



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗ
επένδυση στην κοινωνία της γνώσης

ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗΣ ΑΕΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΠΙΚΑΙΡΟΠΟΙΗΣΗ ΓΝΩΣΕΩΝ ΑΠΟΦΟΙΤΩΝ ΑΕΙ (ΠΕΓΑ)

«Οι σύγχρονες τεχνικές βιο-ανάλυσης στην υγεία, τη γεωργία, το περιβάλλον και τη διατροφή»

ΑΝΟΣΟΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

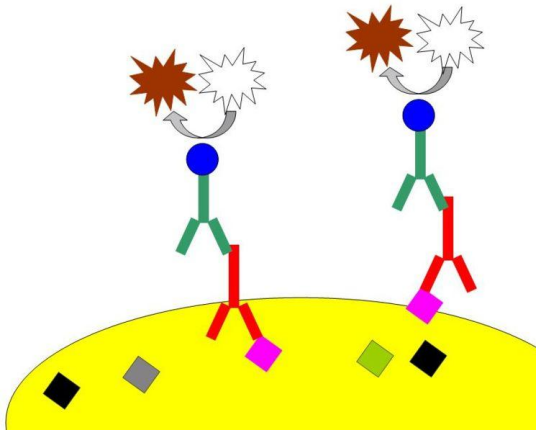
ΑΝΟΣΟΙΣΤΟΧΗΜΕΙΑ- ΣΥΝΕΣΤΙΑΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ELISA

Άννα-Μαρία Ψαρρά
Επίκουρος Καθηγήτρια
Τμήμα Βιοχημείας Βιοτεχνολογίας
Λάρισα, 2014

Ανοσοϊστοχημεία

Ανοσοϊστοχημεία

Μέθοδος προσδιορισμού βιολογικών μορίων σε βιολογικά παρασκευάσματα, στηρίζεται στην χημική συγγένεια και σύνδεση αντιγόνου-αντισώματος και στην ανάπτυξη μεθόδων ανίχνευσης του αντισώματος



Βιολογικά παρασκευάσματα

→ **Ιστός** (Ανοϊστοχημεία, Immunohistochemistry)

→ **Κύτταρα σε καλλιέργεια** (Ανοσοκυτταροχημεία, Immunocytochemistry)

Φύση αντιγόνου

Πρωτεΐνες, υδατάνθρακες, νουκλεϊκά οξέα, λιπίδια

Εντόπιση αντιγόνου

Πλασματική Μembrάνη, υποκυτταρικά διαμερίσματα, μεμβρανικά ή διαλυτά συστατικά του κυττάρου

Αντισώματα

Μονοκλωνικά

Υψηλή εξειδίκευση

Παράγονται συνήθως σε επίμυες

Παράγονται δύσκολα με υψηλό κόστος

Πολυκλωνικά

Υψηλής συγγένειας

Πολλοί αντιγονικοί επίτοποι

Χαμηλότερη εξειδίκευση

Παράγονται εύκολα

Αναπτύσσονται σε κουνέλι, πρόβατο ή γίδα

Μέθοδοι ανοσοεντόπισης

1. Άμεση

Απευθείας σήμανση του πρωτογενούς
αντισώματος

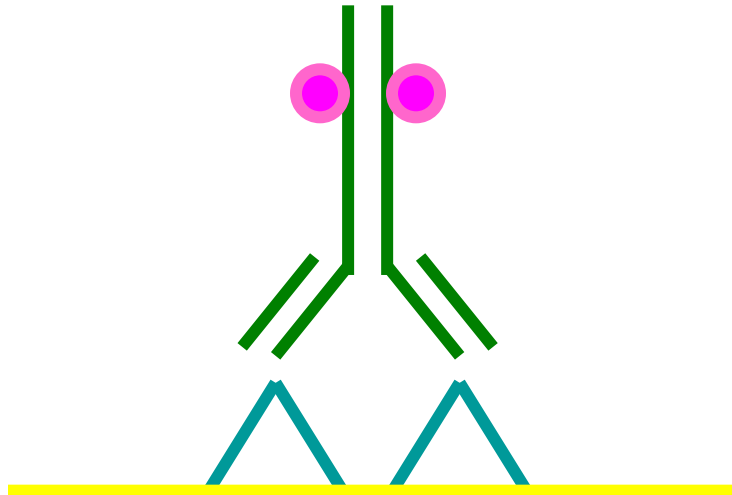
2. Έμμεση

Σήμανση δευτερογενούς αντισώματος

Άμεση μέθοδος

Σημασμένο
πρώτο αντίσωμα

Αντιγόνο

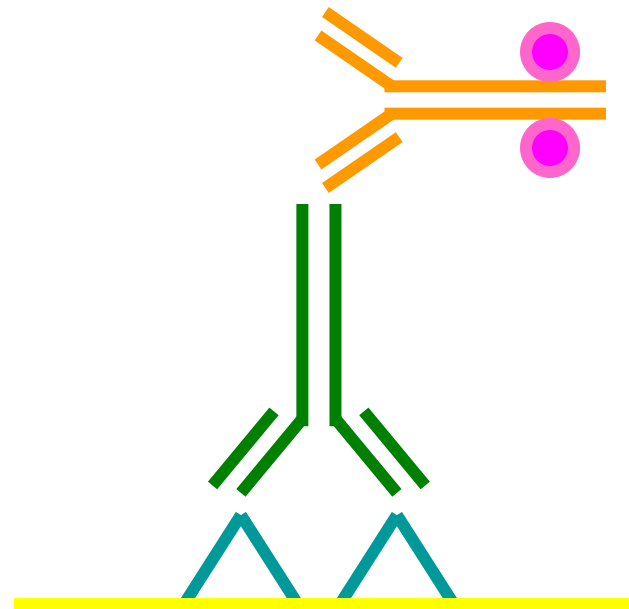


Έμμεση μέθοδος

Σημασμένο 2^ο αντίσωμα

1^ο αντίσωμα

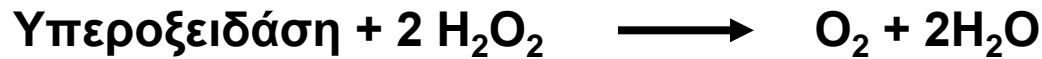
Αντιγόνο



Σήμανση αντισωμάτων

1. Φθορίζουσα
2. Συνδεδεμένα με ένζυμα
 1. Αλκαλική φωσφατάση
 2. Υπεροξειδάση
 3. Οξειδάση γλυκόζης
3. Σωματίδια χρυσού

Υπεροξειδάση



DAB: Διάμινο βενζιδίνη

Αλκαλική Φωσφατάση

Φωσφατάση με υψηλή δραστηριότητα σε αλκαλικό περιβάλλον
Παραγωγή έγχρωμου προϊόντος

Οξειδάση γλυκόζης



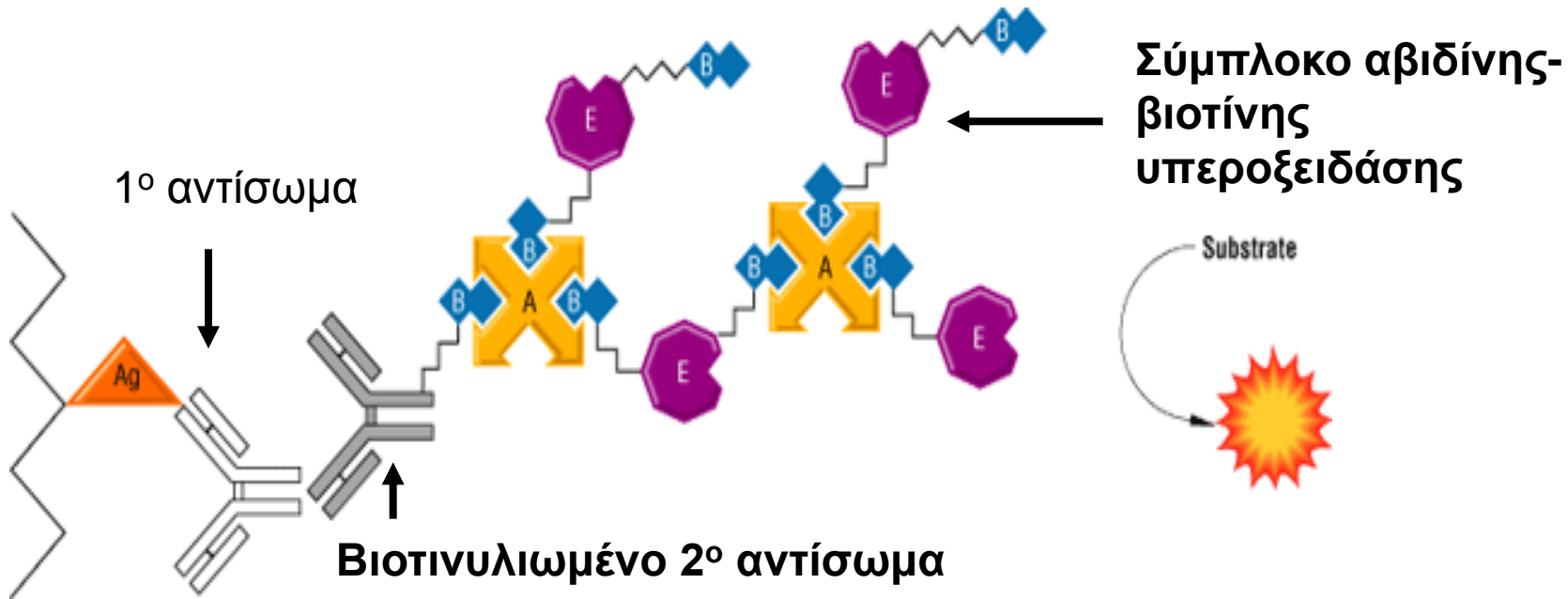
Συνένζυμο FAD



Χρωματομετρικός προσδιορισμός

Ενίσχυση σήματος

Σύμπλοκο αβιδίνης-βιοτίνης



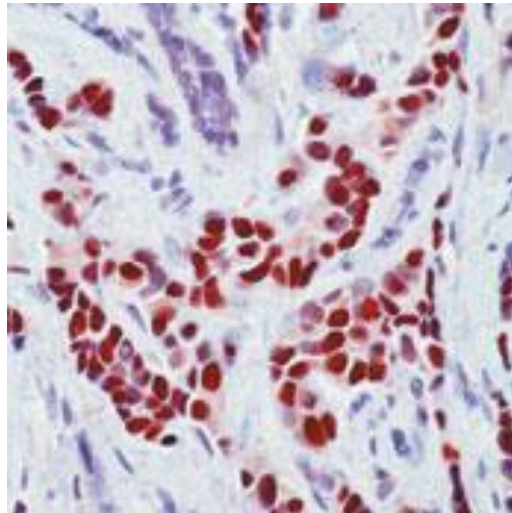
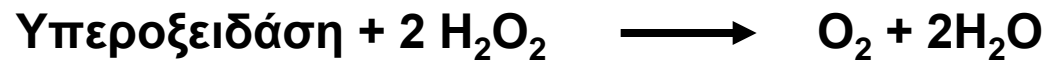
Βιοτίνη: χαμηλού μοριακού βάρους πρωτεΐνη, η οποία μπορεί να συνδεθεί με αντίσωμα

Αβιδίνη: μεγάλη γλυκοπρωτεΐνη η οποία μπορεί να συνδέεται απ' ευθείας με υπεροξειδάση ή φλουορεσκείνη είτε να επωαστεί με βιοτινυλιωμένα ένζυμα υπεροξειδάσης, αλκαλικής φωσφατάσης.

Ανίχνευση σήματος

Μέθοδος υπεροξειδάσης

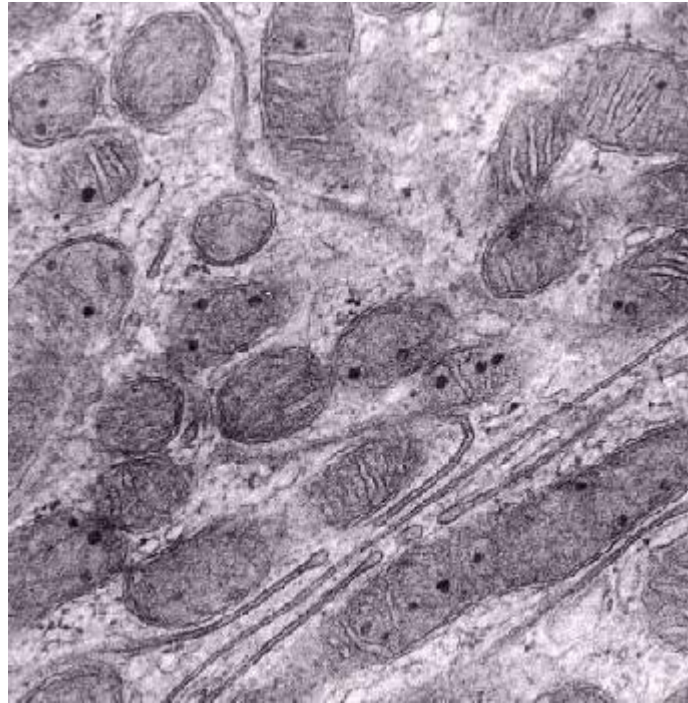
Υπεροξειδάση



Υποδοχέας οιστρογόνων σε καρκινικά κύτταρα μαστού

Ανίχνευση σήματος

Ηλεκτρονική Μικροσκοπία



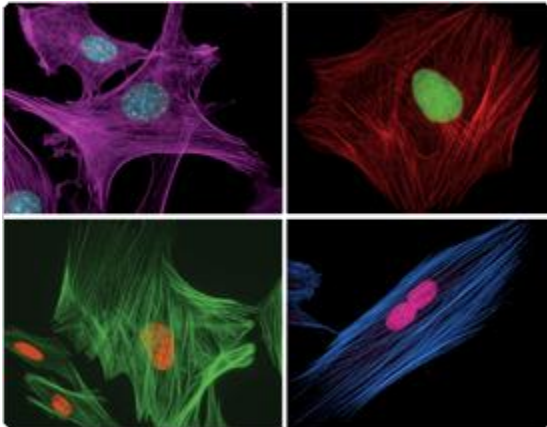
Το μέγεθος των σωματιδίων χρυσού κυμαίνεται από 1-40 nm,

Είναι δυνατή η σήμανση περισσότερων από δύο μορίων χρησιμοποιώντας 1^α αντισώματα από διαφορετικό είδος και 2^α σημασμένα με διαφορετικό μέγεθος χρυσού

