



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



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

ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



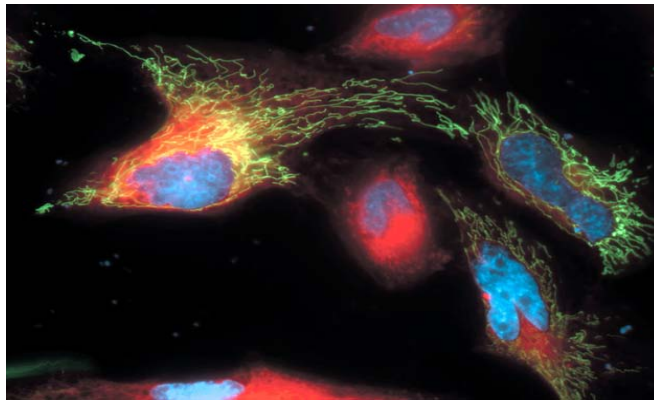
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ

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

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

ΑΝΟΣΟΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ

**ΑΝΟΣΟΙΣΤΟΧΗΜΕΙΑ – ΣΥΝΕΣΤΙΑΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ
ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ - ELISA**



Άννα-Μαρία Ψαρρά

**Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημείας,
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας**

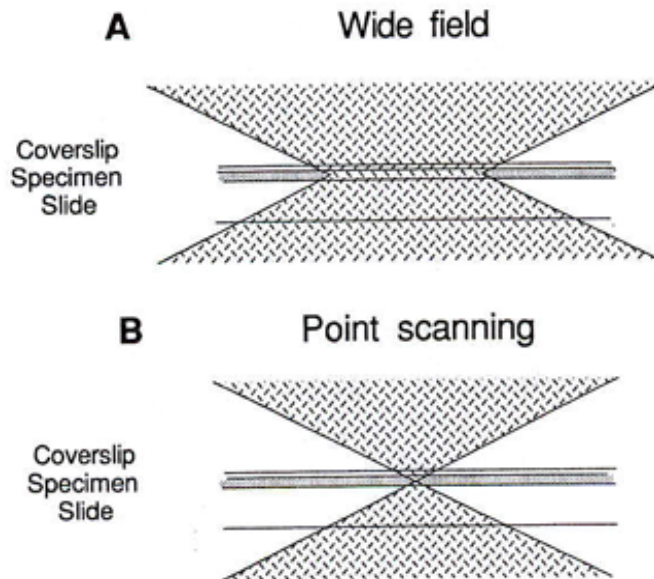
I. Συνεστιακή Μικροσκοπία

Πλεονεκτήματα Συνεστιακής Μικροσκοπίας

Το μικροσκόπιο συνεστίασης έχει αρκετά πλεονεκτήματα έναντι του συμβατικού και του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου. Σε αντίθεση με το συμβατικό μικροσκόπιο, όπου η πληροφορία συλλέγεται από όλο σχεδόν το δείγμα, στο μικροσκόπιο συνεστίασης το μικρό πάχος πεδίου επιτρέπει τη συλλογή πληροφορίας από μία καλά καθορισμένη οπτική τομή. Αποτέλεσμα αυτού είναι ο εκτός περιοχής εστίασης φθορισμός να εξαλείφεται. Δεύτερον οι τομές δείγματος στο μικροσκόπιο συνεστίασης λαμβάνονται οπτικά με αποτέλεσμα τα μη αληθή, τεχνικά δημιουργήματα εξαιτίας της υλικής τομής, που παρατηρούνται στο συμβατικό μικροσκόπιο, να ελαχιστοποιούνται. Επιπλέον εξαιτίας του εκλεπτυσμένου μέσου τομής ζωντανά και μονιμοποιημένα κύτταρα μπορεί να παρατηρηθούν με περισσότερη ακρίβεια. Μέσω του μικροσκοπίου συνεστίασης είναι δυνατόν να ληφθούν τομές όχι μόνο στο επίπεδο xy αλλά και κάθετα σε επίπεδα xz και yz . Οπτικές τομές κατά μήκος του Z άξονα μπορούν να επανασυντεθούν και να παράγουν μία τρισδιάστατη εικόνα του δείγματος.

Αρχή συνεστιακής μικροσκοπίας

Στα συμβατικά μικροσκόπια, η πλειοψηφία του πάχους, είτε του όγκου του δείγματος, καθώς και το επίπεδο στο οποίο οι αντικειμενικοί φακοί εστιάζουν, φωτίζονται ομοιόμορφα. Αυτό οδηγεί σε παρεμβολές από περιοχές εκτός της περιοχής εστίασης. Το φως από τη μη εστιασμένη περιοχή μειώνει την αντίθεση και την ευκρίνεια, καθιστώντας αδύνατη τη διάκριση και τον καθορισμό κυτταρικών και υποκυτταρικών δομών. Εν αντιθέσει, ο φωτισμός στο συνεστιακό μικροσκόπιο δεν είναι συνεχής αλλά διαδοχικός. Ο φωτισμός εστιάζεται σημειακά σε ένα στοιχειώδη όγκο του δείγματος σε μία χρονική στιγμή. (Σχήμα 1)



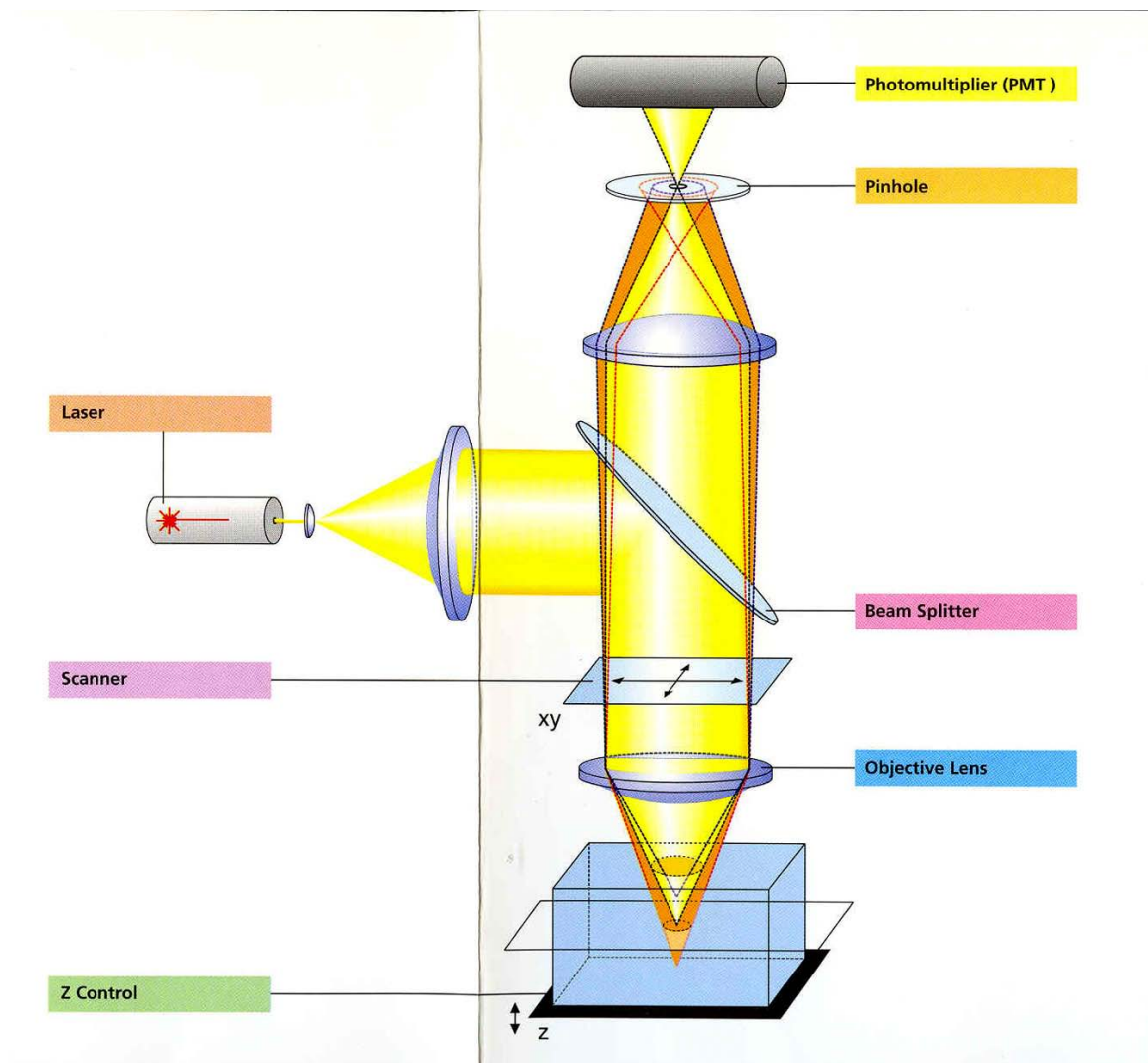
Σχήμα 1

Τα συστήματα συνεστιακής μικροσκοπίας στηρίζονται σε μία βασική αρχή:

Τα συστήματα φωτισμού και ανίχνευσης εστιάζουν στον ίδιο στοιχειώδη όγκο δείγματος. Ανιχνεύονται μόνο τα σήματα από τον στοιχειώδη όγκο που φωτίζεται, ενώ σήματα έξω από το επίπεδο εστίασης αφαιρούνται με χρήση ειδικών συστημάτων και φίλτρων. Έτσι ο φωτισμός, το δείγμα και ο ανιχνευτής εστιάζουν στο ίδιο σημείο, συνεστιάζουν. Η ιδιότητα αυτή προσδίδει και το όνομα συνεστιακή μικροσκοπία (confocal).

Ανατομία μικροσκοπίου συνεστιακής μικροσκοπίας

Στο σχήμα 2 απεικονίζονται διαγραμματικά τα βασικά εξαρτήματα ενός συνεστιακού μικροσκοπίου.



Σχήμα 2

Έτσι ένα CLSM (Confocal Laser Scanning Microscopy) αποτελείται από:

1. Laser

Αποτελεί την πηγή φωτός, το οποίο προβάλλεται πάνω στο δείγμα και το διεγείρει. Η δυνατότητα αυξομείωσης της ισχύς του Laser προστατεύει το δείγμα από αποχρωματισμό (bleaching) είτε παρέχει τη δυνατότητα αύξησης του σήματος.

2. Σαρωτής (Scanner)

Η μονάδα σάρωσης κινεί την εστιασμένη δέσμη του Laser κατά μήκος του δείγματος σειρά με σειρά. Παρέχει δυνατότητα ρύθμισης α) της ταχύτητα σάρωσης β) του χρόνου του ηλεκτρονικού στοιχείου (περισσότερα πρωτόνια ανά ηλεκτρονικό στοιχείο, λιγότερος θόρυβος). γ) ανάλυσης του ηλεκτρονικού στοιχείου pixel. δ) x/y μέγεθος πλαισίου π.χ. 512X512 pixel: 5 frames/sec.

3. Z-control

Παρέχει τη δυνατότητα εστίασης στο δείγμα και απόκτησης στοιβάδας εικόνων X-Y κατά των Z άξονα, δυνατότητα ρύθμισης των μεσοδιαστημάτων κατά τον Z-άξονα και βελτιστοποίησης του μεγέθους βηματισμού κίνησης κατά των Z-άξονα: 0.5 X πάχος οπτικής τομής. Προαιρετικό: γρήγορη σάρωση κατά τον Z-άξονα. (HRZ= higher precision of z movement. (e.g. step size 10 nm, reproducibility 30 nm, working range 200 μm)

4. Pinhole

Μικρή οπή η οποία επιτρέπει την επιλογή βάθους, εμποδίζει την ανίχνευση μη εστιασμένου φωτός (out of focus light). Η διάμετρος της καθορίζει το πάχος της οπτικής τομής.

5. Photomultiplier (PMT) Φωτοπολλαπλασιαστής, Ανιχνευτής

Ανίχνευση πρωτονίων τα οποία εκπέμπονται, αντανακλώμενα από το δείγμα.

6. Dichroic Beam Splitter

Καθορίζει τη διαδρομή της δέσμης φθορισμού. Καθορίζεται από συνδυασμό βασικών (HFT) και δευτερευόντων διχρωϊκών καθρεπτών (NFT) και φίλτρων εκπομπής.

HFT: διαχωρίζει το φως διέγερσης από το φως εκπομπής

NFT: αποδίδει διαχωρισμό του εκπεμπόμενου φθορισμού π.χ. NFT 545 αντανακλά φως μικρότερο από 545 nm και απορροφά φως μεγαλύτερο από 545 nm.

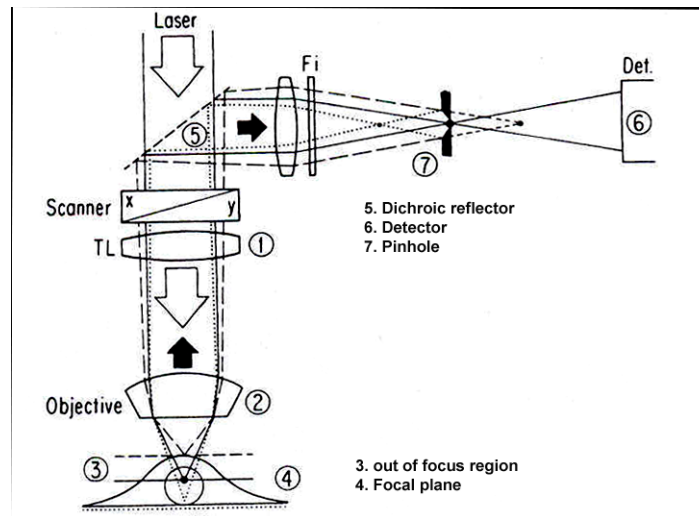
6. Objective lens (Αντικειμενικοί φακοί)

Καθορίζουν την ποιότητα της εικόνας π.χ. ανάλυση. Χαρακτηρίζονται από Numerical aperture (NA) καθορίζει το μέγεθος σημείου της εικόνας και κατά συνέπεια

επηρεάζει το ελάχιστο πάχος τομής το οποίο είναι δυνατόν να επιτευχθεί. n (refractive Index): Ταιριάζει το n (immersion liquid: υγρό εμβάπτισης) με το n (specimen mounting medium, υλικό επικάλυψης δείγματος) για καλύτερη ποιότητα εικόνας

Επίτευξη εικόνας στο μικροσκόπιο συνεστίασης

Η επίτευξη μίας εικόνας στο μικροσκόπιο συνεστίασης επιτυγχάνεται ως εξής: Το φως διέγερσης από ένα Laser κατευθύνεται προς το δείγμα. Η δέσμη φωτός περνάει μέσω του συστήματος σάρωσης και φτάνει στον αντικειμενικό φακό, ο οποίος εστιάζει την δέσμη σαν ένα σημείο πάνω στο δείγμα. Ο εκπεμπόμενος φθορισμός, που παράγεται από το δείγμα διασκορπίζεται προς όλες τις κατευθύνσεις. Ο φθορισμός από το επίπεδο εστίασης από το δείγμα επιστρέφει μέσω του αντικειμενικού φακού και του συστήματος σάρωσης, αντανακλάται από τον διχροϊκό καθρέπτη και εστιάζεται πάνω στον ανιχνευτή. Μπροστά από τον ανιχνευτή υπάρχει ένα φίλτρο, το οποίο περιλαμβάνει μία οπή άνοιγμα (pinhole), η οποία καθορίζει την εικόνα του σημείου στην περιοχή εστίασης του μικροσκοπίου. Ο φθορισμός πάνω και κάτω από το επίπεδο εστίασης δεν περνάει μέσα από το μικρό αυτό άνοιγμα με αποτέλεσμα ακόμα και λίγο φως έξω από το επίπεδο εστίασης να μην φθάνει στον ανιχνευτή. Για τον σχηματισμό της δύο διαστάσεων εικόνας η δέσμη από το Laser σαρώνει το δείγμα κάθετα και οριζόντια και το παραγόμενη φθορίζων ακτινοβολία ανιχνεύεται και μετατρέπεται σε ένα σήμα το οποίο και απεικονίζεται στην εικόνα του υπολογιστή. Ο ανιχνευτής είναι συνήθως ένας χαμηλού θορύβου πολλαπλασιαστής, ο οποίος μετατρέπει την ενέργεια φωτός σε ηλεκτρική ενέργεια. (Σχήμα 3)



