

Eljárás fehérjék *biotonil- ϵ -aminokapronsav-o-pentafluor-fenol*
észterrel való jelölésére

Doktori dolgozat

Biotechnika Rt.
Szeged

Berényi Mária

Szakvezető: _____

Dr. Maróy Péter (Biológiai Tudományok Kandidátusa) Tanszékvezető Egyetemi Tanár

1989.



A dolgozatban használt rövidítések:

3AEC:	3-amino-9-etilkarbazol
^3H :	trícium
4CN:	4 kloro-1-naftol
B-:	biotinilált-
(B-)BSA:	(biotinilált) Bovin Szérum Albumin
(B-)Ig:	(biotinilált) immunglobulin
B-X-NHS:	biotinil- ϵ -aminokaprónsav-N-hidroxi-szukcinimid észter
Biotin-X-opfp:	biotinil- ϵ -aminokaprónsav-o-pentafluor-fenol észter
BSA:	Bovin Szérum Albumin
ConA:	Concanavalin-A
DAB:	diamino benzidin
DMSO:	dimetil szulfoxid
DNS:	dezoxi ribonuklein sav
EIA:	Enzyme Immuno Assay
ElH:	Enzim Immun Hisztokémia
ELISA:	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
HABA:	hidroxi-azo-benzoe acid
HRPO:	Horse Radish Peroxidase
Ig:	immunglobulin
IgG:	immunglobulin G
Kd:	kilo-dalton
MS:	relatív molekulatömeg (molekula súly)
NC:	nitocellulóz
OD _{492nm} :	492nm-en mért optikai denzitás
ONPG:	O-nitrofenil β -D-galakto-piranozid
OPD:	o-fenilén diamin
OVA:	ovalbumin
PAP:	peroxidáz anti-peroxidáz
PBS:	foszfátokkal pufferelt fiziológiás NaCl oldat
pI:	izoelektromos pont
POTE:	Pécsi Orvostudományi Egyetem
Prot.A:	protein A
RIA:	Radio-Immuno-Assay
SOD:	Szuperoxid dizmutáz
SOTE:	Szentgyörgyi Albert Orvostudományi Egyetem

SZBK:	(MTA) Szegedi Biológiai Központ
T-3CMO:	Tesztoszteron-3-karboxil-metil észter
TBS:	Tris-szel pufferelt fiziológiás NaCl oldat
TMB:	tetra-metil benzidin
TRIS:	Trisz(hidroximetil) aminometán
X-Gal:	5-bromo-4-kloro-3-indolil- β -D-galakto piranozid

I. Bevezetés

Napjainkban egyre szélesebb teret hódítanak a különböző betegségek, kórokozók immunológiai módszerekkel történő kimutatására szolgáló immundiagnosztikai tesztek. A legtöbb ilyen teszt izotóppal jelölt reagenseket használ, ami azonban egészségkárosító hatása és költséges volta miatt a széleskörű elterjedését, használatát hátráltatja. Másik jelentős korlátja ezeknek a teszteknek egyes izotópok rövid felezési idejéből ered.

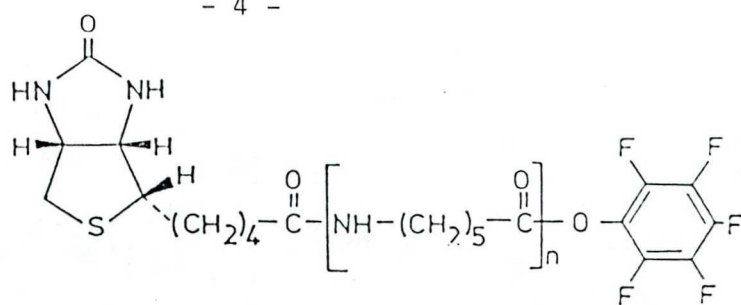
Egyértelmű, hogy az immundiagnosztikai vizsgálatok széleskörű elterjedésének egyik alapfeltétele olyan stabil fehérjejelölő reagensek bevezetése, melyek az egészségre nem ártalmasak, ugyanakkor megfelelő érzékenységgel rendelkeznek.

Egy esélyes jelölt a nagy immunológiai cégek által már forgalmazott biotin/avidin rendszer, amely érzékenysége miatt igen jól helyettesítheti az izotópokat. Hazai viszonylatban azonban beszerzésének magas költségei hátráltatják az elterjedését.

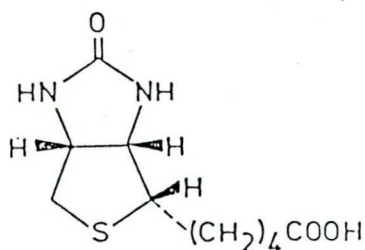
Dr. Somlai Csaba vegyész (Szentgyörgyi Albert OTE Orvosvegytani Intézet), előállított egy újfajta biotiniláló reagenst, biotinil- ϵ -amino-kapronsav-o-pentafluor-fenol észter (továbbiakban biotin-X-opfp), mely tapasztalataink szerint egyszerűbben és olcsóbban állítható elő mint az irodalomból ismert biotinil-kaproilamido-N-hidroxi-szukcinimid-észter (B-X-NHS). 1. ábra

Dolgozatomban ezzel az új fehérje biotiniláló reagenssel történő fehérjejelölés optimalizálásáról és a jelölt fehérjék különböző területeken történő alkalmazásáról számolok be.

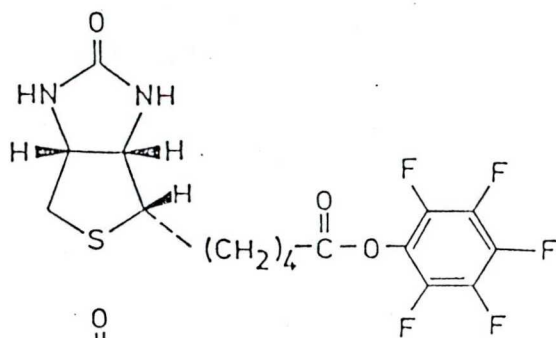
Az eredmények alapján elmondhatjuk, hogy a biotin-X-opfp-vel jelölt fehérjék minősége a már ismert biotiniláló reagenssel (B-X-NHS) jelölt fehérjék tulajdonságaival összevethetőek.



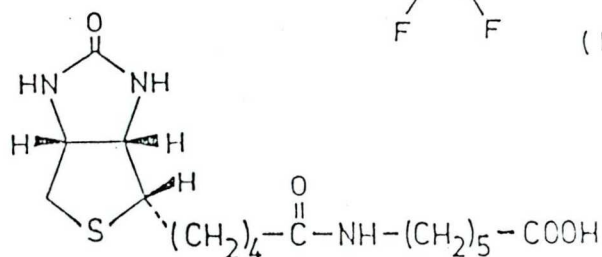
(I)



(II)



(III)



(IV)

1.ábra: Szerkezeti képletek

A találmány szerint a (II) képletű biotint diciklohexil-karbodiimid jelenlétében pentafluor-fenollal reagáltatjuk, majd kívánt esetben a kapott (III) képletű biotin-pentafluor-fenol észtert (biotin-opfp) ϵ -amino-kaprónsavval, a kapott (IV) képletű kapril-amido-biotint pedig diciklohexil-karbodiimid jelenlétében pentafluorfenollal visszük reakcióba. Így kívánság szerint vagy a biotin-opfp-t, vagy a távolságtartó "szpészt" is tartalmazó biotin-X-opfp-t (I) állítjuk elő. Mind a (III) képletű biotin-opfp, mind az (I) képletű biotin-X-opfp alkalmas aminosavak, peptidek, fehérjék enyhe körülmények közötti biotinilálására. A gyakorlatban a már említett okból az utóbbi felhasználása előnyösebb.

II. Irodalmi áttekintés

Két nagy csoportba oszthatjuk az immunológiában jelenleg használatos, nem izotópos fehérje jelölő rendszereket.

A. Nagykapacitású molekulafelismerő rendszerek

Ebben az esetben a minden élő rendszer szerkezetének és szerveződésének alapjául szolgáló néhány igen specifikus és nagykapacitású molekula-felismerő rendszert építenek be az immunológiai előhívórendszerek eszköztárába.

- 1, Avidin/biotin rendszer
- 2, Bakteriális ellenanyagkötő sejtfal fehérjék
Protein-A és -G
- 3, Lektinek
- 4, Enzim-anti-enzim komplexek

B. Kémiai úton előállított konjugátumok

Ebbe a csoportba soroljuk mindazokat a konjugátumokat, melyeket kémiai reakciókkal állítanak elő. Többnyire egy ellenanyag molekulát és egy olyan enzimet vagy kolloidális festék molekulát kapcsolnak össze, amely a kimutatást lehetővé teszi.

- 1, Enzimes konjugátumok
 - a, NaIO₄-os konjugátum
 - b, Konjugátumok homo- ill. bifunkcionális reagensekkel
- 2, Kolloidális arannyal jelölt fehérjék
- 3, Fluorokrómmal jelölt fehérjék

A, Nagykapacitású molekulafelismerő rendszerek

A/1, Avidin/biotin rendszer

Az avidin/biotin rendszer igen gyorsan vált az Enzim Immuno Assay-k (EIA) fontos eszközévé. Ennek több oka is van:

- Az avidin kivételesen erős kötődése a biotinhoz ($K_d: 10^{-15}M$)
- a biotin nagyon könnyen kapcsolható fehérjékhez anélkül, hogy azok aktivitását csökkentené
- az avidin nagyon stabil és több biotinkötő helyet is tartalmaz, így összekötő molekulának használható két biotinilált molekula között.

Az avidin/biotin rendszer használata igen érzékeny kimutatást tesz lehetővé minimális háttér mellett (Becker and Wilchek 1972; Heitzmann and Richards 1974; Heggeness and Ash 1977). A biotin egyike a B-vitamin komplex számos vízzoldékony faktorának, s a karboxilációs reakciókban enzimek koenzimje. A (+)-biotin valeriánsav oldalláncának karboxil csoportja kovalensen kapcsolódik egy amid-kötésen keresztül a karboxiláló enzimek lizil oldalláncának ϵ -amino csoportjához. Az avidin antibakteriális funkciója a biotin megkötésén alapul, így gátol minden biotint koenzimként tartalmazó enzimet.

Az avidint tojásfehérjéből izolálták (Frankel and Conrad 1952), mely számos egyéb antibakteriális fehérjét is tartalmaz (lizozim, conalbumin). Az avidin és a lizozim jelentős szekvencia hasonlóságából közös eredetre lehet következtetni (Green 1975). Az avidinhoz nagyon hasonló fehérje a streptavidin, melyet a *Streptomyces avidinii* nevű gombából izoláltak (Dunale 1955). Funkcióját tekintve azonos a két molekula, de szerkezetében az avidin egy glükoprotein magas izoelektromos ponttal ($pI=10.5$), míg a streptavidin nem tartalmaz cukor oldalláncot, s az izoelektromos pontja is a semleges tartományba esik. Ezen tulajdonságai miatt főleg az immunhisztokémiai festésekben van háttércsökkentő hatása az avidinnel szemben. A natív avidinnek 4 biotin kötő alegysége van, melyeknek mindegyike 15600 dalton molekulatömegű (Green 1975). Az avidin minden egyes alegysége képes egy biotinmolekulát megkötni pH:2-13 tartományban (Green 1963,1975).

Az 1 mg/ml koncentrációjú avidin oldat optikai denzitása 282 nm-en 1.54cm^{-1} (Green and Toms 1970). A molekula erős fénnel szemben érzékeny (György 1942). Definíció szerint egy egység avidin 1 g (+)-biotint köt meg, a legmagasabb elérhető specifikus aktivitás az avidin ill. streptavidin esetében 14U/mg.

Ahhoz, hogy a biotint fehérjékhez tudjuk kapcsolni, a biotin karboxil csoportját aktívá kell tenni a fehérjék szabad aminocsoportja felé.

Két ilyen nagy reaktivitású biotin észtert használnak általánosan, a biotinil-p-nitrofenil-(BNP) észtert és a biotinil-N-hidroxi-succinimid (B-NHS) észtert. Az utóbbi sokkal inkább vízzoldékony, ezért könnyebb használni, bár tárolása éppen ezért bonyolultabb (desszikator). Mivel az avidin biotin kötő helye mélyen a molekulafelszín alatt van, ha a biotin szorosan kapcsolódik egy ligandhoz, az avidin nem tudja megkötni azt, sztérikus gátlás lép fel. Green és munkatársai (1971) dimer biotin molekulákat állítottak elő, melyek közé különböző szénatomszámú "szpészt", távolságtartó kart iktattak be. Azt tapasztalták, hogy a molekula 2 biotin végéhez csak abban az esetben tudott 1-1 avidin molekula kötődni, ha ez a szpészer lánc 12 szénatomnál hosszabb volt. Ezért vezették be a biotin/avidin rendszerekben az ϵ -aminokapronsavat mint szpészt a biotin karboxil csoportja és a reaktív NHS csoport közé (B-X-NHS-ként rövidítjük) (Costello 1979, Hoffmann 1982, Leary 1983).

A/2, Bakteriális ellenanyagkötő sejtfal fehérjék

Protein-A

A Prot.A a *Staphylococcus aureus* sejtfalából izolált fehérje, mely nagy affinitást mutat sok immunglobulin (Ig) Fc fragmentjéhez (Forsgren and Sjöquist 1966, Kronwall 1974). Becsült molekulásúlya 42000 és 56000D között van (Björk 1972), pI:5.1 (Lindmark 1977). Négy fehérjekötő helye közül csak kettőt tud egyszerre használni, így bifunkcionális vegyületnek tekinthető.

A Prot.A elsődlegesen az Fc régióban köti meg az Ig molekulát, a 2. és 3. konstans régiókban (Langone 1982), így az Ig-Prot.A kapcsolat nem gátolja az antigén-ellenanyag kötődést. Mivel az Fc régió a különböző ellenanyag osztályokban és alosztályokban nem egyforma, nem meglepő, hogy a Prot.A is az eltérő eredetű és osztályú ellenanyagokhoz más-más erősséggel kötődik.

Protein G

A Prot.A-hoz hasonló típusú fehérjék izolálhatók más streptococcus törzsek sejtfalából is. A Protein G egy 30000-35000D molekulasúlyú fehérje, melyet a *Staphylococcus aureus* C illetve G jelű törzseiből izoláltak (Kronwall 1973). Mivel először csak 1984-ben tisztították, kevésbé ismert mint a Prot.A (Björek and Koronwall 1984). Jelentősége, hogy azok az ellenanyag osztályok, alosztályok amelyek egyes fajok esetében gyengén kötődnek a Prot.A-hoz, igen jó affinitást mutatnak a Prot.G-hez. Mindkét fehérje génjét izolálták, s túltermelő törzsekbe építve a mesterséges gyártását is megoldották.

Mindkét fehérjének széleskörű immunokémiai felhasználása lehetséges az ellenanyag tisztításon kívül, radioaktív, enzim vagy fluoreszkáló részecskékkel jelölve.

A/3. Lektinek

Az eredetileg növényekből izolált, hemagglutinációért felelős glükoproteineket agglutininnek, fitohemagglutininnek, vagy újabban lektinnek nevezzük, mivel eredetük nem korlátozódik csak növényekre (Gold and Balding 1975 review). A lektinek nevezéktana még nem egységes, de alkalmazásuk elsősorban az általuk megkötött cukorcsoportok szerint történik. EIA rendszerekben igen jól használható pl. a (*Canavalia ensiformis* L.-ből izolált) Concanavalin-A (Con.A) lektin, mely a peroxidáz molekula szénhidrát oldalláncát ismeri fel (D-mannóz és D-glükóz).

A Con.A négy, egyenként 26000D molekulasúlyú alegységből áll, melyek tetramerré rendeződnek (Edmundson 1971). Minden alegység az aktivitásához nélkülözhetetlen Mn^{2+} és Ca^{2+} ionokat, valamint egy szénhidrátkötő helyet tartalmaz (Becker 1971).

A lektinek használata EIA rendszerekben főleg az aviditásuktól függ, mivel hatékonyságuk gyakran kisebb mint azoké az ellenanyagoké, melyeket helyettesíthetnének. Jól megválasztott rendszerben azonban igen jó eredmények érhetők el.

A/4. Enzim-anti-enzim (E-a-E) komplexek

A legspecifikusabb nagykapacitású molekula-felismerő rendszer maga az immunrendszer. Mivel egy ellenanyag egyszerre töltheti be az antigén és az antitest funkcióját, kiválóan alkalmas immunológiai előhívó rendszerek előállítására. Az E-a-E rendszerben egy másodlagos ellenanyag tölti be a híd szerepét, két azonos fajból származó, de különböző antigént felismerő Ig között. Az egyik ellenanyag antigénje maga az enzim (peroxidáz vagy alkalikus foszfatáz). Igen nagy specificitás érhető el monoklonális ellenanyagok alkalmazásával. A monoklonális egér PAP (peroxidáz-anti-peroxidáz) komplex pl. immunhisztokémiai festési eljárásokban igen érzékeny, háttérmentes jelet biztosít.

B. Kémiai úton előállított konjugátumok

A következő nagy csoportba azok a konjugátumok tartoznak, melyekben az enzimet, vagy más jelgeneráló reagenst kémiai reakció útján kötik az ellenanyagokhoz, vagy egyéb fehérjékhez.

