

Fehérjék kimutatása. Biokémiai és sejtszintű vizsgálatok

A fluorescence microscopy image showing several cells. The cytoskeleton is stained green, showing a dense network of filaments. Numerous small red puncta are distributed throughout the cytoplasm. The cell nuclei are stained blue, appearing as bright, rounded structures. The overall image has a dark background, highlighting the fluorescent structures.

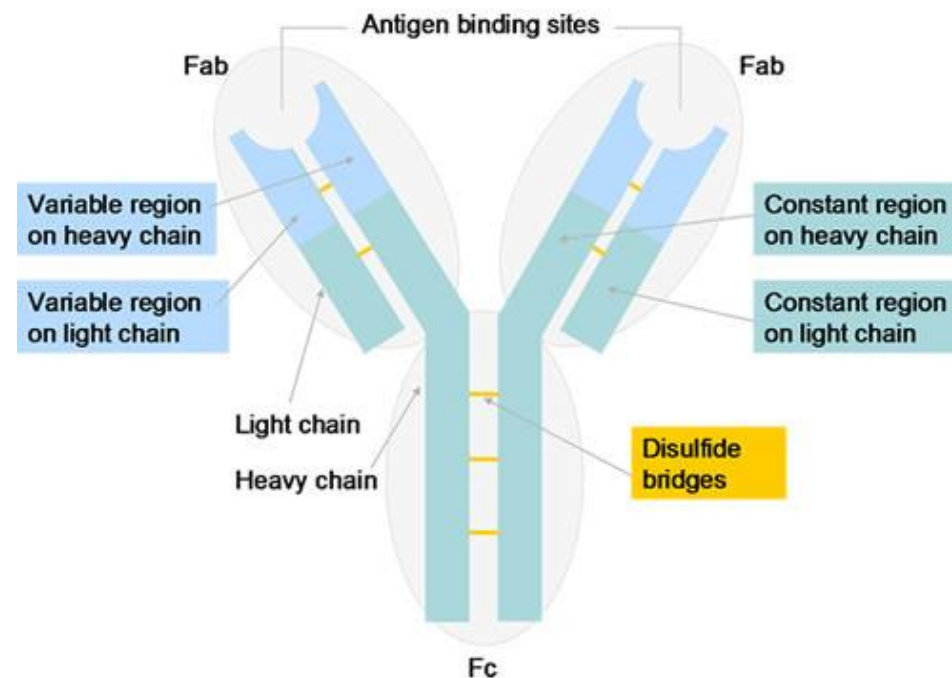
Immunaffinitás, ellenanyagok.
Western-blot, ELISA, FACS,
immuncitokémia,
mikroszkópok (fény, EM,
fluoreszcens, konfokális)

Fehérjék kimutatásának jelentősége, kihívások

- A sejt működtetését elsősorban a fehérjék végzik
- A diagnosztikai módszerek jelentős része fehérjék kimutatásán alapul
- Bár specifikus szekvenciájuk van, a fehérjék kémiai reakciókkal történő specifikus kimutatása nem lehetséges (itt nincs lehetőség komplementer szál kötődésére, ezáltal a szekvencia kimutatására)
- A egyes fehérjék között nagyon kicsi eltérések lehetnek, illetve az aktív fehérje gyakran csak pl. egy foszfátcsoportban különbözik az inaktívtól

Immunaffinitás, antitestek

- **Immunaffinitás:** specifikus antigén-antitest kölcsönhatás (**antigén:** minden olyan ágens, ami immunválaszt vált ki, antitest termelődéséhez vezet)
- **Antitest (Ig):** az immunrendszer B sejtjei által termelt fehérje, amelynek variábilis része nagy affinitással köt specifikus peptidszakaszokat, illetve térbeli mintázatokat: **epitóp**okat
- Felépítése: Y alak, a szár a fajra jellemző Fc régió, ez indukálja az immunválaszt, az Fab régió variábilis, a specifikus kötődésért felelős



Immunaffinitás, antitestek

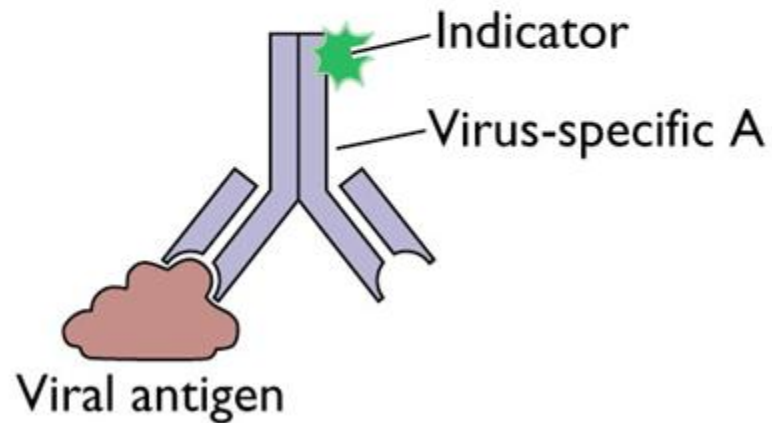
- Az antigénnel való találkozás során a B sejtek szelektálódnak (gyors evolúció), változnak, így a legspecifikusabb kötődésére képes antitest (ellenanyag) választódik ki
- Ez a reakció az alapja a fehérjék specifikus kimutatásának, de a kimutatáshoz a reakciót láthatóvá kell tenni, erre leginkább az ellenanyag jelölése szolgál (fluoreszcens festék, enzim, amely fény- vagy színes terméket kibocsátó reakciót katalizál)
- **Hibridóma sejtek:** tumorsejtek és B sejtek fúziójából létrehozott sejtvonalak, amelyek adott ellenanyagot termelnek
- **Poliklonális ellenanyag:** többféle epitópot felismerő ellenanyagok keveréke, **Monoklonális ellenanyag:** egyetlen epitópot ismer fel

Immunkémiai eljárások

- A fehérje sejten belüli / sejtfelszíni elhelyezkedésének kimutatása
- Ma már a jelölés fluoreszcens festékekkel történik elsősorban (régen színreakciót katalizáló enzimmel)
 - *Direkt*: a specifikus ellenanyag Fc régiójához kötik a festéket
 - *Indirekt*: a specifikus ellenanyag Fc régióját felismerő másodlagos ellenanyaghoz kötik a festéket

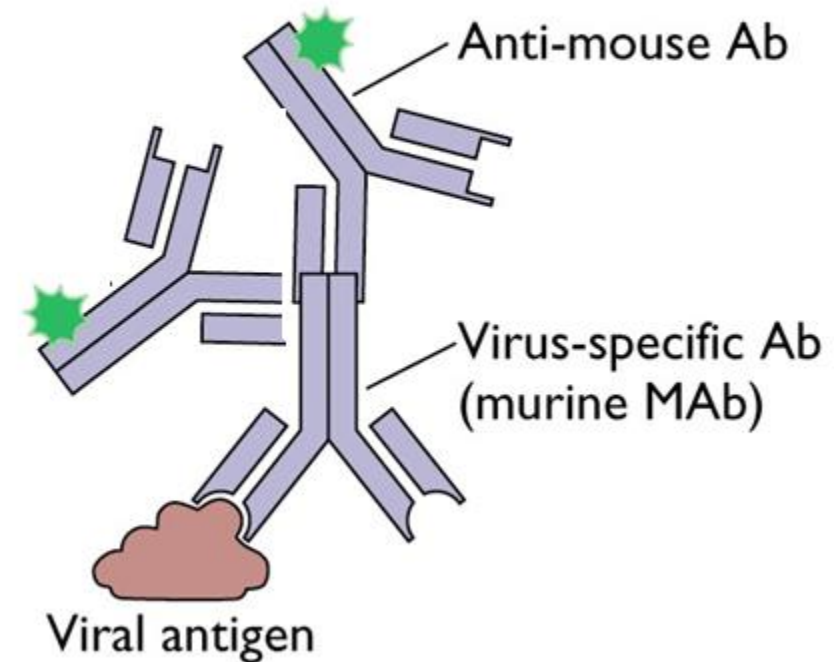
Direkt és indirekt módszer

Direct



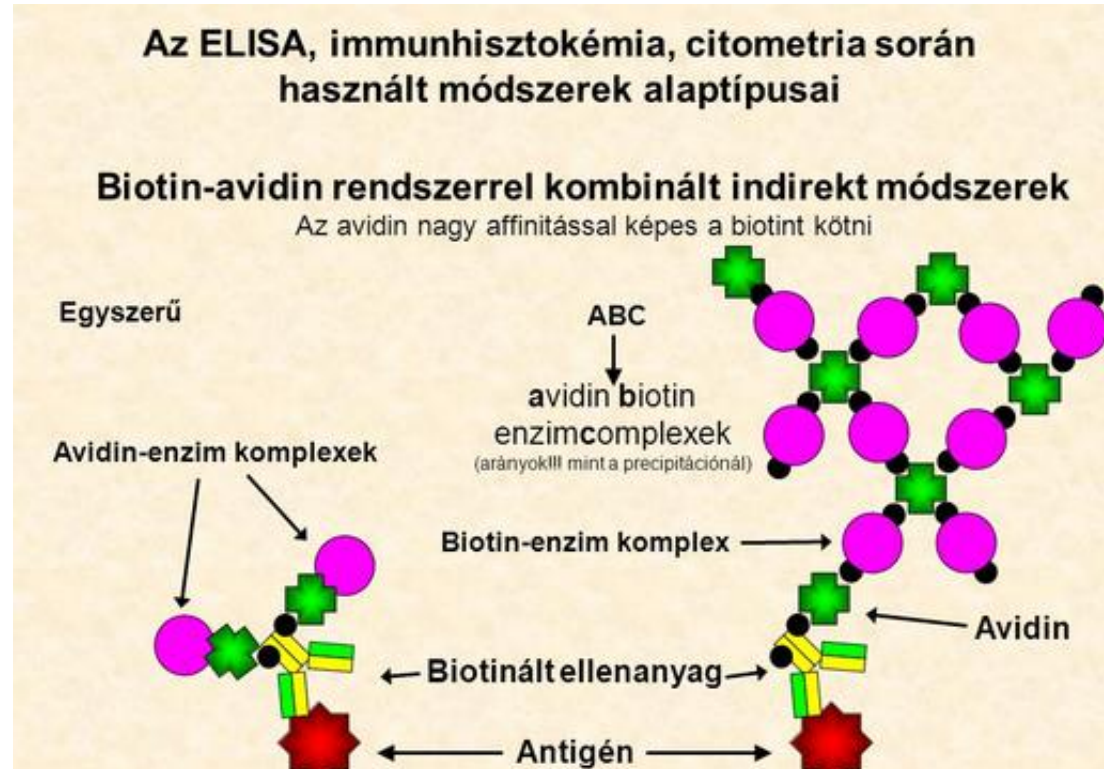
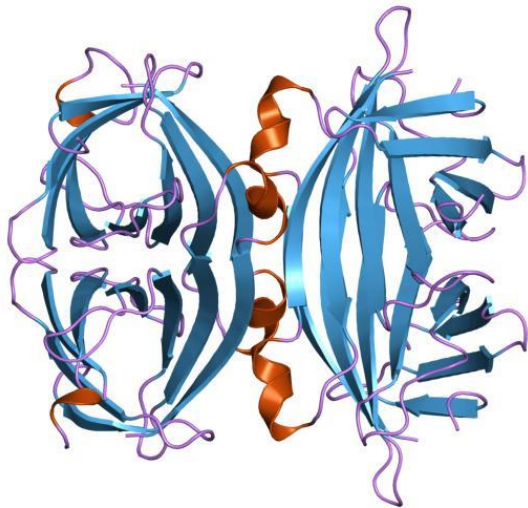
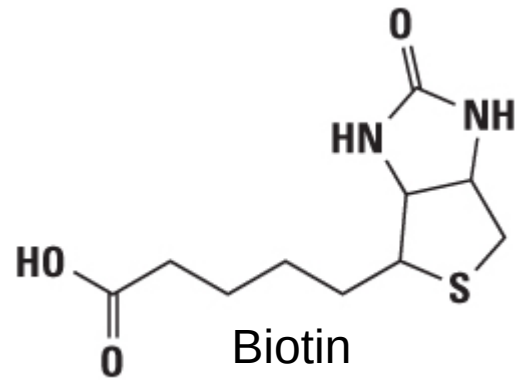
- Gyorsabb
- Olcsóbb
- Kevésbé érzékeny

Indirect



- Több lépés kell
- Drágább
- Érzékenyebb a jelerősítés miatt

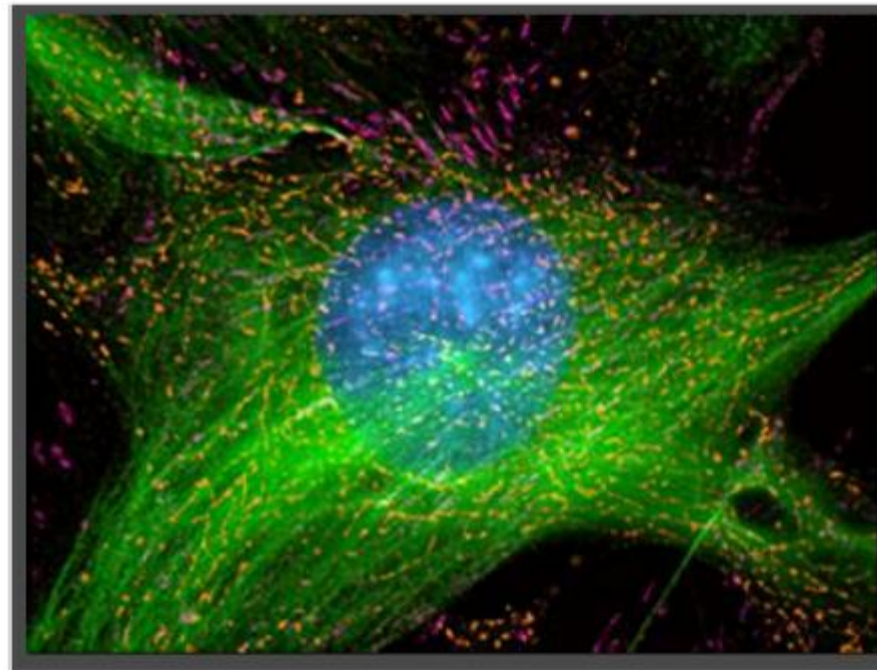
Biotin+(strept)avidin



- **Immuncitokémia:** intakt sejtek kiemelve az extracelluláris mátrixból (sejttenyészetek, kenet stb.)
- **Immunhisztokémia:** sejtek + extracelluláris mátrix (szöveti szerkezet, metszetek)
- **Immunfluoreszcencia:** a fentiek azon esete, amikor fluoreszcenciával teszik láthatóvá
- Egyéb jelzési módok: színreakciót katalizáló enzim (HRP), radiojelzés, biotin
- Limitáció: sejten belül csak fixált sejtekre alkalmas, mert az antitest nem megy át a sejtmembránon, fluoreszcens jelzésnél photobleaching

