

Ηλεκτροφόρηση Πρωτεϊνών-Ανοσοχημικές μέθοδοι προσδιορισμού

Άννα-Μαρία Ψαρρά
Λάρισα, 2018

ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ

Άννα-Μαρία Ψαρρά
ΤΒΒ, Παν/μιο Θεσσαλίας
Λάρισα 2018

ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ

Αναλυτικός τρόπος διαχωρισμού πρωτεϊνών και άλλων μακρομορίων όπως πρωτεϊνών DNA, RNA

Αρχή της μεθόδου

Μόρια που φέρουν καθαρό φορτίο δύναται να μετακινηθούν σε ένα ηλεκτρικό πεδίο

ΤΑΧΥΤΗΤΑ ΜΕΤΑΚΙΝΗΣΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ DNA ΚΑΙ RNA ΜΕΣΑ ΣΕ ΗΛΕΚΤΡΙΚΟ ΠΕΔΙΟ

$$U = E \cdot z / f$$

E = Ένταση ηλεκτρικού πεδίου ($E = F/z$)

Z = καθαρό φορτίο της πρωτεΐνης

$E \cdot z$ = Ηλεκτροστατική δύναμη

f = συντελεστής τριβής

Ο **συντελεστής τριβής** εξαρτάται από τη **μάζα** και το **σχήμα** του μορίου που μετακινείται και από το **ιξώδες του μέσου**

Για σφαίρα

$$f = 6\pi\eta r$$

η = Ιξώδες του μέσου

r = ακτίνα

ΠΗΚΤΗ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟΥ

Ο διαχωρισμός πρωτεϊνών γίνεται μέσω μίας πηκτής πολυακρυλαμιδίου

Πολυμερισμός **ακρυλαμιδίου**

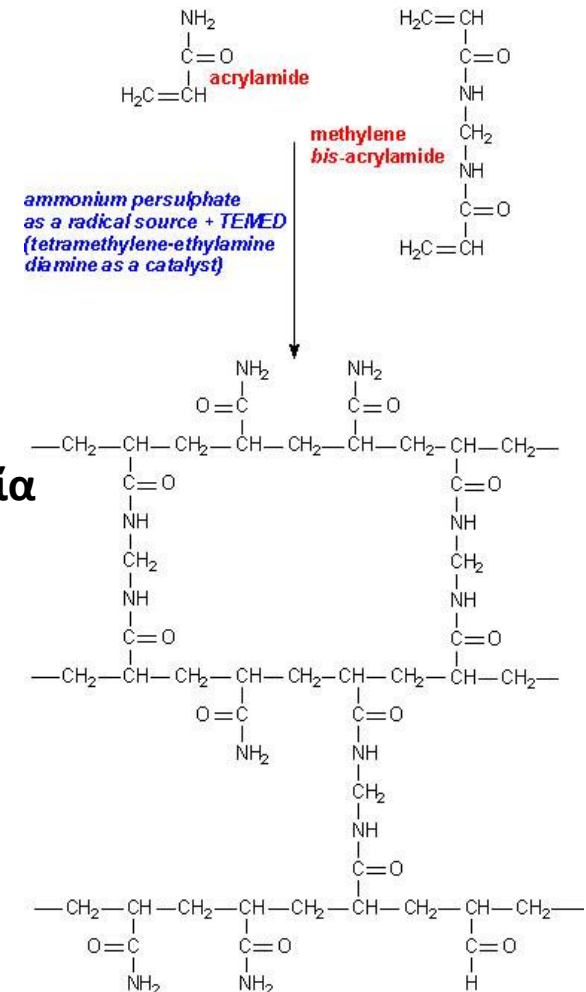
Διασύνδεση πολυμερών ακρυλαμιδίου με **μεθυλενο-δισακρυλαμίδιο**

Υπερθεικό αμμώνιο: Εκκινητής πολυμερισμού, δημιουργία ελεύθερων ριζών

TEMED : τετραμεθυλεν αιθυλαμιν διαμίνη, επιταχυντής πολυμερισμού, καταλύτης

Η πηκτή λειτουργεί ως μοριακός ηθμός

ANNA-MARIA ΨΑΡΡΑ



ΠΗΚΤΗ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟΥ

Μόρια με μεγάλο μοριακό βάρος έχουν μικρή κινητικότητα
Μόρια με μικρό μοριακό βάρος κινούνται ταχύτερα

ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΥΠΟ ΑΠΟΔΙΑΤΑΚΤΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ

Ρυθμιστικό Διάλυμα διαλυτοποίησης πρωτεϊνών : Sample buffer

SDS : δωδεκακυλο-θειικό νάτριο

-  **Ανιοντικό απορρυπαντικό που καταστρέφει σχεδόν όλες τη μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις, καταργεί τις ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις**
- **1 μόριο SDS / 2 αμινοξέα**
- **Προσδίδει αρνητικό φορτίο σε όλες τις πρωτεΐνες που ηλεκτροφορούνται**
- **Το αρχικό φορτίο της πρωτεΐνης καθίσταται αμελητέο μετά τη σύνδεση με το SDS**
- **Το αρνητικό φορτίο που αποκτούν οι πρωτεΐνες είναι περίπου ανάλογο με τη μάζα τους**
- **Ο λόγος φορτίο/μάζα είναι ίδιος για όλες τις πρωτεΐνες**

Μερκαπτοαιθανόλη ή διθειοθρεϊτόλη

Αναγωγή δισουλφιδικών δεσμών

Γλυκερόλη

Αποτρέπει τη διάχυση των πρωτεϊνών στο διάλυμα ηλεκτροφόρησης διατηρώντας της διαλυμένες σε ένα πυκνότερο διάλυμα

Ρυθμιστικό διάλυμα : Διατήρηση επιθυμητού pH

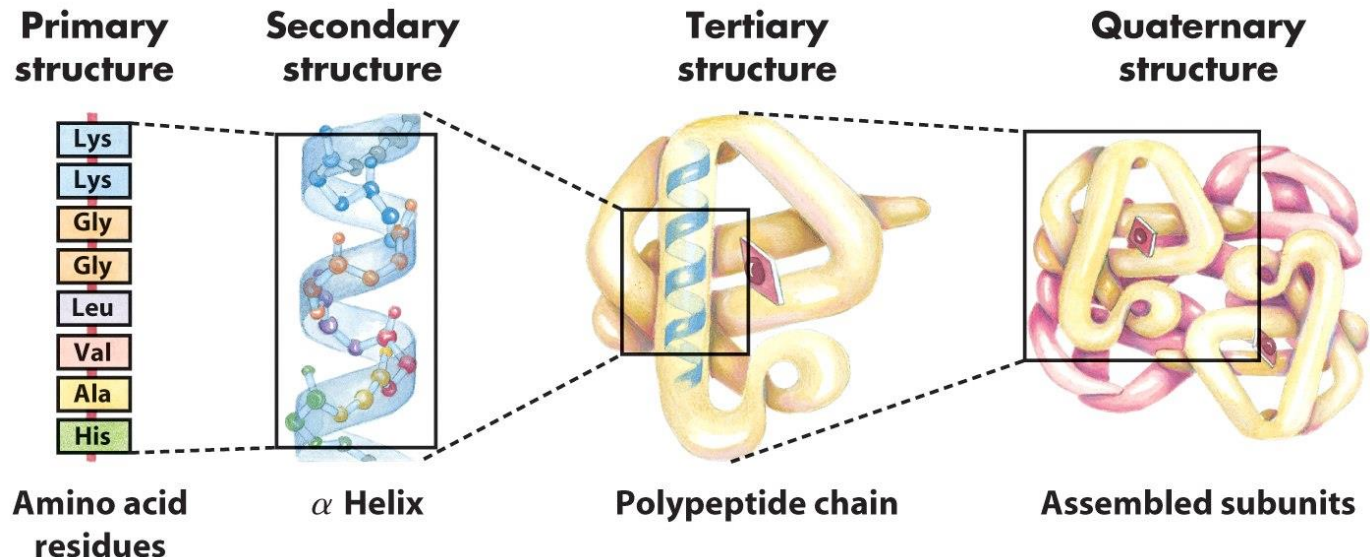
Χρωστική κυανού του Coomassie: Παρακολούθηση της πορείας της ηλεκτροφόρησης

SDS – PAGE: Πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες

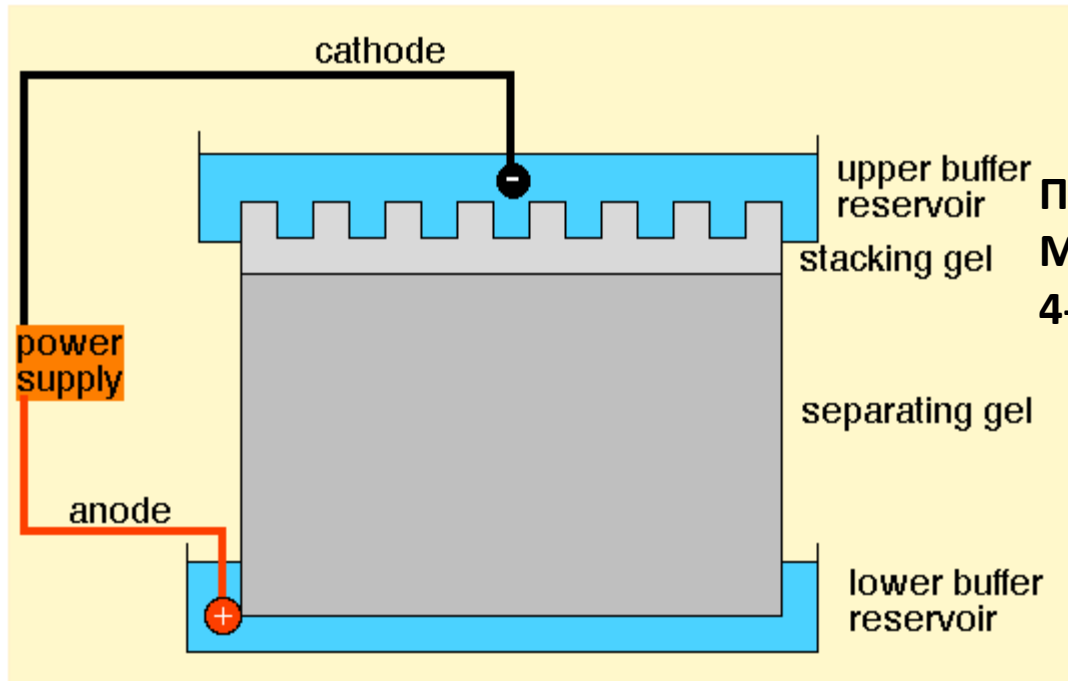
Βασικό συστατικό ρυθμιστικού διαλύματος δείγματος (**Sample Buffer**):

Αναγωγικός παράγοντας: διθειοθρεϊτόλη DTT, β-μερκαπτο-αιθανόλη

Διασπά δισουλφιδικούς δεσμούς, καταργεί την 3D δομή

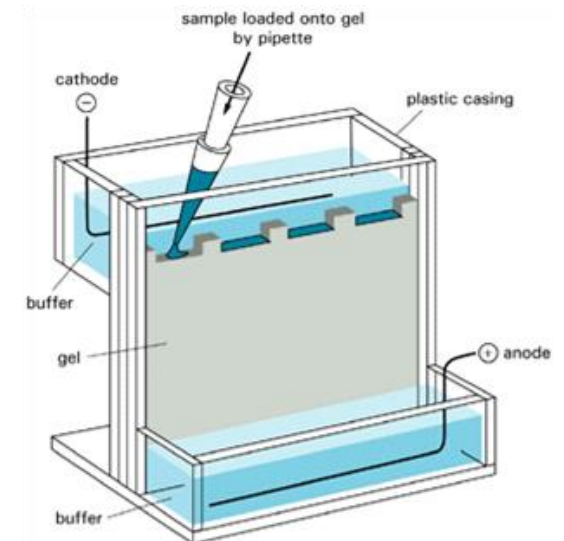


ΠΗΚΤΗ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟΥ



Πηκτή επιστοίβαξης, pH:6.8
Μικρή συγκέντρωση ακρυλαμιδίου
4-6 %

Πηκτή διαχωρισμού, pH:8.8
Συγκέντρωση ακρυλαμιδίου ≥ 7 %

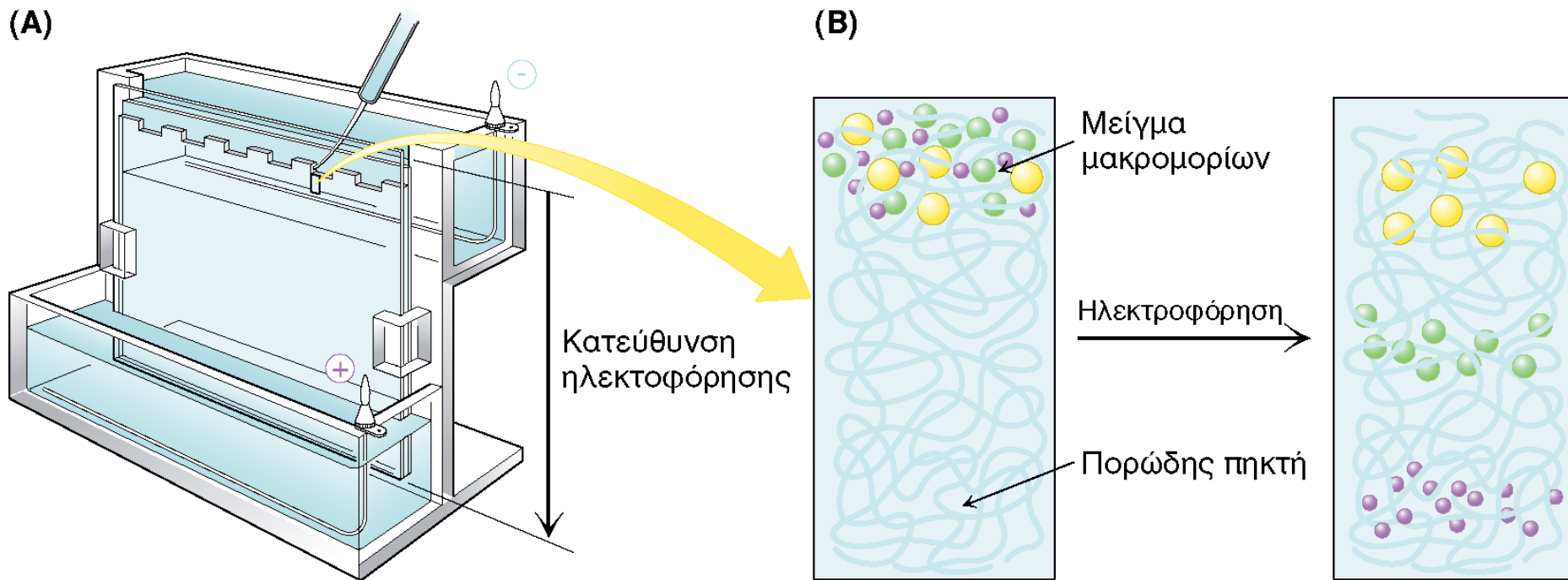


<http://www.sfu.ca/bisc/bisc-429/eph.gif>

ANNA-MARIA ΨΑΡΡΑ

ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΥΠΟ ΑΠΟΔΙΑΤΑΚΤΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ

Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών γίνεται κυρίως βάσει της μάζας τους
ΟΛΕΣ ΟΙ ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ ΕΙΝΑΙ ΑΡΝΗΤΙΚΑ ΦΟΡΤΙΣΜΕΝΕΣ ΚΑΙ ΚΙΝΟΥΝΤΑΙ ΠΡΟΣ ΤΟΝ ΘΕΤΙΚΟ ΠΟΛΟ



ΕΙΚΟΝΑ 4.7 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου. (Α) Μια συσκευή ηλεκτροφόρησης σε πη-

Τα μόρια που είναι μικρά σε σχέση με τους πόρους της πηκτής μετακινούνται εύκολα και γρήγορα δια μέσου της πηκτής

ANNA-MARIA ΨΑΡΡΑ

SDS – PAGE: Πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες

Πηκτές ακρυλαμιδίου με βαθμίδωση συγκέντρωσης ακρυλαμιδίου
Π.χ. 4-15%

Πολύ καλή διαχωριστική ικανότητα συνήθως αγοράζονται έτοιμα

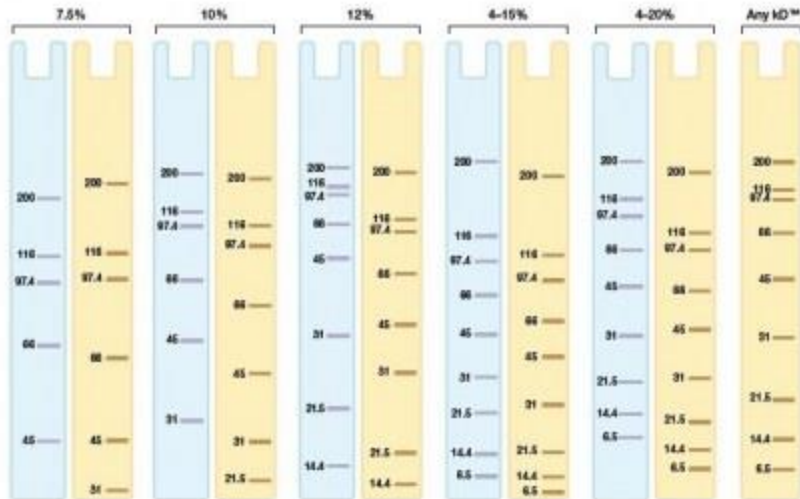


Fig. 1. Side-by-side comparison of migration patterns of broad range SDS-PAGE unstained standards (catalog #161-0317) run on Ready Gel precast gels (■) and Mini-PROTEAN TGX gels (■).



ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΥΠΟ ΑΠΟΔΙΑΤΑΚΤΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ

Μέθοδος:

Γρήγορη

Ευαίσθητη

Μεγάλη διαχωριστική ικανότητα

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

- Έλεγχος των επιπέδων έκφρασης μιας πρωτεΐνης σε καλλιέργεια κυττάρων υπό διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες

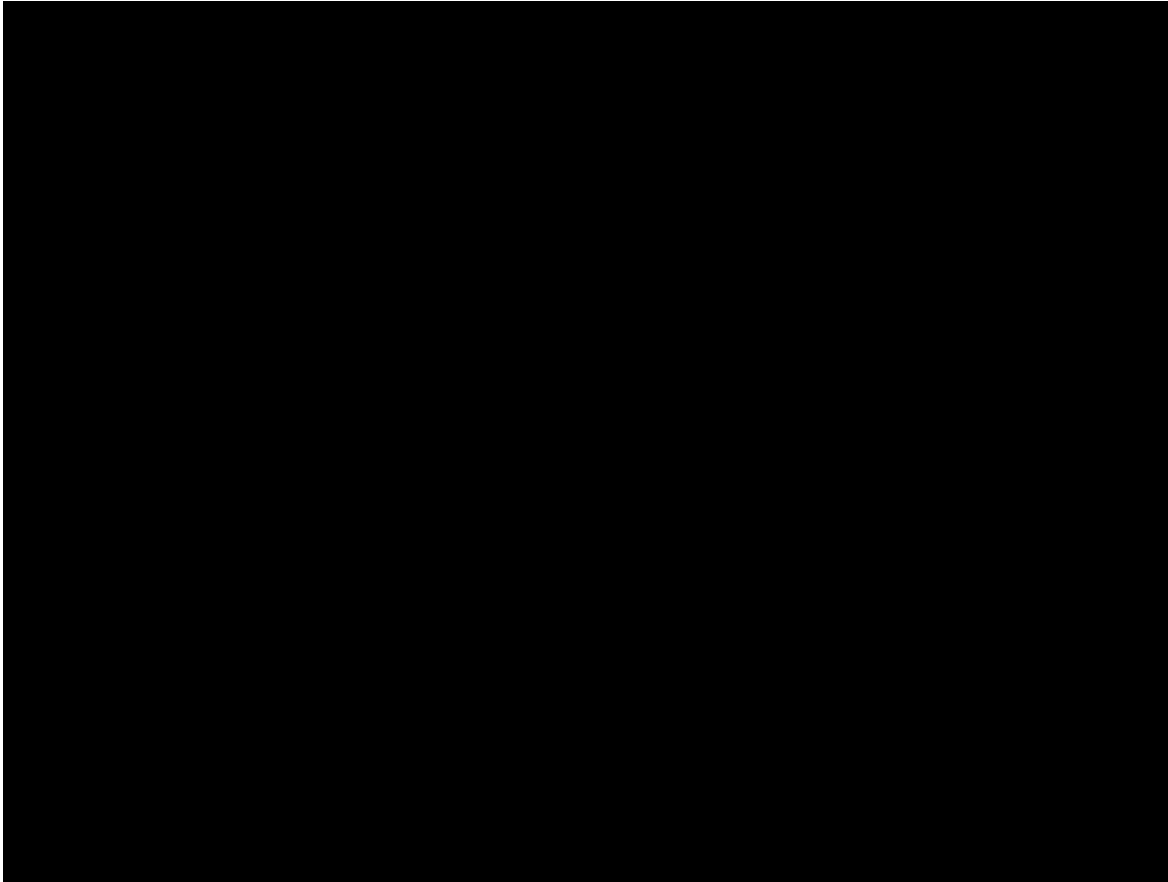
Π.χ αλλαγή θερμοκρασίας πίεσης



Βελτιστοποίηση περιβαλλοντικών συνθηκών παραγωγής πρωτεΐνης

- Ανάλυση του συνολικού πρωτεϊνικού προφίλ ενός τροφίμου π.χ πρωτεΐνες αυγού, γαλακτοκομικών

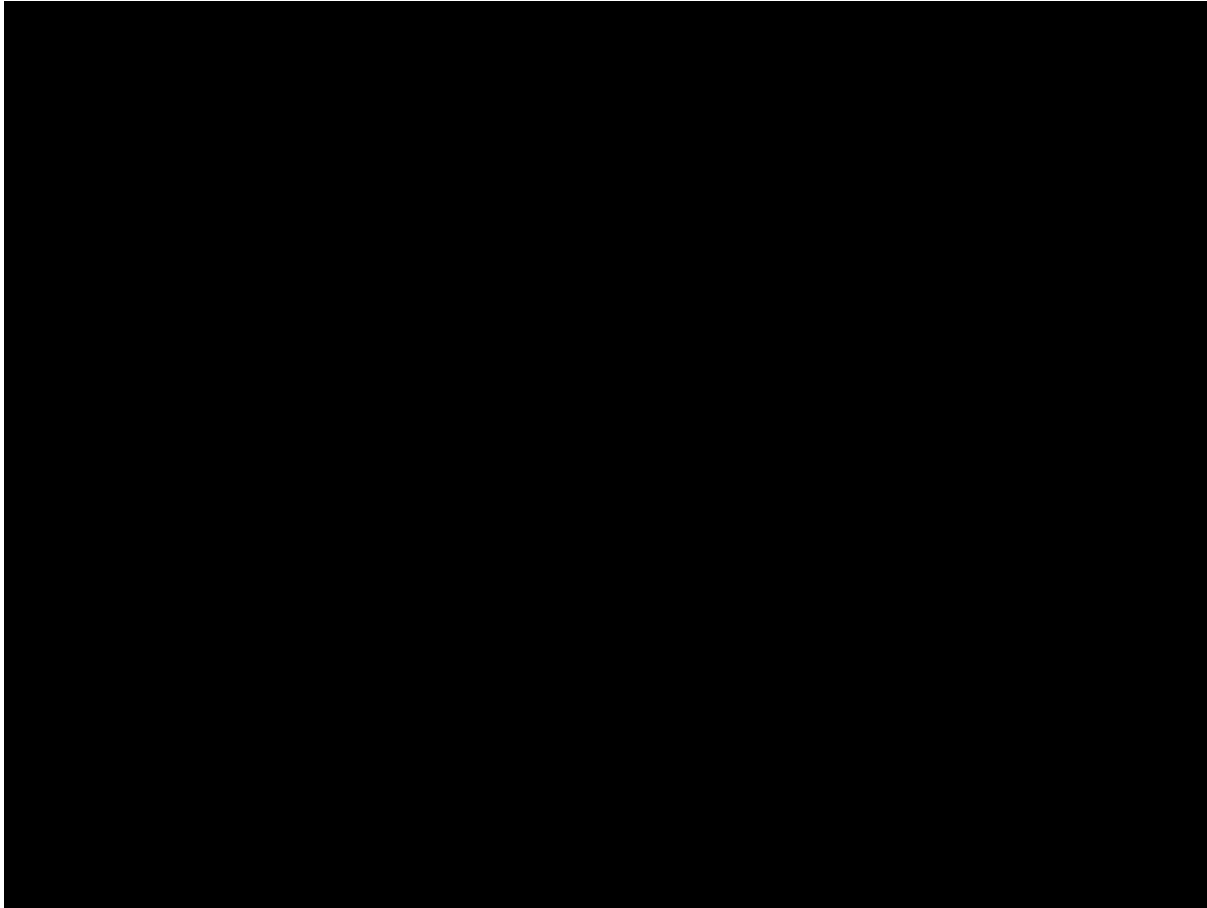
ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΠΗΚΤΗΣ



https://www.youtube.com/watch?v=EDi_n_0NiF4

ANNA-MARIA ΨΑΡΡΑ

ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΥΠΟ ΑΠΟΔΙΑΤΑΚΤΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ

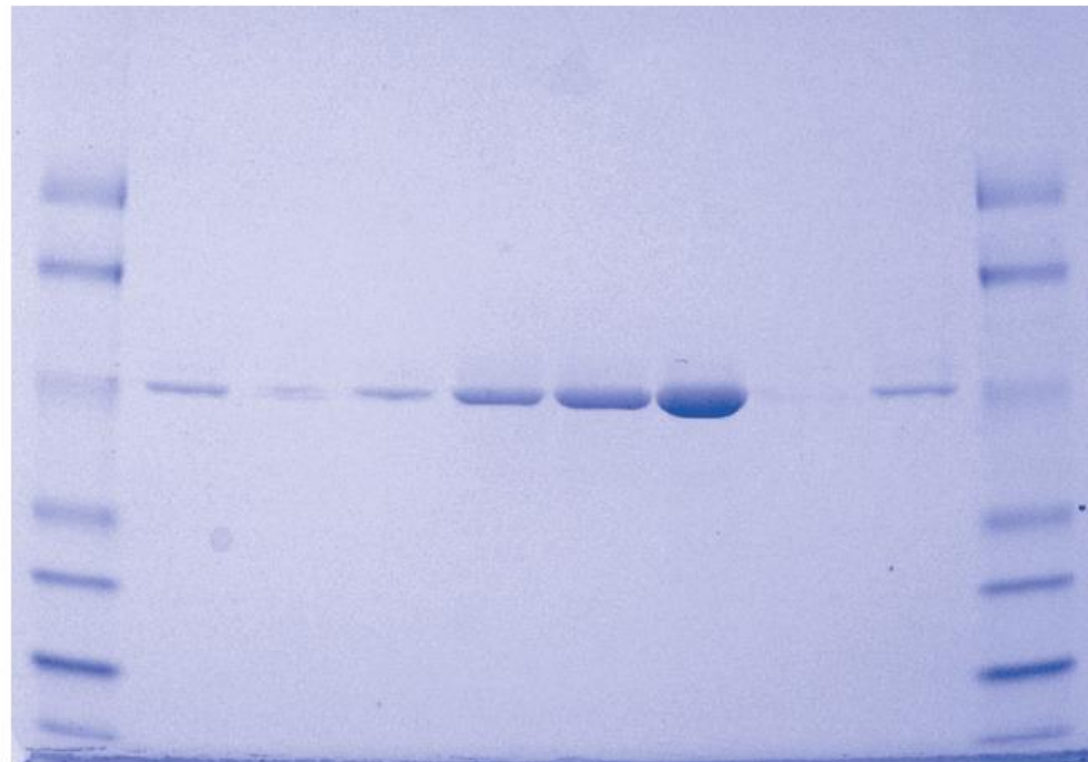
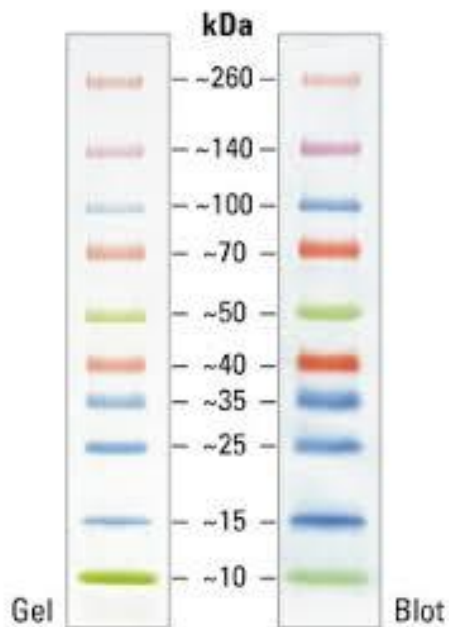


<https://www.youtube.com/watch?v=pnBZeL8nFEo>

ANNA-MARIA ΨΑΡΡΑ

ΧΡΩΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ

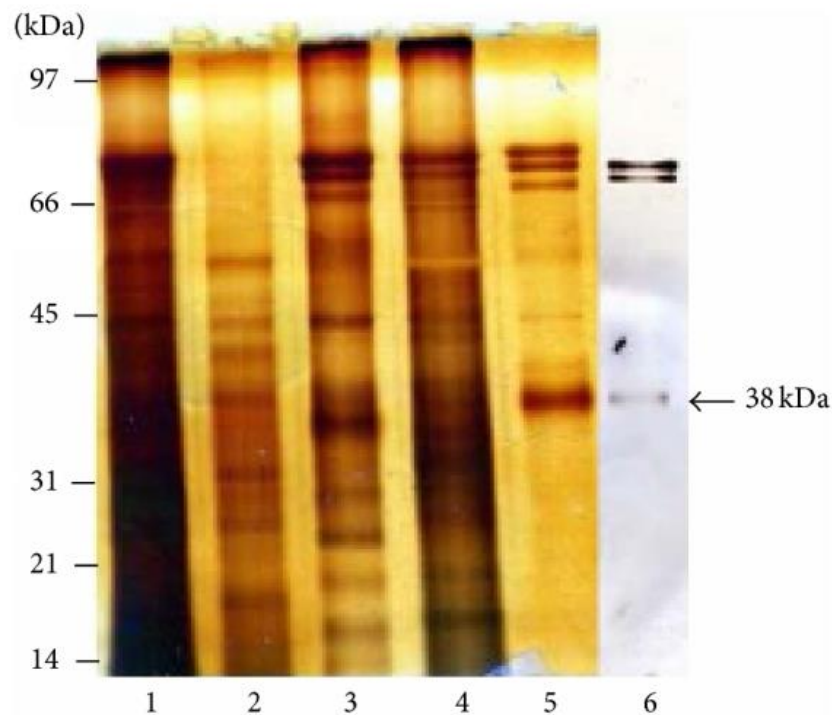
Χρώση με κυανό του Coomassie



ΕΙΚΟΝΑ 4.9 Χρώση των πρωτεϊνών μετά την ηλεκτροφόρηση. ANNA-MARIA ΨΑΡΡΑ Οι πρωτεΐνες που διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή SDS-πολυακρυ-

ΧΡΩΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ

Χρώση με νιτρικό άργυρο



Ευαισθησία χρώσεων πηκτής πολυακρυλαμίδιου

Κυανό του Coomassie: ($\geq 0.1 \mu\text{g}$, $\sim 2\text{pmol}$)

Άργυρος : ($\geq 0.02 \mu\text{g}$)

Αυτοραδιογραφία : $\leq 0.02 \mu\text{g}$

ΙΣΟΗΛΕΚΤΡΙΚΟΣ ΕΣΤΙΑΣΜΟΣ

ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΟ ΦΟΡΤΙΟ ΤΟΥΣ
ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΟ ΣΧΕΤΙΚΟ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟ ΤΟΥΣ ΣΕ ΟΞΙΝΑ ΚΑΙ ΒΑΣΙΚΑ ΑΜΙΝΟΞΕΑ

Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών
σε πηκτή απουσία SDS με βαθμίδωση pH

ΙΣΟΗΛΕΚΤΡΙΚΟ ΣΗΜΕΙΟ (pI)

pH όπου το ολικό φορτίο της πρωτεΐνης είναι μηδέν

$$Z=0$$

$$U = E \cdot z / f$$

$$U=0$$

Η πρωτεΐνη μετακινείται μέχρι να συναντήσει pH ίσο με το pI

ANNA-MARIA PAPPA

ΙΣΟΗΛΕΚΤΡΙΚΟΣ ΕΣΤΙΑΣΜΟΣ

Η βαθμίδωση pH σχηματίζεται με ηλεκτροφόρηση πρώτα πολυαμφολυτών (φορτισμένων πολυμερών) που έχουν πολλές τιμές pI, που διαφέρουν ακόμα και κατά 0,01).

