello più comunemente utilizzato prevede enzimi coniugati, aggiunti in blocco a un classico dosaggio immunometrico a due siti basato sulla fosfatasi alcalina. In questo caso, la fosfatasi alcalina defosforila il NADP^+ producendo NAD^+ . Quest'ultimo costituisce il reagente limitante di un ciclo catalizzato da una alcol deidrogenasi, che riduce il NAD^+ a NADH , il quale a sua volta produce formazan colorato mediante riduzione di leucoformazan ossidato (Fig. 4.23). L'ulteriore ciclo catalizzato dagli enzimi amplifica considerevolmente il segnale originale rispetto a quello prodotto dalla sola coniugazione con fosfatasi alcalina. Un altro diffuso sistema di amplificazione, noto come sistema di amplificazione ELISA (o ELAST; Fig. 4.24), utilizza un comune dosaggio immunometrico, basato su perossidasi, ma prevede l'incorporazione come reagente di tiramina biotinilata, la quale, in seguito a ossidazione (da parte della perossidasi coniugata), lega covalentemente residui di tirosina o triptofano presenti nell'eccesso di proteine bloccanti utilizzate per ricoprire i siti non occupati da antigene, sulla superficie dei pozzetti della piastra di microtitolazione. La biotina immobilizzata viene quindi rivelata con streptavidina marcata (4.5.5). Il sistema di amplificazione produce un numero di molecole di biotina molto più elevato, rispetto al semplice impiego di anticorpi marcati con biotina.

I sistemi di amplificazione producono quasi sempre un segnale aumentato, che però spesso influenza sia il "reale" risultato dato dalla sostanza analizzata, sia il segnale di fondo del dosaggio. Nella peggiore delle ipotesi, l'amplificazione del segnale si limita ad aumentare il segnale totale senza migliorare la sensibilità; a meno che non si proceda con estrema cura, l'utilizzo dei sistemi di amplificazione può rendere i dosaggi meno attendibili, aumentando la probabilità di artefatti.

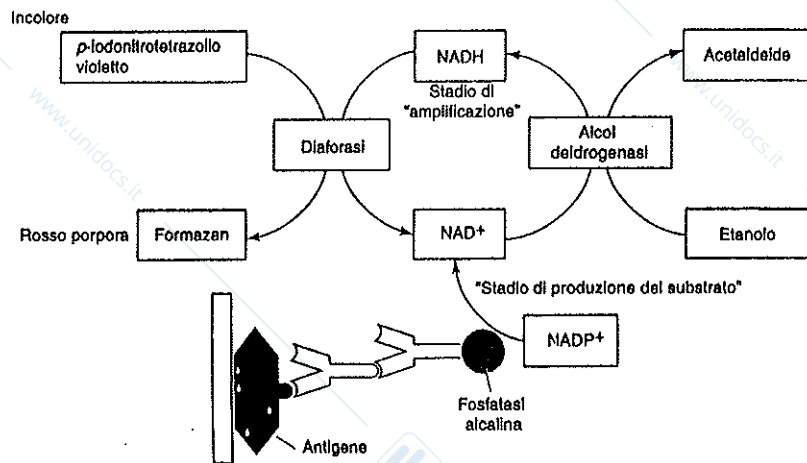


Figura 4.23 Sistema di amplificazione del substrato per la rivelazione con fosfatasi alcalina.

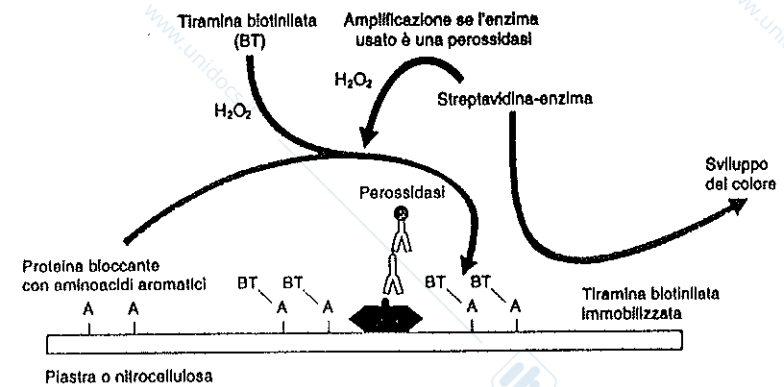


Figura 4.24 Principi del sistema di amplificazione ELAST.