Mivel dolgozatomban az avidin/biotin rendszerrel foglalkozom, amely a nagykapacitású molekulafelismerő rendszerekhez tartozik, a teljesség igénye nélkül csak a leggyakrabban használt kémiai konjugátumokat említem.

Egy ideális konjugátum 100%-ban kapcsolja össze az enzimet és az ellenanyagot megfelelő orientációban az enzim aktivitás csökkenése nélkül, azonkívül stabil és gazdaságosan állítható elő. A jelenleg ismert konjugátumok közül egy sem teljesíti a fenti szigorú követelményeket. Nagy különbségek vannak a konjugátumok között hatékonyságban és kimutathatóságban. Enzim-immuno-hisztokémiai (EIH) festésre pl. sokkal előnyösebb egy olyan konjugátum, ahol az ellenanyag:enzim arány 1:1, mivel ez könnyebben diffundál a szövetben mint egy több enzimet hordozó ellenanyag. Ez utóbbi viszont az EIA módszerekben hasznosabb.

A módszertől függetlenül több fontos paramétert kell figyelembe venni egy optimális konjugátum létrehozásakor. Többek között:

- a konjugációban résztvevő molekulák moláris koncentrációja
- a konjugációs idő megválasztása a moláris koncentrációktól függően
- a puffer oldatok tisztasága
- az ionerősség és a puffer oldatok pH-ja

B/1 Enzimes konjugátumok

Egy nagyon elegáns és hatékony módszert fejlesztettek ki 1974-ben Nakane és Kawaoi glükoproteinek kémiai konjugálására, majd 1978-ban Wilson és Nakane tökéletesítették azt.

B/1a, NaIO_4 -os konjugátum

Direkt konjugáció az egyik makromolekula Na-perjodáttal történő aktivációja után. Elsősorban peroxidáz enzim konjugálására használják. Optimális körülmények között a peroxidáz molekula 90%-a konjugálódik, s csak 10%-os aktivitás-csökkenés figyelhető meg. A konjugátumot egy gondos tisztítási lépés során először elválasztják a konjugálatlan peroxidáztól, majd a szabad immunglobulintól. Az első egy gélszűréssel, az utóbbit affinitás kromatográfiával Con.A-Sepharose oszlopon.

B/1b, Konjugátumok homo- ill. heterobifunkcionális reagenssel

Minden keresztkötést létrehozó reagens legalább két reaktív csoportot tartalmaz. A homobifunkcionális reagenseknél (pl. glutáraldehid), ez a 2 reaktív csoport ugyanaz, míg a heterobifunkcionálisoknál eltérő egymástól, ezért mindkét csoport különböző körülmények között reagálhat (pl. maleimid származékok).

Elméletileg a második csoport használhatóbb konjugátumokat képes létrehozni. Néhány homobifunkcionális reagenst kétlépéses reakcióban alkalmaznak, amikor az egyik fehérje kevésbé reaktív a keresztkötést létrehozó vegyülettel. Amennyiben egylépéses reakcióban használják, a létrejövő konjugátum mérete és arányai nem kontrollálhatóak. Mindezek ellenére a glutáraldehid egy széles körben elterjedt keresztkötő reagens. Használata egyszerű és gyors, főleg alkalikus foszfát és ureáz konjugátumok előállítására használják (Morris and Saelinger 1982). Heterobifunkcionális reagenssel optimálisabb konjugátum hozható létre, könnyebb elkerülni a nemkívánatos keresztkötéseket, homopolimereket (Kurstak et. al, 1975, Ishikawa et.al, 1978).

B/2. Kolloidális arannyal jelölt fehérjék

Másodlagos ellenanyagok, Prot.A vagy streptavidin kolloidális arannyal konjugálva igen jó feloldóképességet biztosító immunhisztokémiai festést tesznek lehetővé. A kolloidális arany erős, de nem kovalens kötéssel kötődik a fehérjéhez, annak pI-je körüli pH értéknél. Az arany jelölést elsődlegesen elektronmikroszkópos felvételek festésére fejlesztették ki (Rooth et. al, 1978), de alkalmas fénymikroszkópos metszetek vizsgálatára is. Nagyobb feloldást ad mint az enzim alapú konjugátumok, s megoldja az endogén enzimaktivitás problémáját is. Újabban fotokémiai ezüstözéssel érzékenyebbé tudják tenni az arany jelölést. Az addig rózsaszín-piros jel ezüstözéssel sötétpirostól feketéig erősödő színt ad.

B/3. Fluorokróm jelölt fehérjék

Az ellenanyagokat közvetlenül a fluorokróm festékekhez lehet kapcsolni, s élő rendszerekben is használhatók. Általánosan négy fluorokrómot használnak, ezek a fluoreszcein, rodamin, Texas Red és a fikoeritrin. Ezek közül is elsősorban a fikoeritrin és a fluoreszcein izotiocianát származékai alkalmasak a fehérjékhez történő kapcsolásra. Ezeknek a konjugátumoknak az előnye elsősorban abban rejlik, hogy egyszerre kétféle festésre is lehetőséget ad. Elsősorban fénymikroszkópos metszetek kettős festésére lehet használni, kihasználva, hogy minden fluorokróm más színnel fluoreszkál. Hátránya azonban, hogy speciális mikroszóp szükséges hozzá, s a stabilitása is kisebb mint pl. a biotinos jelölésé.

III.Célkitűzés

Összefoglalva elmondhatjuk, hogy a felsorolt konjugátumok széleskörben használhatók mind az immunológiában, mind más területeken. Hazai viszonylatban azonban csak néhány, a jónevű külföldi cégek termékeihez képest gyengébb minőségű enzim konjugátum szerezhető be forintért. Az első (A) csoportban felsorolt nagykapacitású molekulafelismerő rendszerek csak valutáért kaphatóak, beszerzésük hosszadalmas.

Célunk volt annak vizsgálata, hogy jelölhető-e a biotin-X-opfp-vel kíméletes körülmények között a különböző fehérjék, s a jelölt fehérjék alkalmasak-e érzékeny tesztrendszerek felépítésére? Végül összehasonlítottuk a külföldről beszerezhető biotin-X-NHS-el és a biotin-X-opfp-vel jelölt fehérjéket.

Kísérleteink során főleg ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) rendszerekben vizsgáltuk a biotinilált fehérjék minőségét és mennyiségét, valamint, hogy az új aktív észter megfelel-e az előzetes célkitűzésnek, azaz minősége összevethető-e a biotin-X-NHS aktív észterrel.

1. A biotin-X-opfp-vel való jelölés optimális körülményeinek megállapítása.

- 1,a A biotinilálás mennyiségi viszonyai.
- 1,b A pH hatása a fehérjék biotinilálására.
- 1,c Az idő szerepe a fehérjék biotin jelölésében.

2. A biotinilált fehérjék jellemzése:

- 2,a Biotinilált BSA és Ig kimutathatósági határa.
- 2,b Biotinilált BSA kimutatása immun-blotton biotinilált β -galaktozidáz /streptavidin komplex-szel.
- 2,c Hígítási kísérletek biotinilált peroxidáz/streptavidin komplex-el.
- 2,d Összehasonlító vizsgálatok az Amersham cég biotinilált termékeivel.

IV. Anyag és Módszer

Anyagok:

1, Poliklonális immunsavók:

Az anti-egér birka és az anti-nyúl birka szérumot a Mezőhegyesi Mezőgazdasági Kombinát Állattenyésztési Üzeme állította elő.

Az anti-tesztoszteron nyúl szérum Dr.Csernus Valér POTE ajándéka.

Az anti-ekdizon nyúl szérum Dr Szekeres György POTE ajándéka.

2, Monoklonális immunsavók:

Az anti-SOD (superoxi dizmutáz) egér és anti-OVA (ovalbumin) egér ellenanyag Dr. Németh Péter, POTE Pathologiai Intézet, ajándéka.

3,Enzimek:

Tormagyökér peroxidáz (HRPO) Reanal RZ=0.5 nyers kivonatból tisztította Dr. Hannu Niemi, Biotechnika RT., RZ=3.0, Spec. aktivitás 60-80 U/mg pirogallol egységben.

β -galaktozidáz, Kőbányai Gyógyszerárugyár Gyógyszerkutató Intézete, Spec.akt. 300000U/mg ONPG egységekben

Alkalikus foszfatáz, CALBIOCHEM 524572 kat.szám, Spec. akt. 1500U/mg PNPP egységekben.

4,Egyéb:

Protein A-Sepharose CL-4B, Pharmacia

Zselatin és BSA (Bovin Serum Albumin), Reanal

BSA haptén konjugációhoz, Serva V frakció Tesztoszteron, Sigma
20-OH ekdiszteroid, Dr.Maróy Péter, SzBK Genetika Int., ajándéka
(+) biotin,Reanal

Biotin-X-NHS, Boehringer kat. szám 1008960

Streptavidin, Apcel

SOD (superoxi dizmutáz), Sigma

DMSO (dimetil szulfoxid), Serva

HABA (hidroxi-azo-benzoessav), pirogallol, Aldrich

ELISA lemez, Titertek, High activated Immuno Assay Plate Kat. szám
77 172 05

5, Referencia anyagok:

Biotinilált anti-egér birka IgG, Amersham RPN.1001
Biotinilált peroxidáz/streptavidin, Amersham, RPN.1041
Anti-egér nyúl IgG/peroxidáz konjugátum, Dakopatts, P260

6, Felhasznált pufferek:

PBS pH:7.2 0.0075M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$
0.0025M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$
0.1450M NaCl

PBS mosó: PBS + 0.5M NaCl + 0.05% Tween20

Citromsav-foszfát puffer pH:5.0
0.0347M citromsav
0.0667M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$

TBS pH:7.5 50mM Tris
150mM NaCl
5mM MgCl_2

"Z"puffer pH:8.00.06M Na_2HPO_4
0.04M NaH_2PO_4
0.01M KCl
0.001M MgCl
0.05M β -Merkapto-etanol

7, Szubsztrátok és kromogének:

ONPG 0-nitrofenil β -D-galakto-piranozid, Aldrich
OPD o-fenilén diamin, Sigma
TMB tetra-metil benzidin, Serva
4CN 4 kloro-1-naftol, Serva
3AEC 3-amino-9-etilkarbazol, Serva
DAB diamino benzidin Sigma
 H_2O_2 hidrogénperoxid, Reanal
X-Gal 5-bromo-4-kloro-3-indolil- β -D-galakto-
piranozid, Biotechnika RT.

Módszerek:

1, Immunglobulin tisztítás:

Az ellenanyagokat két lépésben tisztítottuk . Először 50% ammónium-szulfáttal kicsapva előtisztítottuk a szérumot, majd alapos dialízis után protein-A-Sepharose CL-4B oszlopon választottuk el az IgG frakciókat (Manil,L. et.all. 1986).

2, Fehérjék mennyiségi meghatározása:

Bredford szerint.

Anal. Biochem.,(1976) 72, 248

3, Fehérje biotinilálás:

0.1M NaHCO_3 pH:9,0-es pufferben oldott fehérjét (1mg/ml) szobahőn 2 órán át inkubáltuk a DMSO-ban oldott biotiniláló reaggesszel (1mg/ml biotin-X-opfp) 5:1 térfogatarányban, majd kimerítő dialízissel eltávolítottuk a szabadon maradt biotint. A jelölt fehérjét általában PBS pH:7.2 pufferben tároltuk 1% BSA-val kiegészítve. Proteázgátlóként 0.01% mertiolátot használtunk. A részletes mennyiségi arányokat a különböző fehérjék esetében a későbbiekben részletezem.

4, Biotin-X-opfp meghatározás HABA-val:

Green, N.M. eljárása alapján (Biochem. J.,94, 23)

Először kalibrációs görbét készítettünk. 400 μg avidint és 25 μl (0.25mM) HABA oldatot 1ml PBS pH:7.2 pufferben elkevertünk, majd abszorbcíót mértünk 500nm-en. 20 μg /ml biotin oldatból 5 μl -eket mértünk a fent lemerített elegyhez, majd mértük az abszorbcíós változást. A biotin erősebben kötődik az avidinhez, ezért arányos mennyiségű biotin analógot szorít le az avidin molekuláról, ami fotométerrel követhető színintenzitás csökkenéssel jár.

A vizsgálandó mintákat először proteináz-K enzimmal emésztettük 37°C-on 10mM Tris pH:8.0 pufferben, majd 1 óráig, 67°C-on történő inkubálással hatástalanítottuk a fehérjét emésztő enzimet. Ebből az emésztett fehérje oldatból 5-10 μl -t mértünk az avidin-HABA keverékhez, s mértük a biotin által kiváltott abszorbcíó csökkenést.

5, Enzimaktivitás mérés:

Peroxidáz:

Sigma protokoll szerint:

Reagensek: A, 0.1M KH_2PO_4 pH:6.0

B, 0.147M H_2O_2

C, 5% pirogallol oldat

D, desztillált víz

1ml-es küvettába a következő oldatokat mértük:

A, 0.32ml

B, 0.16ml

C, 0.32ml

D, 2.10ml

Az oldatokat összekevertük, és 20°C-ra állítottuk. 420nm-en a fotométert nulláztuk erre az oldatra, majd közvetlenül a mérés előtt 0.10ml megfelelően hígított peroxidáz enzimet mértünk bele. Gyorsan összekevertük, majd 15mp-enként leolvastuk az OD-t. A lineáris szakaszból számoltuk az aktivitást.

$$\text{U/mg} = \frac{\Delta\text{OD}_{420}/20\text{mp}}{12 \times \text{mg enzim/ml reakció}}$$

12: a Sigma által meghatározott extinkciós koefficiens.

A jelöletlen enzim 1.23mg/ml, a jelölt 0.95mg/ml fehérje tartalmú volt.

$$\text{Eredeti enzim: } \Delta A_{420}/t = 20\text{mp} = 0.0330$$

$$\text{Biotinilált enzim} = 0.0220$$

$$\text{Eredeti} = \frac{0.0330}{12 \times 0.000041} = \underline{67.6 \text{ U/mg}}$$

$$\text{Biotinilált} = \frac{0.0220}{12 \times 0.0000331} = \underline{55.3 \text{ U/mg}}$$

β -galaktozidáz:

Worthington Enzyme Hand Book szerint:

$$\text{Aktivitás: } \frac{\text{OD}_{420} \times 380}{t_{26^{\circ}\text{C}}(\text{perc}) \times \text{mg fehérje/reakció}} = \text{U/mg}$$

10 μ l enzimet 200 μ g ONPG-vel és 1ml Z pufferrel 26°C-on inkubáltuk a sárga szín megjelenéséig. Stopperrel mértük a reakcióidőt. Ha túl gyors a reakció ($t < 1$ perc), hígítottuk az enzim oldatot. 0.5ml Na₂CO₃-al állítottuk le a reakciót, majd 420nm-en abszorpciót mértünk. 1mg tiszta enzim aktivitása max. 300000 U

A fehérjetartalom: 1, biotinilálás előtt 17.3mg/ml

2, biotinilálás után 0.7mg/ml

1a, $t_{26^{\circ}\text{C}} = 3$ perc 1000x híg

1b, = 1perc 100x híg

2, = 3perc 100x híg

1a, $\text{OD}_{420} = 0.242$

1b, $\text{OD}_{420} = 0.778$

2, $\text{OD}_{420} = 0.089$

$$1a \frac{0.242 \times 380}{3 \times 0.000173} = \underline{177186 \text{ U/mg}}$$

$$1b, \frac{0.778 \times 380}{1 \times 0.00173} = \underline{170890 \text{ U/mg}}$$

$$2, \frac{0.089 \times 380}{3 \times 0.00007} = \underline{161047 \text{ U/mg}}$$

6, Kompetíciós ELISA teszt:

Két kompetíciós típusú ELISA vizsgálatot végeztünk, melyekben a módszer megegyezett, csak az antigén ill. ellenanyag hígítások változtak.

A lemezeket BSA-hoz konjugált β -ekdizonnalal ill. tesztoszteronnal érzékenyítettük PBS pH:7.2 pufferben hígítva. Egy mélyedésbe 16 ill. 25ng/100 μ l oldat került. Két órán át 37°C-on inkubáltuk a lemezeket, majd PBS mosó pufferrel 3x3 percig mostuk. A szabadon maradt kötőhelyeket 0.5% BSA oldattal telítettük. 1 óra inkubáció és 3x3 perc mosás után az anti-ekdiszteroid ill. anti-tesztoszteron nyúl szérumokat mértük a mélyedésekbe a megfelelő szabad antigénekkal egyszerre. Az ellenanyag a szabad antigén mennyiségétől függően kötődik ki a lemezre, ahol a biotinilált anti-nyúl birka Ig és biotinilált peroxidáz/streptavidin komplex rendszerrel hívtuk elő. A szubsztrátot és a kromogént citromsav-foszfát pufferben oldottuk. 0.003% H₂O₂ és 0.8mg/ml OPD. A reakciót 4N kénsav oldattal állítottuk le.

Az eredményt OD_{492nm}-en olvastuk le. Minél kevesebb a szabad antigén mennyisége, annál nagyobb OD-t kaptunk. Maximális, azaz 100% az OD, ha a szabad antigén mennyisége = 0. A kalibrációs görbe szemilogaritmikus papíron ábrázolva általában szigmoid. A pontos méréshez a lineáris szakasz használható. Minél erősebb az ellenanyag kötődése az antigénhez, annál meredekebb a görbe és annál pontosabb a mérés.