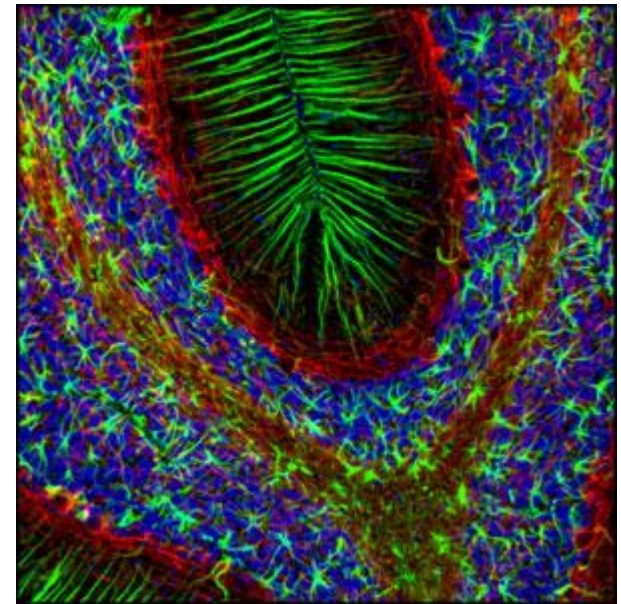
Ανίχνευση σήματος

Μέθοδος Ανοσοφθορισμού

Άμεση



Έμμεση

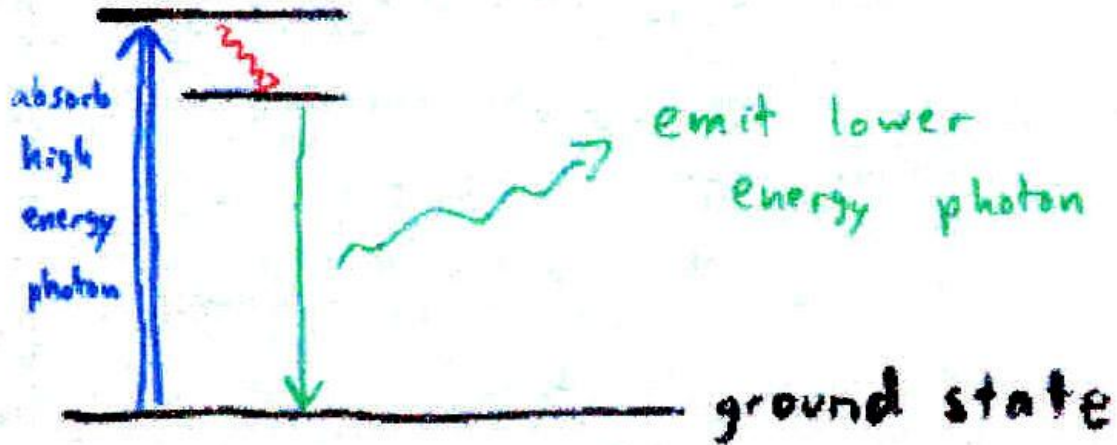


Phalloidin απ' ευθείας σημασμένα με φθορίζουσα

GFAP
NF
DAPI

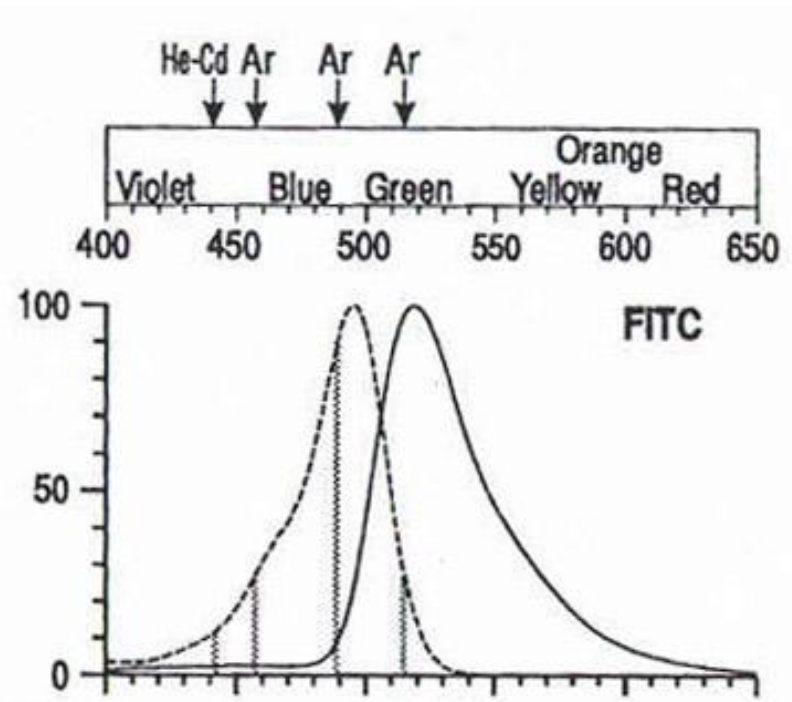
Φθορισμός-Αρχή

What is fluorescence?



FITC (Φλουροσκεΐνη)

Φάσμα εκπομπής και διέγερσης



Διέγερση με Laser Αργού (488 nm)

Εκπομπή (510-530 nm)

Προετοιμασία δείγματος

Μονιμοποίηση δείγματος

Ιστός

Παραφίνη → Τομές σε μικροτόμο (5-10 μm)
Διατηρούνται σε θερμοκρασία δωματίου

OCT (optimal cutting temperature)

→ Τομές σε κρυοστάτη (φύλαξη σε κατάψυξη),
κόβονται πιο δύσκολα σε σχέση με τις τομές παραφίνης
Επίτευξη λεπτότερων τομών σε σχέση με κρυοτόμο
Διατηρούν καλύτερα τους αντιγονικούς επιτόπους
Ο ιστός μπορεί και να μη διατηρήσει καλά την μορφολογία του

Εν αιώρηση παρασκευάσματα → Vibratome

Κύτταρα -Ιστός

Μονιμοποίηση – Αύξηση διαπερατότητας μεμβράνης

- MeOH/Ακετόνη (-20°C)
- Παραφορμαλδεΐδη (PFA)/Triton
- PFA/Ακετόνη
- PFA/Γλουταραλδεΐδη (ηλεκτρονική μικροσκοπία)
- Άμεση κατάψυξη σε υγρό άζωτο, τομές σε OCT (ειδικά όταν η χρησιμοποίηση αλδεΐδης δεν ενδείκνυται δεδομένου ότι μπορεί να καταστρέφει το παρασκεύασμα)

Μπλοκάρισμα μη ειδικών θέσεων

Επώαση των δειγμάτων με άπαχο γάλα ή ορό ζώου σε ποσοστό 5-10% σε ρυθμιστικό διάλυμα pH 7.4 (1 – 3 h θερμοκρασία δωματίου)

Επώαση με το πρώτο αντίσωμα

Επώαση με το αντίσωμα έναντι του αντιγόνου (μορίου στόχου) διαλυτοποιημένο σε κατάλληλη αραίωση σε ρυθμιστικό διάλυμα pH 7.4, παρουσία 2% άπαχου γάλατος

Εκπλύσεις του δείγματος σε ρυθμιστικό διάλυμα pH 7.4, προς απομάκρυνση άδετου 1^{ου} αντισώματος

Επώαση με το δεύτερο αντίσωμα

Επώαση με αντίσωμα έναντι του πρώτου αντισώματος διαλυτοποιημένο σε κατάλληλη αραίωση σε ρυθμιστικό διάλυμα pH 7.4, παρουσία 2% άπαχου γάλατος

Εκπλύσεις του δείγματος σε ρυθμιστικό διάλυμα pH 7.4, προς απομάκρυνση άδετου 2^{ου} αντισώματος

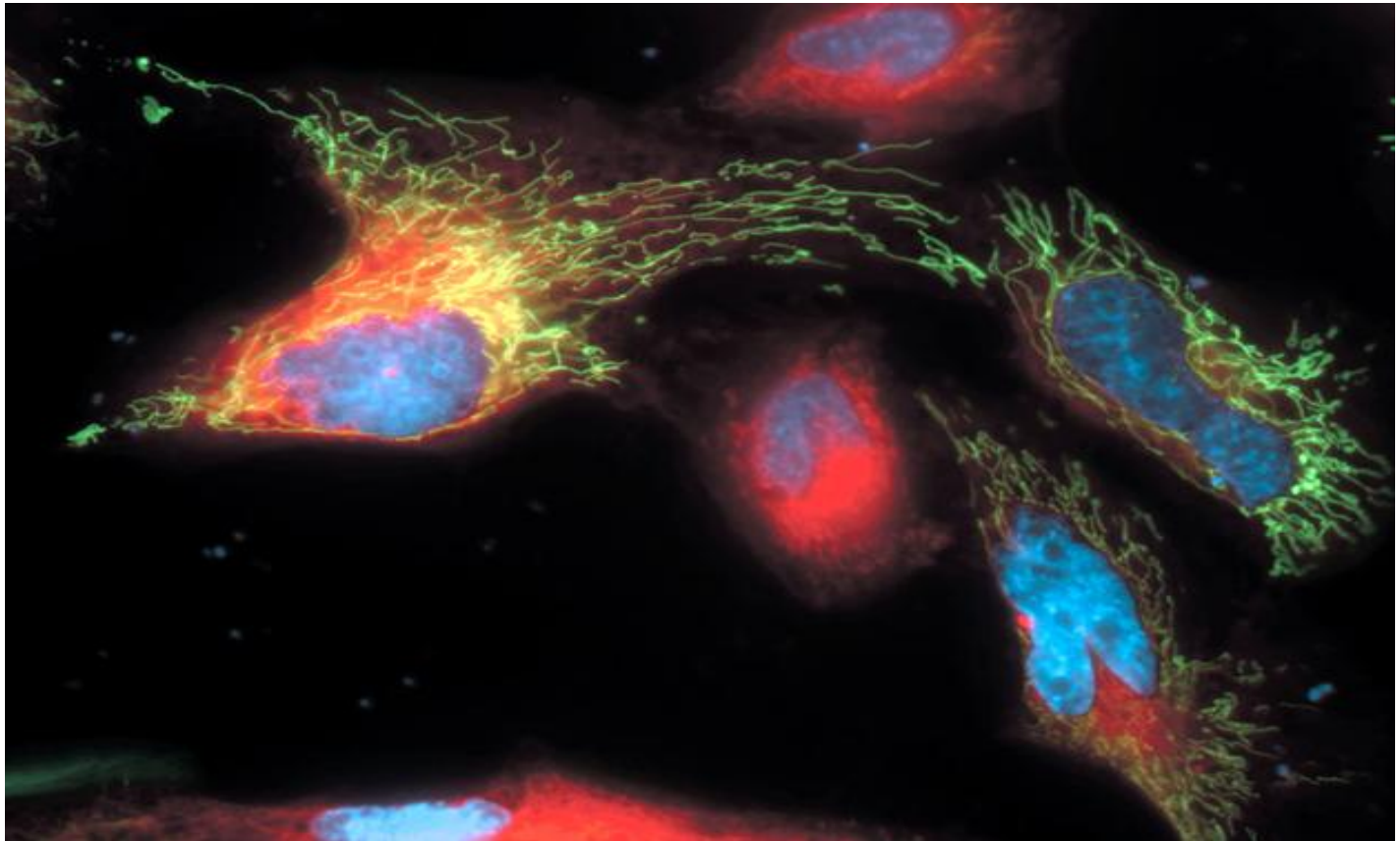
(Επώαση με το υπόστρωμα του ενζύμου που είναι συζευγμένο με το 2^ο αντίσωμα, αυτό δεν χρειάζεται αν το 2^ο αντίσωμα είναι συζευγμένο με φθορίζουσα) στο φθορισμο)

Επίστρωση του δείγματος με κατάλληλο υλικό και καλυπτρίδα ώστε να είναι δυνατή η παρακολούθηση του στο μικροσκόπιο

Συνεστιακή Μικροσκοπία (CONFOCAL MIKROSCOPY)

Μικροσκοπία φθορισμού

Συνεστιακή Μικροσκοπία

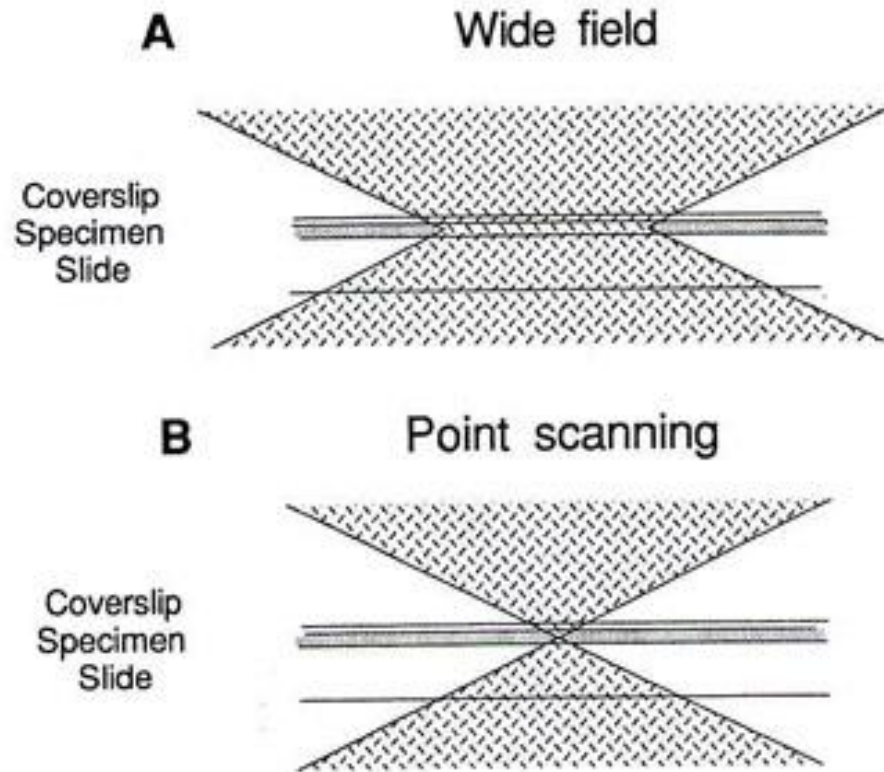




Πλεονεκτήματα χρησιμοποίησης συνεστιακής μικροσκοπίας έναντι συμβατικής μικροσκοπίας φθορισμού

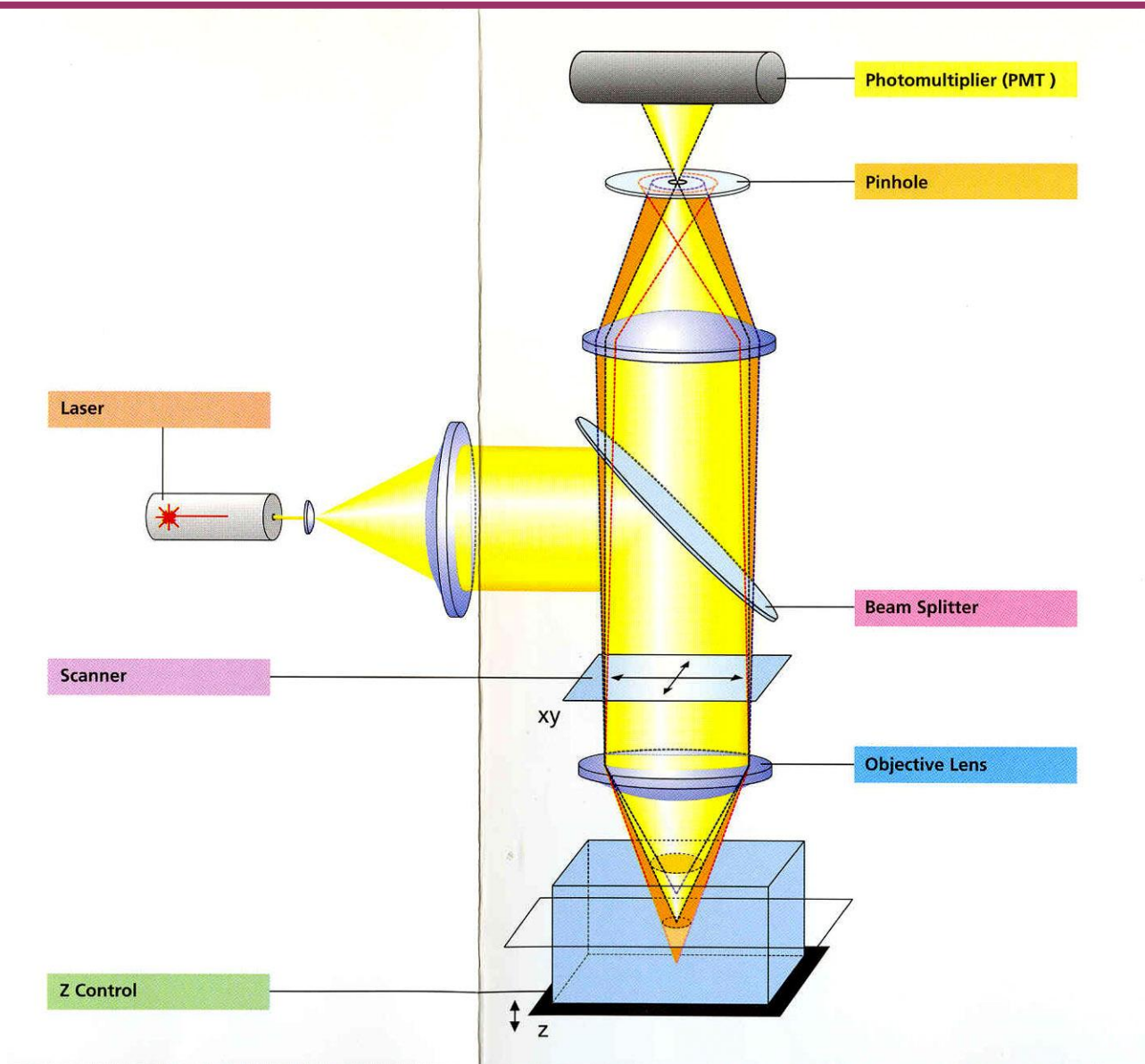
- **Ελαχιστοποίηση μη ειδικού σήματος από φθορισμό**
- **Το σήμα προέρχεται από σημείο και όχι εύρος περιοχής**
- **Laser και όχι UV ακτινοβολία**
- **Οπτικές τομές, Ελαχιστοποίηση βλάβης δείγματος**
- **Ευκρίνεια κυτταρικών δομών**
- **Έλεγχος συνεντόπισης μορίων**
- **Τομές κατά τον Z-άξονα**
- **Απόκτηση τρισδιάστατης δομής κυτταρικών δομών**
- **Μελέτες σε ζωντανά κύτταρα**
- **Παρακολούθηση κίνησης μορίων σε ζωντανά κύτταρα (π.χ. FRAP)**
- **Παρακολούθηση αλληλεπίδρασης μορίων (FRET)**
- **Πολλαπλή σήμανση διαφορετικών μορίων**