4.7.5 Dosaggi immunologici mediante peptidi (mappatura del peptide o dell'epitopo)

I peptidi sintetici possono sostituire gli antigeni in dosaggi immunologici di legame su fase solida; questo consente di individuare gli anticorpi con specificità nota per gli epitopi e di determinare la specificità antigenica di nuovi anticorpi (mappatura di peptidi o mappatura di epitopi). Nella marcatura di epitopi, si costruisce una serie di sequenze peptidiche sovrapposte, che copre l'intera struttura primaria dell'antigene, e la si utilizza per rivestire in sequenza i pozzetti di una piastra di microtitolazione. L'incubazione con anticorpi marcati o con anticorpi successivamente riconosciuti da anti-immunoglobuline marcate, permette l'individuazione dei peptidi riconosciuti dall'anticorpo e quindi anche l'identificazione dell'epitopo, o degli epitopi, riconosciuti dall'anticorpo o dagli anticorpi. Questo approccio è particolarmente utile per gli anticorpi monoclonali. Di solito si usano peptidi lunghi 10-18 aminoacidi, con una sovrapposizione di circa 5-8 residui. Questa procedura è semplice e molto utile, ma limitata all'individuazione di determinanti antigenici "lineari"; inoltre, va eseguita accuratamente per essere certi che tutti i peptidi si leghino in modo efficiente alla superficie dei pozzetti della piastra da microtitolazione. Si può migliorare il legame dei peptidi rivestendo i pozzetti con polilisina (che produce una superficie a carica positiva relativamente forte), oppure sintetizzando peptidi con un residuo finale di biotina, catturato poi da piastre rivestite da streptavidina (questo inoltre ottimizza l'orientamento per il legame). È possibile anche sintetizzare peptidi su "spilli" formati nei pozzetti di speciali piastre da utilizzare poi per la mappatura (procedura pepscan). Le teste degli "spilli" sono chimicamente attivate per assicurare il legame dei residui aminoacidici attivati, aggiunti in sequenza a costruire la sequenza peptidica richiesta.

4.7.6 Dosaggi immunologici mediante fluorescenza e fotoluminescenza

Nel tentativo di aumentare la sensibilità dei dosaggi e di renderli più agevoli, si sono sviluppati molteplici adattamenti dei dosaggi competitivi di base, soprattutto di quelli immuno-

metrici, che prevedono una rivelazione in fluorescenza o luminescenza. Nei casi più semplici, substrati fluorescenti o luminescenti sostituiscono quelli colorimetrici normalmente utilizzati nei dosaggi ELISA a due siti. Essi prendono il nome rispettivamente di EIA fluorimetrici o dosaggi immunoenzimatici in fluorescenza (ELFIA, *Enzyme-Linked Fluorescence ImmunoAssay*) e immunodosaggi in luminescenza (LIA, *LuminoImmunoAssay*) o dosaggi immunoenzimatici in chemiluminescenza (ECLA, *Enzyme-Linked Chemiluminescence Assay*). Tuttavia, alcuni dosaggi si basano su metodi talmente differenti da dover essere considerati separatamente (vedi oltre).

4.7.7 Dosaggio immunologico per aumento della fluorescenza ritardata dei lantanidi

La maggior parte degli immunodosaggi basati sull'aumento della fluorescenza ritardata dei lantanidi (DELFLIA, *Delayed Enhanced Lanthanide Fluorescence Immunoassay*) utilizza il principio dei comuni dosaggi immunometrici a due siti, e viene eseguita in piastre da microtitolazione. L'anticorpo di rivelazione (Fig. 4.25) è marcato direttamente con un lantanide (metallo di transizione 4f - di solito nei DELFLIA si utilizza europio) accoppiato non covalentemente tramite un agente alchilante, come anidride dietiltriainopenta-acetica (DTPA, *Diethylene-TriaminePenta-acetic Anhydride*) o anidride dietiltriainotetra-acetica (DTTA, *Diethylene-TriamineTetra-acetic Anhydride*). Dopo l'esecuzione del dosaggio immunometrico, il lantanide viene separato dall'anticorpo mediante abbassamento del pH a circa 3.2 (a questo valore di pH i chelati sono instabili) e successivamente il lantanide libero viene catturato con un dichetone solubile. Quest'ultimo è complessato in micelle, per impedire il successivo *quenching* della fluorescenza (cosiddetta fase di amplificazione). I lantanidi chelati ad anticorpi non sono fluorescenti, mentre sono tali gli ioni lantanidi catturati, legati in micelle, che quindi sono rilevabili. Il picco d'emissione di fluorescenza dei lantanidi complessati in micelle è relativamente lento, quindi è possibile misurare il ritardo dell'emissione luminosa dopo aggiunta di reagenti

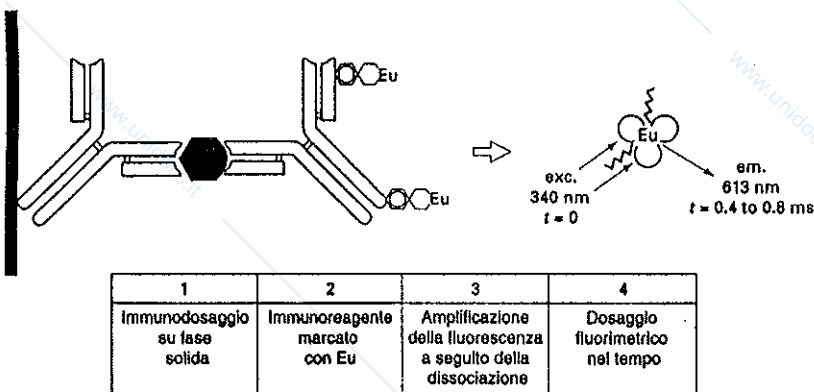


Figura 4.25 Principio di amplificazione della fluorescenza a seguito della dissociazione, esemplificato in un dosaggio sandwich a due siti. exc., eccitazione; em., emissione.

