Mikroskopia fluorescencyjna narzędziem do detekcji białek: modelowa immunoreakcja na powierzchni krzemu

Cel ćwiczenia:

- Zapoznanie się z metodami immobilizacji białek.
- Wykonanie modelowej immunoreakcji przeciwciało pierwszorzędowe/przeciwciało drugorzędowe (rabbit IgG/anti-rabbit IgG) na powierzchni krzemu.
- Detekcja białek na powierzchni za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej.
- Wyznaczanie grubości warstw białek za pomocą ellipsometrii.
- Analiza ilościowa otrzymanych wyników.

Zagadnienia:

- Przeciwciała - budowa, struktura, rodzaje i funkcje.
- Metody immobilizacji biomolekuł - wiązania chemiczne, adsorpcja fizyczna, oddziaływania specyficzne.
- Immunoreakcja na powierzchni/ Test immunologiczny (ang. immunoassay) - rodzaje i zastosowania.
- Zjawisko fluorescencji.
- Zasada działania mikroskopu fluorescencyjnego.
- Wyznaczanie grubości warstwy zaadsorbowanych białek za pomocą ellipsometrii.
- Analiza obrazów fluorescencyjnych za pomocą analizy Minkowskiego.

Materiały:

Przeciwciało pierwszorzędowe (rabbit IgG), przeciwciało drugorzędowe (anti-rabbit IgG) znakowane fluorescencyjnie, białko bydlęcej albuminy wołowej (BSA), bufor fosforanowy PBS, silany APTES (3-aminopropyltrietoksy silan) i GOPS ((3-glycidoxypropyl)trimethoxysilane), podkłady krzemowe

Preparatyka:

- Roztwory

1% roztwór APTES-u w toluenie
1% roztwór GOPS-u w toluenie
Roztwory przeciwciał IgG i anti-IgG o stężeniach 10 μg/mL, 50 μg/mL oraz 100 μg/mL PBS
Roztwor BSA o stężeniu 1mg/mL

- Przygotowanie podłoży

Pociąć podkłady krzemowe na próbki o wymiarach ok. 1cm x 1cm. Pocięte podkłady krzemowe wymyć kolejno w etanolu i toluenie wykorzystując płuczkę ultradźwiękową (czas mycia ok.10min). Po osuszeniu azotem wyczyścić powierzchnię próbek plazmą tlenową (30s). Zanurzyć próbki w roztworze APTES-u (10 min) lub GOPS-u (1h). Następnie spłukać kilkakrotnie toluenem, wymyć kolejno w toluenie i etanolu wykorzystując płuczkę ultradźwiękową, a następnie próbki modyfikowane APTES-em wygrzewać w temp 120°C przez 20 min.

- Wykonanie immunoreakcji na powierzchni krzemu

Immobilizacja przeciwciał: próbki modyfikowane silanami przemyć roztworem PBS. Powierzchni próbek pokryć roztworem IgG lub anti-IgG. Czas inkubacji wynosi 1h dla powierzchni modyfikowanej APTES-em i 24h dla powierzchni modyfikowanej GOPS-em. Następnie powierzchnie pró-

bek spłukać kilkakrotnie roztworem buforu PBS. **Blokowanie BSA:** Powierzchnię próbek pokryć roztworem BSA. Czas inkubacji 1h. Następnie powierzchnię próbek spłukać kilkakrotnie roztworem buforu PBS i wysuszyć strumieniem azotu. **Immunoreakcja:** Powierzchnię próbek pokryć roztworem odpowiednio anti-IgG lub IgG. Czas inkubacji 1h. Następnie powierzchnię próbek spłukać kilkakrotnie roztworem buforu PBS oraz wodą destylowaną i wysuszyć strumieniem azotu.

Zagadnienie:

Przeciwciała (immunoglobuliny) (budowa, rodzaje, wiązanie antygen-przeciwciało). Testy immunologiczne na powierzchni (zasada działania, rodzaje, zalety i ograniczenia, zastosowania (np. biosensory). Immobilizacja przeciwciał na powierzchni (wykorzystanie powierzchni modyfikowanych silanami, wiązanie chemiczne, adsorpcja fizyczna, orientacja przeciwciał na powierzchni). Mikroskopia fluorescencyjna (zasada działania, analiza obrazów fluorescencyjnych za pomocą miar Minkowskiego). Ellipsometria (zasada działania, wyznaczanie grubości warstwy zaadsorbowanych białek).

Przykładowa literatura:

„Antibody orientation on biosensor surfaces: a minireview" A. K. Trilling, J. Beekwilder, H. Zuilhof. Analyst 138,2013, 1619-1627.

