

**Β' ΒΑΣΙΚΟ ΣΕΜΙΝΑΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑΣ
2 ΦΕΒΡΟΥΑΡΙΟΥ 2013
ΑΜΦΙΘΕΑΤΡΟ ΤΟΥ ΓΕΝΙΚΟΥ ΚΡΑΤΙΚΟΥ ΑΘΗΝΩΝ «Γ. ΓΕΝΝΗΜΑΤΑΣ»**

IV Σχεδιασμός Πειραμάτων και Ανάπτυξη Δοκιμασιών

ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΑΝΤΙΓΟΝΟΥ/ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ

Βικεντίου Μυροφόρα, Χημικός, PhD,

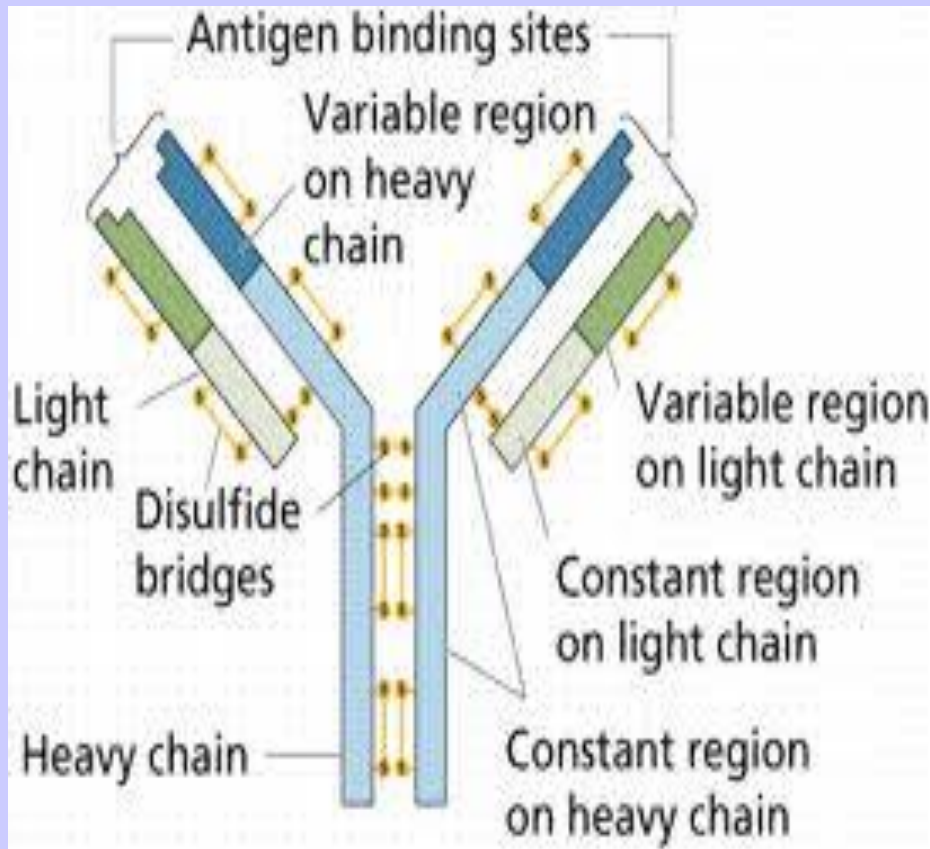
MSc “Κλινική Βιοχημεία-Μοριακή Διαγνωστική”

**Επιστημονικός Συνεργάτης, Β' Παθολογική Προπαιδευτική Κλινική,
Αιματολογική Μονάδα, Π.Γ.Ν “Αττικόν**

Ορισμοί

- **ΑΝΤΙΣΩΜΑ** --> Ανοσοσφαιρίνη, η οποία συνδέεται εξειδικευμένα με μεγάλη ποικιλία φυσικών και συνθετικών αντιγόνων
- **ΑΝΟΣΟΓΟΝΟ** --> Κάθε χημική ουσία, η οποία είναι ικανή να προκαλέσει ανοσολογική απόκριση
- **ΑΠΤΙΝΗ**---> Μικρό μόριο, χημικά προσδιορισμένο, ικανό να προκαλέσει παραγωγή αντισωμάτων μόνο όταν συνδεθεί με ένα ανοσογόνο-φορέα.
- **ΕΠΙΤΟΠΟΣ** :περιοχή στο αντιγόνο που συνδέεται με το αντίσωμα. (Πολύ μικρή περιοχή, 5-7 αμινοξέα).Στις πρωτείνες συναντάμε συνήθως 1 επίτοπο ανά 40-80 αμινοξέα
- **ΠΑΡΑΤΟΠΟΣ** : περιοχή στο αντίσωμα που συνδέεται με το αντιγόνο.

