



Avidin – biotin rendszer

- Avidin: 4 alegység, 16 400 Da → 66 000 Da glikoprotein
 - Green NM „Avidin” Adv Prot Chem 29 85 (1975)
 - biotin kötőhely/alegység; CH kötőhely/alegység
 - pI ~ 10
 - avidin – biotin $1.3 \cdot 10^{-15}$ M (Trp, Lys kötőhely)
 - stabilitás (8 M UREA, 3M Guanidin·HCl)
 - nem-specifikus kötődés is

- Streptavidin „Streptomyces avidinii”
 - 4 alegység, 60 000 Da protein
 - biotin kötőhely/alegység
 - pI 5 – 6
 - kisebb nem-specifikus kötődés



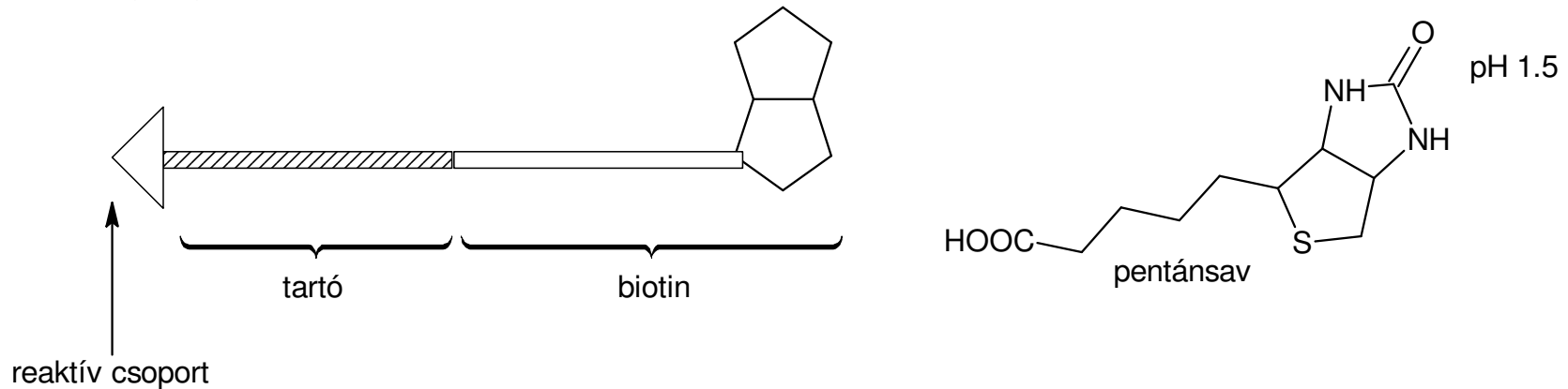
- Biotin

D-biotin,

(hexahidro-2-oxo-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-pentánsav)

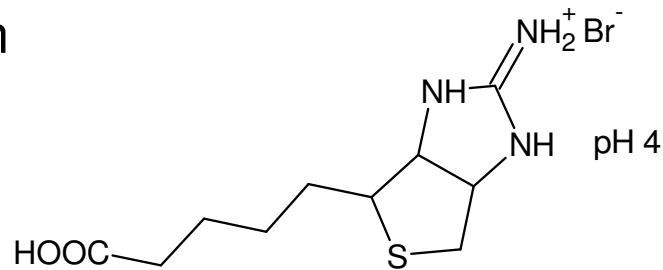
- minden sejt, kis mennyiség
- kofaktor R (CO₂ transzport)
- előfordulás: Lys ε-aminocsoport ➔ BIOCITIN
- hiánybetegség (1927, BOAS)

Konjugátumok



Szemponatok

- kötéshelyek „mélysége” 9 Å
- biotin származék → gyengébb kölcsönhatás
 - pl. iminobiotin



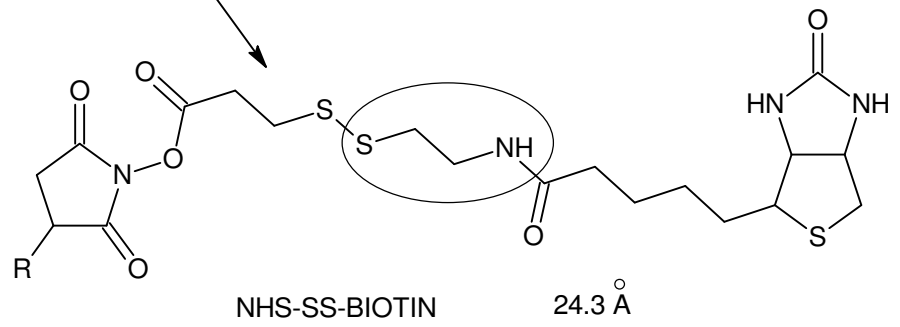
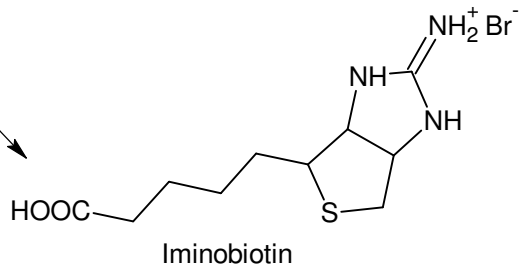
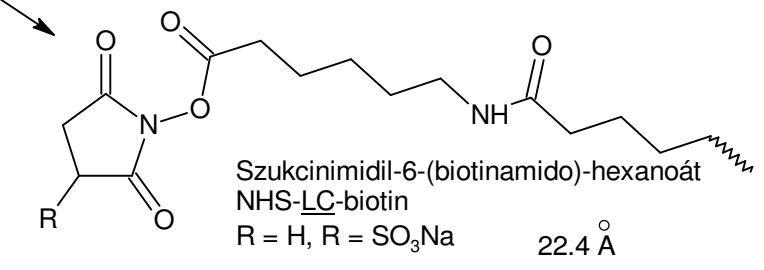
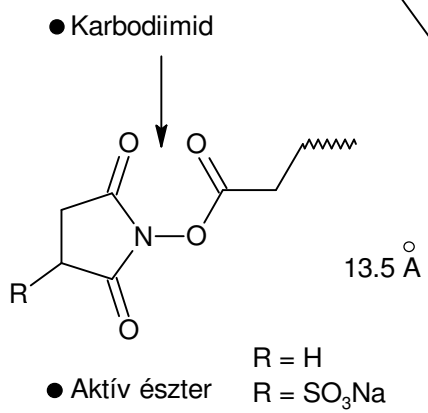
Biotinálás

