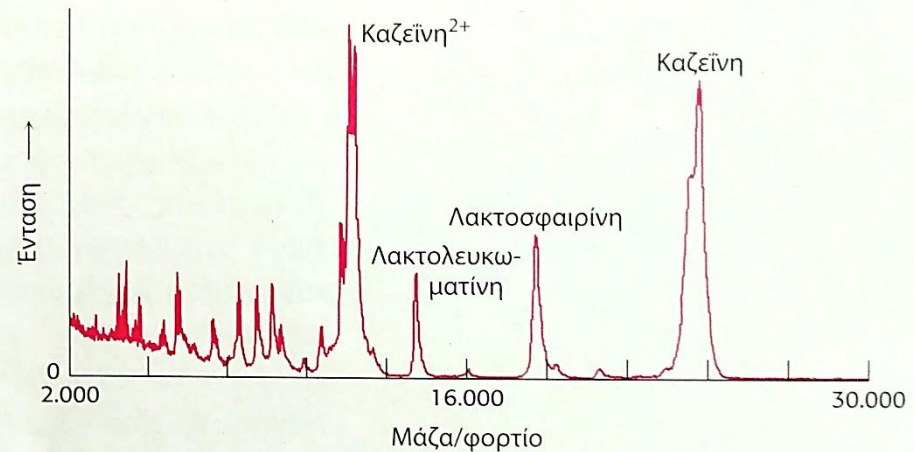


## Εξερευνώντας τις πρωτεΐνες και τα πρωτεώματα



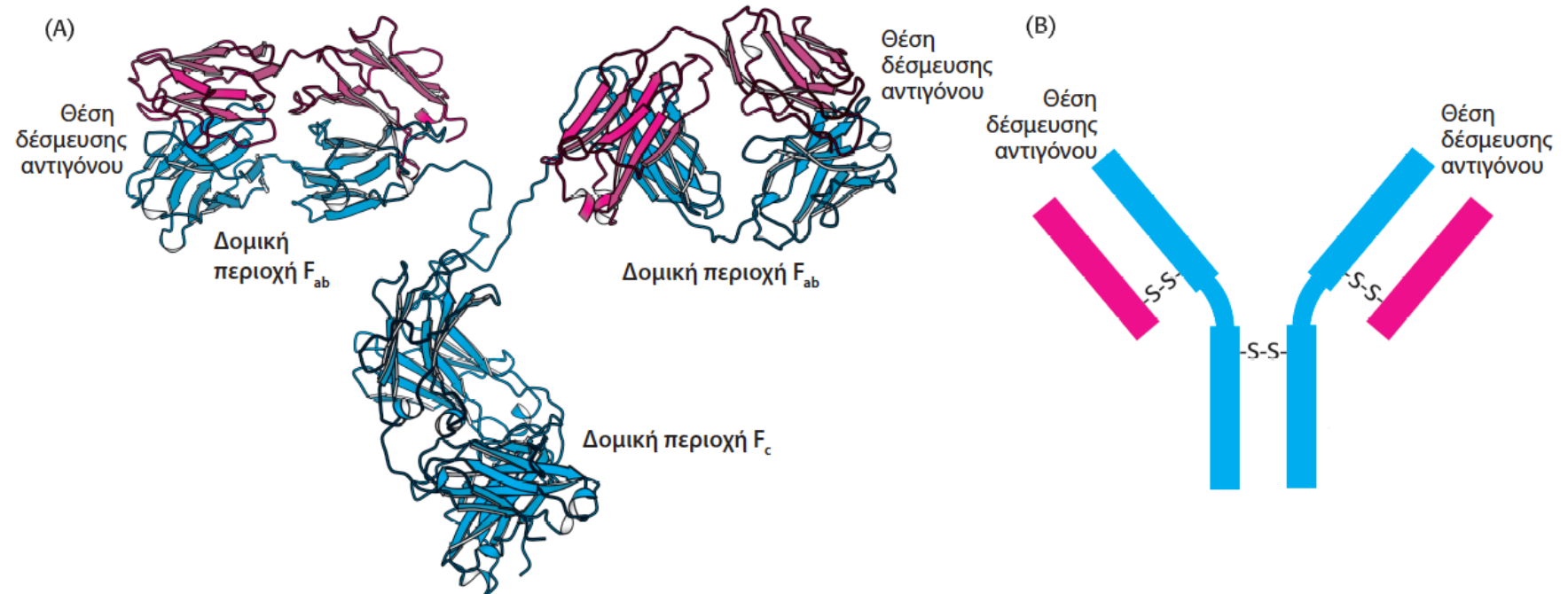
Το γάλα, η πηγή τροφής όλων των θηλαστικών, αποτελείται εν μέρει από μια ποικιλία πρωτεϊνών. Η μελέτη των πρωτεϊνών του γάλακτος που βλέπουμε στο σχήμα έγινε με την τεχνική φασματομετρίας μάζας MALDI-TOF, που διαχωρίζει τα μόρια βάσει του λόγου της μάζας προς το φορτίο τους. [(Αριστερά) Okea/istockphoto.com. (Δεξιά) ευγενική προσφορά Brian Chait.]

# Η ανοσολογία προσφέρει σημαντικές τεχνικές για την διερεύνηση των πρωτεϊνών

- ❑ Η απομόνωση μιας πρωτεΐνης από το φυσικό της περιβάλλον μέσα στο κύτταρο όπου η δραστηριότητα της έχει τη μεγαλύτερη φυσιολογική σημασία.
- ❑ Πλέον υπάρχει δυνατότητα χρήσης των αντισωμάτων ως κρίσιμων αντιδραστηρίων για την εξερεύνηση των λειτουργιών των πρωτεϊνών μέσα στο ίδιο το κυτταρικό περιβάλλον.
- ❑ Η εξειδίκευση των αντισωμάτων για τις πρωτεΐνες-στόχους τους μας παρέχουν τα μέσα για να σημάνουμε μια πρωτεΐνη ώστε να απομονωθεί, να ποσοτικοποιηθεί ή να εμφανιστεί στην κυτταρική της θέση.

# Μπορούν να παραχθούν ειδικά αντισώματα για συγκεκριμένες πρωτεΐνες

- ❑ Αντίσωμα (ή ανοσοσφαιρίνη, immunoglobulin = Ig): είναι μια πρωτεΐνη που συντίθεται από τα σπονδυλωτά ως απόκριση στην παρουσία μιας ξένης ουσίας που λέγεται αντιγόνο.
- ❑ Τα αντισώματα έχουν μεγάλη και ειδική συγγένεια για τα αντιγόνα που προκάλεσαν τη σύνθεσή τους.
- ❑ Η φυσιολογική λειτουργία των αντισωμάτων αφορά την προστασία του ζώου από λοιμώξεις.
- ❑ Πρωτεΐνες, πολυσακχαρίτες και νουκλεϊκά οξέα ξένων οργανισμών μπορεί να δρουν ως αντιγόνα.