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

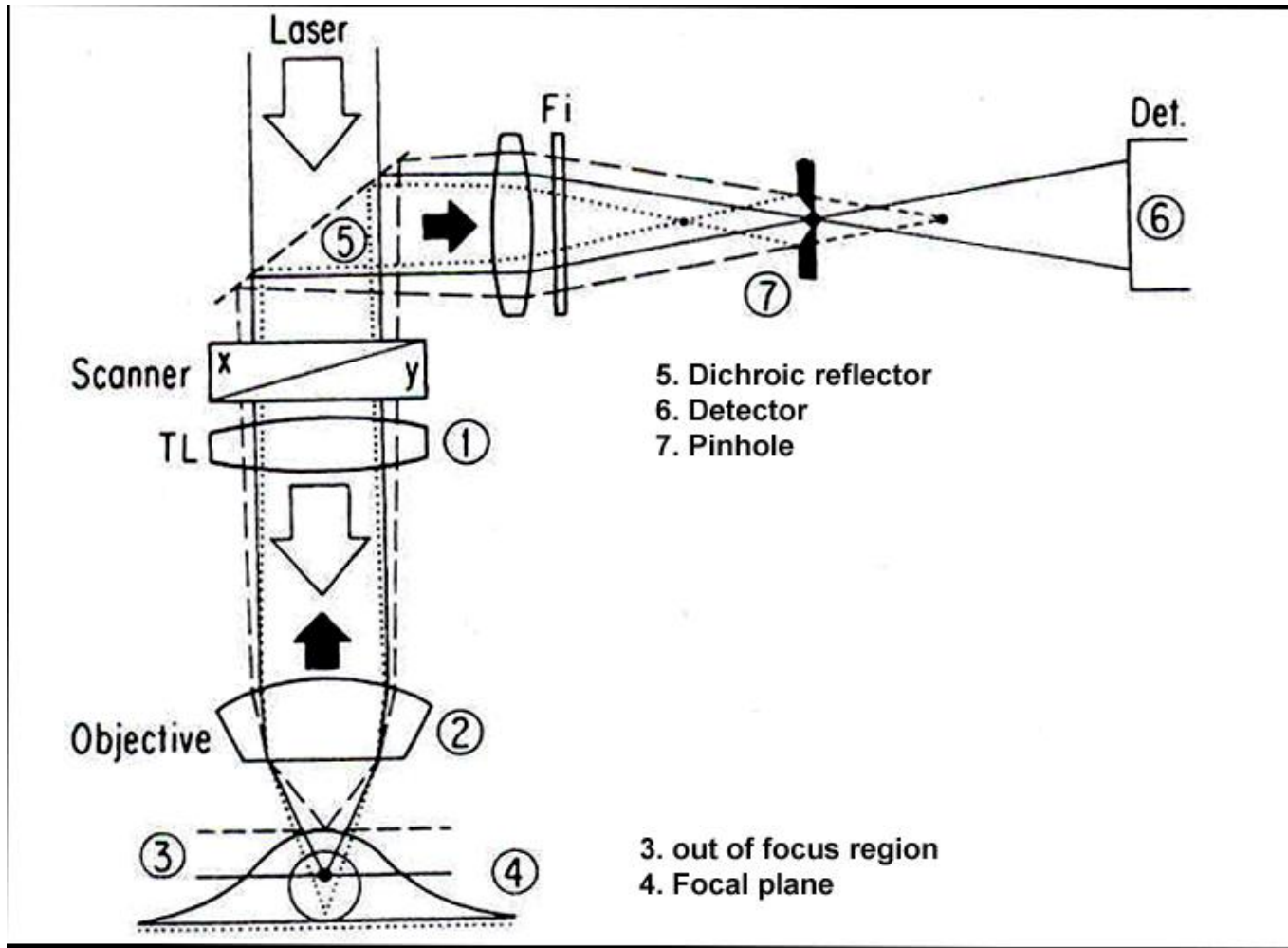


Τα συστήματα διέγερσης και ανίχνευσης εστιάζουν στον ίδιο στοιχειώδη όγκο

Ανατομία CLSM

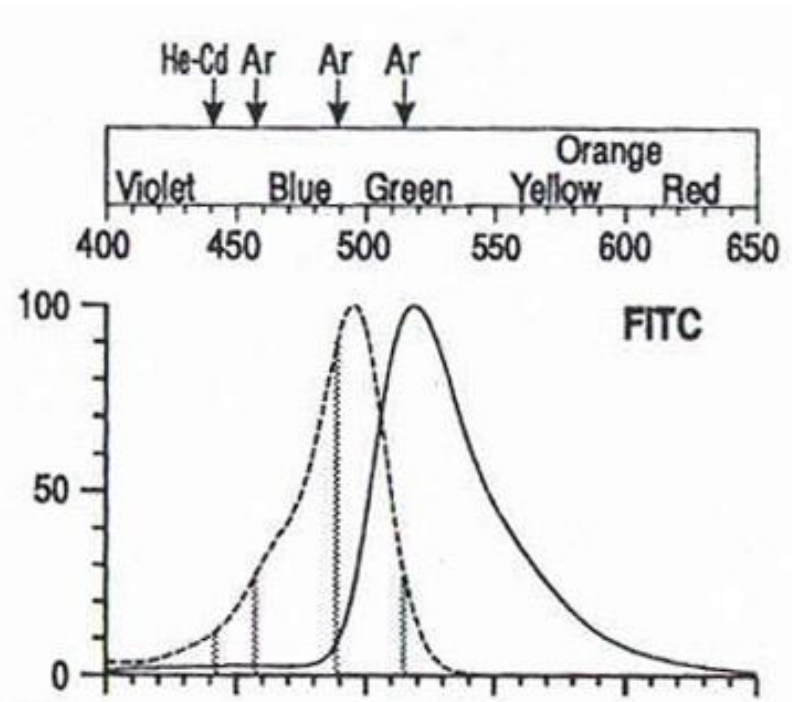


ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΛΗΨΗΣ ΕΙΚΟΝΑΣ CLSM



FITC (Φλουροσκεΐνη)

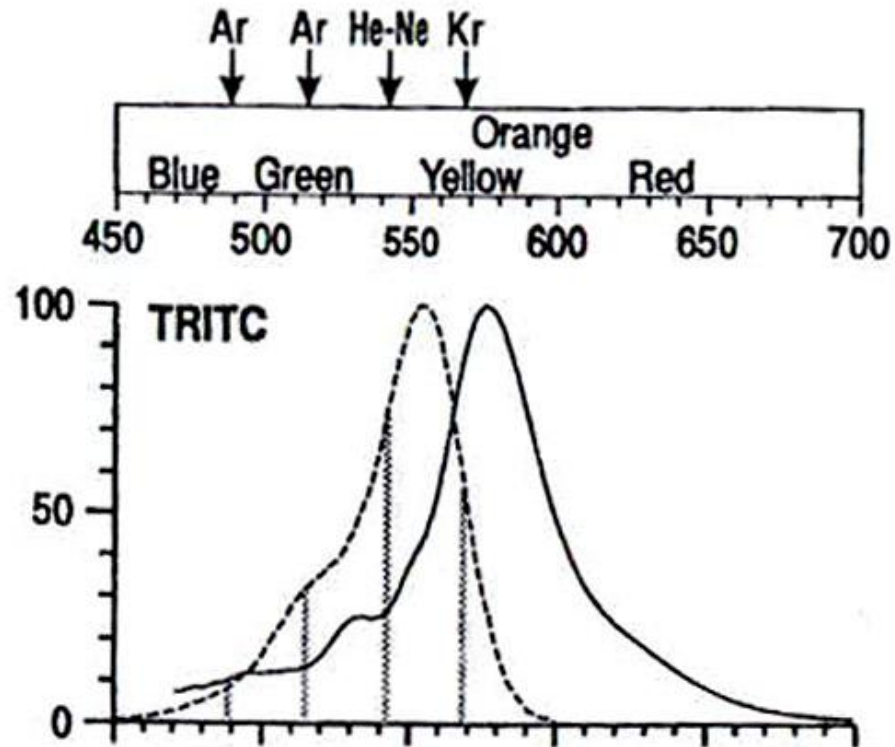
Φάσμα εκπομπής και διέγερσης



Διέγερση με Laser Αργού (488 nm)

Εκπομπή (510-530 nm)

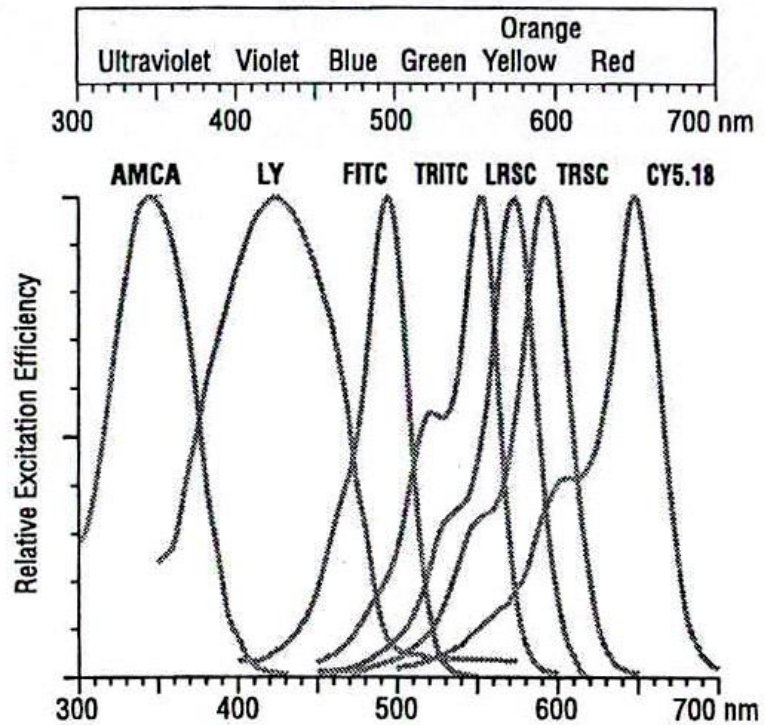
TRITC (Ροδαμίνη)



Διέγερση με Laser Ηλίου-Νέου (543-548 nm)

Εκπομπή (560-620 nm)