amplificanti. In questo modo, gli artefatti dovuti ad autofluorescenza delle componenti del campione sono distinguibili dal "reale" segnale ritardato del lantanide. Per questo motivo, questi metodi sono spesso chiamati immunodosaggi fluorimetrici nel tempo (TRIFMA, *Time-Resolved ImmunoFluorimetric Assay*). In questi dosaggi, la fluorescenza è proporzionale alla quantità di antigene presente nei campioni. I DELFLIA possono essere sensibili, accurati, robusti e coprono una gamma relativamente ampia di concentrazioni delle sostanze da analizzare; inoltre possono essere automatizzati per consentire l'analisi contemporanea di molti campioni.

4.7.8 Immunodosaggio mediante substrati fluorescenti omogenei

Gli immunodosaggi mediante substrati fluorescenti (SLFIA, *Substrate-Labelled Fluorescence ImmunoAssay*) utilizzano principi simili a quelli dei dosaggi competitivi, ma non richiedono la separazione dell'antigene libero da quello legato. Essi richiedono la sintesi di antigeni coniugati contenenti una struttura chimica non fluorescente, ma in grado di dar luogo a un composto intensamente fluorescente se tagliata con un enzima; inoltre, è necessario un anticorpo che leghi l'antigene coniugato, in modo da impedire all'enzima di tagliare e liberare il fluorocromo. Nei dosaggi SLFIA, i campioni contenenti antigene in quantità note e ignote sono incubati con una quantità costante di antigene coniugato, in presenza di una concentrazione limitante di anticorpo. In tali condizioni, l'antigene dei campioni compete con l'antigene coniugato per l'anticorpo. Una volta raggiunto l'equilibrio, si aggiunge l'enzima per liberare il fluorocromo dall'antigene coniugato che non lega l'anticorpo. La fluorescenza misurata è quindi proporzionale alla quantità dell'antigene presente nel campione. Spesso, per le tecniche SLFIA, si utilizza una combinazione dell'enzima β -galattosidasi e di composti coniugati preparati accoppiando l'antigene a un residuo galattosil 4-metilumbelliferil. La β -galattosidasi idrolizza il coniugato liberando 4-metilumbelliferone, facilmente misurabile in fluorimetria. Nell'applicazione generale di questo tipo di dosaggio è problematico l'ottenimento dell'anticorpo appropriato, cioè un anticorpo che effettivamente inibisca la reazione catalizzata dall'enzima. In genere è possibile solo per sostanze relativamente piccole, per esempio morfina e altri oppiacei.

4.8 Immunoisto/citochimica

Al fine di comprendere la struttura, l'organizzazione e la funzione cellulare, nonché lo sviluppo e il differenziamento dei tessuti normali e patologici, è spesso necessario essere in grado di determinare la distribuzione *in situ* dell'antigene. Le tecniche di immunoistochemica e immunocitochimica sfruttano l'interazione specifica di un anticorpo con il suo antigene per localizzare o determinare la distribuzione di un antigene *in situ*, rispettivamente in tessuti e cellule. In alternativa, si possono applicare queste tecniche a tessuti o cellule che contengano un particolare antigene, per esaminare la specificità degli anticorpi o degli antisieri. Il principio dell'immunoisto/citochimica è analogo all'immunobinding in fase solida (4.7.3) e all'immunoblotting (4.6), con la differenza che l'anticorpo è incubato su sezioni sottili di tessuto solido montate su vetrino, oppure su preparazioni di cellule contenenti l'antigene, invece che su antigeni immobilizzati su piastre da microtitolazione o membrane di nitrocellulosa. Nell'immunoisto/citochimica, l'anticorpo (o l'anticorpo anti-immunoglobuline; 4.5.1) dev'essere coniugato con un fluorocromo o un enzima che dia un intenso segnale, in modo da consen-

tire la visualizzazione quando le sezioni o le cellule vengono esaminate con microscopia immunoenzimatica. La localizzazione del segnale rivela la posizione dell'interazione anticorpo-antigene, per esempio all'interno di particolari tipi cellulari o organuli cellulari (la Fig. 4.26 ne riporta un esempio).

Tutte le metodiche di immunoisto/citochimica necessitano di stringenti anticorpi di controllo positivi e negativi, per un confronto con l'anticorpo in esame al fine di accertare la specificità dell'immunocolorazione. È pratica comune indicare come immunocolorazione il legame di anticorpi marcati a specifici antigeni tissutali o cellulari, ma questo termine non deve essere confuso con la colorazione differenziale dei costituenti cellulari mediante le colorazioni chimiche di routine, come quelle con ematossilina ed eosina per l'istologia e la patologia.