Immunkémiai eljárások

Sejtalkotóra specifikus jelölt antitesttel



Mitokondriumok

Sejt letapadási
pontok
(integrinek)

Sejtmag

Citoszkeleton
(tubulinok)

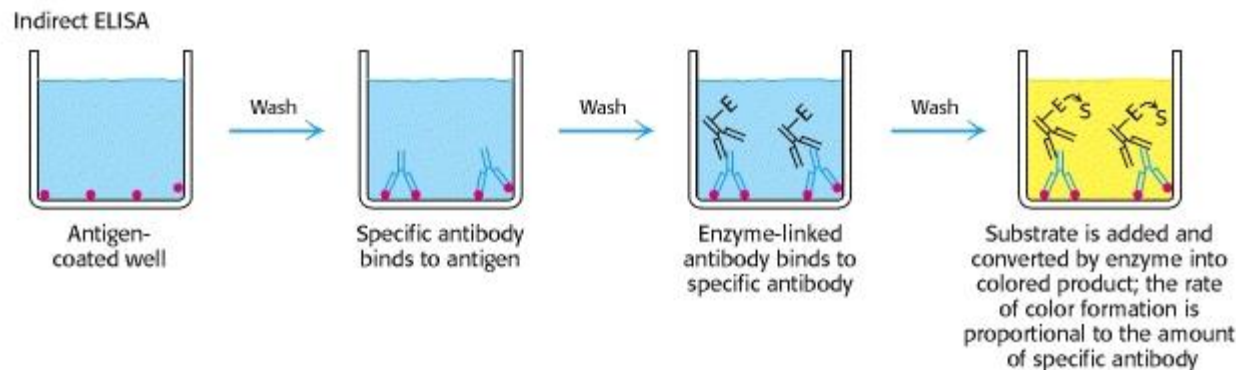
MRC5 cell

ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay)

- Elsősorban a sejtek által kibocsátott szolubilis fehérjék (hormonok, citokinek) kimutatására szolgál
- Az antigén-antitest kötődést az ellenanyaghoz kötött enzim katalizált színreakció teszi láthatóvá
 - Indirekt: elsősorban az immunstátusz kimutatására szolgál (pl. fertőzés hatására megjelenő ellenanyagok kimutatása)
 - Szendvics (antigén kimutatása, pl. baktérium, vírus jelenléte)

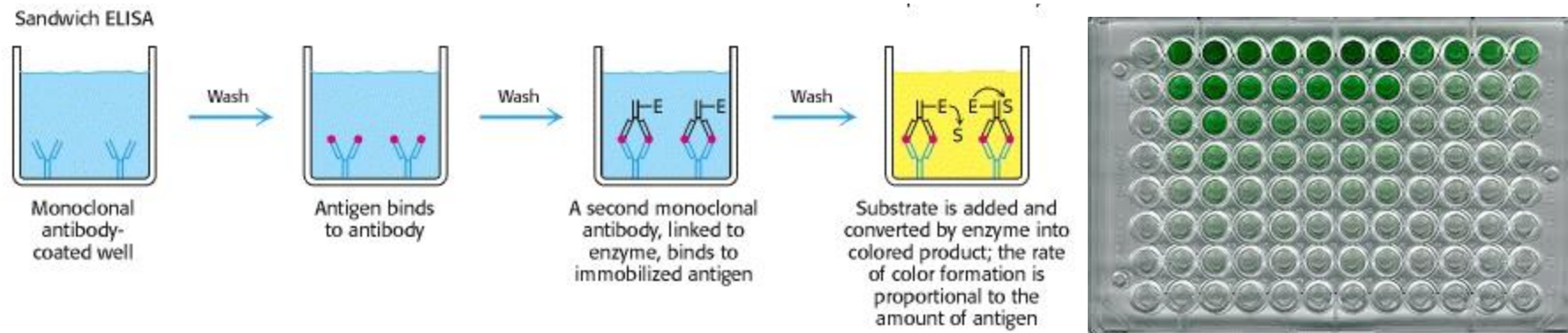
Indirekt ELISA

- A reakcióedénybe, az ún. 96 lyukú mikrotiter edény lyukainak aljára kötik az **antigént** (A nem fedett helyeket blokkolják pl. BSA-val)
- Hozzáadják a szérumot (vérmintát): az antigén (fertőző ágens) elleni ellenanyagok specifikusan kötődnek az edény alján rögzített antigénekhez (*az antitesteket detektáljuk*).
- A szérumot kimossák: az összes egyéb ellenanyag kimosódik, csak az antigénhez kötöttek maradnak az edényben
- Az ellenanyag kimutatása: az Fc régiót (fajra jellemző) felismerő ellenanyaggal, amelyhez színreakciót katalizáló enzimet kötöttek (pl. tormaperoxidáz, HRP)
- A felesleg kimosása
- Színreakció, a szín intenzitásából megállapítható a fertőző ágens elleni ellenanyagok koncentrációja



Szendvics ELISA

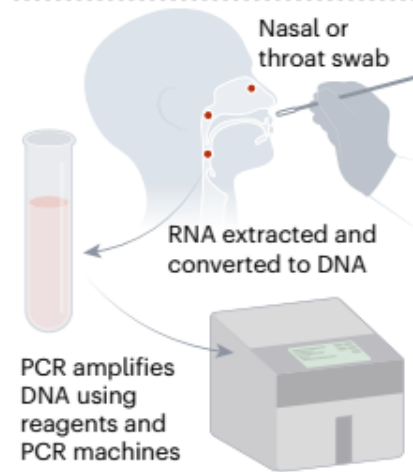
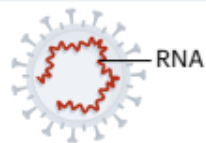
- Az edény aljára **ellenanyagot** kötnek, a nonspecifikus kötőhelyeket blokkolják
- Felviszik a mintát (szérum, sejtlizátum, biológiai folyadék): a mérni kívánt anyagot (pl. hormon, fertőzést okozó antigén) az ellenanyag (antitest) megkötí
- A mintát kimossák, minden fehérje távozik, csak az ellenanyaghoz kötött marad
- Kimutatás: újabb, enzimhez kapcsolt ellenanyaggal, amely a fehérje egy másik epitópjára specifikus,
- Felesleges ellenanyag kimosása, színreakció



Nucleic-acid-based test

How it works

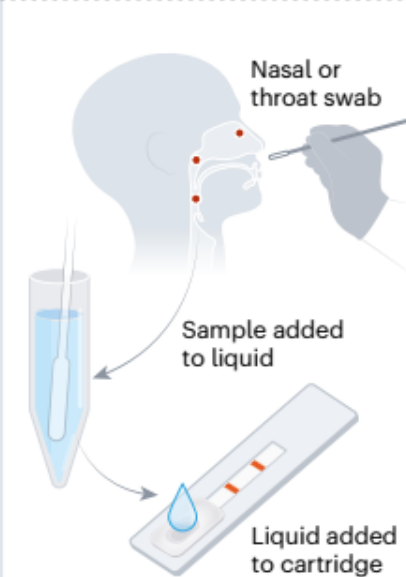
Detects viral genetic material.



Usually requires a centralized laboratory; some machines can be brought to test sites. Variations include LAMP, CRISPR and sequencing-based tests that amplify and detect DNA in a range of ways.

Antigen test

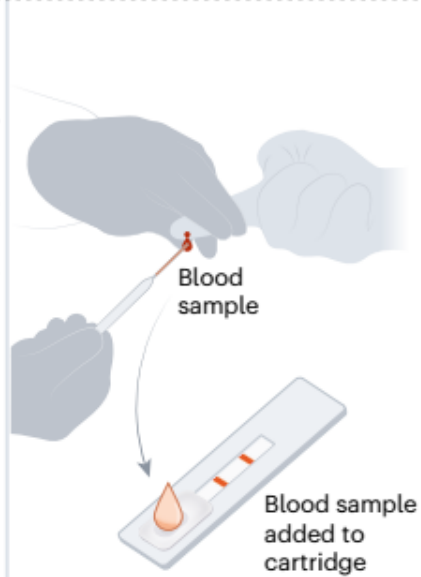
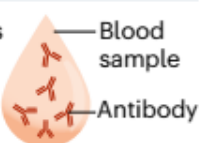
Detects proteins on surface of the virus.



Point-of-care test that can be done by non-experts.

Antibody test (serological)

Detects antibodies that the immune system produces against the virus.



Point-of-care test that can be done by non-experts.

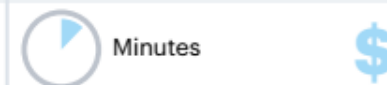
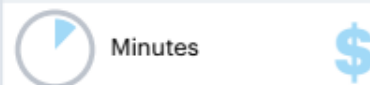
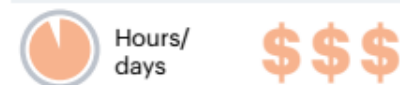
What a test tells you

Whether any viral genetic material is present, even at low levels.

Whether the virus is present in high concentrations. (Whether you are likely to be infectious.)

Whether you are likely to have had the virus. It does not detect an active infection.

Time and cost



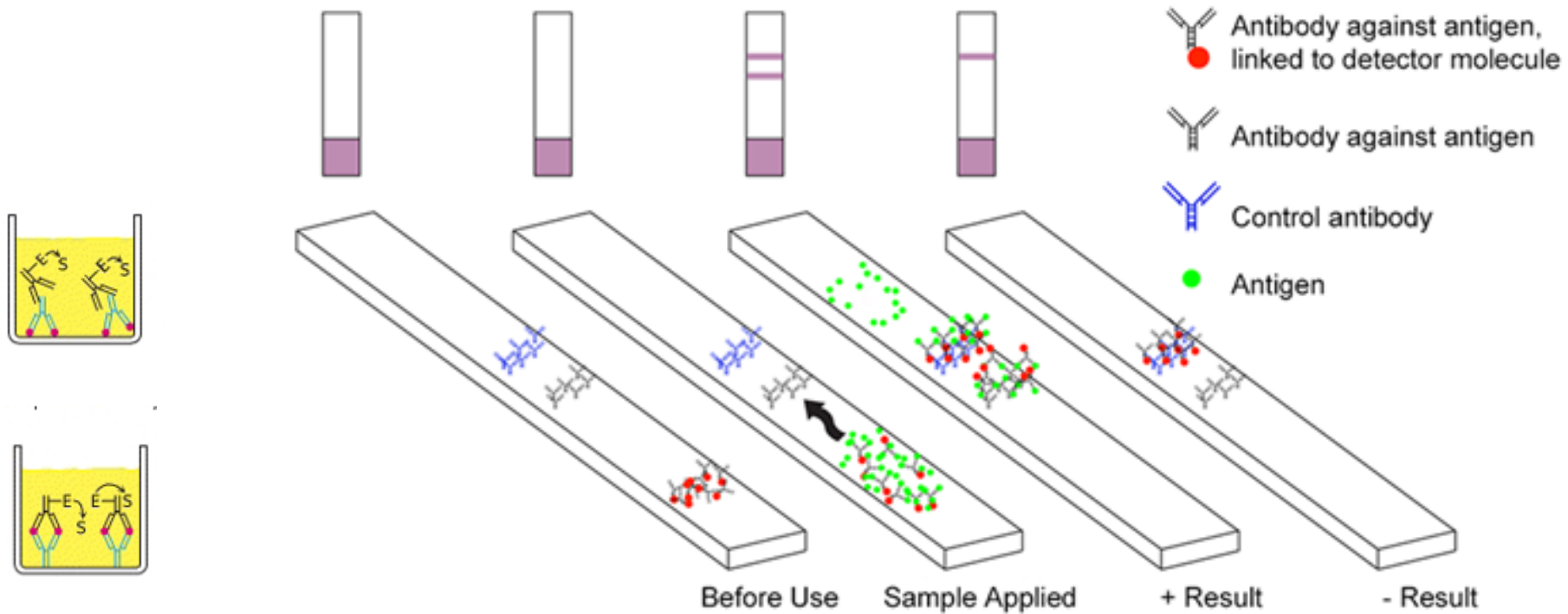
General reliability*

Very sensitive and specific.

Misses infections with low virus levels.

Variable, but some tests are very specific.