7, Western-blot - biotinilált MS marker előhívása

Akrilamid gélen, töltés alapján elválasztott fehérje mintázatot kapilláris transzfer segítségével vittük át nitrocellulóz (NC) filterre (Towbin, 1979.; Gershoni, 1983.). A blottolás után telítettük a szabadon maradt fehérje kötő helyeket. TBS pH:7.5 pufferben oldott 3% BSA vagy zselatin oldattal 37°C-on enyhe rázogatózás közben inkubáltuk. A nitrocellulóz filtert nagy fehérjekötő kapacitása miatt 2-4 órán át telítettük.

A továbbiakban általában az ELISA típusú tesztekhez hasonlóan jártunk el. Jelen esetben közvetlenül a biotinilált peroxidáz/streptavidin komplexel hívtuk elő a megfuttatott, majd NC filterre átblottolt biotinilált mólsúly fehérjét. 1% BSA-val és 0.05% TritonX-100-al kiegészített TBS pufferben hígítottuk a komplexet, és mostuk a filtert. A biotinilált peroxidáz/streptavidin komplexel 30 perces inkubáció általában jó festést biztosított. Nitrocellulóz filteren színes csapadékot adó kromogént használtunk, 4CN (4-kloro-1-naphtol): kékesfekete csapadék, szubsztrát puffere: TBS ph:7.5+0.03% H_2O_2 +0.4mg/ml 4CN. Az enzimreakciót egyszerű csapvizes kimosással állítottuk le, majd a filtert szárazon, sötét helyen tároltuk.

V. Kísérletek és eredmények

1. A biotin-X-opfp-vel való jelölés optimális körülményeinek megállapítása:

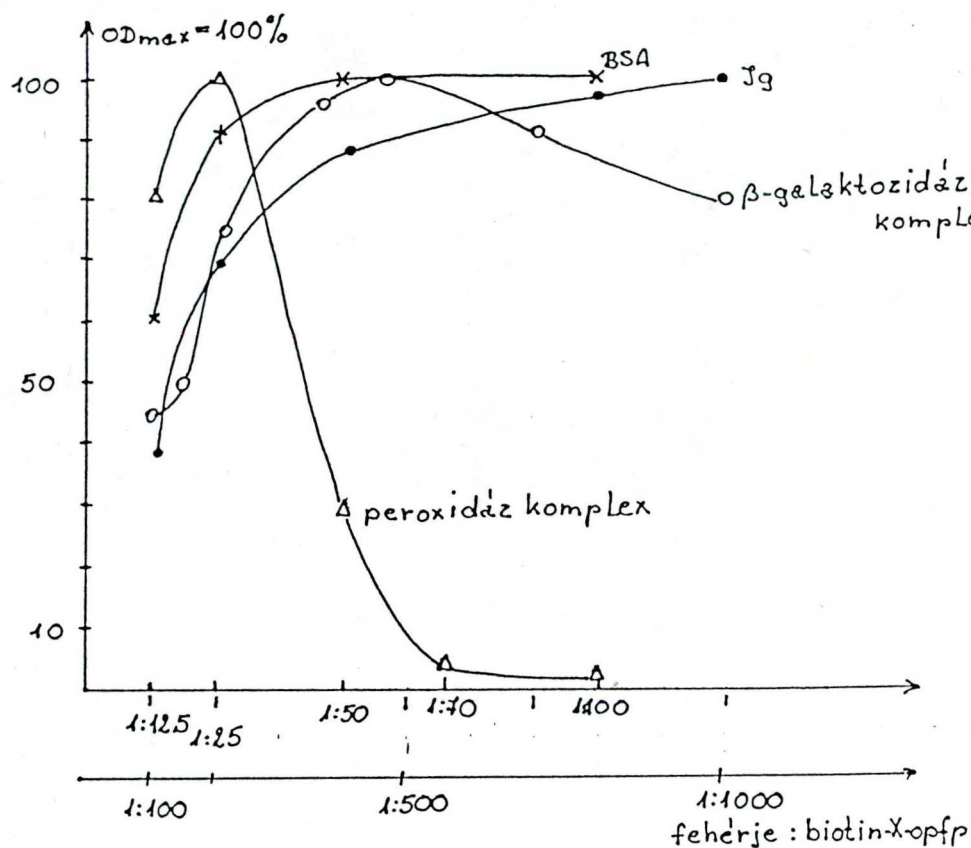
Vizsgáltuk a jelölés körülményeit és megállapítottuk az optimális fehérje/biotin arányt több fehérjére nézve, mértük a jelölődés időtől és pH-tól való függését, valamint enzimek esetében a streptavidinnel történő komplexképzés optimális arányait. Végezetül a specifikus aktivitás meghatározásával ellenőriztük a jelölt enzimek károsodásának mértékét.

1/a A biotinilálás mennyiségi viszonyai:

Több különböző fehérjét jelöltünk különböző mennyiségű biotin-X-opfp-vel annak megállapítására, hogy a megkötött biotin mennyisége befolyásolja-e a fehérjék biológiai funkcióját, valamint, hogy immunológiai tesztrendszerben milyen érzékenység érhető el ezzel a módszerrel. Biotiniláltunk BSA-t, mint enzim aktivitással nem rendelkező fehérjét, immunglobulint és két enzimet.

Tormagyökér peroxidázt, mint egy alegységből álló és β -galaktozidázt, mint 4 alegységből álló enzimet. Mindkettőt gyakran használják az immunológiai előhívó rendszerekben. Az eredmények a 2.ábrán és az I.táblázatban vannak összefoglalva. Minden esetben azonos körülmények között végeztük a biotinilálást, figyelembe véve, hogy a β -galaktozidáz aktív struktúrájának fenntartásához β -merkaptó-etanol és Mg^{++} ionok szükségesek. 1mg/ml-es fehérje oldatokat készítettünk 0.1M $NaHCO_3$ pH:9.0 pufferben, és ehhez adtuk a DMSO-ban oldott biotin-X-opfp-t 1:12,5; 1:25; 1:50; 1:100; 1:150; β -galaktozidáz esetében 1:100; 1:140; 1:210; 1:360; 1:460; 1:700; és 1:1000 arányban. Ügyeltünk rá, hogy a DMSO mennyisége ne haladja meg a puffer térfogatának 1/5-ét, különben az oldat pH-ja erősen lecsökken.

Szobahőmérsékleten 4 órahosszáig inkubáltuk, majd PBS pH:7.2 pufferrel szemben legalább 36 órán át dializáltuk, többszörös puffercserével. A β -galaktozidázt 10mM $MgCl_2$ -ot és 10mM β -merkaptó-etanolt is tartalmazó 10mM TRIS pH:7.6 pufferbe dializáltuk át. A BSA és az immunglobulin esetében közvetlenül a szilárd fázishoz, ELISA lemezhez kötéssel, és egy biotinilált peroxidáz/streptavidin komplex-szel történő előhívással ellenőriztük a biotin jelöltségét.



2.ábra: Négy különböző fehérje biotin-jelöltségének függése a jelölő reagens mennyiségétől

Érzékenyítés: B-fehérjével

Telítés: 0.5% BSA

Előhívás: biotinilált peroxidáz/streptavidin komplex-szel, 1000x híg, illetve az enzim komplexeket közvetlenül a szubsztrátjukkal.

A részletes adatok az 1. Táblázatban találhatók.

1.Táblázat

A fehérje biotinilálás mennyiségi viszonyai:

	1:12.5	Fehérje:biotin-X-opfp molarány			1:100	1:150
		1:25	1:50	1:70		
B-BSA 25ng/mélyedés						
ΔOD	1.19	1.82	1.98		1.97	
%	60	92	100		99.5	
ΔSD	0.03	0.03	0.05		0.07	
B-Ig 20ng/mélyedés						
ΔOD	0.76	1.40	1.76		1.94	2.00
%	38	70	88		97	100
ΔSD	0.02	0.04	0.05		0.07	0.08
B-biotinilált peroxidáz/streptavidin komplex 2000x híg peroxidáz 1 g/ml streptavidin 0.6 g/ml						
ΔOD	1.62	2.00	0.60	0.08	0.06	
%	81	100	30	4	3	
ΔSD	0.05	0.06	0.02	0.01	0.07	
β-galaktozidáz/streptavidin komplex 100x híg β-galaktozidáz 0.04ng/ml streptavidin 2.3 g/ml						
Fehérje:biotin molarány	ΔOD		%		ΔSD	
1:1000	1.12		80		0.03	
1:700	1.27		91		0.04	
1:540	1.37		98		0.04	
1:460	1.40		100		0.03	
1:360	1.34		96		0.02	
1:210	1.05		75		0.04	
1:140	0.70		50		0.03	
1:100	0.63		45		0.02	

Mindkét esetben a várt telítési görbét kaptuk, azaz növelve a biotin-X-opfp mennyiségét, növekszik a jel, azaz egyre több biotin molekula kötődik meg a fehérjén. Immunglobulin esetében egy független kísérletben meggyőződünk arról, hogy az 1:100 fehérje/biotin-X-opfp molarány mellett jelölt fehérje immunológiai felismerő képessége nem csökkent.

Enzimek esetében nem elsősorban az a kérdés, hogy hány biotin-X-opfp molekulát tudunk megkötni a fehérjén, hanem hogy a megkötött molekulák mennyire befolyásolják az enzimaktivitást. Ezért nem mint jelölt fehérjét, hanem streptavidin komplexet képezve, magát a biotinilált enzim/streptavidin komplexet vizsgáltuk adott mennyiségű biotinilált fehérjéhez kötve. Ahhoz, hogy a különböző mennyiségű biotin-X-opfp-vel jelölt enzimeket egymással össze tudjuk hasonlítani, előbb mindegyikhez meg kellett keresni az optimális streptavidin koncentrációt. Az optimális streptavidin koncentráció azt az értéket jelenti, amelynél a streptavidin maximális számú biotinilált enzimet kapcsol össze úgy, hogy még elegendő számú felületi elhelyezkedésű szabad biotinkötő helye marad más, a szilárd fázishoz kötött biotin molekulákhoz való kötődésre.

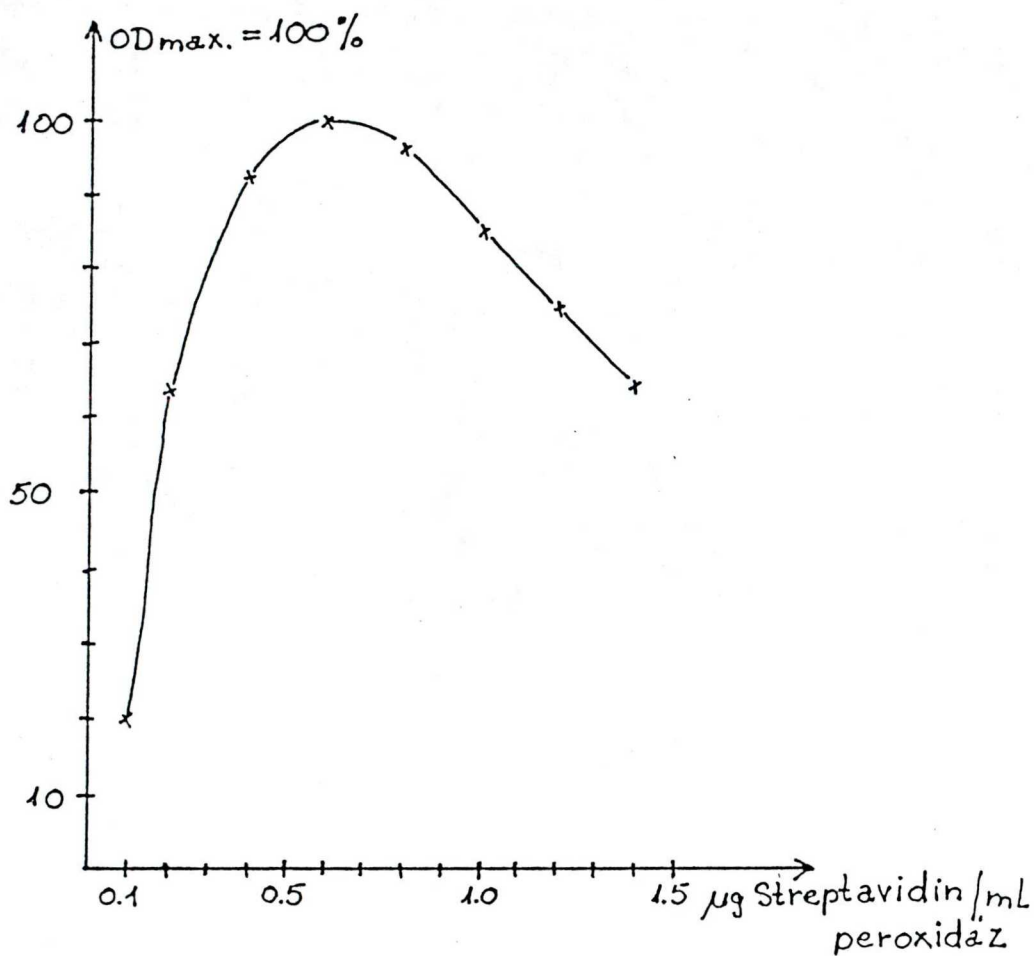
Peroxidáz enzimnél ezt az optimumot a 3.ábrán mutatjuk be.

Ugyanezt a kísérletet végeztük el biotinilált β -galaktozidáz esetében is, majd a komplexeket hasonlítottuk össze. Ábrázolásakor 100%-nak vettük az adott kísérletben elért maximális OD-t, s ehhez az "optimumhoz" képest ábrázoltuk a többi mérési pontot. A 2.ábrán látható, hogy míg a biotinilált peroxidáz/streptavidin komplex éles csúcsot ad, jelezve, hogy a megkötött biotin mennyisége egy bizonyos arány fölött már károsan befolyásolja az enzim aktivitását, addig a β -galaktozidáz/streptavidin komplexnél a csökkenés csak minimális.

β -galaktozidáz esetében dot-blot analízissel is ellenőriztük a különböző molarány mellett biotinilált, streptavidinre optimalizált komplexeket 4.ábra.

Enzimjelölés esetében alapvető követelmény, hogy a jelölést olyan körülmények között végezzük, amely nem károsítja az enzimet, illetve a jelölt fehérjét. Peroxidáz esetében pirogallol egységekben mértük az aktivitást jelölés előtt és után 5.ábra.

A β -galaktozidáz aktivitását ONPG egységekben mértük Worthington szerint.



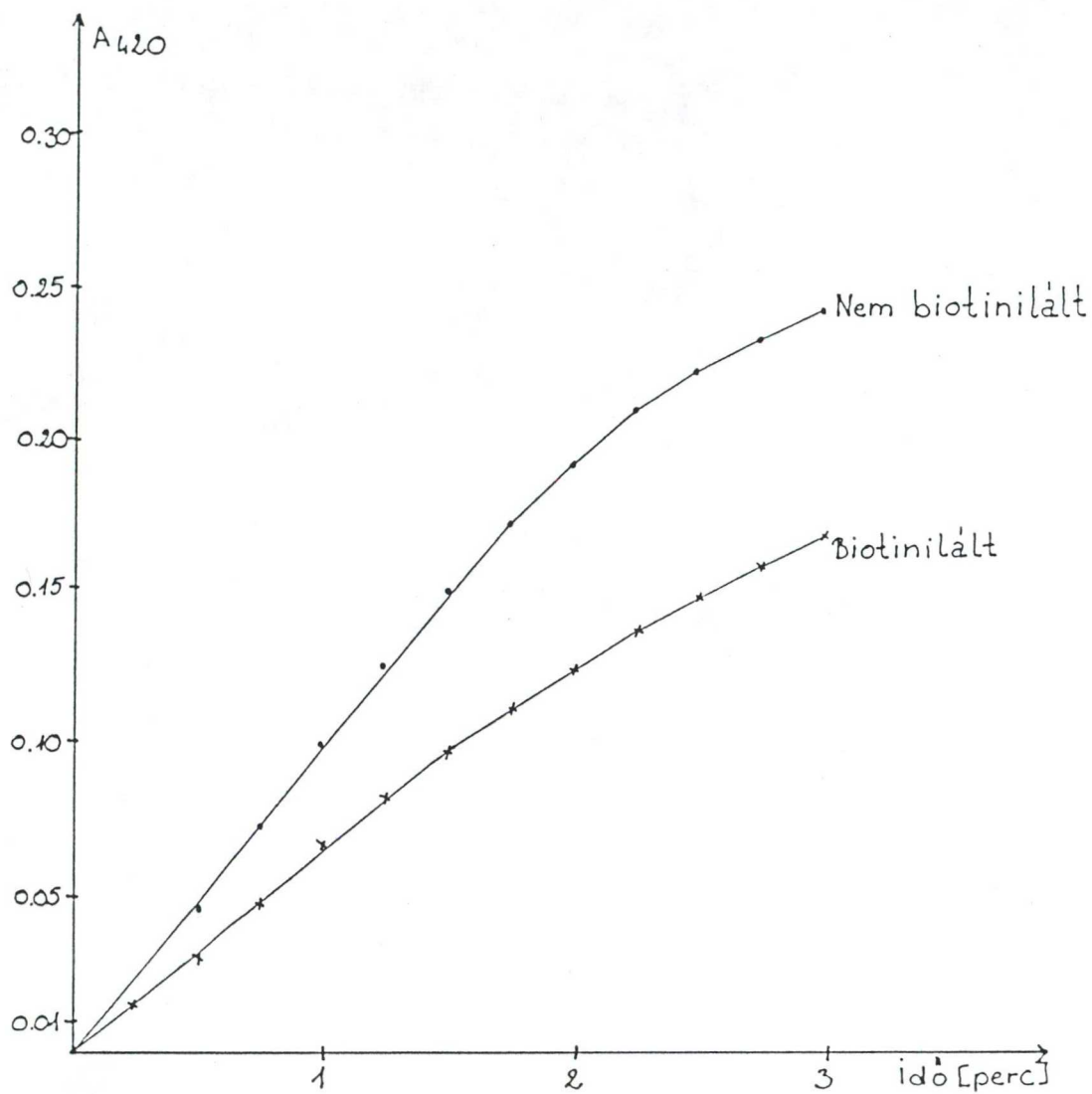
3.ábra: Egy biotinilált tormagyökér peroxidáz oldathoz tartozó optimális streptavidin koncentráció meghatározása

Érzékenyítés: 50 ng/mélyedés biotinilált BSA

Telítés: 0.5% BSA

Biotinilált peroxidáz/streptavidin komplex képzés:

1 g/ml-re hígítjuk az enzimet, majd 1-1 ml-eihez 0.2-1.4 g streptavidint mérünk. 1 órát inkubáljuk 4°C-on, majd előhívjuk. Ezt a mérést minden újonnan biotinilált enzim minta esetében el kell végezni.