Διαχωρισμός πρωτεϊνών που διαφέρουν στο pI τους ακόμα και κατά 0,01, δηλαδή κατά ένα μόνο αρνητικό φορτίο

Αμφολύτες.

Χημικές ενώσεις, οι οποίες συμπεριφέρονται άλλοτε ως βάσεις και άλλοτε ως οξέα ανάλογα με το περιβάλλον στο οποίο βρίσκονται

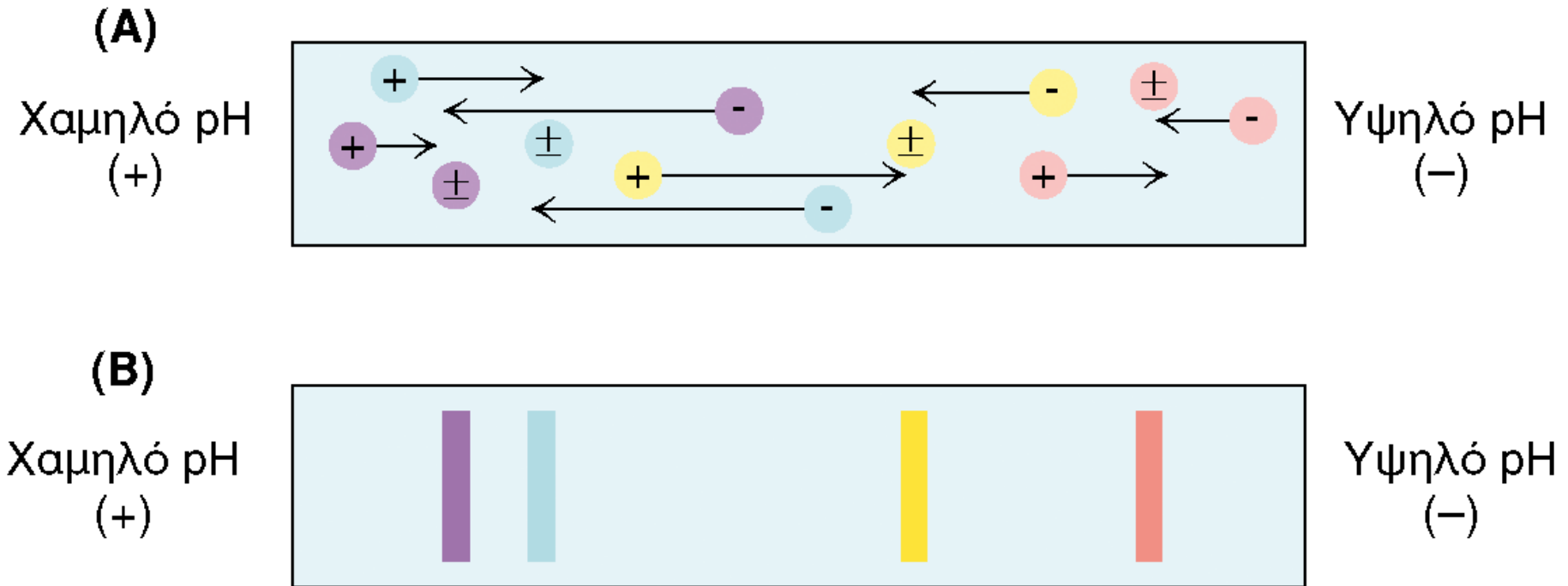
Για κάθε αμφολύτη υπάρχει μια συγκεκριμένη τιμή pH, για την οποία το συνολικό μόριο είναι ουδέτερο – αν και μπορεί να υπάρχουν επιμέρους φορτισμένες ομάδες, οι οποίες ωστόσο ως σύνολο εξουδετερώνονται - η τιμή αυτή αντιστοιχεί στο ισοηλεκτρικό σημείο (pI).

Οι πρωτεΐνες είναι αμφολύτες

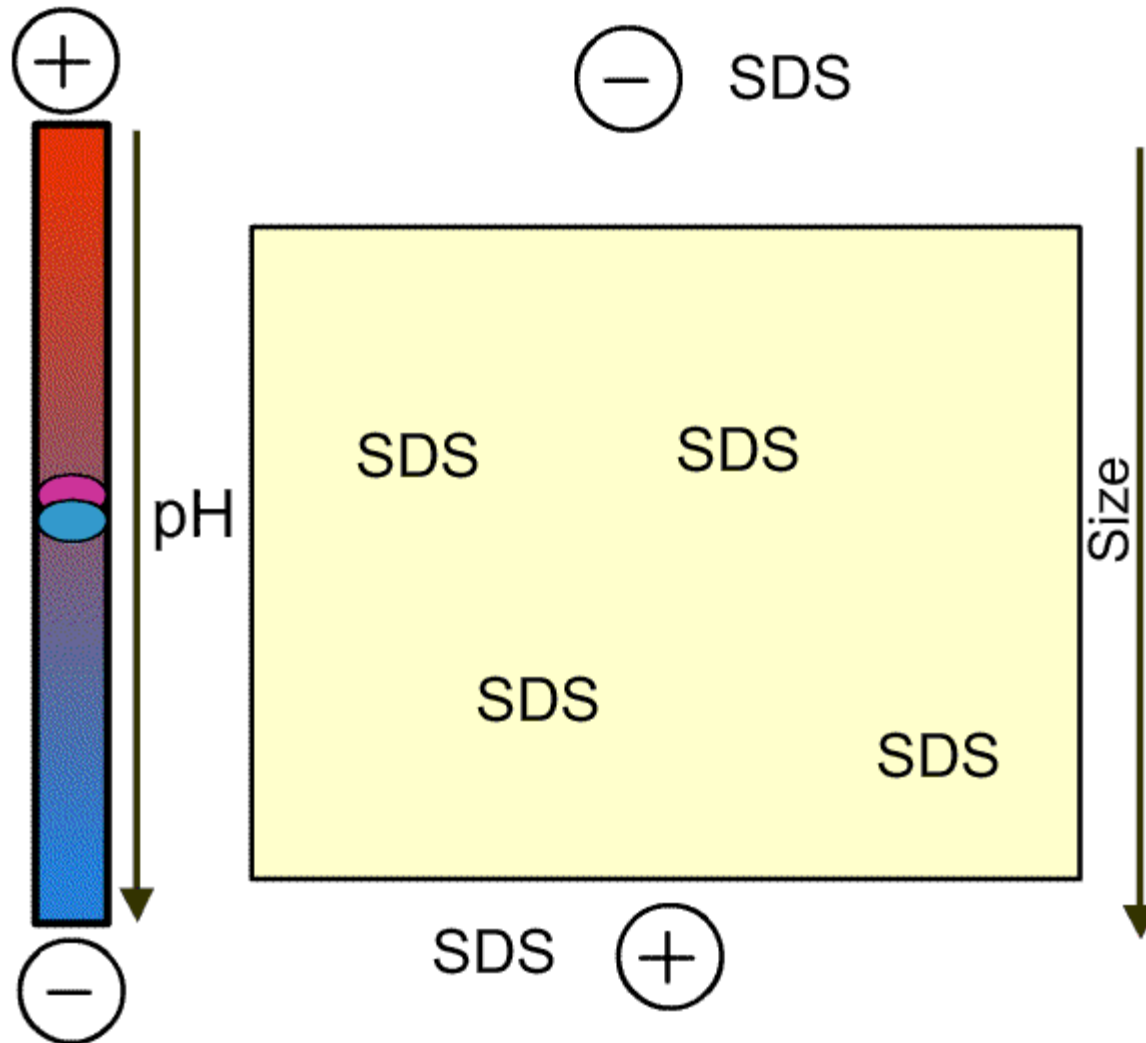
Για τιμές pH κάτω του pI τους οι πρωτεΐνες φέρουν καθαρό θετικό φορτίο ενώ για τιμές pH άνω του pI τους, οι πρωτεΐνες φέρουν καθαρό αρνητικό φορτίο.

ANNA-MARIA ΨΑΡΡΑ

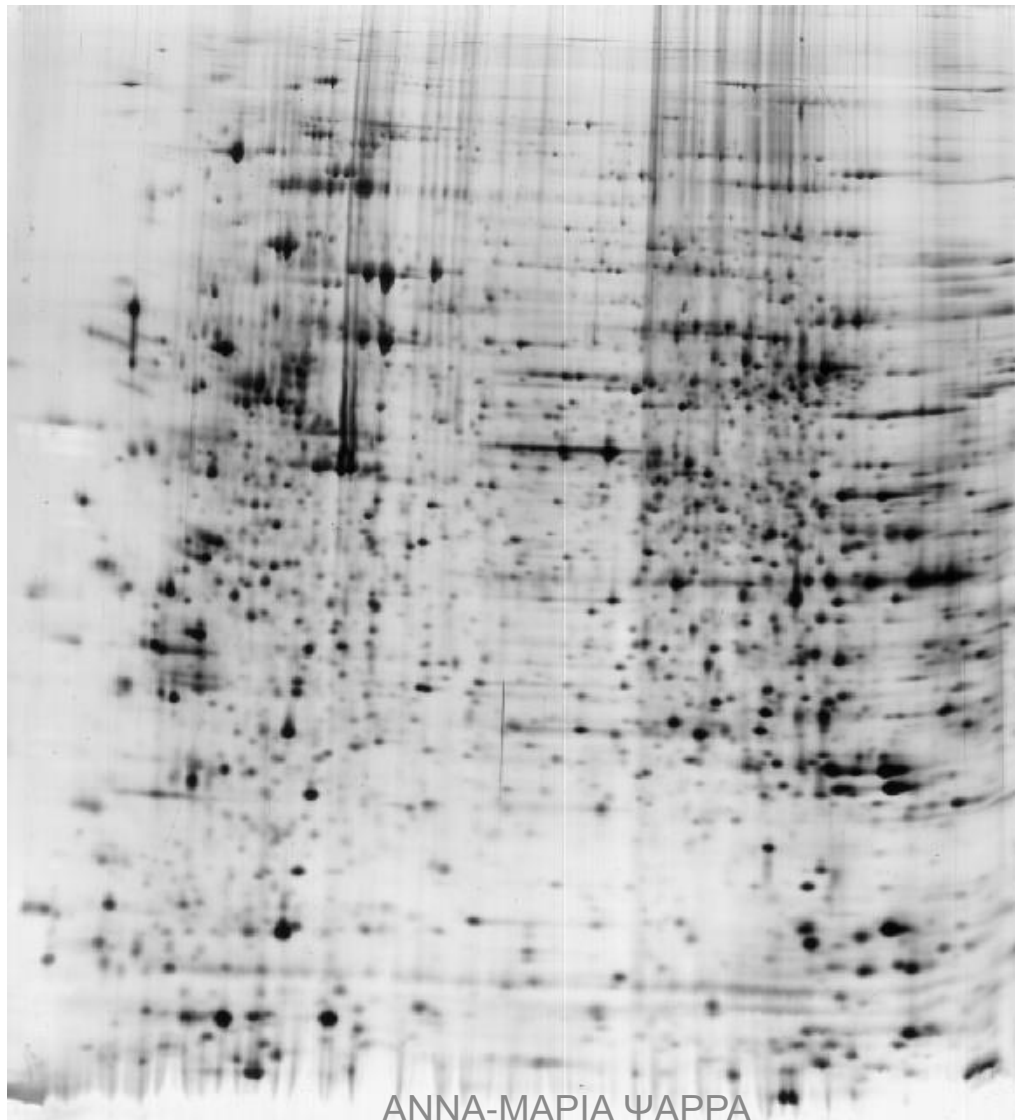
ΙΣΟΗΛΕΚΤΡΙΚΟΣ ΕΣΤΙΑΣΜΟΣ



ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΔΥΟ ΔΙΑΣΤΑΣΕΩΝ (2D PAGE)