4.8.1 Microscopia immunoenzimatica

Il principale vantaggio della marcatura con enzimi nelle tecniche di immunoisto/citochimica (principalmente perossidasi da rafano [HRP, HorseRadish Peroxidase] o fosfatasi alcalina; 4.5.4) consiste nella possibilità di usare un semplice microscopio ottico per visualizzare le sezioni o le cellule, mentre l'impiego di coloranti di contrasto come l'ematossilina (che colora i nuclei in blu) contribuisce a identificarne la morfologia. I principali svantaggi sono legati al-

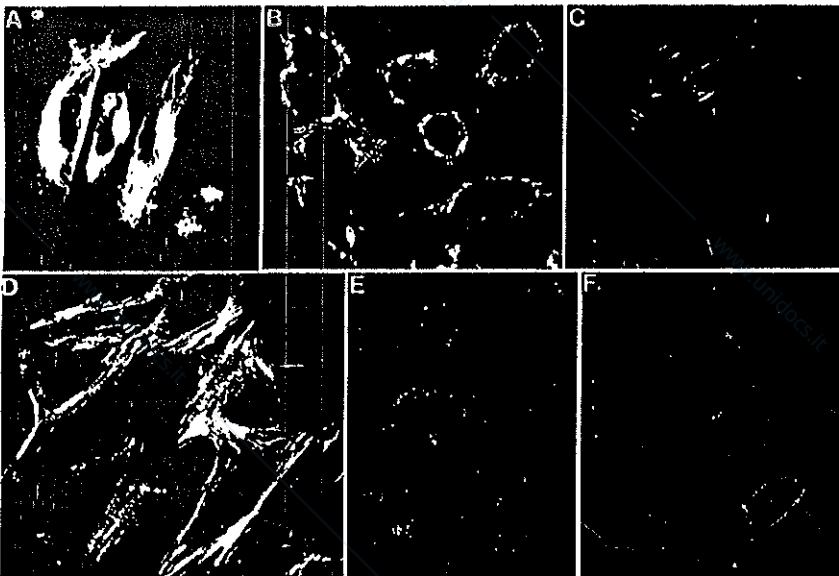


Figura 4.26 Microfotografie di immunofluorescenza che mostrano la colorazione degli organuli cellulari: (A) filamenti intermedi; (B) mitocondri; (C) microspike; (D) fibre allungate; (E) granuli; (F) componenti citoplasmatiche. Si sono incubati monostrati di una linea cellulare di glioma di ratto C6 con anticorpi monoclonali umani IgM, e poi con IgM anti-anticorpi umani marcati con fluoresceina.

Coloranti di contrasto → morfologia (EMATOSSILINA)

la presenza, nei tessuti, di enzimi endogeni (che possono dare un'intensa colorazione) e dai passaggi aggiuntivi richiesti per la reazione enzimatica.

4.8.2 La tecnica perossidasi-antiperossidasi

La tecnica perossidasi-antiperossidasi (PAP) è una modificazione della metodica enzimatica indiretta di immunoisto/citochimica per l'amplificazione del segnale (Fig. 4.27). In questo metodo, immunoglobuline non marcate anti-anticorpi di coniglio o di topo formano un ponte tra l'anticorpo primario, rispettivamente di coniglio o di topo, e un complesso perossidasi-(di coniglio o di topo)-antiperossidasi. Sono inoltre disponibili complessi fosfatasi alcalina-antifosfatasi alcalina. Un vantaggio di questa metodica è che durante l'accoppiamento