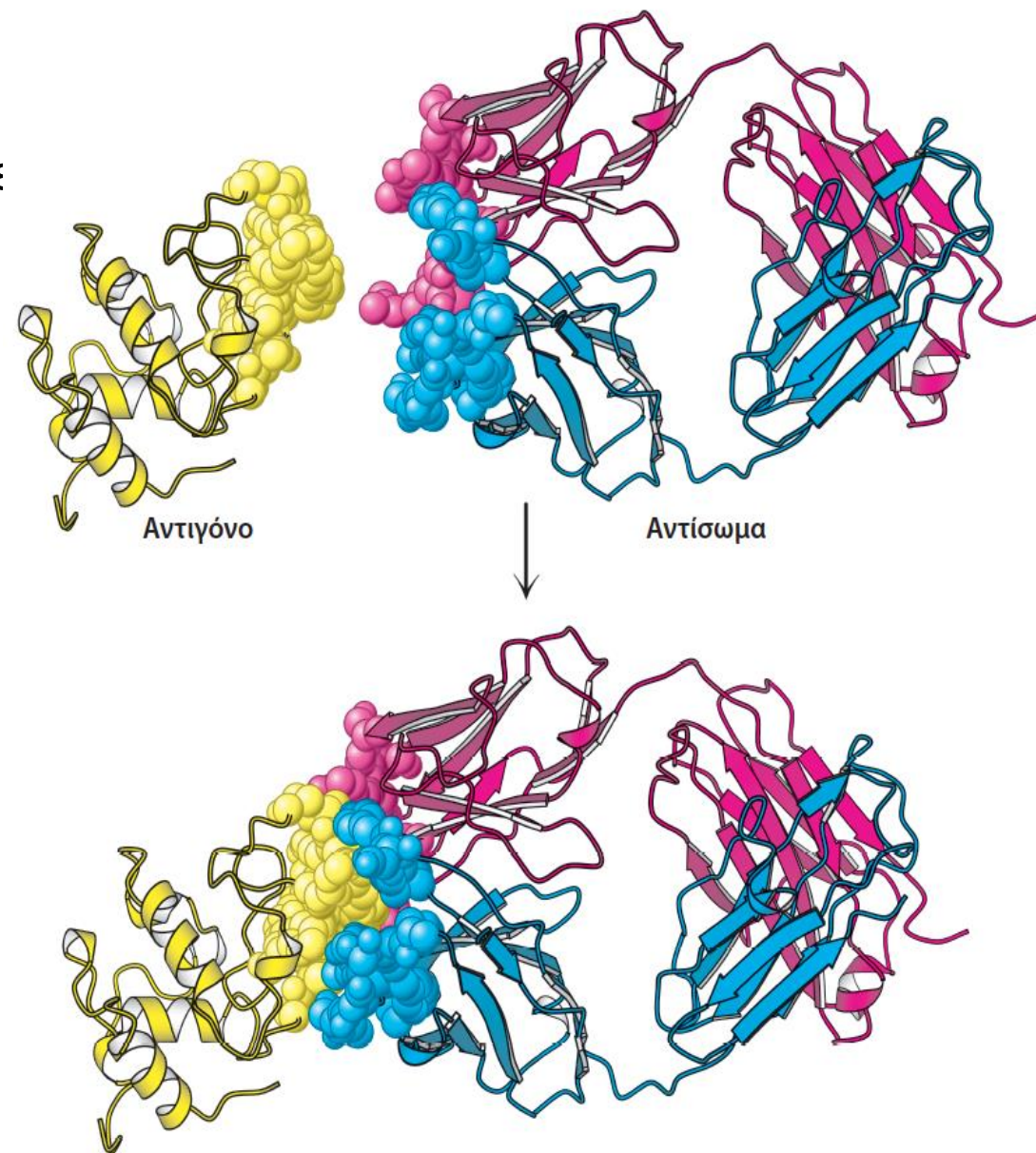
Εικόνα 3.17 Δομή αντισώματος. (A) Τα αντισώματα IgG (ανοσοσφαιρίνη Γ) αποτελούνται από τέσσερις αλυσίδες, δύο βαριές (μπλε) και δύο ελαφριές (κόκκινες), που συνδέονται με δισουλφιδικούς δεσμούς. Η βαριά και η ελαφριά αλυσίδα ενώνονται και δίνουν τη δομική περιοχή F<sub>ab</sub> που έχει τις θέσεις δέσμευσης αντιγόνου στα άκρα της. Οι δύο βαριές αλυσίδες σχηματίζουν τη δομική περιοχή F<sub>c</sub>. Παρατηρήστε ότι οι δομικές περιοχές F<sub>ab</sub> ενώνονται με τη δομική περιοχή F<sub>c</sub> με εύκαμπτες αρθρώσεις. (B) Το μόριο IgG σε πιο σχηματική μορφή [Σχεδιασμένο από 1IGT.pdb.]

# Μπορούν να παραχθούν ειδικά αντισώματα για συγκεκριμένες πρωτεΐνες

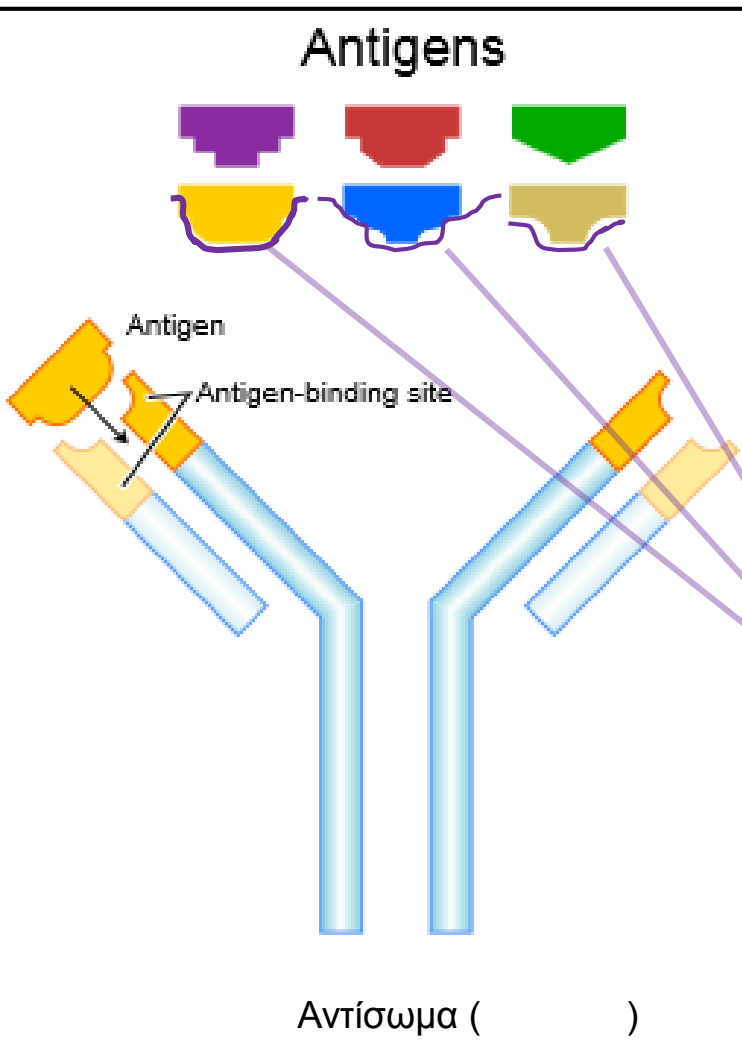
Μικρά ξένα μόρια, όπως π.χ. συνθετικά πεπτίδια, είναι επίσης ικανά να προκαλέσουν την σύνθεση αντισωμάτων με την προϋπόθεση να είναι δεσμευμένα σε έναν μακρομοριακό φορέα.

Η εξειδίκευση της αλληλεπίδρασης αντιγόνου-αντισώματος είναι συνέπεια της συμπληρωματικότητας των τρισδιάστατων σχημάτων μεταξύ των δύο επιφανειών.