LASER



Ar Ion, Air Cooled, Small

Ar Ion, Air Cooled, Large

Ar Ion, Water Cooled

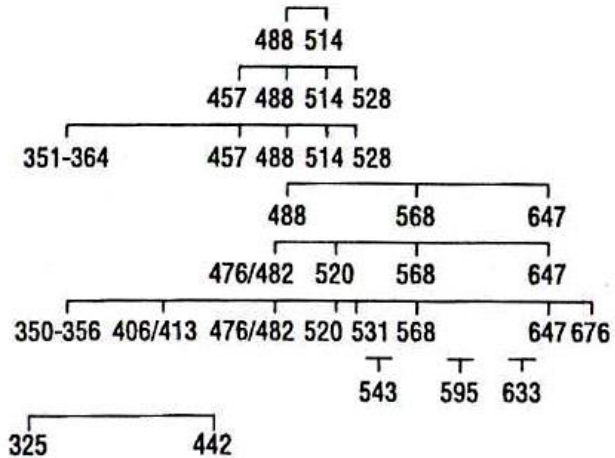
Kr-Ar Ion, Air Cooled

Kr Ion, Air Cooled

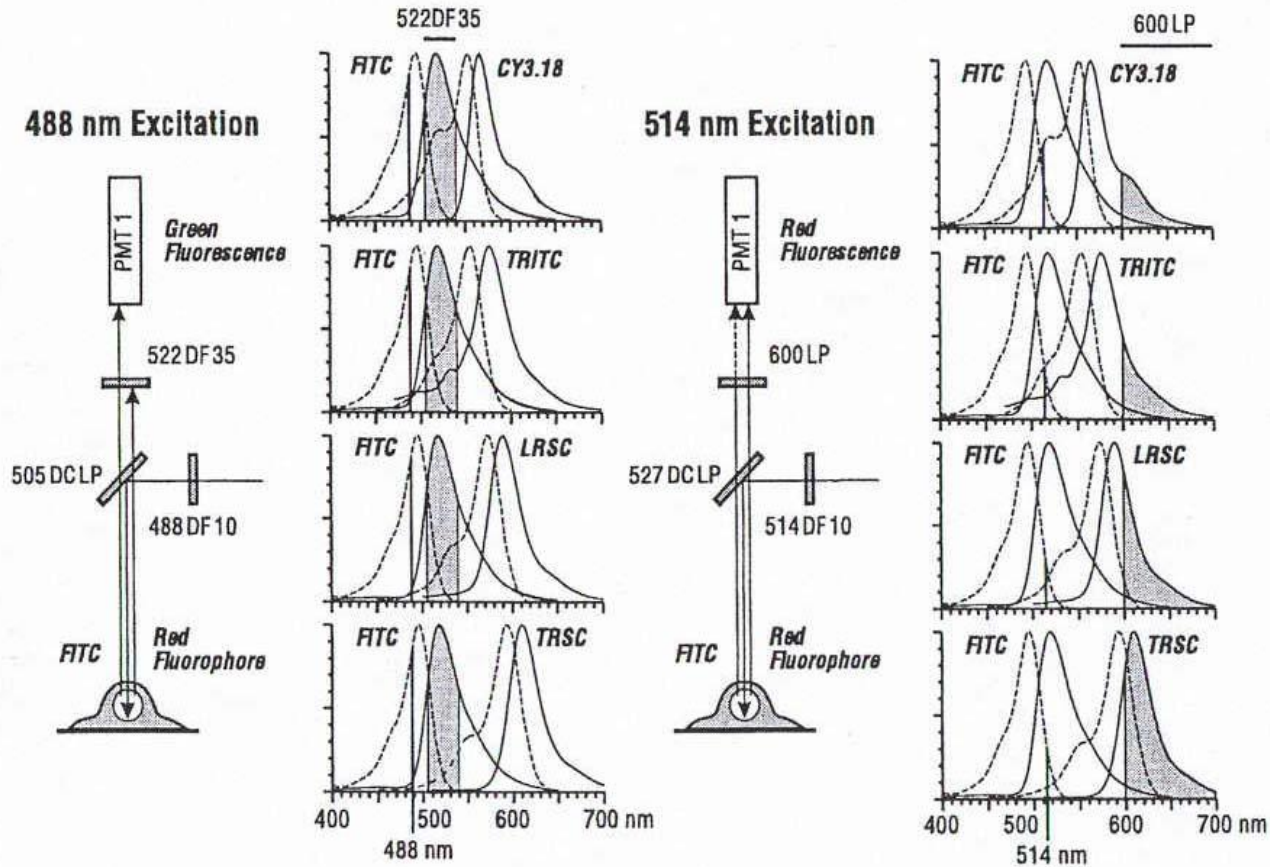
Kr Ion, Water Cooled

He-Ne

He-Cd



Η ΧΡΗΣΗ ΕΙΔΙΚΩΝ ΦΙΛΤΡΩΝ ΚΑΙ DICROIC BEAM SPLITTER ΕΠΙΤΡΕΠΕΙ ΤΗ ΛΗΨΗ ΕΙΔΙΚΟΥ ΣΗΜΑΤΟΣ

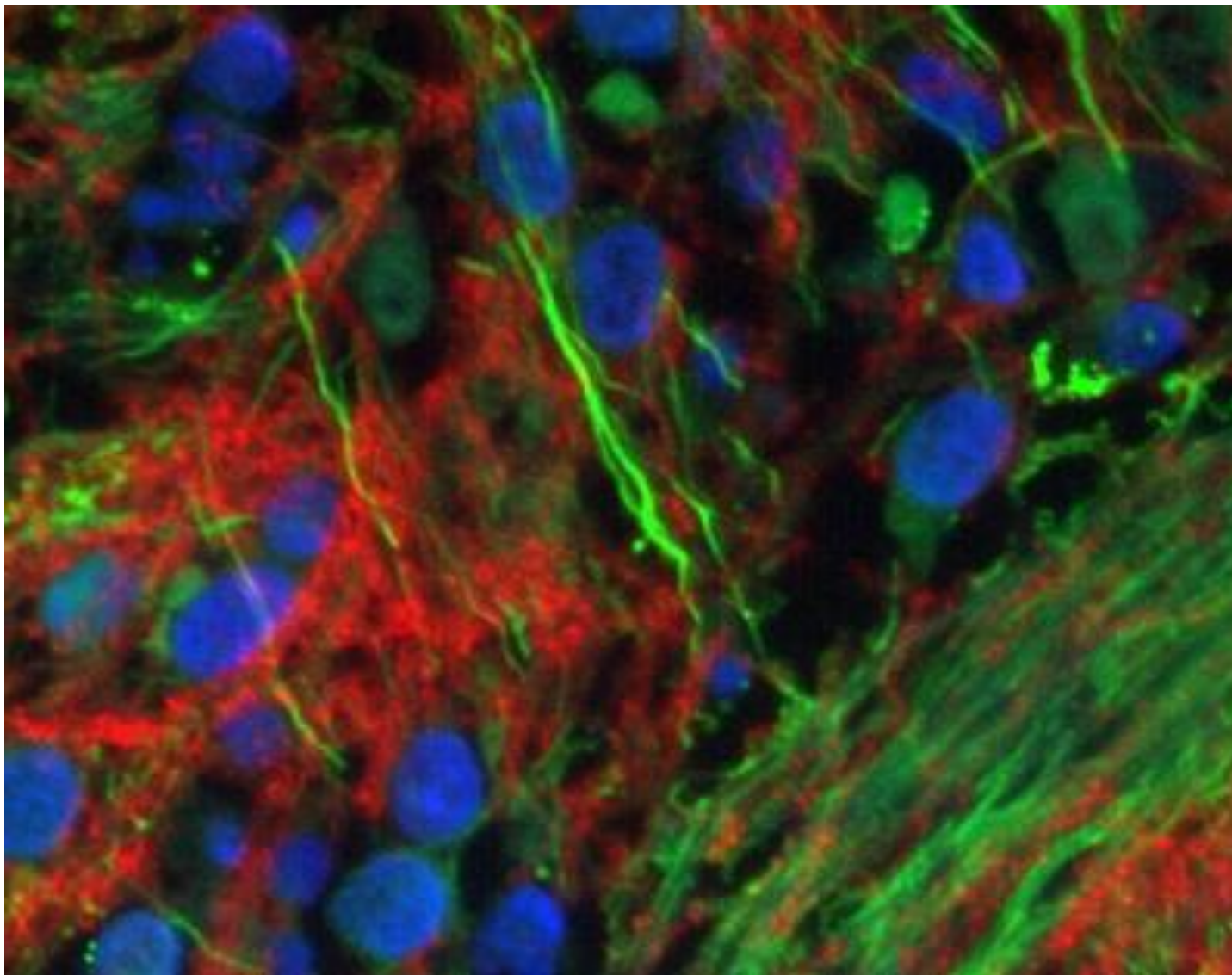


Ζωντανά κύτταρα

- **Διαμόλυνση, Έκφραση GFP χιμαιρικών πρωτεϊνών**
- **Φθορίζων Ιχνηθέτες**

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ CLSM

Ανοσοϊστοχημεία πολλαπλών χρώσεων



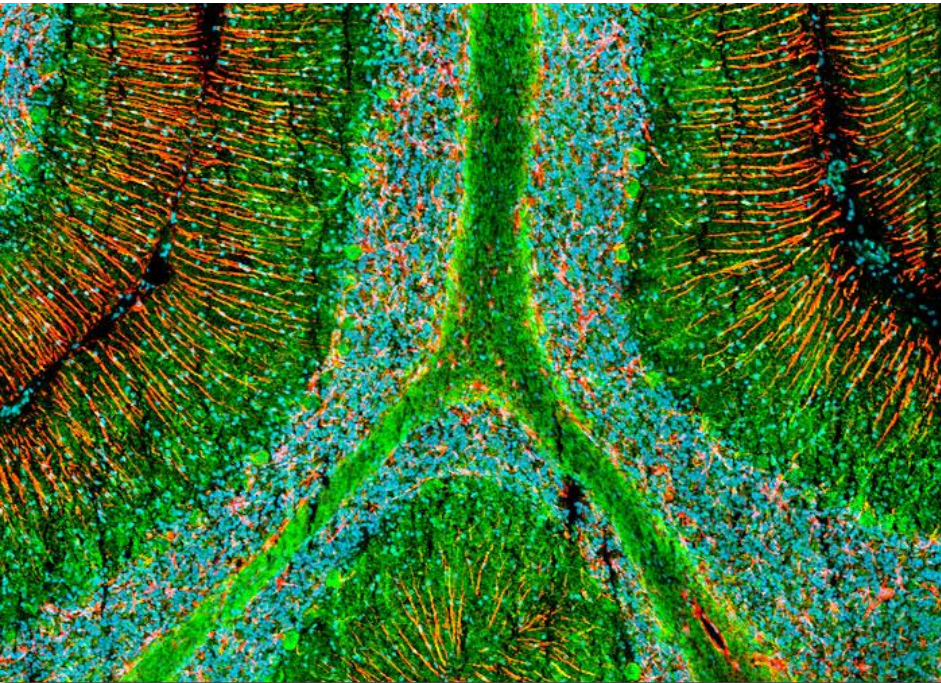
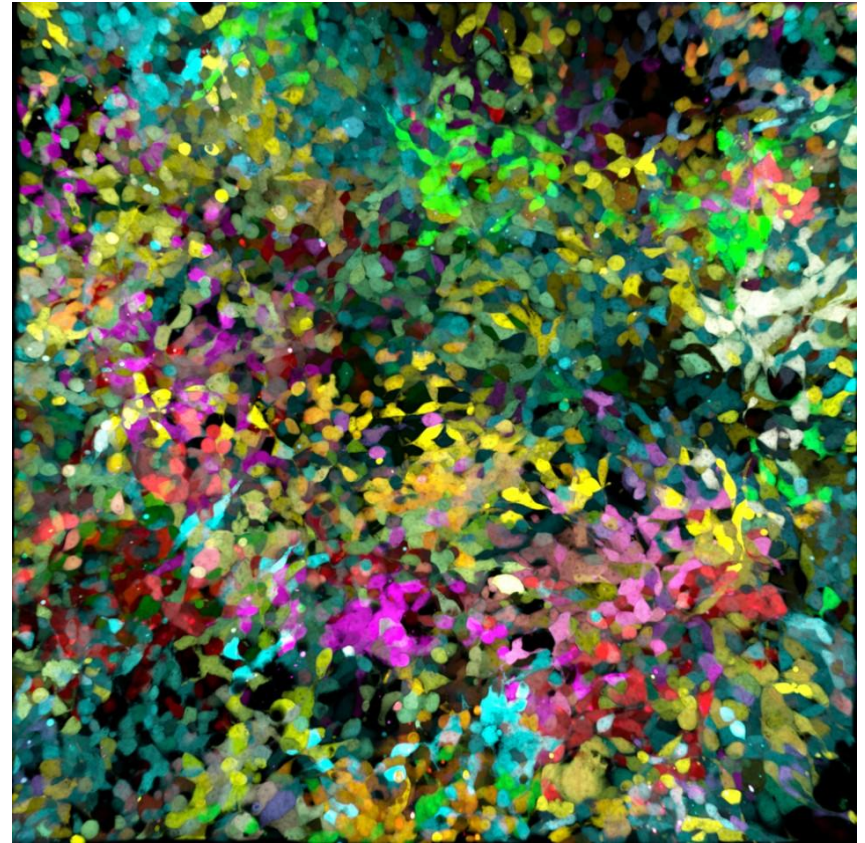
**Τομές
εγκεφάλου**

NF
(νευροϊνίδια)

**GFAP (Glial
Fibrillary Acid
protein),
Πρωτεΐνη
αστρογλοιακώ
ν κυττάρων**

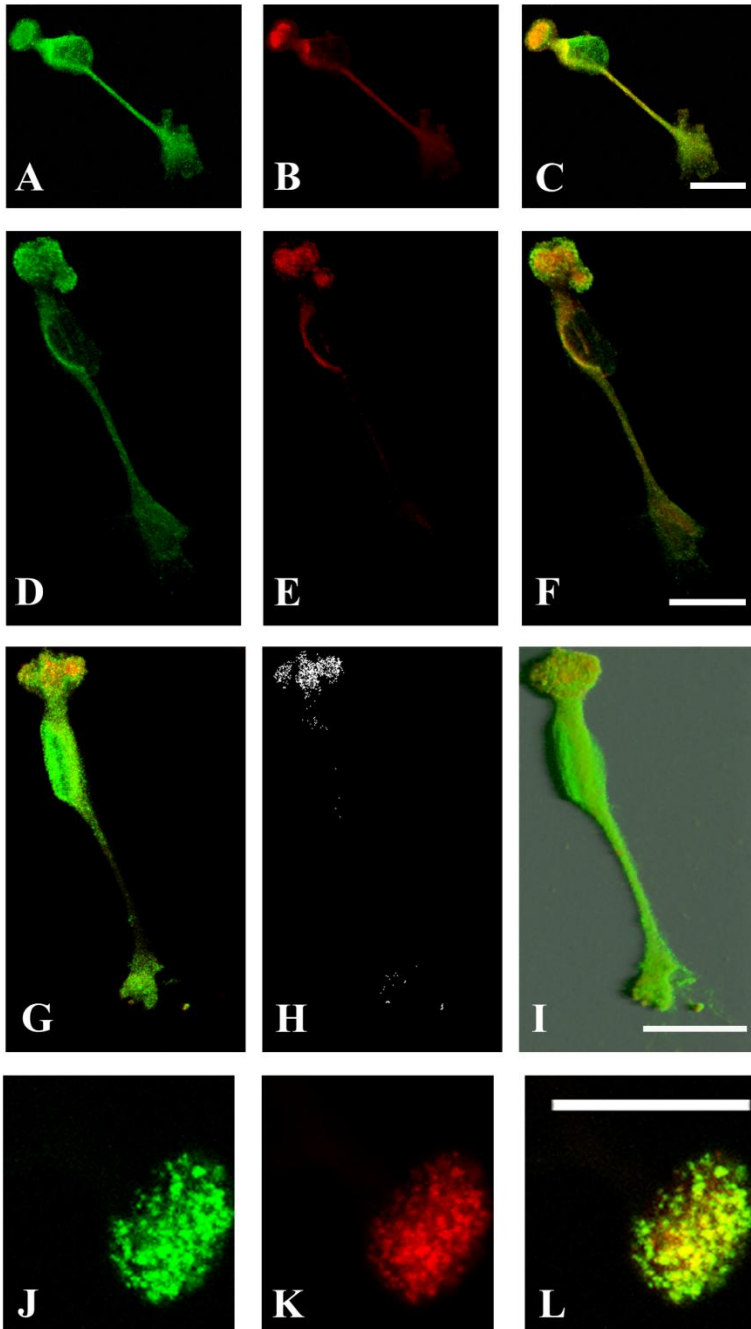
DAPI
**(χρώση
πυρήνων)**

Εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας



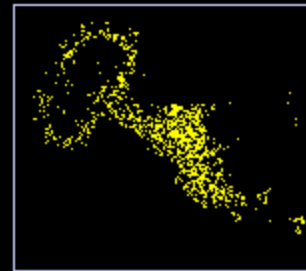
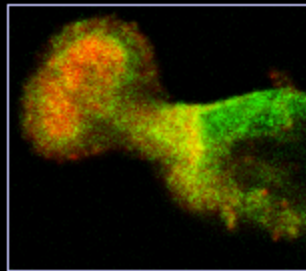
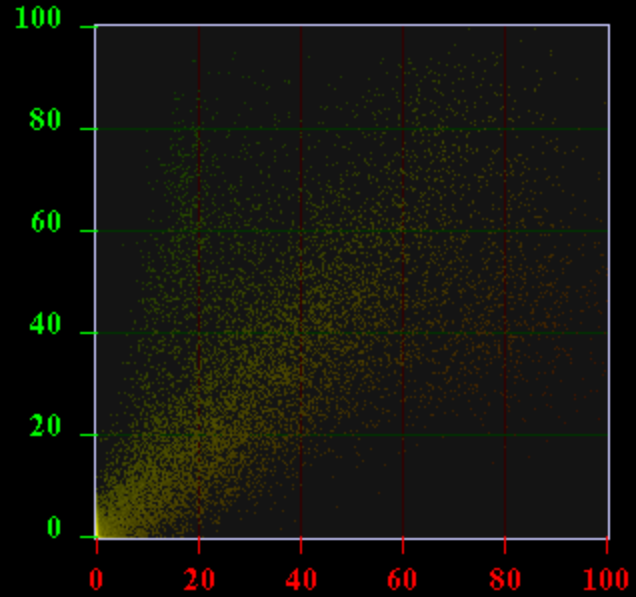
Μελέτες συνεντόπισης