- -NH₂, -SH, -C=O, -COOH, fotoreaktív

-NH₂



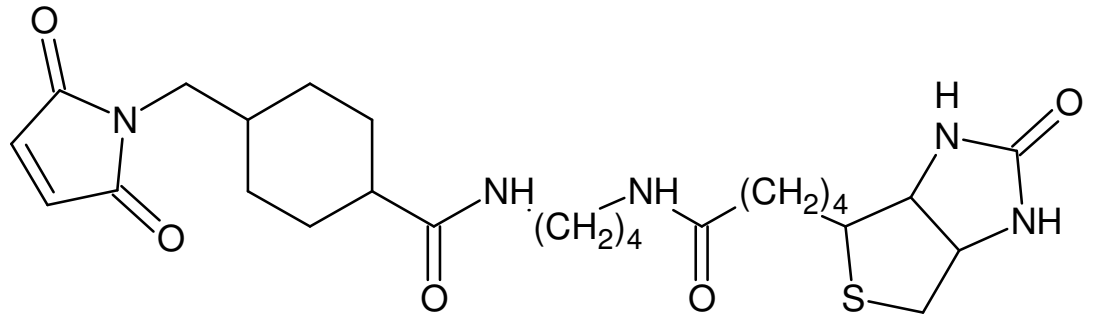
HÁROMFUNKCIÓS KONJUGÁTUM



● Affinitás kromatográfia

-SH

a



MALEIMIDO

BUTÁN

BIOTIN

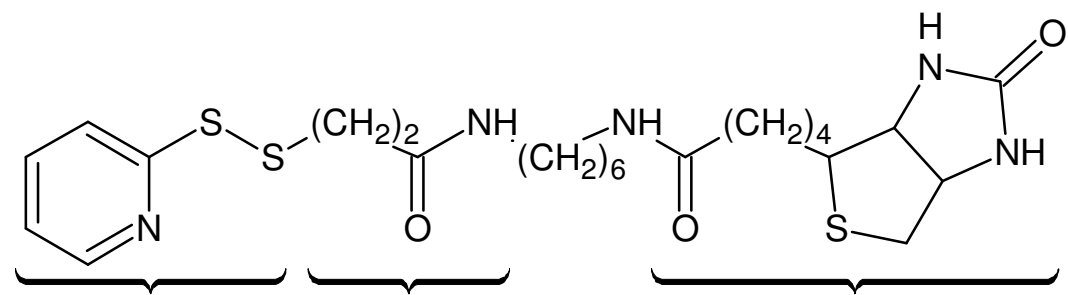
- pH 6.5-7.5
- DMF/DMSO

32.6 Å

BIOTIN-BMCC

TIOÉTER KÖTÉS

b



2-piridilditio

propionsavamid

Biotin

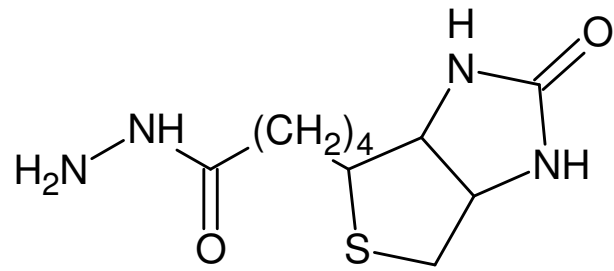
- pH 7 EDTA
- DMF/DMSO

29.2 Å

BIOTIN-HPDP

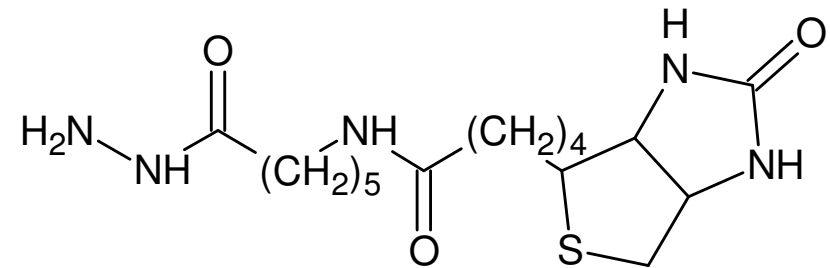
DISZULFID KÖTÉS

-CHO



BIOTIN HIDRAZID

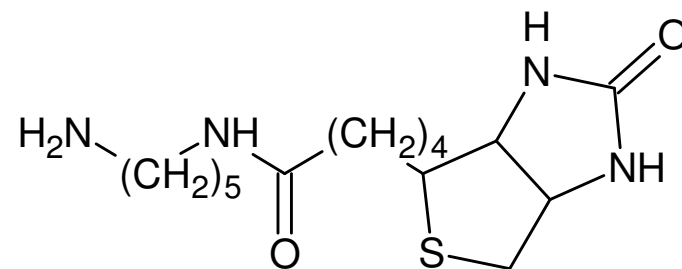
15.7 Å



BIOTIN-LC-HIDRAZID

24.7 Å

-COOH



5-(biotinamido)pentilamin