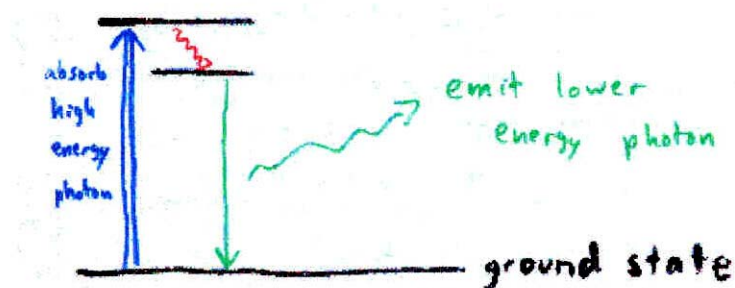
Σχήμα 3

II. Φθορισμός

Η προσλαμβανόμενη ενέργεια κατά την φωτοδιέγερση ενός μορίου, λόγω της απορροφήσεως ενός φωτονίου δεν διατηρείται στο διεγερμένο μόριο, αλλά αποβάλλεται ποικιλοτρόπως, συνήθως υπό μορφή θερμότητας, ενίοτε δε με την εκπομπή

δευτερευούσης ακτινοβολίας, η οποία χαρακτηρίζεται με το γενικό όρο φωταύγεια. Ειδικότερα, η φωταύγεια χαρακτηρίζεται ως φθορισμός μεν, εάν η εκπομπή γίνεται εντός χρόνου 10^{-9} - 10^{-6} sec μετά την διέγερση, ως φωσφορισμός, όταν μεσολαβεί καθυστέρηση της εκπομπής 10^{-4} – 10 sec (ή και μεγαλύτερη). Λόγω της μικρής διάρκειας του φθορισμού, η μέτρηση της εντάσεως αυτού γίνεται κατά την διάρκεια της διεγέρσεως και όχι μετά των τερματισμό αυτής (Σχήμα 4).

What is fluorescence?



Σχήμα 4

Ανοσοιστοχημεία Φθορισμού

Η ανοσοιστοχημεία φθορισμού απαιτεί τη χρήση αντισωμάτων σημασμένων με φθορίζουσες ουσίες. Η μέθοδος ανοσοφθορισμού μπορεί να είναι άμεσος ή έμμεσος. Ο άμεσος φθορισμός περιλαμβάνει την άμεση πρόσδεση του πρωτογενούς αντισώματος με την φθορίζουσα, ενώ στον έμμεσο ανοσοφθορισμό το πρωτογενές αντίσωμα εντοπίζεται μετά την πρόσδεση του με σημασμένο με φθορίζουσα δευτερογενές αντίσωμα έναντι ανοσοσφαιρινών είδους, από το οποίο το πρωτογενές αντίσωμα έχει προκύψει. Η έμμεση μέθοδος έχει πιο ευρεία εφαρμογή, δεδομένου ότι είναι περισσότερη ευαίσθητη, μία και για ένα μόριο πρωτογενούς αντισώματος περισσότερα από ένα δευτερογενή συνδέονται. Η σχετική φωτεινότητα μία φθορίζουσα είναι ανάλογη του συντελεστή διέγερσης σε ένα συγκεκριμένο μήκος κύματος. Αν και το συνολικό σήμα φθορισμού μπορεί να αυξηθεί αυξάνοντας την ένταση φωτισμού-διέγερσης, είτε εκθέτοντας για περισσότερο χρόνο, φωτοχημικές παράπλευρες αντιδράσεις δεν μπορούν να αποφευχθούν. Τέτοιες είναι η εξασθένηση του σήματος (bleaching) ή η καταστροφή του δείγματος.

Μεθοδολογία

A. Μονιμοποίηση και επίτευξη διαπερατότητας ιστού.

Το δείγμα (ιστός ή απομονωμένα κύτταρα) πλένεται με κρύο διάλυμα PBS (10mm Sodium Phosphate, 150 mM NaCl, pH: 7.4) και στην συνέχεια μονιμοποιείται με χρήση διαφόρων μονιμοποιητικών. Ενδεικτικά αναφέρονται μερικά από αυτά:

- MeOH/Acetone (Methanol, -20°C, 10 min, Acetone, -20°C, 2 min)
- PFA/Triton (3.5% PFA/PBS, 10 min 37 ° C, έκπλυση με PBS δύο φορές και μία με 0.1 M Glycine/PBS, επώαση με 0.1% Triton, 5min ή εναλλακτικά επώαση με ακετόνη-20°C, 2 min).

Εκτός από την μεθανόλη και την παραφορμαλδεΐδη ως μέσα μονιμοποίησης χρησιμοποιούνται επίσης η γλουταραλδεΐδη και το χλωροφόρμιο. Η μέθοδος ιστού εμβαπτισμένου σε παραφίνη δεν ενδείκνυται στην περίπτωση της συνεστιακής μικροσκοπίας.

B. Έμμεση μέθοδος ανοσοφθορισμού

- Έκπλυση με PBS
- Μπλοκάρισμα μη ειδικών θέσεων σύνδεσης με 5 % BSA/PBS ή (1/10) φυσιολογικό ορό/ PBS από το είδος ζώου από το οποίο έχει προκύψει το πρώτο αντίσωμα 30 min, RT,
- Έκπλυση με PBS
- Επώαση με το πρωτογενές αντίσωμα, 1 ώρα, RT
- Εκπλύσεις με PBS, 5 min X3
- Επώαση με το δευτερογενές αντίσωμα, 1 ώρα, RT
- Εκπλύσεις με PBS, 5 min X3

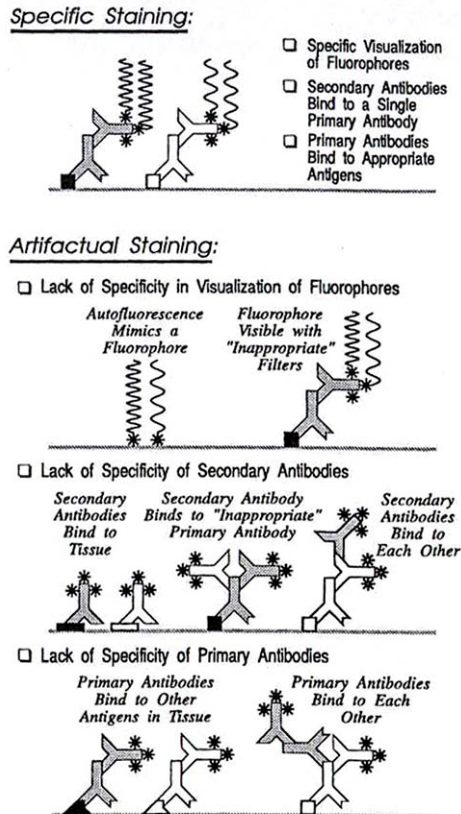
Σε περίπτωση που ελέγχεται η εντόπιση δύο βιολογικών μορίων η επώαση με τα πρωτογενή καθώς και με τα δευτερογενή αντισώματα μπορεί να γίνει σε διαδοχικά ή ταυτόχρονα στάδια.

Ακολουθεί επικάλυψη δειγμάτων με παρασκευάσματα που προστατεύουν τον αποχρωματισμό (bleaching) του δείγματος. Τέτοια είναι για παράδειγμα η PVA (polyvinyl alcohol), η άλλα αντίστοιχα εμπορικά παρασκευάσματα.

Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να λαμβάνεται ώστε να αποφευχθούν ψευδή θετικά αποτελέσματα. Η εκτέλεση πειραμάτων μαρτύρων τόσο για τα πρωτογενή όσο και τα δευτερογενή αντισώματα καθίσταται αναγκαία. Μη ειδική σήμανση είναι δυνατόν να προκύψει είτε από αυτοφθορισμό του δείγματος είτε από μη ειδική σήμανση πρωτογενούς ή δευτερογενούς αντισώματος. Μη ειδικό σήμα λόγω δευτερογενούς αντισώματος μπορεί να προκύψει λόγω μη ειδικής σύνδεσης αυτού είτε απ ευθείας στον δείγμα, είτε σε άλλο δευτερογενές αντίσωμα, είτε σε πρωτογενές αντίσωμα διαφορετικό από αυτό για το οποίο προορίζεται. Όμοια μη ειδική σύνδεση πρωτογενούς αντισώματος μπορεί να προκύψει μετά από σύνδεση αυτού με αντιγονικό επίτοπο διαφορετικό απ αυτόν για τον οποίο προορίζεται, είτε με άλλο πρωτογενές αντίσωμα. Ο αυτοφθορισμός του δείγματος μπορεί να εξαιρεθεί επιλέγοντας τον καταλληλότερο τρόπο μονιμοποίησης του ιστού. Η λήψη ειδικού σήματος προϋποθέτει την λήψη εικόνας με χρήση ειδικών φίλτρων. Στο σχήμα 5 απεικονίζονται οι περιπτώσεις λήψης ειδικού και μη ειδικού σήματος.

