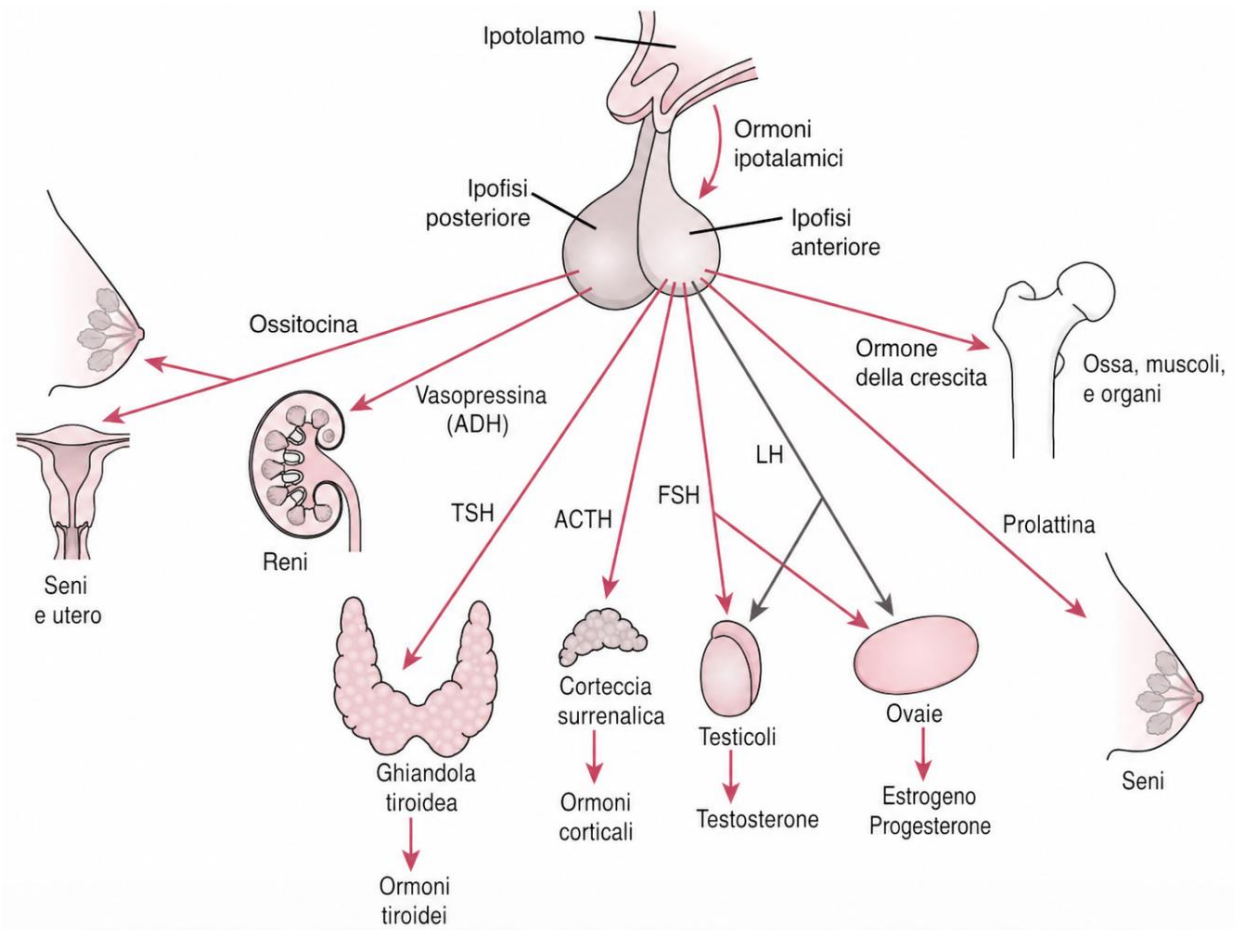


Attività esercitazionale n°1

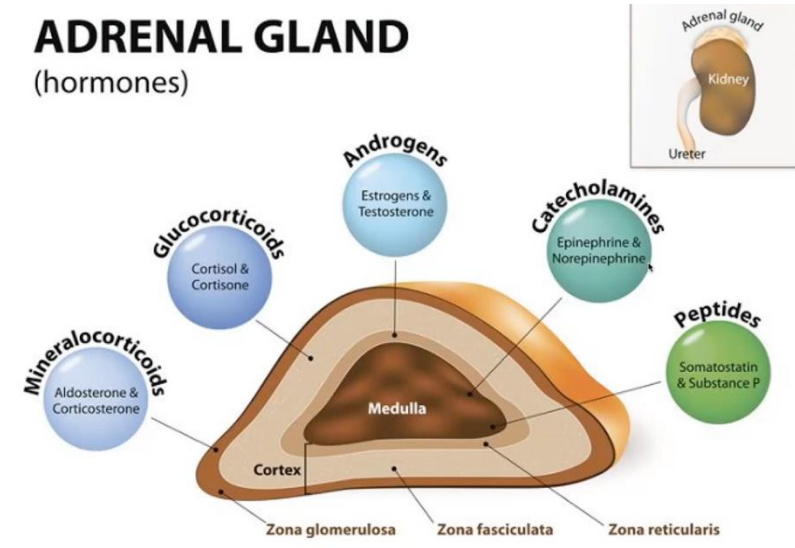
Dosaggio del cortisolo da saliva