Biokonjugátumok szintézise, a konjugátumok jellemzése, problémák

A. Szintézis módszerek

1) Reakciótípusok

Egy-lépéses (single pot)

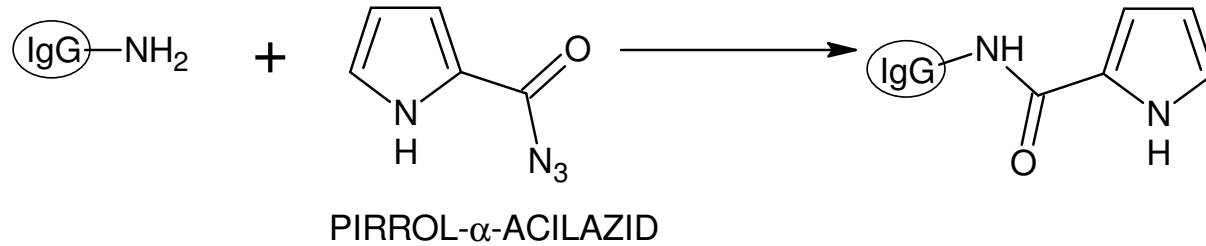
- két partner pl. direkt jelölés
- két partner + kapcsolószer pl. homobifunkciós reagens

Két-lépéses

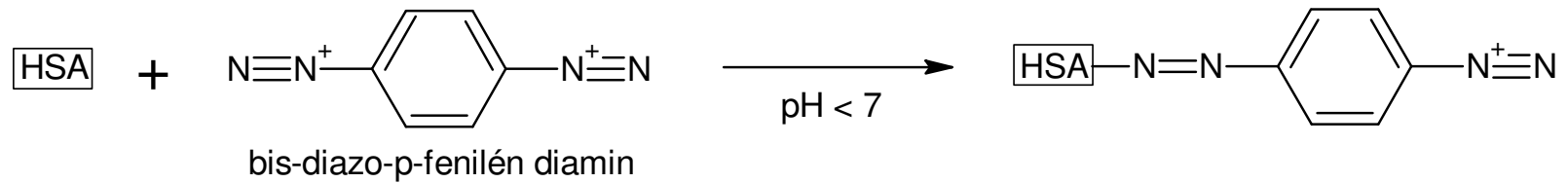
- két partner + kapcsolószer:
 - első lépés: egyik partner + kapcsolószer
 - második lépés: „aktivált” első partner + másik partner
- pl. heterobifunkciós reagens (MBS)
- homobifunkciós reagens (toluol-2,4-diizocianát, glutáraldehid)

Három lépéses

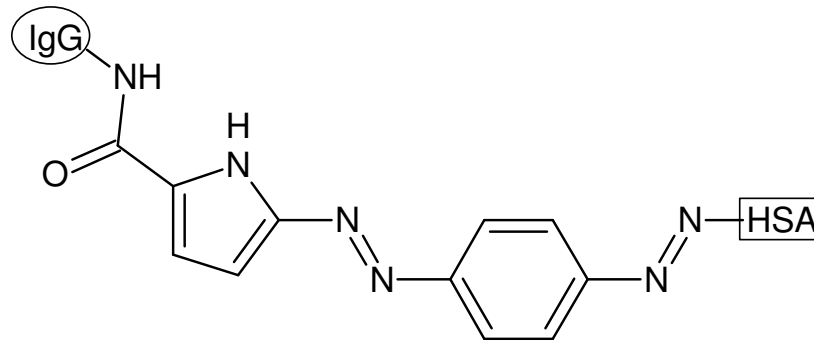
1.



2.