GR και **Cyt C oxidase** σε κύτταρα Müller

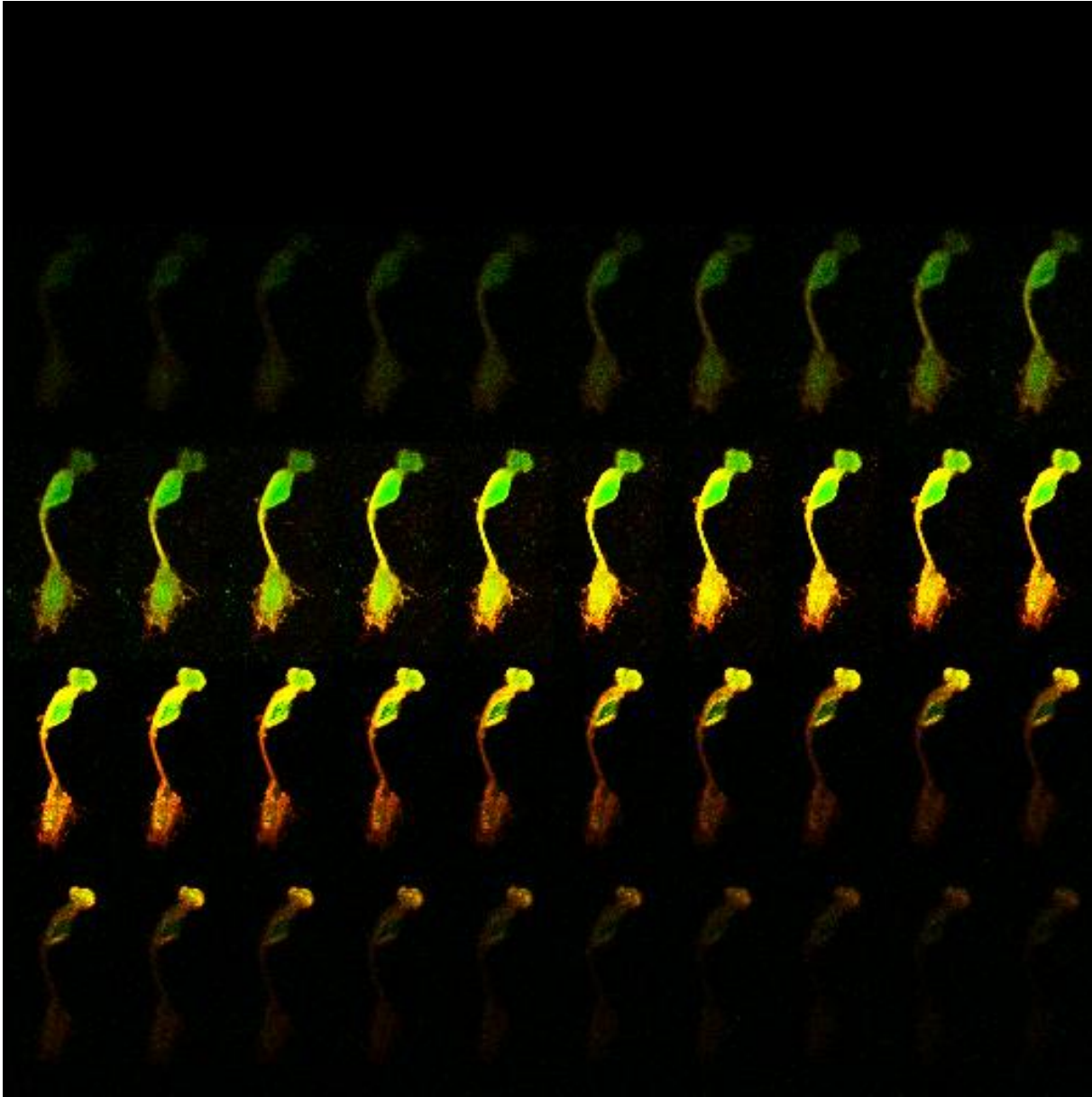


Εντόπιση GR σε
μιτοχόνδρια γλοιακών
(Müller) κυττάρων

File: cx07m.ims
Title: /usr/people/piallat/Anna-Maria/cx017m
Comment: ,
Set: cox vs gr
Layer: 19

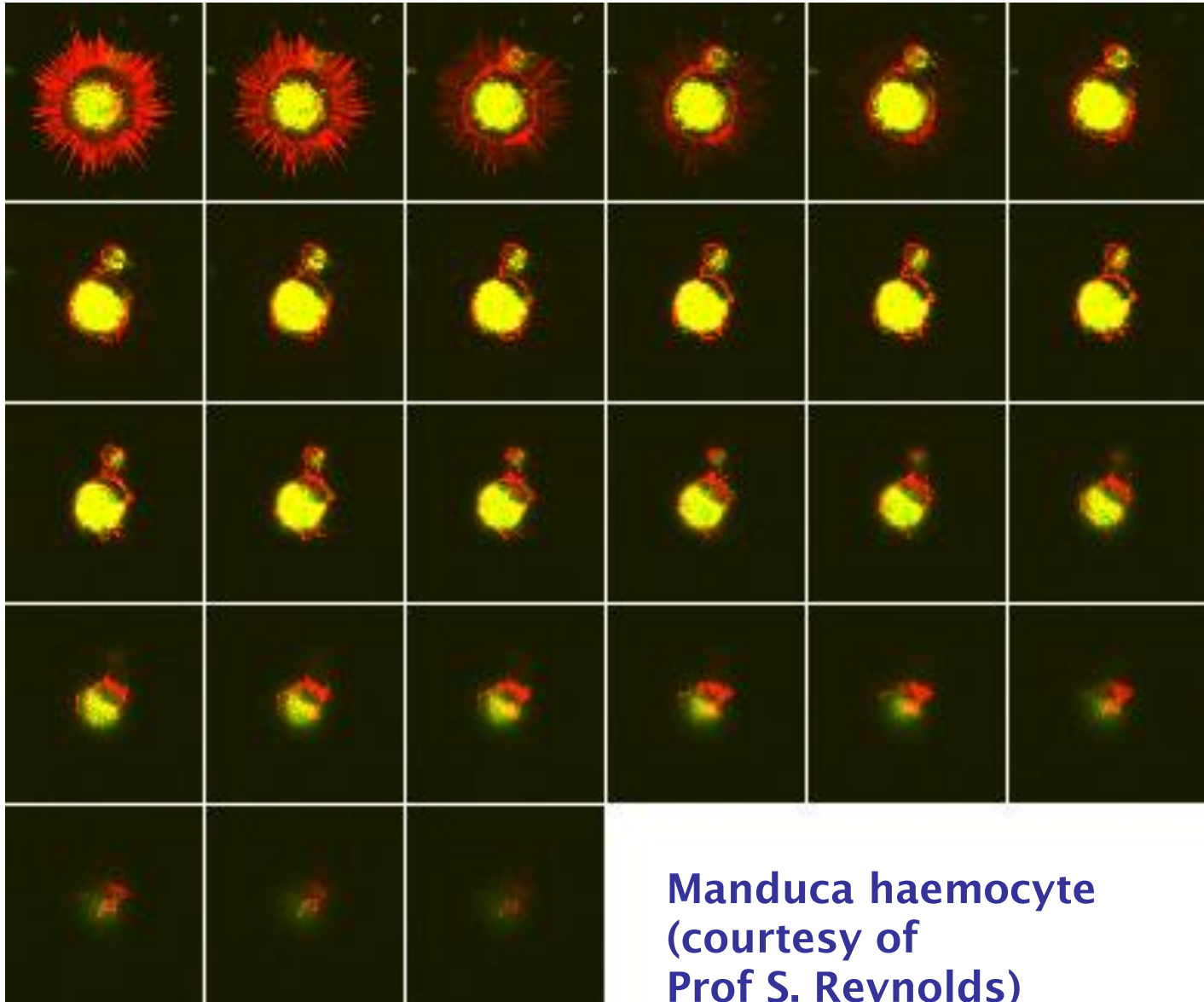


Απεικόνιση κυττάρου σε διαφορετικά επίπεδα κατά τον Z-άξονα.
Συγχώνευση επιμέρους απεικονίσεων, επανακατασκευή τρισδιάστατης
δομής, 3D απεικόνιση του κυττάρου

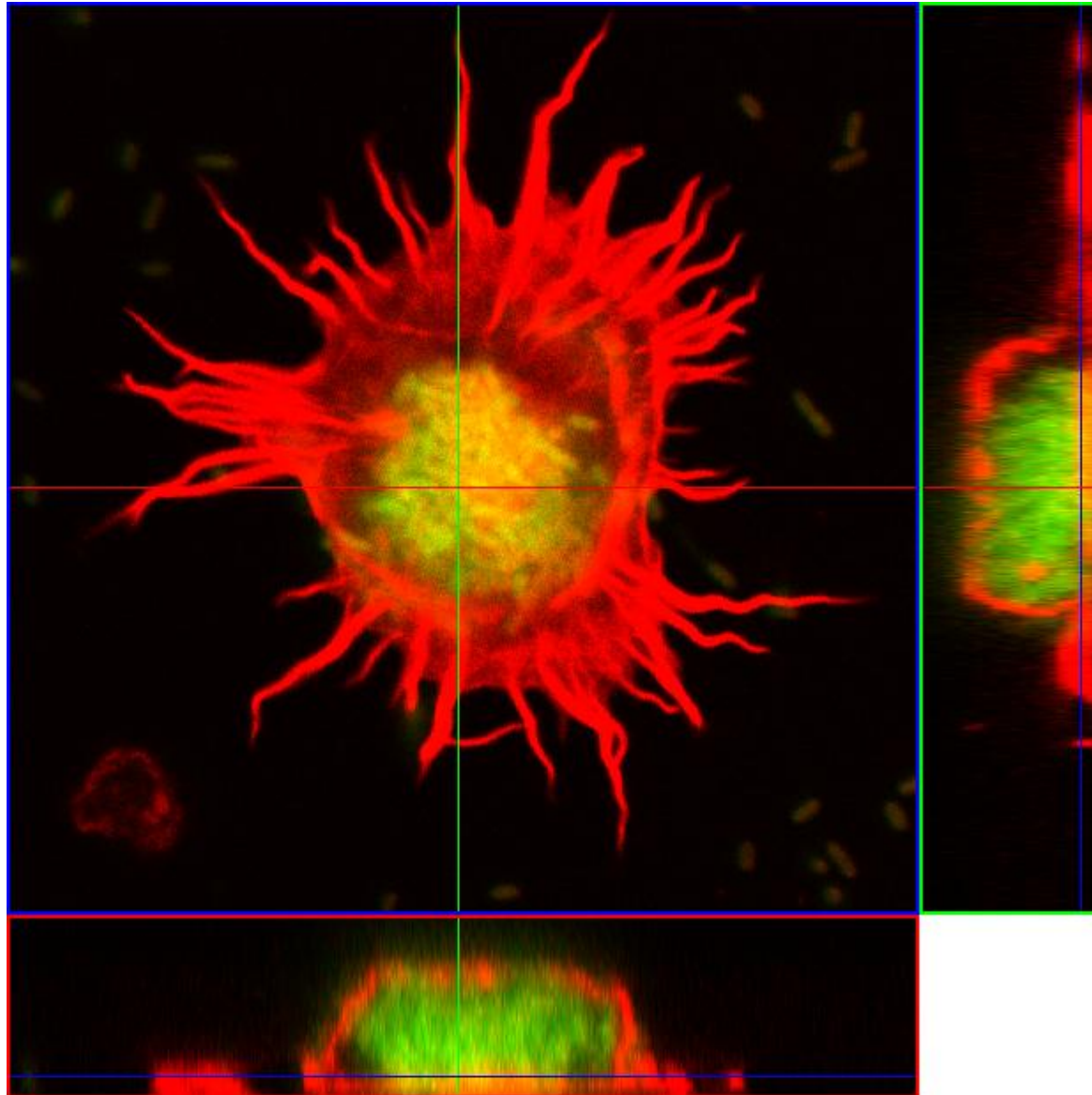


Psarra et al, *Glia*, 2003, 41, 38-49

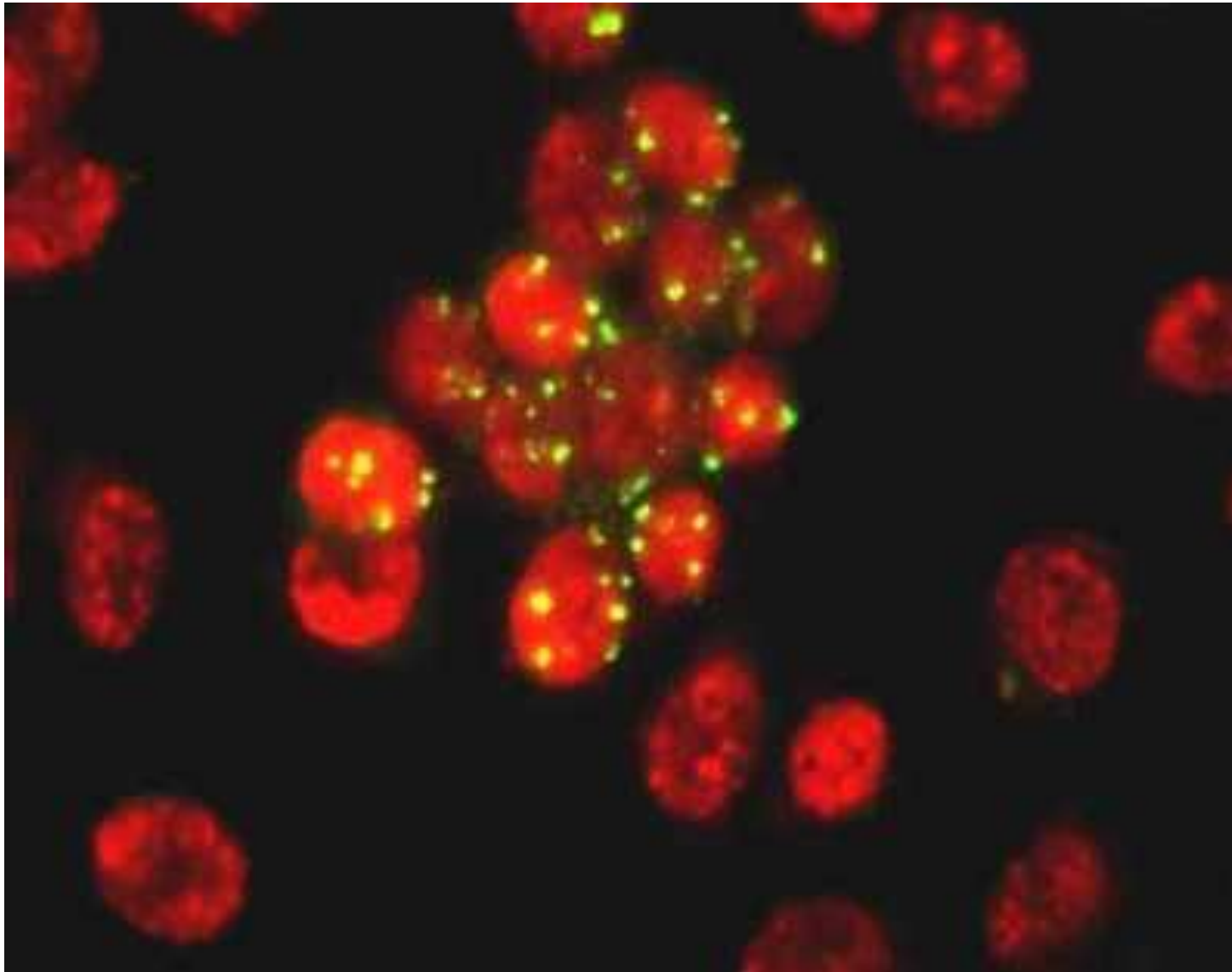
Απεικόνιση κυττάρου αίματος σε διαφορετικά επίπεδα κατά τον Z-
άξονα. Συγχώνευση επιμέρους απεικονίσεων, επανακατασκευή δομής,
3D απεικόνιση του κυττάρου