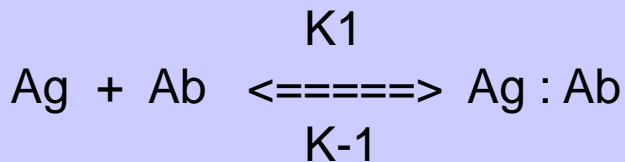
Σχηματική παράσταση μορίου ανοσοσφαιρίνης G



- IgG, IgA, IgM, IgD, IgE
- 2 όμοιες βαριές αλυσιοι (H), και δύο ελαφρείς- (L)
- Κ ή λ ελαφρείς αλυσιοι
- Η απόσταση μεταξύ HVL και αντιγόνου είναι περίπου 0.2nm
- Δομικές ειδικότητες του χώρου αυτού- Ιδιοτυπία (idiotypes)

Συγγένεια (Ab affinity) και Συνάφεια (Ab Avidity) αντισώματος προς το αντιγόνο

AFFINITY: Εκφράζει την σταθερά σχηματισμού (K_a) του συμπλόκου αντιγόνου - αντισώματος σύμφωνα με την αντίδραση:



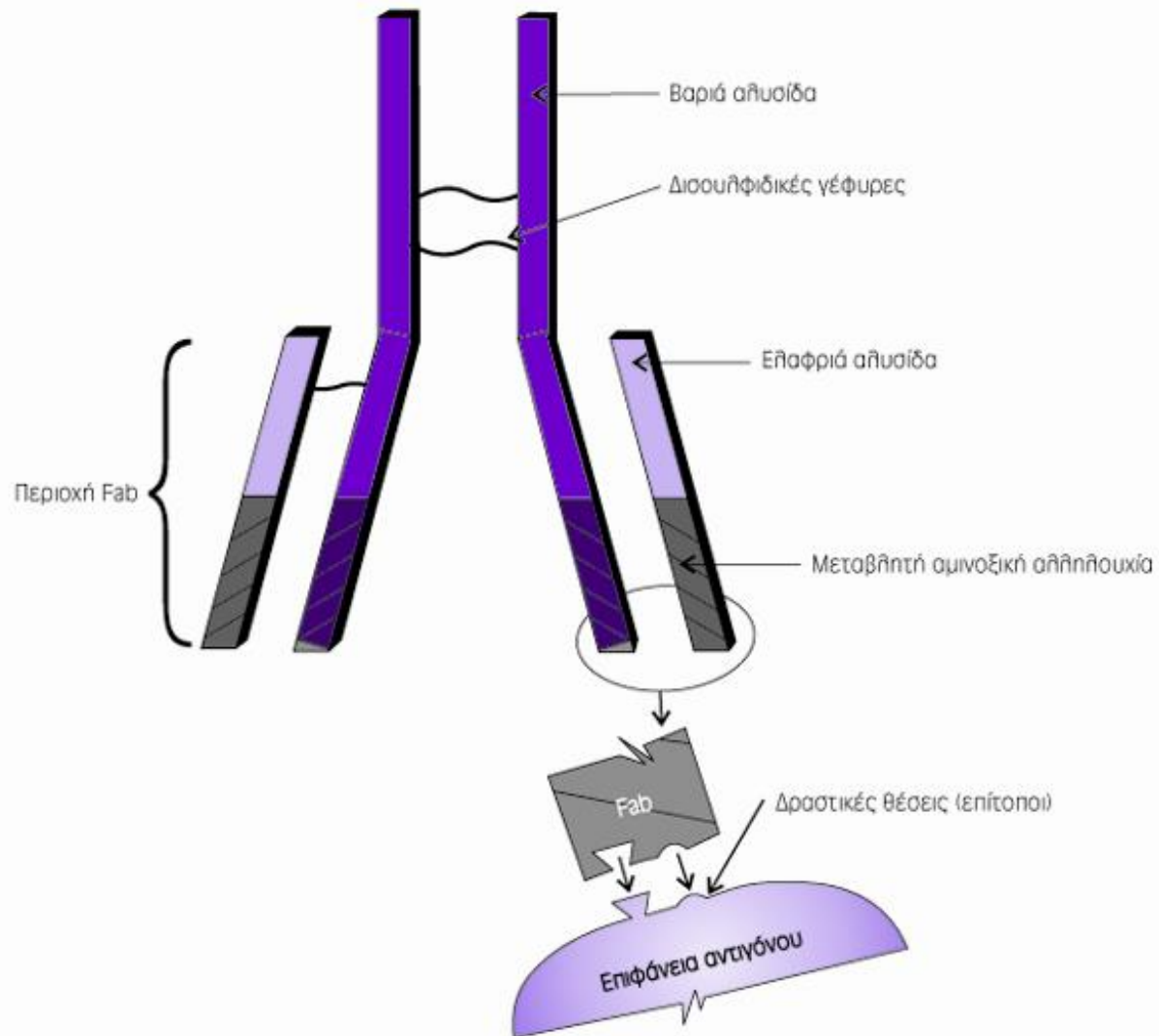
$$K_a = \frac{[\text{Ag} \cdot \text{Ab}]}{[\text{Ag}] \cdot [\text{Ab}]}$$

AVIDITY----> Εκφράζει την ολική σταθερότητα του συμπλόκου Ab-Ag

Εξαρτάται από:

- α) Συγγένεια του αντισώματος ως προς τον αντιγονικό επίτοπο.
- β) Σθένος του Ab και Ag.
- γ) Γεωμετρικές διατάξεις του συνόλου των δεσμών που σχηματίζονται μεταξύ Ab και Ag.