5. ábra: Peroxidáz enzim aktivitásának kinetikai görbéi biotinilálás előtt és után

A peroxidáz enzim eredeti aktivitása 67.6U/mg volt, jelölés után 55.3U/mg. A β -galaktozidáz eredeti aktivitása 177186U/mg volt, biotinilálás után 170890U/mg lett.

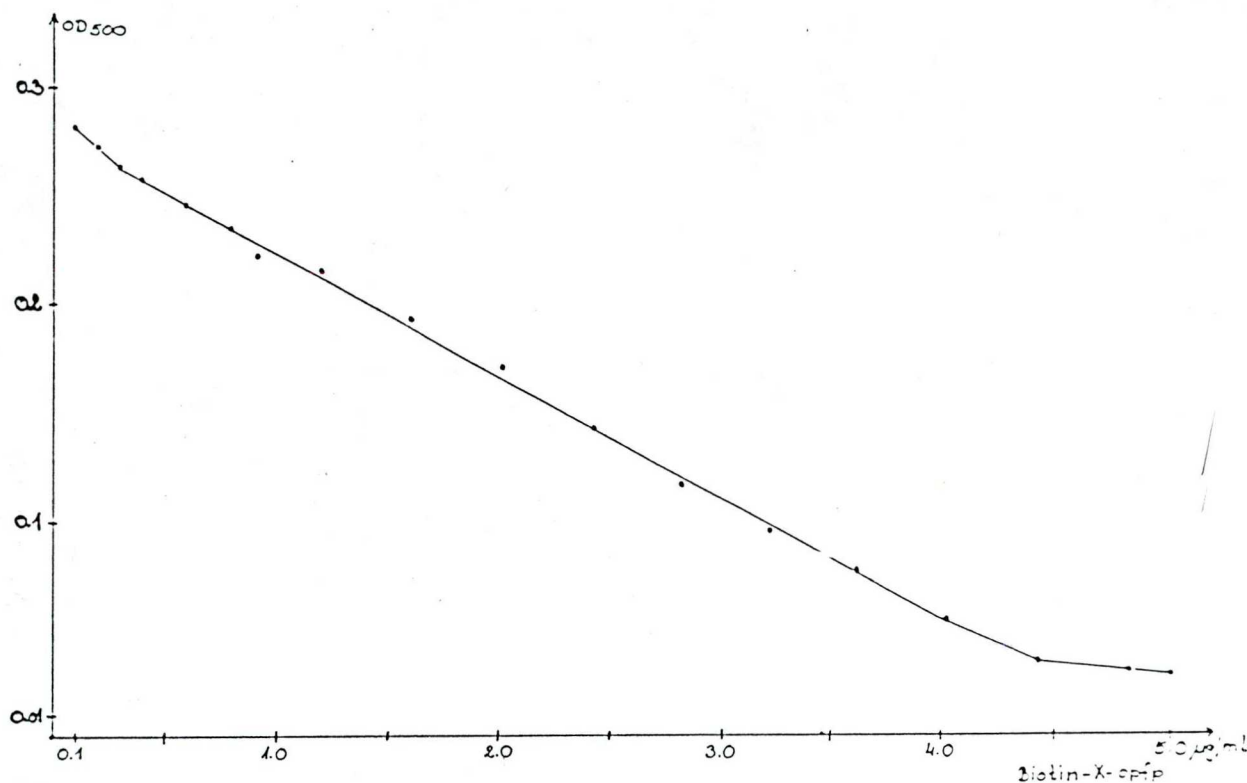
A biotinilálás hatására a β -galaktozidáz enzim 7.5%-os aktivitás csökkenést mutatott, szemben a peroxidáznál mért 18%-kal.

Megmértük néhány fehérje molekulán optimális körülmények között megkötött biotin molekulák számát. Ebben a tesztben a biotin egy analógját, a HABA-t (hidroxi-azo-benzoészav) használtuk, amely képes a streptavidinnel ill. avidinnel egy sárga színű, gyenge komplexet képezni, s ez 500 nm-en jól mérhető. Ismert mennyiségű biotin erősebb kötődése révén arányos mennyiségű analógot szorít le, ami fotométerrel jól követhető színintenzitás csökkenéssel jár (Green, 1965). Ezen az alapon pontos kalibrációs görbe készíthető 6.ábra.

Peroxidáz enzimre átlag 8-10 biotin molekulát mértünk, míg a birka Ig-ra nézve ez az érték 80-85 volt.

1.b A pH hatása a fehérjék biotinilálására:

Savanyú, semleges és lúgos körülmények között jelöltünk anti-egérnyúl immunglobulin molekulákat. 1mg/ml koncentrációjú fehérje oldatot készítettünk pH:5.0 citrát, pH:7.2 foszfát és pH:9.0 karbonát pufferben, majd 1.8mg/ml koncentrációjú DMSO-ban oldott biotin-X-opfp-ből 200-2000U-t mértünk hozzá. 2 órán át inkubáltuk szobahőmérsékleten, majd PBS pH:7.2 pufferbe dializáltuk át. Ezután ELISA-ban ellenőriztük, hogy milyen mértékben jelölődtek a fehérjék. 1000, 2000, 4000 és 8000x-esére hígított biotinilált immunglobulin 100-100 l-ével érzékenyítettük a lemezt, majd a szabadon maradt fehérjekötő helyek BSA-val történő telítése után blokkolás után biotinilált peroxidáz/streptavidin komplex-szel hívtuk elő 2.táblázat.



6. ábra: A fehérjén megkötődött biotin-X-opfp mérése HABA titrálással

Proteináz K-val emésztett, ismert mennyiségű biotinált fehérje molekulán levő biotin-X-opfp molekulák száma jól mérhető ezen a módon. Egy peroxidáz molekulára átlag 8-10 biotin molekula kötődik fel az optimális molarányok mellett, még egy nagyobb immunglobulin molekulán átlag 80-85 biotin-X-opfp molekulát mértünk.

	Idő[perc]				
	10	30	60	120	240
OD492	1.2	1.6	1.8	>2.0	>2.0
%	60	80	90	100	100
SD±	0.02	0.02	0.03	0.04	0.06



2.Táblázat

Anti-egér nyúl Ig biotinilálásának pH függése:

Puffer pH:	Hígítás			
	1000	2000	4000	8000
5.0	0.48	0.17	0.00	0.00
7.2	1.85	1.02	0.46	0.22
9.0	> 2.0	1.72	0.87	0.43

Az adatok OD-ban vannak megadva. Ez alapján a lúgos pH tartomány kedvez legjobban a biotin-X-opfp molekulák kötődésének.

1.c Az idő szerepe a fehérjék biotin jelölésében:

Tisztított anti-egér nyúl immunglobulin molekulát 10-30-60-120-240 percig biotin-X-opfp-vel jelöltünk, majd a már említett módon teszteltük a biotinilálás hatékonyságát. Az adatokat az 7.ábrán mutatjuk be.

100%-nak a 4 órás inkubációval elérhető maximális OD_{492nm}-t tekintettük. 10 perc alatt már 60%-os jelöltség mutatható ki, 1 óra múlva 90% és 2 óra múlva nem lehet különbséget kimutatni a 4 órás inkubációhoz képest. Az eredmények igen gyors kinetikára utalnak.

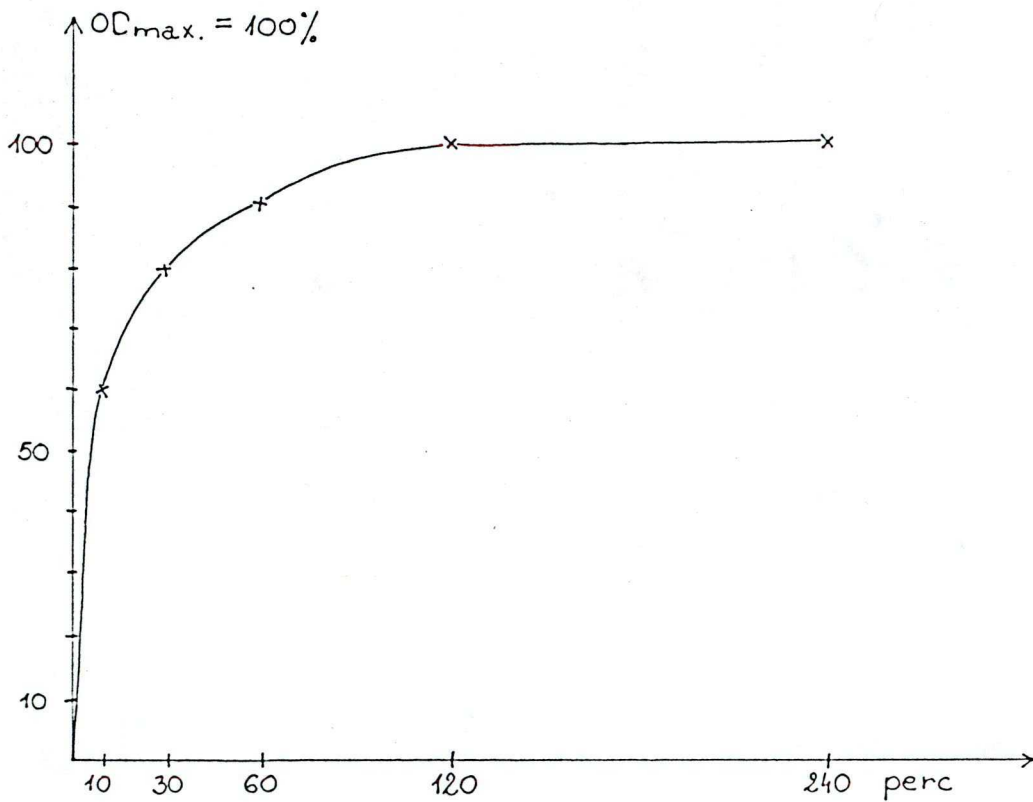
2. A biotinilált fehérjék jellemzése:

Az optimalizációs kísérletek után különböző rendszerekben néztük a jelölődés hatékonyságát. Hígítási kísérletekben vizsgáltuk a biotinilált fehérjék kimutatható-sági határát különböző biotinilált enzim komplexekkel előhívva.

2/a A biotinilált BSA és immunglobulin kimutatható-sági határa ELISA rendszerben:

Vizsgáltuk, hogy egy optimális körülmények között jelölt BSA molekula szilárd fázishoz kötve milyen érzékenységgel mutatható ki egy biotinilált peroxidáz/streptavidin komplex-szel. A komplex-szel történő inkubálás idejét 15 perctől 24 óráig változtattuk. A komplex töménysége változatlan volt, 2000x-es hígítás. A 8.ábrán egyértelműen látszik, hogy ha a kimutatható-sági határt OD₄₉₂=0.1-ben határozzuk meg, akkor a szokásos 1 órás inkubáció mellett ebben a rendszerben 1.5ng/mélyedés biotinilált BSA-t tudunk kimutatni. Ha az inkubációs időt növeltük, ez a határ természetesen csökkent. 3 óránál 200pg/mélyedés, 6 óránál 50pg/mélyedés és 24 órás inkubáció mellett 10pg/mélyedés B-BSA-t is ki tudunk mutatni.

Sokszor nem a kimutatandó anyag mennyisége a kevés, hanem az idő. Félórás inkubáció már 7ng/mélyedés, negyedórás inkubáció pedig 25ng/mélyedés kimutatását is lehetővé tette. Természetesen ezek a mennyiségek csak az ELISA lemez mélyedéseibe mért ng-ok. Mivel egy mélyedésbe 100 μ l-t mértünk, a bemért fehérje oldat koncentrációjánál egy tízszeres szorzószámot kell figyelembe venni (25ng/mélyedés = 250ng/ml).



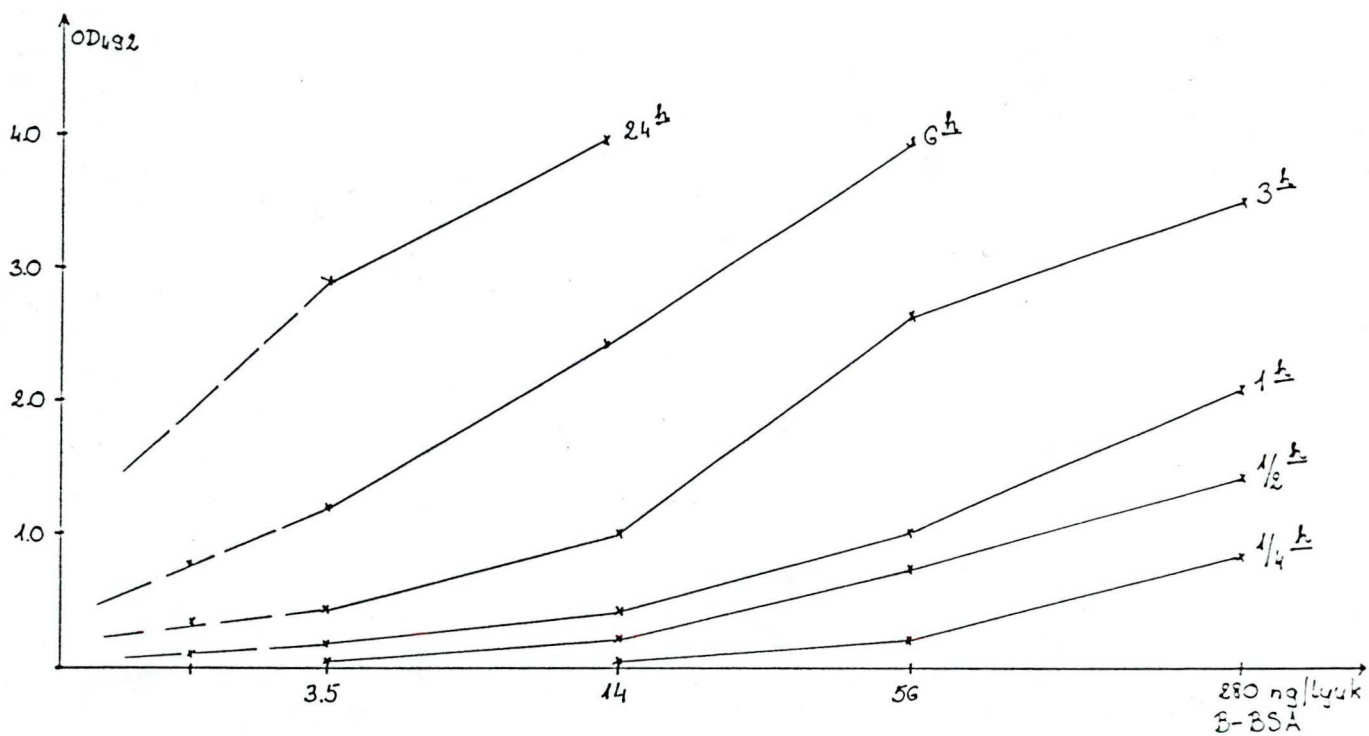
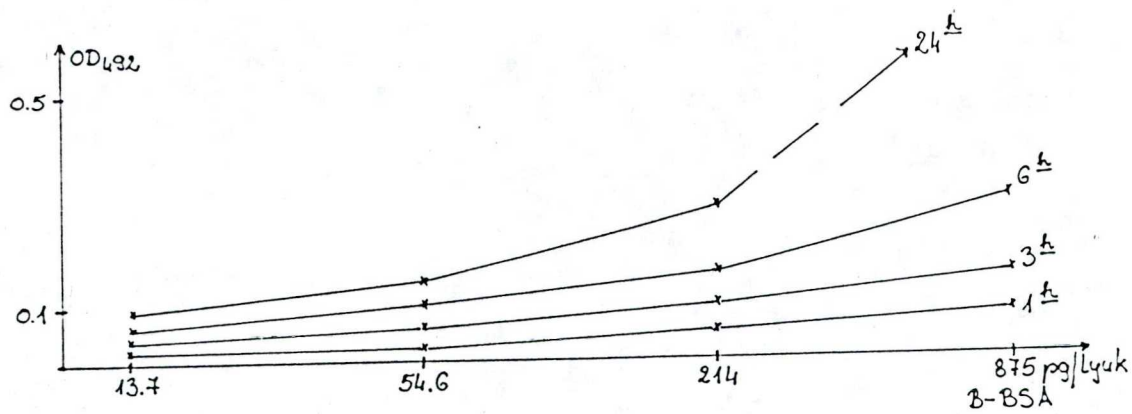
7 .ábra: A biotinilálás mértéke az idő függvényében

Érzékenyítés: 100ng/ml B-IgG

Telítés: 0.5% BSA

Előhívás: biotinilált peroxidáz/streptavidin komplex

Az adatok OD₄₉₂-ben vannak megadva:



8.ábra: B-BSA titrálási görbe különböző komplex inkubációs idővel

Érzékenyítés: 280-0.0137ng/lyuk B-BSA

Telítés: 0.5% BSA

Előhívás: biotinilált peroxidáz/streptavidin komplex

2000x híg

Inkubációs idő a komplex-szel: 1/4-24 óra

A tényleges kikötődésről nincs adatunk, de ennek mindenképpen csak töredéke. A szilárd fázisra való kötődés nagymértékben függ a fehérje töltésétől, pl-jétől és méretétől. A BSA molekulánál 4x nagyobb Ig molekulával is végeztünk hasonló vizsgálatot, de itt az inkubációs időt nem változtattuk, végig 1 óra volt 9. ábra.

