



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»*

**ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ**  
**ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ**

**Άννα-Μαρία Ψαρρά**  
**Λάρισα, 2014**

# Μελέτη αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών

---

## 1.

### Ανοσοκατακρήμνιση

- a) Σύνδεση αντισώματος με χρωματογραφική στήλη (Σφαιρίδια αγαρόζης συνδεδεμένα με πρωτεΐνη A)
  - a) Επώαση πρωτεΐνης-στήλης με βιολογικό εκχύλισμα
- b) Σύνδεση των πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη, στο σύμπλοκο στήλης – πρωτεΐνης
  - c) Απομόνωση και χαρακτηρισμός των πρωτεϊνών

### 2<sup>A</sup> Pull Down

- a) Παρασκευή His-Tag ή GST- χιμαιρικών πρωτεϊνών
- b) Σύνδεση των πρωτεϊνών με κατάλληλη στήλη χρωματογραφίας
- c) Επώαση του συμπλόκου χιμαιρικών πρωτεϊνών - στήλη με βιολογικό εκχύλισμα
- d) Σύνδεση των πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με την χιμαιρική πρωτεΐνη
- e) Απομόνωση και χαρακτηρισμός των πρωτεϊνών (π.χ. πρωτεομική ανάλυση)

### 2<sup>B</sup> Pull Down

- a) Παρασκευή His-Tag ή GST- χιμαιρικών πρωτεϊνών
- b) Σύνδεση των πρωτεϊνών με κατάλληλη στήλη χρωματογραφίας
- c) Επώαση του συμπλόκου χιμαιρικών πρωτεϊνών - στήλη με *in vitro* εκφρασμένη πρωτεΐνη
- d) Σύνδεση των πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με την χιμαιρική πρωτεΐνη
- e) Ηλεκτροφόρηση Αυτοραδιογραφία)

## 3.

### FRET ανάλυση (Κεφάλαιο Συνεστιακής Μικροσκοπίας)

## 4.

### Surface plasmon resonance

# ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑΣ

---

Χρωματογραφία συγγένειας

Μέθοδος διαχωρισμού βιοχημικών μορίων

Βασίζεται στις αντιστρεπτές **ισχυρές χημικές αλληλεπιδράσεις βιολογικών μορίων** όπως:

**αλληλεπιδράσεις αντιγόνου-αντισώματος**  
**αλληλεπιδράσεις ενζύμου-υποστρώματος**  
**αλληλεπιδράσεις υποδοχέα-προσδέτη**

Η μέθοδος αναπτύχθηκε από τους Cuatrecasas P, Wilchek M, και Meir Wilchek οι οποίοι τιμήθηκαν με το βραβείο Wolf Prize ιατρικής το 1987.

# ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑΣ

## Αρχές χρωματογραφίας συγγένειας

1.

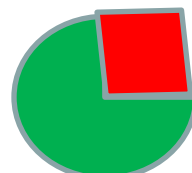


Σφαιρίδια

+

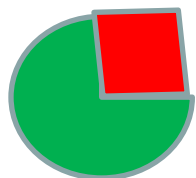


Προσδέτης



Ακίνητοποίηση προσδέτη

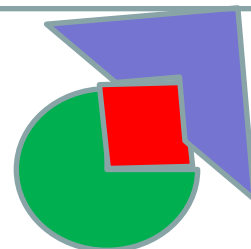
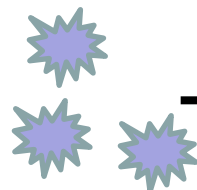
2.



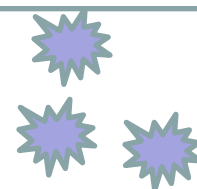
+



+

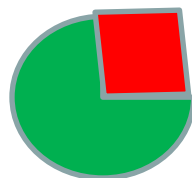
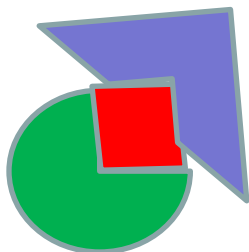


+

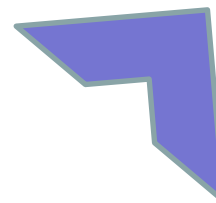


Ακίνητοποιημένος Μόριο Στόχος Προσμείξεις Σύμπλοκο Προσμείξεις  
προσδέτης

3.



+



Σύμπλοκο

Απομόνωση μορίου στόχου

# ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑΣ-ΑΝΟΣΟΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗ

---

**Ακίνητη φάση - στήλη χρωματογραφίας συγγένειας:** σφαιρίδια συνήθως αγαρόζης, σεφαρόζης (γραμμικός υδατάνθρακας, πολυμερές σακχαρίτη) ή μαγνητικά

**Υλικό προς ανάλυση:**

ετερογενές μίγμα μορίων σε διάλυμα

π.χ. εκχύλισμα κυττάρων,  
υλικό ανάπτυξης κυττάρων  
ορός αίματος

Το μόριο που μας ενδιαφέρει πρέπει να έχει μία χαρακτηριστική ιδιότητα (χημική συγγένεια) την οποία αξιοποιούμε κατά τη διαδικασία

# ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑΣ

---

## Στάδια διαδικασίας

1. Παγίδευση του μορίου που μας ενδιαφέρει λόγω της μοναδικής χημικής συγγένειας του με συστατικά της στατικής φάσης ή υλικού
2. Τα υπόλοιπα μόρια του προς εξέταση μίγματος που δεν έχουν τη συγκεκριμένη χημική ιδιότητα δεν προσδένονται και απομακρύνονται.
3. Έκπλυση της στήλης χρωματογραφίας
4. Έκλουση του μορίου που μας ενδιαφέρει με ένα διάλυμα που καταργεί την δυνατότητα χημικής αλληλεπίδρασής του με τη στήλη

# ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑΣ

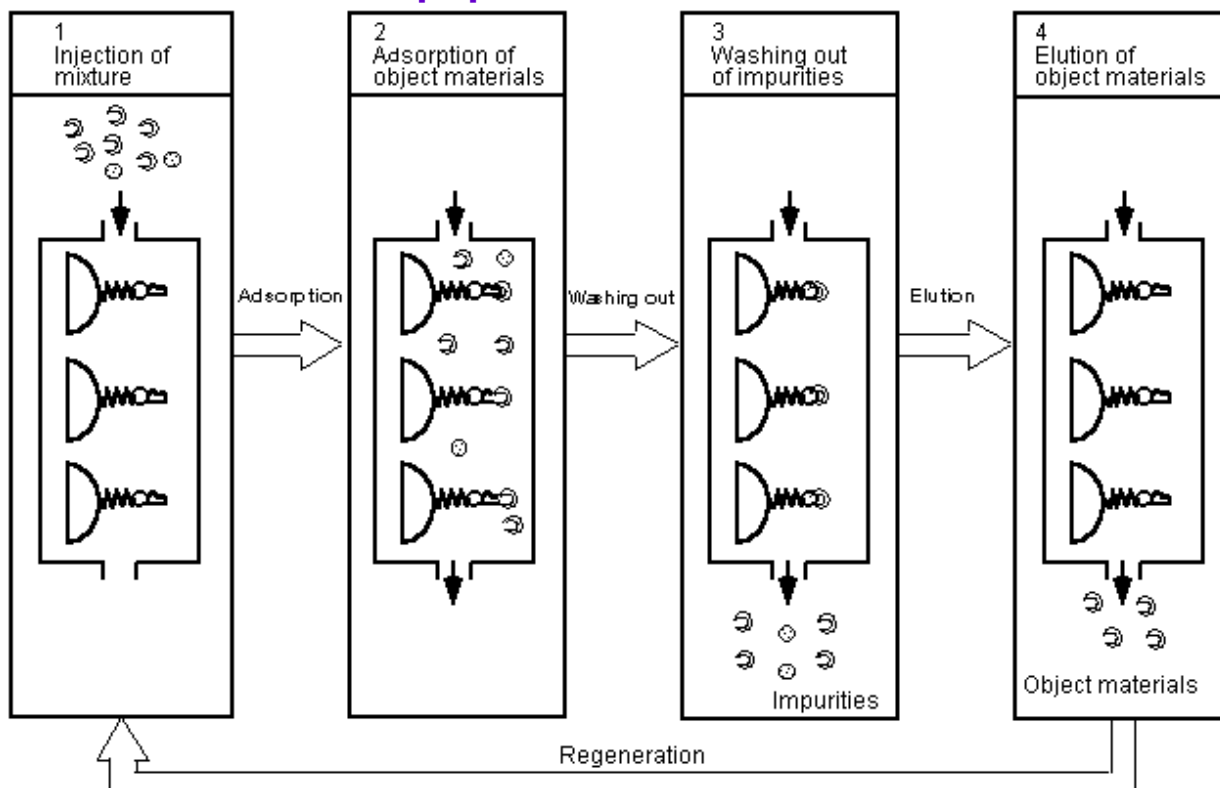
## Στάδια χρωματογραφίας συγγένειας

1. Ένεση του προς  
ανάλυση δείγματος

2. Ειδική  
σύνδεση  
των μορίων

3. Έκπλυση των  
μορίων που δεν  
προσδέθηκαν

4. Έκλουση των  
μορίων που  
συνδέθηκαν ειδικά

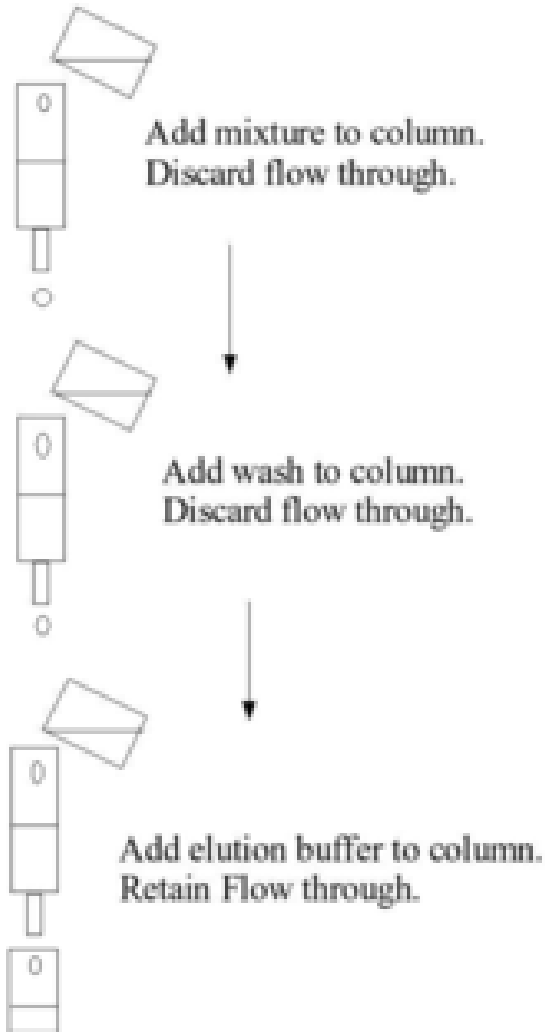


Matrix (Shodex GEL) Spacer Ligand Object material

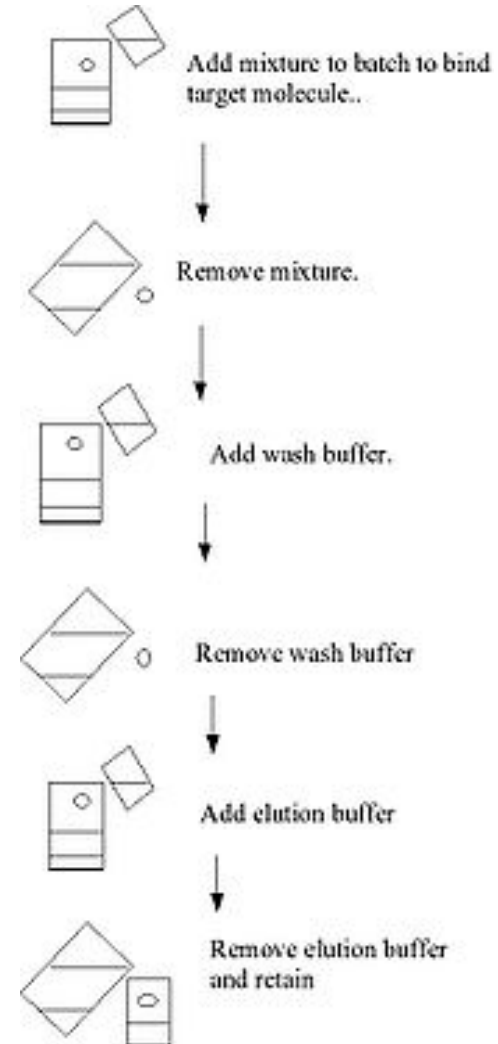


# ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑΣ

## Χρωματογραφία στήλης



## Χρωματογραφία σε μικρή κλίμακα



# ΑΝΟΣΟΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗ-ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑΣ

---



Σφαιρίδια



Αγαρόζης

Σεφαρόζης

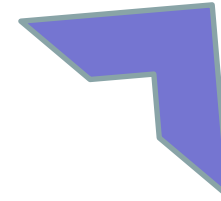
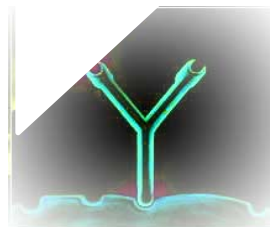
Μαγνητικά



Προσδέτης



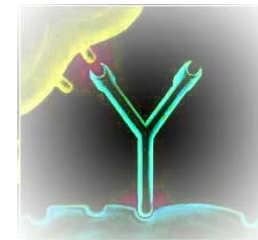
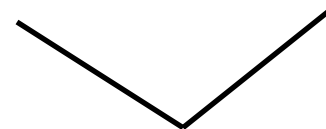
Αντίσωμα



Μόριο Στόχος



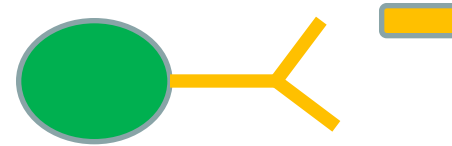
Αντιγονικός επίτοπος  
Πρωτεΐνης X



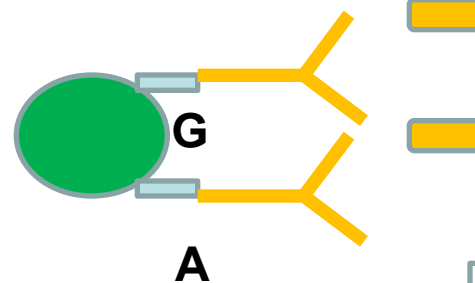
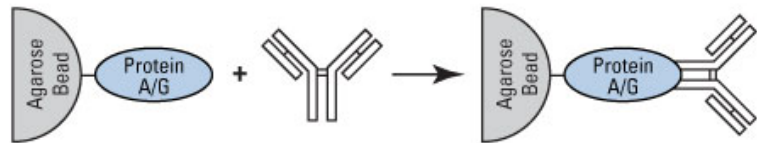


# ΣΥΝΔΕΣΗ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ ΜΕ ΣΦΑΙΡΙΔΙΑ



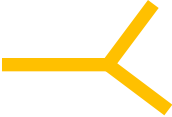

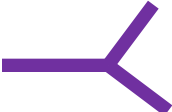
➤ Απευθείας σύνδεση αντισώματος με σφαιρίδια



➤ Ακινητοποίηση πρωτεΐνης A, G, ή A/G με σφαιρίδια και πρόσδεση αντισώματος πάνω στις πρωτεΐνες A, G, ή A/G



➤ Σύνδεση αντισώματος έναντι ετικέτας πρωτεΐνης στόχου

-  Πρωτεΐνη A ή G
-  Αντιγόνο, πρωτεΐνη στόχος
-  Αντίσωμα έναντι πρωτεΐνης στόχου
-  χιμαιρική πρωτεΐνη ετικέτας-πρωτεΐνης στόχου
-  Αντίσωμα έναντι ετικέτας πρωτεΐνης στόχου

3.