Παράδειγμα 2D PAGE ηλεκτροφόρησης

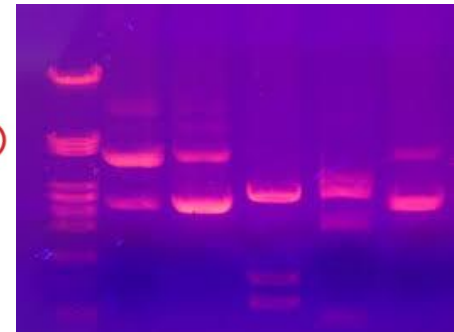
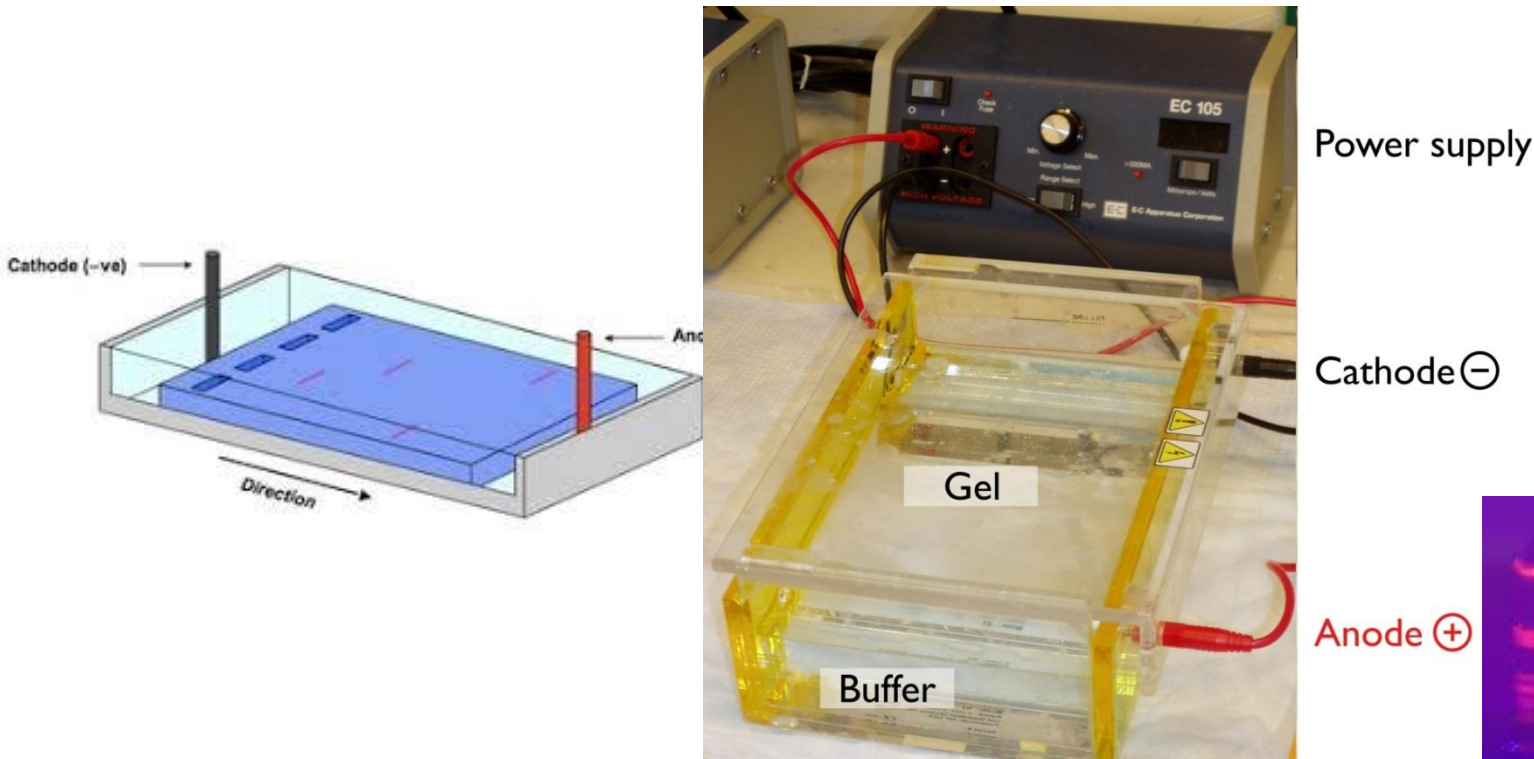


ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ DNA

Αρνητικά φορτισμένα μόρια

Διαχωρίζονται με βάση το μέγεθος τους υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου

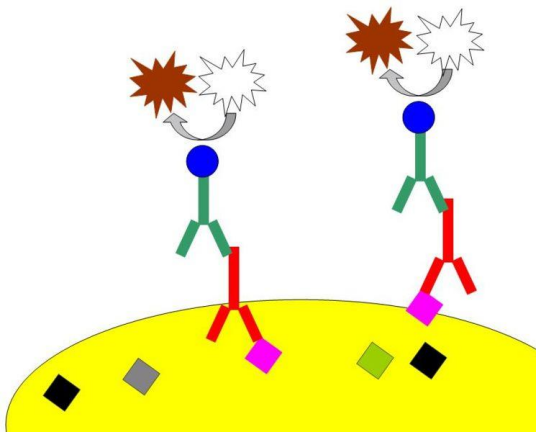
Χρησιμοποιείται αгарόζη για τη δημιουργία της πηκτής



Ανοσοχημεία

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)

ΑΝΤΙΣΩΜΑ

ΑΝΤΙΣΩΜΑ: ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΗ, IMMUNOGLOBULIN, Ig

Τα αντισώματα είναι πρωτεϊνικής φύσεως μόρια που συντίθενται σε ένα ζώο ως απόκριση στην ύπαρξη μίας ξένης ουσίας που λέγεται αντιγόνο.

ΑΝΤΙΓΟΝΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΤΗΣ Ή ΕΠΙΤΟΠΟΣ: Ειδική ομάδα ή συστάδα αμινοξέων που αναγνωρίζεται από ένα αντίσωμα

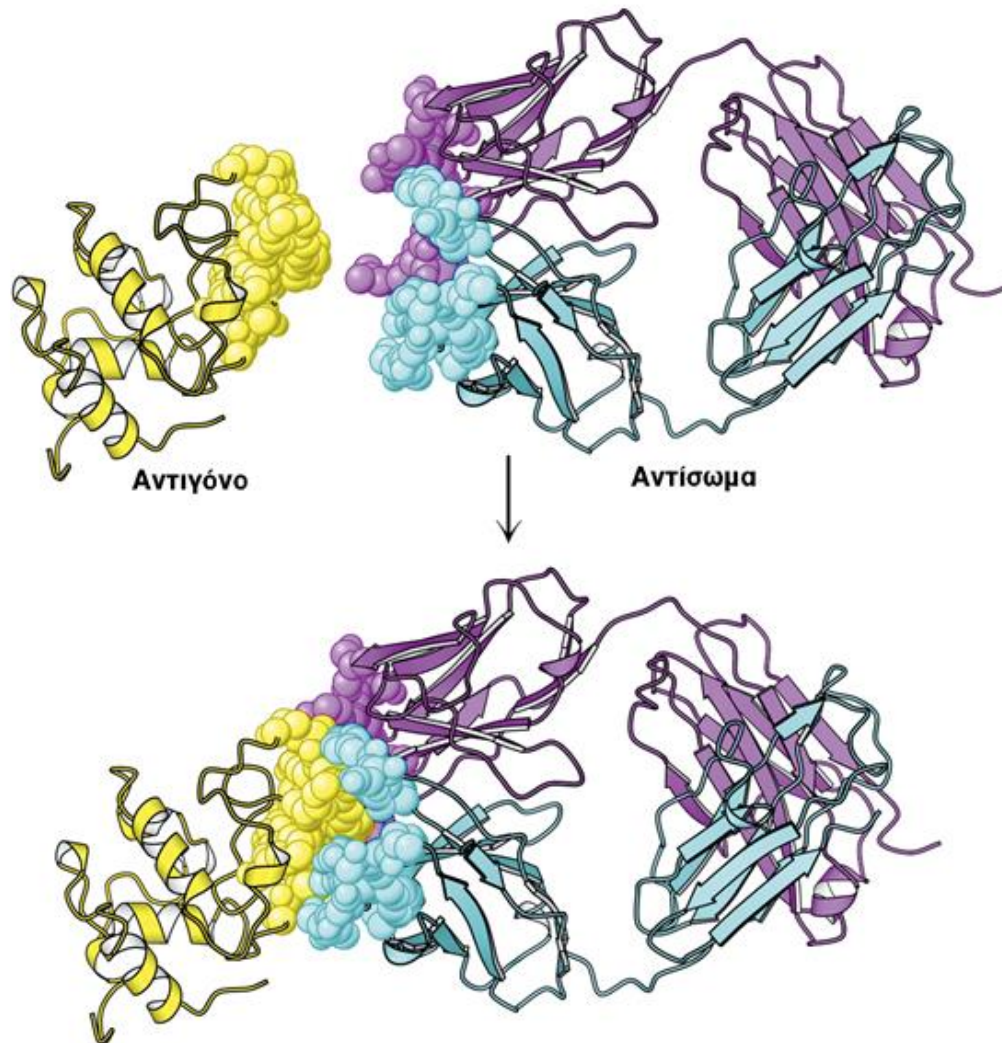
Τα αντισώματα έχουν μεγάλη και ειδική συγγένεια για τα αντιγόνα που προκάλεσαν τη σύνθεσή τους

Συμμετέχουν στην ανοσολογική απόκριση του οργανισμού

ΧΗΜΙΚΗ ΦΥΣΗ ΤΩΝ ΑΝΤΙΓΟΝΩΝ:

Πρωτεΐνες, πολυσακχαρίτες, νουκλεϊκά οξέα ξένων οργανισμών
Συνθετικά πεπτίδια δεσμευμένα σε έναν μακρομοριακό φορέα

ΕΞΕΙΔΙΚΕΥΣΗ ΑΝΤΙΓΟΝΟΥ – ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ ΤΡΙΣΔΙΑΣΤΑΤΩΝ ΔΟΜΩΝ



Φύση αντιγόνου

Πρωτεΐνες, υδατάνθρακες, νουκλεϊκά οξέα, λιπίδια

Εντόπιση αντιγόνου

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

Αντισώματα

Μονοκλωνικά (αναγνωρίζουν έναν αντιγονικό επίτοπο)