Συγγένεια αντισώματος προς το αντιγόνο



Ειδικότητα Αντισώματος (Ab Specificity)

ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ: Εκφράζει τη συμπληρωματικότητα της στερεοδομής μεταξύ επιτόπου και παρατόπου

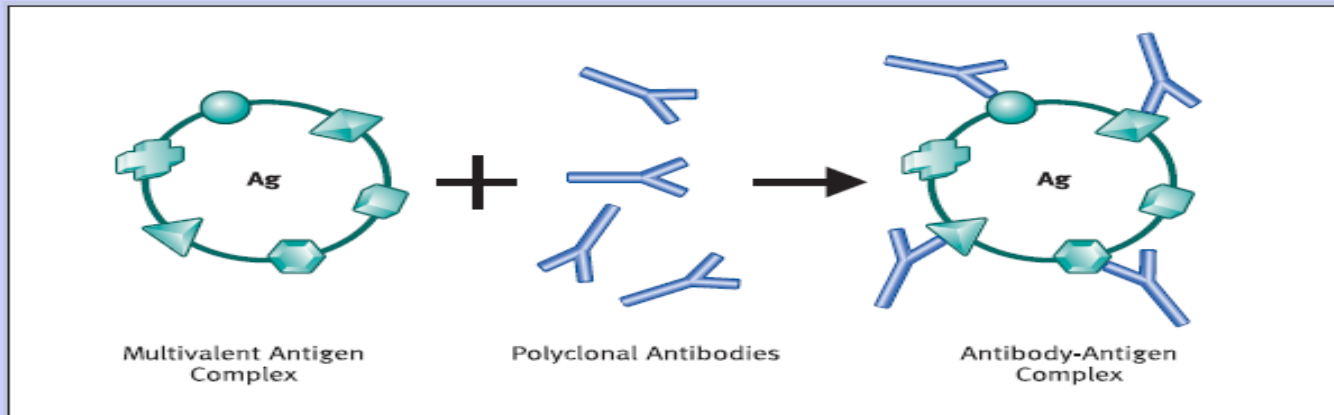
- Είναι δυνατόν δύο διαφορετικά αντιγόνα A και B να έχουν ένα ή περισσότερους κοινούς επιτόπους στο μόριό τους με αποτέλεσμα ένας υποπληθυσμός αντισωμάτων πολυκλωνικού αντιορού να αντιδρά και με τα δύο αντιγόνα. Στην περίπτωση αυτή εάν χρησιμοποιηθεί μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του κοινού επιτόπου δεν είναι δυνατή η διάκριση μεταξύ των δύο αντιγόνων. (Shared reactivity).
- Παράδειγμα:
 - α) CK-MB και CK-MM με ειδικό αντίσωμα έναντι της M υπομονάδας.
 - β) LH και HCG με αντισώματα ειδικά έναντι της α υπομονάδας.

Διασταυρούμενη Αντίδραση (Cross Reaction)