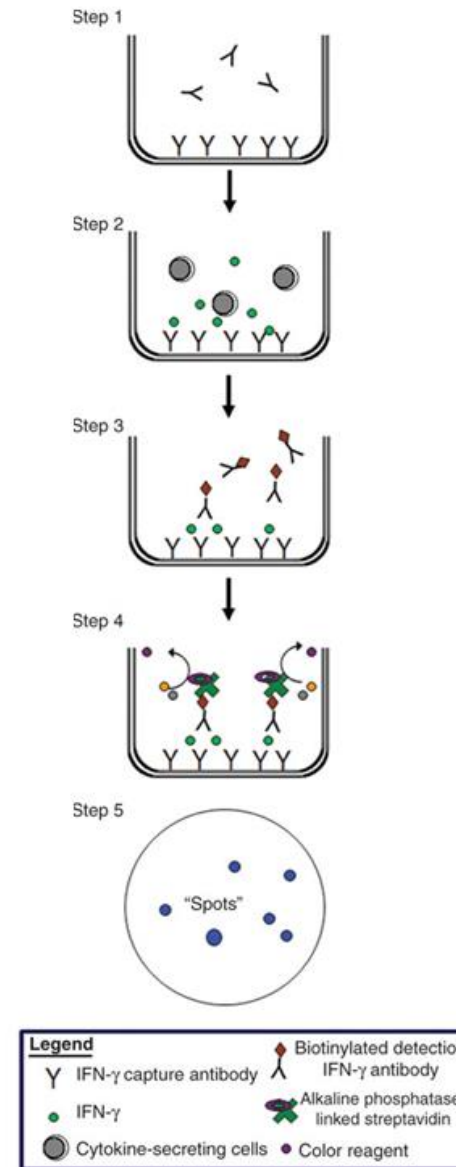
Covid test



Adapted from: Ian M. Campell, https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Diagnostic_Medical_Dipstick.png

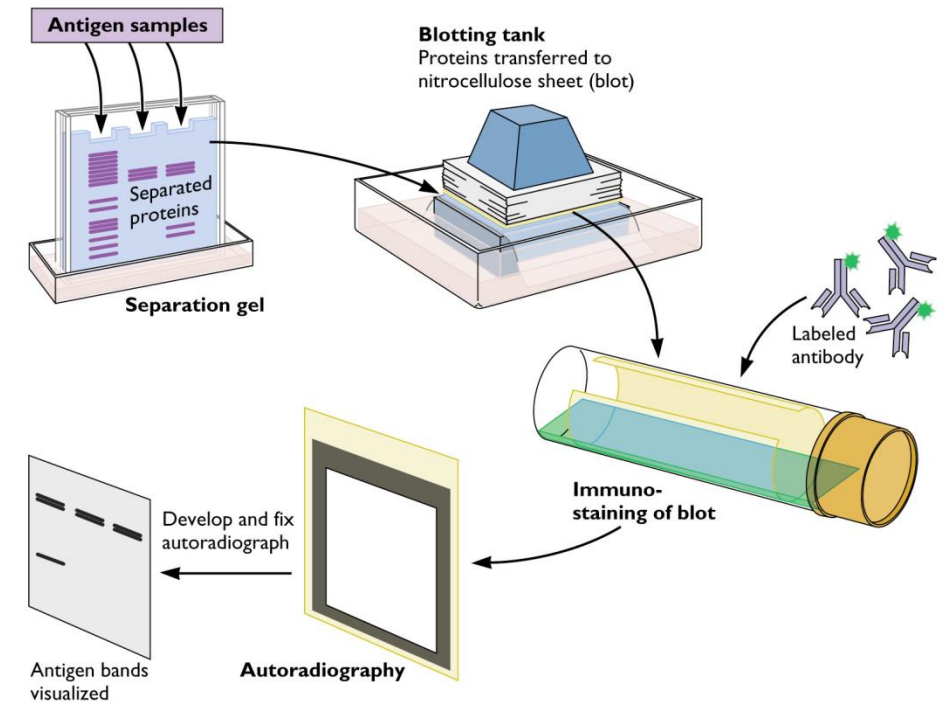
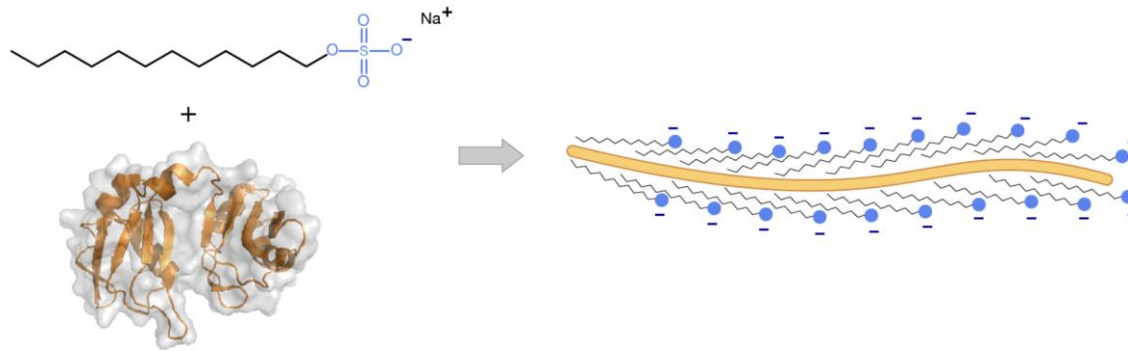
ELISPOT (Enzyme-Linked Immuno Spot Assay)

- ELISA elvén működik
- De: egyetlen sejt által kibocsátott fehérjét tud mérni
- Edény alján ellenanyag
- Sejttenyészetet adnak az edénybe: egyes sejtek aktívak, szecernálják a mérni kívánt fehérjét, amit az ellenanyag megköt
- Kimossák a sejteket az edényből, a kibocsátott fehérje (antigén) az ellenanyaghoz kötve ott ragad
- Második, enzim-kapcsolt ellenanyag hozzáadása
- Színreakció: a kibocsátás helyén jön létre csak a színreakció, ezért a kibocsátó sejtek száma megállapítható



Western blot

- Fehérjék elválasztáson alapuló kimutatása komplex fehérjeelegyből
- Elválasztás: SDS-PAGE gélelektroforézis (méret alapján) vs. natív gélelektroforézis (méret, töltés)
- Kimutatás: indirekt módszerrel (jelzett antitest)



Fluoreszcencia

- A gerjesztett állapotból a molekula fotonkibocsátással lép vissza az alapállapotba
- Foton kibocsátás (fluoreszcencia, foszforeszcencia)
 - Fluoreszcencia (nincs spinváltás, $S^* \rightarrow S^{\text{alap}}$)
 - Foszforeszcencia (van spinváltás $T^* \rightarrow S^{\text{alap}}$)

Gerjesztő energia

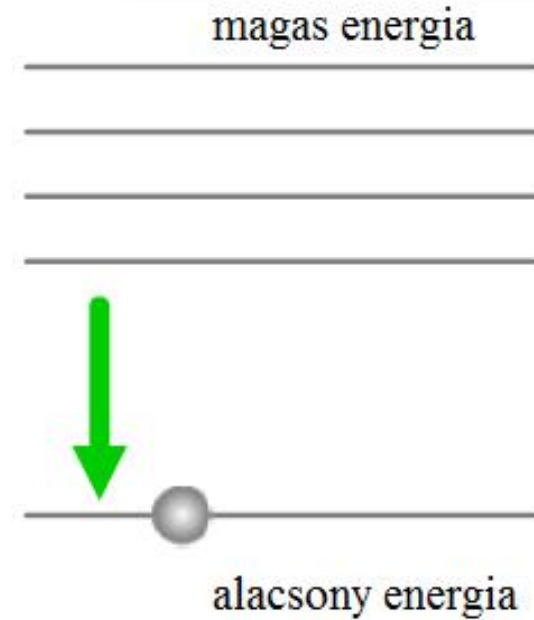
- Biolumineszcencia (biológiai folyamat, pl. luciferin-luciferáz)
- Kemilumineszcencia (kémiai reakció, pl. luminol- H_2O_2 + vas)
- Fotolumineszcencia (fénnnyel való gerjesztés – fluoreszcencia, foszforeszcencia)



Mit nevezünk fluorofórnak?

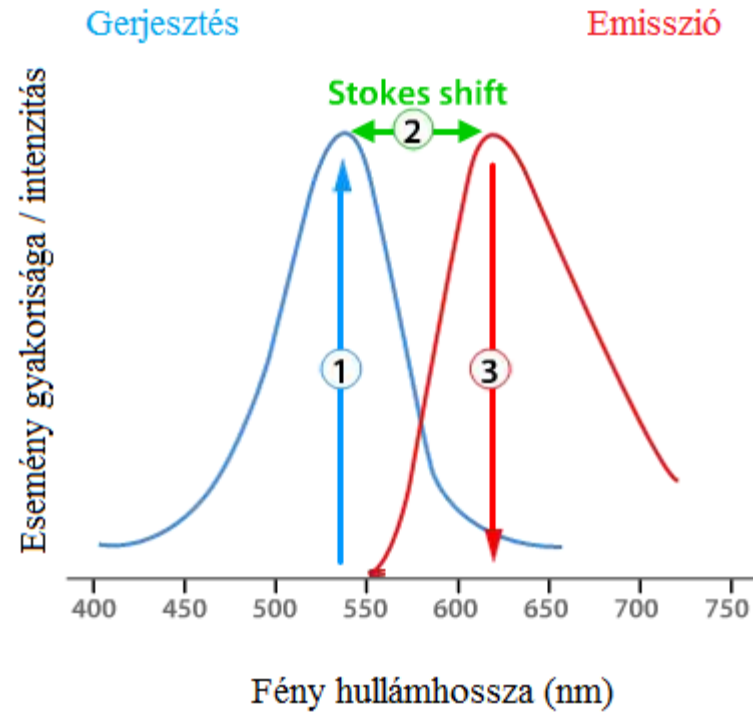
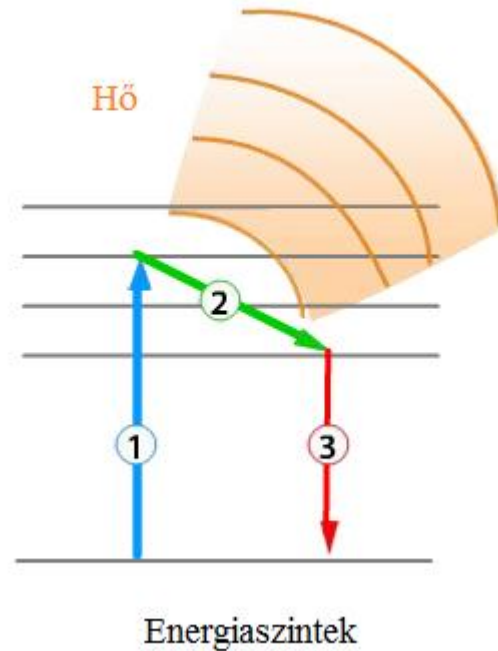


FLUOROFÓR



ENERGIASZINTEK

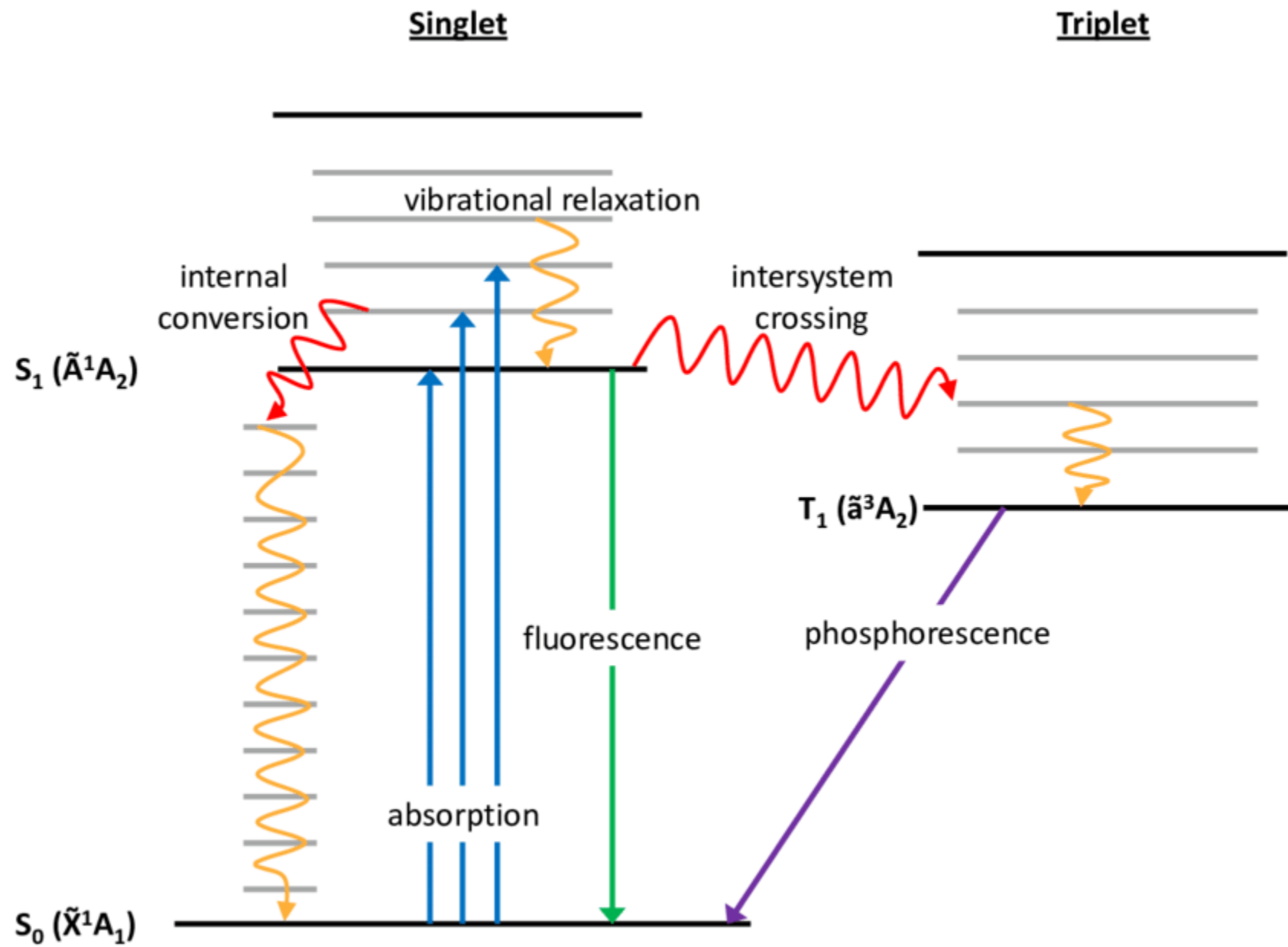
Stokes-eltolódás



Stokes-féle fluoreszcencia: a kibocsátott fény energiája kisebb, mint a gerjesztő fény energiája