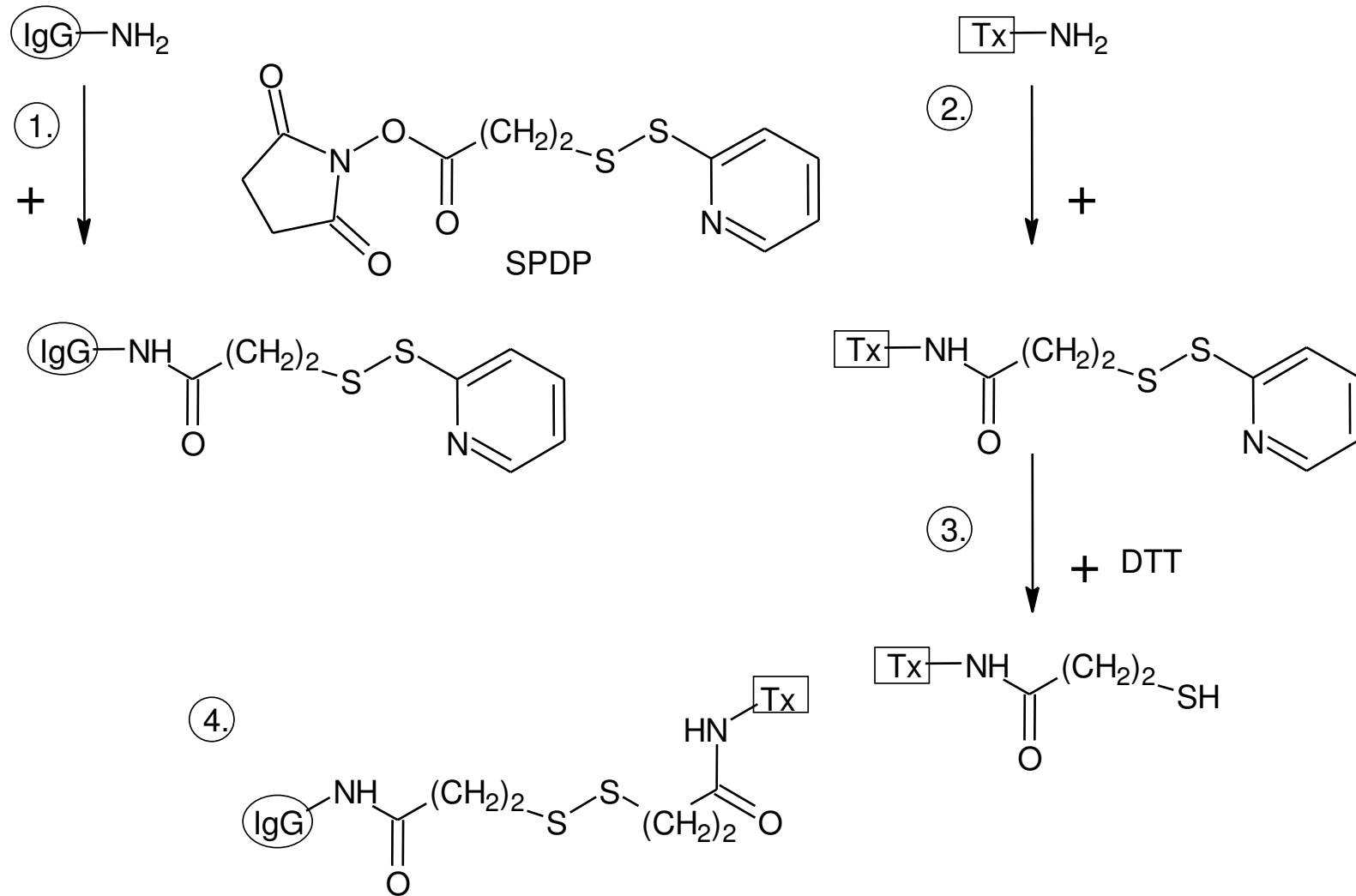
3.



Howard AN, Wild F: Br J Exp Pathol 38 640 (1957)

pl. immunokonjugátumok, immunotoxinok

Többlépéses



2) Reakciókörülmények

- reagens / kapcsolóagens megválasztása
- pH [reagens, funkciós csoport, partnerek funkciója]
- reakcióidő [30 perc - nap]
- fény [UV – látható] hő
- inoerősség [ionizáltság mértéke, konformáció]
- moláris arányok koncentráció
- oldékonyság oldószer

pl. N-hidroxi szukcinimidek – hidrolízis 10 perc pH 8.6
– kis hőmérsékletfüggés 4-5 óra pH 7.0
– perc – óra
– koncentráció 0.05-9 mM

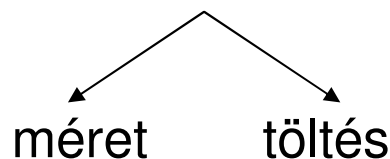
STRATÉGIA

B. Analízis módszerek [kicsi – nagy, nagy – nagy]

- dialízis
 - molekulatömeg
 - időtartam
 - molekulaméret
 - „csere”
 - molekulatöltés
 - oldószer
- UC
 - méret
 - hőmérséklet
- gélszűrés/GPC Sphadex, Bio-Gel P
 - méret különbség (alak!)
 - detektálási módszer (cpm, UV stb.)
 - eluens (oldékonyság, stabilitás)
 - molekulaméret - standardek

● HPLC

● elektroforézis – papír



- gél (PAGE, AGAR)
 - detektálási módszerek
- } egy/két dimenzió


(Festés, cpm, UV, fluoreszcencia)

(Funkcionális: enzimaktivitás, immunoreaktivitás)



c. Komplikációk, problémák

- Heterogenitás – ennek jellemzése / oldékonyság
- reprodukálhatóság /specifitás, szelektivitás/
- a szubsztitúció mértékének meghatározása (spektroszkópia, cpm, MS ... stb.)
- stabilitás („polc”, oldat vs. idő, körülmények)
 - kémiai (pl. aggregálódás)
 - funkcionális (pl. enzim)
- immunogenitás / allergizáló hatás
- denaturáció
- biodisztribúció
- sejtbe jutás módja