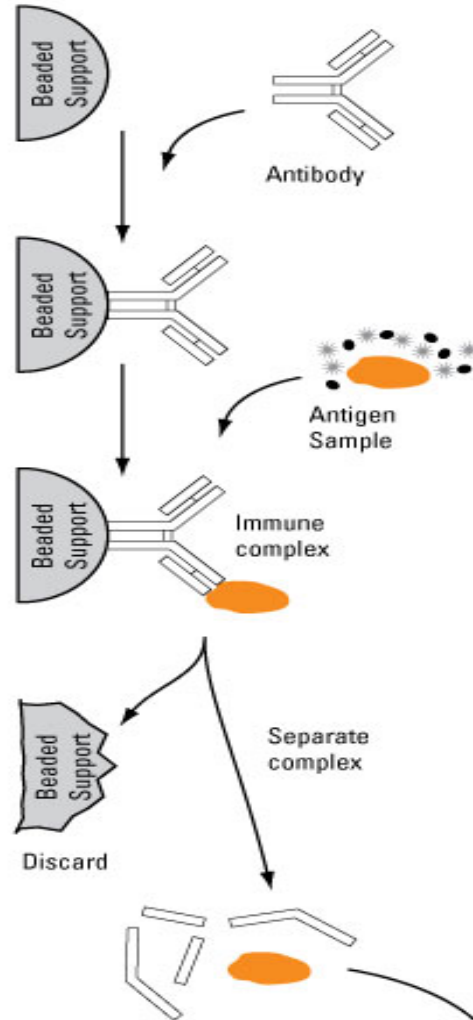
Σε περίπτωση που δεν υπάρχει διαθέσιμο αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης στόχου



# ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΙΚΗ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΑΝΟΣΟΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗΣ

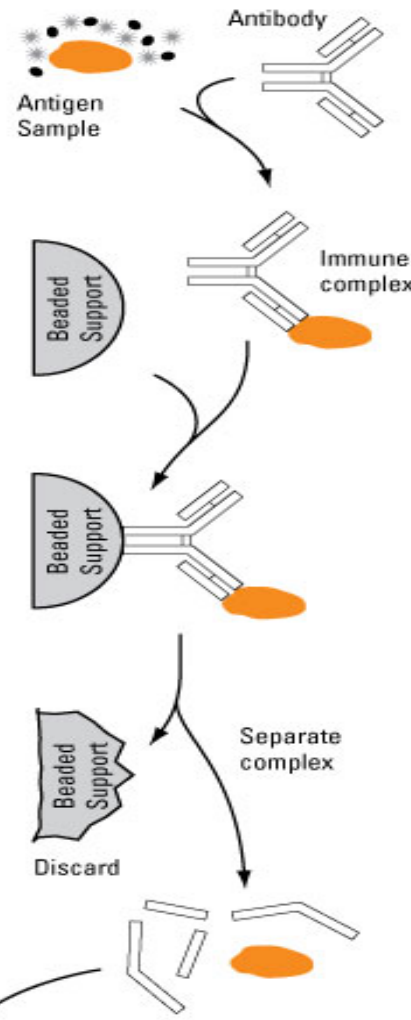
**A**

Pre-immobilized antibody approach



**B**

Free antibody approach

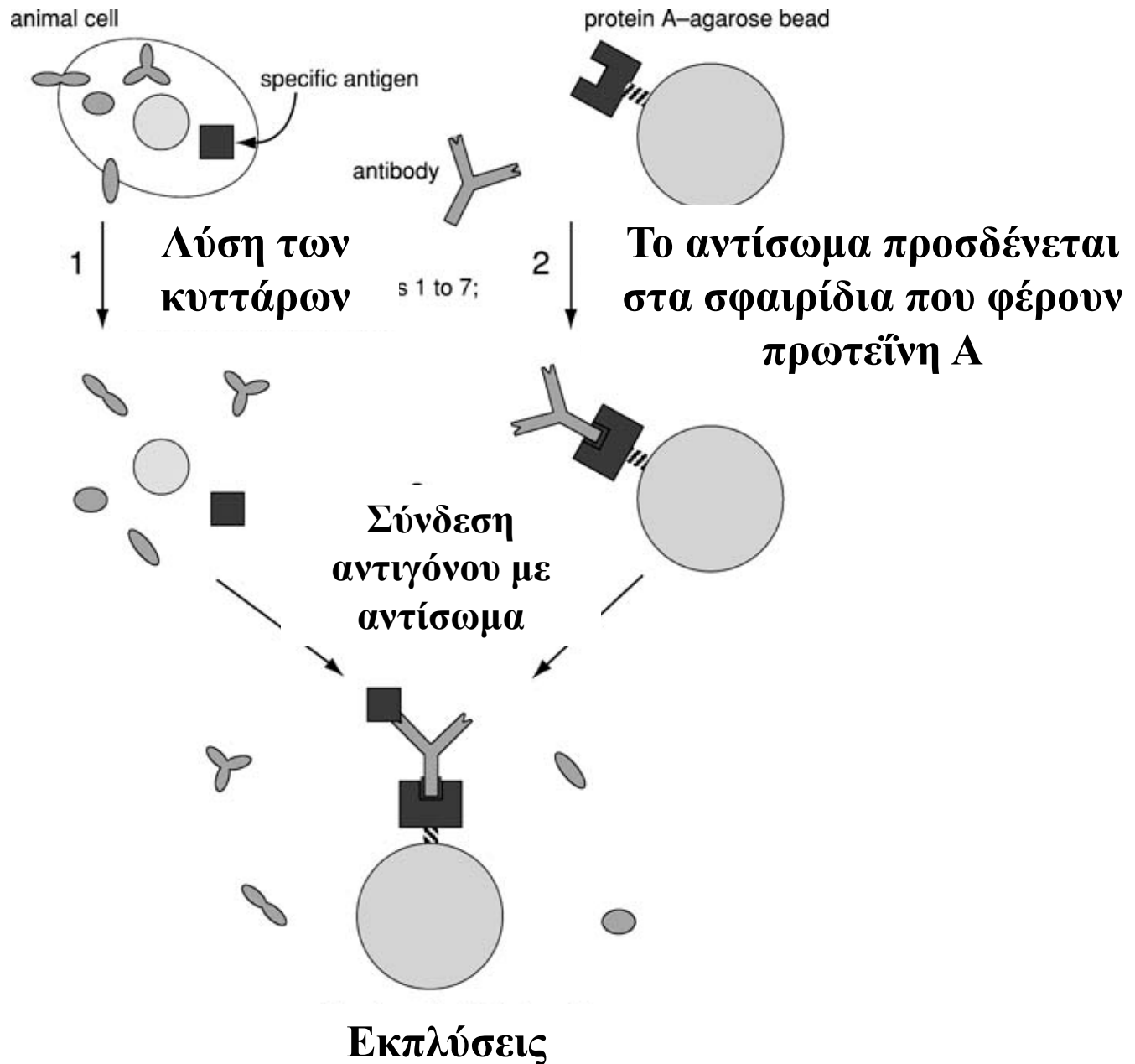


Β. Πρόσδεση αντιγόνου αντισώματος και κατόπιν πρόσδεση του συμπλόκου στα σφαιρίδια

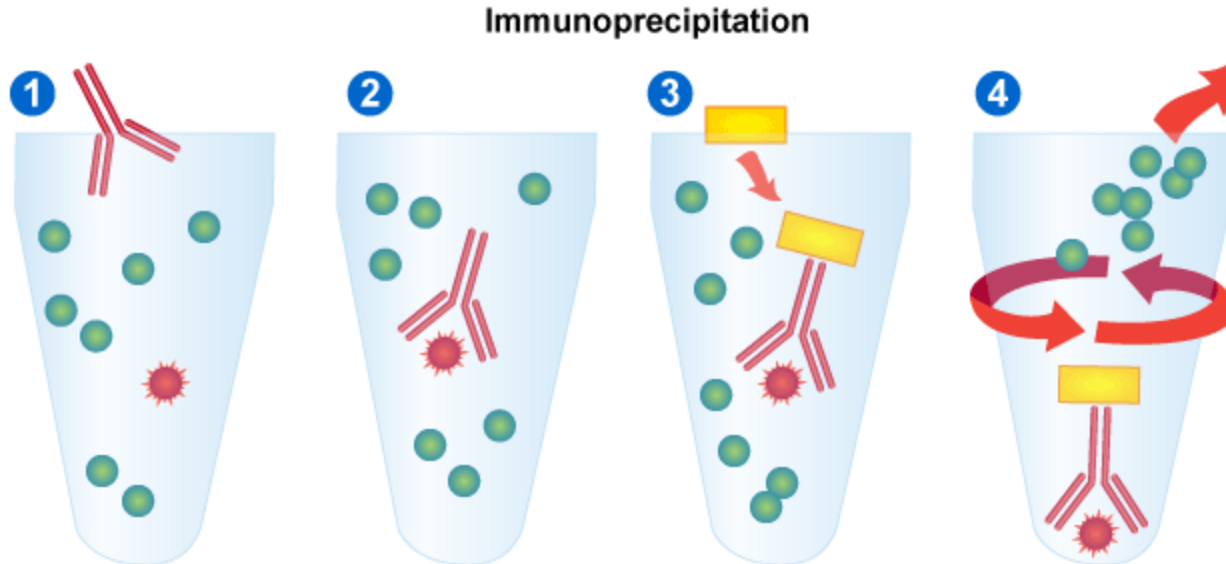
Α. Ακίνητοποίηση αντισώματος με τα σφαιρίδια και κατόπιν επώαση με το δείγμα που περιέχει το αντιγόνο

Analyze precipitated antigen

# Ανοσοκατακρήμνιση- πρωτεϊνών από κυτταρικό εκχύλισμα



# ΑΝΟΣΟΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗ ΣΕ ΜΙΚΡΗ ΚΛΙΜΑΚΑ

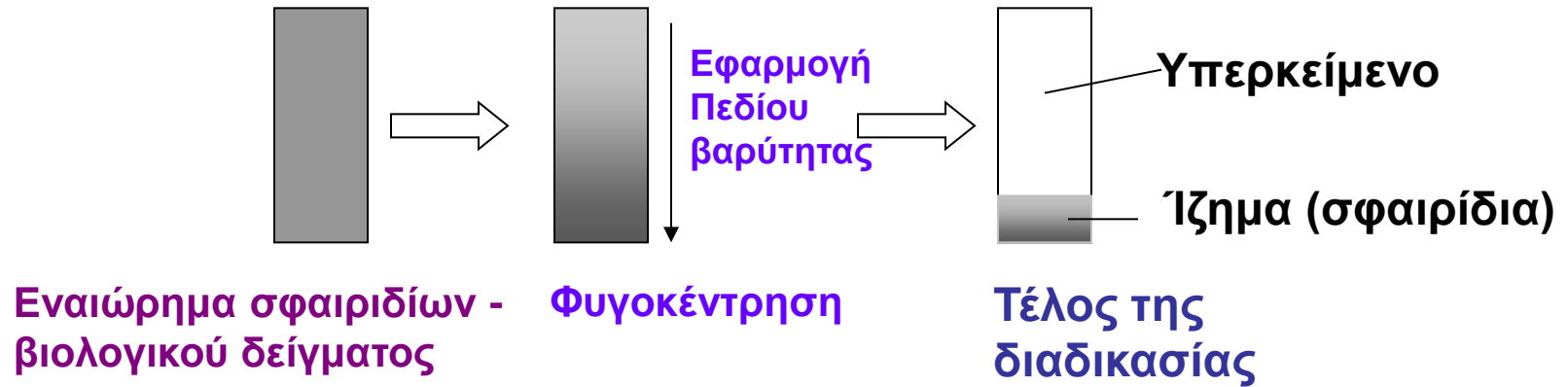


- 1** Suitable antibody is added.
- 2** Antibody binds to protein of interest.
- 3** Protein A or G added to make antibody-protein complexes insoluble.
- 4** Centrifugation of solution pellets antibody-protein complex. Removal of supernatant and washing.