A fluoreszcencia tulajdonságai

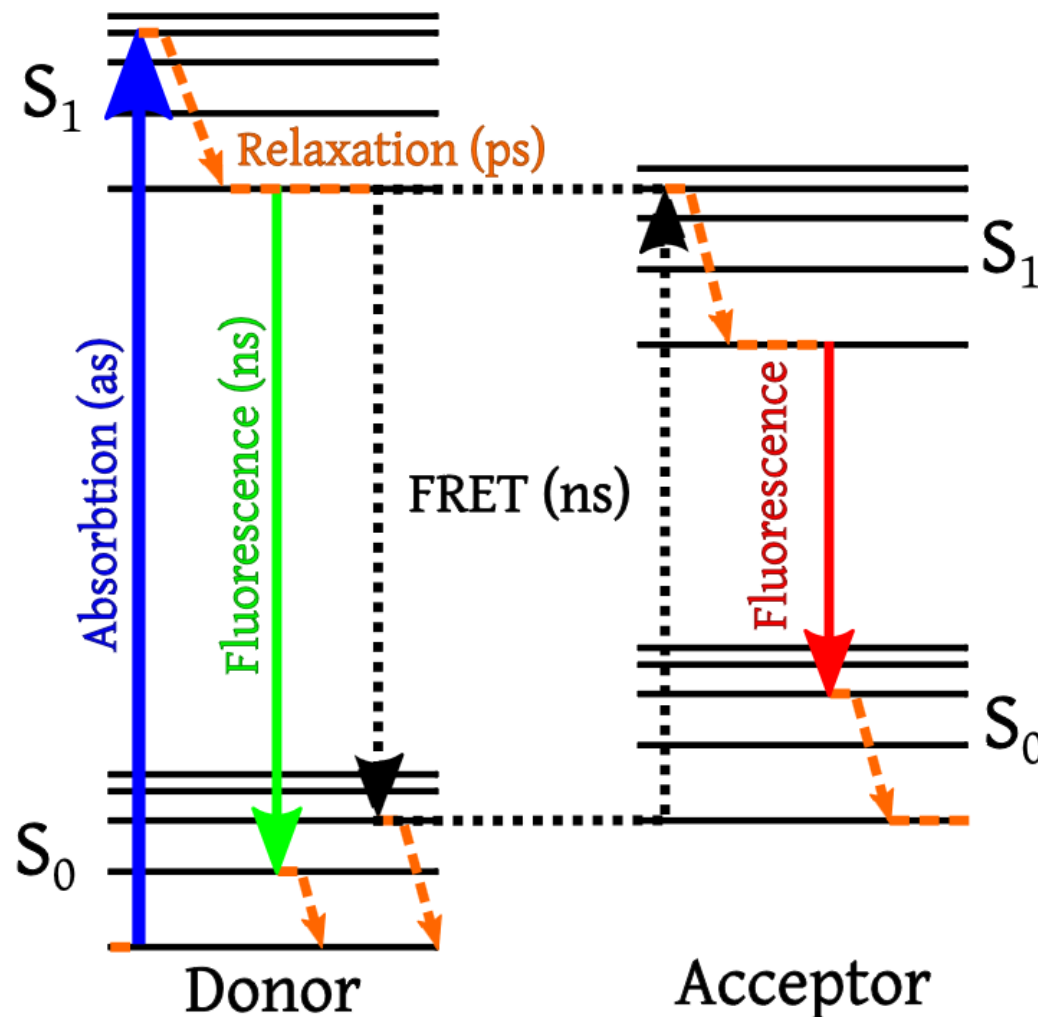
- Könnyű észlelhetőség (fluoriméter, mikroszkóp, szabad szem stb.)
- Érzékeny észlelés (femtomol, 1 molekula)
- Jó felbontóképesség (idő-, térbeli)



Fluorofór típusok

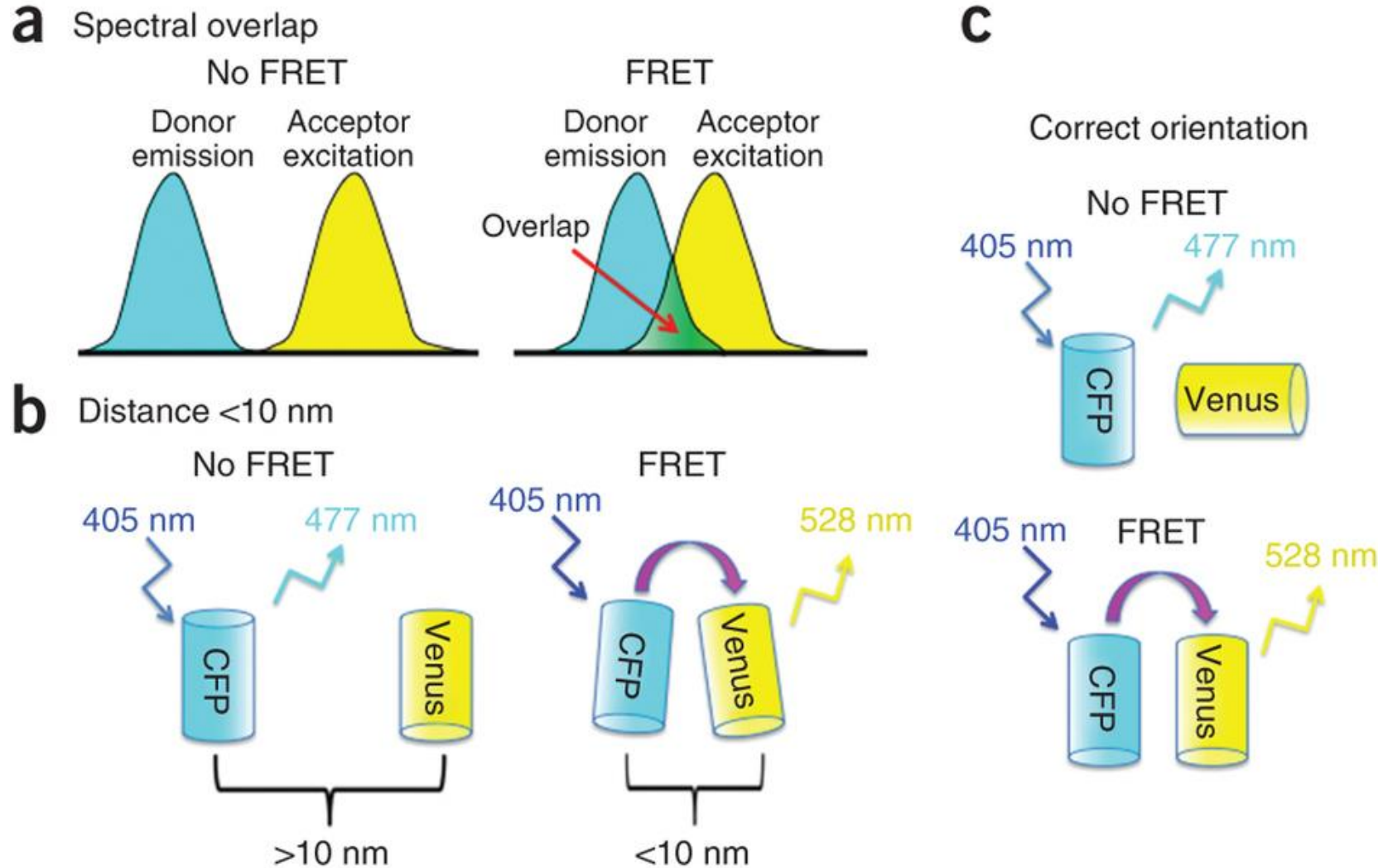
- Természetes vegyületek (pl. fluoreszcens fehérjék, GFP)
- Mesterséges szerves vegyületek (pl. aromás, konjugált vegyületek)
- Szervetlen félvezető nanorészecskék (pl. CdSe nanorészecskék, Quantum dots, QDs)
- Anti-Stokes nanorészecskék (upconverting nanoparticles, NaYF₄-Yb:Er) – közeli IR (NIR) gerjesztés, látható emisszió: mélyszövetes képalkotás, nincs autofluoreszcencia)

Förster Rezonáns Energiatranszfer FRET



- Spektrális átfedés (donor emisszió, akceptor abszorpció)
- Távolság (10-100 nm) – $E = 1/1+(r/R_0)^6$
- Irányultság (átmeneti momentumok)
- Akceptor lehet quencher is

FRET



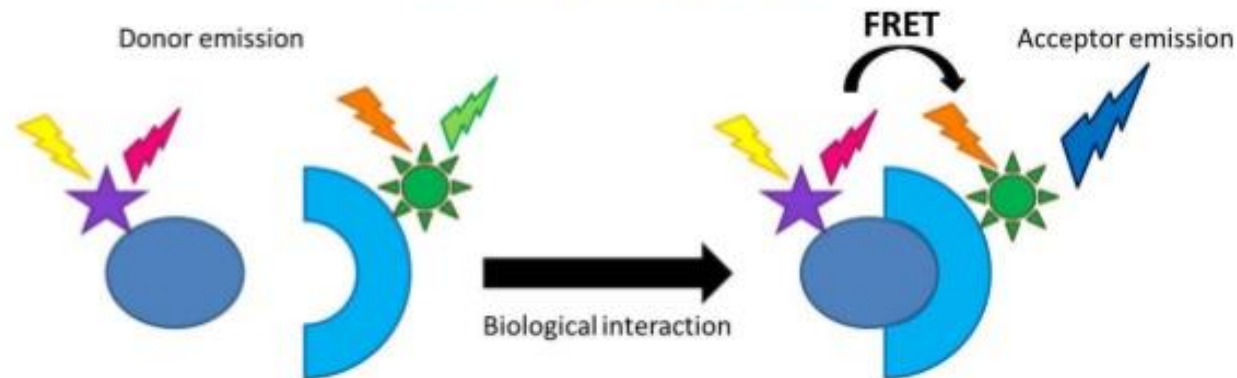
FRET példa 1



Innova Biosciences
first for Antibody labeling

FRET examples

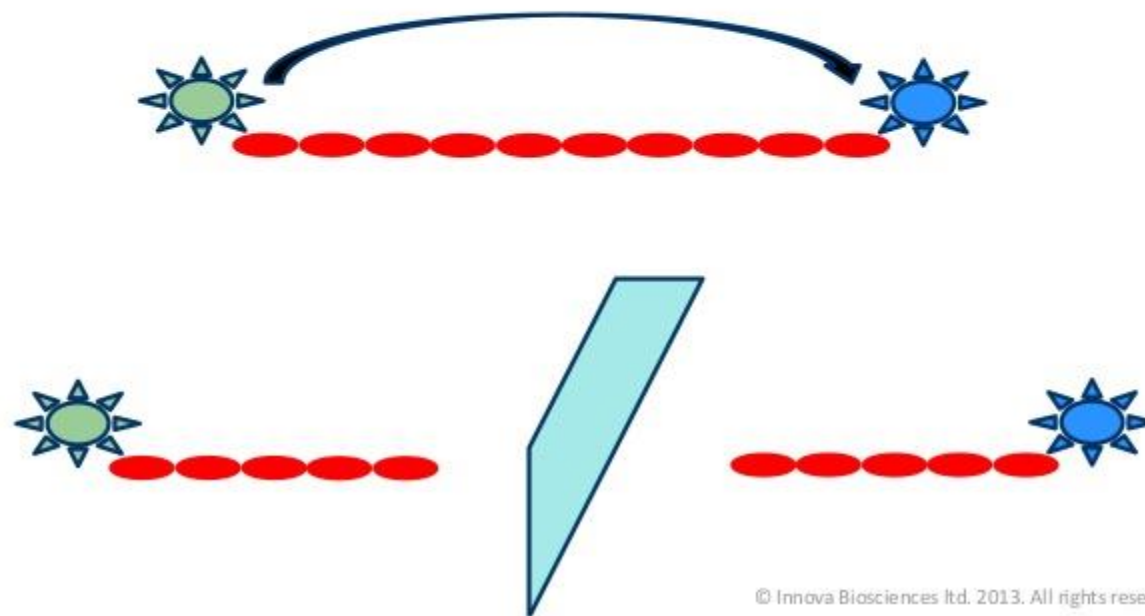
Typical example of detecting interaction of two molecules – e.g. drug binding to active site or antibody binding to target