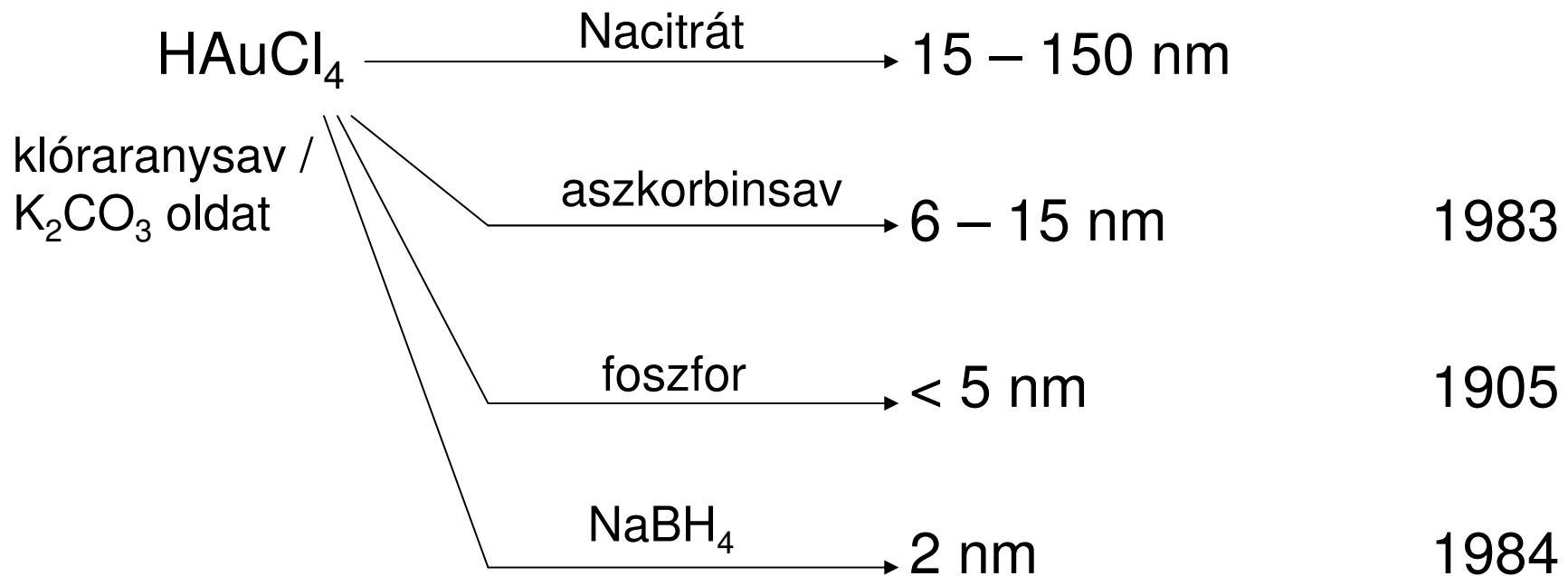
Egy „arany”-os történet

Zsigmondy R (1905) kolloidális arany-sol (< 10 nm)

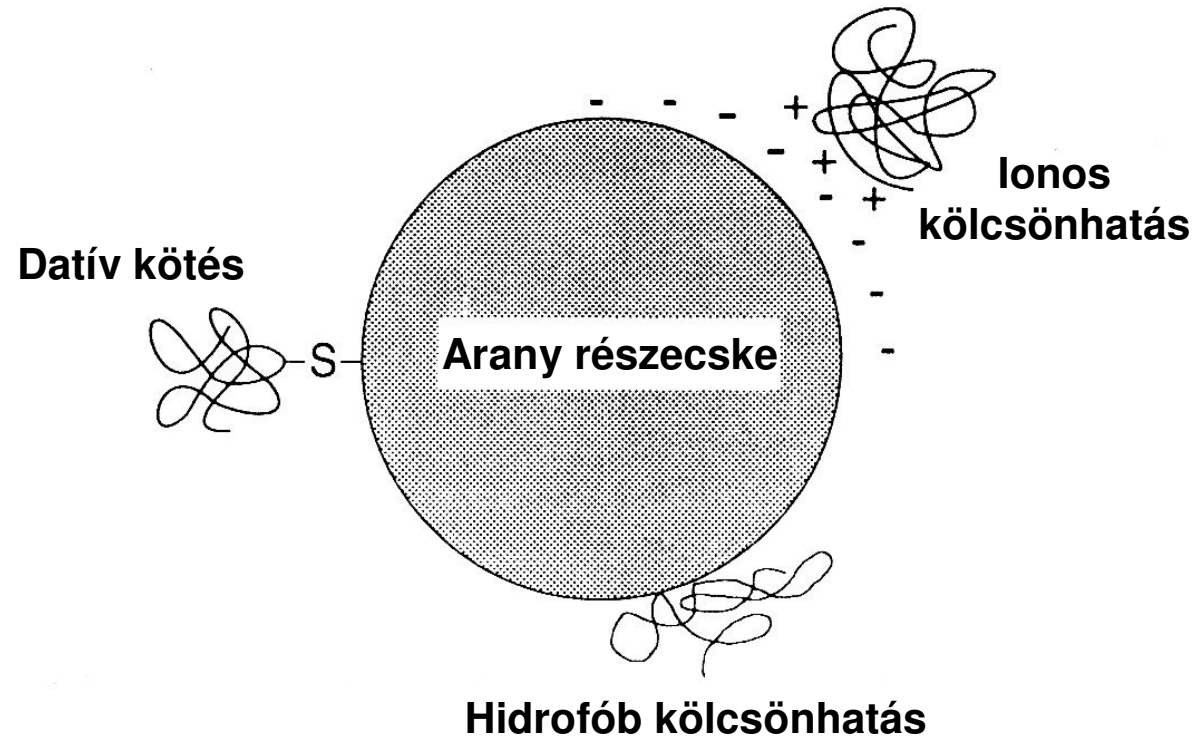
Faulk WP, Taylor GM (1971) „immunogold” elektronmikroszkóp
(Immunochemistry 8 1081-1083)