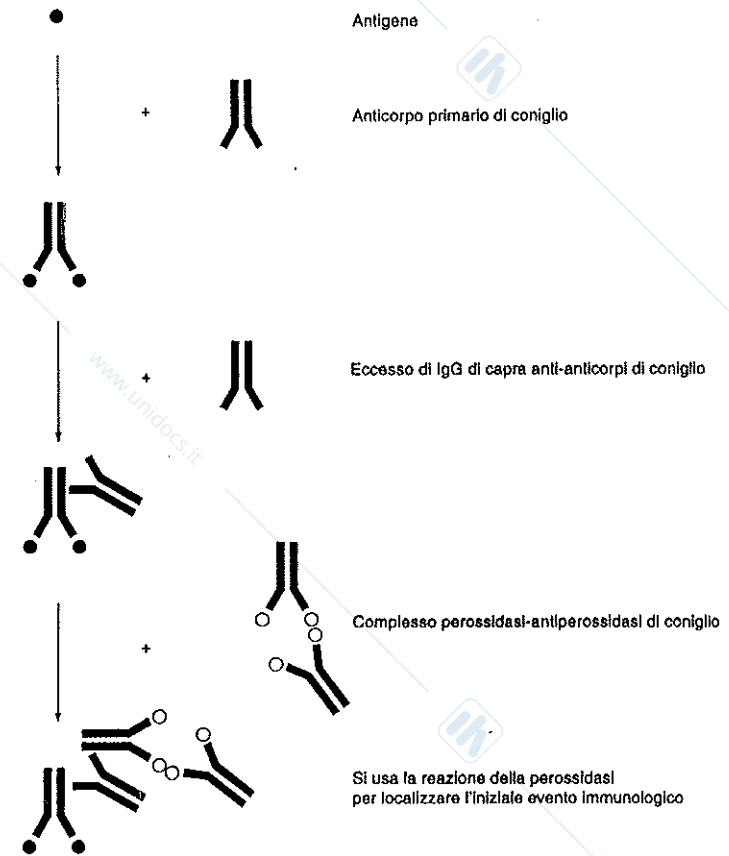


Figura 4.27 Rappresentazione schematica della tecnica perossidasi-antiperossidasi. ● antigene; ○ perossidasi.

250 può verificarsi distruzione di anticorpi e/o enzimi. Sul mercato si trovano anche sistemi di amplificazione che sfruttano le reazioni anti-immunoglobuline o biotin-chj molte volte più sensibili delle procedure indirette standard.

4.8.3 Tecniche di immunofluorescenza

Ab-fluorescenza

L'immunoistochimica è stata originariamente sviluppata con anticorpi marcati con fluorocromi (4.5.3). Il loro uso è notevolmente aumentato negli ultimi anni grazie alla diffusione di tecniche di citofluorimetria a flusso, che consentono l'analisi di singole cellule in sospensione, in base all'espressione di antigeni di superficie (4.8.5), e grazie all'avvento del microscopio confocale, in cui una sorgente di luce laser sostituisce la normale fonte luminosa, consentendo l'analisi di immagini a diverse profondità attraverso la sezione tissutale o la cellula, per costruire un'immagine tridimensionale. In immunoisto/citochimica è possibile un'applicazione peculiare degli anticorpi marcati con fluorocromi in cui, poiché i diversi fluorocromi emettono luce ultravioletta a differenti lunghezze d'onda, l'utilizzo di filtri appropriati sul microscopio a fluorescenza consente di analizzare la stessa sezione tissutale o il medesimo campione di cellule, colorati con due, tre o anche quattro anticorpi diversi, ognuno coniugato a un diverso fluorocromo. Queste metodiche di doppia o tripla colorazione richiedono, a volte, l'utilizzo di anticorpi primari coniugati direttamente, in quanto, per esempio, anticorpi di coniglio anti-immunoglobuline di topo coniugati con fluoresceina, non si distinguono da anticorpi primari monoclonali di topo con diversa specificità.

La scelta del fluorocromo dipende dalla sorgente luminosa, dal sistema di rilevazione disponibile e dalle preferenze personali; tra le sorgenti luminose vi sono lampade al tungsteno, lampade alogene al quarzo o ad arco di mercurio per i microscopi a fluorescenza, laser a ione argo o a cripton-argo per la citometria a flusso.

L'utilizzo di anticorpi marcati con fluorocromi è rapido e semplice, inoltre offre una buona sensibilità. Il principale svantaggio è la necessità di un microscopio dotato di ottica in fluorescenza; inoltre la fluorescenza, soprattutto quella della fluoresceina, si affievolisce durante osservazioni prolungate dello stesso campo, a meno che, durante il montaggio, non si aggiunga un agente riducente, come 1,4-biciclo-2,2,2-ottano. Si pensa che questi agenti impediscano una reazione distruttiva della fluoresceina al suo stato eccitato con la proteina. Può essere problematica l'autofluorescenza, cioè la fluorescenza intrinseca, di alcune componenti tissutali.

4.8.4 Capping

Un'importante caratteristica dell'immunocolorazione di cellule vitali, in particolare i linfociti, è l'aggregazione degli antigeni di superficie dovuta ai legami crociati da parte degli anticorpi intatti. Questi aggregati formano infine un cappuccio (*cap*) a un polo della cellula, che successivamente viene perso o assunto per endocitosi. Il capping, che può essere visualizzato con anticorpi marcati con fluorocromi, fornisce informazioni sull'associazione di molecole con differenti marcatori antigenici, se si fa ricorso a una doppia o tripla marcatura immunofluorescente. Si può impedire la formazione di questo aggregato eseguendo l'immunocolorazione a 4 °C in presenza di sodio azide, che impedisce la modulazione delle molecole di superficie, o utilizzando frammenti Fab monovalenti, allo scopo di studiare l'iniziale legame degli anticorpi agli antigeni di superficie.

4.8.5 Citometria a flusso

Uno svantaggio della valutazione della colorazione immunocitochimica con la microscopia convenzionale è la difficoltà di misurare l'intensità dell'immunocolorazione. Sebbene sia possibile determinare la porzione di cellule colorate in una popolazione, eseguendo conteggio manuale delle cellule, l'accuratezza della valutazione dipende dal numero totale di cellule contate e dalla quantità di cellule positive.