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

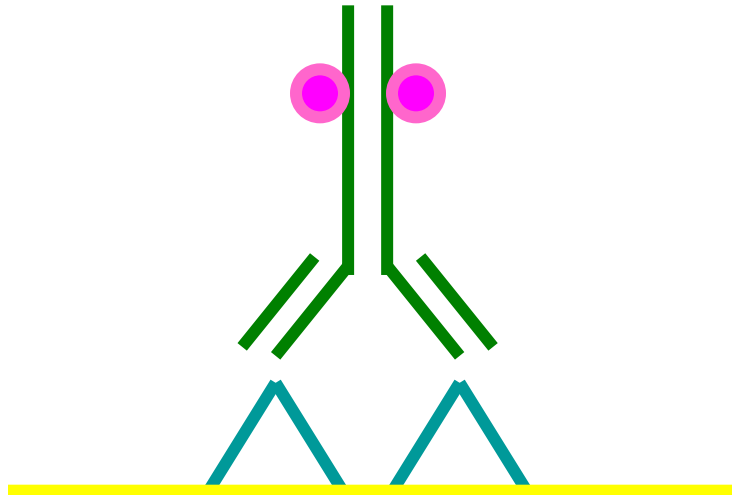
2. Έμμεση

Σήμανση δευτερογενούς αντισώματος

Άμεση μέθοδος

Σημασμένο
πρώτο αντίσωμα

Αντιγόνο

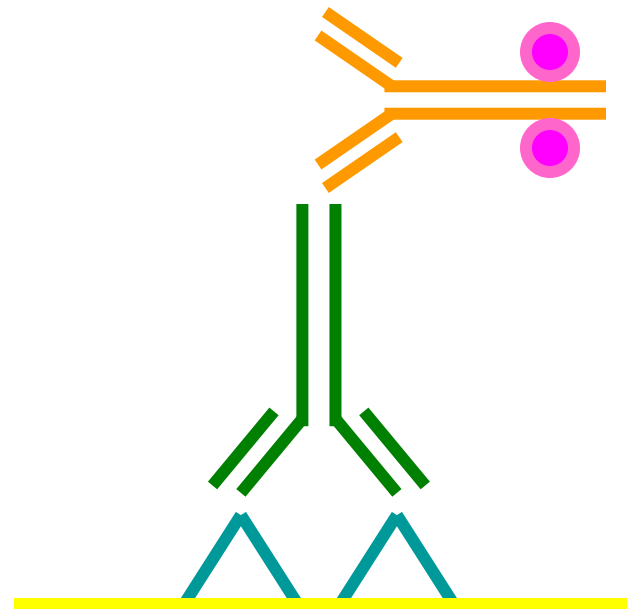


Έμμεση μέθοδος

Σημασμένο 2^ο αντίσωμα

1^ο αντίσωμα

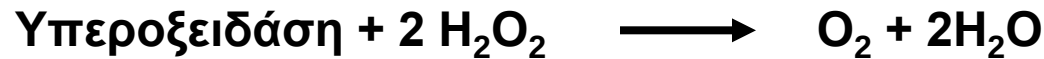
Αντιγόνο



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



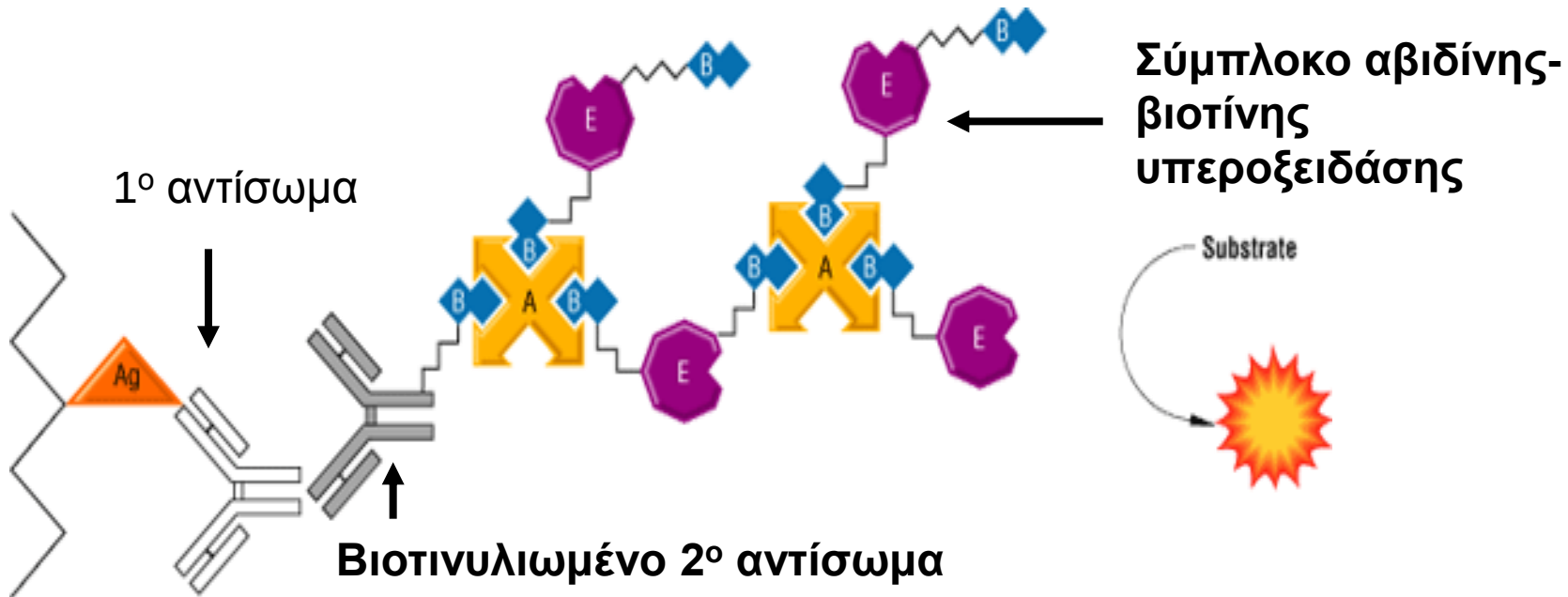
Συνένζυμο FAD



Χρωματομετρικός προσδιορισμός

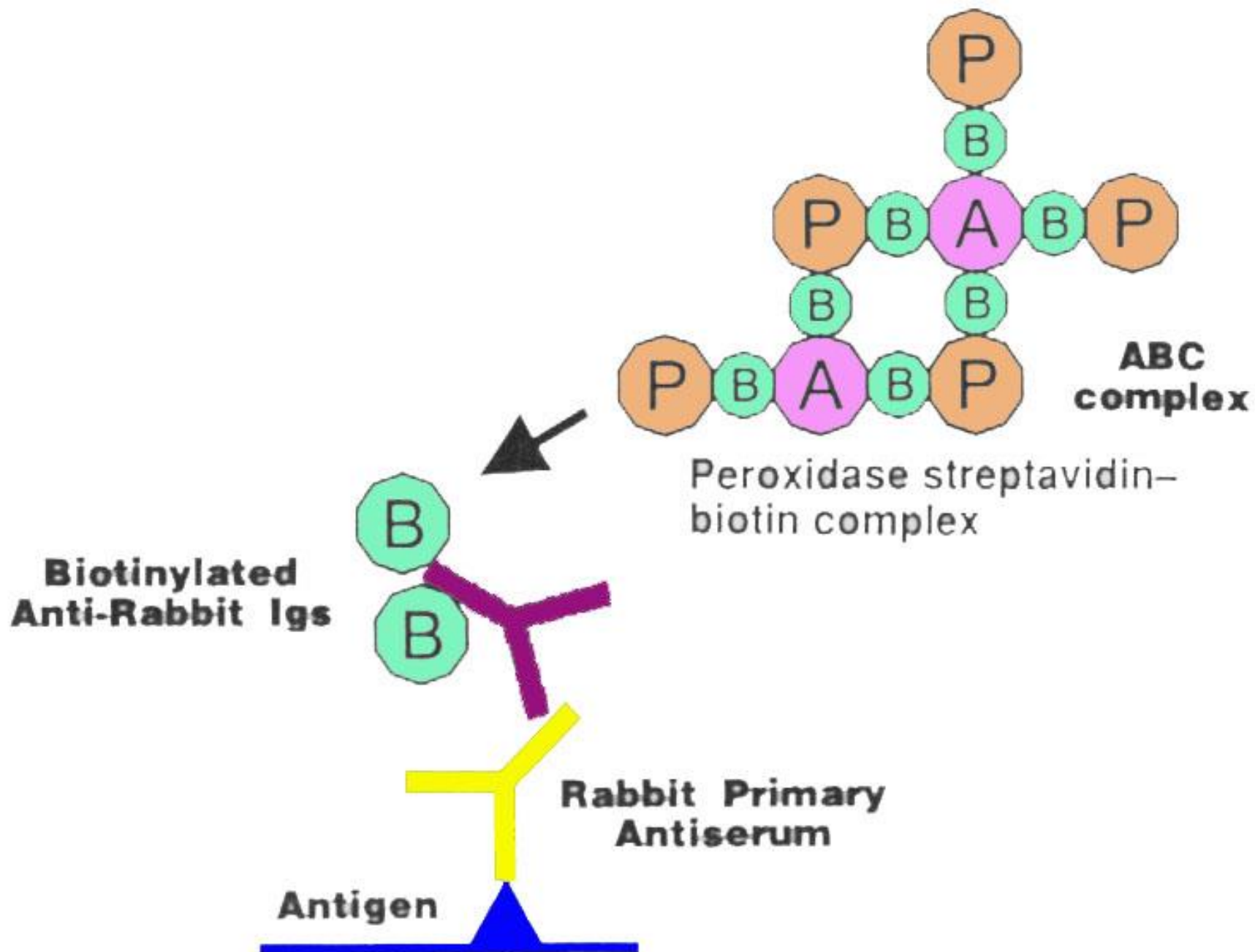
Ενίσχυση σήματος

Σύμπλοκο αβιδίνης-βιοτίνης



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

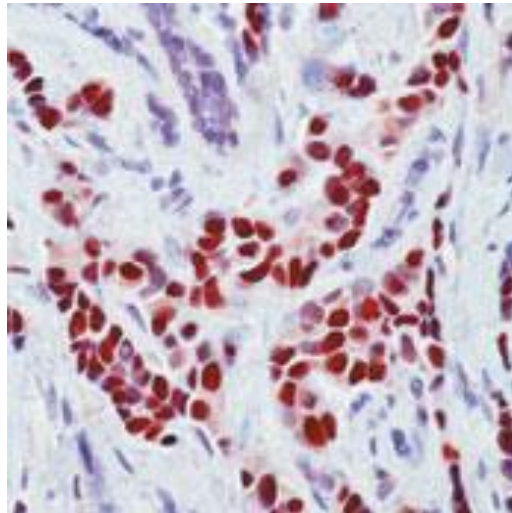
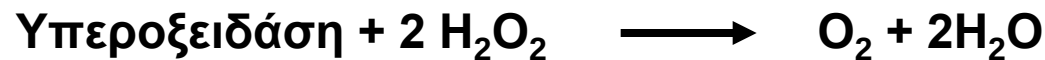
Αβιδίνη: μεγάλη γλυκοπρωτεΐνη η οποία μπορεί να συνδέεται απ' ευθείας με υπεροξειδάση ή φλουορεσκεΐνη είτε να επωαστεί με βιοτινυλιωμένα ένζυμα υπεροξειδάσης, αλκαλικής φωσφατάσης.



Ανίχνευση σήματος

Μέθοδος υπεροξειδάσης

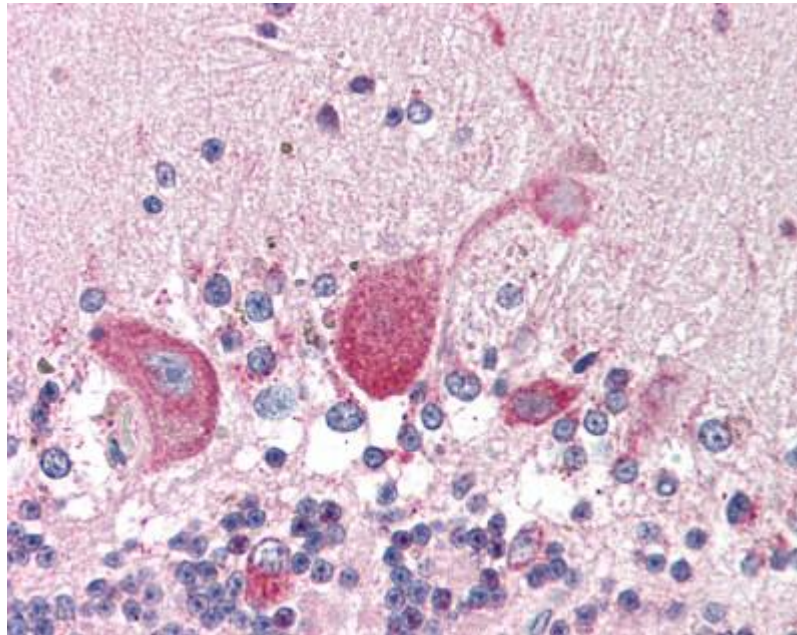
Υπεροξειδάση



Υποδοχέας οιστρογόνων σε καρκινικά κύτταρα μαστού

Ανίχνευση σήματος

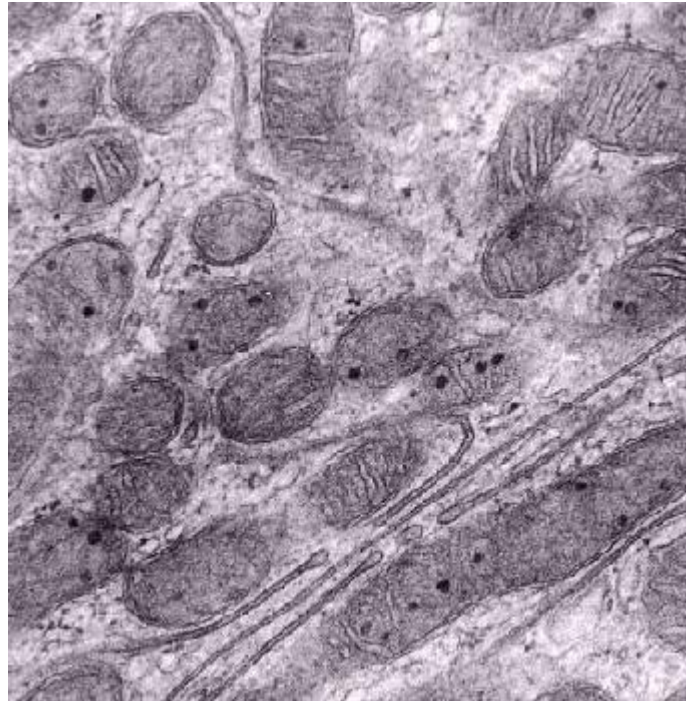
Μέθοδος αλκαλικής φωσφατάσης



Ανθρώπινος εγκέφαλος, παρεγκεφαλίδα χρώση νευρώνων

Ανίχνευση σήματος

Ηλεκτρονική Μικροσκοπία



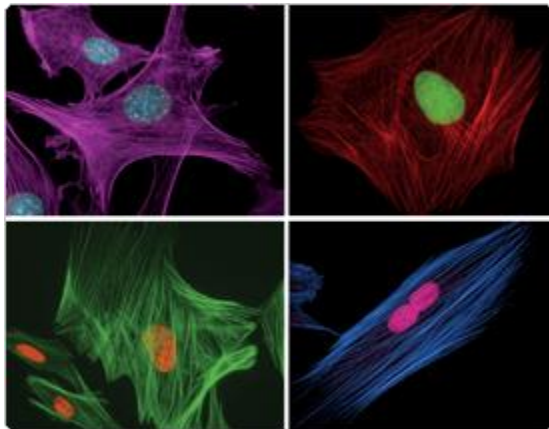
Πρώτο ή δεύτερο αντίσωμα σημασμένο με σωματίδια χρυσού

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

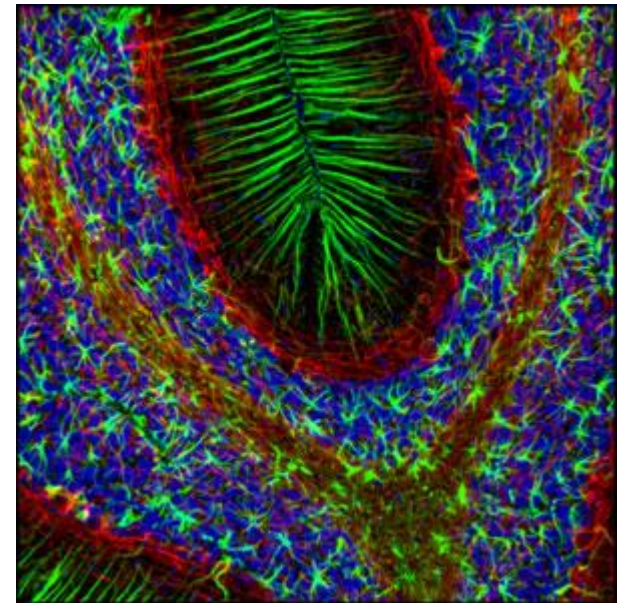
Ανίχνευση σήματος

Μέθοδος Ανοσοφθορισμού

Άμεση



Έμμεση



Phalloidin απ' ευθείας σημασμένα με φθορίζουσα

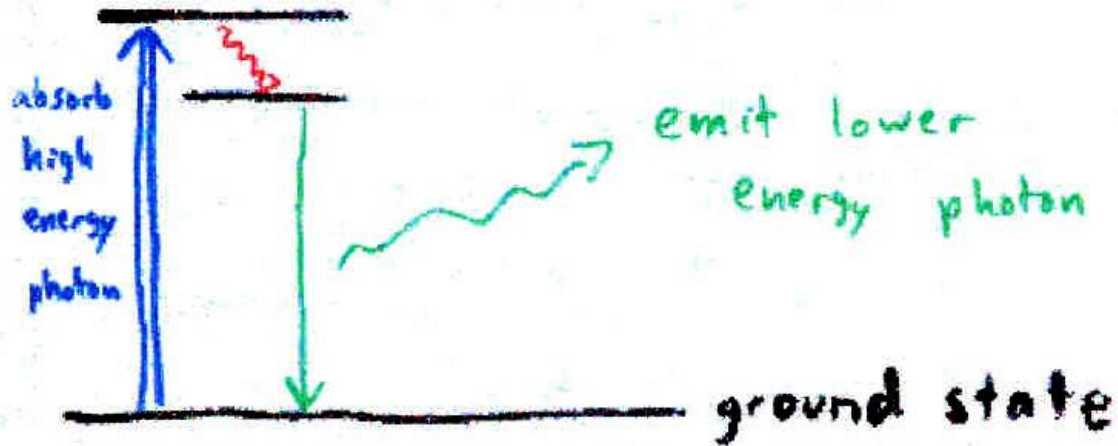
GFAP

NF

DAPI

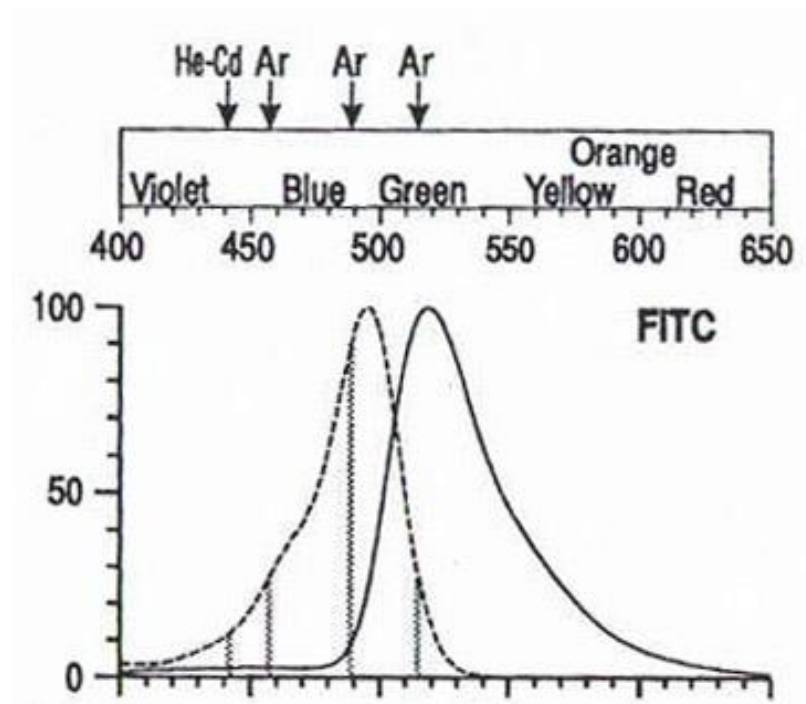
Φθορισμός-Αρχή

What is fluorescence?



