# 14. Fehérjék kimutatása

Míg adott szekvenciájú nukleinsavakat döntően hibridizáción alapuló technikákkal lehet specifikusan kimutatni, addig fehérjék specifikus kimutatására ez nem alkalmas. A fehérjék szintézisük után feltekerednek, felveszik a rájuk jellemző térszerkezetet. Natív állapotukban adott fehérjéket elsősorban az egyéni harmadlagos szerkezetük alapján lehet megkülönböztetni egymástól. A fehérjék specifikus kimutatására legalkalmasabbak az ellenük termeltetett **antitestek**, vagy a szelektált **aptamerek**.

## 14.1. Antitestek termeltetése

Antitesteket élő állatokban, vagy sejtkultúrákban termeltetnek: egérben, nyúlban, kecskében, birkában, marhában, szamárban, patkányban és csirkében termeltetett antitestek a leggyakoribbak. Antitestek termeltetéséhez mindig antigén szükséges. Antigénként a kimutatni kívánt fehérjét, a fehérje fúziós tag-ekkel kiegészített variánsát, vagy az adott fehérje egy immunogén részét reprezentáló peptidet használnak. Attól függően, hogy az antitestet termelő sejtek egy, vagy több immunsejt utódai, megkülönböztetünk **monoklonális** és **poliklonális** antitesteket. A monoklonális antitestek egyformák, a poliklonális antitestek különbözőek olyannyira, hogy az sem biztos, hogy ugyanazt az **epitopot** (felismerőhelyet) ismerik fel a kérdéses fehérjén.

 Jó néhány biotechnológiai cég foglalkozik antitestek termelésével és árusításával. Ezek az antitestek többnyire igen drágák, és korántsem biztos, hogy megfelelően **specifikusak**. (Vásárlás előtt próbáljunk minél több információt szerezni a választott antitestről. Ennek legegyszerűbb módja, hogy a termékkatalógusban, vagy valamilyen tudományos publikációban ellenőrizzük az antitesttel készült western blot képét, ha az hozzáférhető). Gyakran előfordulhat az is, hogy az általunk kimutatni kívánt fehérje ellen nem található antitest a piacon (vagy nem megfelelő). Ilyenkor rá vagyunk kényszerülve arra, hogy saját magunk állítsuk elő a megfelelő antitesteket.

**14.1.1. Poliklonális antitestek készítése**

A poliklonális antitestek előállításához **antigéneket** kell az állat **bőre alá** (szubkután) **injektálni**, hogy az immunrendszer sejtjei antitesteket termeljenek ellenük. Az antitesteket a vérből lehet majd kinyerni. Az injektálás előtt az antigén vizes oldatát ásványolaj/növényi olajkeverékkel, ún. Freund’s adjuvánssal keverjük, emulziót készítünk belőle. Az ásványolaj emulzióból az antigének csak lassan tudnak kijutni, ezért az immunizálás eredményeképpen egy hosszú és erős antitestválaszt kapunk. Az első injektálás alkalmával inaktivált mycobacteriummal kevert, ún. **komplett Freund’s adjuvánst** alkalmazunk. A mycobacterium stimulálja az immunrendszert. Az immunizálást meghatározott időközönként (nyúl esetében például hetenként) ismételjük, de ekkor már **inkomplett**, mycobacterium nélküli **Freund’s adjuvánssal**. (Ezt követően az állat már csak az antigén ellen termel antitestet, a mycobacterium ellen nem.) A specifikus antitestek növekvő jelenlétét minden héten vérvétellel ellenőrizzük, negatív kontrollként az immunizálás előtti vérszérumot használjuk. Körülbelül 4-5 héten belül az antitest-koncentráció olyan magas lesz, hogy érdemesebb nagyobb mennyiségű vért venni (a kisebb állatokat kivéreztetni), és abból antitestet tisztítani.

 Az antitesteket többnyire a **vérszérumból** tisztítjuk: a levett vért a centrifugacsőben hagyjuk megalvadni, majd centrifugálás után a tiszta felülúszót mérjük át óvatosan egy tiszta csőbe, ez lesz a vérszérum. Vérplazmából is történhet az antitest-tisztítás. Ilyenkor a vért mindenképpen véralvadásgátló szert (Na-citrát, EDTA stb.) tartalmazó flaskákba kell gyűjteni, hogy ne alvadjon meg. Centrifugálással el kell távolítani az alakos elemeket, a felülúszó lesz a vérplazma.