Questi limiti si possono superare mediante analisi in citofluorimetria a flusso. Con questa tecnica, le cellule marcate con anticorpi coniugati a fluorocromi in sospensione sono introdotte in un getto liquido e passate individualmente attraverso un raggio laser. Ogni cellula, passando attraverso il laser, emette un lampo di fluorescenza e di luce dispersa. I segnali sono raccolti dal citofluorimetro e convertiti in modo da fornire informazioni quantitative sull'intensità di fluorescenza e sulle proprietà di dispersione della luce di ogni cellula. La luce dispersa frontalmente è correlata alle dimensioni della cellula; la quantità di luce dispersa lateralmente è proporzionale alla granulosità della cellula (presenza di granuli intracellulari, organuli e/o nucleo pronunciato). Nella figura 4.28 sono riportati alcuni esempi di dati ottenuti in citofluorimetria. In questo modo, si possono analizzare velocemente varie migliaia di cellule, allo scopo di determinare, per esempio, la proporzione di cellule immunocolorate o l'intensità della fluorescenza. In citometria a flusso è anche possibile selezionare le cellule in base ai parametri specificati, come l'intensità di fluorescenza e la dimensione cellulare (di solito, le cellule si mantengono vitali dopo immunocolorazione con anticorpi marcati con fluorocromi). Sono disponibili molti fluorocromi per l'analisi in citometria a flusso, che consentono di analizzare simultaneamente vari colori, purché gli spettri di emissione non si sovrappongano. Questo consente l'utilizzo contemporaneo di molti anticorpi, coniugati con differenti fluorocromi. In citofluorimetria a flusso si utilizzano spesso anticorpi monoclonali coniugati direttamente, per consentire la marcatura simultanea con molti fluorocromi (4.8.3 e 4.5.3). Inoltre, gli anticorpi anti-immunoglobuline coniugati, impiegati nelle tecniche immunocitochimiche indirette, possono legarsi direttamente ai linfociti che esprimono immunoglobuline in superficie, oppure indurre l'agglutinazione di cellule rivestite di anticorpi primari. (Le IgG sono divalenti, perciò possono legare due molecole di anticorpo primario, ognuna legata a cellule separate, avvicinando quindi le cellule.) È disponibile in commercio un'ampia gamma di anticorpi monoclonali coniugati direttamente, specifici per diversi marcatori di superficie, come la serie di antigeni CD (gruppo di differenziazione), caratteristici di una particolare popolazione di cellule del sangue. Ciò consente di analizzare gruppi e sottogruppi di cellule coinvolti nei sistemi biologici, per esempio le popolazioni di linfociti T e B. Mentre si procede all'immunocolorazione di antigeni di superficie di cellule vitali per analisi in citofluorimetria a flusso, potrebbe essere necessario eseguire specifici passaggi per impedire il legame di anticorpi non specifici ai recettori Fc presenti, per esempio, sui leucociti. Infatti, questi siti si possono bloccare facendo ricorso a siero non immune contenente alti livelli di immunoglobulina, o a frammenti F(ab')₂ di anticorpi.

4.8.6 Microscopia immunoelettronica

I dettagli subcellulari non individuabili dalla microscopia convenzionale possono essere risolti dalla microscopia elettronica, poiché gli elettroni hanno una lunghezza d'onda più breve della luce bianca o ultravioletta. In immunoelettromicroscopia si utilizzano anticorpi marcati con reagenti elettrodensi, come oro e ferritina (proteina contenente ferro), o con HRP, che