*Diagram 1: Illustration of Immunoprecipitation process.*

Τα σφαιρίδια κατακρημνίζονται λόγω βαρύτητας σε συνθήκες περιβάλλοντος είτε με τη βοήθεια φυγοκέντρου

# Αρχή Μεθόδου Φυγοκέντρησης



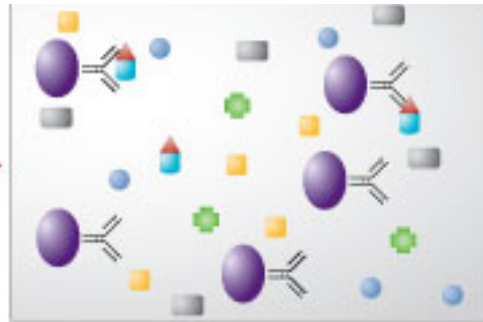


# ΣΥΝ-ΑΝΟΣΟΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗ

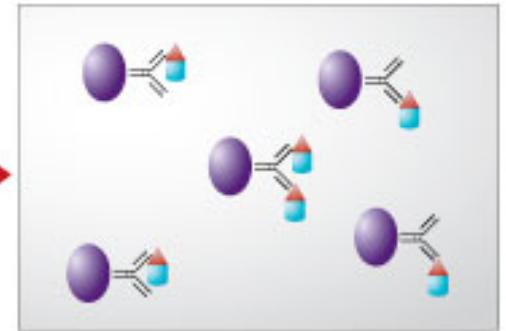
Κυτταρικό εκχύλισμα (ΚΕ)



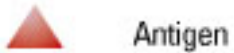
Επώαση ΚΕ με σύμπλοκο σφαιριδίων αντισώματος



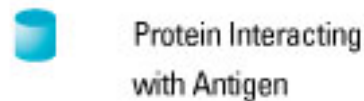
Σύνδεση αντιγόνου και πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με αυτό



Coupled Antibody



Antigen



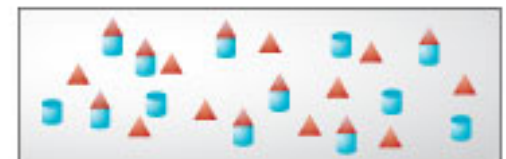
Protein Interacting with Antigen



Spin and wash



Elute



Φυγοκέντρηση και απομάκρυνση πρωτεϊνών που δεν αλληλεπιδρούν



Analyze

Έκλυση και ανάλυση αντιγόνου και μορίων που αλληλεπιδρούν με αυτό

# Χαρακτηρισμός συν-κατακρημισθέντων αλληλεπιδρώντων πρωτεϊνών

---

Ηλεκτροφόρηση συμπλόκου ανοσοκατακρημισθέντων πρωτεϊνών



Ταυτοποίηση συν-κατακρημισθέντων πρωτεϊνών

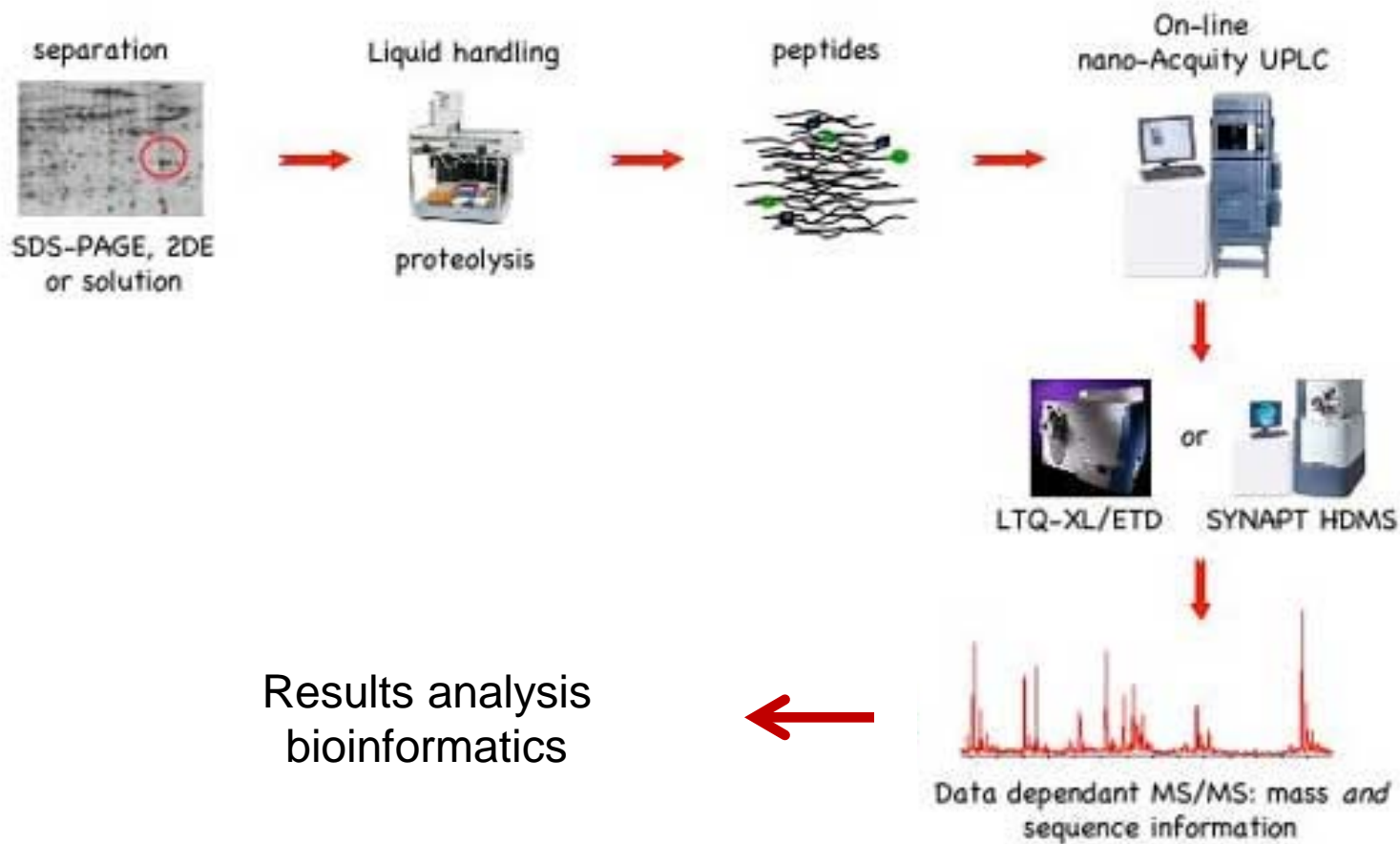
1. -πρωτεομική ανάλυση
2. -ανοσοαποτύπωση σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης  
χρήση κατάλληλων αντισωμάτων



Ταυτοποίηση αλληλεπιδρώντων πρωτεϊνών

# Χαρακτηρισμός ανοσοκατακρημνισθέντων πρωτεϊνών

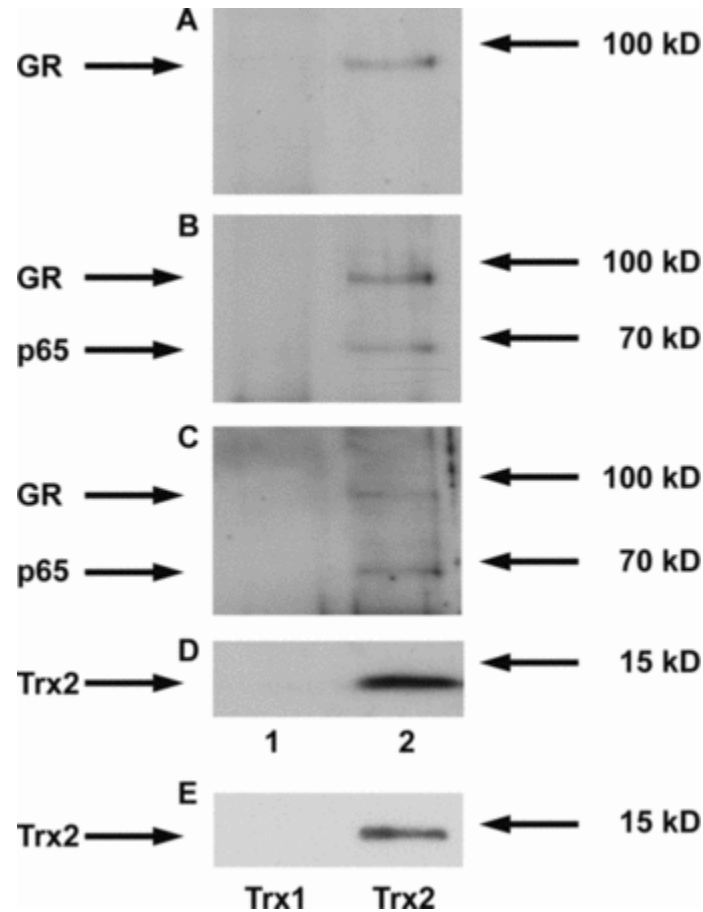
## 1. Πρωτεομική ανάλυση



# Χαρακτηρισμός ανοσοκατακρημνισθέντων πρωτεϊνών

## 2. Ανοσοαποτύπωση κατά Western

---



Biochem. J. (2009) 422 (521–531)

# Ανοσοκατακρήμιση Χρωματίνης (CHIP)

---

## Μεθοδολογία (CHIP)

Κύτταρα



Μονιμοποίηση αλληλεπιδράσεων  
Πρωτεϊνών-Πρωτεϊνών  
Πρωτεϊνών-DNA  
(φορμαλδεΐδη)



Λύση κυττάρων και τεμαχισμός DNA ( $\leq 300$  Kb)  
(χρήση υπερήχων)



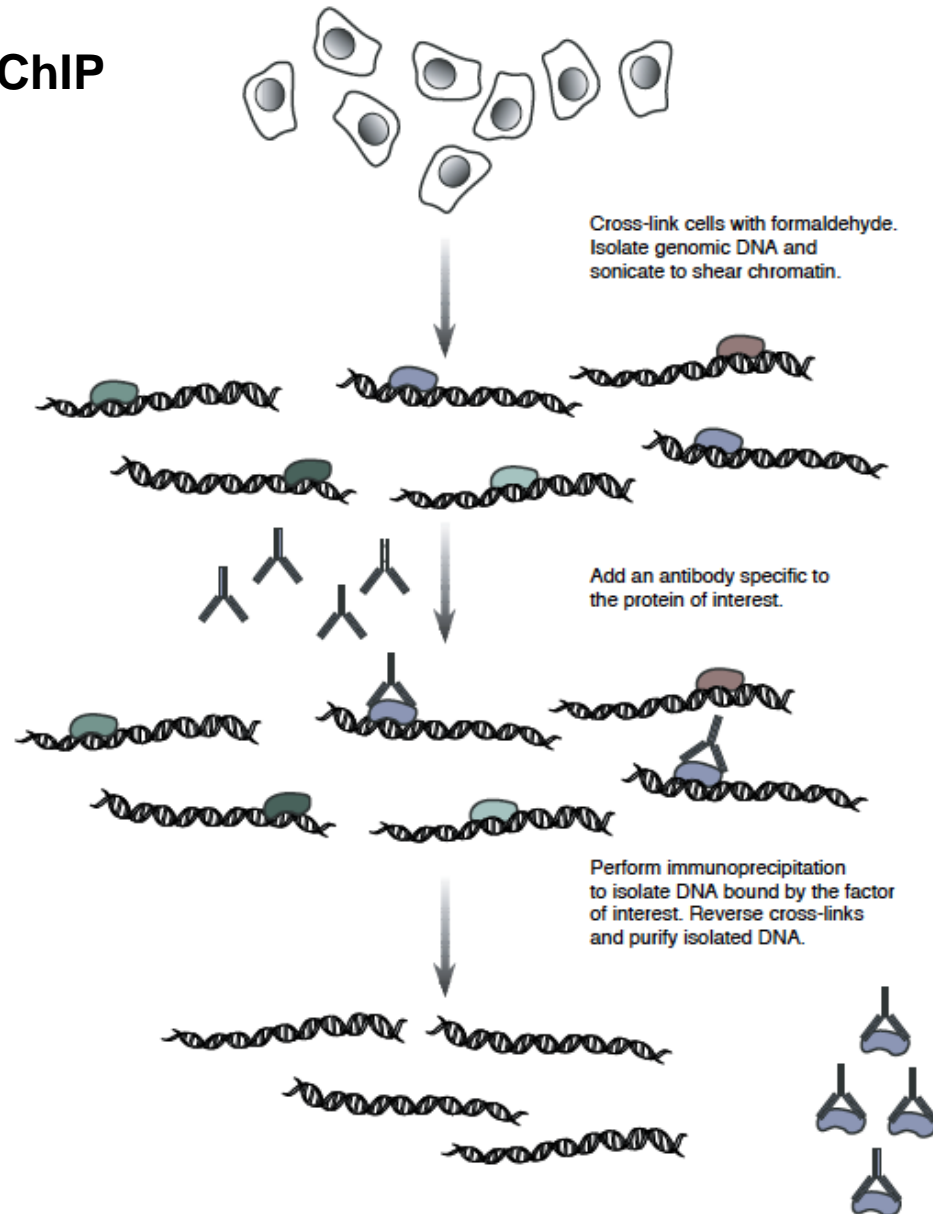
Ανοσοκατακρήμιση μεταγραφικού πρωτεϊνικού παράγοντα με  
(χρήση ειδικών αντισωμάτων)



Ανίχνευση σύνδεσης του υποδοχέα  
με συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA  
(PCR)

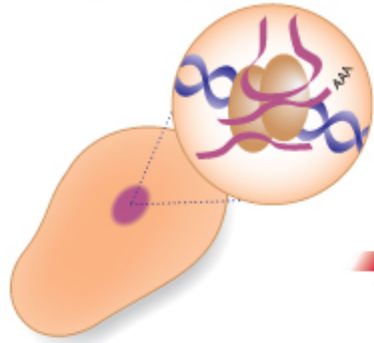
# Ανοσοκατακρήμιση Χρωματίνης (ChIP)

## Διαγραμματική απεικόνιση ChIP

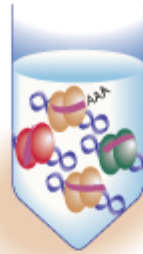


# Ανοσοκατακρήμνιση RNA (RIP)

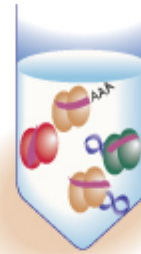
Cross-link protein to RNA & DNA in living cells with formaldehyde



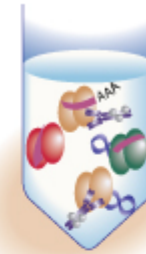
Lyse cells and shear both RNA & DNA by Sonication Shearing



Treat with DNase I to remove most DNA



Add Protein G Magnetic Beads & primary antibody of interest



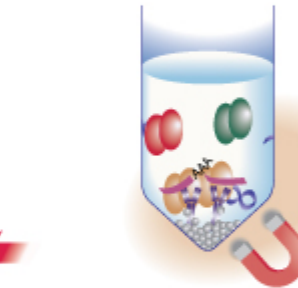
Analyze purified RNA using end point or real-time RT-PCR



Treat with DNase I again to remove any residual DNA



Elute RNA from Magnetic Beads, reverse protein/RNA cross-links, then extract the RNA



Immunoprecipitate antibody-bound protein/RNA complexes using Magnetic Beads and a magnet

## Flow chart of the RNA ChIP-IT™ process.

Live cells are fixed using formaldehyde, which cross-links and preserves protein/RNA interactions (as well as protein/DNA interactions). The RNA/DNA is then sheared into small, uniform fragments using sonication and, after a DNase treatment to remove residual DNA, specific protein/RNA complexes are immunoprecipitated using an antibody directed against the RNA-binding protein of interest. Following immunoprecipitation, cross-linking is reversed, the RNA is extracted then DNase I treated again (to remove residual DNA). The RNA is then analyzed by end point or real-time RT-PCR to determine which RNA fragments were bound by the protein of interest.

# ΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗ ΧΙΜΑΙΡΙΚΩΝ ΚΑΙ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΩΝΤΩΝ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ (Pull down από βιολογικό κυτταρικό εκχύλισμα )

A, B

A, B Δημιουργία χιμαιρικής πρωτεΐνης:  
Ετικέτα πρωτεΐνης X – πρωτεΐνη X

**ΠΡΩΤΕΙΝΗ X**

**ΕΤΙΚΕΤΑ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ X:**

**GST**

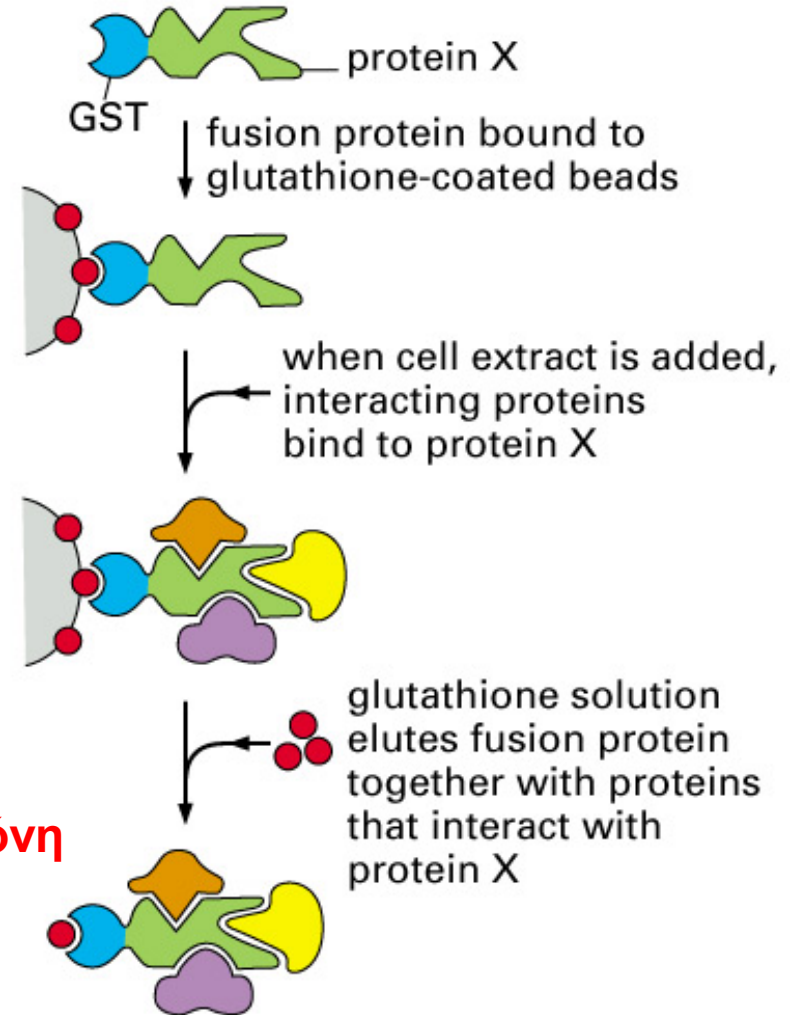
**HIS Tag (6XHIS)**

**στρεπταβιδίνη**

Η **GST** πρωτεΐνη συνδέεται ειδικά με **γλουταθειόνη**

Οι **6XHIS** με ιόντα **Νικελίου**

Η **στρεπταβιδίνη** με **αβιδίνη ή βιοτίνη**





# ΣΥΝ- ΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗ ΧΙΜΑΙΡΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΚΑΙ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΩΝΤΩΝ ΜΕ ΑΥΤΕΣ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ

---

**Το βιολογικό κυτταρικό εκχύλισμα μπορεί να περιέχει:**

**A) τα ενδογενή επίπεδα πρωτεϊνών**

**B) υπερεκφρασμένη την υπό μελέτη πρωτεΐνη μετά από διαμόλυνση των κυττάρων με κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα που φέρει το γονίδιο που κωδικοποιεί την υπό μελέτη πρωτεΐνη**

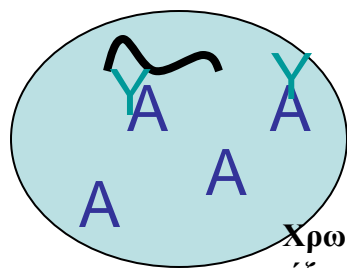
# ΣΥΝ- ΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗ ΧΙΜΑΙΡΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ

---

- Παρασκευή π.χ His-Tag ή GST- χιμαιρικών πρωτεϊνών
- Σύνδεση των πρωτεϊνών με κατάλληλη στήλη χρωματογραφίας
- Επώαση πρωτεΐνης-στήλης με βιολογικό εκχύλισμα
- Σύνδεση των πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη (σύμπλοκο στήλης – πρωτεΐνης –πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη)
- Απομόνωση και χαρακτηρισμός των πρωτεϊνών (πρωτεομική ανάλυση)

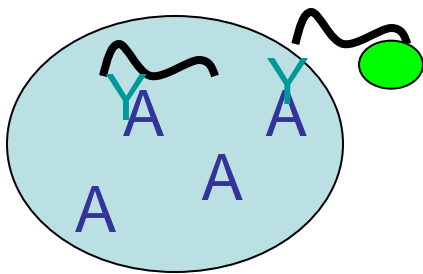
# Μελέτη Αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών

Απομόνωση πρωτεϊνών με χρωματογραφία συγγένειας  
Απομόνωση και χαρακτηρισμός πρωτεϊνών που συνκατακρημνίζονται  
άρα και αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη X

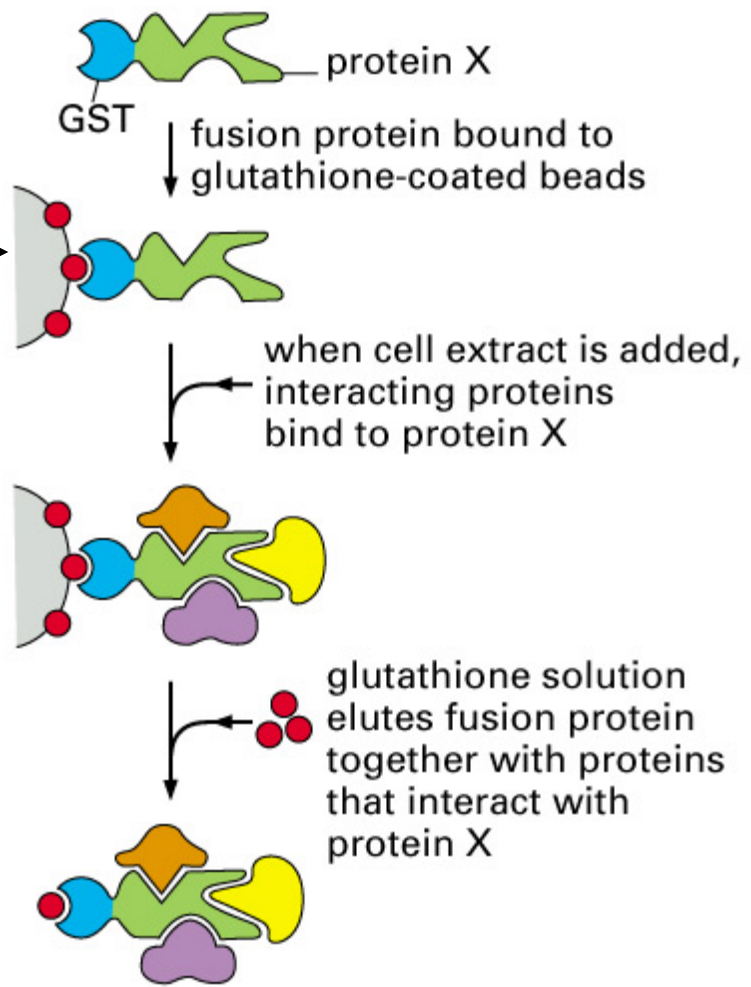


Χρωματογραφική στήλη  
αγαρόζης/σεφαρόζης συνδεδεμένη  
με γλουταθειόνη

## Χρωματογραφία συγγένειας



Απομόνωση πρωτεϊνών που  
αλληλεπιδρούν με την GST  
πρωτεΐνη



**Τυφλό:** Παράλληλα εκτελείται χρωματογραφία αναφοράς με την GST πρωτεΐνη

# ΣΥΝ - ΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗ ΧΙΜΑΙΡΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ (Pull down από in vitro εκφρασμένη πρωτεΐνη)

---

**1**

In vitro μετάφραση και έκφραση πρωτεΐνης (X) παρουσία **ραδιενεργού αμινοξέος**  
Π.χ μεθειονίνης

Η πρωτεΐνη στο σύνολο της μπορεί να ανιχνευτεί με αυτοραδιογραφία

**2**

Επώαση του μίγματος της ραδιενεργού πρωτεΐνης X με σφαιρίδια τα οποία φέρουν GST-Y χιμαιρική πρωτεΐνη

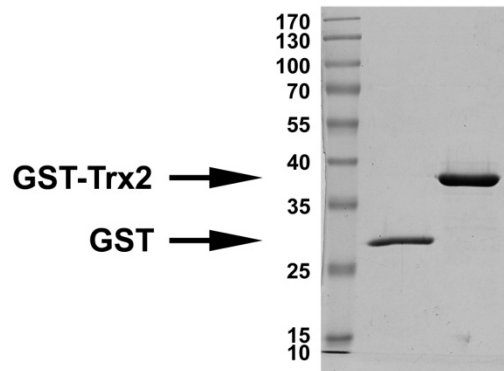


**5.** Ανίχνευση αλληλεπίδρασης της X με Y πρωτεΐνη με ηλεκτροφόρηση και αυτοραδιογραφία

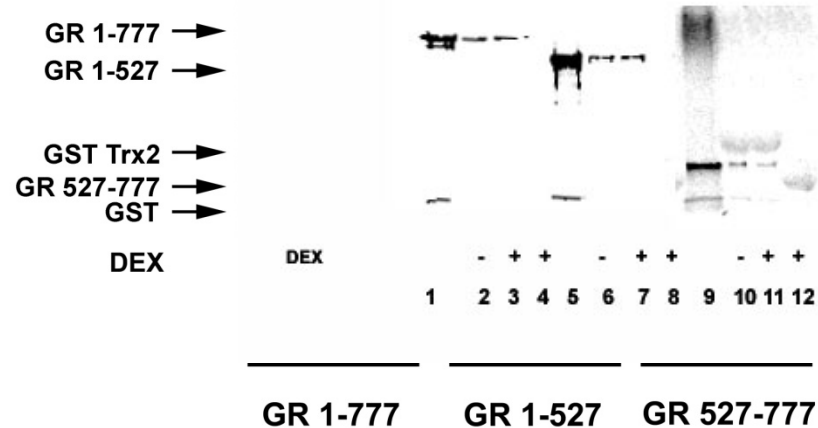
# ΣΥΝ - ΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗ ΧΙΜΑΙΡΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ (Pull down από in vitro εκφρασμένη πρωτεΐνη)

## Παράδειγμα Pull down πρωτεϊνών

**A**



**B**



**Υ πρωτεΐνη: GST-Trx2**

**Δείγμα αναφοράς (Τυφλό): GST**

**Χ πρωτεΐνη: GR**

# ΣΥΝ - ΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗ ΧΙΜΑΙΡΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ (Pull down από in vitro εκφρασμένη πρωτεΐνη)

---

**Απαντάει στο ερώτημα απευθείας άμεσης αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών**

**Δίνει τη δυνατότητα της ταυτοποίησης επακριβώς του τμήματος μίας πρωτεΐνης που αλληλεπιδρά με την άλλη**

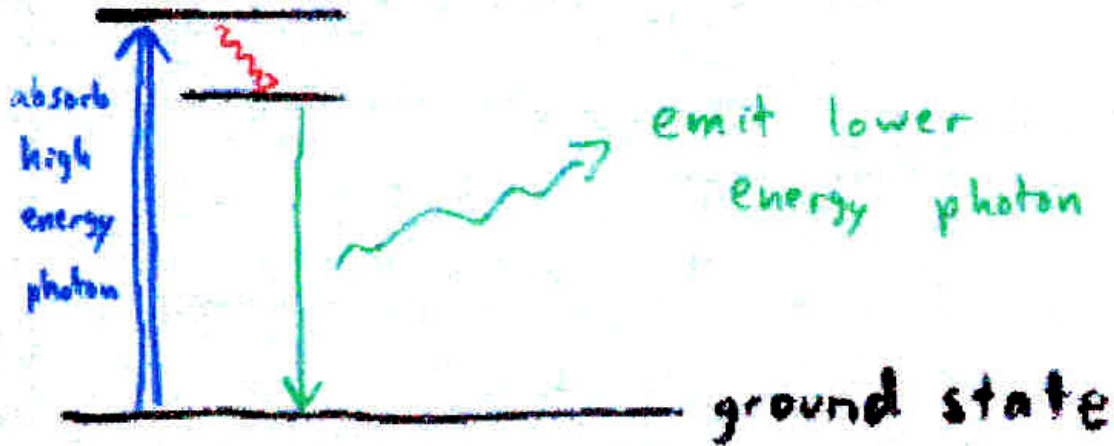
### **3. Μέθοδος FRET**

**Fluorescence resonance energy transfer**

**Μεταφορά ενέργειας συντονισμού φθορισμού**

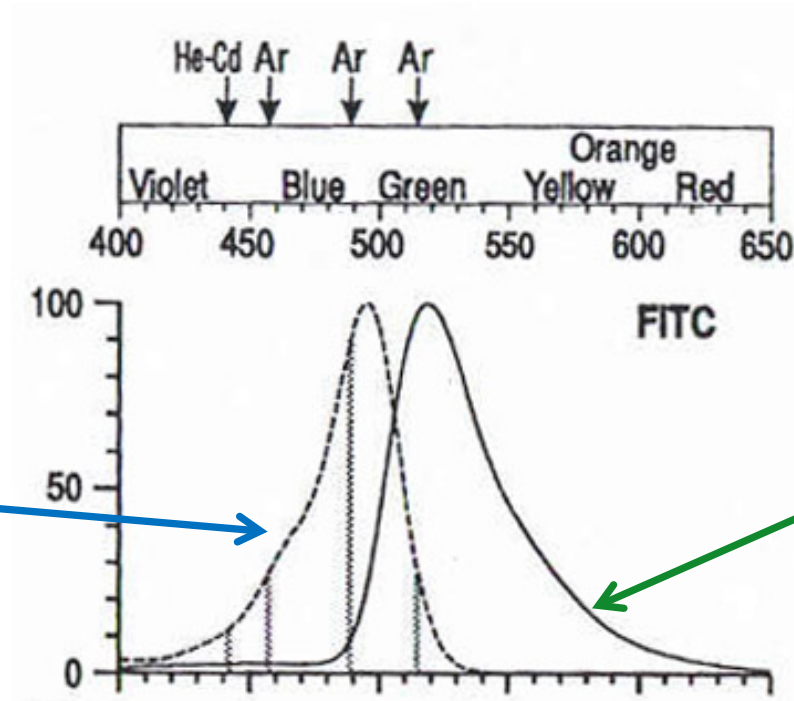
# Φθορισμός-Αρχή

What is fluorescence?