Σε in vivo πειράματα, (ζωντανά κύτταρα, έμβρυα), μπορεί να γίνει μελέτη μετακίνησης, αλληλεπίδρασης μορίων, είτε διαμολύνοντας τα κύτταρα με παρασκευάσματα τα οποία κωδικοποιούν έκφραση φθορίζουσας ουσίας προσδεμένης

στην υπό μελέτη πρωτεΐνη, είτε προεπωάζοντάς τα με φθορίζων ουσία, η οποία προσδένεται ή αλλάζει χρώμα κατά την πρόσδεση της με το υπό μελέτη βιολογικό μόριο.

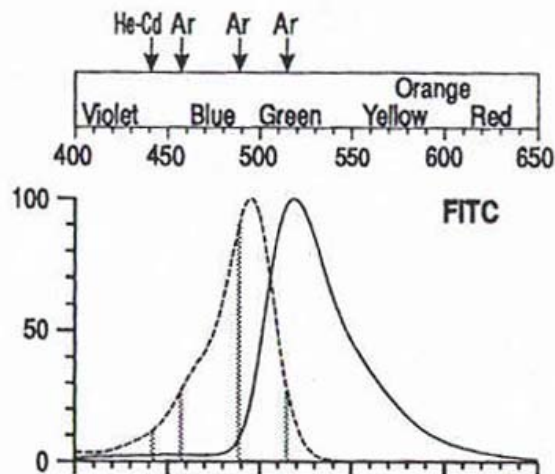


Σχήμα 5

Φθορίζουσες

FITC

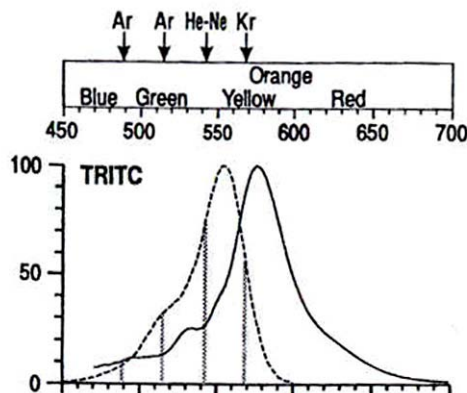
Η FITC (ισοθειοκυανική φλουορεσκεΐνη) είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη φθορίζουσα. Η φλουορεσκεΐνη διεγείρεται στο μπλε φως και εκπέμπει στο πράσινο με κίτρινο. Το εύρος φάσματος που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την διέγερση της φλουορεσκεΐνης είναι 450-500 nm. Το μήκος κύματος 488 το οποίο χρησιμοποιείται για το Laser αργού, το οποίο χρησιμοποιείται στο LSCM είναι ιδανικό για την επίτευξη της μέγιστης διέγερσης της φλουορεσκεΐνης. Μειονεκτήματα της χρήσης φλουορεσκεΐνης είναι η μεγάλη της ευαισθησία στο pH, η οποία οδηγεί σε αποχρωματισμό και ότι το φάσμα εκπομπής της επικαλύπτεται με αυτοφθορισμό των κυττάρων. Εξαιτίας του γρήγορου αποχρωματισμού της ενδείκνυται η χρήση antifade mounting medium κατά την εφαρμογή της στην συνεστιακή μικροσκοπία. (Σχήμα 6)



Σχήμα 6

Ροδαμίνη (TRITC, Τετραμέθυλο ισοθειοκυανική φλουορεσκεΐνη)

Το εύρος φάσματος που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την διέγερση της TRITC είναι 530-580 nm. Το μήκος κύματος 543 το οποίο χρησιμοποιείται για το Laser ηλίου - νέου, το οποίο χρησιμοποιείται στο LSCM είναι ιδανικό για την επίτευξη της μέγιστης διέγερσης της Τετραμέθυλο ισοθειοκυανική φλουορεσκεΐνης. Η Τετραμέθυλο ισοθειοκυανική φλουορεσκεΐνη διεγείρεται σε μήκος κύματος 540-570 nm και εκπέμπει σε μήκος κύματος 560-620 (Σχήμα 7). Πλεονεκτεί στο ότι είναι λιγότερο ευαίσθητη σε αποχρωματισμό. Άλλες φθορίζουσες που μπορεί να χρησιμοποιηθούν αντί της ροδαμίνης είναι CY-3, το T Texas red και το ιωδιούχο προπίδιο



Σχήμα 7

Πληθώρα φθορίζων ουσιών είναι διαθέσιμες στο εμπόριο, μερικές από αυτές είναι η CY3, CY5, Alexa 488, Alexa 543, phycoerythrin.

GFP

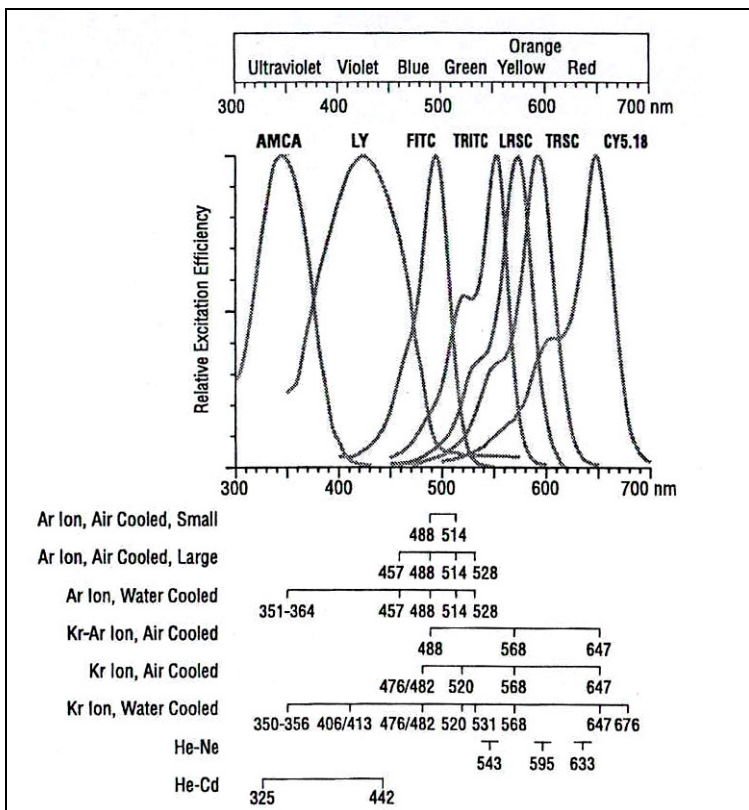
Σε in vivo πειράματα η χρήση GFP Fusion αποδεικνύεται χρήσιμο εργαλείο. Η GFP πρωτεΐνη διεγείρεται σε UV, μία σημειακή μετάλλαξη (S65) αυτής οδηγεί στην

δημιουργία της enhanced GFP η οποία διεγείρεται σε 488nm και έτσι μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε συνεστιακό μικροσκόπιο. Η εισαγωγή της αλληλουχίας, που κωδικοποιεί την GFP πρωτεΐνη σε παρασκευάσματα (construct), στα οποία μπορεί να εισαχθεί η προς μελέτη πρωτεΐνη οδηγεί στην δημιουργία σύνθετων πρωτεϊνών, η παρακολούθηση των οποίων καθίσταται δυνατή λόγω της φθορίζουσας GFP. Απαραίτητη προϋπόθεση μετά την έκφραση της πρωτεΐνης, είναι αυτή να είναι λειτουργική, να έχει την σωστή διαμόρφωση και να εντοπίζεται στο αναμενόμενο υποκυτταρικό διαμέρισμα.