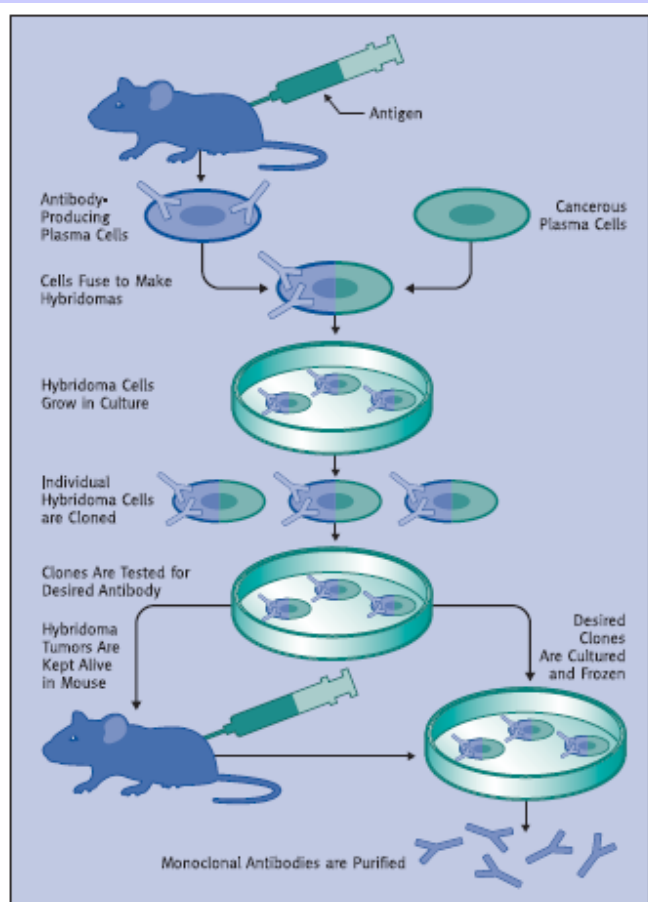
- Εκφράζει το φαινόμενο, όπου παρατηρείται σύνδεση του ειδικού αντισώματος με αντιγόνο Ag2 διαφορετικό του ανοσογόνου Ag1 λόγω ύπαρξης παρόμοιου αντιγονικού επιτόπου.
- Στην περίπτωση αυτή αντισώματα εξειδικευμένα έναντι ενός επιτόπου του ομολόγου αντιγόνου (A) είναι δυνατό να αντιδρούν και με παρόμοιους αλλά διαφορετικούς επιτόπους άλλων ετερόλογων αντιγόνων.
- Στην περίπτωση αυτή έχουμε μικρότερη σταθερά σύνδεσης Ab-Ag.

Πολυκλωνικά Αντισώματα

Τα πολυκλωνικά αντισώματα παράγονται σε πολλούς οργανισμούς (κουνέλι, ποντικός, αίγα, όνος). Ονομάζονται πολυκλωνικά καθώς στον παραγόμενο αντιορό περιέχονται IgG που είναι προϊόντα πολλών διαφορετικών κλώνων Β-λεμφοκυττάρων και κατά συνέπεια αναγνωρίζουν διαφορετικούς επιτόπους του αντιγόνου. Η διαδικασία καθαρισμού των πολυκλωνικών αντισωμάτων από τον ορό του αίματος πραγματοποιείται είτε με χρωματογραφία συγγένειας με το αντιγόνο (αφαιρεί το μεγαλύτερο μέρος του μη ειδικού κλάσματος των ανοσοσφαιρινών) είτε με απομόνωση των ανοσοσφαιρινών (αφαιρεί το μεγαλύτερο μέρος των πρωτεϊνών του ορού αλλά δεν εξασφαλίζει την εξάλειψη μη ειδικού κλάσματος των ανοσοσφαιρινών).



Μονοκλωνικά Αντισώματα



Τα μονοκλωνικά αντισώματα παράγονται συνήθως σε ποντικό. Η ανοσοποίηση ακολουθείται από απομόνωση διακριτών κλώνων Β-λεμφοκυττάρων, καθένας εκ των οποίων παράγει ένα μόνο αντίσωμα με την ίδια μοριακή δομή, ειδικότητα και συγγένεια το οποίο αναγνωρίζει έναν συγκεκριμένο επίτοπο. Το βασικό πλεονέκτημα των μονοκλωνικών αντισωμάτων είναι η μεγάλη τους ειδίκευση καθώς όταν χρησιμοποιούνται η πιθανότητα διασταυρούμενης αντίδρασης του αντισώματος με αντιγόνα που φέρουν επιτόπους παρόμοιους με αυτούς του υπό μελέτη αντιγόνου είναι πολύ μικρή.

Πλεονεκτήματα Μονοκλωνικών Αντισωμάτων

- Απόδοση απεριόριστης ποσότητας αντισώματος με σταθερά χαρακτηριστικά
- Χημική συγγένεια και ειδικότητα πλήρως καθορισμένες με δυνατότητα επιλογής ως προς την εφαρμογή
- Δυνατότητα παραγωγής εξαιρετικά ειδικού αντισώματος από μη καθαρό ανοσογόνο
- Διαθεσιμότητα αντισωμάτων έναντι πολλών και διαφορετικών και απομακρυσμένων επιτόπων του ιδίου αντιγόνου
- Δυνατότητα εύκολου καθαρισμού σε μεγάλες ποσότητες με μεθόδους που δεν καταστρέφουν την ανοσοδραστικότητα
- Καθαρά αντιδραστήρια που δίνουν χαμηλό σήμα υποβάθρου (background) και μη-ειδικής σύνδεσης (non specific binding, NSB)
- Συνήθως δεν παρεμποδίζουν τη βιολογική δραστηριότητα του αντιγόνου (π.χ ενζύμου)