# FITC (Φλουροσκεΐνη)



Φάσμα διέγερσης

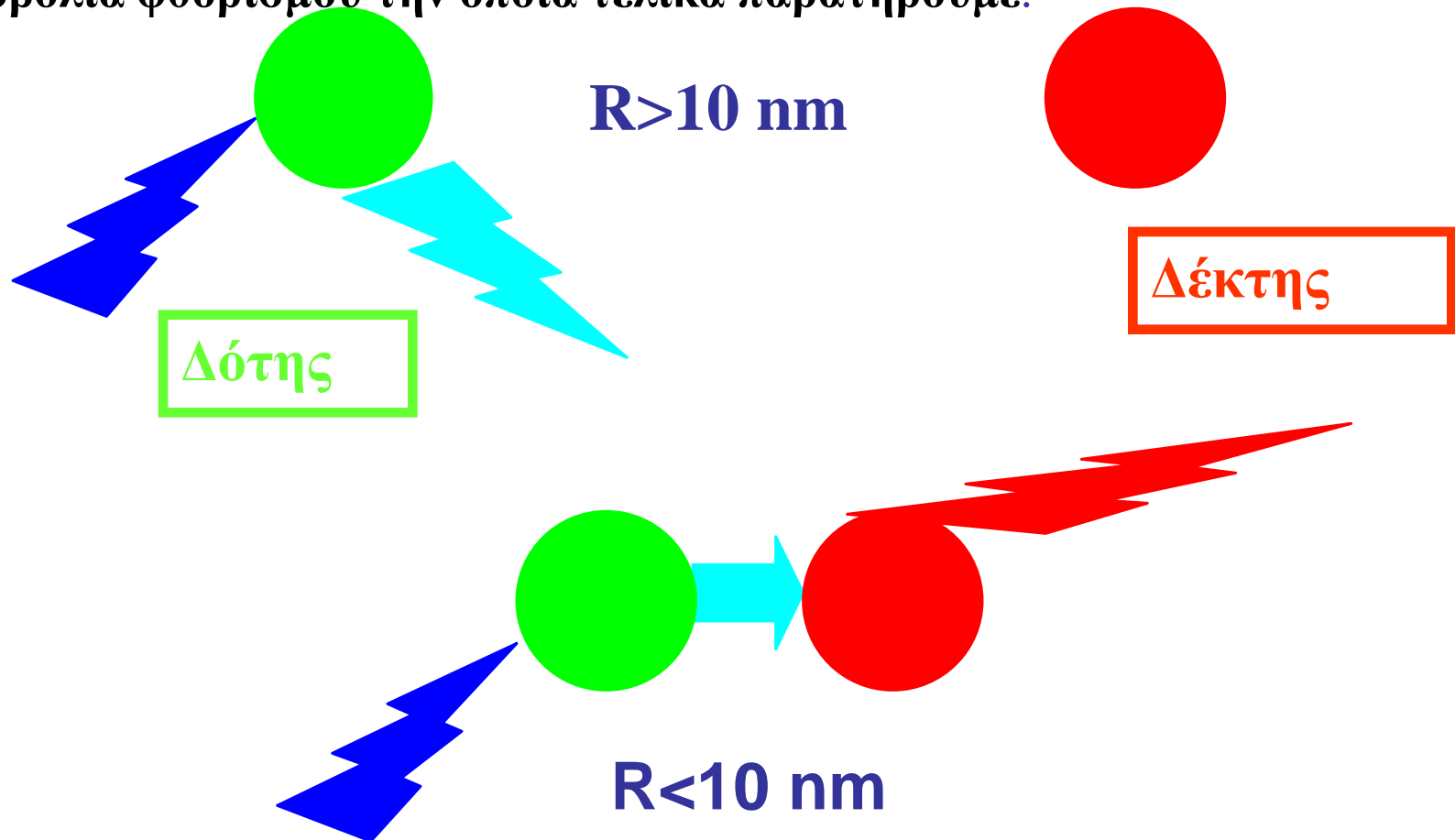
Φάσμα εκπομπής

Διέγερση με Laser Αργού (488 nm)

Εκπομπή (510-530 nm)

# Fluorescence Resonance Energy Transfer FRET(1)

Όταν δύο μόρια, ένα σημασμένο με κατάλληλο δότη, το άλλο με κατάλληλο δέκτη είναι επαρκώς κοντά άρα και αλληλεπιδρούν (τυπικά λιγότερα από 10 nm) ή ενέργεια διέγερσης από τον δότη μπορεί να μεταφερθεί στον δέκτη. Το φαινόμενο μπορεί να γίνει αντιληπτό. Δεδομένου ότι ο δέκτης διεγείρεται και εκπέμπει ακτινοβολία φθορισμού την οποία τελικά παρατηρούμε.



# FRET(2)

---

**Η ταχύτητα μεταφοράς της ενέργειας εξαρτάται από:**

- την απόσταση των δύο φθοροφόρων
- 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

# FRET(3)

---

## ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΕΠΙΛΟΓΗΣ ΦΘΟΡΙΖΩΝ ΟΥΣΙΩΝ

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.

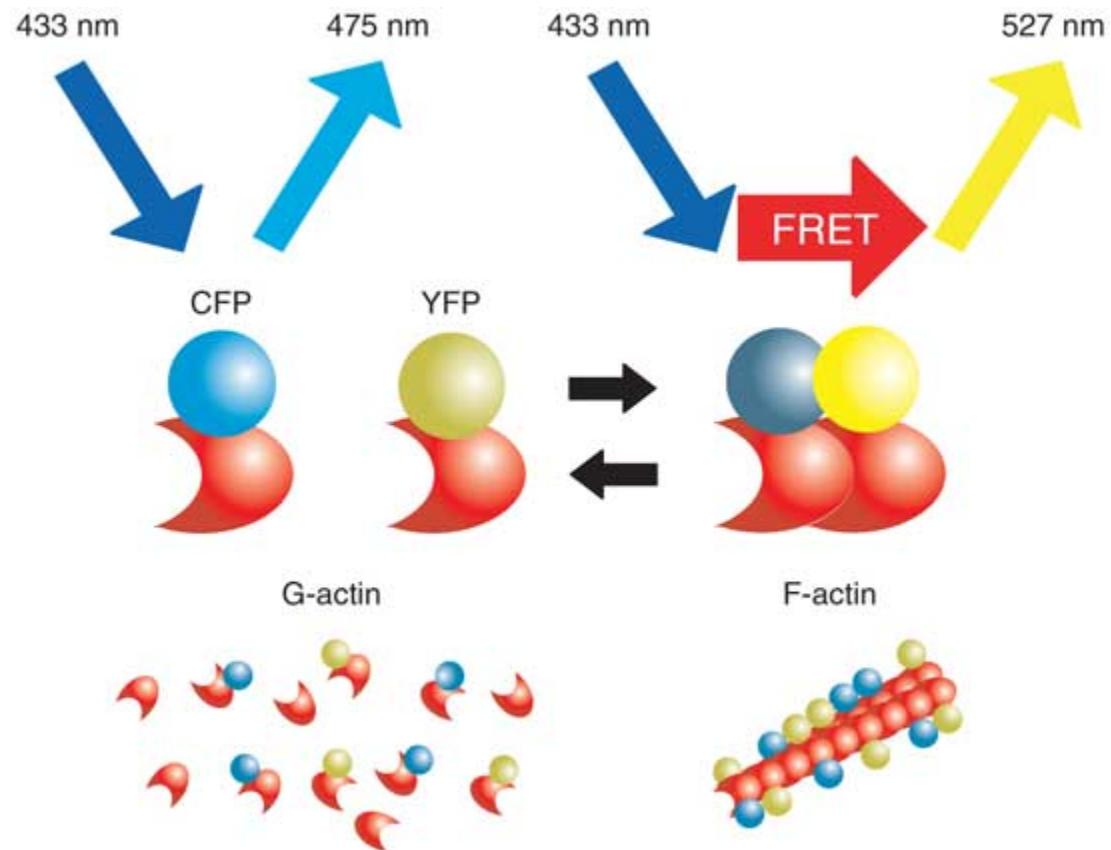
# Fluorescence Resonance Energy Transfer FRET(4)

---

Ο δέκτης εκπέμπει ακτινοβολία, μόνο εφόσον δεχθεί την ακτινοβολία εκπομπής του δότη. Αυτό συμβαίνει μόνο εφόσον τα μόρια είναι πάρα κοντά, άρα και αλληλεπιδρούν.

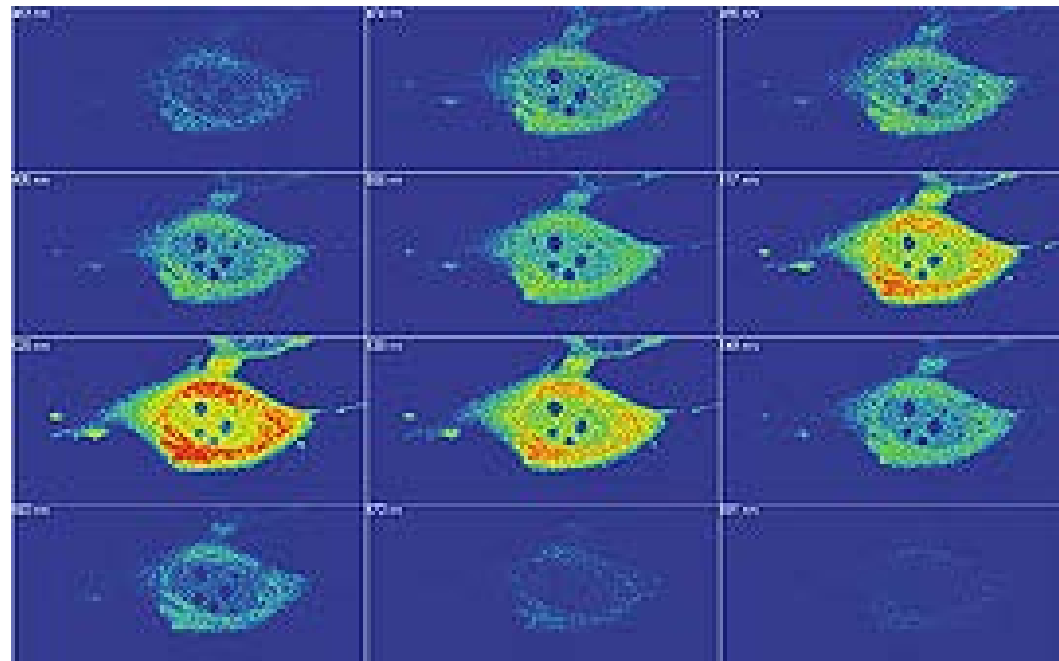
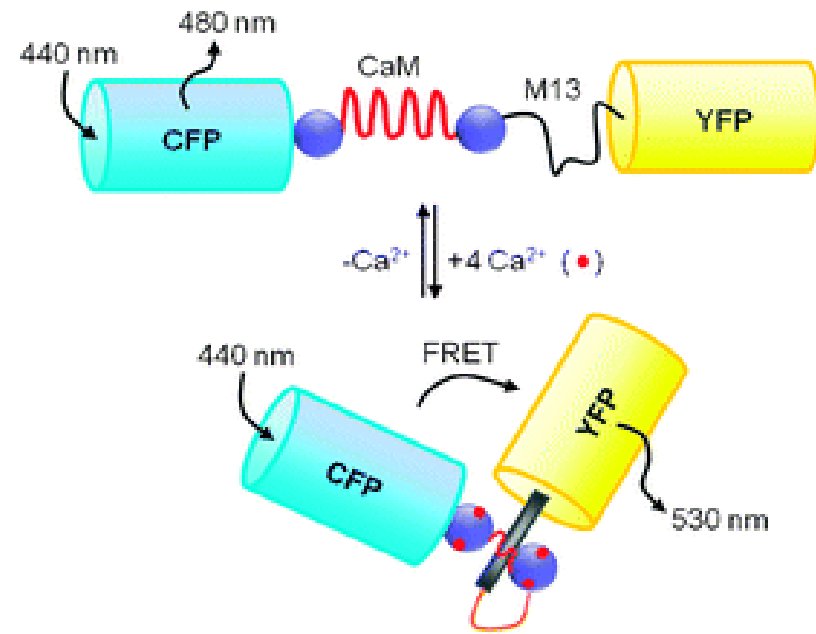
Επιτρέπει μελέτες αλληλεπίδρασης μορίων σε πραγματικό χρόνο σε ζωντανά κύτταρα.

# Fluorescence resonance energy transfer (FRET)



# Fluorescence resonance energy transfer (FRET)

## Μετρήσεις μεταφοράς ενδοκυτταρικού ασβεστίου



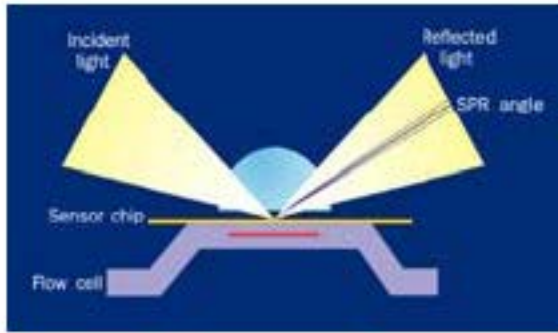
# FRET

<http://link.brightcove.co.jp/services/player/bcpid180228075001?bctid=193633758001>

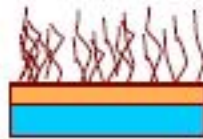


## 4. Surface Plasmon Resonance

Ανταπόκριση επιφάνειας στην αύξηση της συγκέντρωσης μορίων πάνω σε αυτήν  
λόγω αλληλεπίδρασής τους με μόρια της επιφάνειας



## SPR (Surface Plasmon Resonance) Detection System



## Gold-Dextran Surfaces

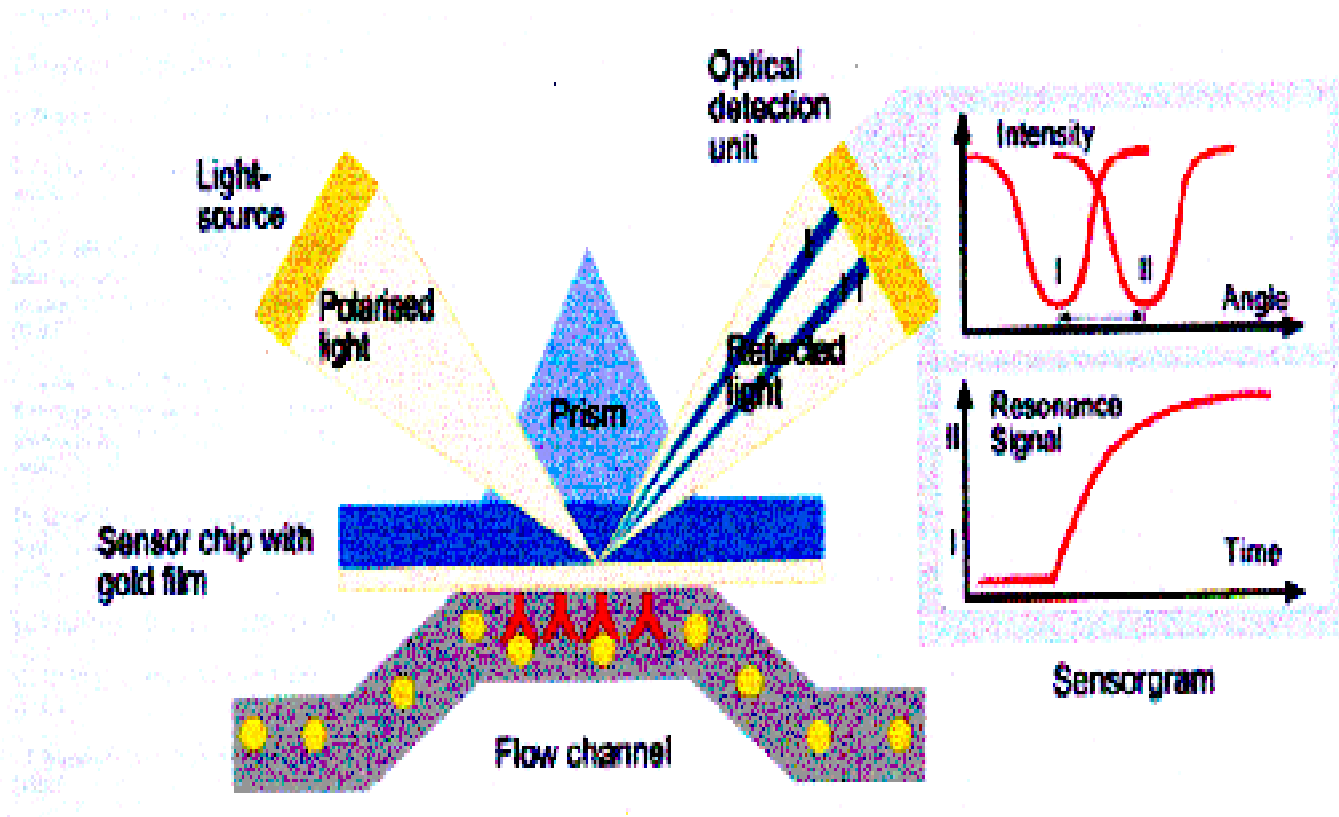


## Microfluidic System

## Surface Plasmon Resonance

Όταν μια δέσμη φωτός προσπίπτει σε μία επιφάνεια υπό μία συγκεκριμένη γωνία ανάλογα με το πάχος της μοριακής στιβάδας, και άρα της ποσότητας της πρωτεΐνης, στην επιφάνεια του μετάλλου, τα SPR φαινόμενο καταλήγει σε μία διαβαθμισμένη ένταση του ανακλώμενου φωτός, άρα και του δείκτη διάθλασης του μέσου σε γειτνίαση με την επιφάνεια του μετάλλου