**Εικόνα 3.18 Αλληλεπιδράσεις αντιγόνου-αντισώματος.** Μια πρωτεΐνη-αντιγόνο, στην περίπτωση αυτή η λυσοζύμη, δεσμεύεται στο ένα άκρο της δομικής περιοχής  $F_{ab}$  ενός αντισώματος. Προσέξτε ότι το άκρο του αντισώματος και του αντιγόνου έχουν συμπληρωματικό σχήμα, επιτρέποντας την κάλυψη ενός μεγάλου τμήματος της επιφάνειας και των δύο μορίων μετά τη δέσμευση. [Σχεδιασμένο από 1YQV.pdb.]



- Η ειδική ομάδα ή η συστάδα αμινοξέων του αντιγόνου που αναγνωρίζεται από ένα αντίσωμα λέγεται αντιγονικός προσδιοριστής (antigenic determinant) ή επίτοπος (epitope)

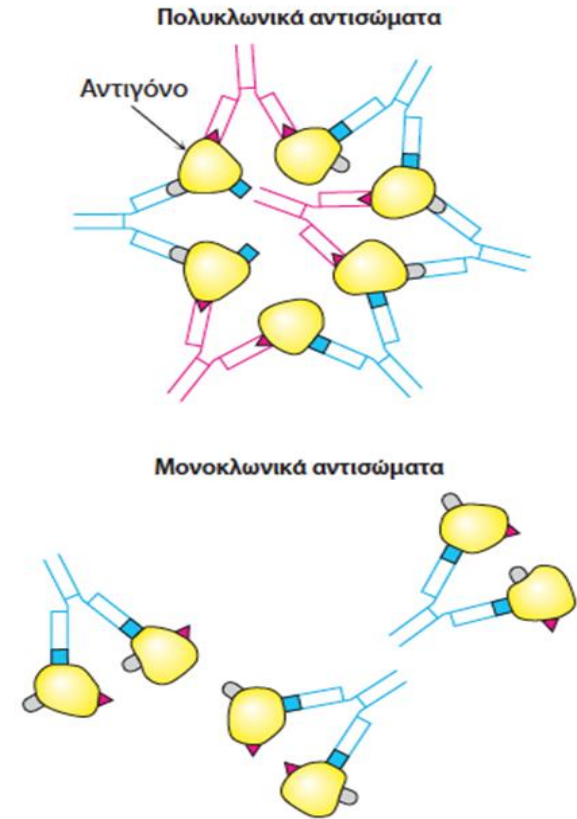


Η ομάδα που αναγνωρίζεται από ένα αντίσωμα λέγεται **αντιγονικός προσδιοριστής** (antigenic determinant) ή επίτοπος (epitope)



# Μπορούν να παραχθούν ειδικά αντισώματα για συγκεκριμένες πρωτεΐνες

- ❑ Ο ορός, που λέγεται **αντιορός**, περιέχει αντισώματα για όλα τα αντιγόνα που έχουν ενεθεί στο κουνέλι/ποντίκι.
- ❑ Μόνο ένα μέρος από αυτά θα αναγνωρίζουν την πρωτεΐνη που ενέθηκε.
- ❑ Επιπλέον, όλα τα αντισώματα που αναγνωρίζουν ένα συγκεκριμένο αντιγόνο δεν αποτελούν ένα και μόνο μόριο σε πολλά αντίγραφα.
- ❑ Τα κύτταρα παράγουν πολλά διαφορετικά αντισώματα, το κάθε ένα από τα οποία αναγνωρίζει ένα διαφορετικό στοιχείο στην επιφάνεια του ίδιου αντιγόνου.
- ❑ Τα αντισώματα αυτά ονομάζονται **πολυκλωνικά**, λόγω του ότι προκύπτουν από πολλούς πληθυσμούς κυττάρων.



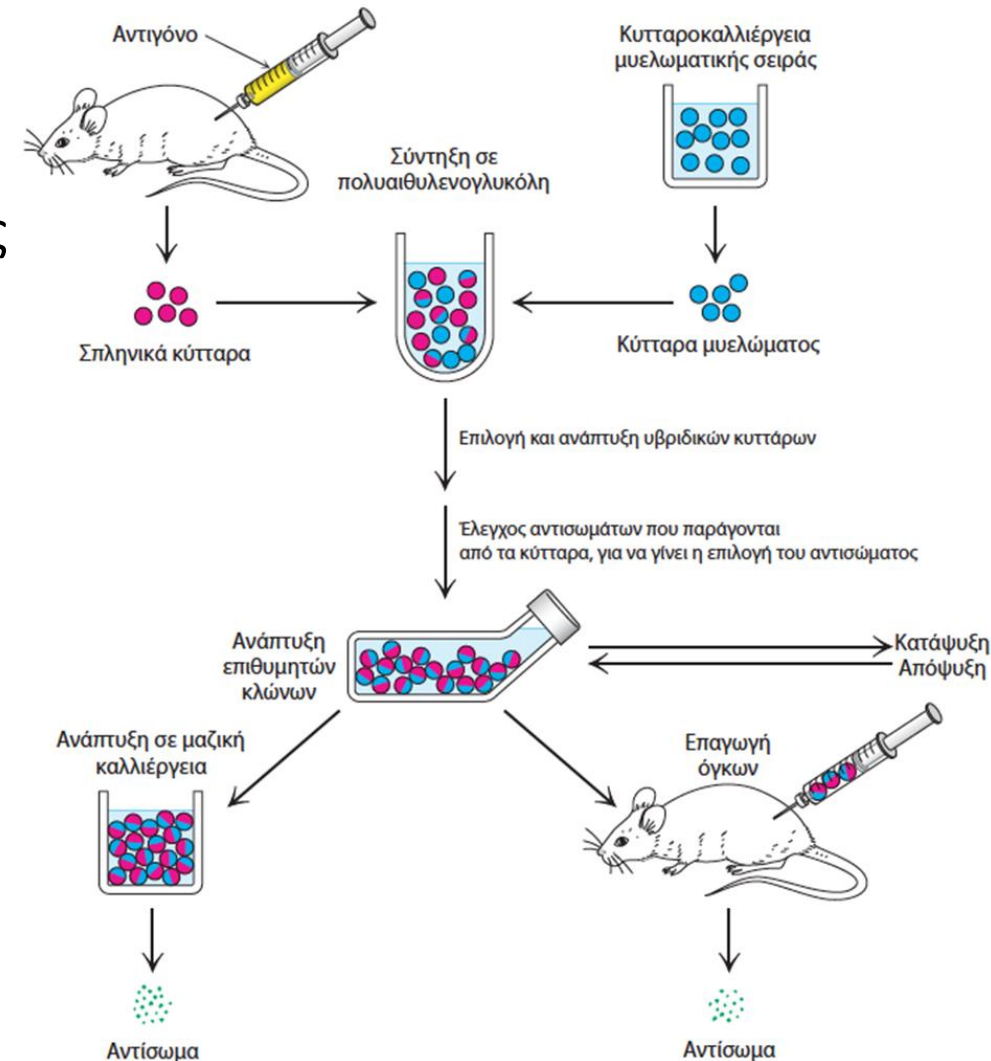
**Εικόνα 3.19 Πολυκλωνικά και μονοκλωνικά αντισώματα.** Τα περισσότερα αντιγόνα έχουν αρκετούς επιτόπους. Τα πολυκλωνικά αντισώματα είναι ετερογενή μείγματα αντισωμάτων, το κάθε ένα ειδικό για έναν από τους επιτόπους ενός αντιγόνου. Τα μονοκλωνικά αντισώματα είναι όλα ίδια και παράγονται από κλώνους ενός μοναδικού αρχικού κυττάρου-παραγωγού. Αναγνωρίζουν έναν συγκεκριμένο επίτοπο. [Κατά R.A. Goldsby, T.J. Kindt, and B.A. Osborne, *Kuby Immunology*, 4th ed. (W.H. Freeman and Company, 2000) p. 154.]