Μειονεκτήματα Μονοκλωνικών Αντισωμάτων

- Συνήθως χαμηλότερη χημική συγγένεια έναντι των πολυκλωνικών
- Εξάρτηση από ένα και μόνο επίτοπο, ο οποίος σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να μην είναι αντιπροσωπευτικός για το αντιγόνο ως σύνολο (σε περιπτώσεις πολυμορφικών επιτόπων)
- Πιθανότητα εμφάνισης ασυνήθιστων φυσικών ιδιοτήτων που εξαρτώνται από τον συγκεκριμένο ιδιότυπο
- Δεν εμφανίζουν ιδιότητες καθίζησης ή συγκόλλησης

Είδη Μονοκλωνικών Αντισωμάτων



- Μονοκλωνικά Αντισώματα Επιφανείας
- Μονοκλωνικά Αντισώματα ειδικά για το κυτταρόπλασμα (σημαντικό το μέγεθος αντισώματος και φθορίζουσας να είναι μικρό)

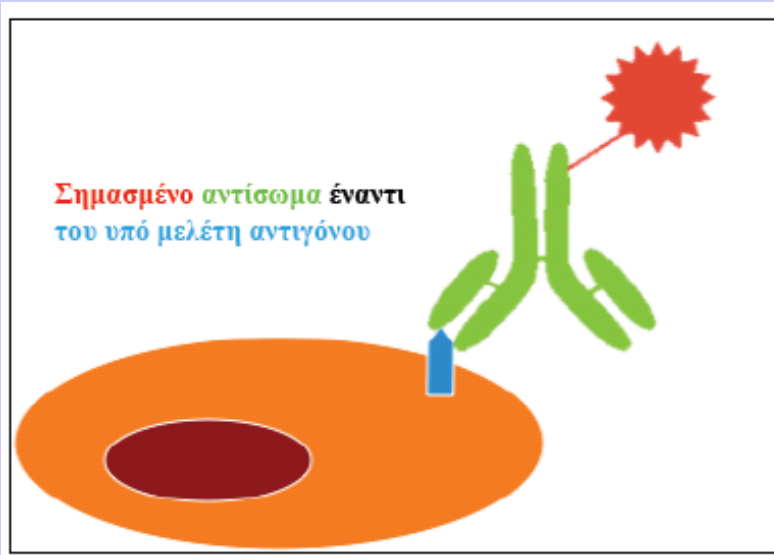
Ανοσοπροσδιορισμοί - Ανοσοφθορισμός

- Άμεσες μέθοδοι ανοσοπροσδιορισμών
- Έμμεσες μέθοδοι ανοσοπροσδιορισμών

ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΣ

Ο ανοσοφθορισμός είναι η μέθοδος κατά την οποία χρησιμοποιούνται φθορίζοντα αντισώματα για την ανίχνευση και εντόπιση αντιγόνου ή αντισώματος σε ιστούς ή κύτταρα.

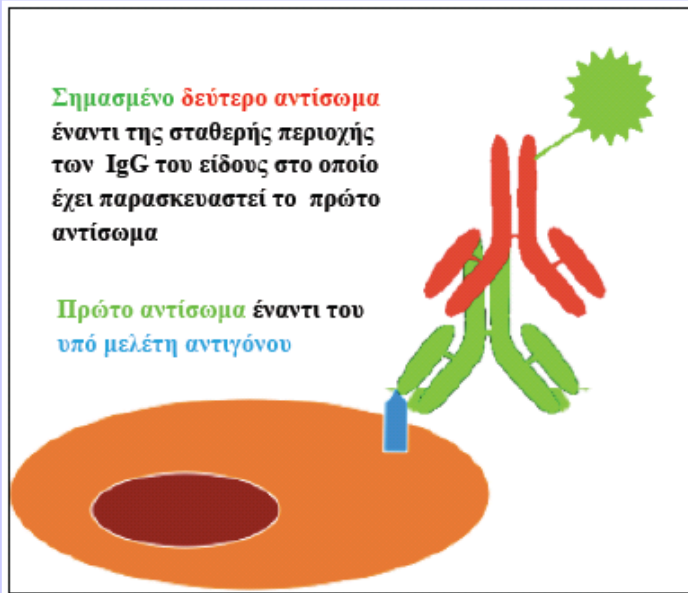
Άμεσες Μέθοδοι Ανοσοπροσδιορισμού



Εικόνα 6: Σχηματική απεικόνιση της άμεσης μεθόδου ανίχνευσης.

Στις άμεσες μεθόδους η ανίχνευση του συμπλέγματος αντιγόνου αντισώματος καθίσταται δυνατή λόγω της σύνδεσης πάνω στο μόριο του αντισώματος το οποίο αναγνωρίζει το υπό μελέτη αντιγόνο ενός μορίου αναφοράς όπως μια φθορίζουσα χρωστική, ενός ενζύμου, κολλοειδούς χρυσού, βιοτίνης κλπ (Εικόνα 6). Το βασικό πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι η ταχύτητα, αφού αποτελεί διαδικασία που ολοκληρώνεται σε ένα βήμα. Ωστόσο, σε σχέση με τις έμμεσες μεθόδους μειονεκτεί σημαντικά όσον αφορά την ευαισθησία της.