Z-επιμέρους τομές & 3D επανακατασκευή



In situ υβριδοποίηση



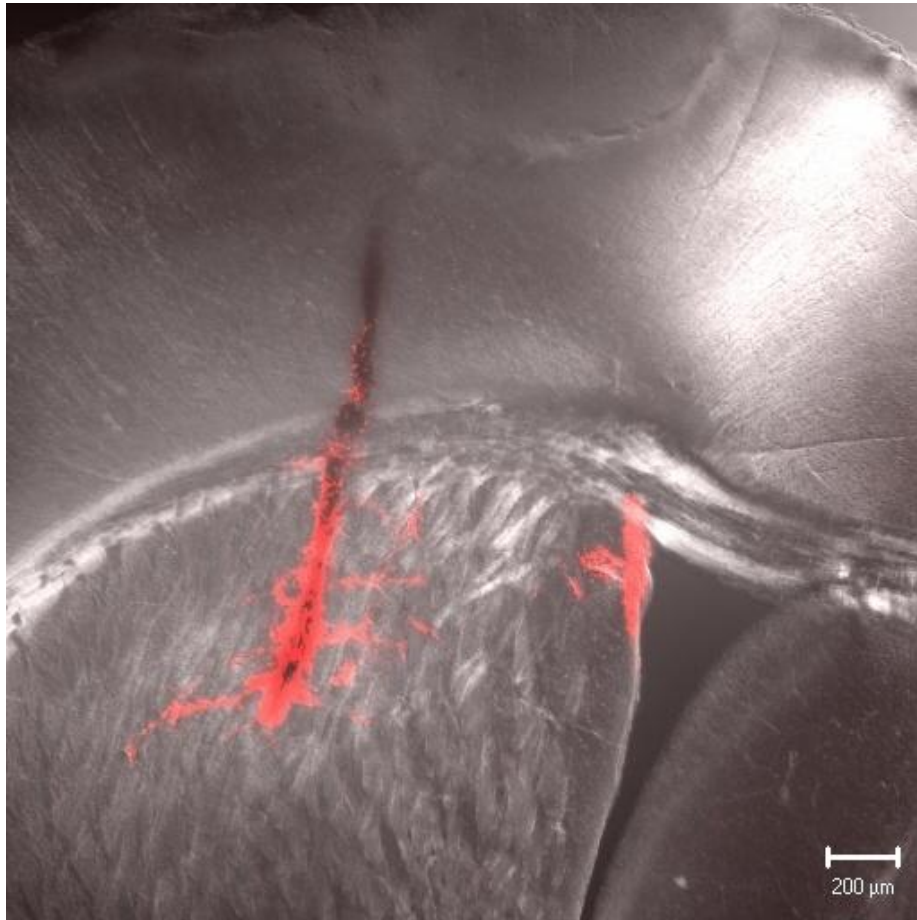
mRNA Ιού
ανθρώπινου
παπιλώματος

FITC

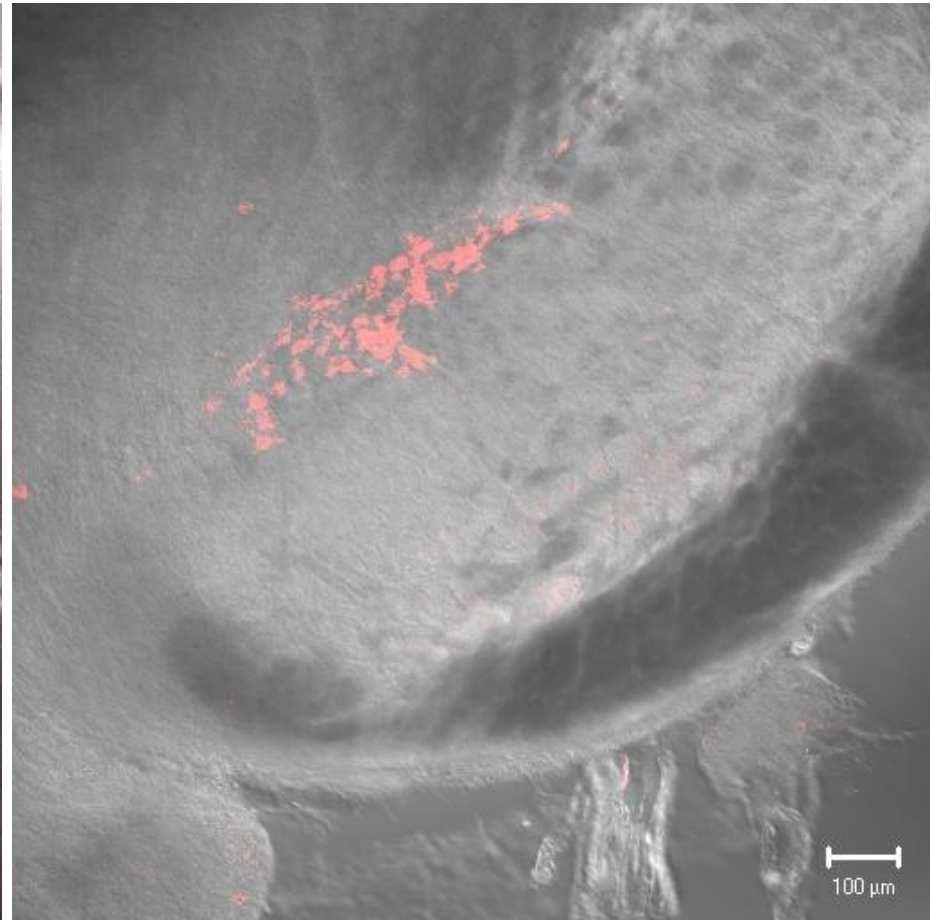
Επιθηλικά
κύτταρα

Ροδαμίνη

Ιχνηθέτιση σε νευρώνες

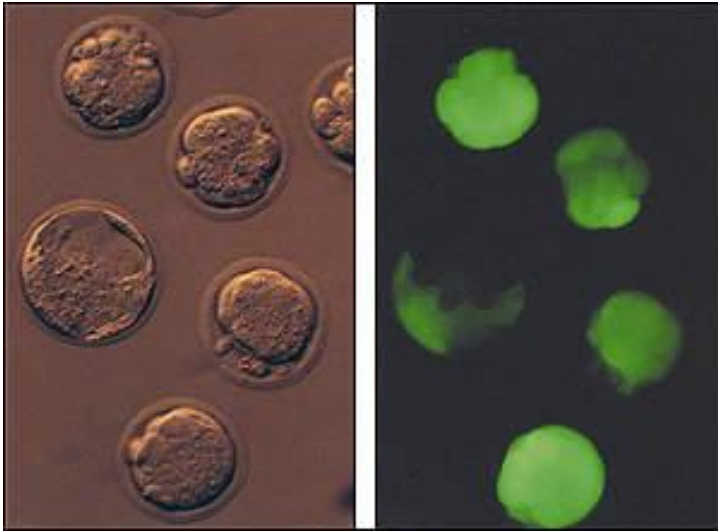


Ένεση σε νευρικά κύτταρα

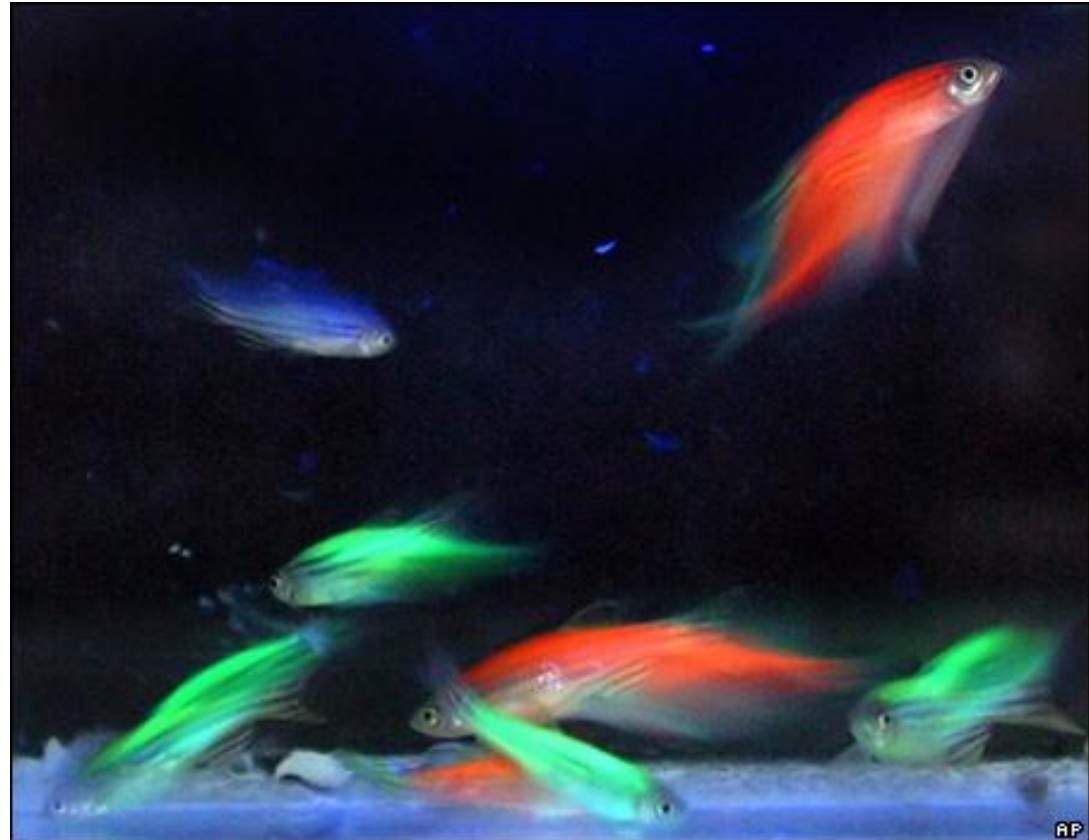


Σήμανση σωμάτων

In vivo διαμόλυνση με ιχνηθέτες που φθορίζουν



Έμβρυο από επίμυα



(Zebrafish)

<http://www.youtube.com/watch?v=Py9zAUOYYLk>

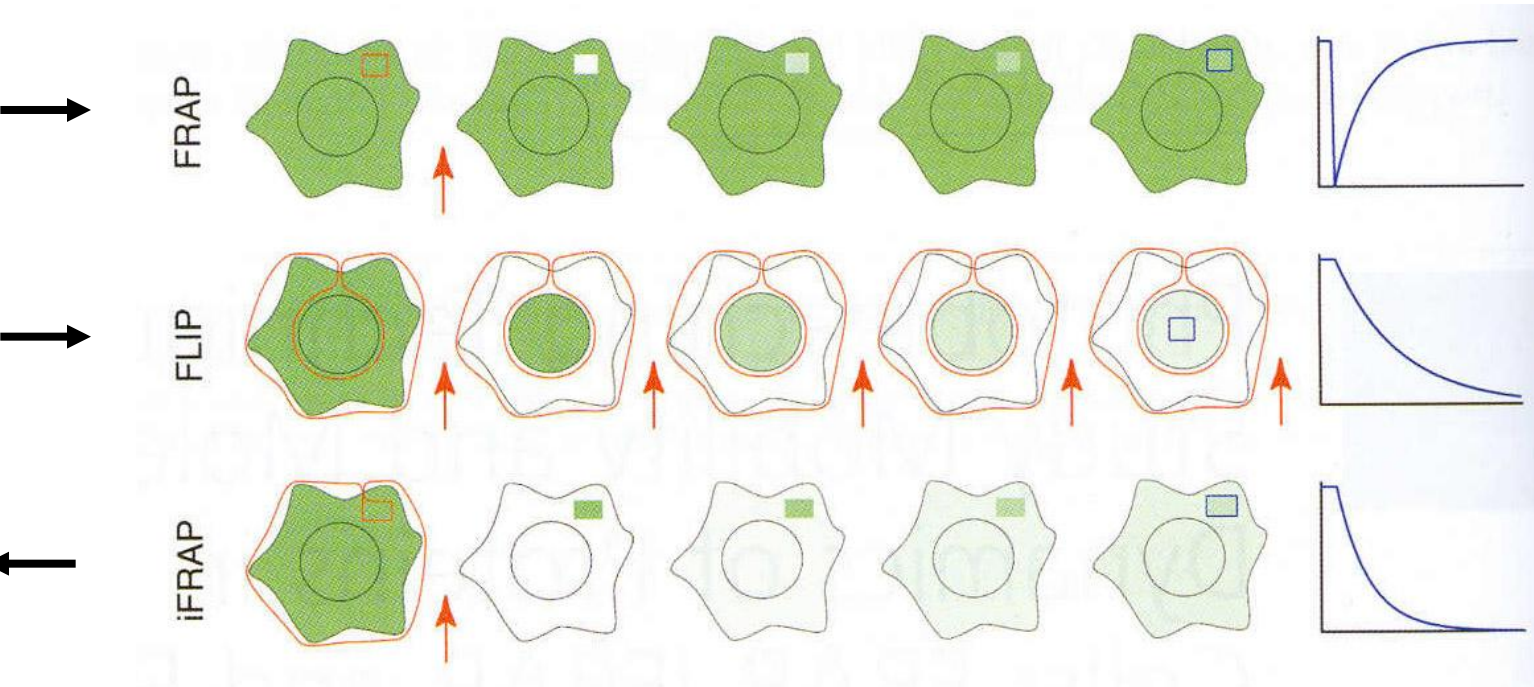


Τεχνικές Photobleaching σε ζωντανά κύτταρα:

FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching)

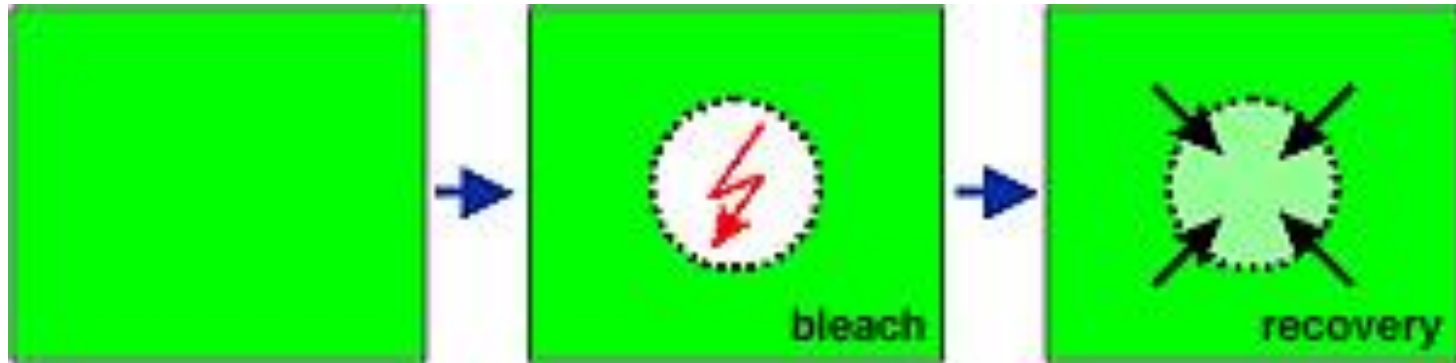
iFRAP (inverse FRAP)

FLIP (Fluorescence Loss In Photobleaching)