# Surface Plasmon Resonance



Η γωνία διάθλασης (αλλαγή στο συντελεστή διάθλασης) του προσπίπτοντος φωτός είναι ανάλογη της ποσότητας της ουσίας στην επιφάνεια χρυσού

# Surface Plasmon Resonance

---

**Η μέθοδος παρέχει:**

**Χαρακτηρισμό πρωτεϊνών που προσδέονται σε συγκεκριμένα μόρια**

**Ποσοτικούς προσδιορισμούς**

**Εξειδίκευση**

**Έλεγχος εξειδίκευσης της αλληλεπίδρασης δύο μορίων**

**Συγκέντρωση**

**Προσδιορισμός της συγκέντρωσης του ενεργού μορίου που συμμετέχει στην αλληλεπίδραση**

**Κινητική**

**Ποιος είναι ο ρυθμός (ταχύτητα) αλληλεπίδρασης, αποσύνδεσης των μορίων που αλληλεπιδρούν**

**Σχέση συγγένειας**

**Πόσο ισχυρή είναι η σύνδεση**

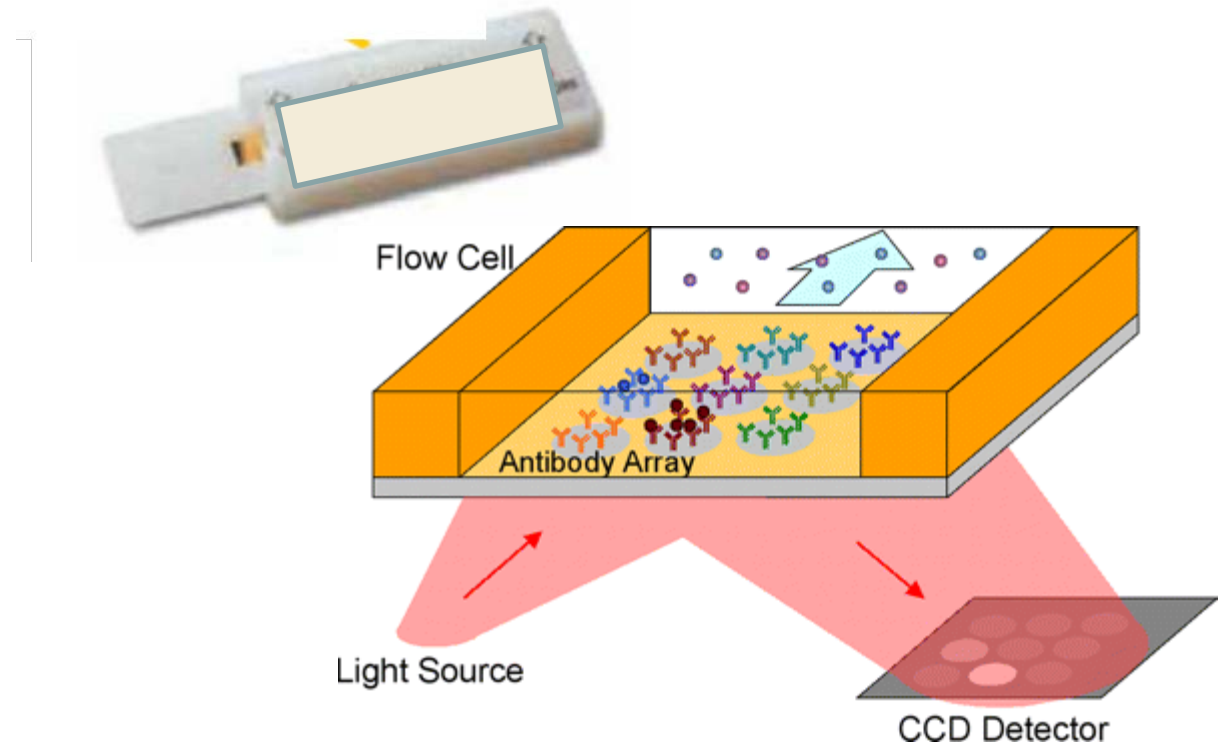
**Παρακολουθεί τις αλληλεπιδράσεις σε πραγματικό χρόνο**

# Φαινόμενο SRP στην τεχνολογία αλληλεπίδρασης μορίων

---

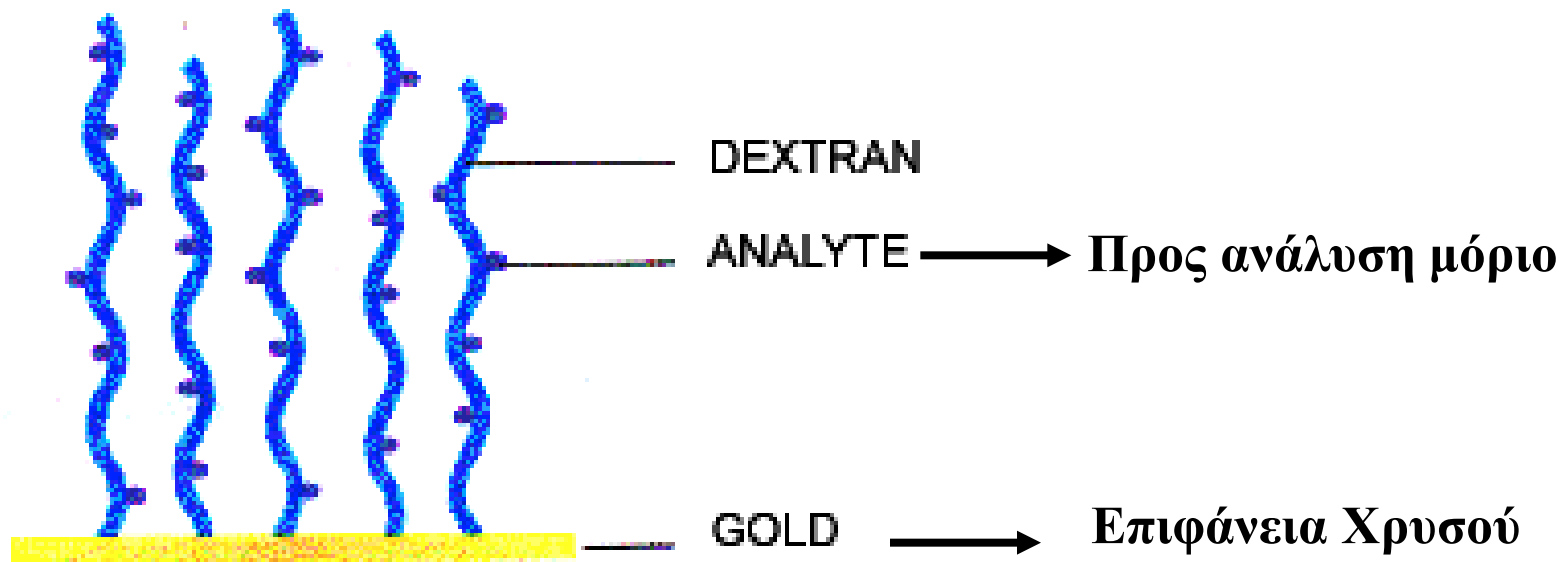
Μικροροές υγρών

Sensor Chip (Συστοιχία ανίχνευσης)



# Η επιφάνεια του ανιχνευτή SRP

---



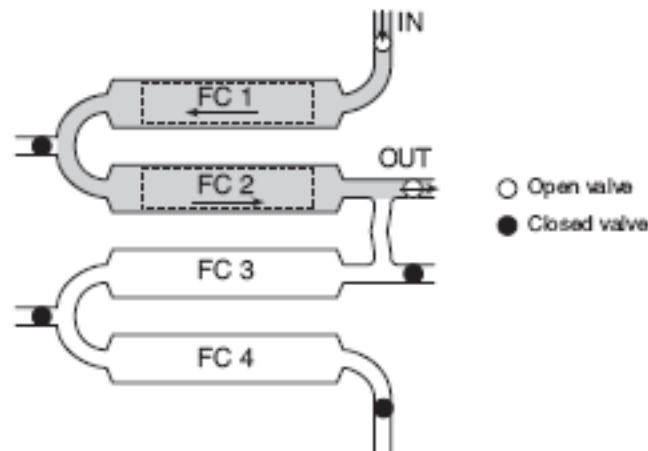
The sensor chip surface

# Μικροσυστοιχίες ανίχνευσης

Π.χ. 4 κελιά κατασκευασμένα έτσι ώστε να ρυθμίζεται διαδοχικά η ροή από αυτά

Μικρές συστοιχίες (συνήθως με 4 θέσεων)  
Μικρός όγκος αντιδραστηρίων

Αυτοματοποιημένο και ολοκληρωμένο σύστημα χειρισμών





# Βιολογικά Μόρια προς Ανάλυση

---

Πρωτεΐνες

Νουκλεϊκά οξέα

Λιπίδια και μεμβράνες-  
αλληλεπιδρώντα μόρια

Υδατάνθρακες

Χαμηλού μοριακού βάρους μόρια (>  
200 Da)

Ολόκληρα κύτταρα

Ιοί/βακτήρια



**Βασική αλλά και εφαρμοσμένη έρευνα σε επιστημονικά πεδία όπως**

**Καρκίνος**

**Νευροβιολογία**

**Ανοσολογία**

**Μολυσματικές νόσοι**

**Πρωτεομική**

**Μετάδοση σήματος**

**Επιλογή και χαρακτηρισμός αντιδραστηρίων σύνδεσης**

**Σχεδιασμός φαρμάκων**

# ΟΡΟΛΟΓΙΑ

---

**Resonance Units:** Units που χρησιμοποιούνται να εκφράσουν το σήμα από SPR

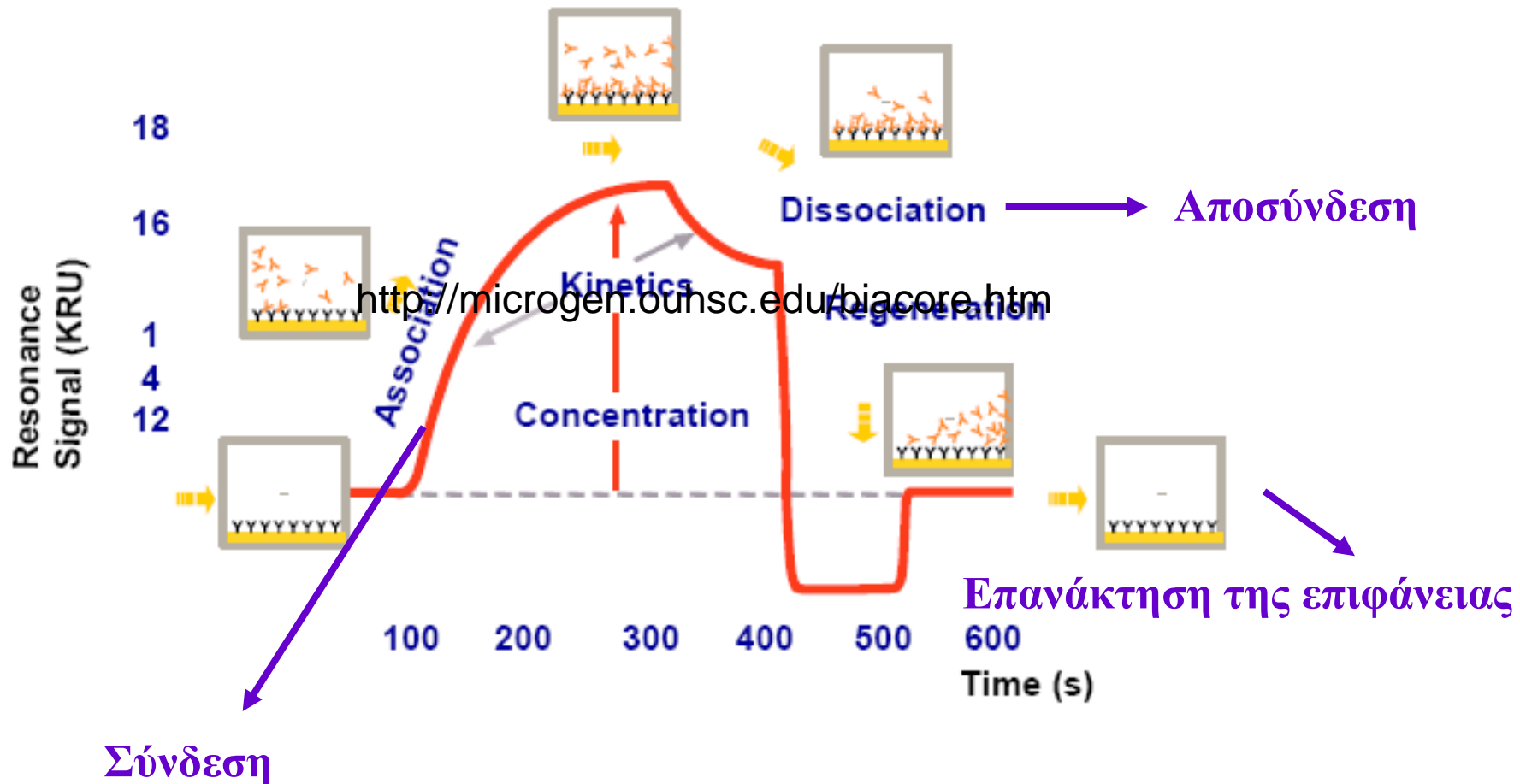
1000 RU = μετατόπιση κατά  $0.1^\circ$  στη γωνία διάθλασης ή αλλαγή στο συντελεστή διάθλασης κατά  $10^{-3}$

**Kilo RU (kRUs):** 1000 RU = Αντιστοιχούν σε αλλαγή περίπου  $1 \text{ ng/mm}^2$  στη συγκέντρωση της πρωτεΐνης

**Sensorgram:** Το γράφημα των μονάδων του SPR σήματος σε σχέση με το χρόνο

# SENSOGRAM

Η συνεχή καταγραφή των RU αποδίδεται στο sensogram



# **Ανίχνευση αλληλεπίδρασης μορίων χωρίς αυτά να είναι σημασμένα**

---

**Μελέτη αλληλεπίδρασης χωρίς σήμανση των μορίων.**

**Δεν απαιτείται τροποποίηση των μορίων**

**Μελέτη αλληλεπίδρασης σε πραγματικό χρόνο.**

**Επιτρέπει μελέτες ασθενών και ταχέων αλληλεπιδράσεων**

**Απ ευθείας μελέτες, χωρίς να στερούνται ευαισθησία ή εξειδίκευση**

# Απαντάει σε ερωτήματα

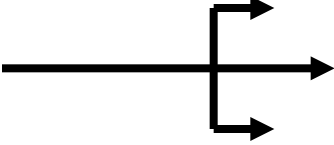
---

Σύνδεση



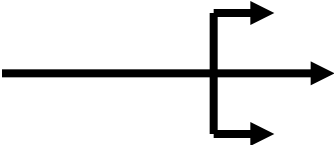
Ναι  
Όχι

Ταυτοποίηση



Εξειδίκευση σύνδεσης  
Επιτόπων σύνδεσης  
Μορίων που αλληλεπιδρούν

Χαρακτηρισμός  
Σύνδεσης



Συγγένεια  
Κινητική  
Ενεργές συγκεντρώσεις  
Θερμοδυναμική

# Παραδείγματα ερωτημάτων που μπορούν να απαντηθούν

---

Έλεγχος εξειδίκευσης αντισωμάτων (συνδέεται με ένα ή περισσότερα αντιγόνα?)