FRET példa 2

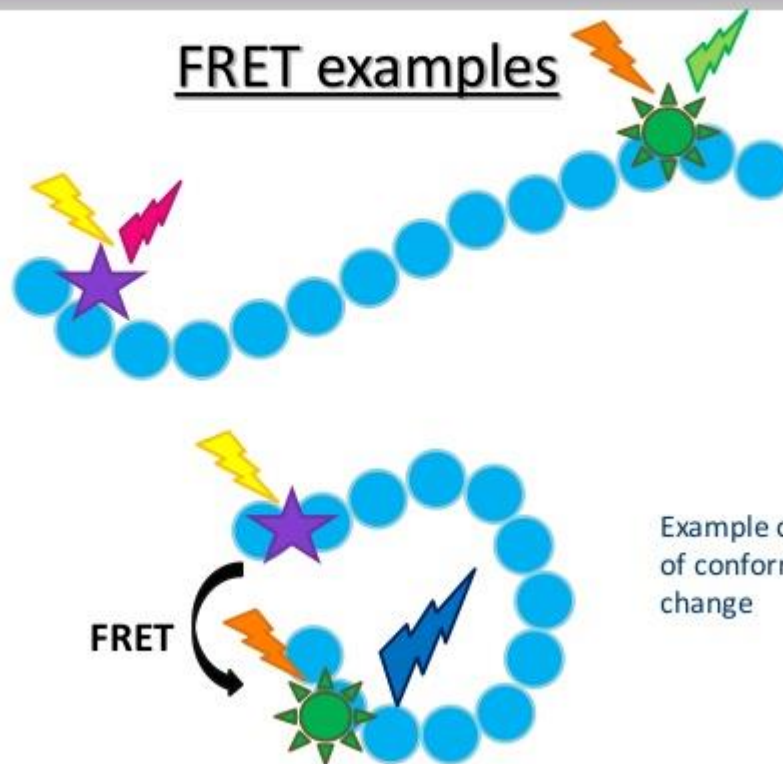
FRET examples

Example of protein cleavage detected by loss of FRET signal



FRET példa 3

FRET examples

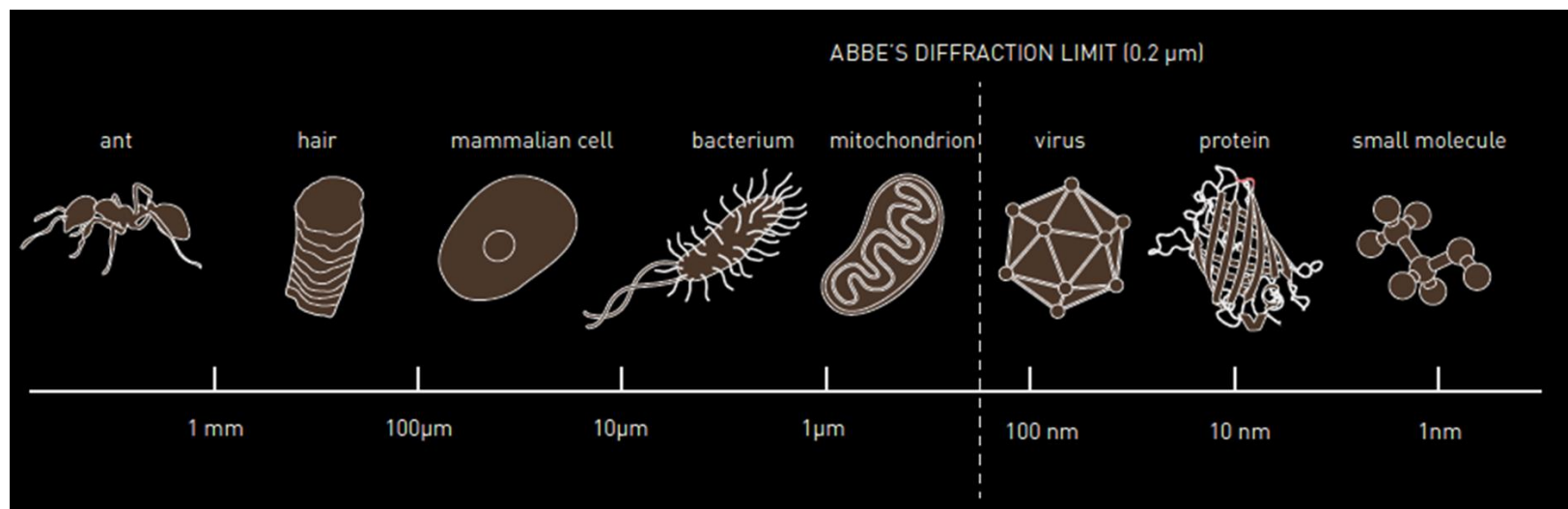


Example of detection
of conformational
change

Mikroszkópos technikák

- Láthatóvá kell tenni a vizsgált rendszereket (sejt, sejtalkotó, molekula)
- A láthatóvá tételhez részecske természetű energiaforrást alkalmaznak
- Megfelelő lencsék optikai mikroszkópoknál
- Diffrakciós limit vs. felbontóképesség

Felbontóképesség



Emberi szem
PET, MRI

Optikai képalkotó eljárások

Elektronmikroszkóp

Nem invazív

Invazív

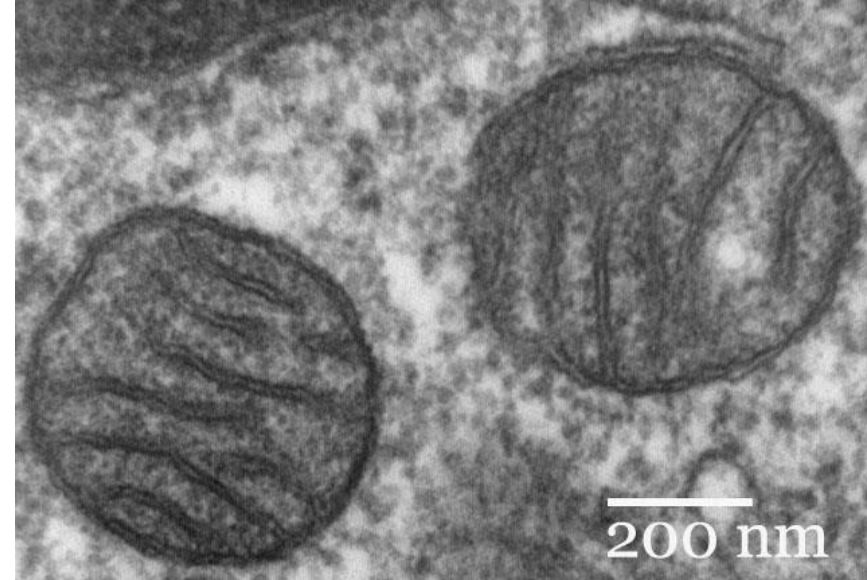
Mikroszkópos technikák

- Fénymikroszkóp
- Látható fényt használ (400-800 nm)
- Egyszerű fénymikroszkóp (fényelnyelésen alapul)
- Sötét / kontrasztos anyagok, vagy festés kell
- Olcsó
- Felbontóképesség: 200 nm körül, nagyítás: 2000 ×
- Fáziskontraszt mikroszkóp :
fényinterferencián alapul a létrejövő kép (az egyes sejtalkotók másként szórják a fényt, ezt erősítik fel, mielőtt a képet létrehozzák)



Mikroszkópos technikák

- Elektronmikroszkóp
 - Gyorsított és kondenzátorokkal fókuszált elektronokat használ a „megvilágításhoz”
 - Akár 50 pm felbontóképesség
 - 10 000 000 × nagyítás
- Transzmissziós EM (TEM)
 - Nagyfeszültségű elektronokkal történik a megvilágítás - elektronszórás
 - ~ röntgendiffrakció de nem kell kristály
 - Mintát ki kell szárítani és fixálni



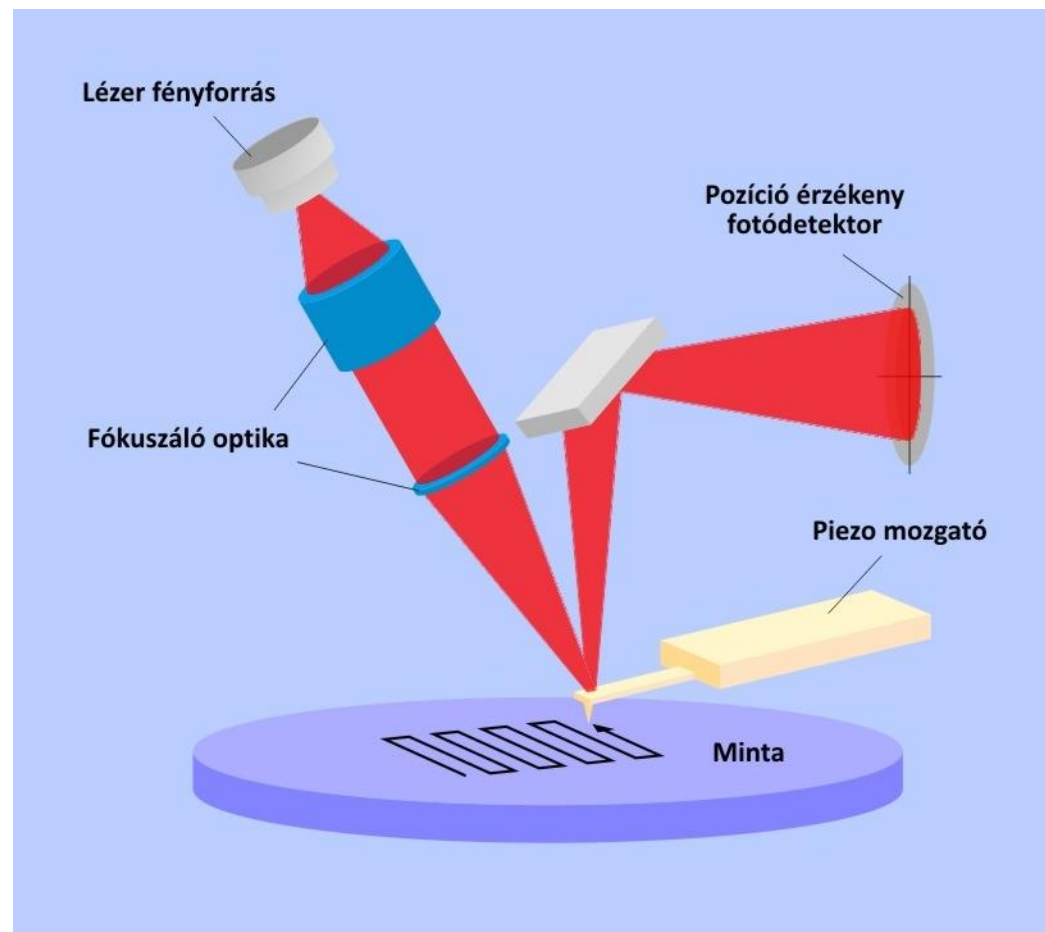
Mikroszkópos technikák

- Elektronmikroszkóp
- Pásztázó (Scanning EM; SEM)
 - Elektronokkal pásztázzák a mintát
 - Ahol van valami, ott csökken az energiája az elektronoknak, illetve az elektronok visszaverődnek
 - Ezt a változást alakítják át jellé
- 1 nagyságrenddel gyengébb felbontás, mint a TEM-nek
- Nagyméretű mintákra is alkalmas, jó mélységélességet ad
- Előny: nem kell szárítani pl.



Mikroszkópos technikák

- Atomerő mikroszkóp (AFM)
- **Nincsen sugárzás, lencsék**
- Felbontóképesség: atomi léptékű
- XY síkon 0,1 - 2 nm, Z irányban 0,005 - 0,1 nm
- Élő sejtekre is alkalmas
- Szubnanométeres felbontás



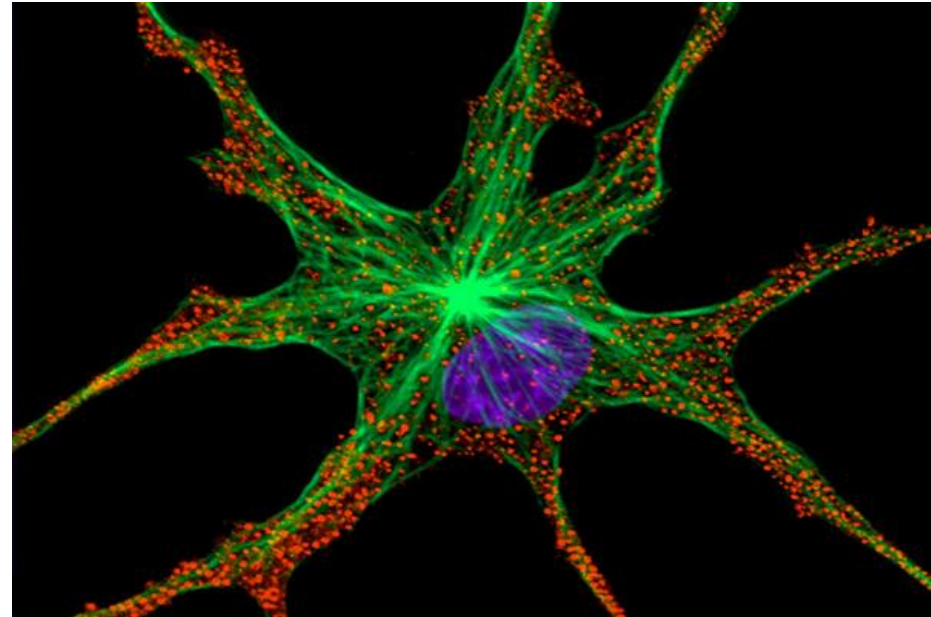
Mikroszkópos technikák

- Fluoreszcens mikroszkóp
- Lézerrel gerjesztik a mintát, majd az indukált fluoreszcens fényt detektálják (a fényforrás maga a minta)
- Epifluoreszcens mikroszkóp
 - Jó jel/zaj arány
 - Csak az látszik, ami fluoreszkál
 - Hátrány pl. photobleaching
 - Felbontóképesség jobb, mint a fénymikroszkópé (FRET technikával akár nm is lehet)