## Μπορούν να παραχθούν μονοκλωνικά αντισώματα οποιασδήποτε επιθυμητής εξειδίκευσης

- ❑ Η ανακάλυψη ενός τρόπου παραγωγής μονοκλωνικών αντισωμάτων, με όποια εξειδίκευση επιθυμούμε, έφερε επανάσταση στη χρήση των ανοσολογικών τεχνικών.
- ❑ Όπως η χρήση μη καθαρής πρωτεΐνης έτσι και η χρήση μείγματος αντισωμάτων δυσκολεύει την ερμηνεία δεδομένων και την κατανόηση της λειτουργίας.
- ❑ Θα ήταν ιδανικό να μπορούσαμε να έχουμε έναν κλώνο κυττάρων που παράγουν μόνο έναν τύπο αντισώματος.
- ❑ Το πρόβλημα είναι ότι κύτταρα που παράγουν αντισώματα δεν διατηρούνται έξω από τον οργανισμό, διότι πεθαίνουν σε μικρό χρονικό διάστημα.
- ❑ Ωστόσο, υπάρχουν αθάνατες κυτταρικές σειρές που παράγουν μονοκλωνικά αντισώματα.
- ❑ Οι σειρές αυτές προέρχονται από μια μορφή καρκίνου, το πολλαπλό μυέλωμα, μια κακοήθη διαταραχή των κυττάρων που παράγουν αντισώματα.
- ❑ Στον καρκίνο αυτόν, ένα μετασχηματισμένο πλασματοκύτταρο πολλαπλασιάζεται ανεξέλεγκτα, με αποτέλεσμα την τεράστια παραγωγή ενός μόνου τύπου κυττάρων.
- ❑ Τα κύτταρα αυτά αποτελούν κλώνο διότι προέρχονται από το ίδιο κύτταρο και έχουν τις ίδιες ιδιότητες.
- ❑ Αυτά τα απολύτως ίδια κύτταρα του μυελώματος εκκρίνουν μεγάλες ποσότητες μιας και μόνο ανοσοσφαιρίνης από γενεά σε γενεά.

# Μπορούν να παραχθούν μονοκλωνικά αντισώματα οποιασδήποτε επιθυμητής εξειδίκευσης

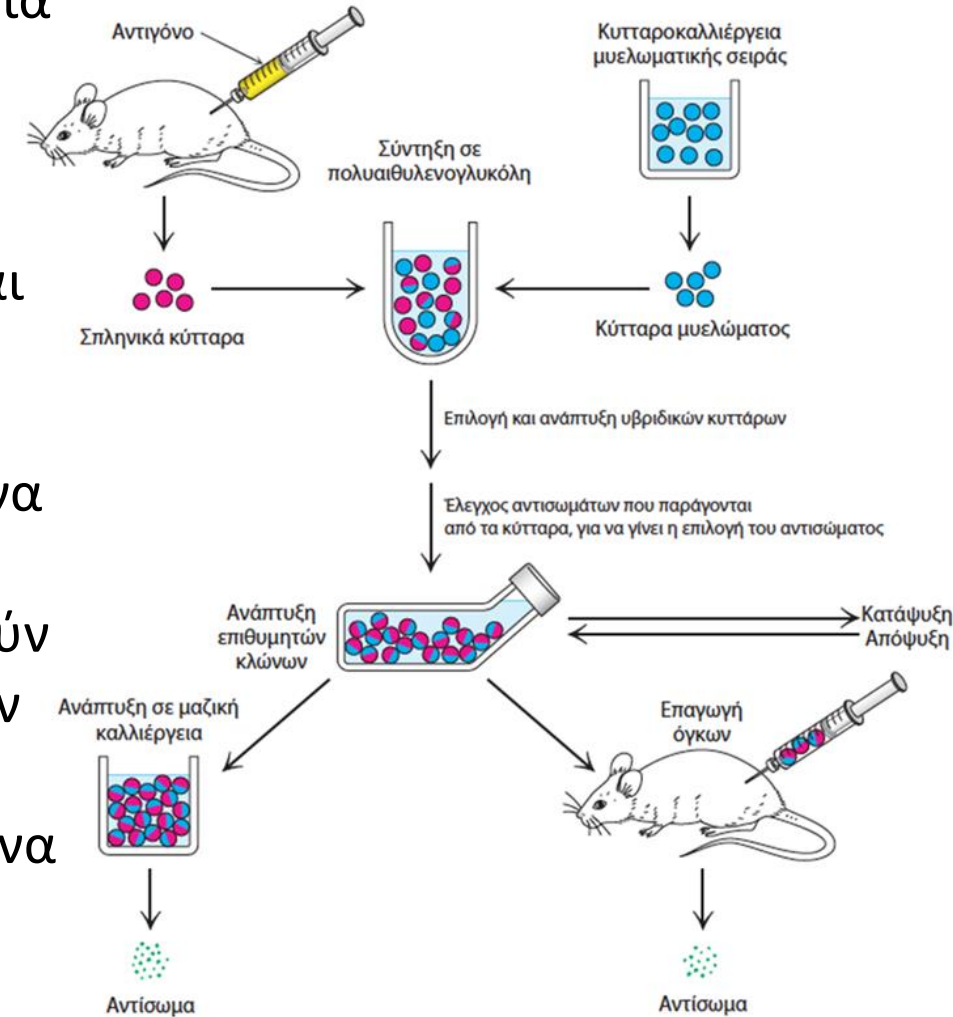
- ❑ Οι Cesar Milstein και Georges Köhler ανακάλυψαν ότι αν δημιουργηθεί μια σύντηξη ενός βραχύβιου κυττάρου που παράγει ένα αντίσωμα και ενός αθάνατου κυττάρου μυελώματος, τότε μπορούμε να έχουμε μεγάλες ποσότητες ομοιογενούς αντισώματος οποιασδήποτε επιθυμητής εξειδίκευσης.
- ❑ Η διαδικασία είναι η ακόλουθη:
- ❑ Εισάγουμε με ένεση το αντιγόνο σε έναν ποντικό και αρκετές εβδομάδες αργότερα παίρνουμε τον σπλήνα του.
- ❑ Ένα μείγμα πλασματοκυττάρων αυτού του σπλήνα και κυττάρων μυελώματος συντήκονται *in vitro*.
- ❑ Το κάθε ένα από τα υβριδικά κύτταρα που προκύπτουν και ονομάζονται υβριδισματικά κύτταρα παράγει το αντίσωμα που καθορίζεται από το σπληνικό κύτταρο με το οποίο ενώθηκε και μάλιστα η παραγωγή συνεχίζεται επ' άπειρον και σε μεγάλες ποσότητες.