Έλεγχος εξειδίκευσης/χαρακτηρισμός αναστολέων

Έλεγχος εξειδίκευσης/χαρακτηρισμός προσδέτη για τον υποδοχέα του – εν δυνάμει φάρμακο

Πόσο ισχυρή είναι η σύνδεση?

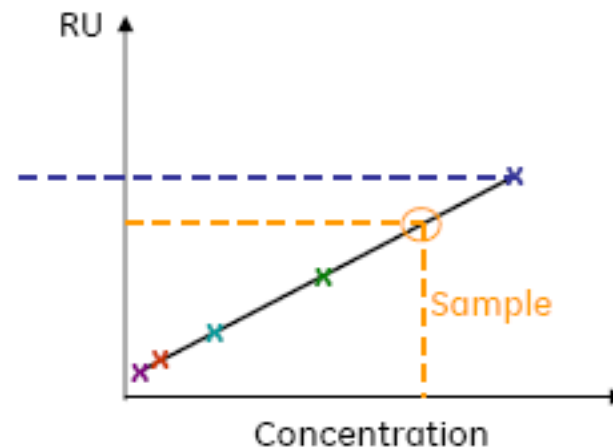
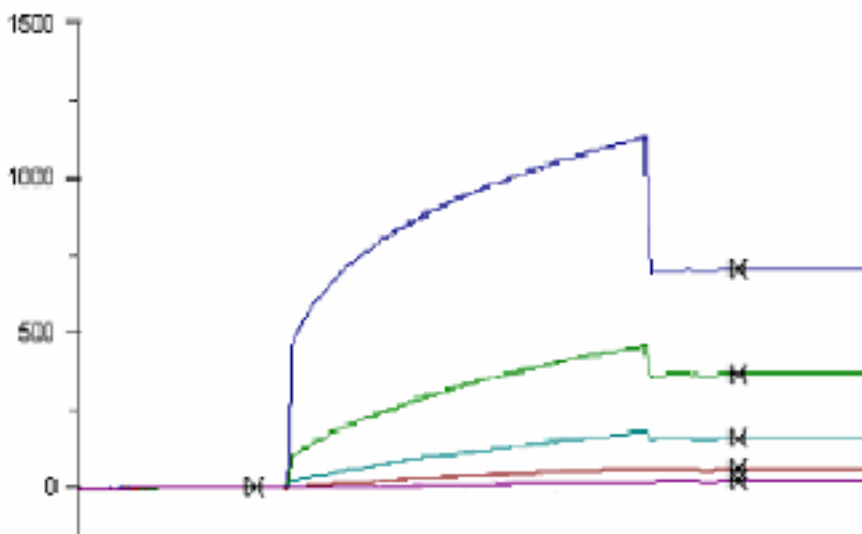
Πόσο γρήγορη-εύκολη είναι η αποσύνδεση?

## **Μειονεκτήματα**

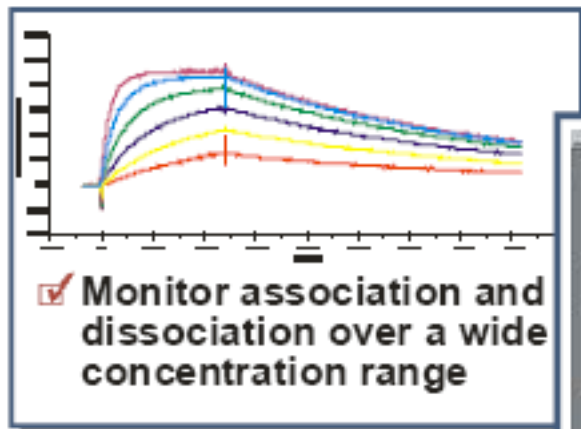
**Υψηλό κόστος αναλωσίμων (συστοιχίες από χρυσό)**



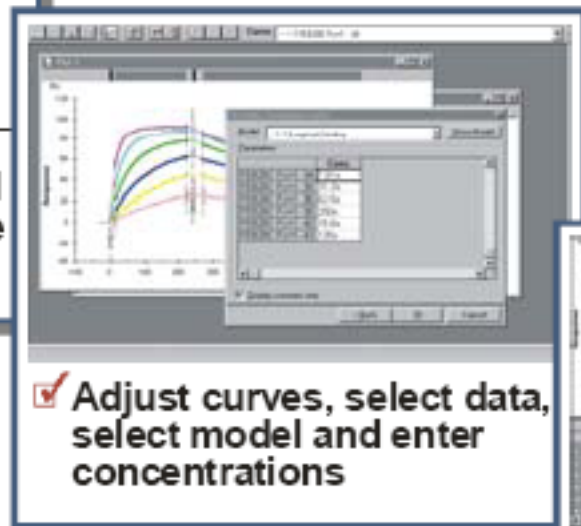
# Μελέτες κινητικής



**Χρησιμοποιώντας διάφορες συγκεντρώσεις του προς ανάλυση μορίου (analyte) μπορούν να εξαχθούν πληροφορίες σχετικά με την κινητική της σύνδεσης**



1



2

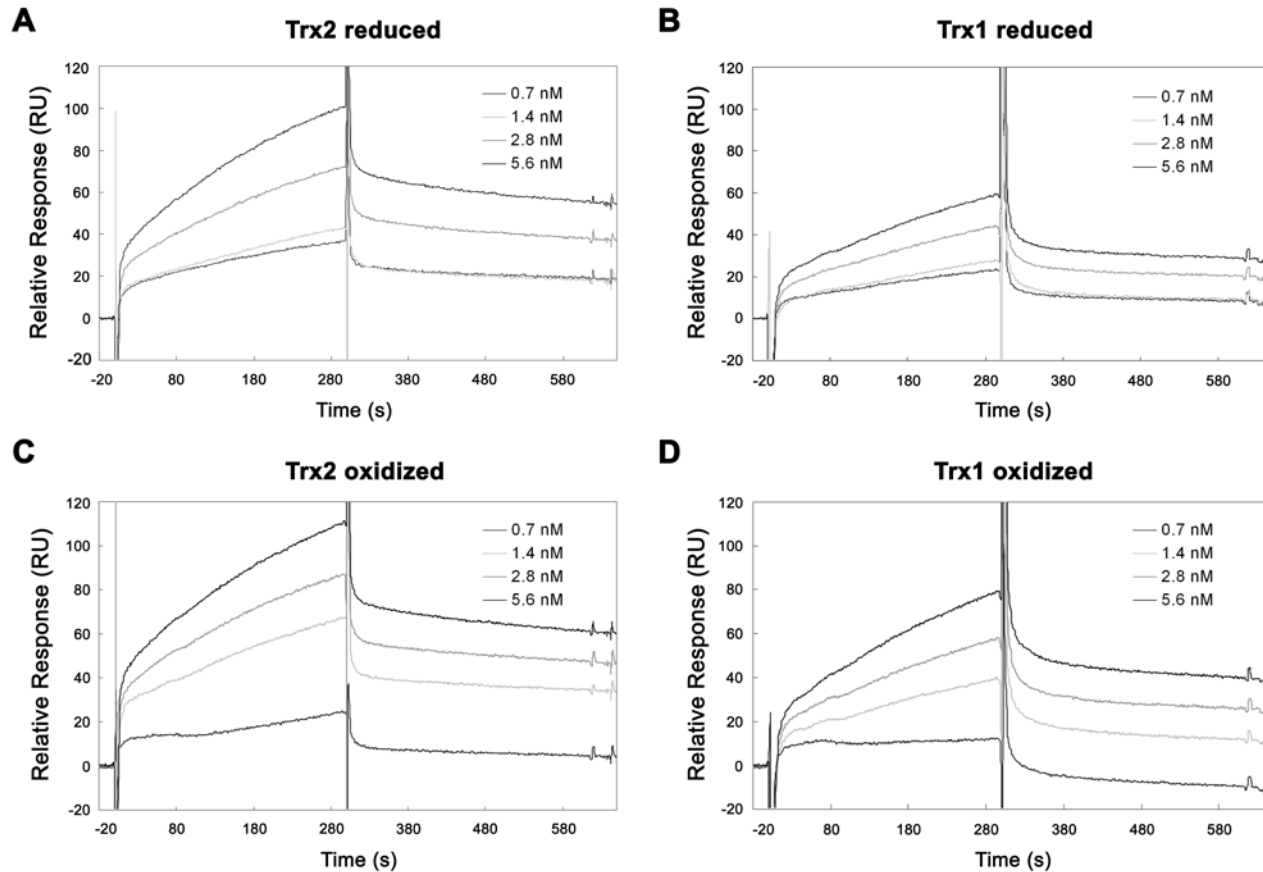


3

Ανάλυση των αποτελεσμάτων δίδει πληροφορίες σχετικά με την κινητική σύνδεσης-αποσύνδεσης

Προσδιορισμός σταθερών ισορροπίας  $K_A$  &  $K_D$  γίνεται αυτοματοποιημένα από κατάλληλο λογισμικό.

# Κινητικές μελέτες



Παράδειγμα μελέτης αλληλεπίδρασης της οξειδωμένης και ανηγμένης μορφής της θειορεδοξίνης μιτοχονδριακής (2) και κυτταροπλασματικής (1) με τον υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών

# Κατηγορίες μικροσυστοιχιών

---

**Διάφορες κατηγορίες μικροσυστοιχιών που επιτρέπουν το χαρακτηρισμό διαφόρων τύπων αλληλεπιδράσεων**

**Ομοιοπολική σύνδεση του προσδέτη με την καρβοξυμεθυλιωμένη επιφάνεια δεξτράνης**

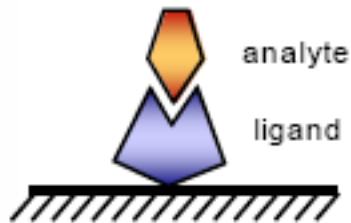
**Καρβοξυ-μεθυλιωμένη επιφάνεια δεξτράνης στην οποία έχει ακινητοποιηθεί στρεπταβιδίνη. Χρησιμοποιείται για την δέσμευση βιοτυνυλιωμένων μορίων όπως πεπτίδια, πρωτεΐνες, DNA**

**Καρβοξυ-μεθυλιωμένη επιφάνεια δεξτράνης στην οποία έχει ακινητοποιηθεί NTA (NitriloTriAcetic Acid). Σχηματισμός χηλικής ένωσης με νικέλιο  
Χρησιμοποιείται για τη δέσμευση μορίων που φέρουν ομάδες Ιστιδίνης (6XHis)**

**Καρβοξυ-μεθυλιωμένη επιφάνεια δεξτράνης η οποία έχει τροποποιηθεί με λιπόφιλες ομάδες. Χρησιμοποιείται για γρήγορη και επαναλήψιμη πρόσδεση λιποσωμάτων. Επιτρέπει μελέτες για διαμεμβρανικές πρωτεΐνες.**