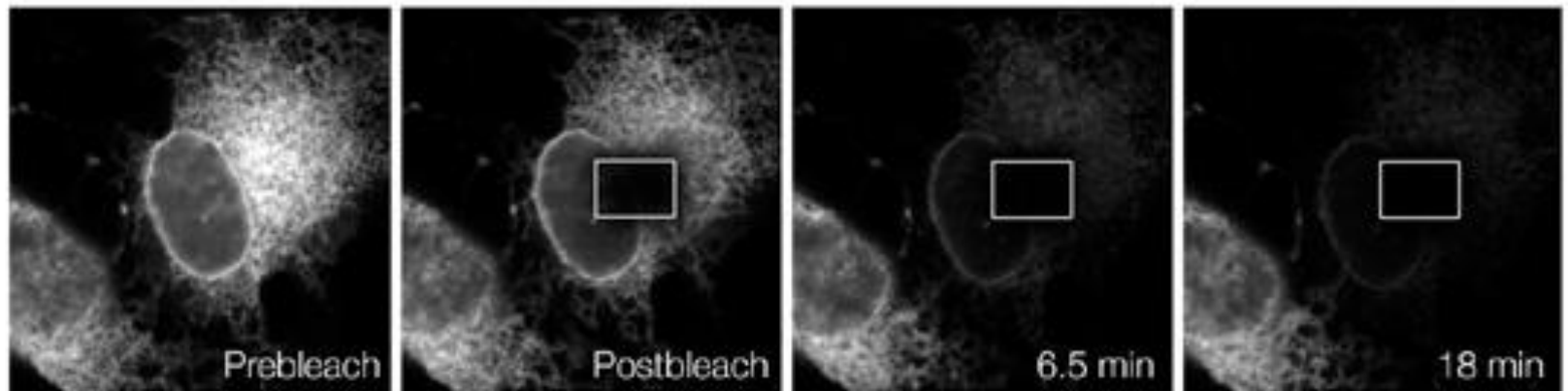


Παρακολούθηση μετακίνησης μορίων μεταξύ υποκυτταρικών οργανιδίων

Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP)



FLIP (Fluorescence Loss In Photobleaching)



Επαναλαμβανόμενη διέγερση της περιοχής, άρα και εξαφάνιση του φθορισμού σε αυτήν την περιοχή = κάψιμο του δείγματος σε αυτήν την περιοχή

Παρακολούθηση μείωσης του φθορισμού στη γύρω περιοχή

FRAP

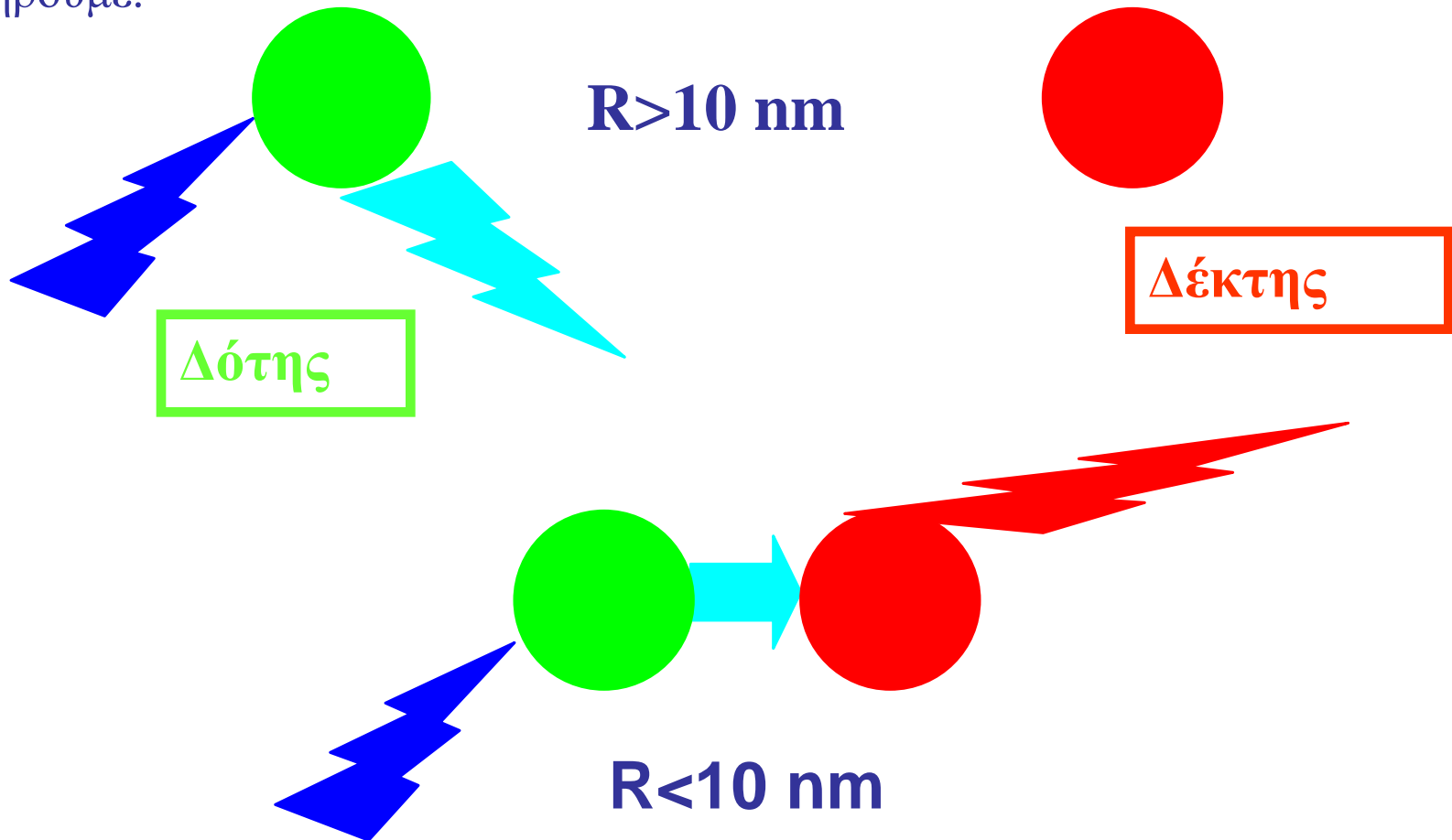
<http://www.youtube.com/watch?v=tJsb-OJMzi8>

FLIP

<http://www.youtube.com/watch?v=Av0xdkJkO0s>

Fluorescence Resonance Energy Transfer FRET(1)

Όταν δύο μόρια, ένα σημασμένο με κατάλληλο δότη, το άλλο με κατάλληλο δέκτη είναι επαρκώς κοντά (τυπικά λιγότερα από 10 nm) ή ενέργεια διέγερσης από τον δότη μπορεί να μεταφερθεί στον δέκτη. Το φαινόμενο μπορεί να γίνει αντιληπτό. Δεδομένου ότι ο δέκτης διεγείρεται και εκπέμπει ακτινοβολία φθορισμού την οποία τελικά παρατηρούμε.



FRET(2)

Η ταχύτητα μεταφοράς της ενέργειας εξαρτάται από:

- την απόσταση των δύο χρωμοφώρων
- το βαθμό επικάλυψης μεταξύ φάσματος εκπομπής του δότη και διέγερσης του δέκτη
- το σχετικό προσανατολισμό μεταξύ δότη και δέκτη
- την απόδοση κβάντουμ του δότη και
- το χρόνο ζωής φθορισμού του δότη

FRET(3)

ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΕΠΙΛΟΓΗΣ ΦΘΟΡΙΖΩΝ ΟΥΣΙΩΝ

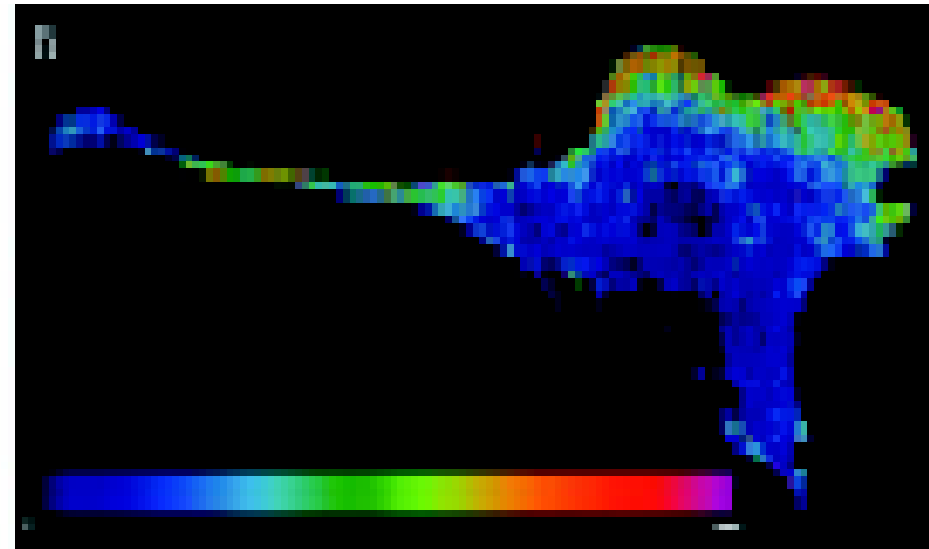
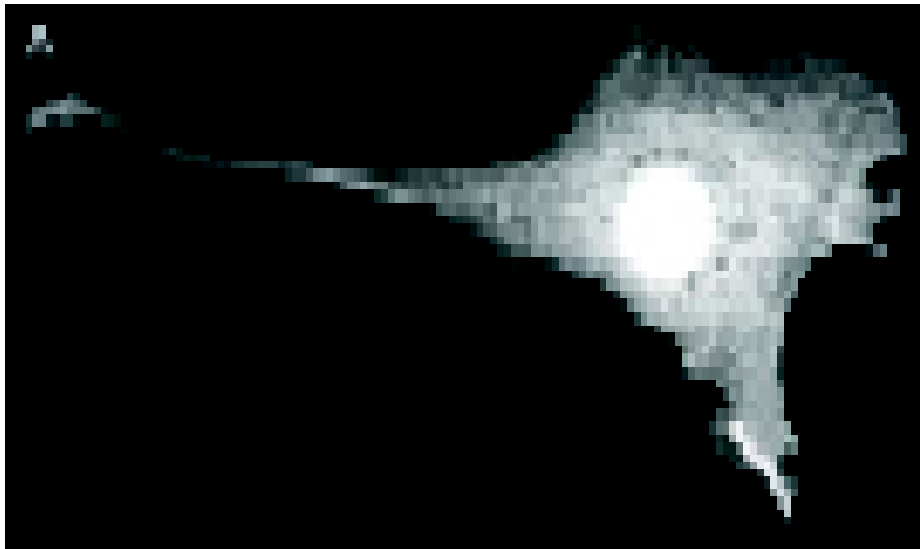
1. Το φάσμα εκπομπής του δότη πρέπει να επικαλύπτεται σημαντικά με το φάσμα διέγερσης του δέκτη.
2. Το φως διέγερσης του δότη δεν πρέπει να διεγείρει απευθείας τον δέκτη.

FRET (4): Δείχνει την αλληλεπίδραση και συνεντοπισμό δύο πρωτεϊνών

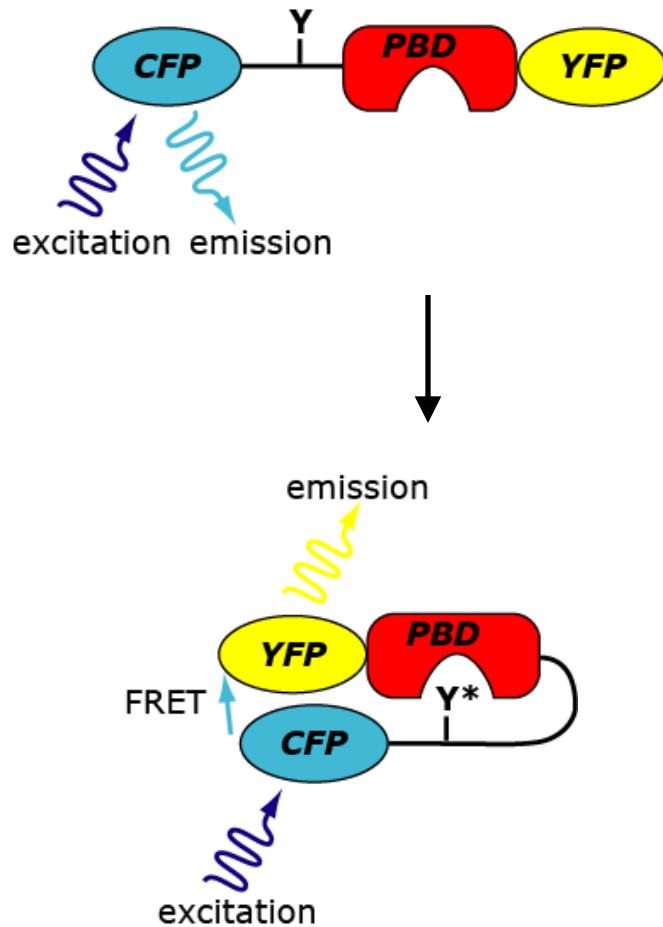
Figure 1. Confocal FRET analysis demonstrates that integrins induce local Rac-effector coupling. NIH-3T3 cells were microinjected with cDNAs encoding the indicated GFP-V12-Rac fusion proteins and then with Alexa-PBD protein (Pozo et al., 2002). Donor (A), un-

Donor

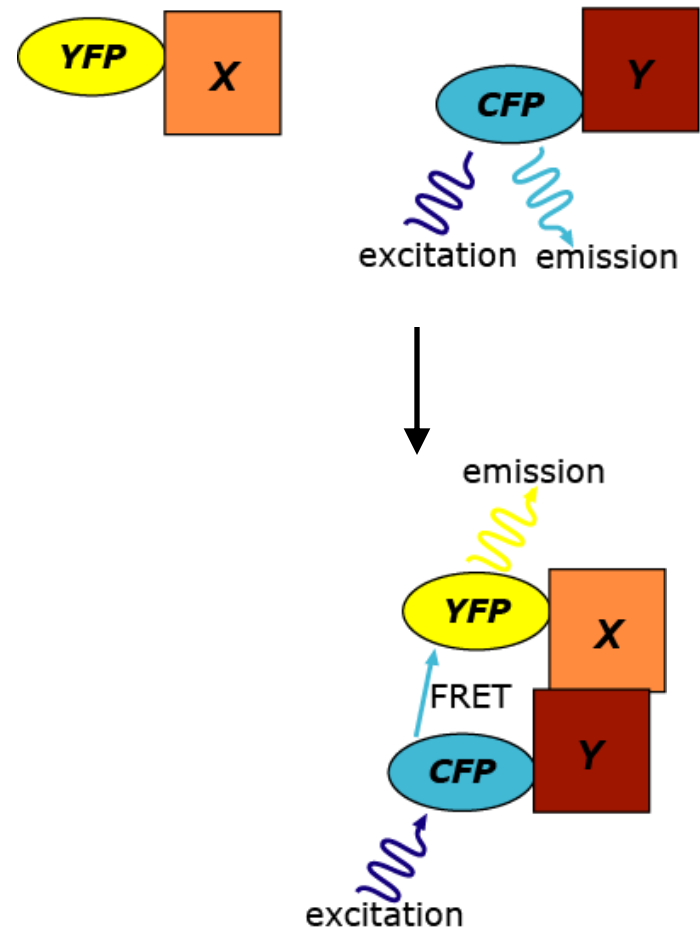
FRET αποτελεσματικότητα, blue=χαμηλό, red=υψηλό. Η κόκκινη περιοχή δηλώνει υψηλό επίπεδο συνεντοπισμού των δύο πρωτεϊνών