Έμμεσες Μέθοδοι Ανοσοπροσδιορισμού



Εικόνα 7: Σχηματική απεικόνιση έμμεσης μεθόδου ανίχνευσης.

Οι έμμεσες μέθοδοι είναι μέθοδοι δύο ή περισσότερων βημάτων:

1^ο Βήμα: Αλληλεπίδραση του αντισώματος με το αντιγόνο που αναγνωρίζει

2^ο Βήμα: Επώαση του συμπλέγματος αντιγόνου-πρώτου αντισώματος με δεύτερο αντίσωμα το οποίο αναγνωρίζει το σταθερό τμήμα των IgG του ζωϊκού είδους στο οποίο έχει δημιουργηθεί το πρώτο αντίσωμα (Εικόνα 7).

Το δεύτερο αντίσωμα είναι συνδεδεμένο με μια φθορίζουσα ομάδα ή κάποιο ένζυμο (π.χ. υπεροξειδάση) ή άλλο μόριο (π.χ. βιοτίνη) που καθιστά δυνατή την ανίχνευση του συμπλέγματος. Σε πολλές περιπτώσεις, ειδικά όταν τα επίπεδα του υπό μελέτη αντιγόνου είναι χαμηλά χρησιμοποιούνται έμμεσες μέθοδοι ενίσχυσης περισσότερων βημάτων.

Επίδραση παρουσίας Ρευματοειδών Παραγόντων στους ανοσοχημικούς προσδιορισμούς

- Οι ρευματοειδείς παράγοντες είναι κυρίως μόρια IgM τα οποία κατευθύνονται έναντι ανθρώπινης IgG
- Αντιδρούν με την Fc περιοχή των IgG
- Συχνά παρατηρούνται και διασταρούμενες αντιδράσεις με αντισώματα άλλων ειδών, πχ ποντίκι, κουνέλι κ.ά.
- Το πρόβλημα μπορεί να αποφευχθεί και στις δύο περιπτώσεις με προσθήκη περίσσειας μη ειδικών αντισωμάτων ποντικού στο μίγμα της αντίδρασης

Επίδραση Fc υποδοχέων στους ανοσοχημικούς προσδιορισμούς

Οι **Fc υποδοχείς** είναι γλυκοπρωτεΐνες μοριακού βάρους 50-70 kD. Ανιχνεύονται κυρίως στα λευκά αιμοσφαίρια όπως στα μονοκύτταρα, τα B κύτταρα, τα T κύτταρα, τα κοκκιοκύτταρα καθώς και στην πλειονότητα των καρκινικών κυττάρων και κυτταρικών σειρών. Οι Fc υποδοχείς έχουν υψηλή συγγένεια με μια Fc περιοχή μονομερούς IgG ενώ δεν εμφανίζουν μη-ειδική δέσμευση (χρώση) και μπορεί να προκύψει θόρυβος (background staining) από την Fc περιοχή των ανοσοσφαιρινών στους Fc υποδοχείς που παρουσιάζονται στα κύτταρα. Παραδείγματα δειγμάτων πλούσιων σε Fc υποδοχείς είναι οι λεμφικοί ιστοί, μυελούς οστών, κύτταρα όγκων, κυτταρικά επιχρίσματα και καρκινικές σειρές μελανώματος.

Μπορεί να χρησιμοποιηθεί ένας **Fc Receptor Blocker** ως παράγοντας δέσμευσης (blocking agent) των Fc υποδοχέων των αιμοποιητικών κυττάρων καθώς και των λεμφικών ιστών και καρκινικών κυττάρων και καρκινικών σειρών. Η δέσμευση της Fc περιοχής της αρχικής (primary) ή της δεύτερης (secondary) ανοσοσφαιρίνης που βρίσκεται στην επιφάνεια των λευκών αιμοσφαιρίων ή των καρκινικών κυττάρων προκαλεί μη ειδική δέσμευση και παρατηρείται ως θόρυβος (background) ή ως μη ειδική χρώση στις τεχνικές ανοσοϊστοχημείας, φθορισμού και στις δοκιμασίες κυτταρομετρίας ροής, κάτι που παρεμποδίζεται με τη χρήση του Fc blocker.