Παράλληλα με την GFP, άλλα φθορίζων probes (π.χ για ανίχνευση Ca^{2+}) και δείκτες (π.χ pH) μπορούν να χρησιμοποιηθούν για in vivo πειράματα και in situ Hybridization.

Laser

Τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα Laser είναι 1. Αργό (διέγερση FITC) , 2. Ήλιο-Νέο (διέγερση TRITC) και 3. Ήλιο Κάδμιο. (Σχήμα 8)

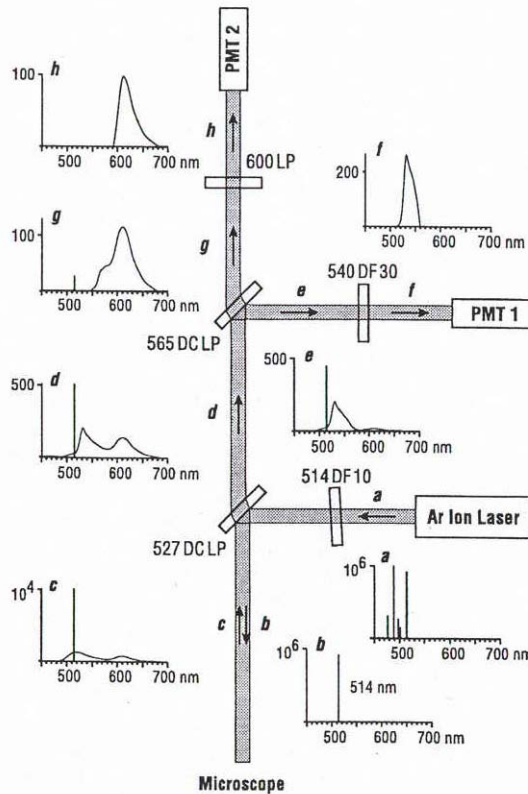


Σχήμα 8

Η εξέταση περισσότερων από ενός χρωμοφόρου σε ένα δείγμα απαιτεί την ανεξάρτητη ανίχνευση σημάτων από την κάθε χρωμοφόρο.. Υπάρχουν δύο τρόποι προσέγγισης για την ανίχνευση του κάθε χρωμοφόρου. 1. Χρησιμοποίηση ενός μήκους κύματος για την διέγερση των δύο χρωμοφόρων και στη συνέχεια διαχωρισμό των φασμάτων εκπομπής τους. 2. Χρήση διαφορετικών μηκών κύματος για την διέγερση των χρωμοφόρων και χρήση διαφορετικών φίλτρων εκπομπής για την ανίχνευση του σήματος.

Η χρήση laser, ειδικών διχροϊκών καθρέπτων και φίλτρων στη συνεστιακή μικροσκοπία επιτρέπει την εκλεκτική δίοδο ειδικού σήματος ώστε τελικά το σήμα που φθάνει στον ανιχνευτή να είναι απαλλαγμένο από μη ειδικά σήματα.

Έτσι για παράδειγμα η δέσμη 488 nm από το Laser συλλέγεται με ένα στενό φίλτρο, αντανακλάται μέσω ενός διχροϊκού καθρέπτη και εστιάζεται μέσω του φακού πάνω στο δείγμα. Το σήμα φθορισμού μπορεί να μεταφερθεί από τον ίδιο διχροϊκό καθρέπτη προς την πορεία ανίχνευσης. Ένας δεύτερος διχροϊκός καθρέπτης (565) αντανακλά την μικρότερου μήκους κύματος πράσινο φθορισμό προς τον ένα ανιχνευτή και μεταφέρει την μεγαλύτερου μήκους κύματος κόκκινο φθορισμό σε άλλον ανιχνευτή. Το μήκος κύματος του φωτός που ανιχνεύεται περιορίζεται περαιτέρω με φίλτρα εκπομπής σε 525-555 nm για την πράσινη φθορίζουσα και μεγαλύτερο από 600 nm για την κόκκινη φθορίζουσα (Σχήμα 9)

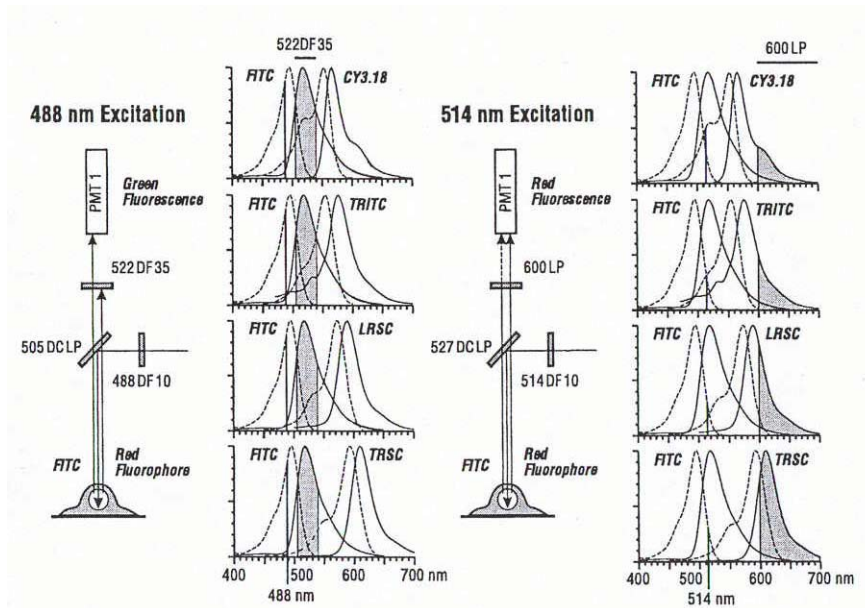


Σχήμα 9

Cross talk

Εξαιτίας κοινών περιοχών στα φάσματα διέγερσης και εκπομπής δύο διαφορετικών φθορίζων ουσιών είναι δυνατόν ένα ποσοστό σήματος από την κάθε χρωστική να οφείλεται στην άλλη. Το φαινόμενο αυτό είναι γνωστό ως cross talk και

καθίσταται απαραίτητη η εξάλειψη αυτού του σήματος ώστε να εξαλειφθεί η μη ειδική χρώση. Ένας τρόπος εξάλειψης αυτής της παρεμβολής είναι η διέγερση κάθε φθορίζουσας, τόσο ώστε, να μην ανιχνεύεται σήμα στο κανάλι της άλλης. Το σήμα που τελικά λαμβάνεται, τόσο με τα ειδικά συστήματα που διαθέτει το μικροσκόπιο συνεστίασης όσο και με την κρητική παρέμβαση του χρήστη, είναι ειδικό (Σχήμα 10). Άλλος τρόπος είναι η διαδοχική και ανεξάρτητη διέγερση, σάρωση και καταγραφή σήματος των διαφορετικών ουσιών που φθορίζουν.



Σχήμα 10

III Είδη μικροσκοπίων συνεστίασης

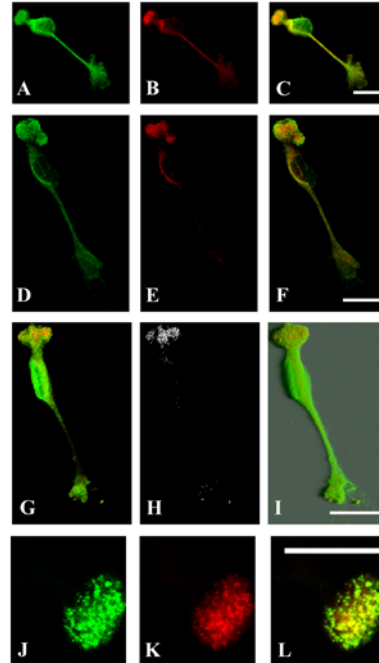
Τρία βασικά είδη μικροσκοπίου έχουν κατασκευαστεί μέχρι σήμερα. Τα μικροσκόπια συνεστίασης μπορεί να εκτελούν είτε μία πλευρική κίνηση τράπεζας και να διαθέτουν σταθερή δέσμη φωτός (stage scanning) είτε να διαθέτουν σταθερή τράπεζα και εκτελούν σάρωση μέσω της δέσμης φωτός (beam scanning) είτε να διαθέτουν σταθερή τράπεζα και δέσμη φωτός (spinning disk).