# Μπορούν να παραχθούν μονοκλωνικά αντισώματα οποιασδήποτε επιθυμητής εξειδίκευσης

- ❑ Τα υβριδικα κίτταρα ελέγχονται στη συνέχεια με κάποια δοκιμασία αντιγόνου-αντισώματος για να προσδιοριστούν εκείνα που έχουν την επιθυμητή εξειδίκευση.
- ❑ Οι ομάδες των κυττάρων που φαίνονται να παράγουν τα επιθυμητά αντισώματα υποκλωνοποιούνται και ελέγχεται και πάλι η παραγωγή ειδικού αντισώματος.
- ❑ Η ίδια διαδικασία επαναλαμβάνεται μέχρις ότου επιτύχουμε μια καθαρή καλλιέργεια, δηλαδή έναν κλώνο που παράγει ένα μόνο αντίσωμα.
- ❑ Τα θετικά κίτταρα που επιλέχθηκαν μπορούν να αναπτυχθούν σε θρεπτικό υλικό, ή να ενεθούν σε ποντικούς και να επάγουν τη δημιουργία μυελώματος.
- ❑ Εναλλακτικά, τα κίτταρα μπορούν να καταψυχθούν και έτσι να διατηρηθούν για μεγάλα χρονικά διαστήματα.
- ❑ Η μέθοδος των υβριδισμάτων η οποία επιτρέπει την παραγωγή μονοκλωνικών αντισωμάτων άνοιξε καινούργιους ορίζοντες στη βιολογία και την ιατρική.



# Μπορούν να παραχθούν μονοκλωνικά αντισώματα οποιασδήποτε επιθυμητής εξειδίκευσης

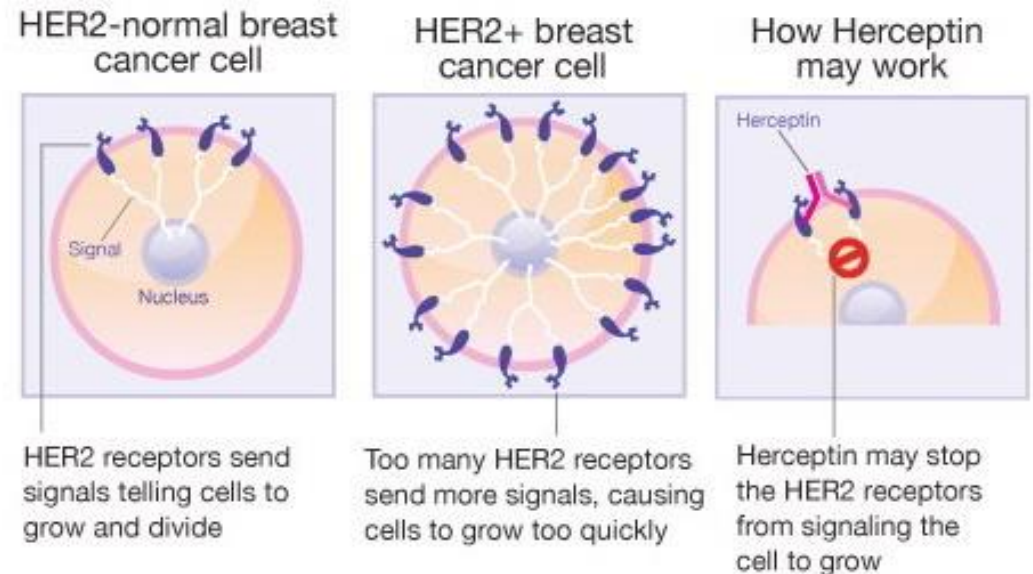
- ❑ Μεγάλες ποσότητες ομοιογενούς αντισώματος οποιασδήποτε επιθυμητής εξειδίκευσης μπορούν να παραχθούν με τη μέθοδο αυτή.
- ❑ Είναι οι πηγές οξυδερκούς κατανόησης της σχέσης μεταξύ δομής αντισώματος και εξειδίκευσης.
- ❑ Τα μονοκλωνικά αντισώματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ακόμη ως αναλυτικά και παρασκευαστικά αντιδραστήρια απόλυτης εξειδίκευσης.
- ❑ **Παραδείγματος χάριν, μπορεί να παρασκευαστεί αντίσωμα για αντιγόνο που δεν έχει απομονωθεί ακόμη.**
- ❑ Πολλές πρωτεΐνες που καθορίζουν την αναπτυξιακή διεργασία απομονώθηκαν χρησιμοποιώντας μονοκλωνικά αντισώματα σαν ετικέτες.
- ❑ Μονοκλωνικά αντισώματα συνδεδεμένα σε στερεά υποστρώματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως στήλες συγγένειας για να καθαριστούν σπάνιες πρωτεΐνες.
- ❑ Με τη μεθοδολογία αυτή απομονώθηκε η ιντερφερόνη (μια αντι-ιική πρωτεΐνη) με απόδοση καθαρότητας 5000 φορές σε σχέση με το αρχικό εκχύλισμα.



**Εικόνα 3.21** Φωτομικρογραφία φθορισμού ενός αναπτυσσόμενου εμβρύου *Drosophila*. Το έμβρυο έχει χρωματιστεί με φθορίζον μονοκλωνικό αντίσωμα για την πρωτεΐνη του γονιδίου *engrailed*, που είναι μια πρωτεΐνη η οποία προσδέεται στο DNA. Το γονίδιο είναι απαραίτητο για τον καθορισμό του σχεδιασμού του σώματος. [Ευγενική προσφορά Dr. Nipam Patel και Dr. Corey Goodman.]

# Μπορούν να παραχθούν μονοκλωνικά αντισώματα οποιασδήποτε επιθυμητής εξειδίκευσης

- ❑ Τα κλινικά εργαστήρια χρησιμοποιούν τα μονοκλωνικά αντισώματα σε πολλές δοκιμασίες.
- ❑ Παραδείγματος χάριν, όταν ισοένζυμα της καρδιάς ανιχνεύονται στο αίμα τότε έχουμε ενδείξεις καρδιακής προσβολής.
- ❑ Οι μεταγγίσεις αίματος έγιναν ασφαλέστερες με τον έλεγχο του αίματος του δότη για τους ιούς της επίκτητης ανοσοανεπάρκειας (AIDS), της ηπατίτιδας και άλλων λοιμωδών νοσημάτων.
- ❑ Μονοκλωνικά αντισώματα δοκιμάζονται μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως θεραπευτικά μέσα.
- ❑ Παραδείγματος χάριν, το φάρμακο trastuzumab (Herceptin) είναι ένα μονοκλωνικό αντίσωμα χρήσιμο για τη θεραπεία ορισμένων μορφών καρκίνου του μαστού.