- blotting
- flow-cytometry
- hibridizáció (1990/1991)

1. Monodiszperz arany-szuszpenzió előállítása



2. Protein – arany konjugátum



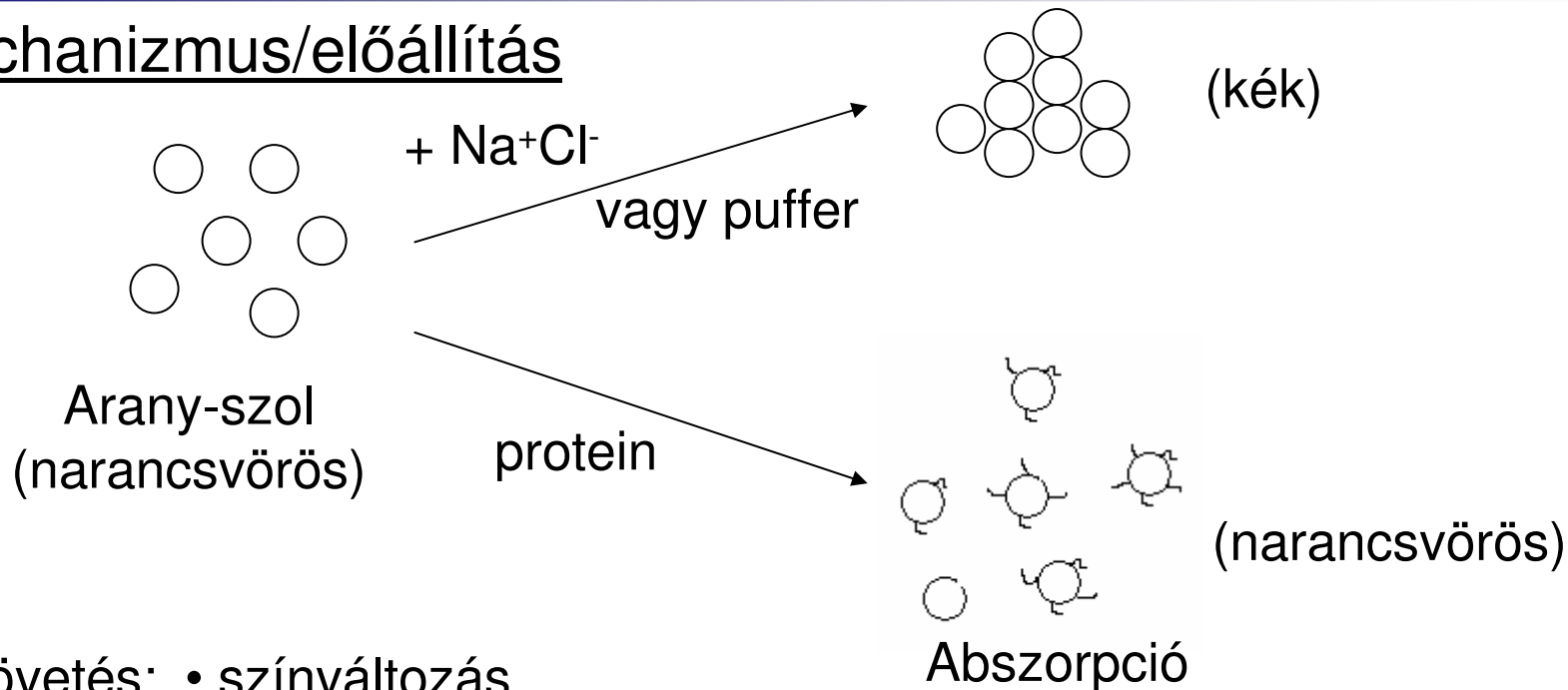
Deryagin BV, Landau L (1941) ActaPhysiochim VRSS 14 633-662

Verwey EJW, Overbeck JTG (1948)