ELISA Competitivo

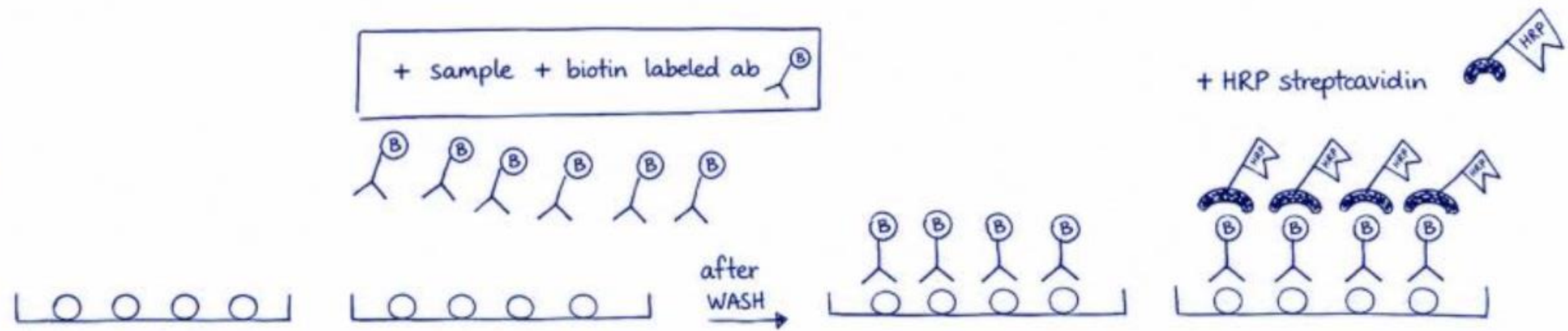
Enzyme-Linked Immunosorbent Assay.



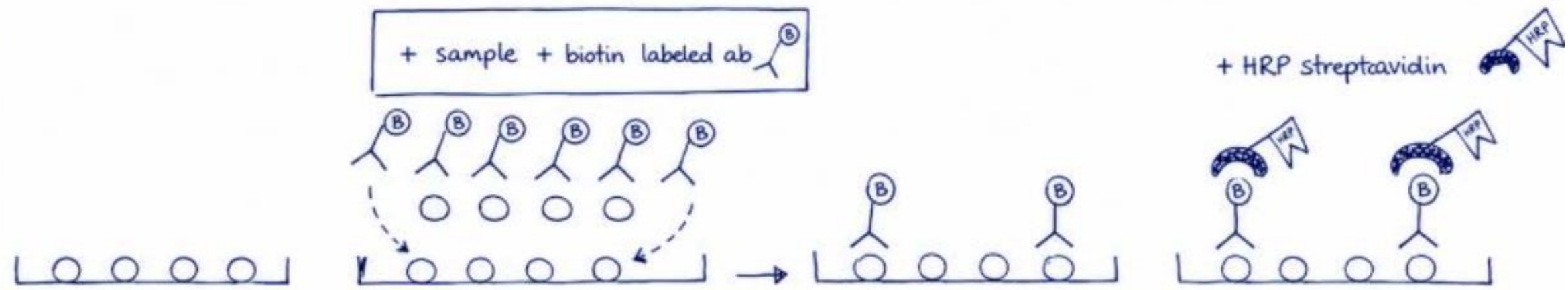
ADRENAL GLAND (hormones)