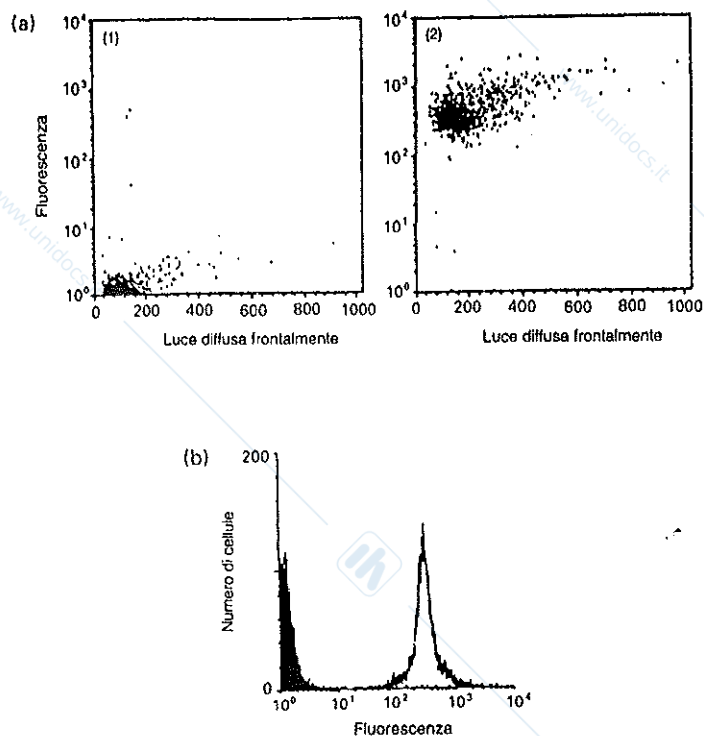


Figura 4.28 Esempi dei risultati ottenuti in citometria a flusso. (a) Grafici a punti di eritrociti (globuli rossi) colorati con anticorpo monoclonale di topo antiemoglobina, marcato con fluorescenza (2), o con anticorpo monoclonale di topo irrilevante, marcato con fluorescenza (1). Ogni punto rappresenta un eritrocita. L'intensità della fluorescenza è riportata sull'asse delle ordinate, la luce dispersa frontalmente (cioè la dimensione) sull'asse delle ascisse. Gli eritrociti non sono colorati con l'anticorpo irrilevante (1), ma quasi tutte le cellule sono colorate con l'anticorpo antiemoglobina (2). (b) Gli stessi dati sono mostrati in un istogramma, dove il numero di cellule è sull'asse delle ordinate e l'intensità di fluorescenza sull'asse delle ascisse.

produce una sostanza elettrodensa in presenza dell'appropriato substrato, per colorare con essi sezioni ultrasottili di tessuti o di cellule.

4.9 Affinità e avidità

La determinazione dell'affinità di un anticorpo può essere importante per predire e/o spiegare le sue caratteristiche immunochimiche. L'affinità si definisce come la costante di equilibrio quando "un anticorpo monovalente reagisce con (lega) un antigene monovalente, ossia un determinante antigenico". Di solito gli anticorpi sono divalenti o multivalenti e gli antigeni hanno più di un determinante antigenico, perciò questa situazione è di raro riscontro. Di norma si usa il termi-

ne "avidità" per descrivere la costante di equilibrio applicabile alle interazioni totali tra anticorpo e antigene, compresa la componente di affinità tra più fattori additivi dovuti alla multivalenza del legame e ad altre considerazioni. Talvolta, al posto dei termini "affinità" e "avidità" si usano rispettivamente le espressioni "affinità intrinseca" e "affinità funzionale", sicuramente più descrittive.

4.9.1 Misurazione di affinità e avidità

L'affinità di un anticorpo monovalente per il suo epitopo può essere espressa matematicamente come la costante di associazione all'equilibrio, con la seguente formula:

$$K_a = \frac{[AgAb]}{[Ag][Ab]}$$

dove K_a è la costante di associazione all'equilibrio, $[Ag]$ è la concentrazione di antigene, $[Ab]$ è la concentrazione di anticorpo e $[AgAb]$ è la concentrazione del complesso antigene-anticorpo.

In pratica, è necessario che tutte le componenti siano assolutamente pure; inoltre, la formula si riferisce all'equilibrio in soluzione omogenea. Queste condizioni si riscontrano raramente nella maggior parte delle tecniche immunochimiche applicate alle metodiche biologiche. Tuttavia, il calcolo dell'affinità relativa degli anticorpi può essere utile per predire il loro uso nelle tecniche immunochimiche (cap. 8, 8.2).

4.10 Utilizzo immunochimico della risonanza plasmatica superficiale

La risonanza plasmatica superficiale (cap. 8, 8.2.3) utilizza le proprietà ottiche sulla superficie di un "chip" di vetro, rivestito di uno strato sottile di oro, per studiare il fenomeno di legame. I principi fisici del metodo sono i seguenti. Un fascio di luce polarizzata si riflette all'interno del chip (montato su un prisma di vetro). L'angolo di riflessione cambia se si lega del materiale sulla superficie del chip; l'alterazione di tale angolo è proporzionale alla massa di sostanza legata sulla superficie del chip. Sono disponibili in commercio strumenti per applicare la tecnologia di risonanza plasmatica superficiale all'immunochimica: il sistema di biosensori Biacore™, probabilmente il più adatto per un utilizzo generale in campo immunochimico, può essere programmato per molte operazioni diverse ed è automatizzato. Con questo sistema, il chip è rivestito da una matrice al destrano, alla quale si possono accoppiare chimicamente, e quindi immobilizzare, l'antigene o l'anticorpo. I campioni da analizzare per l'antigene (se l'anticorpo è stato immobilizzato) o l'anticorpo (se a essere immobilizzato è stato l'antigene) possono così scorrere sul chip e il legame viene continuamente rilevato misurando l'alterazione dell'angolo di riflessione della luce incidente sul lato a prisma del chip. Le misure sono direttamente proporzionali alla massa di sostanza legata e possono essere usate per confrontare il contenuto di antigene, o anticorpo, dei campioni e per calcolare i parametri cinetici relativi all'interazione antigene-anticorpo, per esempio le costanti di affinità di associazione e di dissociazione.