FITC (Φλουορσκεΐνη)

Φάσμα εκπομπής και διέγερσης



Διέγερση με Laser Αργού (488 nm)

Εκπομπή (510-530 nm)

Προετοιμασία δείγματος

Μονιμοποίηση δείγματος

Ιστός

Εγκλεισμός σε:

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

Πολύ χαμηλή θερμοκρασία σε ειδικό υλικό

→ 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

Τομές παραφίνης σε μικροτόμο

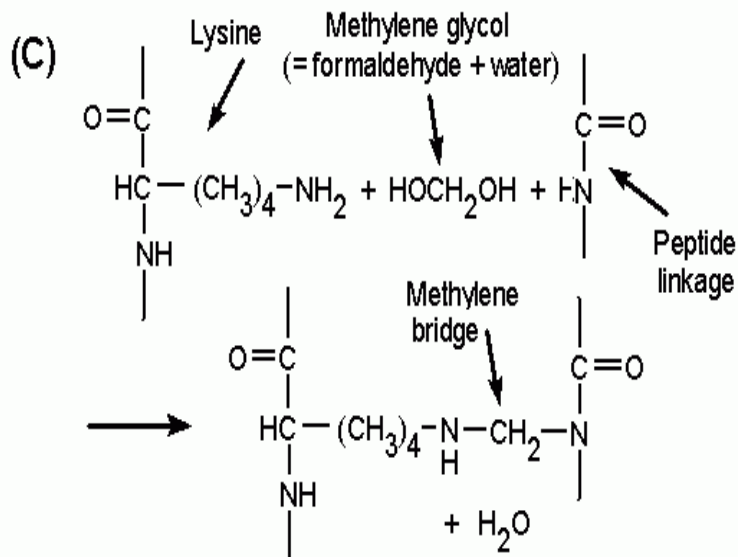
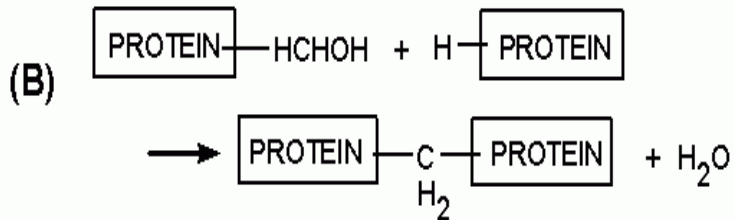
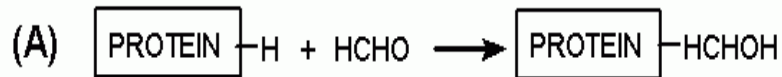


Κύτταρα -Ιστός

Μονιμοποίηση – Αύξηση διαπερατότητας μεμβράνης

- **MeOH/Ακετόνη (-20⁰C)**
- **Παραφορμαλδεΰδη (PFA)/Triton**
- **PFA/Ακετόνη**
- **PFA/Γλουταραλδεΰδη (ηλεκτρονική μικροσκοπία)**
- **Άμεση κατάψυξη σε υγρό άζωτο, τομές σε OCT (ειδικά όταν η χρησιμοποίηση αλδεΰδης δεν ενδείκνυται δεδομένου ότι μπορεί να καταστρέφει το παρασκεύασμα)**

Μονιμοποίηση με Φορμαλδεΰδη – Παραφορμαλδεΰδη



Οι ομάδες αλδεΰδης φτιάχνουν δεσμούς με άτομα N της πρωτεΐνης

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 φθορισμό)

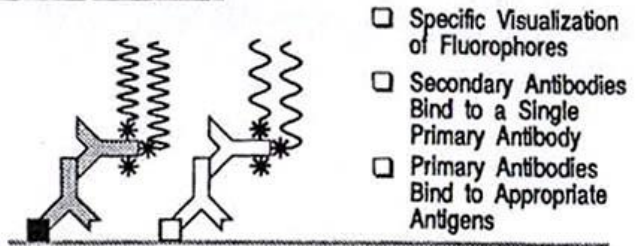
Επίστρωση του δείγματος με κατάλληλο υλικό και καλυπτρίδα ώστε να είναι δυνατή η παρακολούθηση του στο μικροσκόπιο

Ειδικό σήμα –

Πιθανότητα εμφάνισης μη ειδικού σήματος

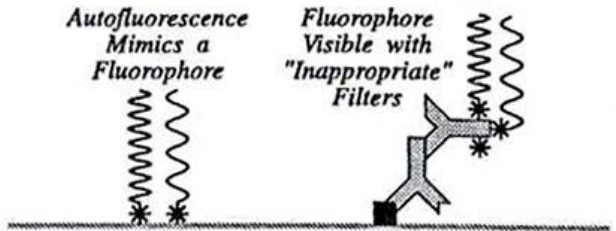
Διαδοχικές χρώσεις

Specific Staining:

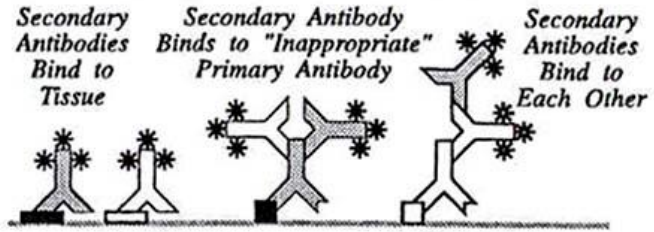


Artifactual Staining:

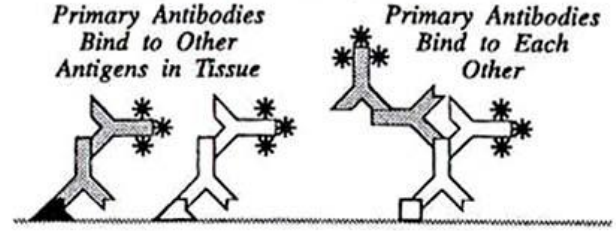
□ Lack of Specificity in Visualization of Fluorophores



□ Lack of Specificity of Secondary Antibodies

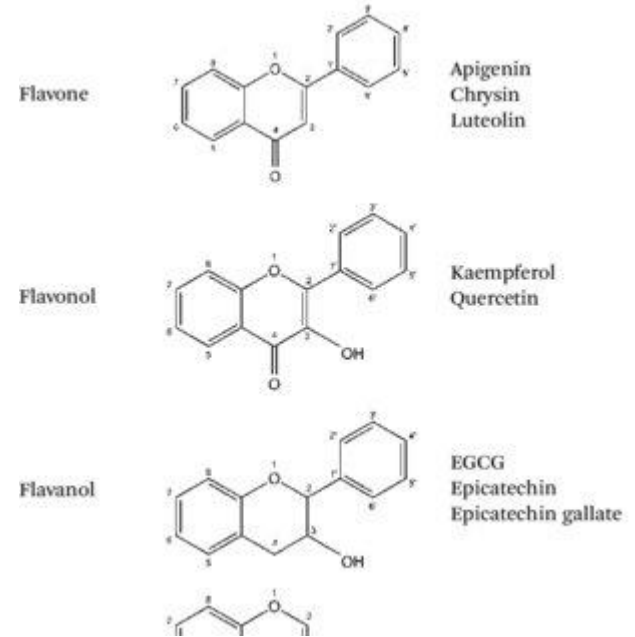


□ Lack of Specificity of Primary Antibodies



ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

ESTROGENS



ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ ΜΟΡΙΑ

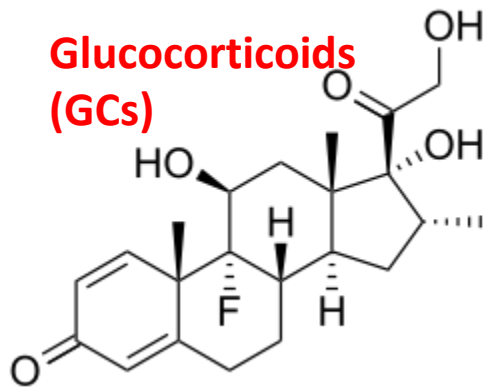
Π.Χ ΦΛΑΒΟΝΕΣ
ΙΣΟΦΛΑΒΟΝΕΣ

ΕΚΛΕΚΤΙΚΟΙ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΤΕΣ/ΚΑΤΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ
ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ



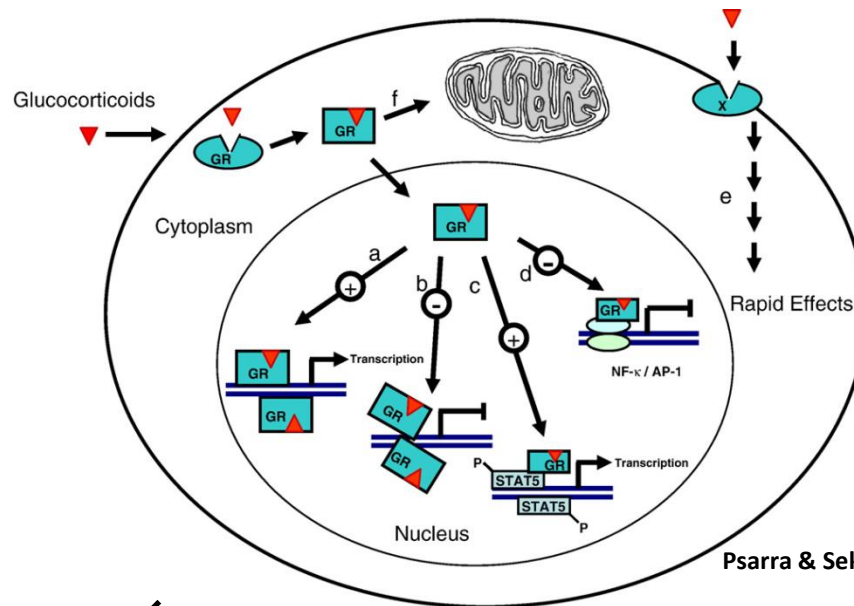
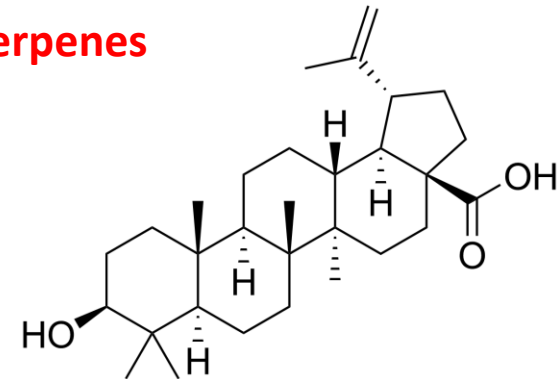
Triterpenes as selective Glucocorticoid receptor regulators (SEGRA)

Triterpenes as possible selective GR modulators that separate transactivation from transrepression



Structural similarities

Triterpenes



Psarra & Sekeris, BBA, 2008

Metabolism

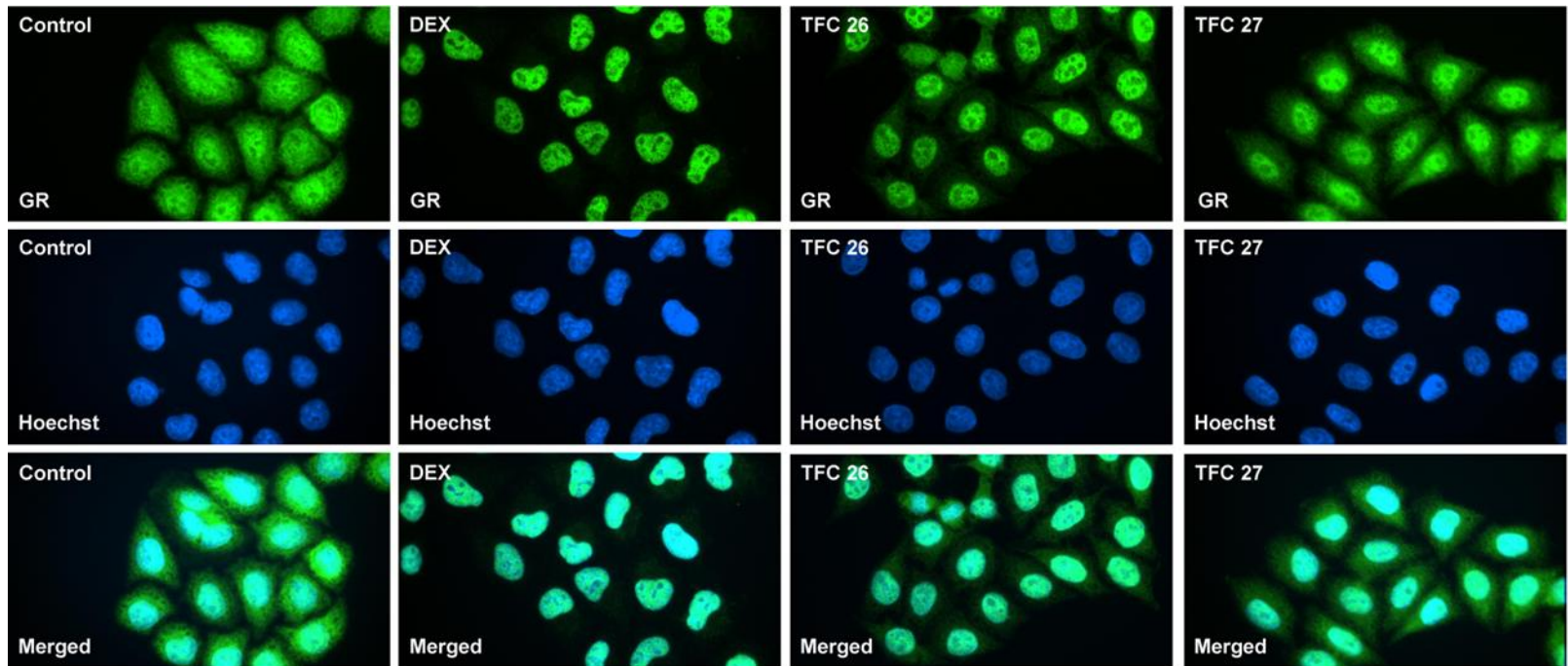
Growth

Differentiation

Immune response
(anti - inflammatory action)

Apoptosis

ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΠΥΡΗΝΙΚΗΣ ΜΕΤΑΤΟΠΙΣΗΣ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΣΤΕΡΟΕΙΔΩΝ ΟΡΜΟΝΩΝ



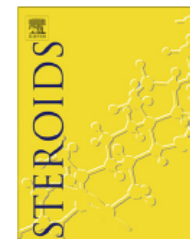
Από στεροειδή φυτικής προέλευσης



Contents lists available at [ScienceDirect](#)

Steroids

journal homepage: www.elsevier.com/locate/steroids



Review

Steroidogenesis in plants – Biosynthesis and conversions of progesterone and other pregnane derivatives



Peter Lindemann

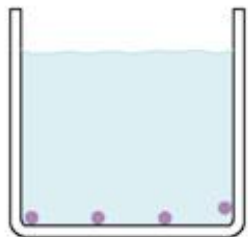
Institut für Pharmazie, Martin-Luther Universität Halle/Wittenberg, Hoher Weg 8, 06120 Halle, Germany

ΜΕΘΟΔΟΣ ELISA



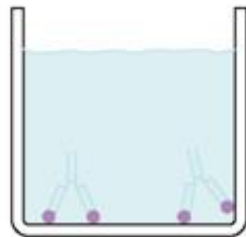
ΜΕΘΟΔΟΣ ELISA

(A) Έμμεση ELISA



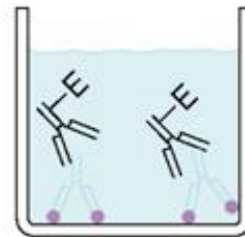
Θέση καλυμμένη με αντιγόνο

Πλύσιμο



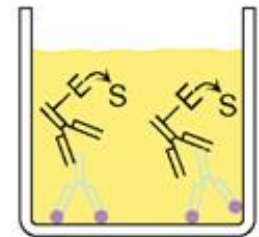
Ειδικό αντίσωμα δεσμεύει το αντιγόνο

Πλύσιμο



Ενζυμοσύνδετο αντίσωμα δεσμεύεται στο ειδικό αντίσωμα

Πλύσιμο



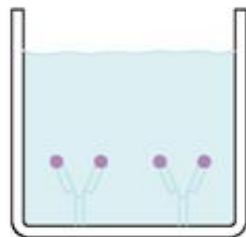
Το προστιθέμενο υπόστρωμα μετατρέπεται από το ένζυμο σε έγχρωμο προϊόν· η ένταση του χρώματος είναι ευθέως ανάλογη της ποσότητας του ειδικού αντισώματος

(B) Διπλή ELISA



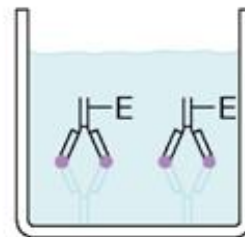
Θέση καλυμμένη με μονοκλωνικό αντίσωμα

Πλύσιμο



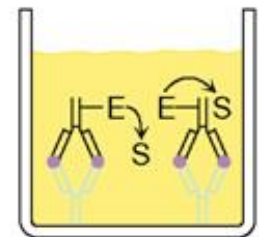
Το αντιγόνο δεσμεύεται στο αντίσωμα

Πλύσιμο



Ένα δεύτερο μονοκλωνικό αντίσωμα, συνδεδεμένο με ένζυμο, δεσμεύεται στο ακινητοποιημένο αντιγόνο