Hasonló kritériumok mellett a biotinilált-Ig (nyúl) kimutathatósági határa közvetlen kikötés mellett 5ng/mélyedés.

A fenti kísérleteket megismételtük, -hogyan a ténylegesen kikötődött biotinilált fehérje mennyiségéről némi fogalmunk legyen-, úgy is, hogy 1 órás inkubáció után minden mélyedésből óvatosan visszaszívtuk a fehérje oldatot, majd egy másik lemezre adagoltuk. Újabb 1 óra múlva megismételtük az eljárást, így az eredeti oldatot 3 lemez érzékenyítésére használtuk fel. Csak az eredeti koncentrációt ismerjük, a 2. és 3. lemezre jutott B-BSA ill. B-Ig (nyúl) mennyiségére már csak következtethetünk. 10. ábra.

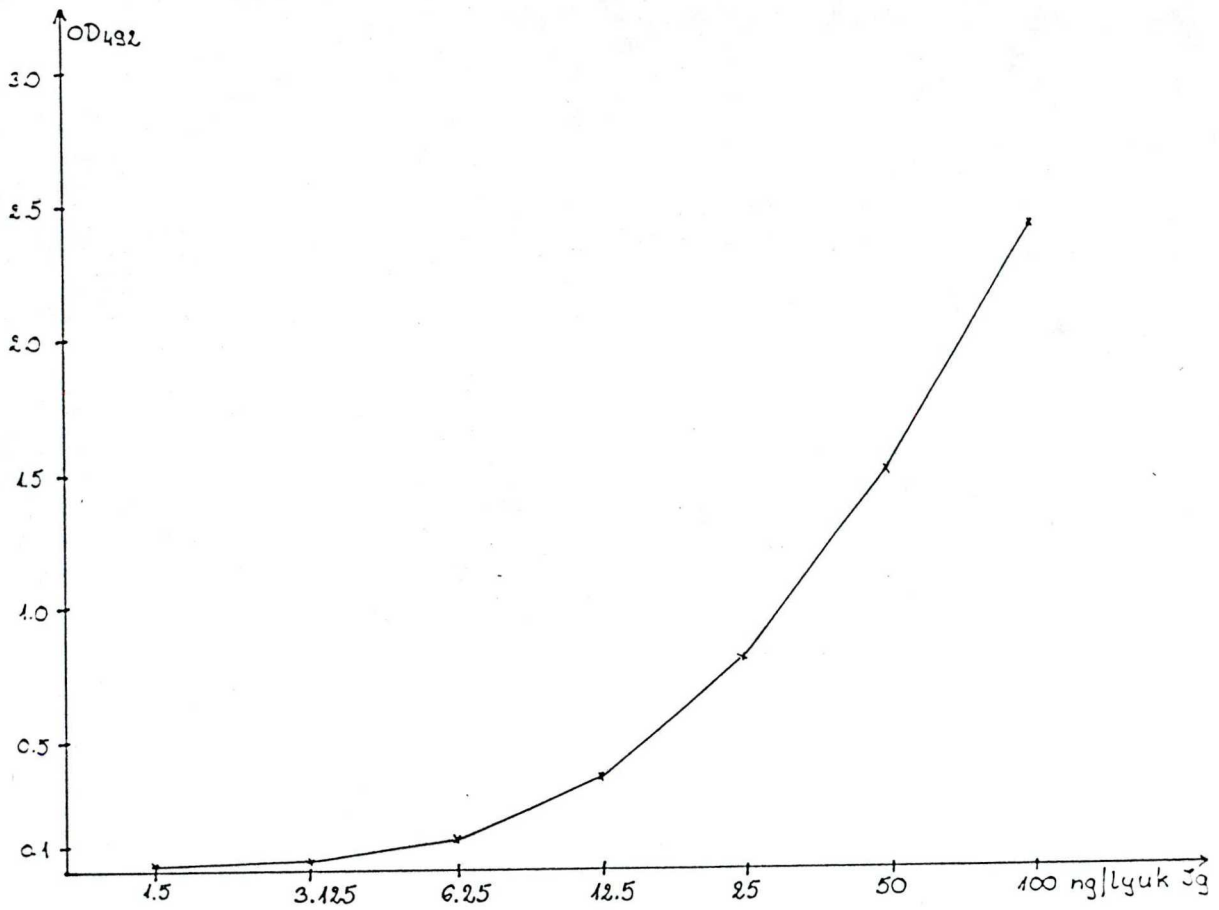
%-os összesítésben a 3. táblázatban részletezem az adatokat.

A táblázat adatai arra engednek következtetni, hogy a 100ng/mélyedésnél magasabb fehérje koncentráció (cc) még az 1-3 áthelyezésnél is főlegesen van az optimális kikötődéshez, míg a 10ng/lyuk alatti cc. már túl híg. Az optimum valahol a 10 és 50 ng között van.

A B-BSA adatai nagyon hasonlítanak a B-ellenanyagnál számítottakhoz, az 500ng itt is túl sok, a 250ng a határon van. Az optimum itt is 10 és 50 ng között van. Mindkét kísérletből egyértelmű azonban, hogy az optimumnál magasabb koncentráció esetén a szilárd és a folyadék fázis közötti egyensúly a folyadék fázis felé tolódik el, míg 10ng alatti koncentrációnál inkább a szilárd fázis felé.

2/b. Biotinilált BSA kimutatása immun-blotton biotinilált β -galaktozidáz/streptavidin komplex-szel:

A B- β -galaktozidáz enzimet elsősorban immunhisztokémiában ill. immun-blottok előhívására érdemes használni. ELISA-ban kicsit lassú a peroxidázhoz képest. Lassúbb szubsztrátbontása viszont a fent említett módszerekben előnyös, kisebb háttérrel eredményez. A 12. ábrán látható kísérletekben 100-3ng-ig felező hígításban B-BSA-val érzékenyítettük a nitrocellulóz filtert, telítettük, majd optimális β -galaktozidáz/streptavidin komplex-szel 1 órát inkubáltuk. A komplex hígítása 1:500x. A körök



9.ábra: B-nyúl Ig kimutathatósági határa 1 óra inkubációval

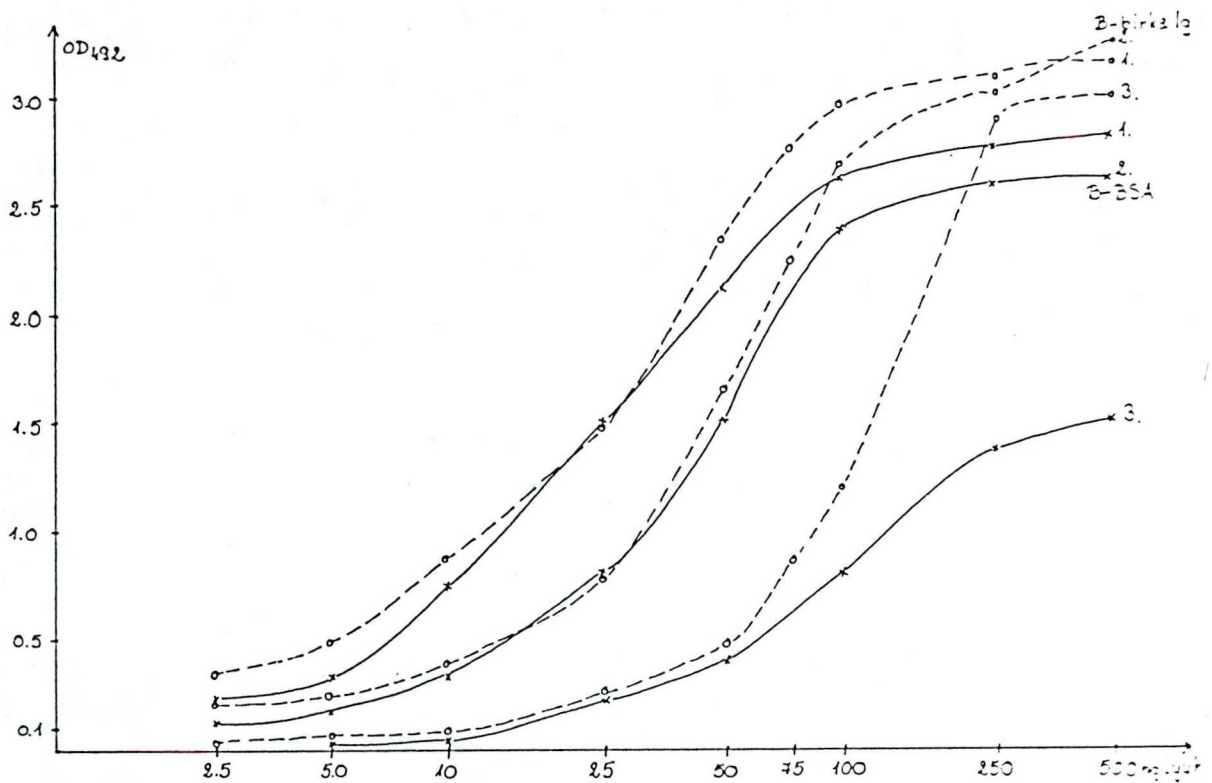
Érzékenyítés: 100-1.5ng/mélyedés immunglobulin

Telítés: 0.5% BSA

Előhívás: biotinilált peroxidáz/streptavidin komplex

2000x híg

Inkubációs idő: 1 óra



10.ábra: A szilárd fázishoz kikötődött B-fehérje mérése sorozat érzékenyítéssel

Érzékenyítés: 1. lemez, 500-2.5ng/mélyedés B-fehérje

2. lemez, az elsőről 1 óra múlva visszazívott oldatokkal

3. lemez, a másodikról 1 óra múlva visszazívott oldatokkal

Telítés: 0.5% BSA

Előhívás: biotinilált peroxidáz/streptavidin komplex

3.Táblázat

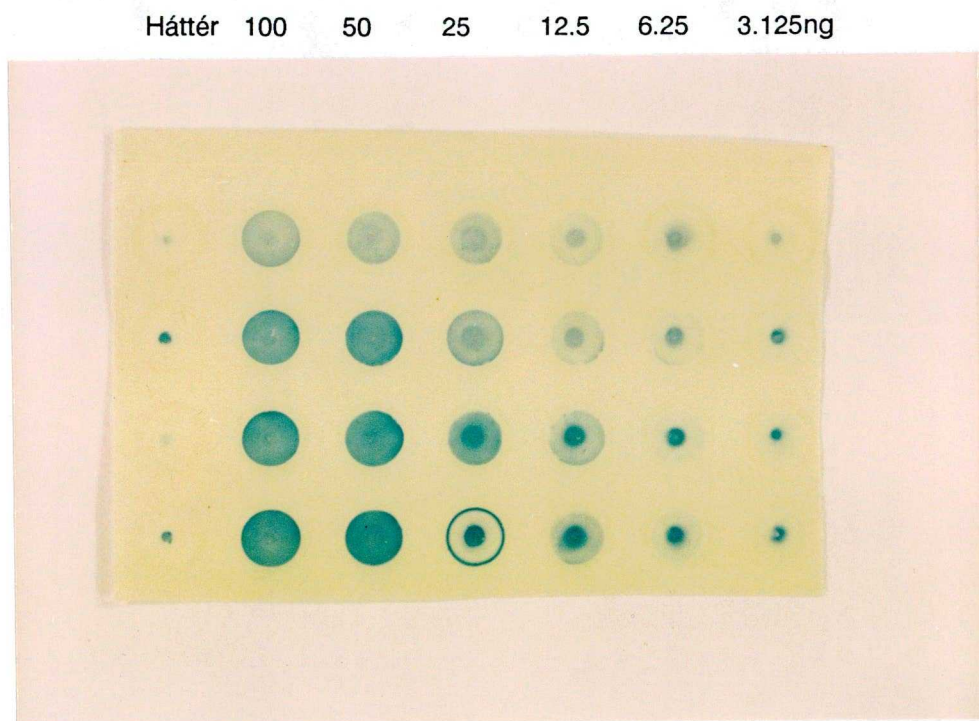
Biotinilált ellenanyag és BSA sorozat-hígításos kísérleteinek eredményei:

Biotinilált ellenanyag:

	ng/mélyedés							
	500	250	100	50	25	10	5	2.5
1.	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
2.	100%	98	91%	70%	53%	46%	47%	57%
3.	95%	95%	41%	21%	16%	11%	13%	14%

Biotinilált-BSA:

	ng/mélyedés							
	500	250	100	50	25	10	5	2.5
1.	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
2.	93%	94%	92%	71%	53%	45%	55%	56%
3.	54%	50%	31%	19%	15%	6%	9%	0%



12.ábra: Dot-blot teszt B-β-galaktozidáz/streptavidin komplex-szel

Érzékenyítve: 100-3.125ng/folt B-BSA

Telítés: 5% BSA

Előhívás: B-β-galaktozidáz/streptavidin komplex

500x híg

A körök közepén látható túszerű pont a Dot-blot készülék hibájából eredő háttér, mely a filter alá helyezett szűrőpapírral megszüntethető.

közepén látható pont a készülék hibájából eredő háttér, melyet a filter alá helyezett szűrőpapírral meg lehet szüntetni.

2/c. Hígítási kísérletek biotinilált peroxidáz/strept-avidin komplexel:

Hígítási kísérletekkel minősítettük a biotinilált peroxidáz/streptavidin komplex-et .A biotinilált-peroxidáz fehérjetartalma 0.95 mg/ml volt, a streptavidin optimum 0.6mg/ml. Biotinilált fehérjével érzékenyítettünk ELISA lemezeket, 50ng/mélyedés

A szabadon maradt kötőhelyek szokásos telítése után a komplex 1000-16000x felező hígításaival inkubáltunk 1 órán át 11.ábra. Az ábráról leolvasható, hogy ennek a komplexnek az optimális hígítása 2000-4000x. Az elérhető jelintenzitás természetesen függ a kísérleti rendszertől és az alkalmazott szubsztráttól ill. kromogéntől.