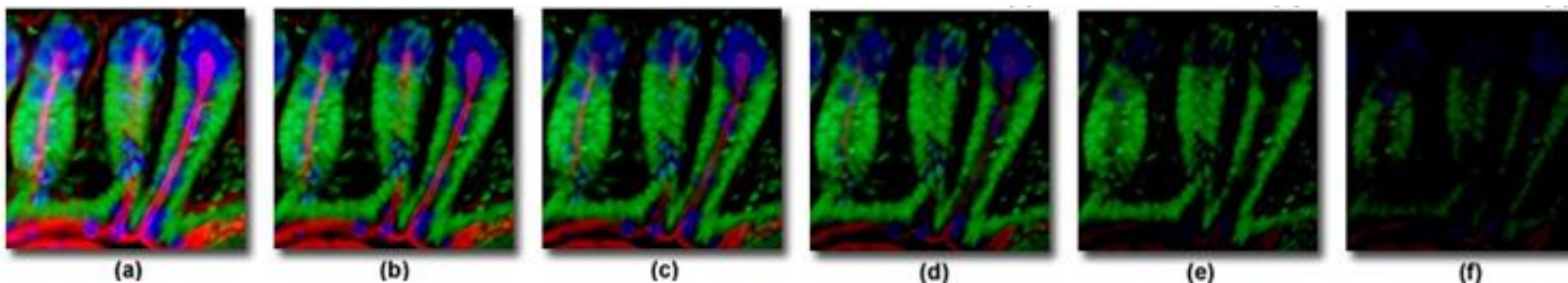
Mikroszkópos technikák

- Konfokális fluoreszcens mikroszkóp
- A gerjesztő fényt különböző mélységekbe lehet fókuszálni
- A nem a fókuszból érkező fényt ki lehet szűrni – kiváló képminőség
- Különböző síkokról / rétegekről lehet képet alkotni, majd összerakni a 3D szerkezetet
- Mivel pontszerűen gerjeszt, jobb a felbontása



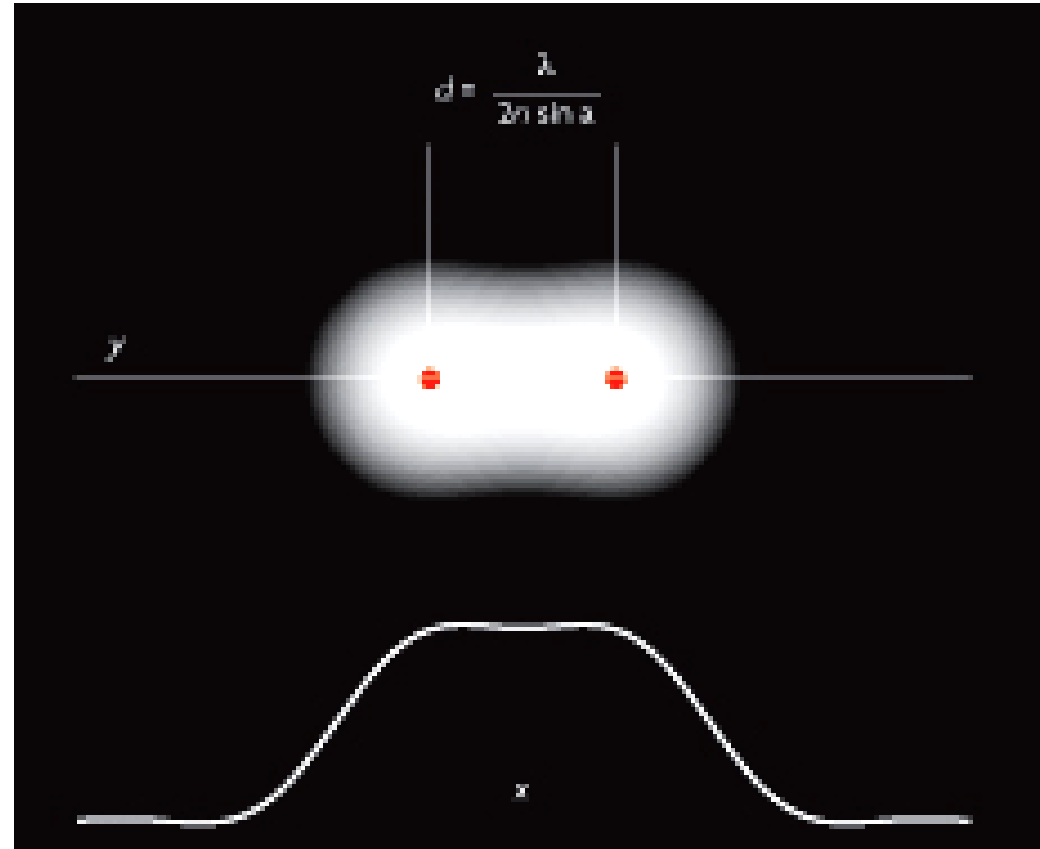
Fluoreszcenciát zavaró hatások

- **Autofluoreszcencia** : főleg UV gerjesztésnél az aromás aminosavak, nukleotidok, porfirinek is gerjesztődnek, emittálnak, kisebb jel-zaj arány)
 - Nagy Stokes eltolódás vagy vörös/NIR gerjesztés csökkenti
- **Háttérfluoreszcencia**: a nem-specifikusan kötődött jelzővegyület fluoreszcenciája (kisebb jel-zaj arány)
 - Fluorogén festékek csökkentik
- **Photobleaching**: a gerjesztett állapotban fotokémiai reakcióval nem fluoreszkáló termék keletkezik)
 - Fotostabil festékek

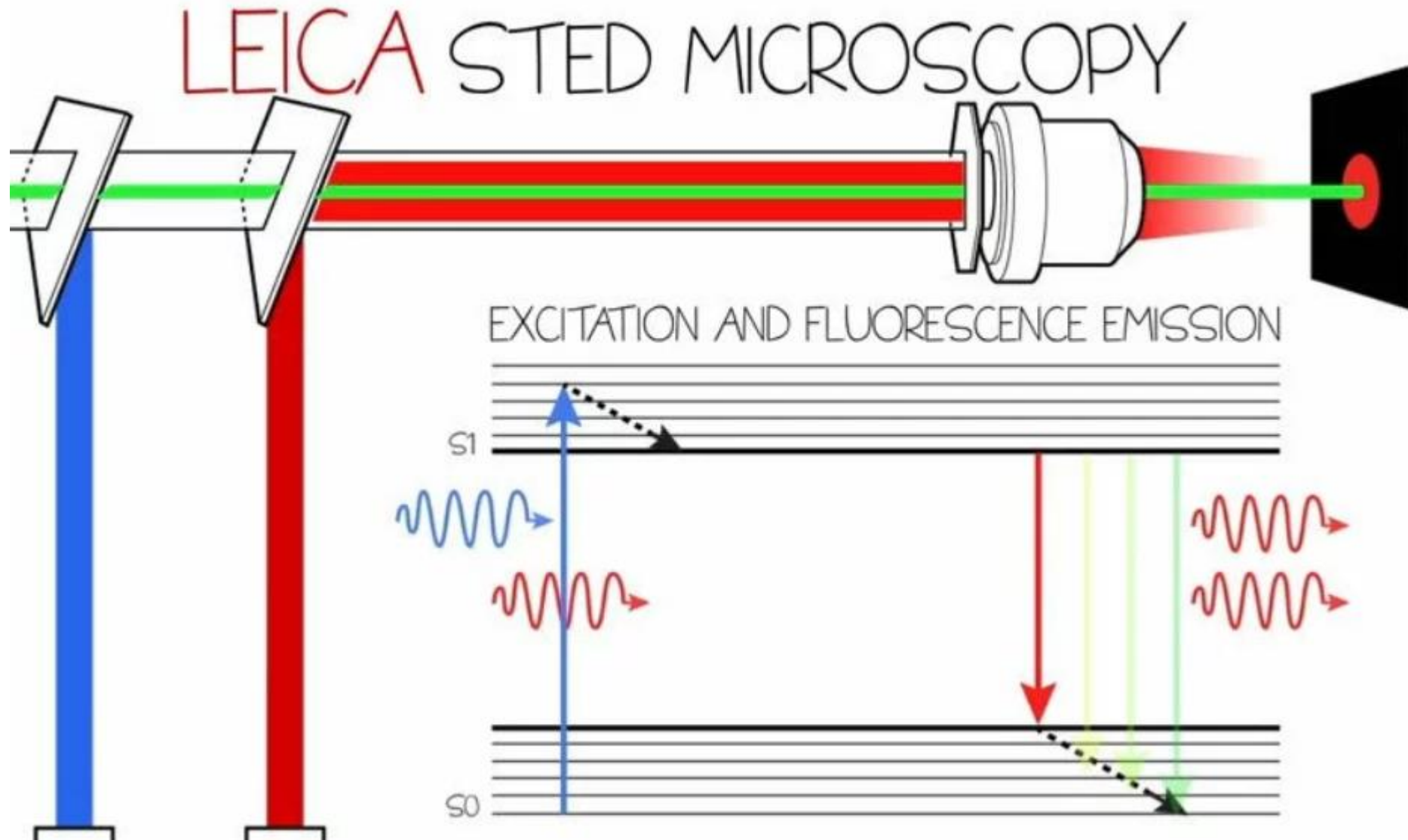


Felbontóképesség-Diffrakciós limit (Abbe)