Πλύσιμο

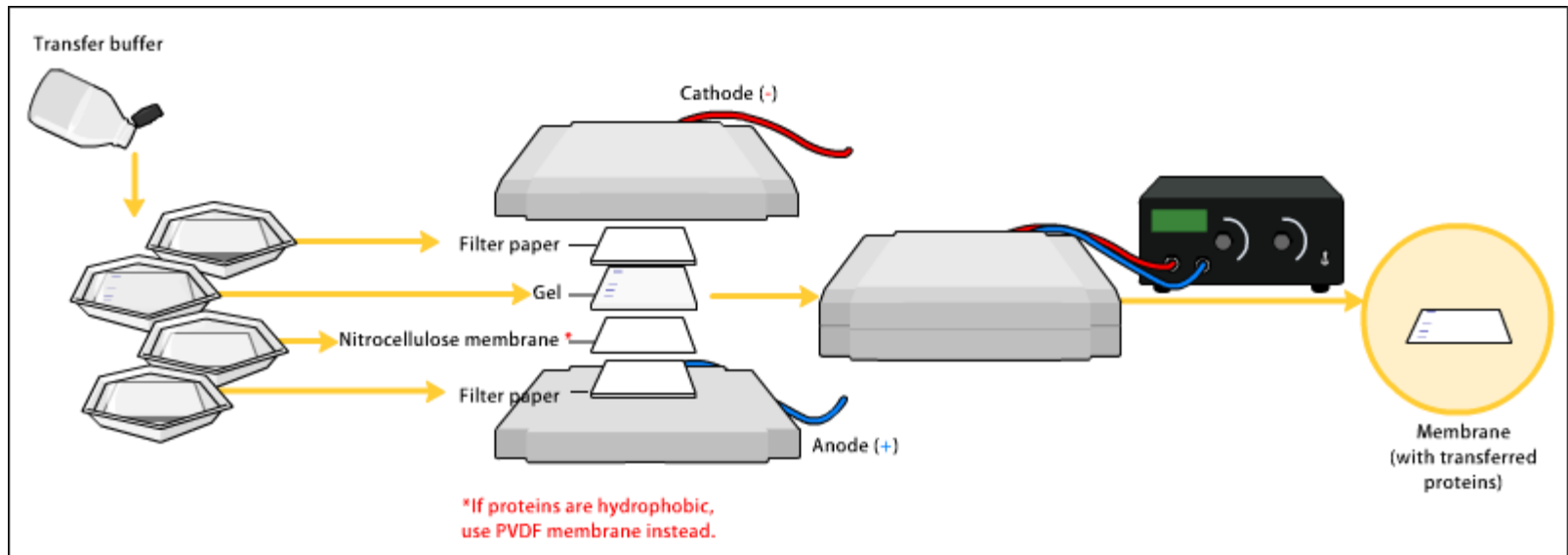


Το προστιθέμενο υπόστρωμα μετατρέπεται από το ένζυμο σε έγχρωμο προϊόν· η ένταση του χρώματος είναι ευθέως ανάλογη της ποσότητας του αντιγόνου

ΕΦΑΡΜΟΓΗ

Π.χ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΙΩΝ ή ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΣΕ ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΜΑΤΑ

ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ - WESTERN BLOT



http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/9/93/Western_blot_transfer.png

ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ - WESTERN BLOT

Detection in Western Blots

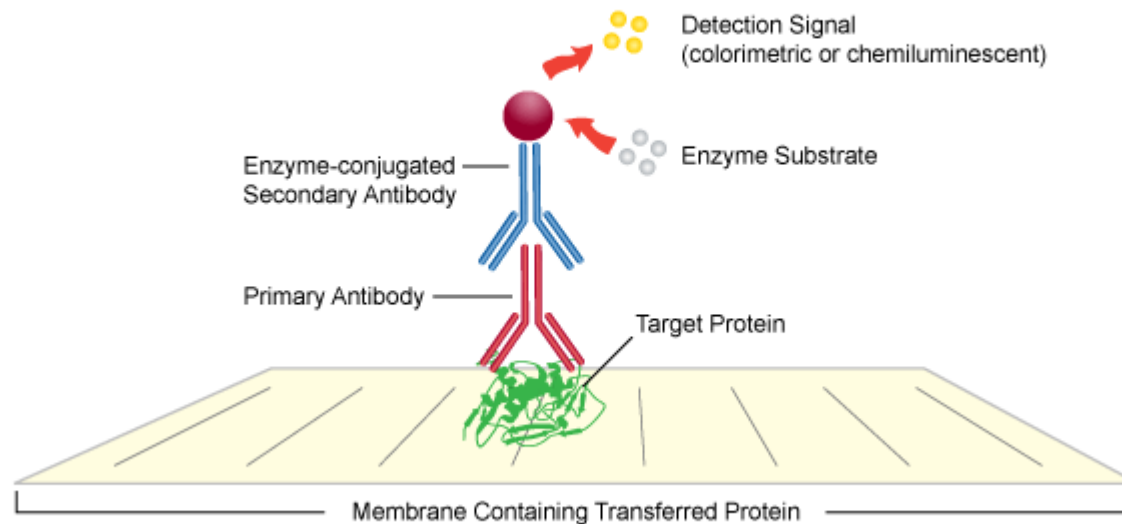
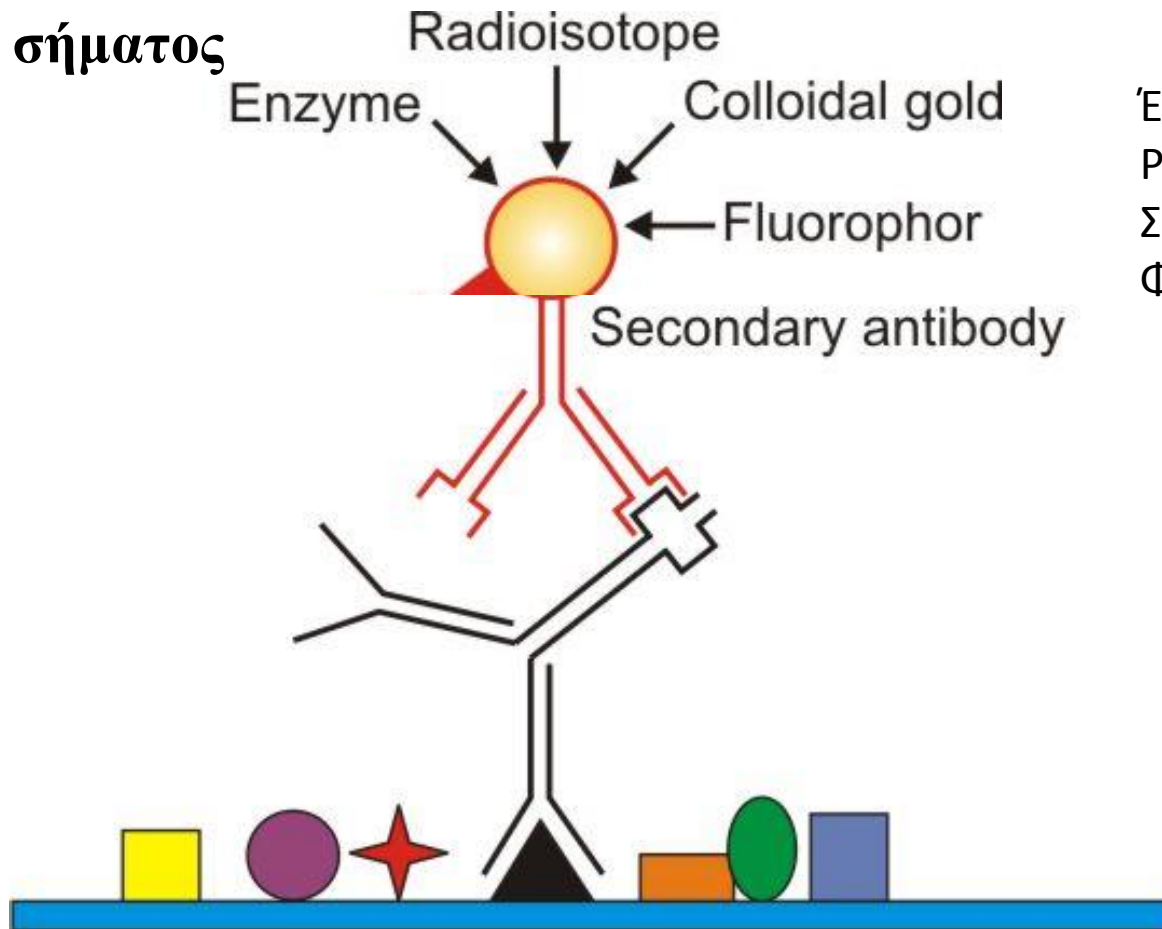


Diagram 2: Illustration of detection in Western Blots.

http://www.google.gr/url?sa=i&rct=j&q=&esrc=s&source=images&cd=&cad=rja&uact=8&ved=0CAcQjRw&url=http%3A%2F%2Fwww.leinco.com%2Fgeneral_wb&ei=fXpcVJXNN4z2PNSrgRg&bvm=bv.79184187,d.d2s&psig=AfQjCNGcsD-TGsp6R-WhzBr1ElzKL0b9lw&ust=1415433210703287

Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης

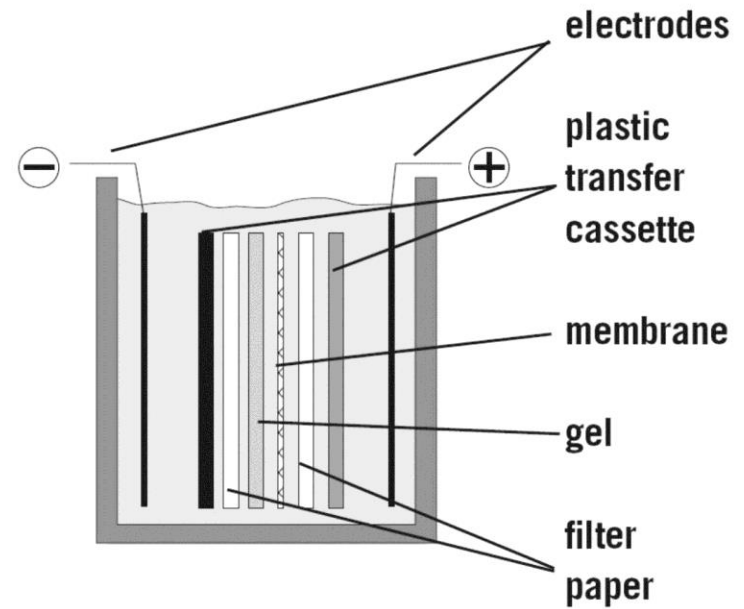
Ανίχνευση σήματος



Ένζυμα
Ραδιενεργό Ισότοπο
Σωματίδια χρυσού
Φθορίζουσα

Ανοσοαποτύπωση σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης

1. Διαχωρισμός των πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση
2. Μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης μετά την εφαρμογή ηλεκτρικού δυναμικού



Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης

3. Χρώση με ponceau



4. Έκπλυση

5. Μπλοκάρισμα μη ειδικών θέσεων σύνδεσης (10 % γάλα σε ρυθμιστικό διάλυμα pH 7.5)

6. Επώαση της μεμβράνης με αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης που μελετάμε

7. Επώαση της μεμβράνης με αντίσωμα έναντι του πρώτου αντισώματος σημασμένο με κατάλληλο προσδέτη που θα μας επιτρέψει την ανίχνευση του δεύτερου αντισώματος και κατά συνέπεια του μορίου που μελετάμε

<https://www.youtube.com/watch?v=VgAuZ6dBOfs>

<https://www.youtube.com/watch?v=GJJGN0dhP8w>

ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΗΣΗ

ANNA-MARIA ΨΑΡΡΑ
Τμήμα Βιοχημείας κ Βιοτεχνολογίας



ANNA-MARIA ΨΑΡΡΑ

ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΗΣΗ

Μέθοδος διαχωρισμού σωματιδίων ακόμα και μακρομορίων

Ο διαχωρισμός γίνεται βάση διαφορών

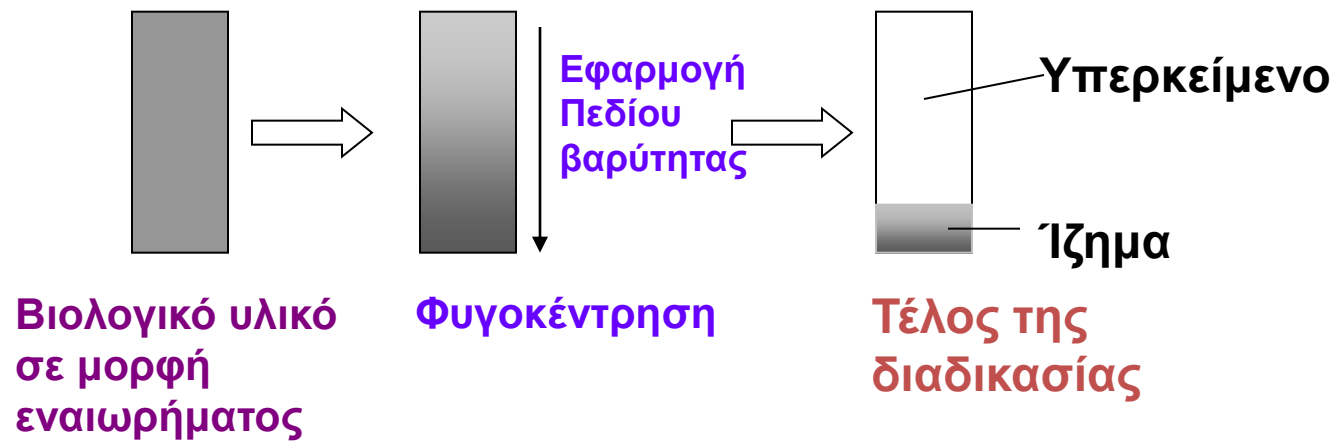
Μεγέθους
Σχήματος
Πυκνότητας

Πυκνότητα Κυττάρων Βιολογικών Μορίων

Βιολογικό υλικό	Πυκνότητα (g/cm ³)
Μικρόβια	1.05 - 1.15
Ευκαρυωτικά κύτταρα	1.04 - 1.10
Οργανίδια	1.10 - 1.60
Πρωτεΐνες	1.30
DNA	1.70
RNA	2.00

Αρχή Μεθόδου Φυγοκέντρωσης

Το δείγμα προς ανάλυση υποβάλλεται σε συνθήκες άσκησης φυγόκεντρου δύναμης





ΚΕΦΑΛΕΣ ΦΥΓΟΓΚΕΝΤΡΟΥ – ΡΟΤΟΡΕΣ



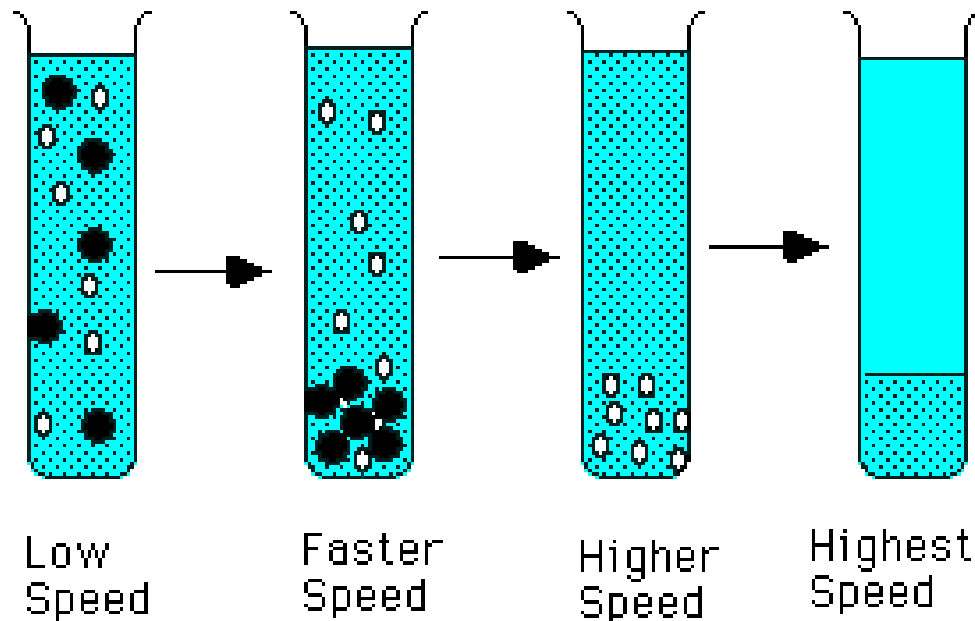
ΣΤΑΘΕΡΗΣ ΓΩΝΙΑΣ



ΥΠΟ ΤΑΛΑΝΤΕΥΣΗ - SWING OUT

Διαφορική φυγοκέντρηση

Figure 2: Differential Centrifugation.