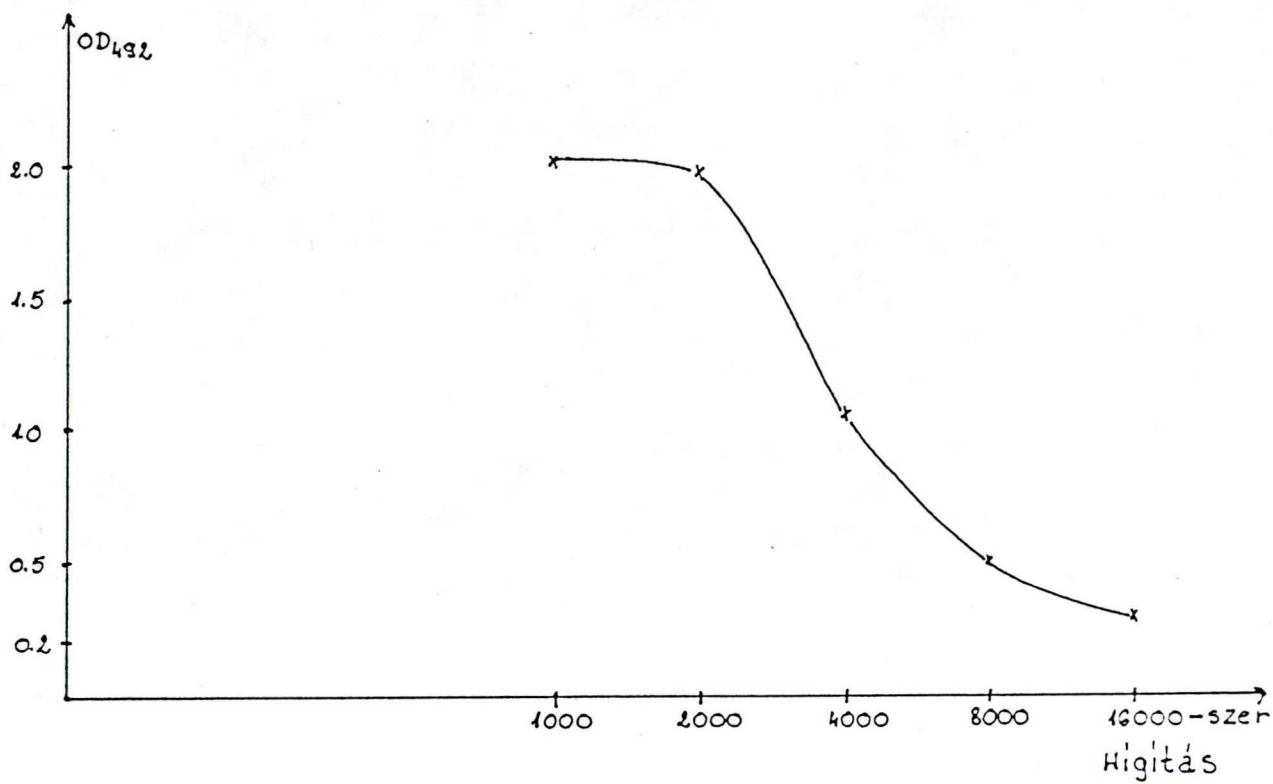
2/d Összehasonlító vizsgálatok az Amersham cég biotinilált termékeivel:

Összehasonlítottuk a saját biotinos előhívó rend-szerünket az Amersham cég forgalomban levő, hasonló termékeivel. Az Amersham cég termékei B-X-NHS aktív észterrel vannak jelölve.

A mikrotitrátor lemez mélyedését 5 μ g/ml szuperoxid-dizmutáz (SOD) enzimmel érzékenyítettük.

A szabadon maradt aspecifikus kötőhelyeket BSA-val telítettük. A lekötött enzimre az egérben termelt monoklonális anti-SOD Ig 1:500x hígítását tettük egy órára. Alapos mosás után az általunk készített, ill. az Amersham cég által forgalmazott B-anti-egér birka Ig azonos, felező léptékű hígításaival inkubáltuk 1 órát. Mosás után a megfelelő biotinilált peroxidáz/streptavidin komplex 500x-os hígításával szintén egy órát inkubáltunk. Háttérként az anti-SOD ellenanyagot nem tartalmazó, telített lyukakat használtuk. Pozitív kontrollként a jelöletlen anti-SOD után anti-egér nyúl Ig/peroxidáz konjugátum megfelelő hígításait használtuk (Dakopatts P260 Kat. no.).

Az azonos körülmények között végzett 12 párhuzamos kísérlet átlagolt adatai a 4.táblázatban szerepelnek.



11.ábra: Biotinilált peroxidáz/streptavidin komplex hígítási görbe

Érzékenyítés: B-BSA 50ng/mélyedés

Telítés: 0.5% BSA

Előhívás: Biotinilált peroxidáz/streptavidin komplex 1000-16000x híg

4.Táblázat

Összehasonlító vizsgálatok az Amersham cég és az általunk előállított biotinilált rendszerek között:

Jelölt Ig hígítások [ng/lyuk]	Biotinos rendszer		peroxidáz konjugátum
	saját	Amersham	Dakopatts
500	> 2.0	> 2.0	1.86
250	1.85	1.62	0.92
100	1.44	1.13	0.50
50	0.80	0.65	0.28
25	0.38	0.29	0.12

Az egyes mélyedések extinciója közötti szórás nem haladta meg a 6%-ot. A fenti értékek a háttér levonása után értendők (átlagban 0.01-0.05).

Mint a példaként említett kísérlet adataiból is kitűnik, a biotin-X-opfp-vel jelzett ellenanyag összehasonlítható érzékenységgű a biotin-N-hidroxiszukcinimid aktív észterrel jelölt, forgalomban kapható azonos típusú ellenanyaggal.

Ezek után a már folyamatban levő kísérletekre próbáltuk alkalmazni a fehérjék biotinos jelölését.

3. Alkalmazások:

3/a Kompetíciós vizsgálat ekdiszteroid kimutatására és mennyiségi meghatározására patkány vizeletből:

Irodalmi adatok szerint egyre több bizonyíték van arra, hogy az élősködő férgek fejlődésében is szerepe van a rovarok vedlési hormonjának a 20-OH ekdiszteroidnak (β -ekdizon) (Koolman, J. 1984; Nirde, P. 1984.).

A gazda állat vizeletében is megjelenő β -ekdizon, amennyiben az mérhető, a féregfertőzés diagnosztizálását tenné lehetővé, már a fertőzés korai stádiumában is. Mivel a gerincesek nem termelik ezt a hormont, a mért ekdiszteroid szint egyértelműen féregfertőzésre utalna.

Dr. Maróy Péter és Dr. Deák Péter (SZBK Genetika Int.) RIA (Radio Immuno Assay) mérési módszert dolgozott ki fertőzött állatok vérének és vizeletének tesztelésére.

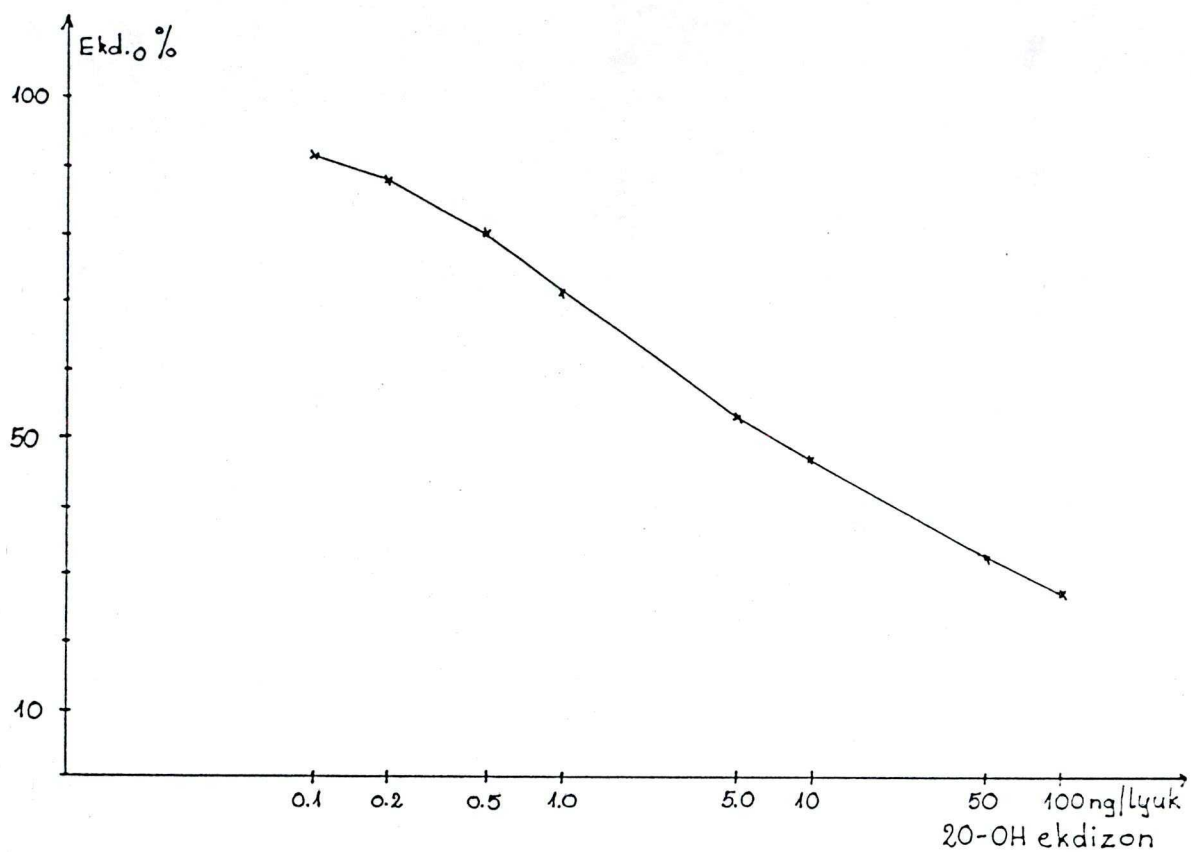
Ekdiszteroidok ellen nyúlban termelt ellenanyag megfelelő hígításait 3000cpm $^3\text{H}\beta$ -ekdizonnal és a kalibrációs görbe hígításainak megfelelő mennyiségű hideg β -ekdizonnal inkubálták, majd a kötött ill. szabad β -ekdizont ammónium-szulfátos kicsapással választották el. 0.1 és 3.0ng közötti értékekre lineáris kalibrációs görbét kaptak. Hagyományos parazitológiai módszerekkel fertőzöttnek talált állatok vérének tesztelve 11 és 54 ng/ml ekdiszteroidot tudtak kimutatni, míg a nem fertőzött állatok 0.5-6ng/ml-es háttérrel adtak. 38 esetet vizsgáltak meg, ebből 7 esetben a hormonszint alacsony volt, míg 6 esetben nem lehetett férget vagy petét kimutatni a hagyományos módszerekkel, bár az ekdiszteroid szint magas volt. Az esetek mintegy 36%-ában bizonyult hibásnak a mérés, ami a minták előtisztítását teszi szükségessé ennél a módszernél.

Részben ezért, részben pedig az izotópos vizsgálat helyettesítésére megpróbáltuk a módszert ELISA-ra alkalmazni. Ugyanazt a poliklonális anti-ekdiszteroid nyúl szérumot használtuk, ill. a lemezek érzékenyítésére BSA-hoz konjugált β -ekdizon-oximot. A BSA molekula 23 β -ekdizon-oximot tartalmazott. Ismert koncentrációjú β -ekdizon oldattal kalibrációs görbét készítettünk kompetíciós ELISA-ban. A lemezt 16ng/mélyedés BSA-hoz kötött β -ekdizon-oximmal érzékenyítettük, majd BSA-val blokkoltuk a szabadon maradt kötőhelyeket. Az anti-ekdiszteroid poliklonális nyúlserumot 4000-szeresére hígítottuk a 0.1% BSA tartalmú PBS pH:7.2 pufferben, majd a β -ekdizon hígítási sorozatával együtt 50-50 μ -t mértünk a mélyedésekbe. Egy órás inkubáció után alaposan mostuk a lemezt, és biotinilált anti-nyúl kecske Ig-nal inkubáltuk tovább. Biotinilált peroxidáz/streptavidin komplexet használtunk a reakció erősítésére. Az adatokat a kompetítort nem tartalmazó minták %-ában ábrázoltuk a 13. ábrán.

Mivel a kalibrációs görbe elég érzékenynek bizonyult, a továbbiakban féreggel mesterségesen fertőzött patkányok vizeletét teszteltük. Öt hím patkányt fertőztünk subcután *Nippostrongylus brasiliensis* petével, 2000 pete/állat. A 0-4-7-11-14 ill. 18. napon vizeletet gyűjtöttünk és a hagyományos módon számoltuk 1 gramm ürülékben a peteszámot. A 18.napon a leölt állatokban megszámoltuk a talált férgeket. Két esetben, a 2. és a 4. állatban 26 ill. 2 *Aspicularis tetraptera* nevű férget is találtunk, valószínűleg spontán fertőzés következtében.

A vizsgálatig a vizeletet 60% MeOH-ban lefagyasztva tároltuk, s közvetlenül a mérés előtt az alkoholt bepárlással távolítottuk el. Más előkezelést nem végeztünk. Minden méréssorozathoz készítettünk kalibrációs görbét, s 50 μ vizeletmintát vizsgáltunk. Az eredményeket a 5.táblázat tartalmazza.

Igen kevés mintával rendelkezünk, és annak is nagy része elfogyott az előzetes RIA vizsgálatok során. Ezért a 3. állat vizelet mintáját már nem is tudtuk mérni ELISA-ban, s a többi mintából is csak egy-egy vizsgálatot tudunk elvégezni. Ennek ellenére az eredmények biztatóak. A 4.napon három állatnál jelentős ekdiszteroid szint növekedést lehetett kimutatni, ami megfelel a 7.napon mért nagy peteszámnak. Ezek szerint a beoltott 2000 pete közül körülbelül 20-80 érte el az ivarérettséget, ha állatonként átlag 100 petét számolunk.



13.ábra: β -ekdizon kalibrációs görbe

Érzékenyítés: 50ng/mélyedés BSA-oxim- β -ekdizon konjugátummal

Telítés: 0.5% BSA

Kompetíció: 50 l 4000x híg anti-ekdiszteroid nyúl szérum

50 l ismert mennyiségű β -ekdizon

2.ellenanyag: B-anti-nyúl kecske Ig 1000x híg

Előhívás: biotinilált peroxidáz/streptavidin komplex 1000x híg

Az adatokat a komptírt nem tartalmazó minták százalékában ábrázoltam.

5.Táblázat

Féregfertőzött patkányok kísérleti adatai:

Fertőzés utáni napok										
Állat	4		7		11		14		18	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
1	50	0	40	8580	0	99	66	0	55	0
2	4920	0	780	8646	0	0	0	0	0	0
4	980	0	0	2871	0	0	0	0	0	0
5	5000	0	47	4059		330		132		32

A: mért ekdiszteroid (ng/ml)

B: 1g székletben számolt pete

A 18. napon az állatok közül az elsőben és az ötödikben találtak Nippostrongylus férget, [11 ill. 2]. Két esetben, a 2. és a 4. állatban [26 ill. 2] Aspicularis tetraaptera nevű férget is találtak, valószínűleg spontán fertőzés következtében. Ennél a két állatnál már a "0" napos mintában is viszonylag magas ekdiszteroid szintet mértünk (80-100ng/ml). A többi állatnál ez a háttér 10ng/ml alatt volt. A táblázat adatai a háttér érték levonása után értendők.

Részben a poliklonális antiszérummal előforduló esetleges keresztreakció miatt (szteroid anyagcsere termékek), részben pedig azért, mert a vizelet töménysége a különböző napokon feltehetően nem egyenletes, még további vizsgálatokra van szükség.

3/b. Kompetíciós vizsgálatok össz-tesztoszteron mennyiségi meghatározására humán szérumból:

A feladat egy olyan tesztrendszer kifejlesztése, mely humán vérből 0.3-30ng/ml tartományban össz-tesztoszteron szintet mér.

A teszt összeállítására vonatkozóan több elképzelés is volt, de itt is a kompetíciós ELISA vizsgálati módszert találtuk a legmegfelelőbbnek. A lemezek érzékenyítésére BSA-hoz konjugált Tesztoszteron-3-karboxi-metil-oximot (T-3CMO) használtunk. Az anti-tesztoszteron poliklonális nyúlszérumot a POTE-en állították elő, Dr.Csernus Valér laboratóriumában. A lekötött antigén és antitest optimális hígítását kettőshígításos kísérletben választottuk ki.

100-75-50-25ng/mélyedés T-3CMO-al érzékenyítettük a lemezt, majd 1000-2000-4000-8000 és 16000x hígított anti-tesztoszteron szérummal inkubáltuk 6.táblázat.

Optimálisnak a 25ng lekötött antigént és a 4000x-es ellenanyag hígítást találtuk. Ennél a hígításnál a legnagyobb az 50 és 25ng lekötött T-3CMO-hoz való affinitás különbsége, a görbe meredeksége, 14.ábra. Ugyanakkor az OD₄₉₂ érték is még megfelelő.