- Diffrakciós limit $\sim \lambda / 2$
- Kb. 200-250 nm

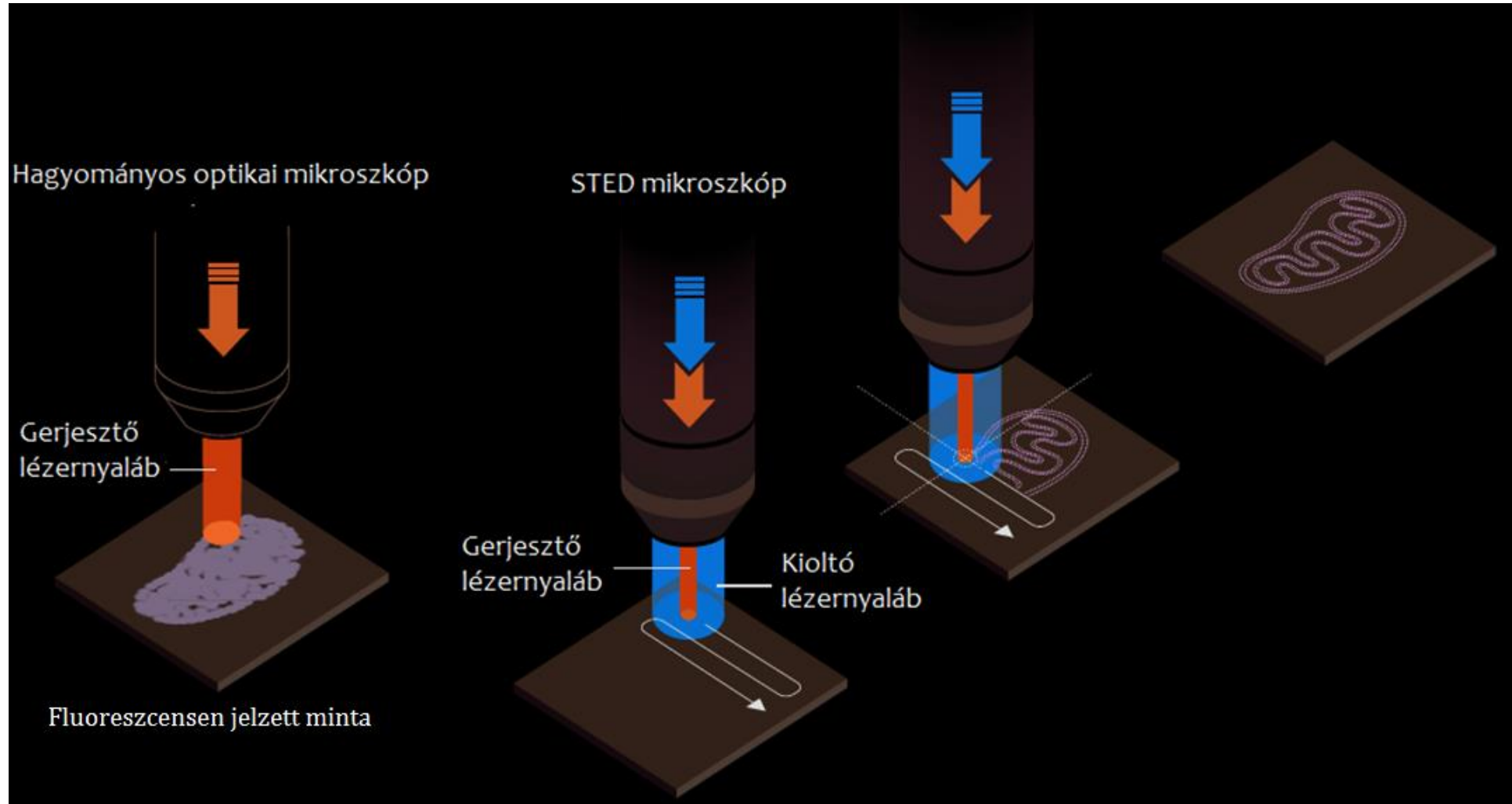


Szuperfelbontású mikroszkópia (STED) determinisztikus módszerek

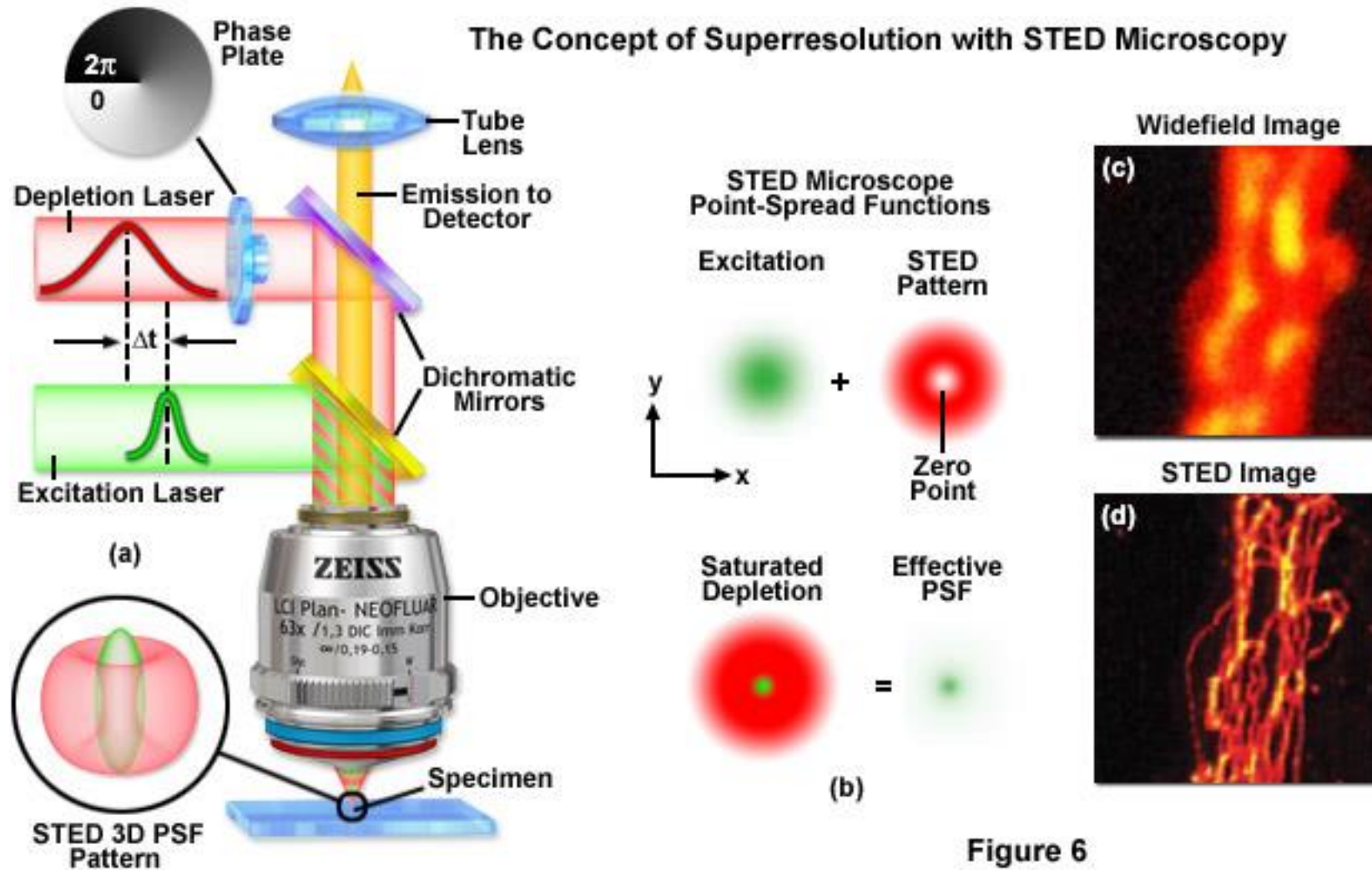


Szuperfelbontású mikroszkópia (STED)

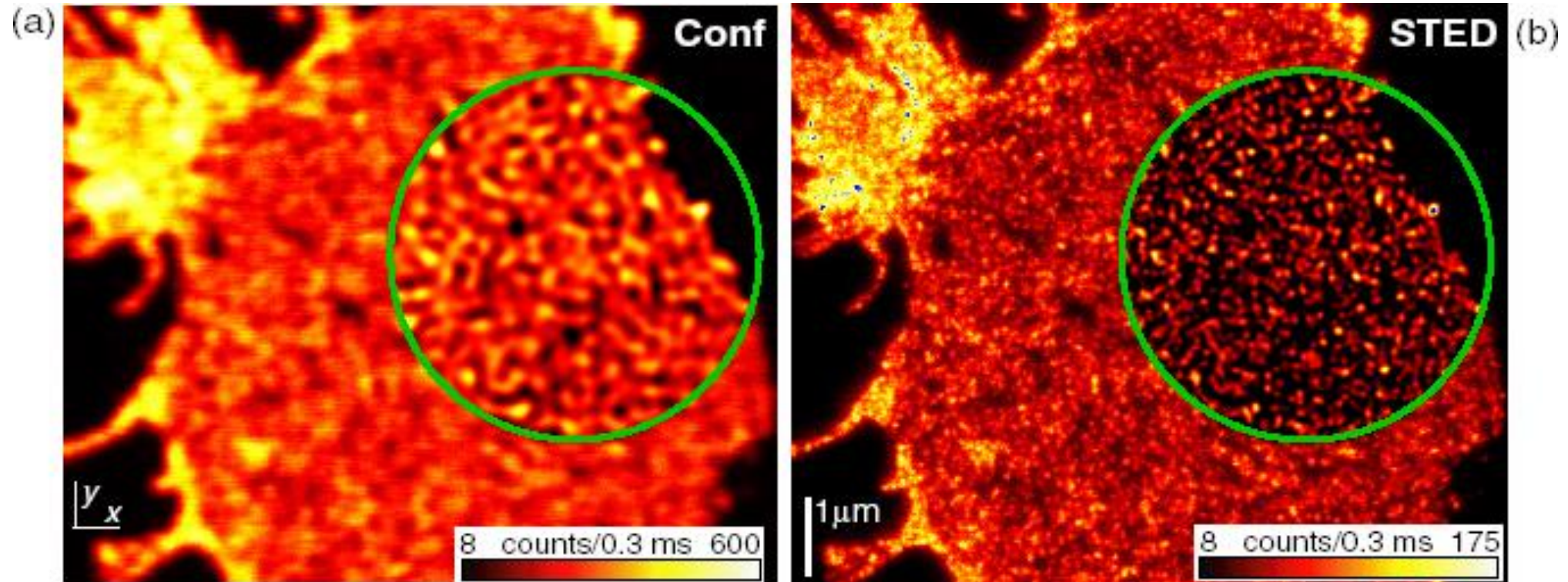
determinisztikus módszerek



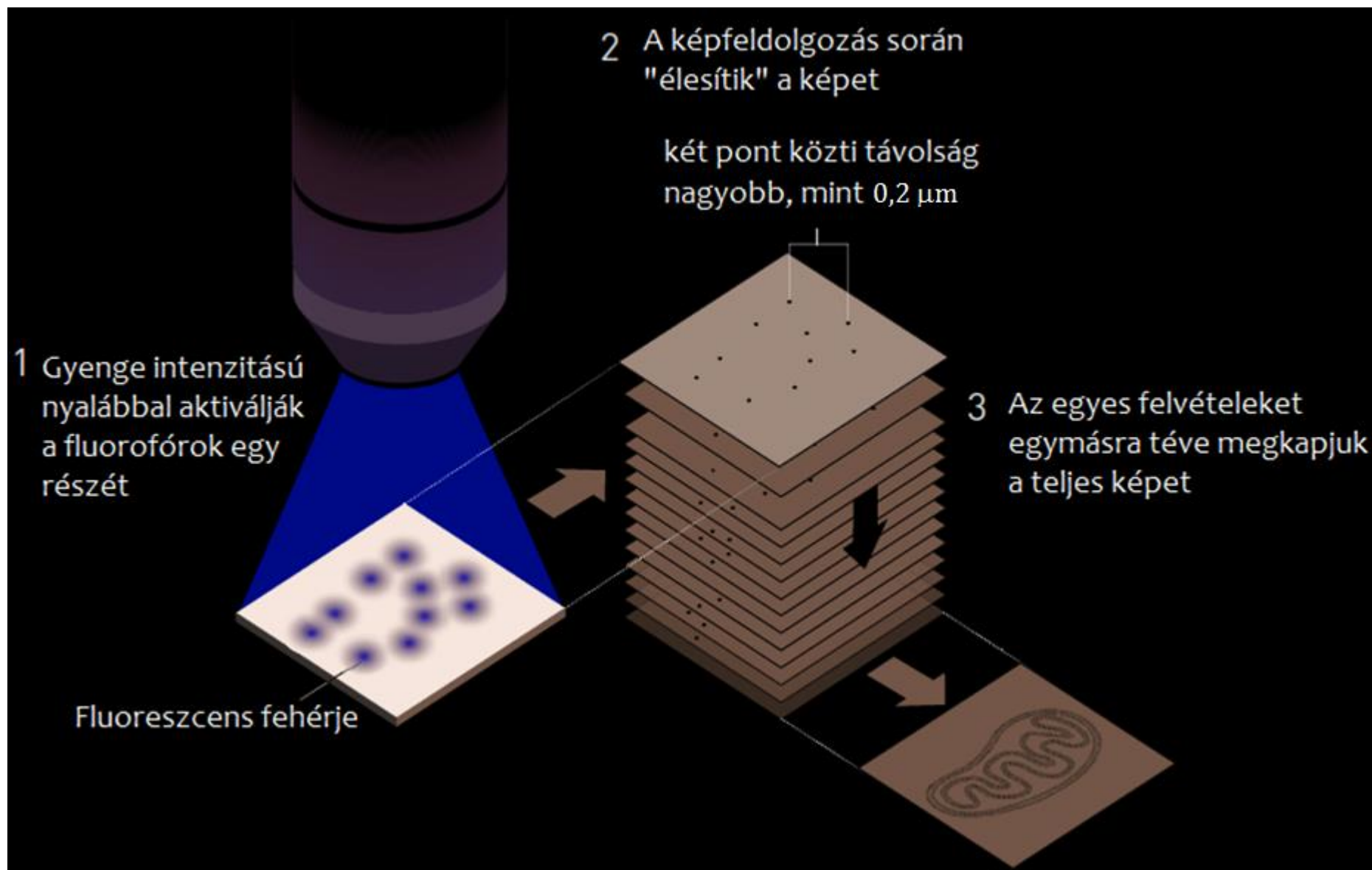
STED – stimulált kioltás



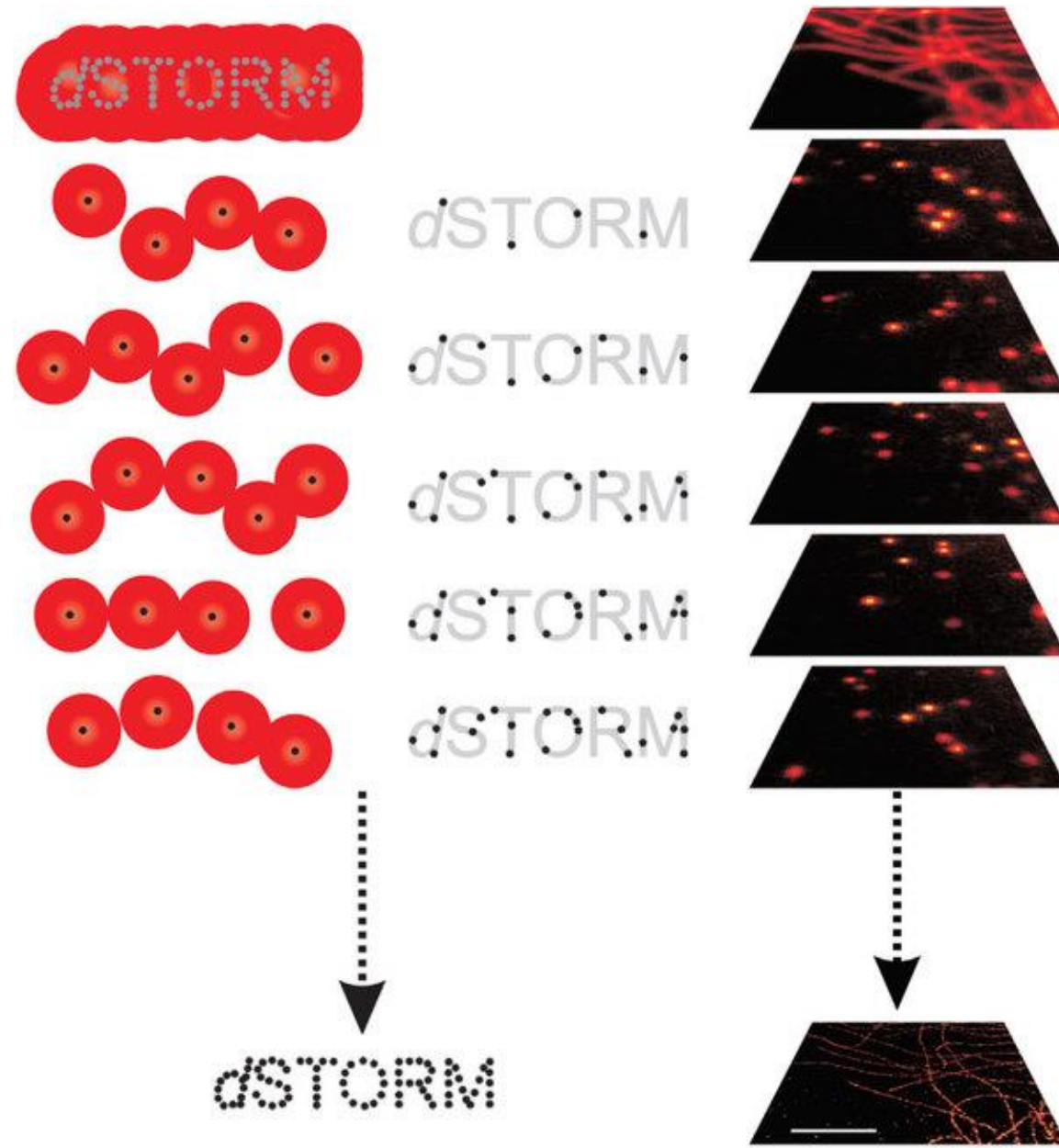
Szuperfelbontású mikroszkópia (STED)