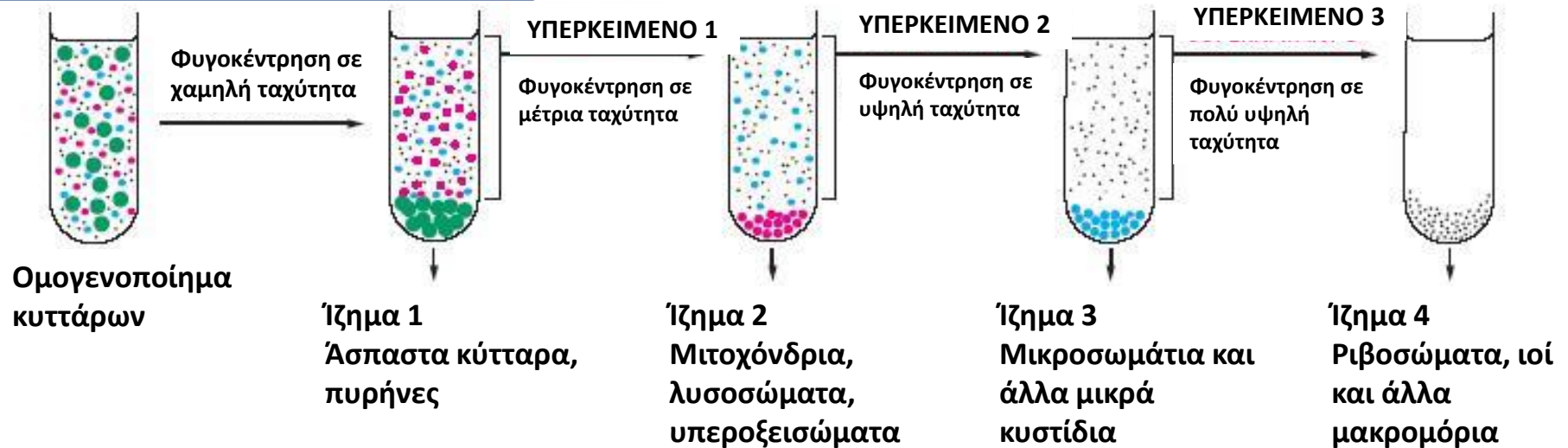


ΔΙΑΦΟΡΙΚΗ ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΗΣΗ – ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΥΠΟΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΚΛΑΣΜΑΤΩΝ

Διαφορική Φυγοκέντρωση

Διαδοχικές φυγοκεντρήσεις με συνεχώς αυξανόμενη ταχύτητα

Διαχωρισμός των κυτταρικών συστατικών με βάση το μέγεθος και την πυκνότητα. Τα μεγαλύτερα και μεγαλύτερης πυκνότητας συστατικά κατακρημνίζονται πρώτα. Η πρώτη φυγοκέντρωση οδηγεί στο σχηματισμό ενός ιζήματος και ενός υπερκείμενου. Τα μικρότερα σωματίδια μένουν στο υπερκείμενο το οποίο στη συνέχεια φυγοκεντρείται σε μεγαλύτερες ταχύτητες και η διαδικασία επαναλαμβάνεται.



ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗΣ ΚΑΤΑΒΥΘΙΣΗΣ

$$s = m (1 - \tilde{v}\rho) / f$$

m = μάζα του σωματιδίου

$\tilde{v}$ = μερικός ειδικός όγκος του σωματιδίου = $1/\rho_{\text{σωματιδίου}}$

ρ = πυκνότητα του διαλύματος

f = συντελεστής τριβής (παράγοντας που εξαρτάται από το σχήμα του σωματιδίου)

$((1 - \tilde{v}\rho))$ = δύναμη άνωσης που ασκείται από το διάλυμα στο οποίο βρίσκεται το σωματίδιο

s = Συντελεστής καταβύθισης, εκφράζεται σε μονάδες Svedberg (S)

1 μονάδα Svedberg (S)

Όσο πιο μικρή είναι η τιμή S , τόσο πιο αργά μετακινείται ένα σωματίδιο μέσα σε ένα φυγοκεντρικό πεδίο

ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗΣ ΚΑΤΑΒΥΘΙΣΗΣ

$$s = m (1 - \tilde{\nu}\rho) / f$$

Η ταχύτητα καταβύθισης ενός σωματιδίου είναι ανάλογη της μάζας του

Ένα σωματίδιο με μεγαλύτερη μάζα καταβυθίζεται ταχύτερα από ένα σωματίδιο ιδίου σχήματος και πυκνότητας αλλά μικρότερης μάζας

Το σχήμα επηρεάζει την ταχύτητα καταβύθισης

Ο συντελεστής τριβής f ενός συμπαγούς σωματιδίου είναι μικρότερος από εκείνον ενός λιγότερου συμπαγούς σωματιδίου της ίδιας μάζας.
Τα επιμήκη σωματίδια καθιζάνουν πιο αργά από ότι τα σφαιρικά σωματίδια της ίδιας μάζας

Ένα πυκνό σωματίδιο μετακινείται πιο γρήγορα από ότι ένα λιγότερα πυκνό

Η αντίθετη δύναμη της άνωσης $(1 - \tilde{\nu}\rho)$ είναι μικρότερη για το πυκνό σωματίδιο

Η ταχύτητα καταβύθισης εξαρτάται από την πυκνότητα του διαλύματος (ρ)

$\tilde{\nu}\rho < 1$: τα σωματίδια καταβυθίζονται

$\tilde{\nu}\rho > 1$: τα σωματίδια επιπλέουν

$\tilde{\nu}\rho = 1$: τα σωματίδια δεν μετακινούνται

Υπερφυγοκέντρηση

Χρήση βαθμίδωσης συγκέντρωσης/πυκνότητας για διαχωρισμό μορίων, μικρών υποκυτταρικών οργανιδίων κ.τ.λ Γενικότερα αυστατικών που διαφέρουν ελάχιστα ως προς την πυκνότητά τους

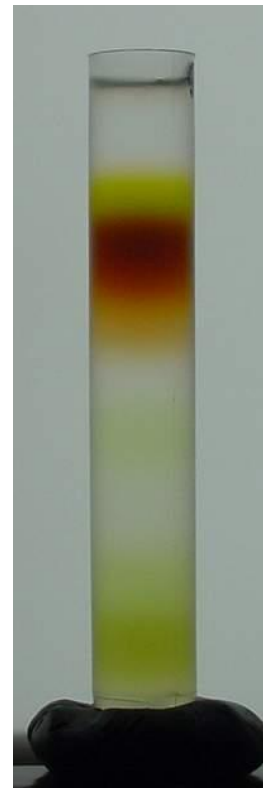
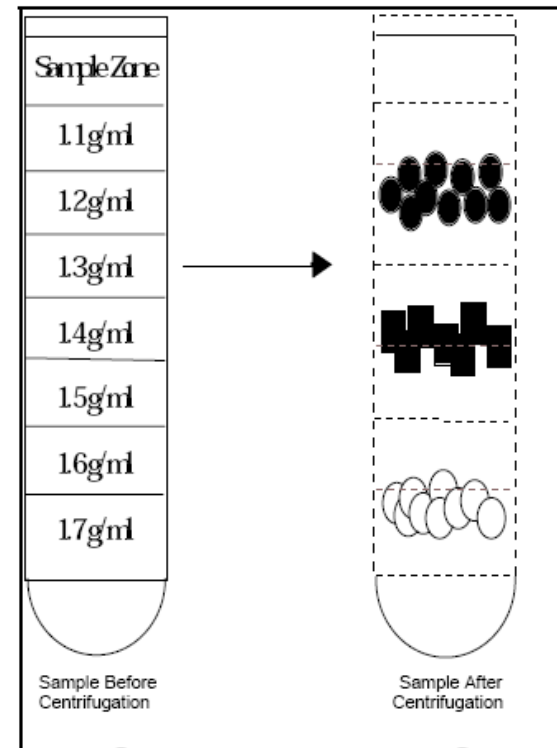
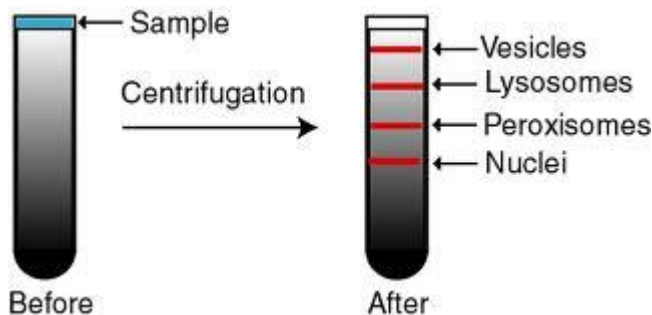
Figure 2. RATE-ZONAL (SIZE) SEPARATION

Π.χ, DNA

Μιτοχόνδρια από λυσοσώματα

Για την δημιουργία βαθμιδώσεων χρησιμοποιούνται υλικά όπως:

Σουκρόζη
Percoll
Ficoll



ΒΑΘΜΙΔΩΣΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΗΣΗ ΣΕ ΔΙΑΒΑΘΜΙΣΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ

ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΥΠΟΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΟΡΓΑΝΙΔΙΩΝ ΚΑΙ ΒΙΟΜΟΡΙΩΝ ΒΑΣΕΙ ΜΙΚΡΩΝ ΔΙΑΦΟΡΩΝ
ΣΤΟΝ ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗ ΚΑΤΑΒΥΘΙΣΗΣ ΤΟΥΣ
ΜΙΚΡΕΣ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΣΤΗΝ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑ ΤΟΥΣ

Υλικά που χρησιμοποιούνται
για τη δημιουργία
βαθμίδωσης συγκέντρωσης

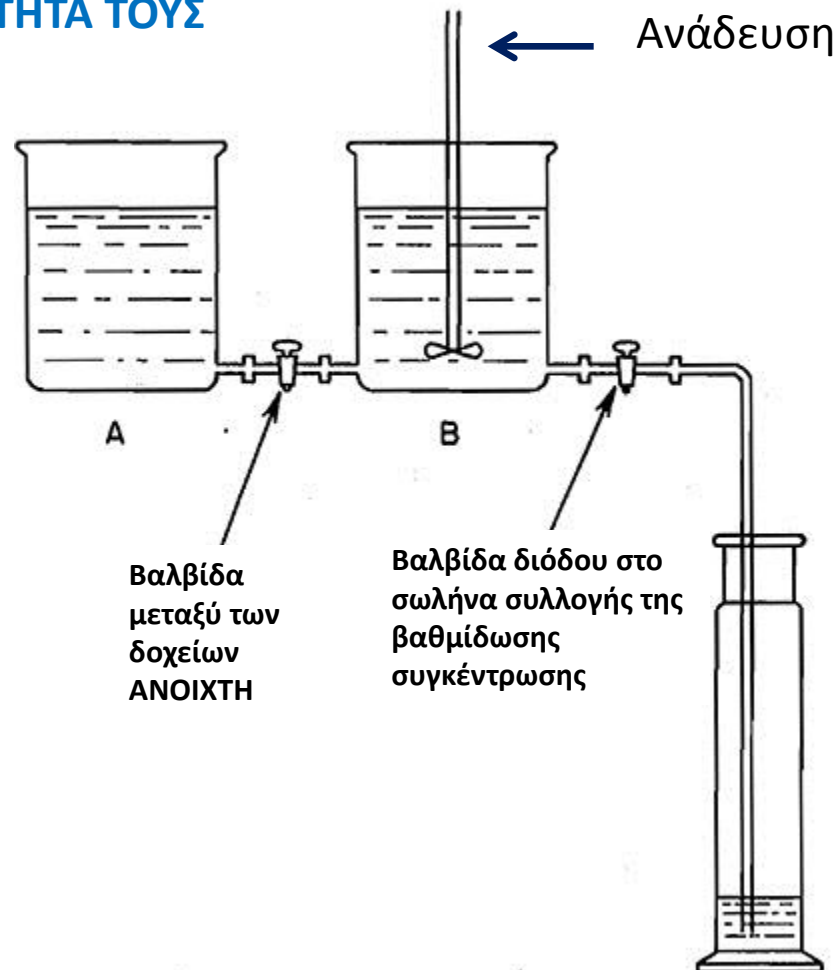
Σουκρόζη

Ficoll

Ουδέτερος πολυσακχαρίτης, μεγάλου
μοριακού βάρους, με πολλές
διακλαδώσεις, υδρόφιλος,
υδατοδιαλυτός

Percoll

αποτελείται από σωματίδια
κολλοειδούς πυρίτη από 15-30 nm σε
διάμετρο (23% W/V σε νερό), τα οποία
έχουν επικαλυφθεί με
πολυβινυλοπυρρολιδόνη (PVP)



ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΗΣΗ-ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

Εφαρμογή

Διαχωρισμός συστατικών αίματος

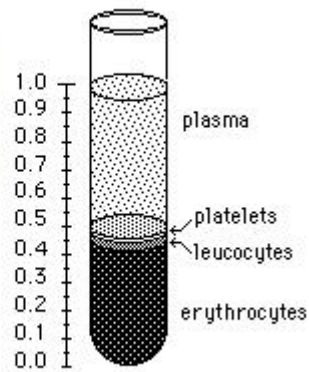
Χρήση βαθμίδωσης Percoll



Πριν



Μετά

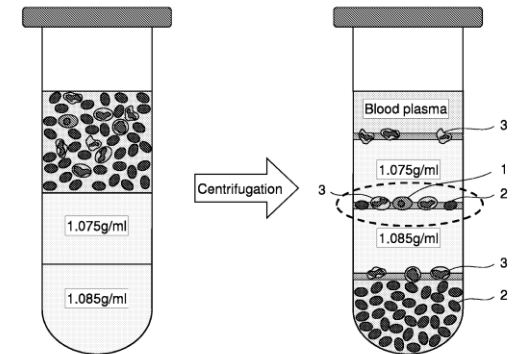


πλάσμα

αιμοπετάλια

λευκοκύτταρα

ερυθροκύτταρα



<http://patentimages.storage.googleapis.com/US20130072402A1/US20130072402A1-20130321-D00003.png>

Παρασκευαστική φυγοκέντρωση

- Αναλύει μεγαλύτερους όγκους (π.χ. 1 με μερικές χιλιάδες λίτρα)
- Τυπικές ταχύτητες 500 - 2000 rpm
- Η επανατροφοδότηση με υλικό προς φυγοκέντρωση και η απομάκρυνση του υπερκειμένου γίνεται με συνεχή τρόπο