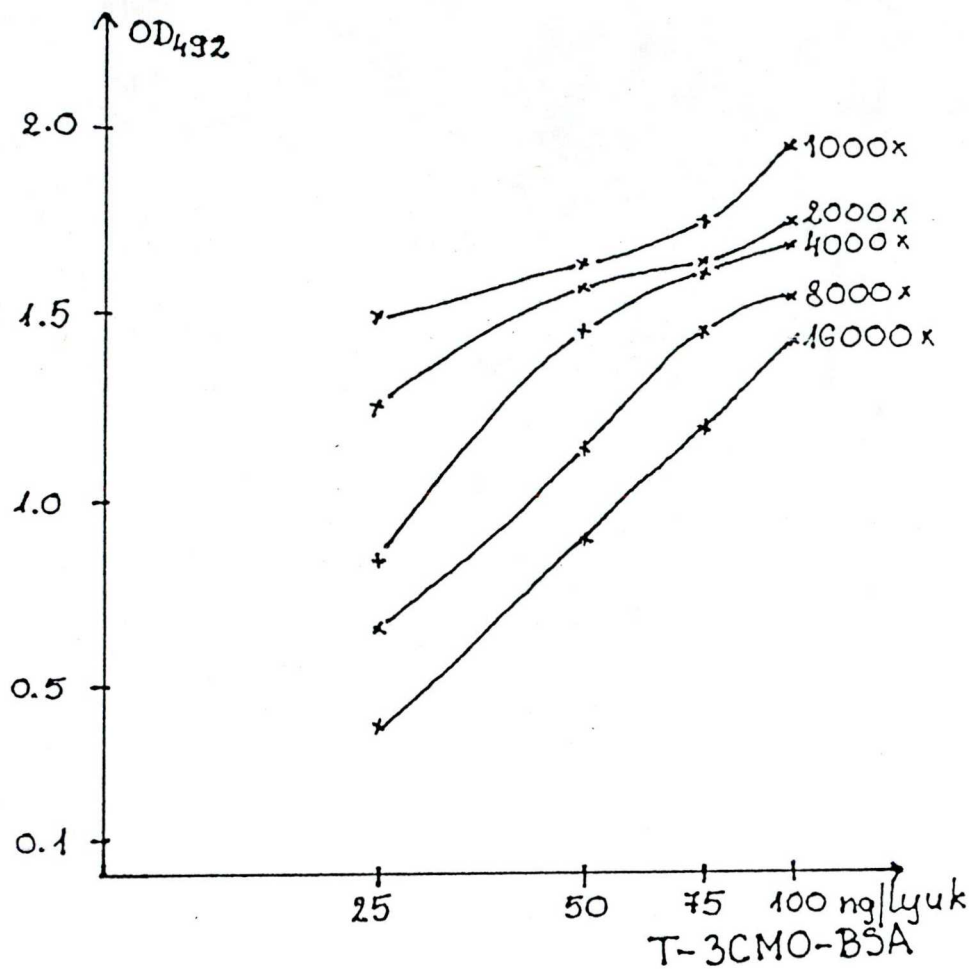
Ezekkel az alap paraméterekkel összeállítottuk a kompetíciós kalibrációs görbét. Az érzékenyített és telített lemezre 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 10, 20, 30ng/ml tesztoszteron törzsoldat 50-50 μ l-ét mértük, majd erre rá az anti-tesztoszteron 2000x-es hígításából 50 μ l-t. 37°C-on 2 órát inkubáltuk. A reakciót kétféleképpen hívtuk elő. Egyrészt a BioRad cég peroxidázzal konjugált anti-nyúl kecske immunglobulinjával, másrészt az általunk előállított biotinilált anti-nyúl birka immunglobulin és biotinilált peroxidáz/streptavidin komplex-szel 15.ábra. Amint az ábráról is egyértelmű, a közvetlen konjugátum alkalmazása esetén sokkal kevésbé meredek görbét kapunk, ami kisebb érzékenységnek felel meg. A biotinilált reagensekkel előhívva a teszt ugyan 1 órával hosszabb ideig tart, de sokkal érzékenyebb. A 15.ábrán feltüntetett 6, egymástól független görbe adatait a 7.táblázatban részletezem.

6.Táblázat

Antigén/ellenanyag optimális arány megállapítása:

		Ellenanyag hígítás				
		1000	2000	4000	8000	16000
100	1.93	1.73	1.68	1.53	1.42	
75	1.75	1.62	1.59	1.44	1.18	
50	1.62	1.56	1.44	1.12	0.90	
25	1.48	1.25	0.82	0.65	0.39	

A baloldali oszlopban az antigén (T-3-CMO-BSA) ng/mélyedés-ben kifejezett adatai vannak feltüntetve.



14.ábra: Tesztoszteron teszt, antigén-antitest hígítás optimalizálása

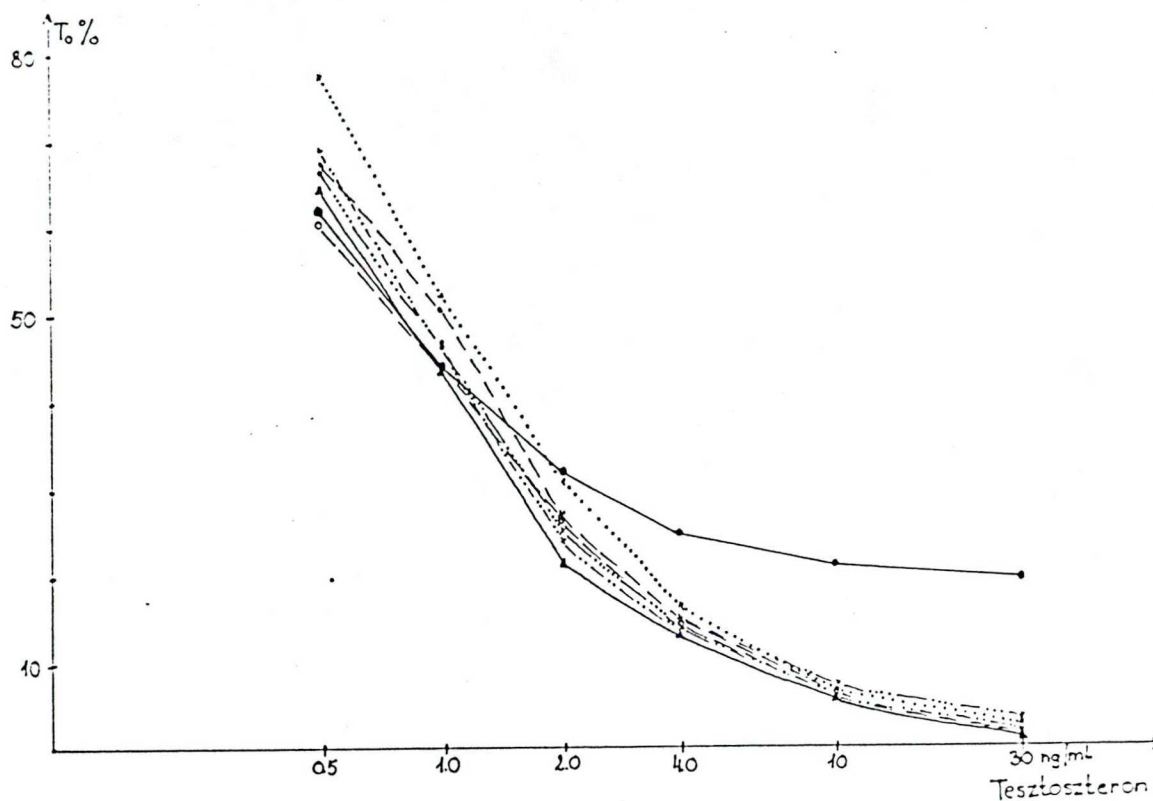
Érzékenyítés: 100-25ng/mélyedés T-3CMO-BSA

Telítés: 0.5% BSAAnti-ekdiszteroid szérum hígítás: 1000-16000x

2. ellenanyag: B-anti-nyúl birka Ig 1000x

Előhívás: biotinilált peroxidáz/streptavidin komplex

1000x híg



15.ábra: *Ellenanyag/peroxidáz konjugátum és biotinilált peroxidáz/streptavidin komplex összehasonlítása a Tesztoszteron tesztben*

Érzékenyítés: 25ng/mélyedés T-3CMO-BSA

Telítés: 0.5% BSA

Kompetíció: 50 l anti-tesztoszteron
50 l tesztoszteron, 30-0.5ng/ml

2.ellenanyag: 1, anti-nyúl birka/peroxidáz konjugátum 1000x híg, (BioRad)
2, B-anti-nyúl birka Ig 1000x híg

Előhívás: biotinilált peroxidáz/streptavidin komplex-el ill. közvetlenül

7.Táblázat

Tesztoszteron teszt, pufferes kalibrációval:

		ng/ml						
		30	10	4	2	1	0.5	"0"
1	OD	0.035	0.070	0.167	0.275	0.560	0.822	1.285
	SD	0.006	0.008	0.012	0.029	0.051	0.067	0.058
	T%	2.7	5.4	13	21.4	43.5	64	100
2	OD	0.043	0.092	0.180	0.340	0.622	0.862	1.433
	SD	0.010	0.005	0.014	0.034	0.031	0.012	0.023
	T%	2.9	6.4	12.5	23.7	43.5	60.2	100
3	OD	0.032	0.077	0.178	0.323	0.599	0.830	1.290
	SD	0.009	0.017	0.062	0.037	0.055	0.097	0.189
	T%	2.5	5.9	13.8	25.1	46.5	64.5	100
4	OD	0.060	0.120	0.255	0.457	0.855	1.145	1.693
	SD	0.008	0.008	0.021	0.022	0.061	0.019	0.033
	T%	3.5	7.0	15.0	27.0	50.5	67.6	100
5	OD	0.020	0.070	0.185	0.340	0.675	1.015	1.470
	SD	0.009	0.014	0.017	0.016	0.021	0.031	0.016
	T%	1.5	4.7	12.6	23.1	45.9	69	100
6	OD	0.020	0.070	0.180	0.335	0.575	0.877	1.320
	SD	0.005	0.012	0.014	0.024	0.031	0.035	0.033
	T%	1.7	5.7	13.6	25.4	43.5	66.5	100

A kalibrációs görbe tesztelésére úgynevezett vissza-mérési kísérletet végeztünk. Aktív szénnel hormon-mentesített humán szérumban 1ng/ml tesztoszteront oldottunk, majd éterrel visszaextraháltuk. 1ml szérumot 6ml éterrel 1 percig vortexeltünk, majd a vizes fázist -20°C-on lefagyasztottuk. A felső, éteres fázist leöntöttük, majd áramló N₂ gáz alatt beszárítottuk. Az eredetivel megegyező térfogatú PBS pH:7.2 pufferben visszaoldottuk, majd 50-50 μ -eket teszteltünk. A kompetíciós lépés inkubációs idejét 1, 3, 6, 9 és 21 órára változtattuk, majd a biotinilált reagensekkel előhívtuk. Az eredményeket a 8.táblázatban részletezem.

Az eredmények alapján 21 órás inkubáció szükséges ahhoz, hogy a bemért 1mg/ml tesztoszteront 90%-ban vissza tudjuk mérni. A tesztoszteron teszt kifejlesztéséhez természetesen számos kontroll kísérlet szükséges még, de az eredmények azt mutatják, hogy ez a rendszer használható hormonszint meghatározására.

3/c. Biotinilált molsúly (MS) markerek alkalmazása Western-blott analízisben:

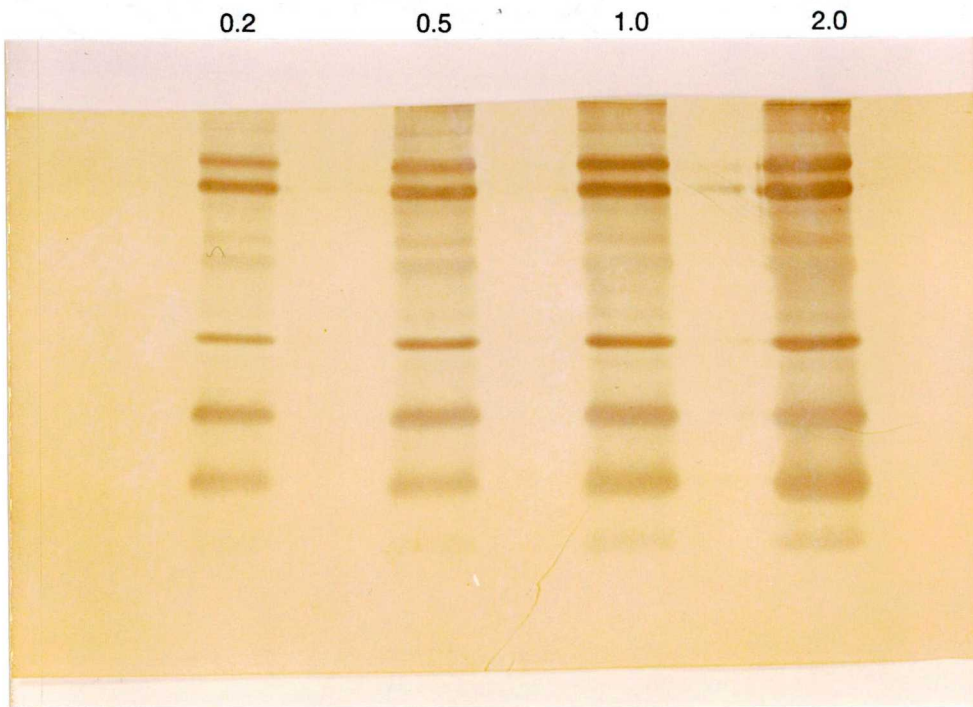
A Pharmacia cég MS marker kit-jét (Kat. szám: 17-0446-01) biotiniláltuk, SDS gélen megfuttattuk, s nitrocellulóz filterre átblottoltuk. 5%-os BSA oldattal telítettük, majd biotinilált peroxidáz /streptavidin komplexszel előhívtuk. Szubsztrátként H₂O₂-ot és egy vízben nem oldódó csapadékot adó kromogént választottunk, a 4-kloro-1-naftolt 16.ábra. A filteren 4 különböző mennyiségben [2, 1, 0.5, 0.25 μ g/minta] megfuttatott MS marker sorozatot látunk. Az 5 erős és az alsó halvány csík jelzik az eredeti markereket. A közbülső csíkok pedig azt, hogy a MS marker kit a föltüntetteken kívül számos egyéb szennyező fehérjét is tartalmaz. Ezek viszont a hagyományos amidofekete festéssel, -amelyet a Western blot MS markereinek megfestésére használnak-, nem láthatók. A módszer előnye a nagy érzékenységen túl, hogy a vizsgált mintával együtt hívható elő a Western-blott során, nem igényel külön kezelést. Az amidofekete festéskor a MS markereket tartalmazó csíkot le kell vágni az immunreagensekkel előhívott részről, s külön kell megfesteni. Ennek során a NC filter változtatja a méretét, ami a molsúly pontos meghatározását nehezíti.



8.Táblázat

	Idő [óra]				
	1	3	6	9	21
1	0.55	0.57	0.60	0.68	0.88
2	0.50	0.56	0.62	0.71	0.90
3	0.53	0.59	0.63	0.72	0.92

Az adatokat ng/ml-ben adtuk meg.



16.ábra: Fehérje MS markerek biotinilálása

Érzékenyítés: 2-1-0.5-0.2 μ g biotinilált fehérje keverék /minta

Telítés: 3% BSA

Előhívás: biotinilált peroxidáz/streptavidin komplex 1000x híg

Kromogén: 4CN

MS fehérjék főntről lefelé: Foszforiláz-B, BSA, Ovalbumin, Karbonik anhidráz, Szójatripszin inhibítor, Laktalbumin.

3/d. Biotinilált DNS kimutatása dot-blot analízissel, biotinilált alkalikus foszfatáz/streptavidin komplex-szel:

A biotiniláló reagens alkalmazhatóságának bizonyítására egy, az eddiektől eltérő alkalmazást is szeretnénk bemutatni. A 17.ábrán egy DNS dot-blott látható. 40ng, 4ng, 400pg, 40pg, 4pg, biotinilált, ill nem biotinilált DNS (pBR322 plazmid) van a foltokban a NC filterre kötve. A DNS-t 80°C-on, vákumban 2 órán át sütöttük, 5% BSA oldatban telítettük, majd biotinilált alkalikus foszfatáz/streptavidin komplex-szel előhívtuk. A komplex-szel 10 percig inkubáltuk, majd α -naftil foszfáttal és Fast Blue-val előhívtuk. Az alkalikus foszfatáz biotinilálását dolgozatomban nem részletezem, mert optimalizálása még folyamatban van.

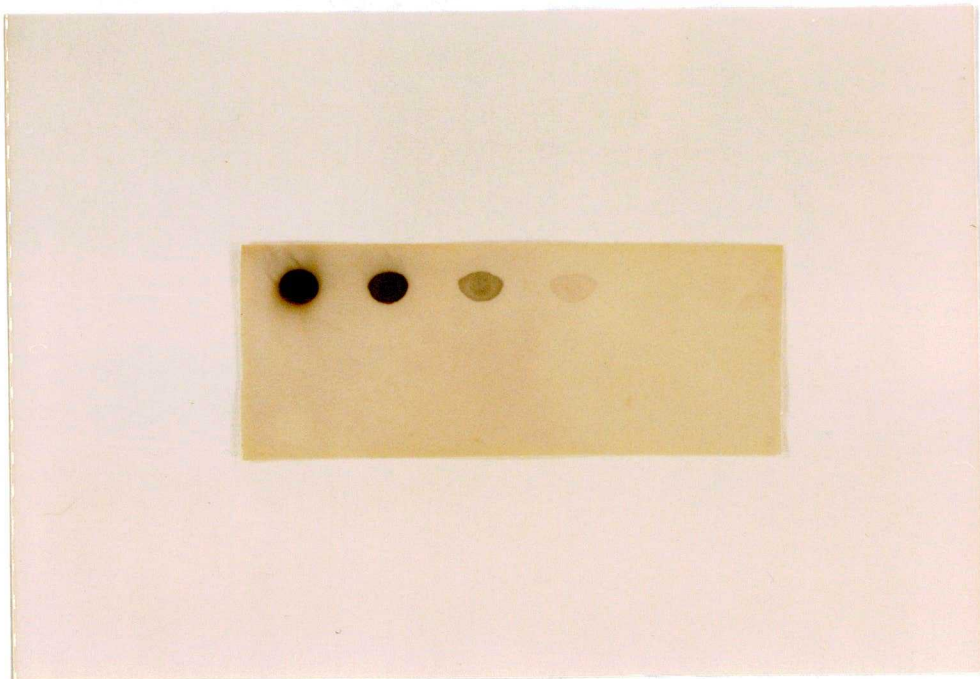
A DNS-t egy, az előzőtől eltérő biotiniláló reaggessel jelöltük. A reagens optimalizálása még szintén nem fejeződött be.