IV. Εφαρμογές συνεστιακής μικροσκοπίας

1. Έλεγχος συνεντόπισης μορίων

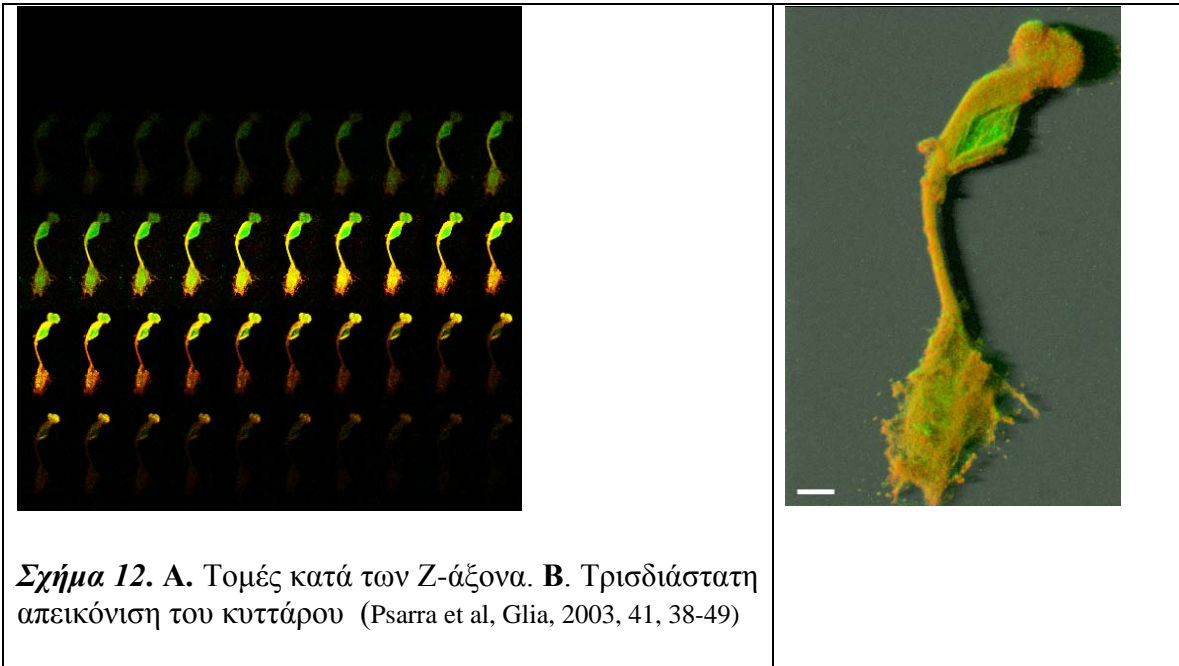
Η σημειακή και ειδική ανίχνευση σήματος με τη χρήση μικροσκοπίου συνεστίασης, σε συνδυασμό με την ιδιότητα συμπληρωματικών χρωμάτων πράσινου και κόκκινου να προσδίδουν κίτρινο χρώμα, επιτρέπει τη μελέτη συνεντοπισμού δύο βιολογικών μορίων. Έτσι σημαίνοντας τα δύο προς μελέτη μόρια με FITC και TRITC η εμφάνιση κίτρινου χρώματος, με χρήση συνεστιακού μικροσκοπίου, αποκαλύπτει τον συνεντοπισμό των δύο μορίων. (Σχήμα 11)

Σχήμα 11. Μιτοχονδρική εντόπιση υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών σε μιτοχόνδρια Muller κυττάρων αμφιβληστροειδούς χιτώνα σαλαμάνδρας. Με κόκκινο απεικονίζεται η κυτοχρωμική οξειδάση (μιτοχονδριακή πρωτεΐνη) ενώ με πράσινο ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών. Με κίτρινο αποκαλύπτονται τα σημεία συνεντόπισης των δύο πρωτεϊνών. Τα σημεία αυτά απεικονίζονται στην εικόνα Η, μετά από επεξεργασία της εικόνας Γ με ειδικό πρόγραμμα (Psarra et al, *Glia*, 2003, 41, 38-49)



2. Απόκτηση τρισδιάστατης δομής

Η χρήση συνεστιακού μικροσκοπίου επιτρέπει την απόκτηση οπτικών τομών (X,Y) κατά των Z-άξονα η ενοποίηση των οποίων οδηγεί στην απόκτηση τρισδιάστατης δομής του εξεταζόμενου βιολογικού υλικού (Σχήμα 12).

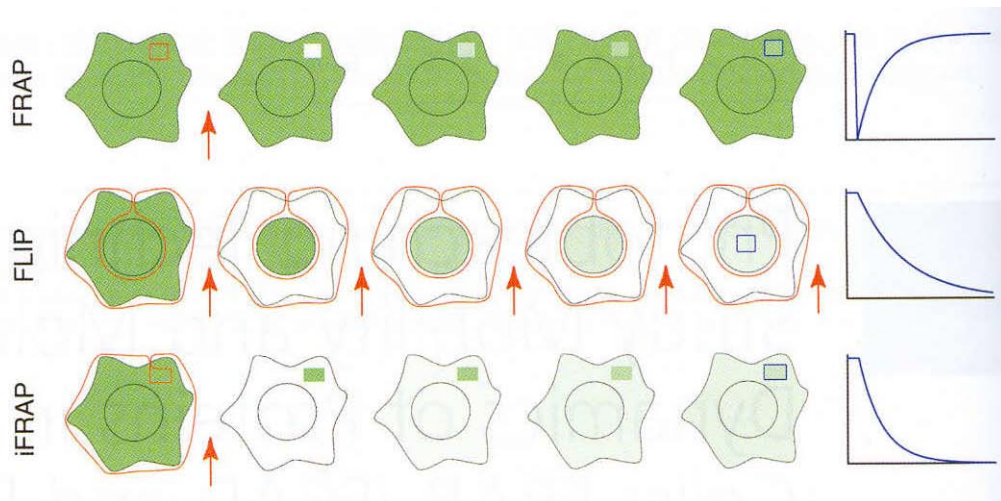


3. Παρατήρηση κινητικής μορίων σε in vivo συστήματα

Η χρήση συνεστιακής μικροσκοπίας επιτρέπει την παρακολούθηση τόσο αλληλεπίδρασης όσο και κινητικής μορίων σε in vivo συστήματα.

Τεχνικές Photobleaching σε ζωντανά κύτταρα: FRAP, iFRAP FLIP

Οι τεχνικές photobleaching επινοήθηκαν στα μέσα του 1970 με σκοπό την μελέτη διάχυσης βιομορίων. Από τα μέσα του 1990, η καθιέρωση της χρήσης του συνεστιακού μικροσκοπίου και επινόηση χρήσης GFP-fusion πρωτεϊνών συνετέλεσε στην εξάπλωση και εγκαθίδρυση των εφαρμογών τους. Μετά από τον αποχρωματισμό (photobleaching) μίας περιοχής ο πειραματιστής δύναται να παρατηρήσει και να αναλύσει την ανακατανομή του φθορισμού. Σημειώνεται ότι ο αποχρωματισμός είναι μία μη αντιστρεπτή διαδικασία. Οι ποικίλες τεχνικές photobleaching διαφέρουν ως προς το μέγεθος της bleached (αποχρωματισμένης, βομβαρδισμένης) περιοχής, τον αριθμό των αποχρωματισμών, και τον τρόπο μελέτης της ανακατανομής του φθορισμού. Οι πιο γνωστές τεχνικές αποχρωματισμού είναι οι FRAP, FLIP και iFRAP.



Σχήμα 13

FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching)

Σε ένα τυπικό πείραμα FRAP, μία μικρή περιοχή από το φθορίζον δείγμα, αποχρωματίζεται μία φορά. Στη συνέχεια η εικόνα μελετάται και αναλύεται ως προς την ανάκτηση του φθορισμού στην αποχρωματισμένη περιοχή. Ως εκ τούτου η τεχνική παρέχει πληροφορίες ως προς την κινητικότητα ή μη της φθορίζουσας ουσίας στην αποχρωματισμένη περιοχή και προσφέρεται για μελέτες ανάλυσης δυναμικής μορίων και προσδιορισμού του συντελεστή διάχυσης (Σχήμα 13).

iFRAP (inverse FRAP)

Στα πειράματα iFRAP, όλος ο φθορισμός του δείγματος αποχρωματίζεται εκτός από μία μικρή περιοχή που μας ενδιαφέρει να μελετήσουμε. Η μετα-αποχρωματισμού εικόνες μελετώνται και αναλύονται ως προς την μείωση του φθορισμού στην μη αποχρωματισμένη περιοχή. Ο χρόνος που απαιτείται για τον αποχρωματισμό της μεγαλύτερης περιοχής (μερικά sec) καθιστά την τεχνική χρήσιμη για την μελέτη σταθερών αποσύνδεσης μορίων (Σχήμα 13).