Επίδραση Fc υποδοχέων και Fc- δεσμευτές (blockers) στους ανοσοχημικούς προσδιορισμούς

- Εφαρμογή Fc blockers γίνεται σε μη μονιμοποιημένα ζώντα κύτταρα και σε λειτουργικές δοκιμασίες

Διαδικασία που ακολουθείται στην κυτταρομετρία ροής

1. Λύση ή Απομόνωση Μονοπύρηνων κυττάρων
2. Προσθήκη 0.3 ml Fc receptor block στα 10^6 κύτταρα
3. Επώαση 30 min σε πάγο.
4. Πλύση με ρυθμιστικό διάλυμα (x2)
5. Χρώση με αντίσωμα

Επίδραση Fc υποδοχέων και κλάσματα Fab στους ανοσοχημικούς προσδιορισμούς

- Τα κλάσματα δέσμευσης αντιγόνου (antigen binding fragments, Fab) δε δεσμεύονται στους Fc υποδοχείς, μειώνοντας έτσι το πρόβλημα της μη ειδικής χρώσης.
- Τα κλάσματα Fab είναι χρήσιμα σε περιπτώσεις όπου είναι απαραίτητη η αποφυγή της διασταυρούμενης σύνδεσης αντιγονικών τόπων και /ή συγκόλλησης, παρόλο που η συγγένεια δέσμευσής τους είναι χαμηλότερη από αυτήν των αντισωμάτων από τα οποία προκύπτουν.
- Κλάσματα αντισωμάτων είναι εμπορικά διαθέσιμα με ή χωρίς σήμανση.

Μέθοδος χρώσης μη σημασμένου αντισώματος Zenon Technology

Εμπειρικά...

- Υπάρχουν ειδικά κιτ αναλόγως του είδους (π.χ. κουνελιού, ποντικού...), της τάξης (IgG, IgM..) και της υποκατηγορίας (π.χ. IgG1) του αντισώματος που χρησιμοποιείται.
- Απλή μέθοδος η οποία απαιτεί επώαση αντισώματος με φθορίζουσα ουσία περίπου 45 min.
- Πλεονέκτημα
Απλή διαδικασία και μειωμένο κόστος
- Μειονέκτημα
Επανάληψη της διαδικασίας κάθε φορά που θα χρειαστεί να χρησιμοποιηθεί το αντίσωμα
- Συνήθως χρήση 1 μg αντισώματος ανά αντίδραση
- Αναλογία αντισώματος/φθορίζουσας ουσίας 1/3

Μέθοδος χρώσης μη σημασμένου αντισώματος Zenon Technology II

Εμπορικά...

invitrogen *Fluorescence reagents-Zenon® Labeling*

~ 1 µg primary antibody

↓

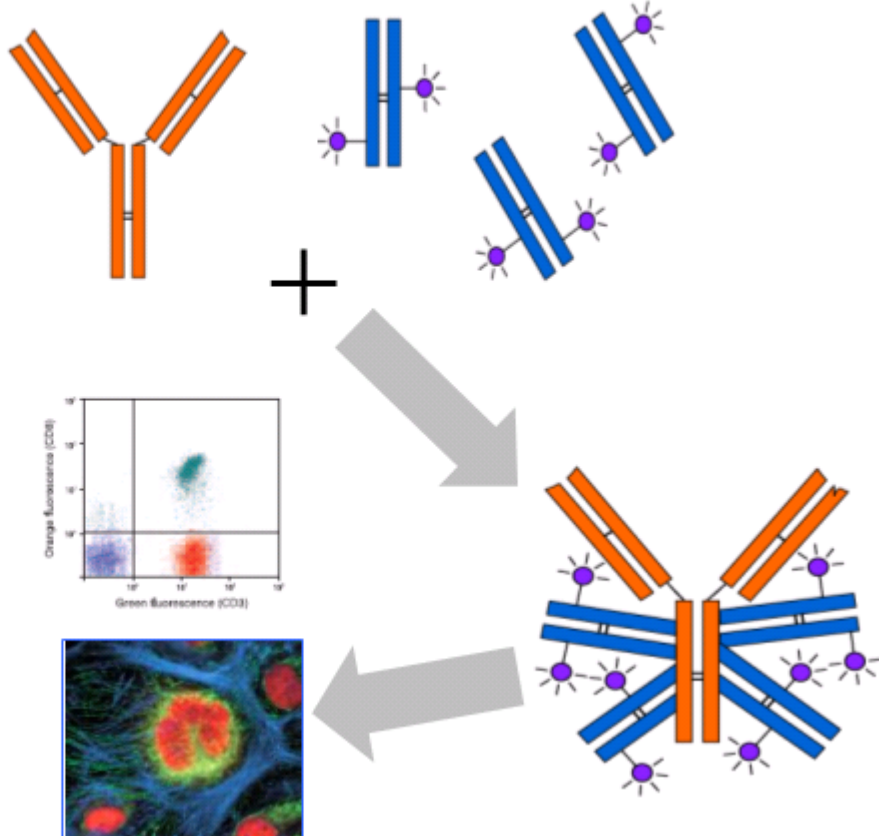
Add Zenon® reagent at desired molar ratio

↓

Incubate 5 minutes ???