„Theory of the stability of lyophobic colloids” Elsevier

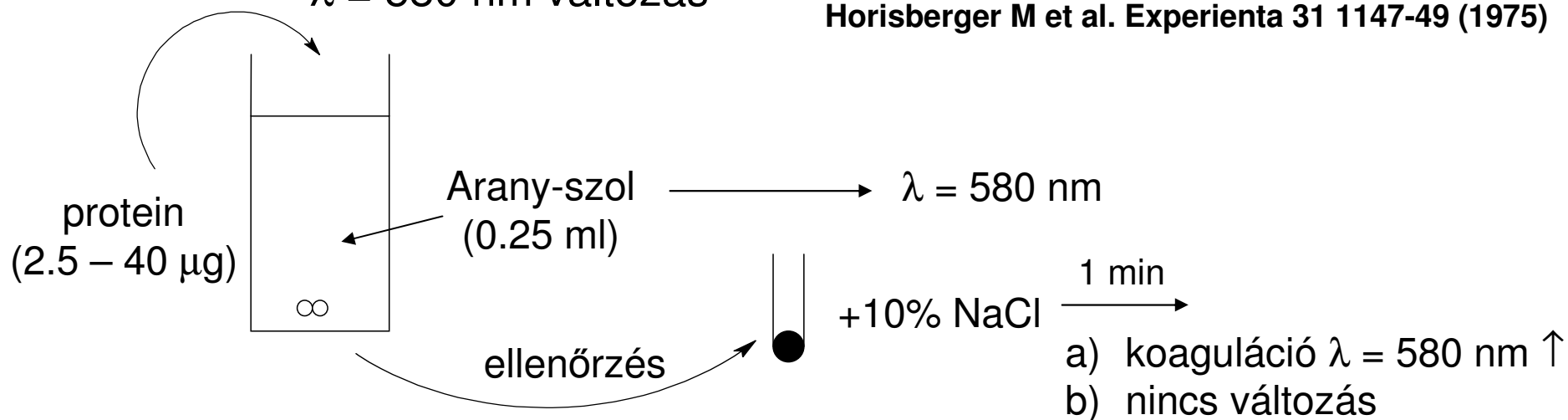
DVLO teória

Mechanizmus/előállítás



követés: • színváltozás
• $\lambda = 580$ nm változás

Horisberger M et al. *Experienta* 31 1147-49 (1975)





Befolyásoló tényezők

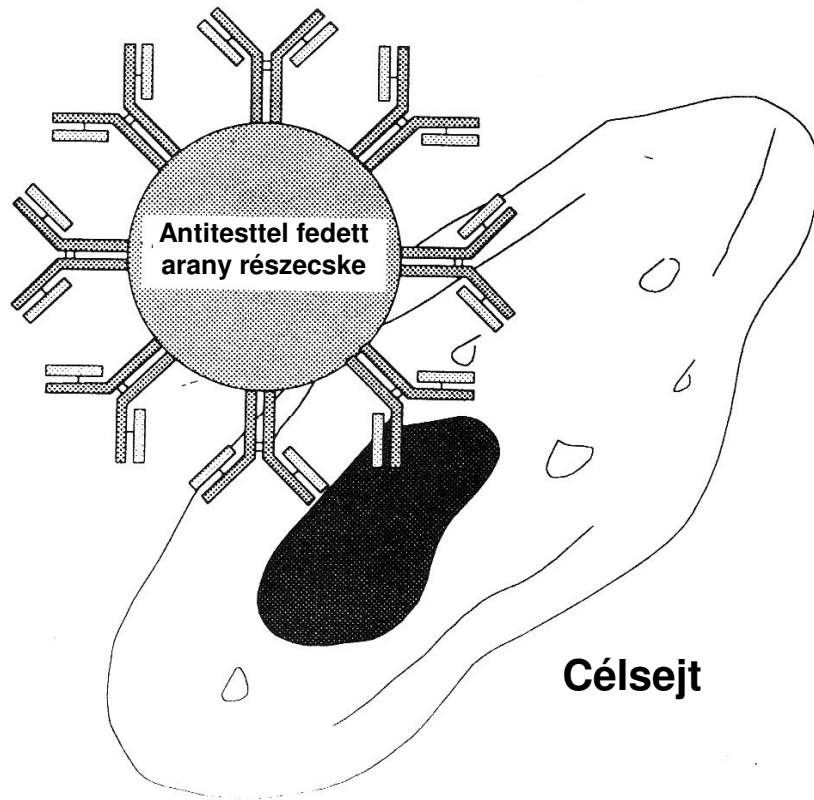
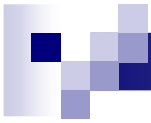
- a protein töltésviszonyai ➔ pI
- az abszorpciós folyamat pH-ja

Gyakorlat

- próbák → nincs univerzális protokoll
- 10% többlet a fehérjéből, mint a minimum
- pI környezetében menjen a reakció