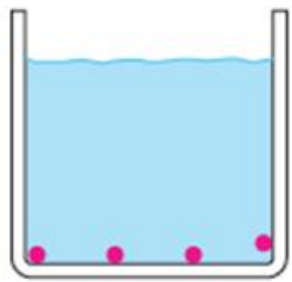
## Οι πρωτεΐνες μπορούν να ανιχνεύονται και να ποσοτικοποιούνται με τη χρήση της ενζυμοσύνδετης ανοσοπροσροφητικής μέτρησης (ELISA)

- ❑ Τα αντισώματα παρέχουν εξαιρετική εξειδίκευση ως αντιδραστήρια καθορισμού της ποσότητας μιας πρωτεΐνης ή κάποιου άλλου αντιγόνου.
- ❑ Η τεχνική λέγεται ενζυμοσύνδετη ανοσοπροσροφητική μέτρηση (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA).
- ❑ Με την τεχνική αυτή, ένα ένζυμο που αντιδρά με ένα άχρωμο υπόστρωμα και παράγει ένα έγχρωμο προϊόν συνδέεται ομοιοπολικά με ένα ειδικό αντίσωμα που αναγνωρίζει ένα αντιγόνο-στόχο.
- ❑ Αν υπάρχει αντιγόνο τότε το σύμπλοκο αντισώματος-ενζύμου θα δεσμευθεί σε αυτό και το ένζυμο θα καταλύσει την αντίδραση παράγοντας το χρωμοφόρο προϊόν.
- ❑ Επομένως, η παρουσία του χρωμοφόρου προϊόντος καθορίζει την ύπαρξη του αντιγόνου.
- ❑ Μια τέτοια μέτρηση, γρήγορη και ευαίσθητη μπορεί να ανιχνεύσει ποσότητες πρωτεΐνης μικρότερες από ένα νανογραμμάριο ( $10^{-9}$ g).
- ❑ Η ELISA μπορεί να χρησιμοποιηθεί με πολυκλωνικά ή μονοκλωνικά αντισώματα, η χρήση όμως μονοκλωνικών αντισωμάτων παρέχει πιο αξιόπιστα αποτελέσματα.

# Οι πρωτεΐνες μπορούν να ανιχνεύονται και να ποσοτικοποιούνται με τη χρήση της ενζυμοσύνδετης ανοσοπροσροφητικής μέτρησης (ELISA)

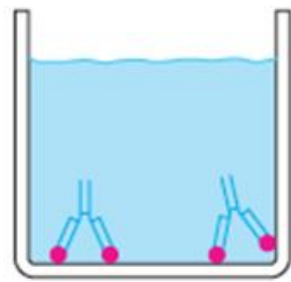
- ❑ Υπάρχουν αρκετοί διαφορετικοί τύποι ELISA. Θα εξετάσουμε δύο από αυτούς.
- ❑ Η έμμεση ELISA χρησιμοποιείται για την ανίχνευση της ύπαρξης αντισώματος και αποτελεί τη βάση της δοκιμασίας ανίχνευσης του ιού HIV.

(A) Έμμεση ELISA



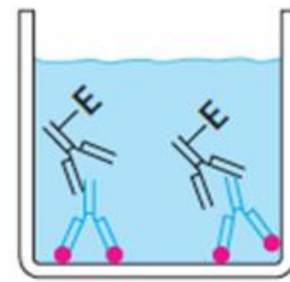
Θέση καλυμμένη με αντιγόνο

Πλύσιμο



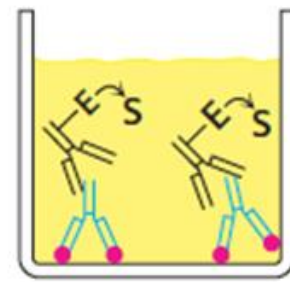
Ειδικό αντίσωμα δεσμεύει το αντιγόνο

Πλύσιμο



Ενζυμοσύνδετο αντίσωμα δεσμεύεται στο ειδικό αντίσωμα

Πλύσιμο



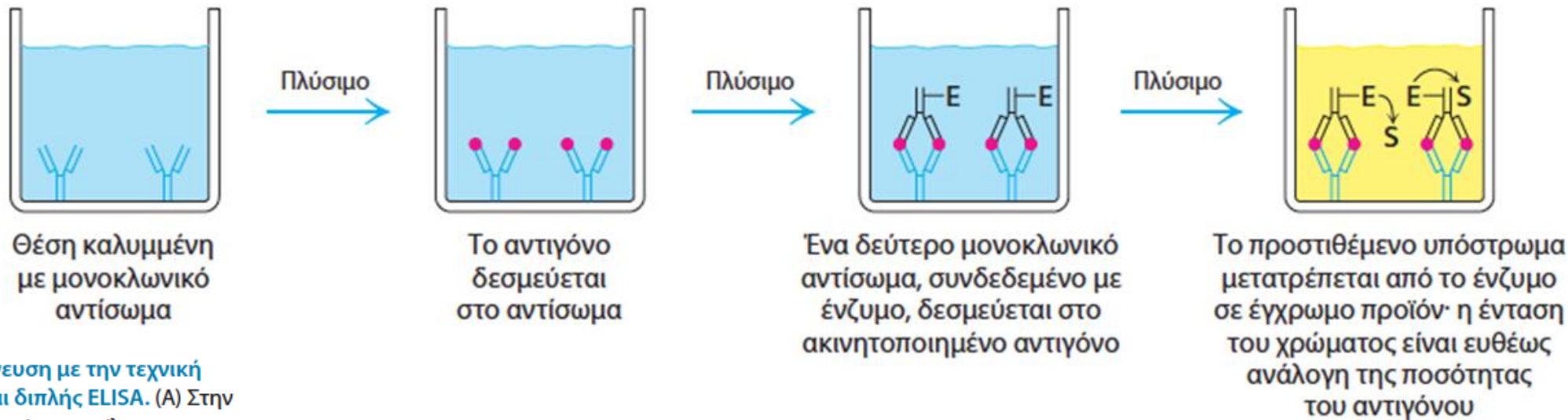
Το προστιθέμενο υπόστρωμα μετατρέπεται από το ένζυμο σε έγχρωμο προϊόν· η ένταση του χρώματος είναι ευθέως ανάλογη της ποσότητας του ειδικού αντισώματος

Εικόνα 3.22 Ανίχνευση με την τεχνική έμμεσης ELISA και διπλής ELISA. (A) Στην έμμεση ELISA, το χρώμα οφείλεται στην ύπαρξη του αντισώματος που αναγνωρίζει ένα ειδικό αντιγόνο. (B) Στη διπλή (sandwich) ELISA, η ένταση του χρώματος είναι ανάλογη της ποσότητας του αντιγόνου. [Κατά R.A. Goldsby, T.J. Kindt, and B.A. Osborne, *Kuby Immunology*, 4th ed. (W.H. Freeman and Company, 2000), p. 162.]

# Οι πρωτεΐνες μπορούν να ανιχνεύονται και να ποσοτικοποιούνται με τη χρήση της ενζυμοσύνδετης ανοσοπροσροφητικής μέτρησης (ELISA)

- ❑ Υπάρχουν αρκετοί διαφορετικοί τύποι ELISA. Θα εξετάσουμε δύο από αυτούς.
- ❑ Η διπλή (sandwich) ELISA χρησιμοποιείται την ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση του αντιγόνου αντί του αντισώματος.