 A szérumból többnyire **protein A**-t vagy **protein G**-t tartalmazó oszlopon tisztítják az antitesteket. (A protein A és a protein G különböző típusú baktériumok felszíni fehérjéi. Az antitestek Fc részét kötik specifikusan, így védekeznek az antitestes immunválasz ellen.) Ilyenkor a szérumban lévő, megfelelő Fc részt tartalmazó összes antitest aspecifikusan felkötődik, a kötött antitesteket alacsony, vagy magas kémhatású oldattal le lehet eluálni az oszlopról. Az elúció után az antitesteket az antigént tartalmazó oszlopon tisztítják, hogy csakis az adott fehérje elleni antitestek kötődjenek, az esetleges más fertőzések ellen termelődött antitestek ne (14-1. ábra). (Az is bevett eljárás, ha az első lépésben nem izolálják az antitesteket protein A, vagy protein G segítségével külön, hanem rögtön az antigént tartalmazó oszlopon engedik át a vérszérumot.) Ha antigénként fúziós fehérje volt használva, akkor a fúziós tag-hez kapcsolódó antitesteket ki lehet szűrni a fúziós peptidet kötő affinitásoszlop segítségével.

14-1. ábra

http://www.cytographica.com/overheads/antibody.jpg

2013.10.17.

**14.1.2. Monoklonális antitestek készítése**

A monoklonális antitestek előállítása sokkal lassabb, jóval munkaigényesebb és jóval nagyobb technikai felszereltséget igénylő folyamat. A monoklonális antitestek az esetek többségében **egér eredetűek**. A procedúra során a megfelelő antigénekkel egereket oltunk, majd az immunitás kialakulása után az **egér lépének immunsejtjeit** (B-sejtek) izoláljuk (ezek termelik az antitesteket, mindegyik sejt más-más antitestet). A **B sejteket** ezután polietilén-glikol segítségével **fuzionáltatjuk** immortális **humán myeloma** (tumor) **sejtekkel**. A B-sejt/myeloma sejt hibridet **hibridóma sejtnek** hívjuk. Hogy csak a hibridóma sejtek szaporodhassanak tovább, az eredeti myelomák ne, **szelekciós táptalajban** növesztjük a sejteket (az eredeti B-sejtek szaporodása korlátozott, egy idő múlva úgyis kihalnak a tápoldatból).

A myeloma sejtvonal sejtjeiből hiányzik a hipoxantin-guanin-foszforibozil-transzferáz (HGPRT) enzim, ezért **purin nukleotidok** szintézise a **mentő utakon nem zajlik**. Ha aminopterint teszünk a médiumba, az gátolja a dihidrofolát-reduktáz (DHFR) enzimet, ami a purin tukleotidok és a timidilát *de novo* szintéziséhez is elengedhetetlen. Ilyenkor a myeloid sejtek nem tudnak replikálódni, végül elpusztulnak, hiába teszünk az **aminopterin** mellé **hipoxantint** és **timidint** (**HAT médium**). A hibridóma sejtekben viszont a B-sejtek révén megtalálható a HGPRT enzim, ezért HAT médiumban a mentő utak segítségével fel tudja építeni nukleotidjait.

Az életben maradt hibridóma sejteket tartalmazó médiumot kihígítjuk, majd egy-egy sejtet sok pici cellát tartalmazó, ún. mikrotiter plate-ekben felszaporítunk. A B-sejt eredetnek köszönhetően a hibridóma sejtek **antitesteket szekretálnak** a médiumba. A hibridómasejt-kolóniákat összehasonlítjuk antigénre való specifikusság szempontjából, és csak a legjobbakat szaporítjuk tovább. Az antitesteket a hibridómasejt-kultúra tápoldatából lehet kinyerni a médium szűrése, dialízise, majd az előbb ismertetett affinitáskromatográfiás lépések segítségével (14-2. ábra).

14-2. ábra

http://en.wikipedia.org/wiki/File:Monoclonals.png

2013.10.17.