FLIP (Fluorescence Loss After Photobleaching)

Τα πειράματα FLIP διαφέρουν από τα πειράματα FRAP και iFRAP στον κατά επανάληψη αποχρωματισμό της ίδιας περιοχής του δείγματος. Ο συνεχής αποχρωματισμός της αρχικά αποχρωματισμένης περιοχής οδηγεί σε σταθερή μείωση φθορισμού, τόσο της αποχρωματισμένης περιοχής όσο και της μη αποχρωματισμένης περιοχής. Η τεχνική εφαρμόζεται για μελέτες επικοινωνίας μεταξύ γειτονικών περιοχών και ροής μορίων μεταξύ αυτών (Σχήμα 13).

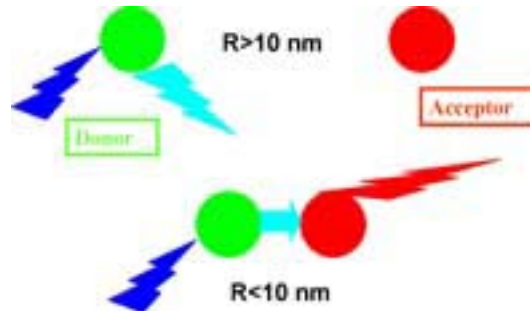
Κάθε τεχνική photobleaching είναι μοναδική. Ο τρόπος που εκτελείται εξαρτάται από το βιολογικό μόριο που μελετάται, την φθορίζουσα που έχει προσδεθεί σε αυτό, την γεωμετρία του κυττάρου, το σύστημα μικροσκοπίου καθώς και το σύστημα ανάλυσης που είναι διαθέσιμα. Για παράδειγμα κόκκινες χρωστικές όπως Cy3, TRITC οι οποίες είναι πολύ σταθερές όσο αφορά τον αποχρωματισμό τους και εμπορικά διαθέσιμες χρωστικές όπως Alexa488 και Alexa543 εξαιτίας της σταθερότητάς τους είναι καλύτερο να αποφεύγονται για τέτοιου είδους πειράματα είτε εναλλακτικά να χρησιμοποιούνται πιο ισχυρά Laser.

Διάφοροι παράμετροι πρέπει να λαμβάνονται υπ' όψη κατά τη λήψης εικόνας αυτοί είναι το άνοιγμα του Pinhole (συνήθως προτιμάται ανοιχτό), το NA των φακών, (προτιμάται χαμηλό NA για ομοιόμορφο φωτισμό του δείγματος), η ισχύς του laser και το % μετάδοσης της στο δείγμα, η ταχύτητα σάρωσης και η συχνότητα λήψης εικόνας, η εκτέλεση απαραίτητων δειγμάτων μαρτύρων και η επάλειψη μη ειδικών σημάτων.

Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)

Οι μετρήσεις FRET παρέχουν ένα χρήσιμο εργαλείο τόσο για την ανίχνευση αλληλεπιδράσεων μεταξύ σημασμένων μορίων όσο και αλλαγών στην διαμόρφωση ενός μορίου. FRET είναι μία διαδικασία, η οποία λαμβάνει χώρα κατά την φάση διέγερσης ενός χρωμοφόρου όταν ενέργεια μεταφέρεται από μία φθορίζων ουσία δότη σε μία φθορίζων ουσία δέκτη. Το μόριο δότη επιστρέφει στην αρχική του ενεργειακή κατάσταση χωρίς την εκπομπή ενέργειας. (Σχήμα 13). Η ταχύτητα μεταφοράς της ενέργειας εξαρτάται από την απόσταση των δύο χρωμοφόρων, από το βαθμό επικάλυψης μεταξύ φάσματος εκπομπής του δότη και διέγερσης του δέκτη, το σχετικό προσανατολισμό μεταξύ δότη και δέκτη, την απόδοση κβάντουμ του δότη και το χρόνο ζωής φθορισμού του δότη. Δύο βασικά κριτήρια πρέπει να ληφθούν υπ όψιν κατά την επιλογή του ζευγαριού των φθορίζουσων ουσιών.

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



Σχήμα 13

Χαρακτηριστικό παράδειγμα εφαρμογής FRET είναι η μελέτη αλλαγών στην διαμόρφωση πρωτεϊνών μετά από σύνδεση Ca^{2+} .

ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ELISA

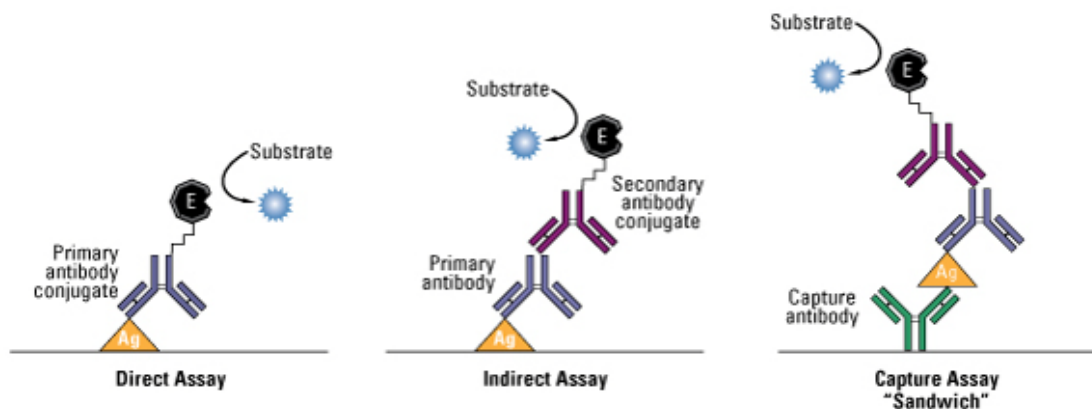
Η δοκιμασία ELISA είναι μια ανοσοδοκιμασία στερεάς φάσης (EIA) για την ανίχνευση της παρουσίας μιας ουσίας, συνήθως ενός αντιγόνου, σε ένα υγρό ή στερεό δείγμα. Στηρίζεται στην ειδική σύνδεση, λόγω χημικής συγγένειας, αντιγόνου-αντισώματος. Στη μέθοδο χρησιμοποιούνται αντισώματα σημασμένα με ένζυμο, όπου η προσθήκη ειδικού υποστρώματος για αυτό το ένζυμο οδηγεί σε παραγωγή έγχρωμου προϊόντος το οποίο και προσδιορίζεται φασματοφωτομετρικά.