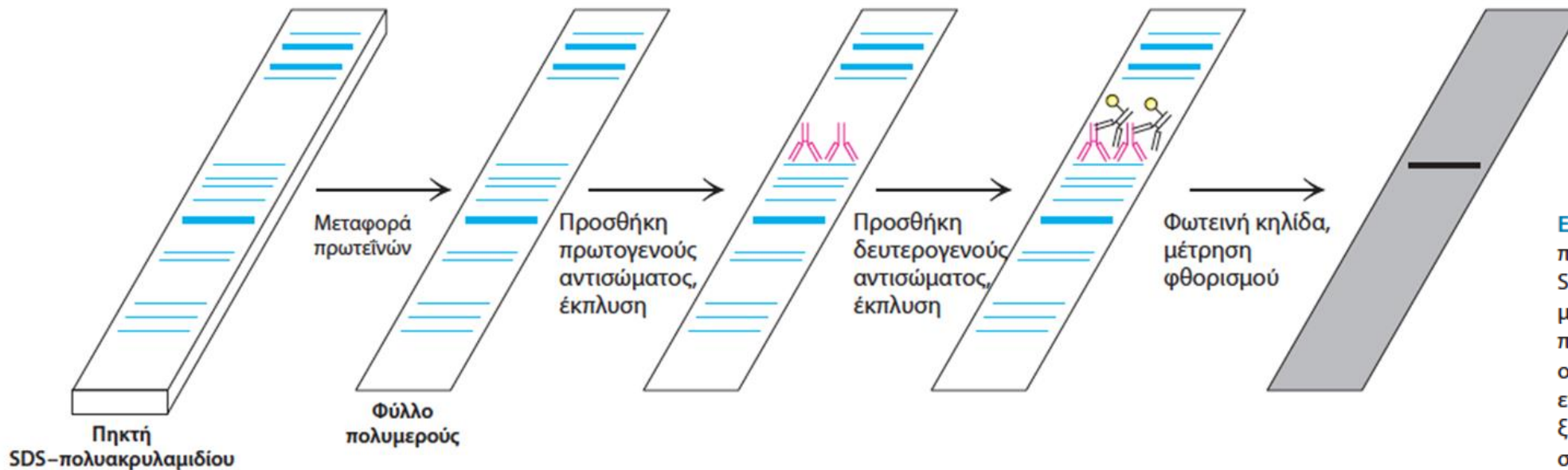
(B) Διπλή ELISA



Εικόνα 3.22 Ανίχνευση με την τεχνική έμμεσης ELISA και διπλής ELISA. (A) Στην έμμεση ELISA, το χρώμα οφείλεται στην ύπαρξη του αντισώματος που αναγνωρίζει ένα ειδικό αντιγόνο. (B) Στη διπλή (sandwich) ELISA, η ένταση του χρώματος είναι ανάλογη της ποσότητας του αντιγόνου. [Κατά R.A. Goldsby, T.J. Kindt, and B.A. Osborne, *Kuby Immunology*, 4th ed. (W.H. Freeman and Company, 2000), p. 162.]

# Η ανοσοαποτύπωση επιτρέπει την ανίχνευση πρωτεϊνών που έχουν διαχωριστεί με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή

- ❑ Πολύ μικρές ποσότητες μιας πρωτεΐνης που μας ενδιαφέρει σε ένα κύτταρο ή κυτταρικό υγρό μπορούν να ανιχνευθούν με μια τεχνική ανοσομέτρησης που λέγεται ανοσοαποτύπωση ή αποτύπωση Western (Western blotting)

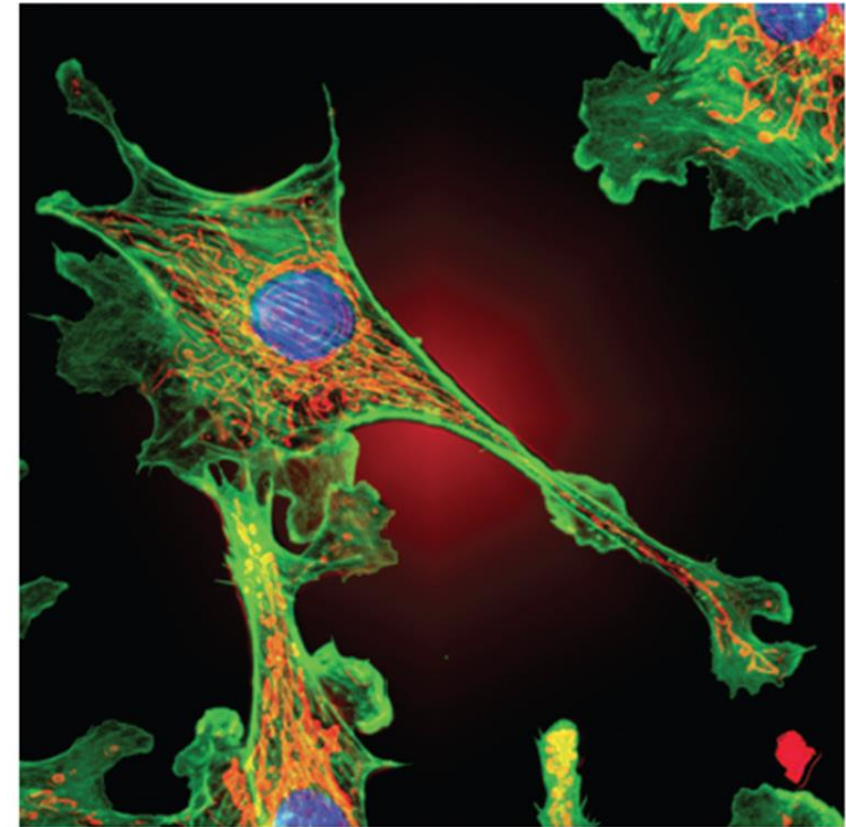


**Εικόνα 3.23 Αποτύπωση western.** Οι πρωτεΐνες που διαχωρίστηκαν σε μια πηκτή SDS-πολυακρυλαμιδίου μεταφέρονται σε μεμβράνη πολυμερούς. Στη μεμβράνη προστίθεται το πρωτογενές αντίσωμα, το οποίο είναι ειδικό για την πρωτεΐνη που ενδιαφέρει. Στη συνέχεια η μεμβράνη ξεπλένεται για να απομακρυνθεί το μη συνδεδεμένο αντίσωμα. Ακολουθεί η προσθήκη του δευτερογενούς αντισώματος, το οποίο αναγνωρίζει το πρωτογενές αντίσωμα, και νέο πλύσιμο. Το δεύτερο ένζυμο έχει σημαθεί (εδώ με φθορίζουσα ετικέτα, η οποία υποδεικνύεται με τον κίτρινο κύκλο), οπότε η ζώνη στην οποία περιέχεται η πρωτεΐνη που ενδιαφέρει μπορεί να προσδιοριστεί.

# Φθορίζοντες δείκτες επιτρέπουν την παρατήρηση συγκεκριμένων πρωτεϊνών μέσα στα κύτταρα

- ❑ Η ύπαρξη ανιχνευτών που φθορίζουν μας δίνει την ευκαιρία να μελετήσουμε τις πρωτεΐνες στο φυσικό τους περιβάλλον, στα κύτταρα.
- ❑ Παραδείγματος χάριν, τα κύτταρα μπορούν να χρωματιστούν με αντισώματα που φθορίζουν και να αναλυθούν με μικροσκόπιο φθορισμού για να αποκαλύψουν τη θέση των πρωτεϊνών που μας ενδιαφέρουν.
- ❑ Σειρές από παράλληλες δέσμες εμφανίζονται σε κύτταρα που χρωματίζονται με αντίσωμα ειδικό για ακτίνη, μια πρωτεΐνη που πολυμερίζεται σε νημάτια.
- ❑ Τα νημάτια της ακτίνης είναι συστατικά του κυτταρικού σκελετού που ρυθμίζει το σχήμα και τη μετακίνηση των κυττάρων.
- ❑ **Παρατηρώντας τη θέση της πρωτεΐνης, οι φθορίζοντες δείκτες μας δίνουν και ενδείξεις για τη λειτουργία της πρωτεΐνης.**