**14.1.3. Másodlagos antitestek**

Most már tudjuk, hogy az antitest specifikusan hozzáköt az adott fehérjéhez, de ezt csak akkor látjuk, ha az antitestet valami látható dologgal megjelölik. Az esetek többségében ez úgy zajlik, hogy nem a fehérjére specifikus antitestet jelölik, hanem a fehérjéhez kötő (elsődleges) **antitest** Fc részét használva antigénnek, az ellen termeltetnek egy másik (másodlagos) antitestet, és azt jelölik meg. Attól függően, hogy az elsődleges antitestet milyen organizmusban termeltettük, a másodlagos antitest lehet anti-egér, anti-nyúl, anti-kecske stb. antitest. Természetesen az elsődleges antitestet termelő fajtól **eltérő organizmusban** termeltetett másodlagos antitestet szoktunk használni (például nyúlban termeltetett anti-egér antitestet, ha az elsődleges antitest egérben, vagy egér eredetű sejtekben termelődött). A másodlagos antitesteket vagy **fluoreszcens festékkel**, vagy valamilyen enzimmel (**torma-peroxidáz**, **alkalikus foszfatáz**) szokták konjugálni. (A piacon kaphatóak jó minőségű, elfogadható árú másodlagos antitestek, házilag ne próbálkozzunk másodlagos antitestek gyártásával és jelölésével.)

 Gyakran vizsgált fehérjéknél előfordul, hogy az antitestet árusító cég már az elsődleges antitestet jelöli, így lerövidítve a detektáláshoz szükséges kísérleti időt.

## 14.2. Aptamerek

Az aptamerek mesterségesen előállított **nukleinsavak** vagy **peptidek**, melyek az antitestekhez hasonló specifitással és affinitással képesek adott fehérjékhez kötni. (Léteznek nem fehérje jellegű molekulákra specifikus aptamerek is, ezekről azonban itt nem ejtünk szót.) Az aptamerek használata viszonylag új keletű, még nem terjedt el széles körben. Az előállításukhoz szükséges technológia is még folyamatos fejlődésen megy keresztül. Előnyük az antitestekkel szemben, hogy viszonylag **kis méretűek**, **kevéssé immunogének**, ezért *in vivo* kimutatásra vagy terápiás célokra különösen alkalmasak.

 A nukleinsav-alapú aptamerek (többnyire **egyszálú RNS vagy DNS**) tartalmaznak egy változó hosszúságú variábilis régiót, melyek a nukleinsavak térszerkezetét nagyon eltérővé tehetik. Az aptamereket leggyakrabban véletlenszerű (vagy ismeretlen) nukleotid-sorrendű, többnyire *in vitro* előállított nukleinsav-tömegből szelektálhatjuk ki. A **szelekció** manapság már leginkább **automatizált** módon zajlik. A sokféle nukleinsavat a gyöngyökhöz kötött, kimutatni kívánt fehérjével kell inkubálni, majd a keletkezett komplexeket centrifugálással el lehet különíteni. A gyöngyökön lévő fehérjéhez specifikusan kötött nukleinsavakat ezután fel kell szaporítani, a terméket pedig újabb kötődési reakciónak alávetni. Ezeket a lépéseket kell mindaddig ismételni, amíg végül már csak egyféle nukleinsav lesz található a rendszerben, amely igen erősen köti a célfehérjét. Ezt a nukleinsavat jelölhetjük, majd használhatjuk az adott fehérje kimutatására.

DNS-aptamerek esetében a szelekció során a felszaporítás **PCR-reakcióval** történik. A reakciótermékből egy kis alikvotot viszünk majd át a soron következő kötődési reakcióba. RNS aptamerek esetén két lehetőségünk van: vagy RNS-dependens RNS-polimerázzal történik az amplifikáció (mivel ez hőérzékeny, minden polimerizácós ciklusnál újra kell adagolnunk), vagy **reverz transzkripciót** követő PCR-reakcióval. A PCR-reakciót ***in vitro* transzkripciós** lépésnek kell követni, hogy a soron következő RNS-célfehérje kötődési reakciót elvégezhessük (14-3. ábra).

14-3. ábra

http://www.genelink.com/newsite/products/images/aptamer\_selex.jpg

2013.10.17.