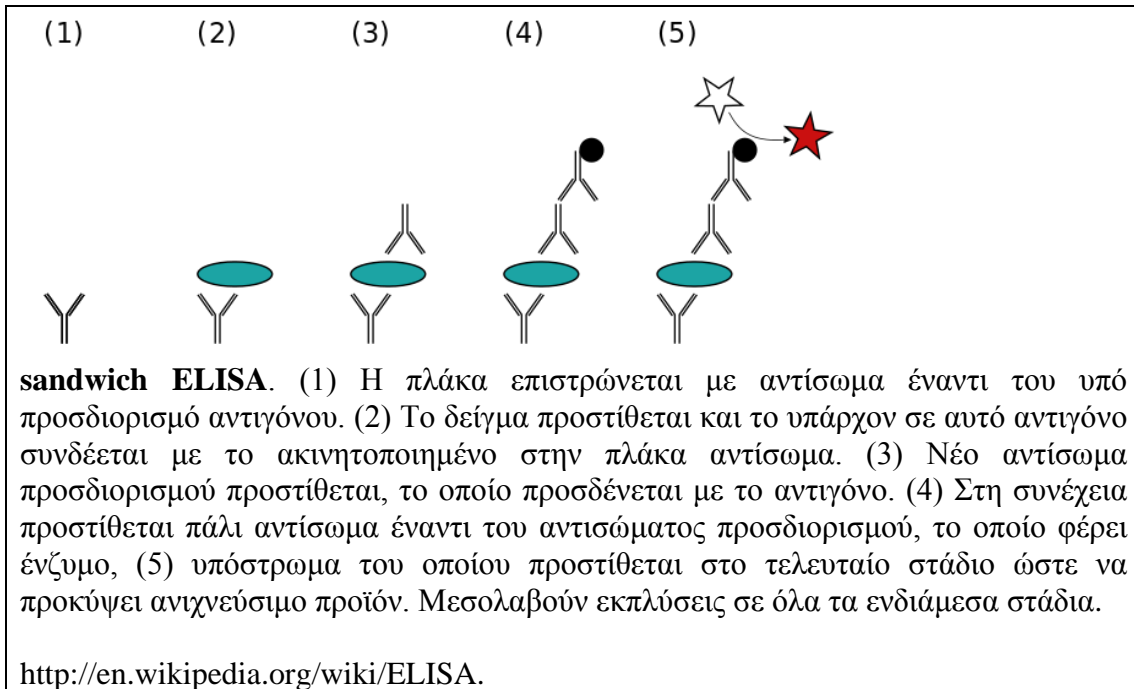
Η μέθοδος ELISA, είναι μία ποσοτική μέθοδος προσδιορισμού, χρησιμοποιείται ευρέως ως ένα διαγνωστικό εργαλείο στην ιατρική, σε μελέτες διερεύνησης της παθολογίας των φυτών, καθώς και στον έλεγχο ποιότητας σε διάφορες βιομηχανίες.

Τα αντιγόνα από το δείγμα προς έλεγχο συνδέονται-προσκολλώνται σε μια επιφάνεια. Η επιφάνεια είναι συνήθως μία πλάκα μικροτιτλοδοτήσεως, πολλαπλών θέσεων από πολυστερίνη. Η σύνδεση του αντιγόνου μπορεί να επιτευχθεί είτε μη-ειδικά (μέσω προσρόφησης στην επιφάνεια) ή ειδικά (μέσω της σύλληψης από ένα άλλο αντίσωμα ειδικό για το αντιγόνο- π.χ. "σάντουιτς" ELISA). Στη συνέχεια, ειδικό αντίσωμα, έναντι του αντιγόνου, επωάζεται με την επιφάνεια έτσι ώστε να μπορεί να συνδεθεί με το αντιγόνο. Το αντίσωμα αυτό είναι συνδεδεμένο με ένα ένζυμο. Στο τελικό στάδιο, προστίθεται ένα διάλυμα που περιέχει το υπόστρωμα αυτού του ενζύμου. Το προϊόν της αντίδρασης του ενζύμου είναι έγχρωμο ώστε τελικά να παράγεται ένα ανιχνεύσιμο σήμα, το οποίο και προσδιορίζεται. Η προσδιορισθείσα παραγόμενου προϊόντος είναι ανάλογη της ποσότητας του υπό διερεύνηση αντιγόνου στο δείγμα. Στα ενδιάμεσα στάδια παρεμβάλλονται εκπλύσεις για την απομάκρυνση των μη προσδεδεμένων ουσιών.

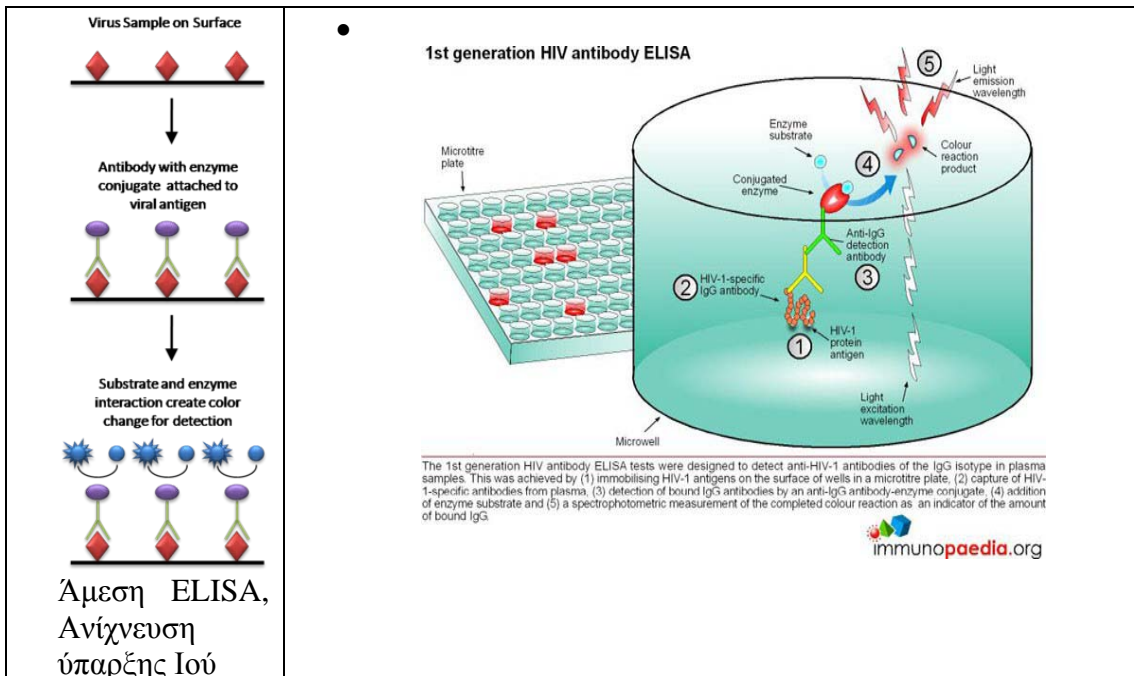
Έτσι αρχικά διακρίνουμε τρεις κατηγορίες ELISA, την άμεση, την έμμεση, και την ELISA-σάντουιτς

όπως απεικονίζονται στο παρακάτω σχήμα.





Παραδείγματα εφαρμογής ELISA-Ανίχνευση Ιού σε βιολογικό δείγμα



Μια τρίτη κατηγορία της μεθόδου ELISA είναι μέσω ανταγωνιστικής δέσμευσης.

Τα βήματα για την ανταγωνιστική ELISA περιγράφονται στη συνέχεια:

1. Μη σημασμένο αντίσωμα επωάζεται παρουσία του αντιγόνου του (δείγμα).
2. Τα σύμπλοκα αντισώματος / αντιγόνου, στη συνέχεια, προστίθενται στην πλάκα προσδιορισμού, η οποία έχει επιστρωθεί με αντιγόνο.
3. Η πλάκα πλένεται, έτσι ώστε το μη δεσμευμένο αντίσωμα απομακρύνεται. (Όσο περισσότερο είναι το αντιγόνο στο δείγμα τόσο περισσότερα σύμπλοκα αντιγόνου-αντισώματος δημιουργούνται και έτσι τόσο λιγότερο διαθέσιμο αντίσωμα υπάρχει για να συνδεθεί με το αντιγόνο της πλάκας, «ανταγωνισμός»)
4. Στη συνέχεια δεύτερο αντίσωμα, έναντι του πρώτου προστίθεται. Αυτό το δεύτερο αντίσωμα είναι συνδεδεμένο με ένζυμο
5. Προσθήκη υποστρώματος. Παραγωγή και προσδιορισμός σήματος

Κάποια κιτ ανταγωνιστικής ELISA, που διατίθενται στο εμπόριο, περιλαμβάνουν ένζυμο συνδεδεμένο με αντιγόνο αντί ένζυμο-συνδεδεμένο με αντίσωμα. Το σημασμένο αντιγόνο ανταγωνίζεται για θέσεις σύνδεσης πρωτογενούς αντισώματος με το αντιγόνο του δείγματος (σημειωμένο). Όσο λιγότερο αντιγόνο στο δείγμα, τόσο πιο πολύ σημασμένο αντιγόνο διατηρείται στο φρεάτιο και τόσο ισχυρότερο είναι το σήμα.

Βιβλιογραφία

Το κείμενο περιλαμβάνει αποσπάσματα και εικόνες από το *Methods in Cell Biology Vol 38* και από το *Live cell a Laboratory Manual Imaging*, edited by Robert D. Goldman and David L. Spector.

Και από το <http://en.wikipedia.org/wiki/ELISA>