La risonanza plasmatica superficiale è una procedura rapida (le misurazioni si effettuano in pochi minuti), che non richiede la marcatura degli anticorpi o degli antigeni e neppure l'uso di reagenti anti-immunoglobuline; inoltre, può prestarsi a varie applicazioni. Di solito non è particolarmente sensibile, per esempio rispetto agli immunodosaggi, ma può essere utilizzata per individuare interazioni a bassissima affinità.

4.11 Parole chiave

affinità	dosaggio immunofluorimetrico nel tempo	immunogeno
anticorpi chimerici monoclonali	dosaggio radioimmunologico	immunoglobulina
anticorpi umanizzati	epitopo	immunostochimica
anticorpo	Fab	immunoprecipitazione
antigene	Fc	iperimmune
aptene	frammento anticorpale a singola catena	mappatura di epitopi
avidità	ibridoma	microscopia immunoenzimatica
capping	immunità acquisita	plasmacellula
chemiluminescenza amplificata	immunità innata	regione costante
citometria a flusso	immunoblotting	regione ipervariabile
coniugato	immunocitochimica	regione variabile
cromatografia d'immunoaffinità	immunodiffusione radiale semplice	risposta policlonale
doppia diffusione	immunodominante	sensibilità
dosaggi di legame competitivi	immunodosaggio con substrato fluorescente	specificità
dosaggi immunoenzimatici	immunoelettroforesi	tecniche di citofluorimetria a flusso
dosaggi immunologici		
dosaggi immunologici di legame		
dosaggio ELISA		

4.12 Problemi

DOMANDA 1

Si calcola la concentrazione di antigene mediante diffusione radiale semplice; i diametri degli anelli di precipitazione dell'antigene per la calibrazione a tre diverse concentrazioni sono:

Concentrazione ($\mu\text{g cm}^{-3}$)	Diametro dell'anello (mm)	Quadrato del diametro dell'anello (mm^2)
10	4	16
60	7	49
100	8.7	76

Usare la carta millimetrata per esprimere in un grafico la concentrazione del composto per la calibrazione, contro il quadrato del diametro dell'anello in modo da costruire la curva di calibrazione. Il diametro dell'anello di un campione di concentrazione antigenica ignota è 6 mm. Usando il grafico di calibrazione, determinare la concentrazione antigenica nell'antigene sconosciuto.

RISPOSTA

40 $\mu\text{g cm}^{-3}$.

4.13 Letture consigliate

HERMANSON G.T. *Bioconjugate Techniques*. Academic Press Inc., London, New York 1996.
Una relazione molto esauriente e dettagliata di quasi tutte le procedure per coniugare la marcatura a molecole biologiche; comprende un numero elevato di metodi per la produzione di molecole coniugate utilizzate nelle tecniche immunochimiche.

HERMANSON G.T., KRISHNA MALLIA A., SMITH P.K. *Immobilised Affinity Ligand Techniques*. Academic Press Inc., London, New York 1992.

Una raccolta completa delle procedure di cromatografia di affinità, comprendente i metodi di affinità immunologica; sono trattate numerose procedure per l'isolamento di anticorpi ecc.

HERZENBERG L.A., WEIR D.M., BLACKWELL C. (Eds) *Weir's Handbook of Experimental Immunology*, 5^a ed. Blackwell Science, Oxford 1997.

Testo dettagliato in quattro volumi che descrive la maggior parte dei metodi immunologici; ottimo per le basi teoriche delle tecniche, contiene inoltre molti dettagli sperimentali. Il volume I tratta specificamente l'immunochimica e l'immunologia molecolare.

JOHNSTONE A.P., THORPE R. *Immunochemistry in Practice*, 3^a ed. Blackwell Science, Oxford 1996.

Contiene dettagliati protocolli di molte tecniche immunochimiche oltre a un riassunto delle loro basi scientifiche.

JOHNSTONE A.P., TURNER M.W. (Eds) *Immunochemistry. A Practical Approach*. IRL Press, Oxford 1997.

Contiene capitoli dedicati a molte procedure immunochimiche.

KEMENY D.M., CHALLACOMBE S.J. (Eds) *ELISA and Other Solid Phase Immunoassays*. John Wiley and Sons, Chichester 1988.

Volume dedicato agli aspetti fondamentali degli immunodosaggi con enzimi coniugati.

KERR M.A., THORPE R. (Eds) *Immunochemistry Labfax*. Bios Scientific, Oxford 1994.

Contiene molte informazioni immunochimiche su immunoglobuline, reagenti e altre sostanze utilizzate nelle tecniche immunochimiche.

LACHMANN P.J., PETERS D.K., ROSEN F.S., WALPORT M.J. (Eds) *Clinical Aspects Of Immunology*, 5^a ed. Blackwell Science, Oxford 1993.

Un ampio lavoro in tre volumi che descrive la maggior parte degli aspetti dell'immunologia clinica e le basi teoriche dell'immunologia.

ROFFT I.M. *Essential Immunology*, 4^a ed. Blackwell Science, Oxford 1998 (tr. it. *Compendio di immunologia*. Idelson, Napoli 1986).

Un ottimo libro di testo sull'immunologia.