↓

Block with non-specific IgG & Use directly



The diagram illustrates the Zenon labeling process. It starts with an orange Y-shaped primary antibody and blue Y-shaped Zenon reagents, each with a purple starburst representing a reactive group. A plus sign indicates their combination. An arrow points to the resulting labeled antibody, where the orange primary antibody is covalently linked to the blue Zenon reagent. A second arrow points to a flow cytometry plot showing Orange Fluorescence (CD8) on the y-axis and Green Fluorescence (CD3) on the x-axis, with a distinct population in the upper right quadrant. A final arrow points to a fluorescence microscopy image of cells, showing a cell with a red nucleus and green cytoplasm, surrounded by other cells with red and green signals.

Μέθοδος χρώσης μη σημασμένου αντισώματος Zenon Technology III



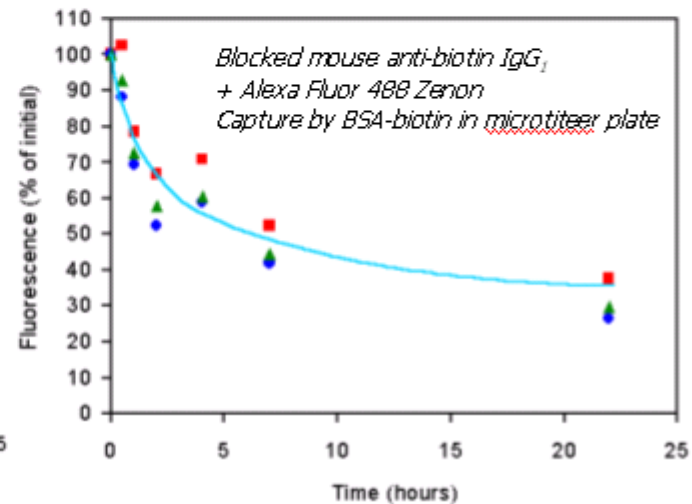
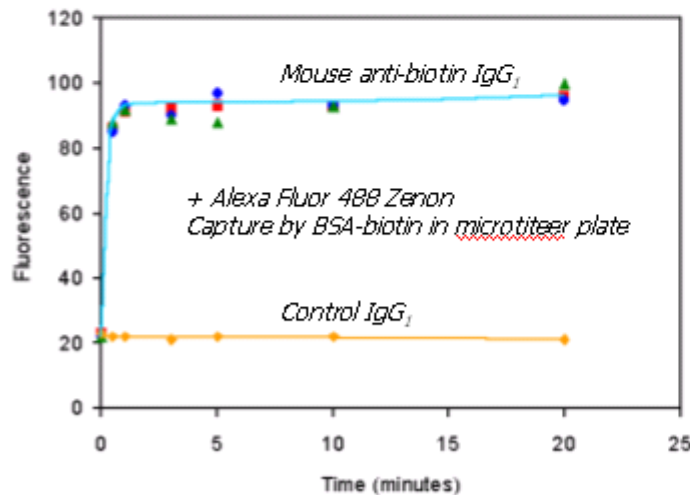
Zenon labeling technology- Stability

Kinetically trapped complex formation: key to making the system work.

Fast complex formation



Slow complex dissociation



Μέθοδος χρώσης μη σημασμένου αντισώματος Zenon Technology IV



WHY use ZENON?

- **Simple**
No need to use secondary antibodies anymore
- **Speed**
Zenon labeling complexes are ready to use for cell staining within **5 minutes...** ???
- **Quantitative Labeling**
100% of the primary antibody sample is labeled.
- **No Preparation**
Removal of exogenous proteins such as serum albumin from primary antibody samples is unnecessary.
- **Compatibility**
Multiple Zenon One-labeled mouse antibodies can be used in the same immunolabeling protocol.
- **Economy**
A standard Zenon labeling requires only 1 µg of primary antibody (versus 100 µg for chemical labeling).
Save time and money.

Βιβλιογραφία- Πηγές

- Λιανίδου, Ε. Σ., 2003, Τεχνικές Μοριακής Διαγνωστικής, Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Ειδίκευσης στην Κλινική Χημεία. Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Χημείας.
- Στυλιανοπούλου, Η., Ανοσοϊστοχημεία – Ανοσοφθορισμός
<http://d1mqv16b9gxt7.cloudfront.net/images/CH-gr.pdf>
- Shapiro, H., Practical flow cytometry. 4th ed. John Wiley & Sons Inc. 2003, ch.7.7.
- <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/brands/Molecular-Probes/Key-Molecular-Probes-Products/Zenon-Labeling-Technology.html>
- Dimitriadis, G., Maratou, E., Boutati, E., Psarra, K., Papasteriades, Ch. and Raptis, S. A., Evaluation of Glucose Transport and Its Regulation by Insulin in Human Monocytes Using Flow Cytometry, *Cytometry Part A*, 2005, 64A, 27–33.