A **peptid aptamerek** többnyire olyan polipeptidek, amelyeken egy **10-20 aminosavból** álló mesterséges **hurkot** hoztak létre (melyet többnyire egy diszulfid-híd határol). A gyakorlatban leginkább a bakteriális tioredoxin-A fehérje génjét egészítik ki a hurkot alkotó aminosavak nukleotidszekvenciáival. Ez a **nukleotidszekvencia** itt is **random**, a róla keletkező **peptidhurok** igen **variábilis** lesz. A variábilis peptidek kötődését a célfehérjéhez leginkább **élesztő-kéthibrid rendszerekkel**, vagy **fág-display rendszerekkel** detektálhatjuk (lásd: 15. fejezet). Ezek a szelekciós rendszerek igen idő- és munkaigényesek, ami oka lehet annak is, hogy a nukleinsavakból készült aptamerek jóval elterjedtebbek, mint a peptid alapú aptamerek.

## 14.3. Western blot

A western blot technika poliakrilamid gélen **elválasztott fehérjék** specifikus **detektálására** szolgál. A western blot tulajdonképpen egy immunoblot technika, mely során a gélelektroforézissel elválasztott fehérjéket szilárd hordozóra (membránra) kötjük, majd jelenlétüket (mennyiségüket) specifikus antitestekkel (esetleg aptamerekkel) detektáljuk. (A technika alapelve nagyon hasonlít a korábban ismertetett Southern és northern blot technikákéhoz.)

A western blot technika menete a következő: a futtatás előtt esetlegesen **előkezelt mintákat** (detergensek, hődenaturálás, diszulfid-hidak redukálása) a gélzsebekbe töltjük, majd a fehérjéket elektromos áram segítségével a gélen elválasztjuk egymástól. A futtatás befejeztével a megfelelő méretben körbevágott gélt buborékmentesen, vízzel előnedvesített **nitrocellulóz** membránra (vigyázat, tömény metanolban feloldódik!), vagy metanolban nedvesített és ún. transzfer-pufferben ekvilibrált PVDF (polyvinylidene-fluorid) membránra helyezzük. A membrán alá és a gél tetejére helyezett, lehetőleg vastag vagy többrétegű, előnedvesített szűrőpapírokból ún. „**szendvicset**” készítünk. (Gyakran folyadékban illesztjük össze a szűrőpapír-membrán-gél-szűrőpapír szendvicset, hogy az egész buborékmentes maradjon.) A fehérjéket a gélről a membránra elektromos áram segítségével visszük át (14-4. ábra). Mivel a transzferhez használt puffer lúgos kémhatású, a **fehérjék a pozitív elektród felé** fognak vándorolni – a gélhez képest mindig a pozitív elektród irányába kell helyezni a membránt. Transzfer után a membránt 5% **zsírmentes tejport** tartalmazó pufferben (TBS-Tris puffer vagy PBS-foszfát puffer) **blokkoljuk**. A blokkolás analóg a már megismert prehibridizációval; a membránhoz aspecifikusan fehérjéket kötünk. Blokkoláshoz tejfehérjék helyett lehet mást is használni (BSA-t, zselatint stb.), de a tejpor messze a legolcsóbb, és igen jó eredményt biztosít. Körülbelül egy óra blokkolás után az elsődleges antitestet tartalmazó oldattal történő inkubáció következik. Az oldat összetétele: TBS (vagy PBS), 1% zsírmentes tejpor, 0,1% Tween 20 (detergens). Az antitest hígítása 1:200–1:100 000-ig terjedhet az antitest töménységétől és specifitásától függően, érdemes először az 1:1000 hígítással próbálkozni. Érdemes minél kisebb térfogatban dolgozni (8-10 ml), hogy kevesebb antitestet kelljen használni. Legalább 1 óráig történik az inkubáció, lehetőleg billegő-tálcán, hogy az antitestes oldat a membrán minden szegletét érje. Az antitestek a kötődésük során leszorítják az aspecifikusan kötődő tejfehérjéket azokról a fehérjékről, melyeket specifikusan felismernek. Az inkubáció és az antitestes oldat leöntése után a membránt öblítés után legalább 3x5 percig mossuk (TBS vagy PBS, 1% zsírmentes tejpor, 0,1% Tween 20 keverékében, most már végig ugyanezzel az összetételű oldattal érdemes dolgozni). Mosások után tegyük hozzá a másodlagos antitestet általában 1:2000–1:5000 hígításban. Egyórás billegtetés, majd az antitestes oldat leöntése után legalább egyórás mosás következik, miközben 3-4-szer érdemes lecserélni a mosófolyadékot.