Sztochasztikus módszerek



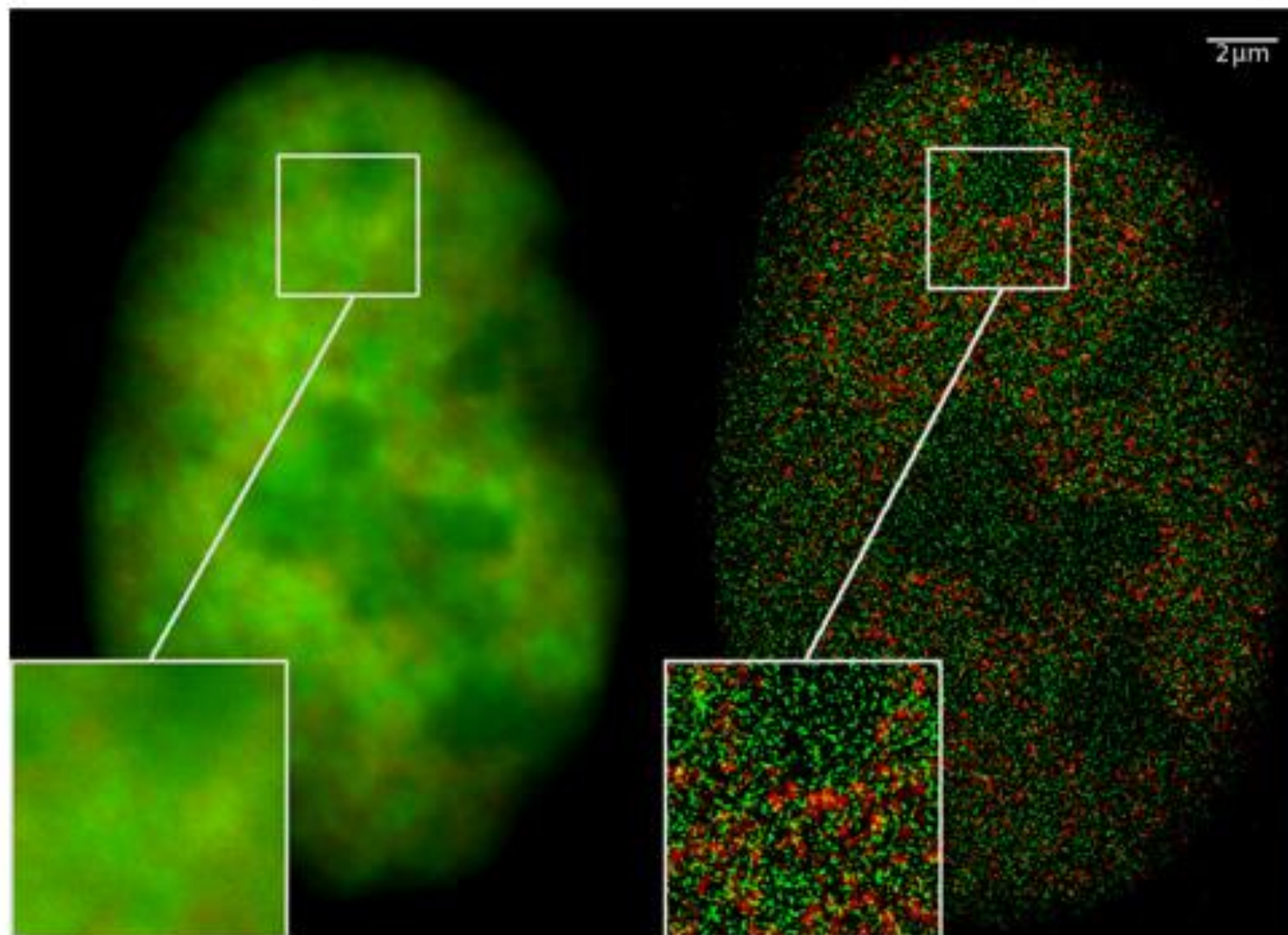
Sztochasztikus módszerek



Szuperfelbontású mikroszkópia

Conventional Epifluorescence

Dual Color Localization Microscopy

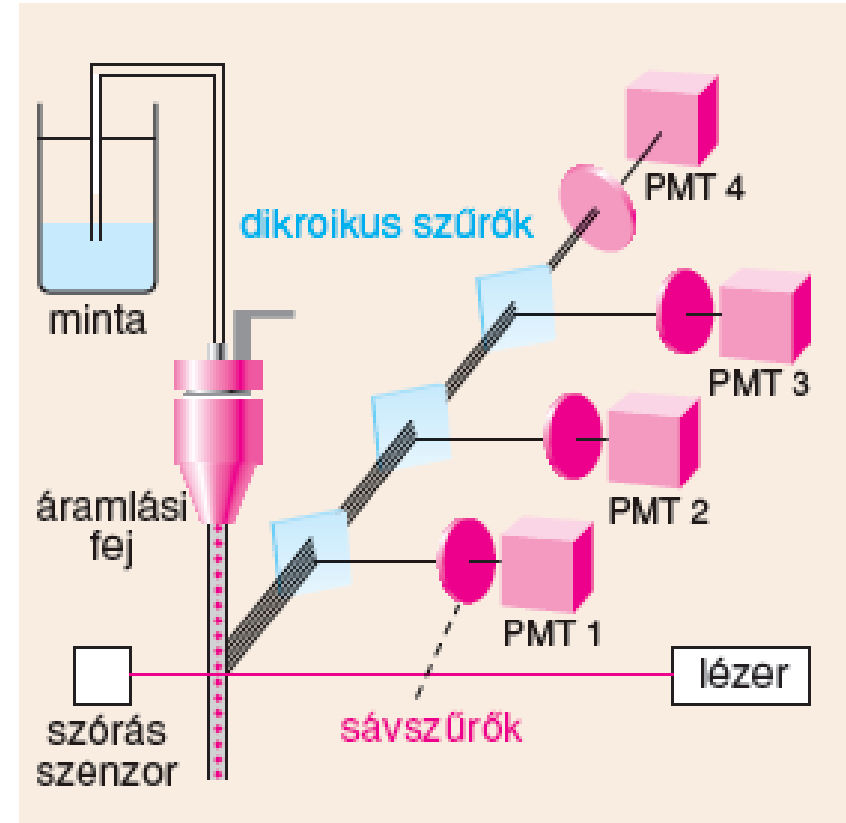
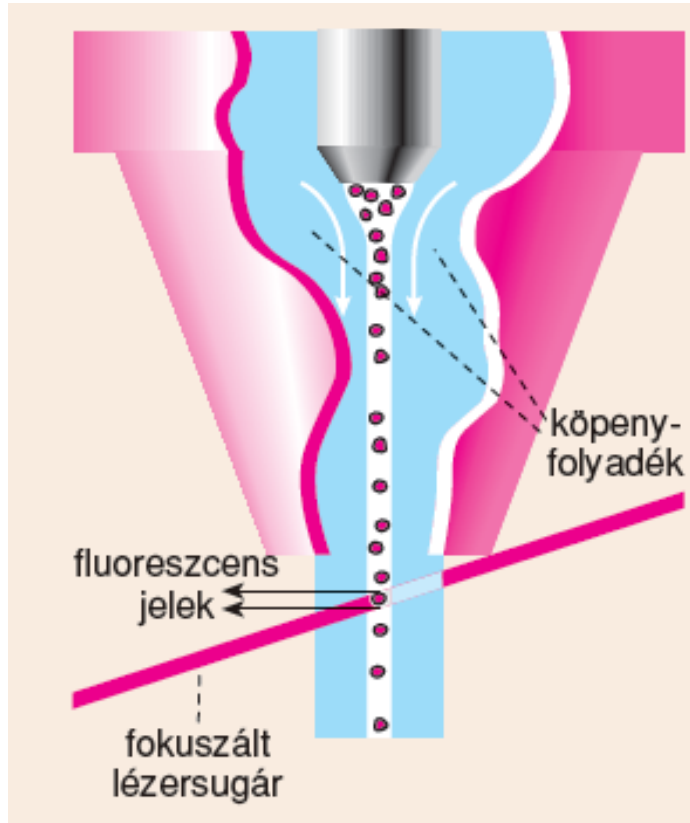


Gunkel et al. 2009

Áramlási citometria

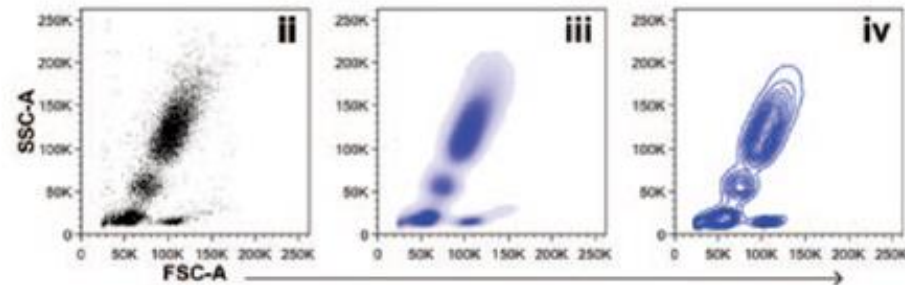
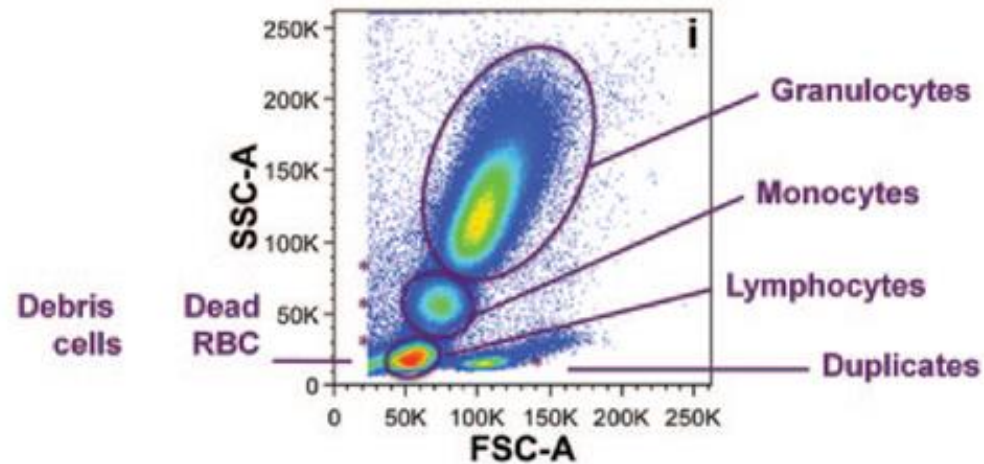
- Sejtek, partikulumok, gyöngyök számlálása és analízise folyadékáramban *fluoreszcensen jelölt ellenanyagok* segítségével
- A sejteket szuszpenzióban hidrodinamikai módszerrel fókuszálják egy lézer előtt, így azok gyöngyszerűen, egyesével vonulnak el a lézer előtt egy folyadékcseppben. A kibocsátott fotonok (legalább) három detektorba jutnak:
 - FSC: forward scatter: sejtek mérete
 - SSC: side scatter: sejtek granuláltsága szerkezete
 - Fluoreszcens detektor: a megkötődött jelzett ellenanyagok alapján a kimutatni kívánt fehérje minősége, mennyisége

Áramlási citometria



Áramlási citometria

Scatter plot: A hasonló fizikai és kémiai tulajdonságokkal rendelkező sejtek egy klasztert alkotnak a szóródási diagramon (kapuzás)



Event Count: 381519
Whole blood sample 1

Áramlási citometria – diagnosztikai alkalmazás

Vér

vörösvértest (vvt)

fehérvérsejtek (fvs)

vérlemezkék (thr)

Vizelet:

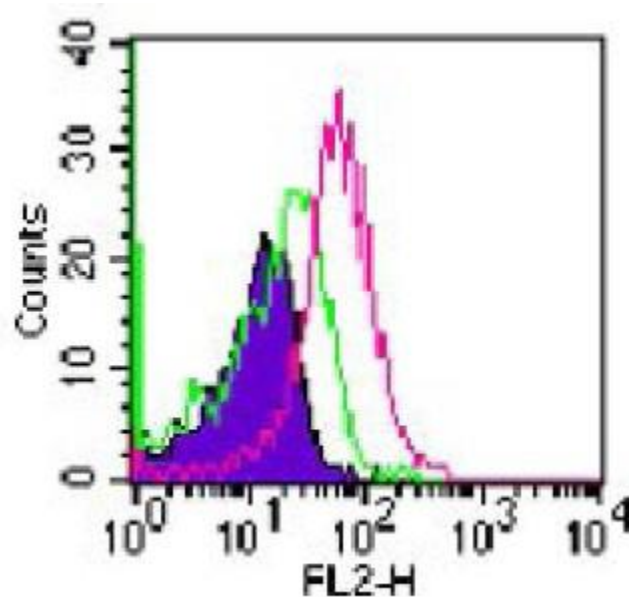
baktériumok

vérsejtek/vértestek

Áramlási citometria

Hisztogram: azonos fluoreszcens intenzitású sejtek száma

- Események száma: ha ez nő, akkor több sejt expresszálja a vizsgált fehérjét (mennyi sejt)
- Intenzitás: ha a csúcspont marad, de eltolódik magasabb intenzitás irányába, akkor ugyanannyi sejt expresszálja a fehérjét, de fokozottan, azaz több található a sejten (mennyi molekula)



Az áramlási citometria alkalmazásai

- DNS tartalom mérés (pl. élő, szaporodó, normál, rákos sejtpopulációk azonosítása)
- Adott fehérjét termelő sejtek (mennyiségi és minőségi) azonosítása, az egyes sejtek szétválogatása (pl. X, vagy Y hímivarsejtek elválasztása)
- Adott sejtek egymáshoz viszonyított aránya (pl. HIV fertőzés)
- Egyéb betegségek szűrése

Fluorescence activated cell sorting (FACS)

- Az áramlási citometria egy speciális alkalmazása
- Az áramlást úgy szabályozzák, hogy kellő „hézag” legyen az egyes sejtek közt
- A jelnek megfelelően a leszakadó, egy sejtet tartalmazó cseppre töltést juttatnak, majd a megfelelő szedőbe gyűjtik (a töltés alapján)