3/e. Immunhisztokémiai metszet festése biotinilált másodlagos ellenanyaggal és biotinilált peroxidáz/strept-avidin komplex-szel:

A 18.ábrán látható képet Dr.Szekeres György (POTE Patológiai Int.) bocsájtotta rendelkezésemre annak igazolásául, hogy a vizsgált biotiniláló rendszer hisztokémiai metszetek előhívására is alkalmas.

A képen egy emberi daganatsejt csoportot látunk, melynek citoplazmájában az 55-57Kd citokeratin intermedier filamentumok vannak megfestve.

A reakciót anti-citokeratin monoklonális ellenanyaggal (KL-1, IMMUNOTECH) és a biotinilált másodlagos előhívó rendszerrel tették láthatóvá.



17.ábra: *Biotinilált DNS előhívása B-alkalikus foszfatáz/streptavidin komplexel*

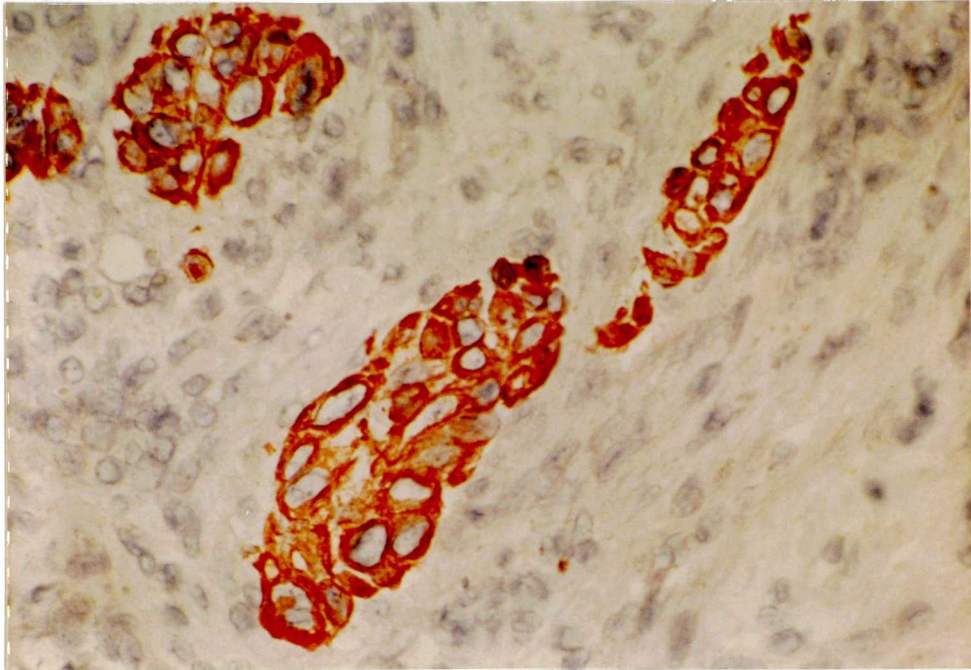
Érzékenyítés: 40-4pg/folt B-pBR322 DNS

Fixálás: 80°C-on

Telítés: 5% BSA

Előhívás: B-alkalikus foszfatáz/streptavidin komplexel

Kromogén: -naftil foszfát és Fast blue



18.ábra: *Citokeratin intermediér filamentum festése a biotinilált másodlagos előhívó rendszerrel:*

Monoklonális ellenanyag: anti-citokeratin egér Ig

Másodlagos ellenanyag: biotinilált anti-egér nyúl Ig

Előhívás: biotinilált peroxidáz/streptavidin komplex

Színreakció: 3AEC és H_2O_2

hematoxilin magfestés

Nagyítás: 200x

VI. Megvitatás

A bemutatott kísérletek alapján elmondhatjuk, hogy a biotin-X-opfp lúgos pH tartományban, 2 órás, szobahőn történő inkubáció során igen jó hatásfokkal kovalensen kötődik a vizsgált fehérje molekulákhoz. Az enzimaktivással nem rendelkező fehérjék esetében a felkötődött biotin molekulák egy telítési görbe mentén növelik a jelölt fehérje kimutathatóságát. A fehérje:biotin MS arány a fehérje tömegével exponenciális arányban nő. BSA esetében 1:25, míg egy 3x nagyobb ellenanyag molekula esetében 1:150.

Optimális körülmények között egy nyúl immunglobulinra ténylegesen felkötődött biotin-X-opfp molekulák száma 82-83. A Calbiochem cég által forgalmazott biotinilált kecske immunglobulinra nézve ez a szám 52, B-X-NHS-el jelölve (Kat.szám:401903; 401213; 401313).

Mivel egyik fehérje esetében sem ismerjük azoknak a szabad aminos csoportot hordozó aminosavaknak a számát, amelyek felszíni helyzetüknél fogva alkalmasak a biotin-X-opfp molekulával reagálni, az említett fehérje:biotin arányok csak gyakorlati jelentőségűek, messzemenő következtetések nem vonhatók le belőle.

Enzimek esetében a biotin molekulák károsan befolyásolják az enzimaktivitást azáltal, hogy az aktív centrum környékéhez kötődve gátolják a szubsztrát kötését, vagy a létrehozott igen erős kovalens kötések megváltoztatják a molekula flexibilitását. Mindezeket a káros hatásokat azonban el lehet kerülni az optimális fehérje:biotin MS arány gondos megválasztásával.

Peroxidáz enzim esetében az 1:25 fehérje:biotin-X-opfp arány bizonyult optimálisnak, míg β -galaktozidáz enzimnél az 1:460. A peroxidáz igen érzékenyen reagál az optimumot meghaladó biotin molekulák számára. 1:50-es arány mellett jelölve (ez az optimum kétszerese) pl. aktivitásának 60%-át elveszíti. A galaktozidáz enzim sokkal rugalmasabb, kétszeres mennyiségű biotinnal jelölve is csak 20%-os aktivitás csökkenést mutat. Ez a nagyobb stabilitás érzékelhető akkor is, mikor a jelölt és jelöletlen molekulák enzimaktivitását hasonlítjuk össze. Peroxidáz esetében az optimális körülmények közötti jelölés is az eredetihez képest 18%-kal csökkenti az aktivitást. A β -galaktozidáznál ez az aktivitás csökkenés csak 7%-os.

Természetesen a streptavidin vagy avidinnel komplexet képezve ez a veszteség többszörösen megtérül mindkét esetben. Egy-egy komplexben több enzim molekula kapcsolódik össze a streptavidin hídon keresztül egymással, többszörösére emelve így az egyes molekulák aktivitását. Ebben az aktivitás sokszorozásban viszont a kisebb peroxidáz molekula van előnyösebb helyzetben kisebb molekulatömege miatt.

Könnyű belátni, hogy ha a komplex mérete túl nagy, kicsi az esélye a szilárd fázishoz kötött biotin molekulákhoz való jutásban. Másrészt két azonos átmérőjű komplex közül annak az aktivitása nagyobb, amelyet több, kisebb méretű enzim alkot. Tapasztalataink is azt mutatják, hogy a biotinilált peroxidáz/streptavidin komplex még igen nagy hígításban is jól használható mind ELISA, mind Western-blot, vagy akár hisztokémiai metszetek előhívására is. ELISA-ban és NC filteren gyakorlatilag háttérmentes jelet lehet vele elérni. Hisztokémiában is elsősorban az ellenanyagok tisztasága a kritérium, másrészt az előforduló szöveti enzimaktivitás gátlása.

A B-fehérje MS markerek esete is jól bizonyítja, hogy a biotinilálással olyan mértékű érzékenység növekedés érhető el, mely más módszerekhez viszonyítva a háttérrel is jelentősen növeli. Olyan kis mennyiségű szennyeződések is láthatóvá válnak, amelyek egyéb ismert módszerekkel nem mutathatók ki. Ez természetesen egyben az előnyét is jelenti a módszernek.

Sok esetben hasznos lehet a jelölődés idejének csökkenése is. Egyes irodalmi adatok szerint a B-X-NHS reaggenssel optimálisan 4 óra az inkubációs idő. A mi méréseink szerint a biotin-X-opfp molekula már 2 órás inkubáció alatt maximális jelöltséget ad. Ez különösen fontos olyan érzékeny fehérje molekulák, pl. enzimek jelölése esetén, melyek hűtőtárolást igényelnek, s a szobahőmérsékleten történő hosszú inkubáció károsítja a szerkezetüket, ezzel együtt az aktivitásukat.

A titrálási görbék bemutatásával érzékeltetem magának a jelölt fehérjének a kimutathatóságát, érzékenységét. Természetesen mind a biotinilált ellenanyagot, mind a biotinilált peroxidáz /streptavidin komplexet egy adott feladat megoldásával kell minősíteni.

Az Amersham cég azonos termékeivel történt összehasonlításakor egy direkt ELISA típusú tesztet végeztünk. Ebben a kísérletben a mi reagenseink titere, ha $OD_{492}=1.0$ -el számolunk $\approx 2600\times$ -os hígításnak felel meg, míg az Amersham cégé $1700\times$ -os hígítással egyenértékű ami mintegy 40%-os különbségnek felel meg a biotin-X-opfp javára.

Két kompetíciós teszt kalibrációs görbét is lemutattam az előző fejezetben. Mindkét esetben egy igen érzékeny görbét sikerült felállítanunk a biotinilált másodlagos ellenanyag használatával. A tesztoszteron esetében adatokkal is alátámasztottuk a biotinilálás érzékenység növelő hatását. Mindkét esetben tovább folytatódik az tesztek vizsgálata, de a további adatok nem a biotin-X-opfp alkalmazhatóságát, inkább a specifikus ellenanyagot minősítik, ezért nem részleteztem azokat.

VII.Összefoglalás

Összefoglalva elmondhatjuk, hogy a felsorakoztatott adatok alátámasztják azt a feltevésünket, hogy a biotin-X-opfp molekulával kíméletes körülmények között, rövid reakció idő alatt jó hatásfokkal jelölhetők különböző fehérjék. A jelölés optimális körülményeinek betartása a minimálisra csökkenti a fehérjék reakció közbeni károsodását. A különböző biotin-X-opfp-vel jelölt fehérjék alkalmasak immunológiai tesztrendszerek összeállítására, a valutáért beszerezhető hasonló termékek helyettesítésére.

VIII.Irodalomjegyzék

- Becker, J.M. and M.Wilchek (1972)
Biochim.Biophys.Acta. 264, 165
- Björck, L. and G.Kronvall, (1984) J.Immunol. 133, 969.
- Björk, I., B.A.Petersson and J.Sjöquist, (1972)
Eur.J.Biochem. 29, 539.
- Bradford, M., (1976) Anal.Biochem., 72, 248
- Costello, S.M., R.T.Felix and R.W.Giese, (1979)
Clin.Chem. 25, 1572
- Dunale, E.L., A.H.Larsen, and E.O.Stapley (1955)
- Forsgreen, A., J.Sjöquist, (1966) J.Immunol. 97, 822.
- Frankel-Conrat, H., N.S.Snell and E.D.Ducay, (1952)
Arch.Biochem.Biophys. 39, 80.
- Gershoni, J.M.G., G.E.Pwade, (1983)
Anal Biochem 131, 1.
- Gold, A.P. and P.Balding, (1975) Receptor-specific
proteins, plant and animal lectins. 440pp. American
Elsevier, New York.
- Goldstein, I.J. and C.E.Hayes, (1978)
Adv.Carbohydr.Chem.Biochem. 35, 127.
- Green, N.M. (1965) Biochem J. 94, 23.
- Green, N.M., (1963) Biochem.J. 89, 606.
- Green, N.M., (1971) Biochem.J. 125, 781.
- Green, N.M., (1975) Adv.Prot.Chem. 29, 85.
- Green, N.M., and E.J.Toms, (1970) Biochem.J. 118, 67.
- György, P., C.S.Rose and Tomarelli, R. (1942)
J.Biol.Chem. 144, 169.
- Heggeness, M.H. and J.F.Ash, (1977) J.Cell Biol. 73, 783
- Heitzmann, H. and F.M.Richards (1974) PNAS 71, 3537
- Hofmann, K., S.W. Wood, et. all (1980) Proc.Natl.
Acad.Sci. USA 77, 4666.
- Ishikawa, E., et.all., (1978) In. Enzyme-labelled
Immunoassay and Drugs (S.B.Pal, ed.).p.43. Walter de
Gruyter, Berlin.
- Jasiewicz, M.L., D.R.Schoenberg, and G.C.Mueller, (1976)
Exp.Cell.Res. 100, 213.

- Koolman,A., J.J.Walker, Ecdysteroids in Helminths,
pp.323-330 IN: Biosynthesis, metabolism and mode of action of invertebrate
hormones (Hoffmann,J. and M.Porchet, eds.) Springer-Verlag, Heidelberg
(1984)
- Koolmann,J., Mayor Helminths Infections of Man Detected by Ecdysteroid RIA.
Ecdysteroid Workshop Abstract (1985)
- Kronvall,G. (1973) J.Immunol. 111, 1401.
- Kronwall,G., U.S. Seal, S.Svensson, and R.C.Williams,
(1974) Acta Phatal.Microbiol.Scand. B 82, 12.
- Kurstak,E. et. all., (1975)
Ann. New York Acad. Sci. 254, 369
- Langone,J.J. (1982) Adv.Immunol. 32, 157.
- Leary,J.J., D.J.Brigati and D.C.Ward, (1983)
Proc.Natl.Acad.Sci. USA 80, 4045.
- Lindmark,R., J.Moritz and J.Sjöquist,(1977)
Eur.J.Biochem. 74, 623.
- Morris,R.E. and C.B.Saelinger, (1982)
J.Immunol.Methods 49, 237.
Mycologia 47, 420
- Nakane,P.K. and A.Kawaoi, (1974)
J.Histochem.Cytochem. 22, 1084.
- Nirde,P. et.all., (1984) FEBS Lett. 168, 235.
- Rooth,J., M.Benclayan and L.Orci, (1978)
J.Histochem.Cytochem 26, 1074
- Sandor,M. and J.J.Langone, (1981)
Biochem.Biophys.Res.Communic. 100, 1326.
- Towbin,H., T.Staehelin, J.Gordon, (1979)
PNAS 76, 4350.
- Wilson,M.B. and P.K.Nakane, (1978) In: Immunofluorescence
and Related Techniques (W.Knapp, H.Holubar and
G.Wick, eds.).p.215. Elsevier/North-Holland,
Amsterdam.

A dolgozat tárgyában megjelent közlemények:

Dr. Somlai Csaba, Dr. Maróy Péter, Berényi Mária, Dr. Németh Péter,
Dr. Vajda András; *Eljárás a biotin-pentafluor fenol származékainak*
előállítására: OTH száma: 2251-982/86, Lajstrom száma: 198057.

Berényi Mária, Somlai Csaba, Perei Katalin, Gyuris Tibor; *Új biotiniláló*
rendszer bevezetése az immundiagnosztikába: Magyar Immunológiai
Társaság XVIII. Vándorgyűlése, Kecskemét, 1988. Összefoglaló.

IX. Köszönetnyilvánítás:

Ezúton fejezem ki köszönetemet Dr. Maróy Péternek (Biológiai Tudományok Kandidátusa), hogy erre az érdekes témára fölhevítve a figyelmemet, s munkám során szakmai tanácsokkal látott el.

Köszönöm Dr. Somlai Csabának a dolgozatban szereplő vegyületek előállítását és azt, hogy munkám során állandó konzultációs lehetőséget biztosított.

Köszönöm munkahelyi vezetőimnek, hogy a kísérletek elvégzését lehetővé tették, s támogatásukkal segítették munkámat.

Dr. Németh Péternek (Orvos Tudományok Kandidátusa), Dr. Szekeres Györgynek, Dr. Monostori Évának és Dr. Hannu Niemi-nek köszönöm az értékes gyakorlati és elméleti útmutatásokat, melyek közelebb vittek a feladat megoldásához.

Perei Katalin kutatónak, Váradi Ágnes és Matyasovszkyné Boross Ágnes asszisztenseknek a feladat kivitelezésében nyújtott gyakorlati segítségükért mondok köszönetet.

Végül köszönöm Dr. Andó Istvánnak (Biológiai Tudományok Kandidátusa), hogy kritikai észrevételeivel segített a dolgozat megírásában.

/

X.Tartalomjegyzék:

A dolgozatban használt rövidítések	1. old.
I.Bevezetés	3. old.
II. Irodalmi áttekintés	5. old.
A, Nagykapacitású molekulafelismerő rendszerek	6. old.
B, Kémiai úton előállított konjugátumok	9. old.
III. Célkitűzés	13. old.
IV. Anyag és Módszer	14. old.
V.Kísérletek és eredmények	21. old.
1. A biotin-X-opfp-vel való jelölés optimális körülményeinek megállapítása	21. old.
2. A biotinilált fehérjék jellemzése	31. old.
3. Alkalmazások	42. old.
VI. Megvitatás	57. old.
VII. Összefoglalás	60. old.
VIII. Irodalomjegyzék	61. old.
A dolgozat tárgyában megjelent közlemények	63. old.
IX. Köszönetnyilvánítás	64. old.
X. Tartalomjegyzék	65. old.