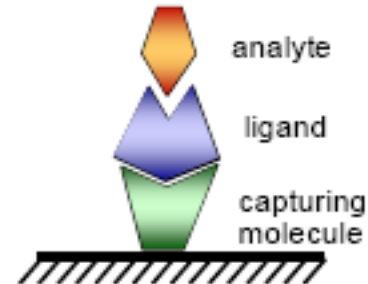
# Ακίνητοποίηση του προσδέτη

---



**Απ ευθείας ακίνητοποίηση**

**Ομοιοπολική σύνδεση του προσδέτη στην επιφάνεια**



**Έμμεση ακίνητοποίηση**

**Ομοιοπολική σύνδεση ενδιάμεσου μορίου**

**Σύνδεση του προσδέτη κατά την εκτέλεση της πειραματικής διαδικασίας μέσω υψηλής συγγένειας αλληλεπιδράσεων**

# Ακινητοποίηση του προσδέτη

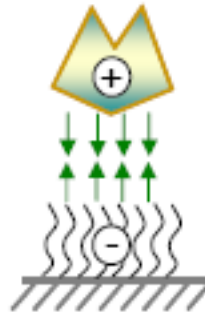
Σύνδεση υπό συνθήκες βέλτιστου pH

$\text{pH} < 3.5$



**Πολύ χαμηλό pH:**  
Έλλειψη  
επιφανειακού  
φορτίου,  
Μη  
ηλεκτροστατικές  
αλληλεπιδράσεις

$3.5 < \text{pH} < \text{pI}$



**Κατάλληλο pH:**  
Υπαρξη  
ηλεκτροστατικών  
αλληλεπιδράσεων

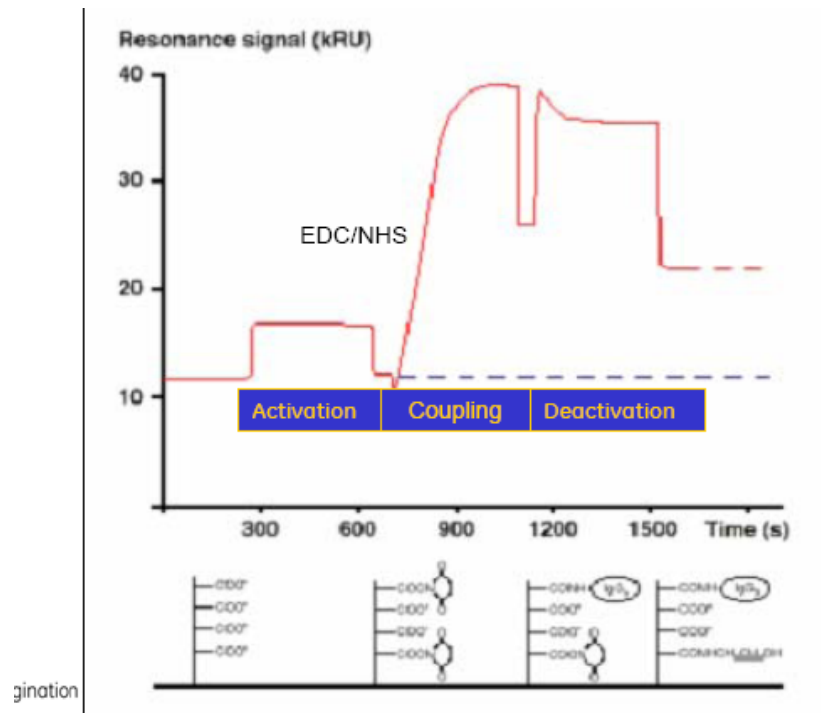
$\text{pH} > \text{pI}$



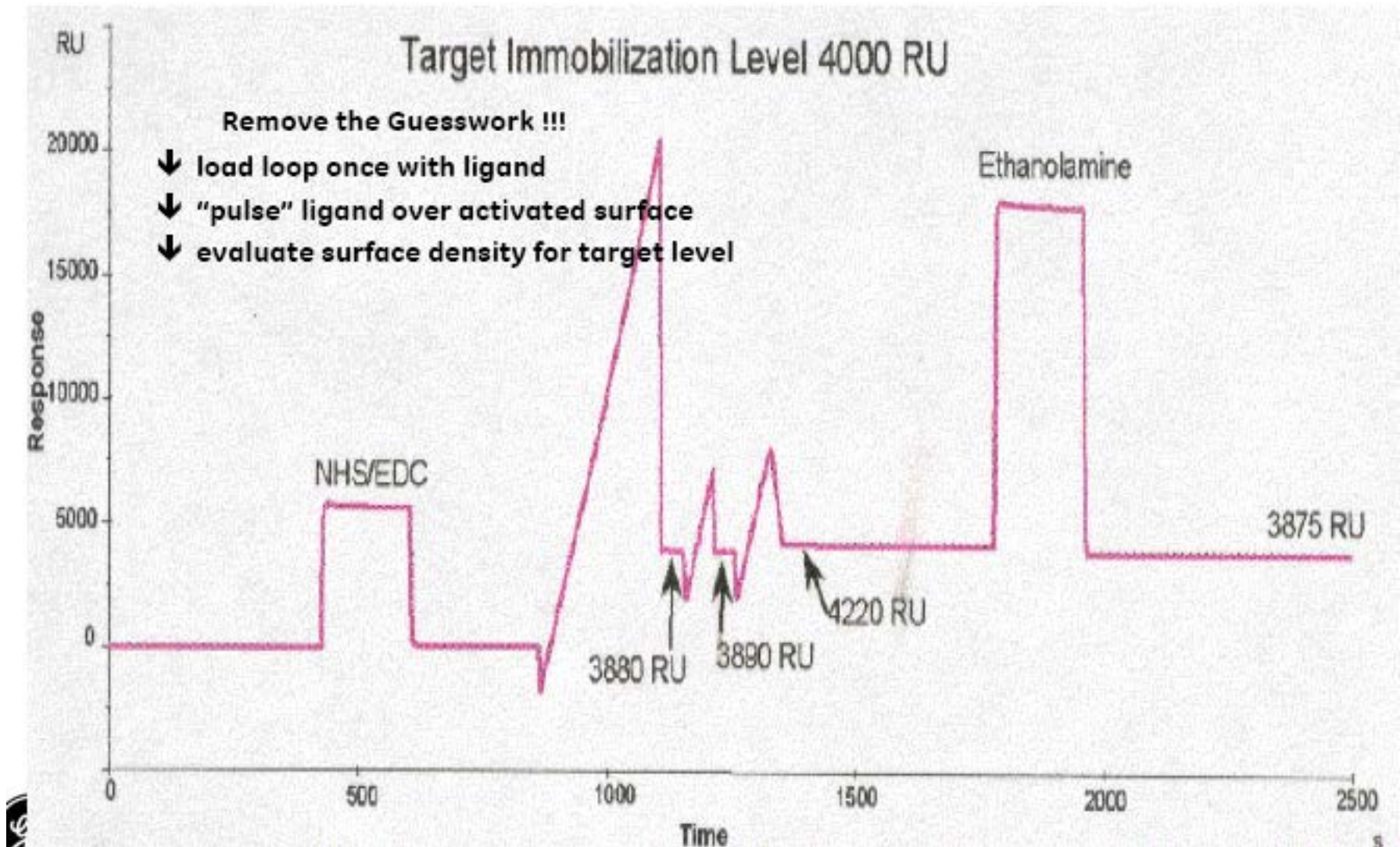
**Υψηλό pH:**  
Αναίρεση  
ηλεκτροστατικών  
αλληλεπιδράσεων

# Ακίνητοποίηση του προσδέτη

1. Ενεργοποίηση των ενεργών ομάδων της επιφάνειας
2. Σύνδεση του προσδέτη
3. Μπλοκάρισμα μη κατειλημμένων θέσεων



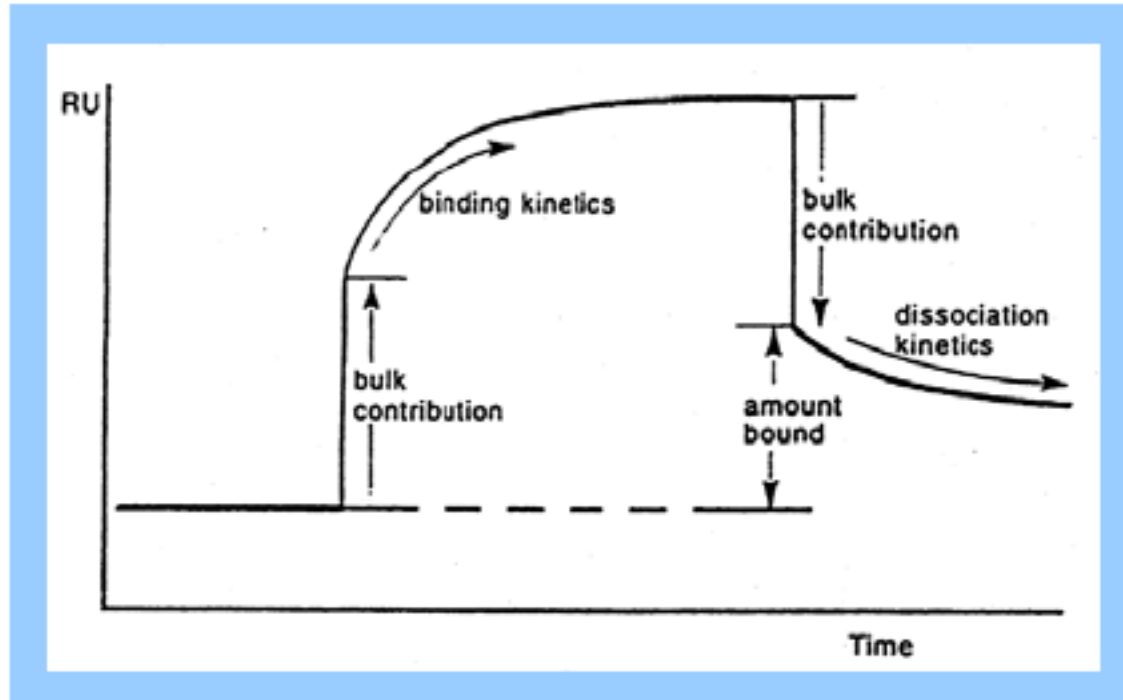
# Ακίνητοποίηση του προσδέτη



Διαδοχική ροή επιπλέον ποσότητας προσδέτη μέχρι να φθάσει τα επιθυμητά επίπεδα RU

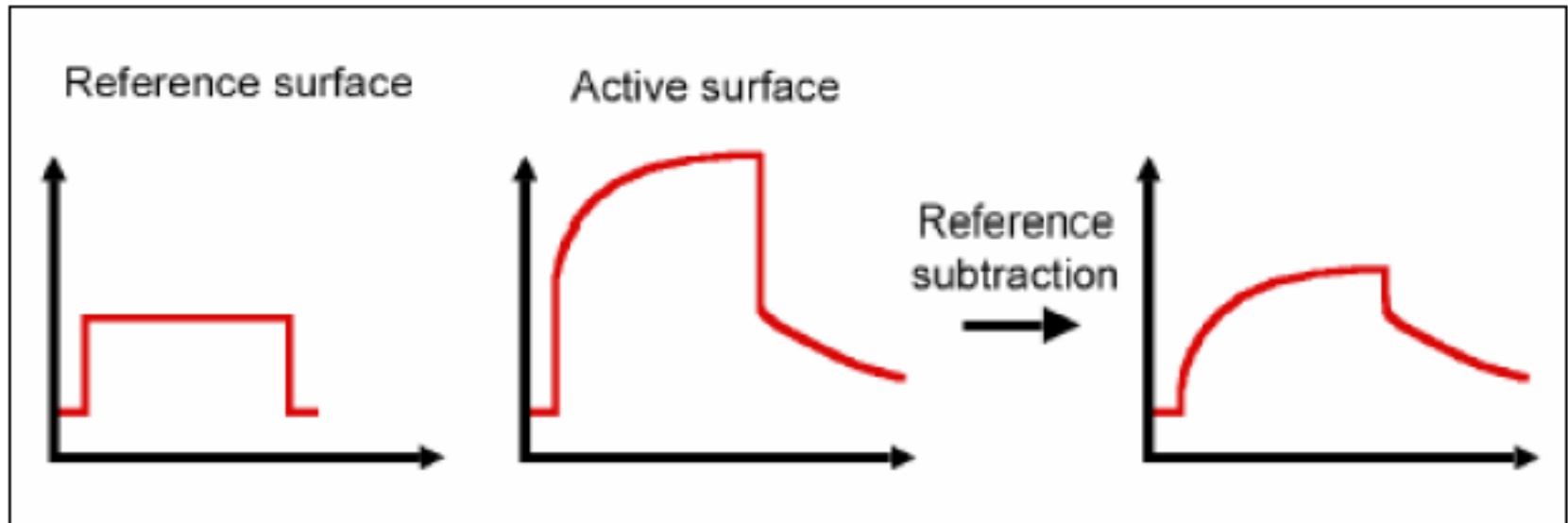


# Έλεγχος πρόσδεσης του προ μελέτη μορίου στο προσδεδεμένο μόριο



# Χρήση μαρτύρων

Σε ένα από τα 4 κελιά προσδένουμε μάρτυρα. Π.χ. πρωτεΐνη όμοια με τον προσδέτη που γνωρίζουμε ότι δεν αλληλεπιδρά με το προς έλεγχο σύνδεσης μόριο



**GST**

**GST-X protein**

# Επανάκτηση της μικροσυστοιχίας

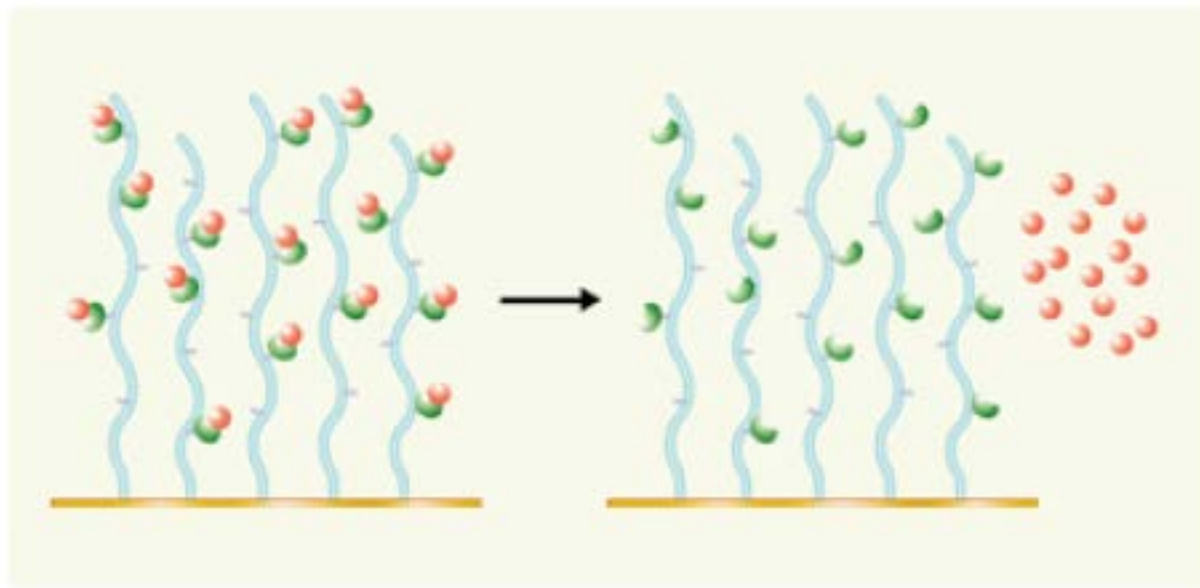
Μπορούμε να απομακρύνουμε οτιδήποτε έχει προσδεθεί με τον ακινητοποιημένο προσδέτη και να δοκιμάσουμε την πιθανή πρόσδεση άλλων μορίων

	Acidic	Basic	Hydrophobic	Ionic
Strong	PH<2 Glycine/HCl Formic Acid H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	PH>10 NaOH KOH	50% ethylene glycol	6M Guanidinium chloride
Intermediate	PH< 2 – 2.5 Glycine/HCl Formic Acid H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	PH 9 – 10 Glycine/NaOH NaOH KOH	40% ethylene glycol	2M MgCl <sub>2</sub> 4M KCl 3M KSCN
Weak	PH >2.5 Glycine/HCl Formic Acid H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	PH < 9 HEPES / NaOH	25% ethylene glycol	1M NaCl

# Επανάκτηση της μικροσυστοιχίας

---

Μπορούμε να απομακρύνουμε ποσοτικά οτιδήποτε έχει προσδεθεί με τον ακινητοποιημένο προσδέτη και να δοκιμάσουμε την πιθανή πρόσδεση άλλων μορίων. Η επιφάνεια της μικροσυστοιχίας πρέπει να παραμείνει αναλλοίωτη.



## **Τελικό στάδιο**

**Ανάλυση της κινητικής των αποτελεσμάτων με χρήση κατάλληλων προγραμμάτων που παρέχονται μαζί με την συσκευή**