<https://www.youtube.com/watch?v=PCJ13LjncMc>

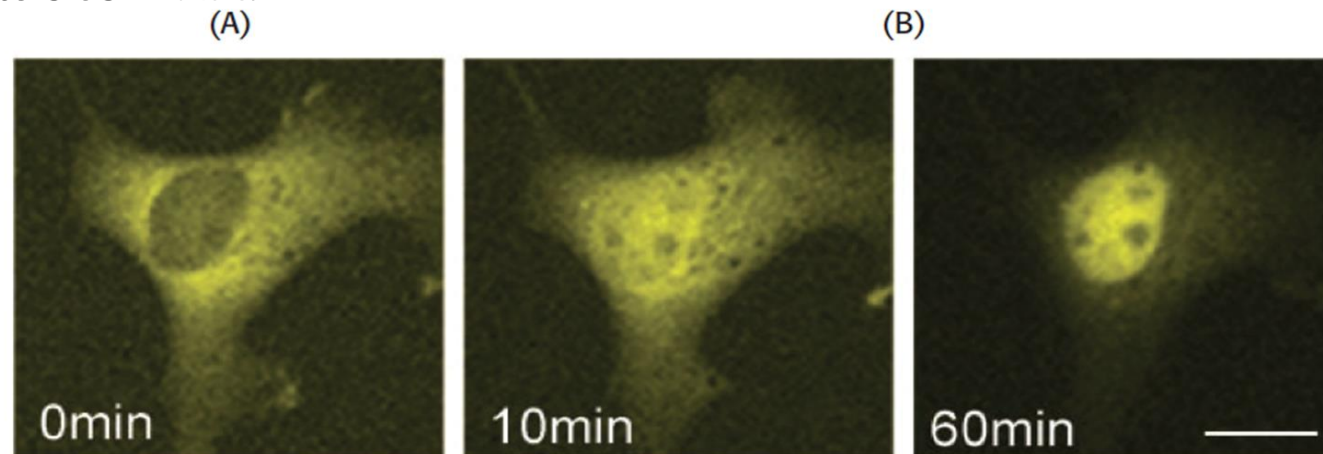


**Εικόνα 3.24 Τα νημάτια της ακτίνης.** Τα νημάτια της ακτίνης, στη φωτομικρογραφία φθορισμού του κυττάρου, εμφανίζονται πράσινα λόγω χρώσης με ένα αντίσωμα ειδικό για την πρωτεΐνη. [David Becker/Science Source.]



# Φθορίζοντες δείκτες επιτρέπουν την παρατήρηση συγκεκριμένων πρωτεϊνών μέσα στα κύτταρα

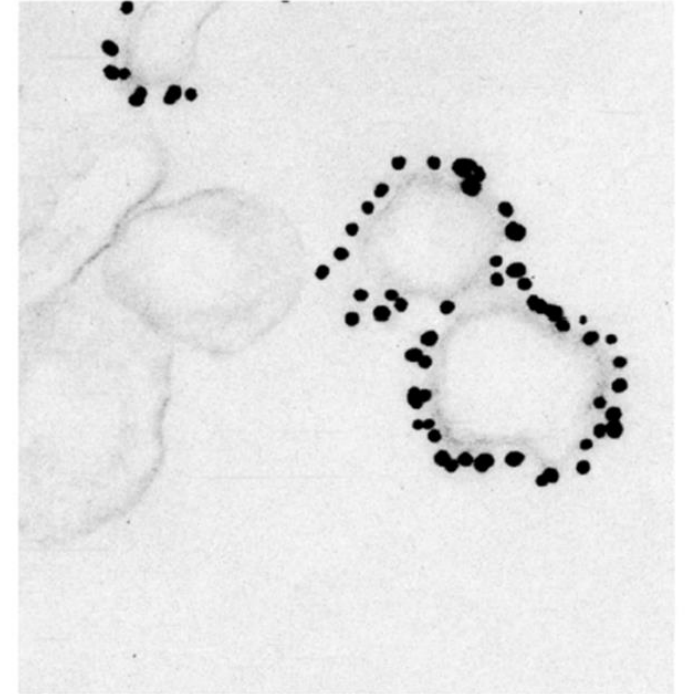
- ❑ Ο πρωτεϊνικός υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών είναι παράγοντας μεταγραφής και ρυθμίζει τη γονιδιακή έκφραση ανταποκρινόμενος στη στεροειδή ορμόνη κορτιζόνη.
- ❑ Ο υποδοχέας συνδέθηκε με την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (green fluorescent protein, GFP) που είναι φυσική πρωτεΐνη της μέδουσας *Aequorea victoria*.
- ❑ Το μικροσκόπιο φθορισμού έδειξε ότι, όταν δεν υπάρχει ορμόνη, ο υποδοχέας εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα, ενώ με την προσθήκη του στεροειδούς ο υποδοχέας μετατοπίζεται στον πυρήνα όπου και δεσμεύεται στο DNA.



**Εικόνα 3.25 Πυρηνική εντόπιση ενός υποδοχέα στεροειδών.** (A) Ο υποδοχέας αλατοκορτικοειδών, ο οποίος είναι ορατός διότι είναι συνδεδεμένος με μια κίτρινη παραλλαγή της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης, βρίσκεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα των καλλιεργούμενων κυττάρων. (B) Όταν προσθέσουμε κορτικοστερόνη (γλυκοκορτικοειδές που συνδέεται και αυτό με τον υποδοχέα αλατοκορτικοειδών) ο υποδοχέας μετακινείται στον πυρήνα. [M. Nishi, M. Tanaka, K.-i. Matsuda, M. Sunaguchi, and M. Kawata. *J. Neurosci.* 24:4918-4927, 2004, Fig. 7A.]

# Φθορίζοντες δείκτες επιτρέπουν την παρατήρηση συγκεκριμένων πρωτεϊνών μέσα στα κύτταρα

- ❑ Η καλύτερη διαχωριστική ικανότητα του μικροσκοπίου φθορισμού είναι περίπου  $0,2 \mu\text{m}$  ( $200 \text{ nm}$  ή  $2.000 \text{ \AA}$ ) λόγω του μήκους κύματος του ορατού φωτός.
- ❑ Ακόμη καλύτερη ανάλυση μπορεί να επιτευχθεί με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, χρησιμοποιώντας αντισώματα σημασμένα με δείκτες μεγάλης ηλεκτρονικής πυκνότητας.
- ❑ Παραδείγματος χάριν, ο συνδυασμός φερριτίνης με αντίσωμα μπορεί να εμφανιστεί εύκολα με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, διότι περιέχει έναν πυρήνα υδροξειδίου του σιδήρου που έχει μεγάλη πυκνότητα ηλεκτρονίων.
- ❑ Συσσωματώματα χρυσού μπορούν επίσης να συζευχθούν με αντισώματα και να γίνουν ορατά με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.
- ❑ Η ανοσοκυτταροχημεία με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο μπορεί να προσδιορίσει τη θέση αντιγόνων με ακρίβεια  $10 \text{ nm}$  ( $100 \text{ \AA}$ ) ή και μεγαλύτερη.



**Εικόνα 3.26** Ανοσοκυτταροχημεία με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Τα αδιαφανή σωματίδια (διαμέτρου  $150 \text{ \AA}$ , ή  $15 \text{ nm}$ ) στην ηλεκτρονιομικρογραφία αυτή είναι συσσωματώματα ατόμων χρυσού συνδεδεμένων σε μόρια αντισώματος. Μεμβρανικά κυστίδια στις συνάψεις των νευρώνων περιέχουν μια πρωτεΐνη-διάυλο (Υποκεφάλαιο 13.4) που αναγνωρίζεται από το σημασμένο με αντίσωμα. [Ευγενική προσφορά Dr. Peter Sargent.]