Είδη FRET πειραμάτων



Ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις

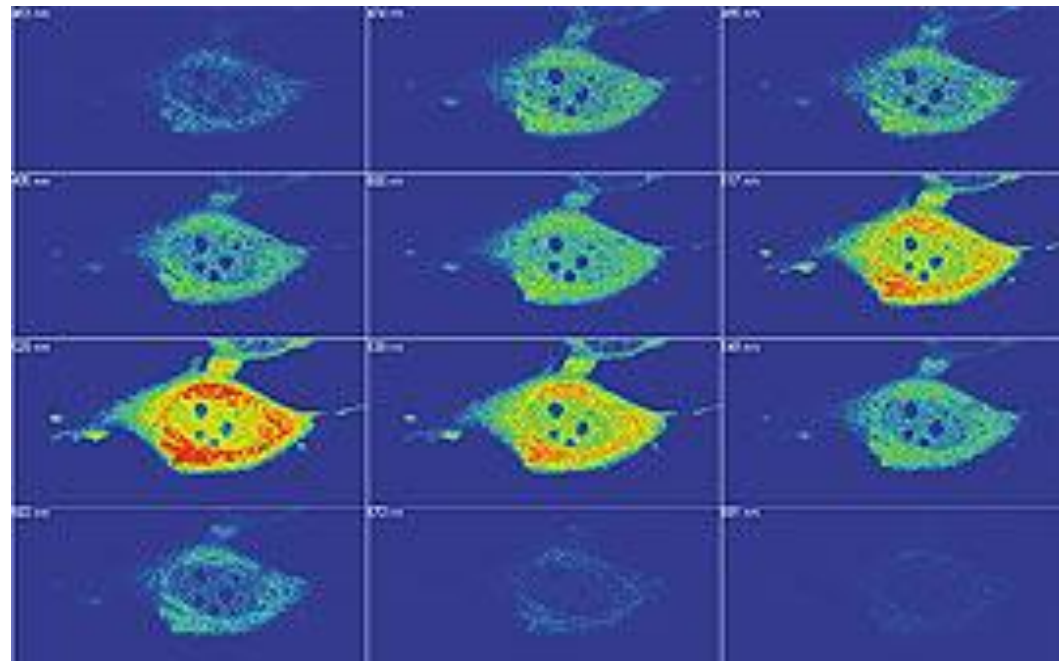
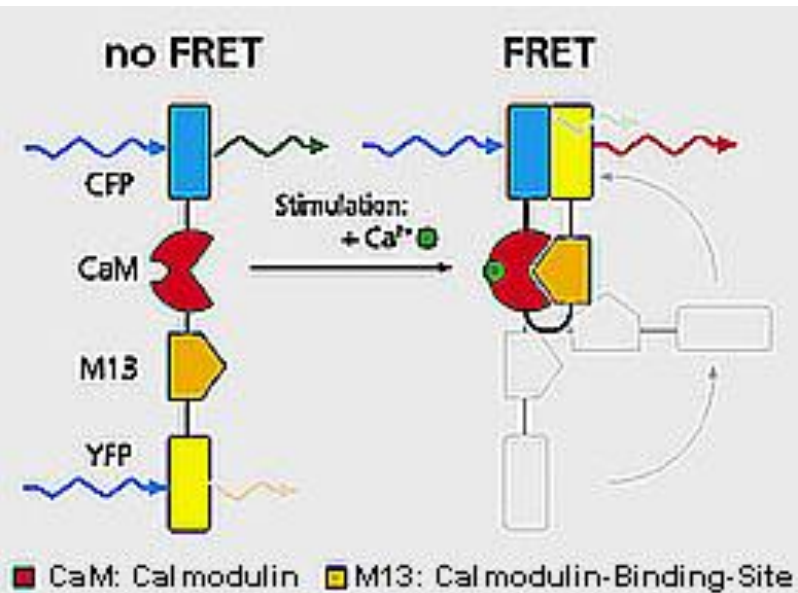


Αλληλεπιδράσεις μεταξύ ανεξάρτητων μορίων

Fluorescence resonance energy transfer (FRET)

(FRET)

Μετρήσεις μεταφοράς ενδοκυτταρικού ασβεστίου



FRET

<http://link.brightcove.co.jp/services/player/bcpid180228075001?bctid=193633758001>

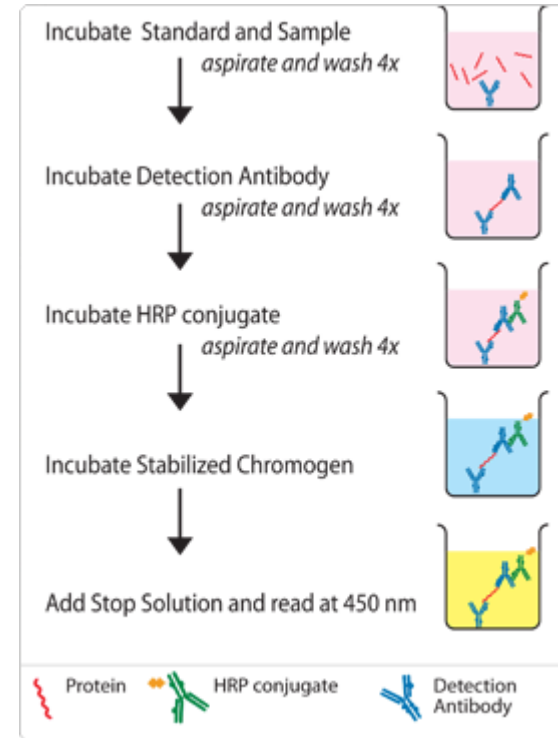
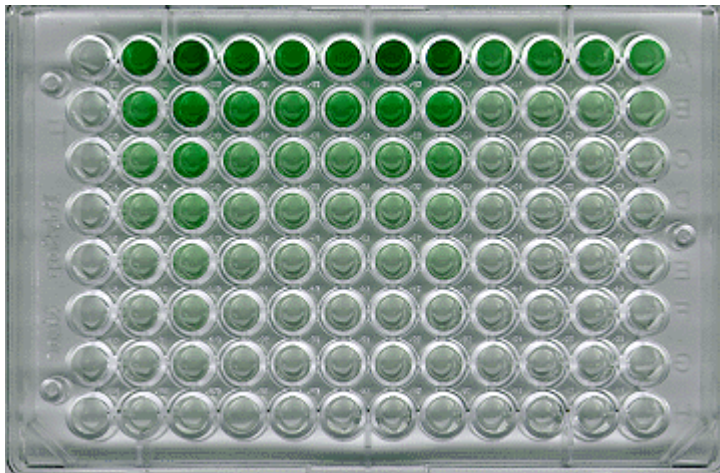
http://www.youtube.com/watch?v=gRol_jgw8mc&feature=related

<http://www.youtube.com/watch?v=WkwhCsX36pY&feature=related>

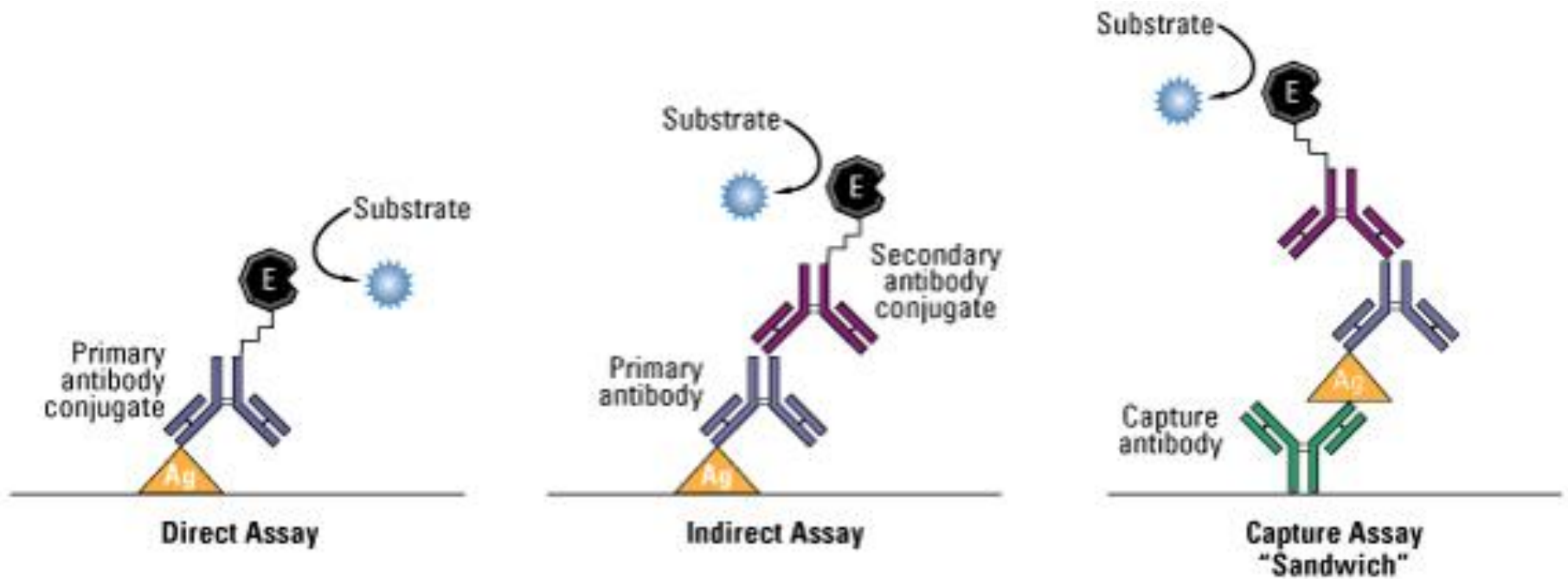
<http://www.youtube.com/watch?v=5nsWImQGIOA&feature=related>

http://www.youtube.com/watch?v=rgLJrvoX_qo&feature=related

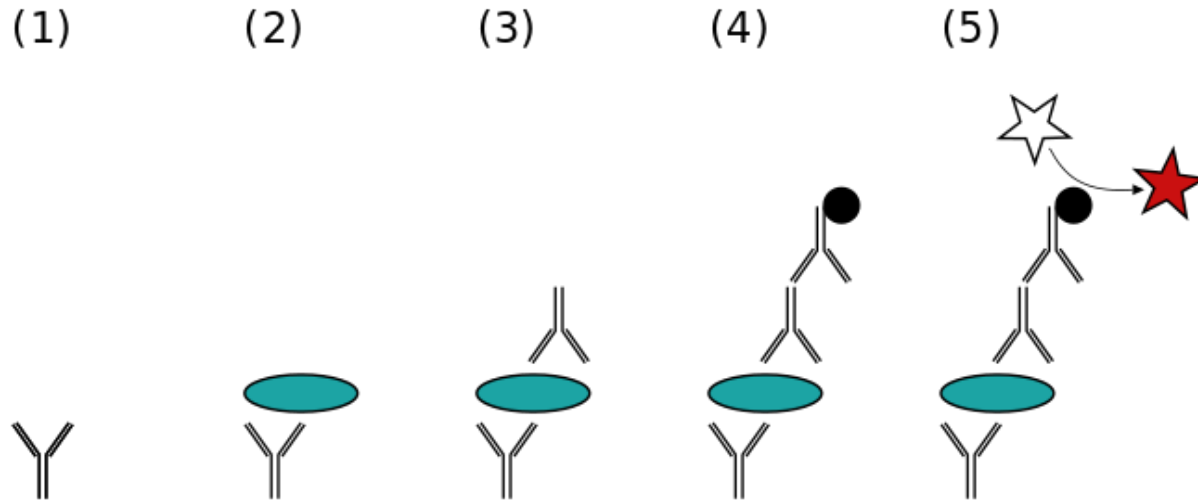
ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ELISA



ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ELISA

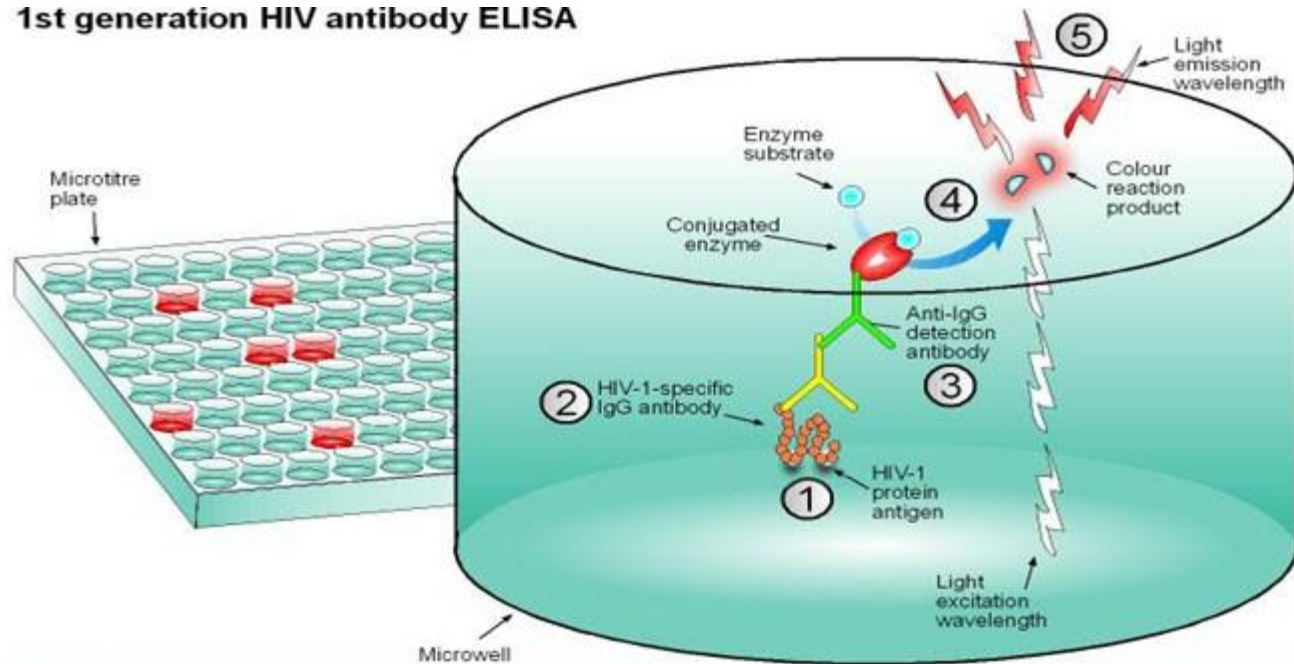


ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ELISA



sandwich ELISA. (1) Η πλάκα επιστρώνεται με αντίσωμα έναντι του υπό προσδιορισμό αντιγόνου. (2) Το δείγμα προστίθεται και το υπάρχον σε αυτό αντιγόνο συνδέεται με το ακινητοποιημένο στην πλάκα αντίσωμα. (3) Νέο αντίσωμα προσδιορισμού προστίθεται, το οποίο προσδένεται με το αντιγόνο. (4) Στη συνέχεια προστίθεται πάλι αντίσωμα έναντι του αντισώματος προσδιορισμού, το οποίο φέρει ένζυμο, (5) υπόστρωμα του οποίου προστίθεται στο τελευταίο στάδιο ώστε να προκύψει ανιχνεύσιμο προϊόν. Μεσολαβούν εκπλύσεις σε όλα τα ενδιάμεσα στάδια.

1st generation HIV antibody ELISA



The 1st generation HIV antibody ELISA tests were designed to detect anti-HIV-1 antibodies of the IgG isotype in plasma samples. This was achieved by (1) immobilising HIV-1 antigens on the surface of wells in a microtitre plate, (2) capture of HIV-1-specific antibodies from plasma, (3) detection of bound IgG antibodies by an anti-IgG antibody-enzyme conjugate, (4) addition of enzyme substrate and (5) a spectrophotometric measurement of the completed colour reaction as an indicator of the amount of bound IgG.