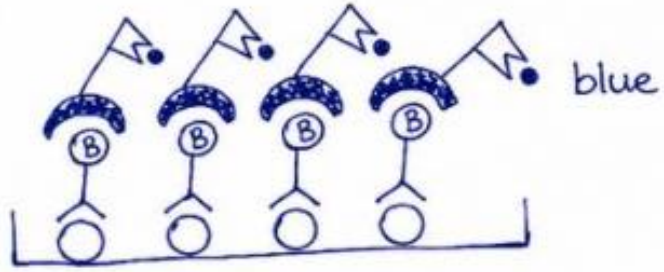
SAMPLE W/O CORTISOL



SAMPLE WITH CORTISOL



+ TETRAMETHYLBENZIDINE (TMB) ●



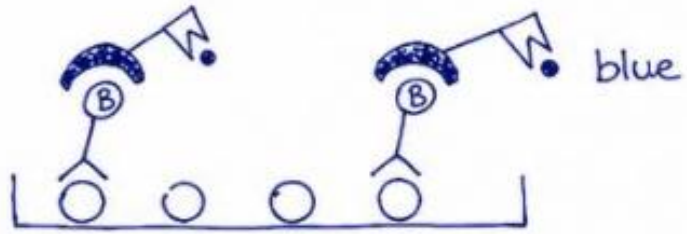
+ ACIDIC SOLUTION

blue → yellow

==

↓ ABSORBANCE AT
450nm
SIGNAL

+ TETRAMETHYLBENZIDINE (TMB) ●



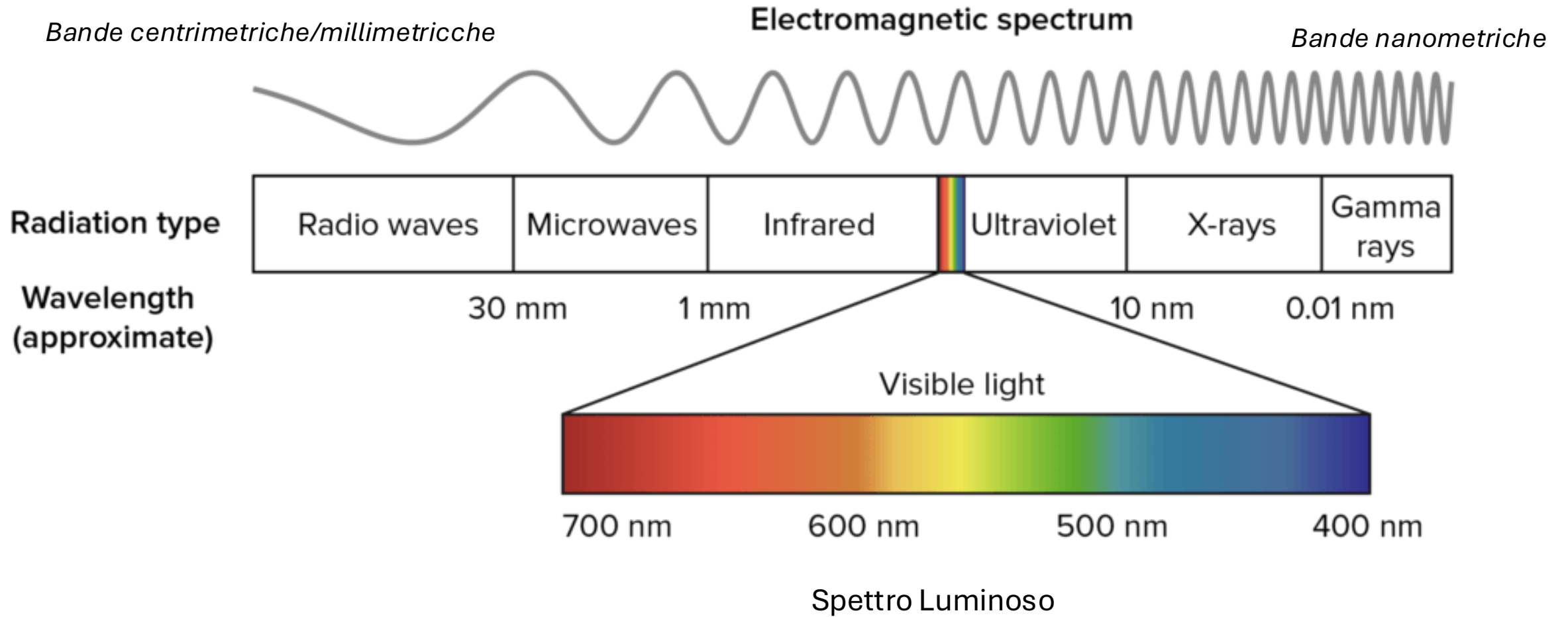
+ ACIDIC SOLUTION

blue → yellow

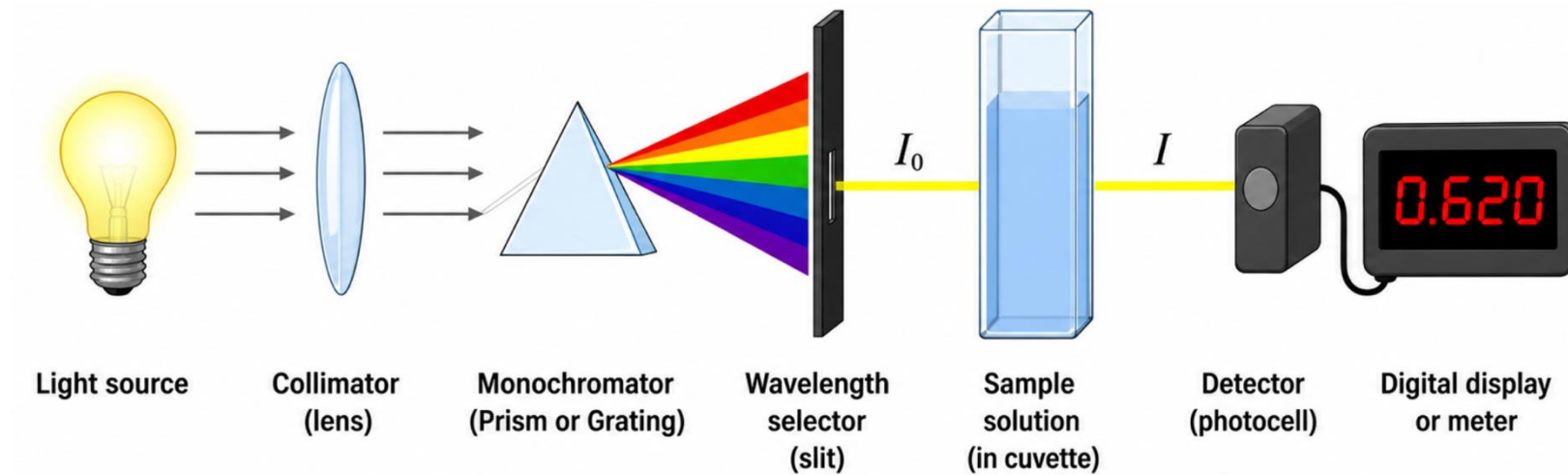
==

↓ ABSORBANCE AT
450nm
SIGNAL

Spettro Elettromagnetico



Come funziona una spettrofotometro



FUNZIONE

Sorgente luminosa	Ordina il fascio di luce	Separa il fascio di luce in diversi fasci di luce alle diverse lunghezze d'onda	Fessura che lascia passare solo una lunghezza d'onda selezionata I_0	Provetta con campione Parte della luce lo attraversa, parte viene assorbita	Sensore che misura quanta luce è arrivata I	Display che mostra il valore
Lampada UV-Vis Es. Lampada al deuterio O tungsteno						


Lo spettrofotometro misura quanta luce passa attraverso il campione e, usando la legge di Lambert-Beer, restituisce il valore di assorbanza A .

All'ingresso c'è una luce di intensità I_0 , all'uscita (dopo la cuvetta) una luce di intensità I .