„Enzyme Immunoassay and Ezyme-Linked Immunosorben Assay" S. D. Gan, K. R. Patel, Journal of Investigative Dermatology 133, 2013, 1-3.

„Ellipsometry on thin organic layers of biological interest characterization and applications" H. Arwin, Thin Solid Films 377, 2000, 48-56.

„Integral Geometry Analysis of Fluorescence Micrographs for Quantitative Relative Comparison of Protein Adsorption onto Polymer Surfaces" J. Zemła, M. Lekka, J. Wiltowska-Zuber, A. Budkowski, J, Rysz, J. Raczkowska, Langmuir 24, 2008, 10253-10258.

Fizyczna adsorpcja, a wiązanie kowalencyjne białek

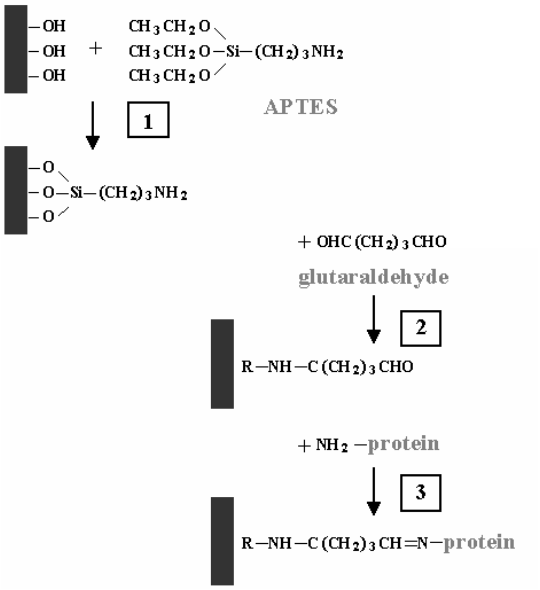
Unieruchomienie białek na powierzchni może zachodzić poprzez fizyczną adsorpcję białek do powierzchni lub ich kowalencyjne wiązanie.

Proces fizycznej adsorpcji białek, choć powszechnie obserwowany na prawie każdym rodzaju powierzchni, jest procesem bardzo skomplikowanym, będącym rezultatem wielu rodzajów oddziaływań. Adsorpcja napędzana jest głównie przez oddziaływania hydrofobowe, elektrostatyczne oraz oddziaływania van der Waalsa, a także przez wzrost entropii konformacyjnej białka na skutek zmian struktury wywołanych adsorpcją. Różna orientacja białek na powierzchni, a także możliwe zmiany struktury mogą powodować zmniejszenie a nawet całkowite utracenie aktywności biologicznej nieuruchomionych w ten sposób molekuł. Na kinetykę adsorpcji białka do powierzchni wpływ mają zarówno właściwości powierzchni, rodzaj adsorbowanego białka jak i warunki środowiska takie jak temperatura, pH czy siła jonowa roztworu. Do najistotniejszych dla procesu adsorpcji własności powierzchni należą jej właściwości fizyko-chemiczne takie jak polarność, oraz morfologia powierzchni. W większości przypadków powierzchnie hydrofobowe wywołują większe zmiany struktury zaadsorbowanych białek niż powierzchnie hydrofilowe, co skutkuje nieodwracalnością procesu adsorpcji, a tym samym większym obserwowanym stopniem pokrycia powierzchni przez białko [CZES]. W celu zwiększenie fizycznej adsorpcji do podłoży bazujących na krzemie (m. in. szkła) stosuje się modyfikację podłoży za pomocą warstwy

organicznej o porządnych właściwościach fizyko-chemicznych. Bardzo często wykorzystuje się do tego celu silany np. APTES ((3-Aminopropyl)triethoxysilane) zwierający grupę aminową.

Wiązanie chemiczne białek do powierzchni zwane także chemisorpcją polega na tworzeniu wiązania chemicznego pomiędzy łańcuchami bocznymi aminokwasów a grupami chemicznymi znajdującymi się na powierzchni. Początkowym etapem chemisorpcji, poprzedzającym utworzenie wiązania chemicznego, jest fizyczna adsorpcja białka do powierzchni. Zaletą immobilizacji białek poprzez tworzenie wiązania kowalencyjnego jest nieodwracalność tego procesu oraz uzyskiwane wysokie pokrycie powierzchni. Istnieje wiele możliwości wiązania kowalencyjnego białek w zależności od rodzaju grup funkcyjnych, którymi została zmodyfikowana powierzchnia. Przykładowe modyfikacje powierzchni pozwalające na kowalencyjne wiązanie białek to [RUS]:

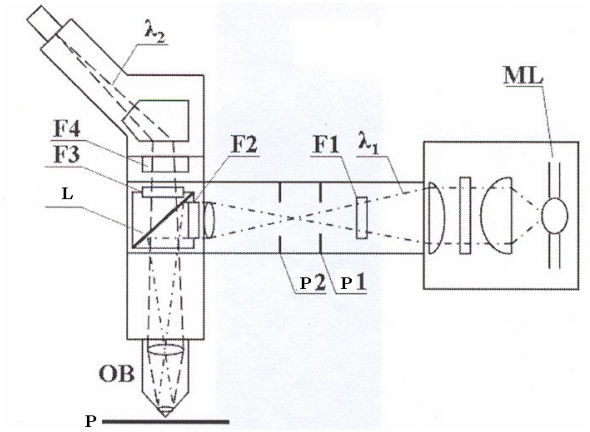
- ⇨ grupy aldehydowe - tworzące wiązanie z grupami aminowymi białek
- ⇨ N-hydroksysukcynimid NHS (ang. N-hydroxysuccinimide) - tworzący wiązanie z grupami aminowymi białek
- ⇨ imid kwasu maleinowego (ang. maleimide) - tworzący wiązanie z grupami tiolowymi znajdującymi się w aminokwasie cysteinie
- ⇨ grupy epoksydowe - tworzące wiązanie z grupami aminowymi białek



Rysunek 2. Schemat silanizacji podłoża za pomocą APTES (1), jego następnej modyfikacji gluteraldehydem (2) oraz wiązania kowalencyjnego białka do tak przygotowanego podłoża (3). [LEB]

Mikroskopia fluorescencyjna

Mikroskopia fluorescencyjna pozwala na badanie substancji fluorescencyjnych, czyli takich, które po naświetleniu światłem o danej długości fali emitują własne promieniowanie świetlne. W przypadku niektórych biomolekuł możliwe jest znaczenie ich znacznikami fluorescencyjnymi, co umożliwia ich detekcję za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego. Stosowanie znakowanych biomolekuł pozwala badać struktury biologiczne np. Żywe komórki a także stwierdzać obecności danych typów molekuł np. na powierzchniach materiałów. Użycie kilku znaczników na raz umożliwia równoczesne zidentyfikowanie różnych typów molekuł.



Rysunek 5: Schemat budowy mikroskopu fluorescencyjnego. ML – lampa rtęciowa, P1, P2 – przesłony, F1, F2, F3, F4 – filtry, L – lustro półprzepuszczalne, OB - obiektyw, P – próbka, λ_1- światło wzbudzające, λ_2 - światło fluorescencyjne [LEB].

Schemat budowy mikroskopu fluorescencyjnego przedstawiono na rys.10. Mikroskop fluorescencyjny zawiera lampę rtęciową jako źródło światła wzbudzającego, które po przejściu przez układ filtrów i przysłon pada na powierzchnię badanej próbki. Oddzielenie światła fluorescencyjnego (λ_2) od światła wzbudzającego odbitego (λ_1) od powierzchni próbki odbywa się za pomocą lustra półprzepuszczalnego, tak aby do oka czy kamery docierało jedynie światło fluorescencyjne.

Fluoroforami często wykorzystywanymi do znakowania białek są m.in.: FITC (fluorescein isothiocyanate) oraz TRITC (tetramethyl rhodamine isothiocyanate). FITC absorbuje światło niebieskie (λ_1= 490 nm), a emituje światło zielone (λ_2= 525 nm). Natomiast TRITC pochłania światło zielone (λ_1 = 557nm), później emitując światło czerwone λ_2 = 576 nm). [ZEM03]

[CZES] C. Czeslik, Zeitschrift fur Physikalische Chemie, 218 (2004) 771
[ZEM01] J. Zemła et al. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 90 (2012) 144-151.
[ZEM02] J. Zemła, praca doktorska, Instytut Fizyki UJ, (2012)
[FOR] K. Fornal, praca magisterska, Instytut Fizyki UJ, (2013)
[LEB] K. Lebed, praca doktorska, Instytut Fizyki Jądrowej PAN, (2006)
[RUS] F. Rusmini et al., Biomacromolecules 8 (2007) 1175-1789.
[ZEM03] J. Zemła, praca magisterska, Instytut Fizyki UJ, (2007)
[HAL] D. A. Hall, Mech Ageing Dev. 2007 January ; 128(1): 161–167.