14-4. ábra

http://www.western-blot.us/procedure-of-western-blot/western-blot-transfer

2013.10.20.

Az elsődleges, majd a másodlagos antitesttel történt inkubáció, majd az alapos mosások után előhívhatjuk a membránt. A másodlagos antitestet többféle módon lehet detektálni, ennek elősegítésére az antitestek **torma-peroxidázzal** történő konjugációja a legelterjedtebb. Ebben az esetben közvetlenül előhívás előtt **luminol** és **hidrogén-peroxid** keverékét adjuk a membránhoz. A torma-peroxidáz katalízisének következtében a fehérjéhez kötődött első- és másodlagos antitestek helyén fényreakciót kapunk, amelyet zöld fényre érzékeny **röntgen-filmmel** detektálhatunk (14-5. ábra). A film feketedésének mértékéből következtetni tudunk a vizsgálandó fehérjék egyes mintákban lévő mennyiségeinek arányaira.

14-5. ábra

http://advansta.com/images/Figures/WB%20Quantum/WBQ\_home-Fig1.jpg

2013.10.20.

## 14.4. ELISA

Ha biztosan tudjuk, hogy az adott antitest specifikus, és semmi máshoz nem kötődik, csak a felismerendő fehérjéhez, akkor felesleges a fehérjéket egymástól elválasztanunk ahhoz, hogy a kérdéses fehérje mennyiségi arányait össze tudjuk hasonlítani a különböző mintákban. Ilyenkor egy műanyag, 96-lyukú lemez (microtiter plate) minden lyukába a célfehérjét felismerő, ismert mennyiségű **antitestet** adunk, ami hozzáköt a cella aljához. A kötődés (és a felesleg kimosása) után a cellák felületének antitesttel nem borított részeit aspecifikus fehérjékkel (például BSA-val) blokkoljuk, hogy ezután a cellába már csak az antitesten keresztül tudjon más fehérje bekötni. Ezután a lyukakba bemérjük a különböző koncentrációjú fehérjemintákat, a mintákban lévő, kimutatandó fehérjék specifikusan hozzákapcsolódnak az antitestekhez. A kapcsolódás után a felesleges folyadékot eltávolítjuk, majd elsődleges (másik epitophoz kapcsolódó, mint a cellák aljára ültetett antitest) és másodlagos antitestek oldataival inkubáljuk a mintákat. A másodlagos antitestekhez kötődő fluoreszcens fény vagy enzim generálta színreakciók összehasonlításának segítségével deríthetjük ki a mennyiségi viszonyokat. A másodlagos antitest használata kikerülhető, ha az elsődleges antitesthez fluoreszcens festéket vagy **biotint** kötöttek. Az utóbbi esetben a biotint a **streptavidin** specifikusan köti; a streptavidinhez kötött enzimet vagy fluoreszcens jelölést a már ismert módokon detektáljuk (14-6. ábra). Az ELISA (ezyme-linked immunosorbent assay) gyors, kvantitatív, könnyen mérhető, és sok minta párhuzamos mérésére alkalmas.

Ma már szinte csak a fent említett szendvics-módszer elvén végzik az ELISA-reakciókat. Az előkészített, antitestekkel borított cellákat tartalmazó microtiter plate-eket az erre specializálódott biotechnológiai cégek árusítják, többnyire a többi hozzávaló reagenssel (antitestek, pufferek, enzim-szubsztrát) együtt. Korábban gyakori eljárás volt, hogy nem az antitesteket, hanem magát a fehérjeminta komponenseit kötik a 96-lyukú lemez aljára. Ez a megoldás ugyan olcsóbb, de a specifikus fehérjék alacsonyabb részaránya miatt sokkal nagyobb hátteret, és sokkal kisebb jelet kapunk az enzimreakció során.

 Az ELISA egy korábbi verziója a RIA (radioimmunoassay). Itt a másodlagos antitesteket nem enzimekkel, hanem radioaktív izotópokkal jelölték, és nem fluoreszcencia-, hanem radioaktivitás-intenzitást mértek. Az erősen radioaktív izotópok potenciális egészségkárosító hatása miatt azonban ezt a technikát ma már sehol sem használják.

14-6. ábra

http://www.epitomics.com/images/products/sandwich\_dual.jpg

2013.10.20.