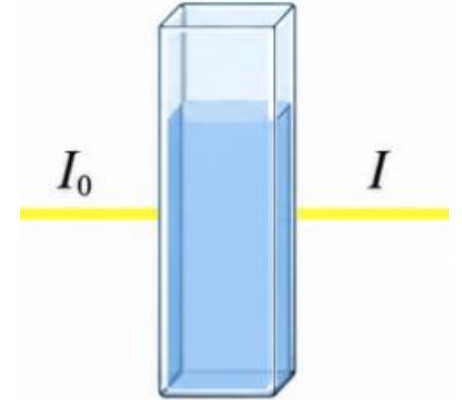
Lo strumento fa questo calcolo per avere l'assorbanza:

$$A = \log_{10}(I_0/I) = \boxed{\epsilon l c}$$

Definita in scala logaritmica



Grazie alla legge di Lambert-Beer è possibile poi collegare questo valore alla concentrazione. Questa legge ci dice che assorbanza e concentrazione sono direttamente proporzionali.



NOTE:

Estinzione = in ottica indica la **diminuzione dell'intensità** della radiazione che attraversa un mezzo

Molare= perché è riferito a una **concentrazione espressa in mol/L**: è legato al numero di molecole presenti

Equazione della curva logistica a 4 parametri (4PL)

$$y = D + \frac{A - D}{1 + \left(\frac{x}{C}\right)^B}$$

4PL invertita per ricavare x, dato y

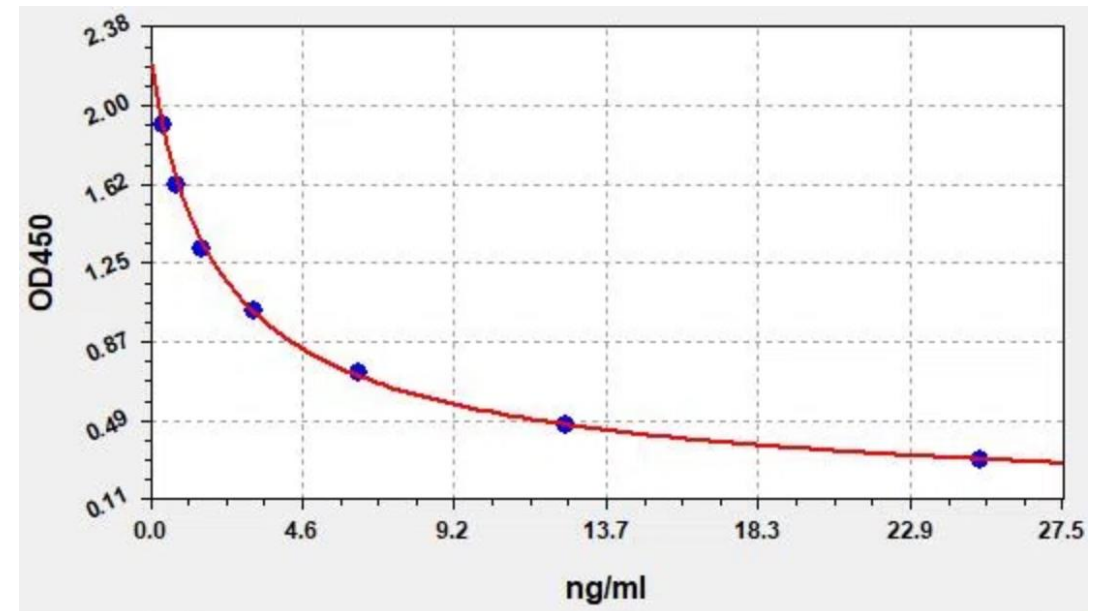
$$x(y) = C \left(\frac{A - y}{y - D} \right)^{\frac{1}{B}}$$

A = assorbanza massima

D = assorbanza minima

C = valore di x al punto di mezzo tra A e D

B = pendenza della curva



Sostituiamo il valori ottenuti nell'equazione

$$y = D + \frac{A - D}{1 + \left(\frac{x}{C}\right)^B}$$

R = 0,99

$$y = 2,263 + \frac{0,4674 + 2,263}{1 + \left(\frac{X}{2000}\right)^{-0,9604}}$$

$$y = D + \frac{4 - D}{1 + \left(\frac{X}{C}\right)^B}$$

REFERENCE EQ

$$x(y) = C \left(\frac{A - y}{y - D} \right)^{\frac{1}{B}}$$

$$X = 2,000 \left[\left(\frac{0,4674 + 2,263}{y - 2,263} \right)^{-1} \right]^{\frac{1}{-0,9604}}$$