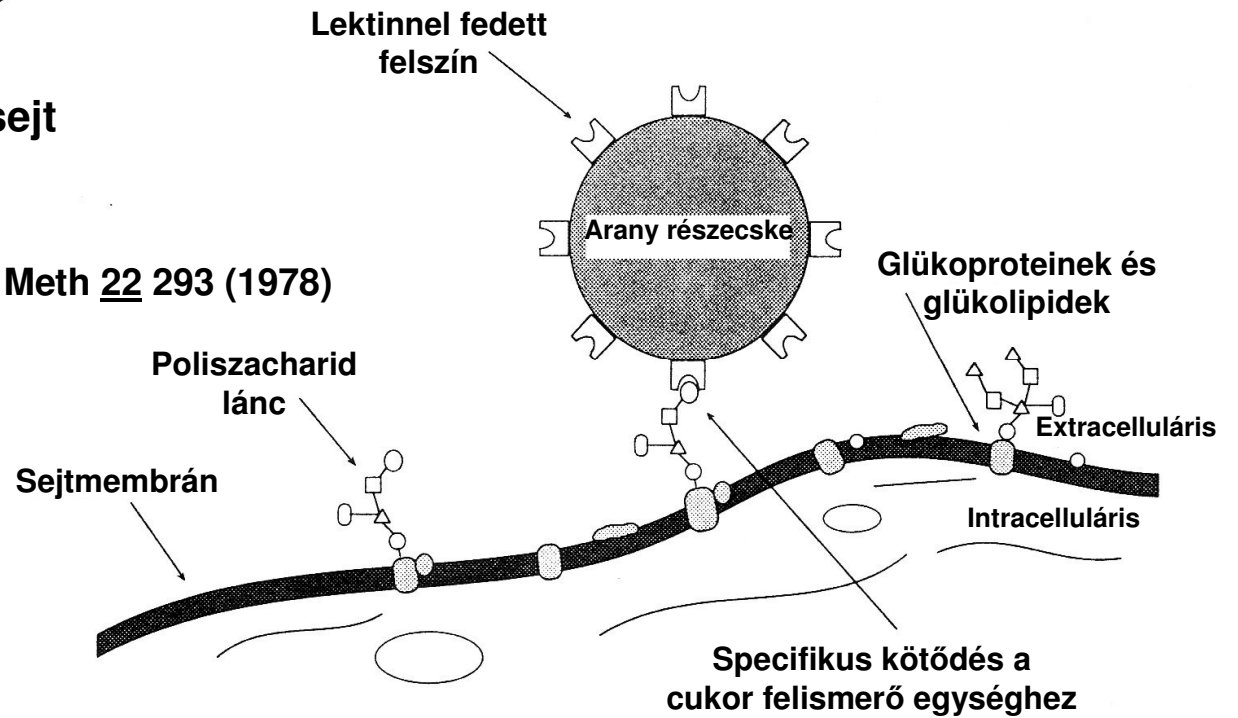
Előnyei

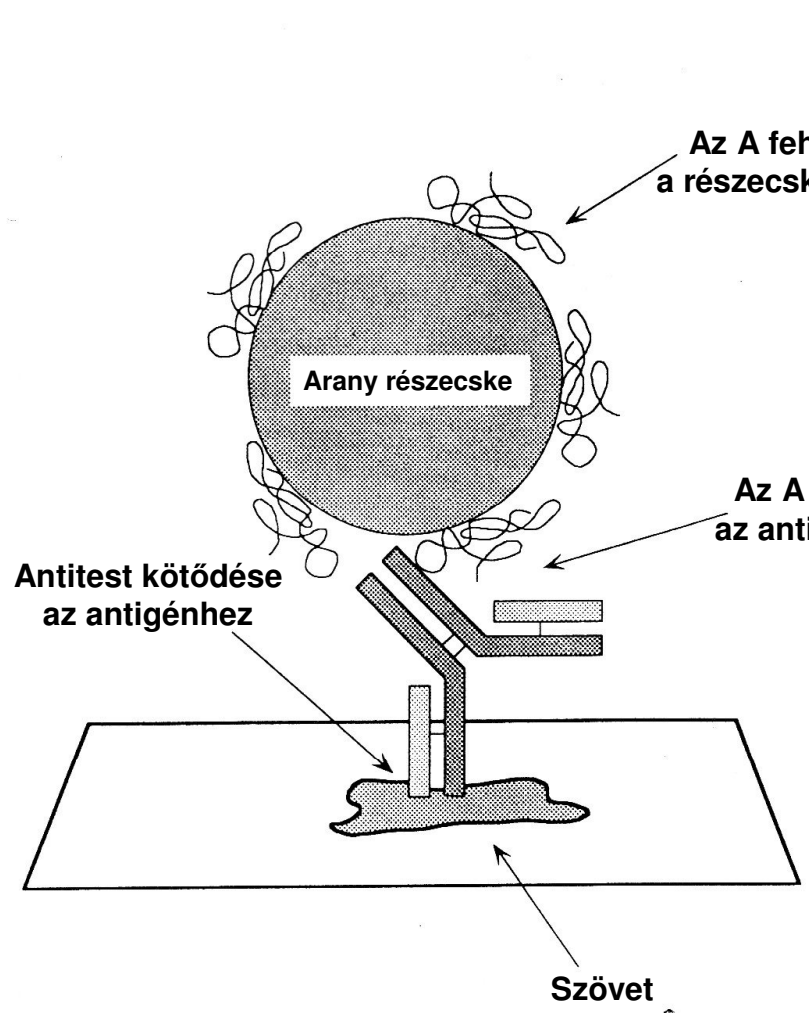
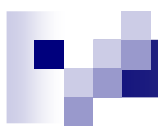
- láthatóvá tétel / mikroszkópia
- stabil (v.ö. fluorofór, kromofór)
- biztonságos (v.ö. radioizotóp)
- kvantitatív mérés



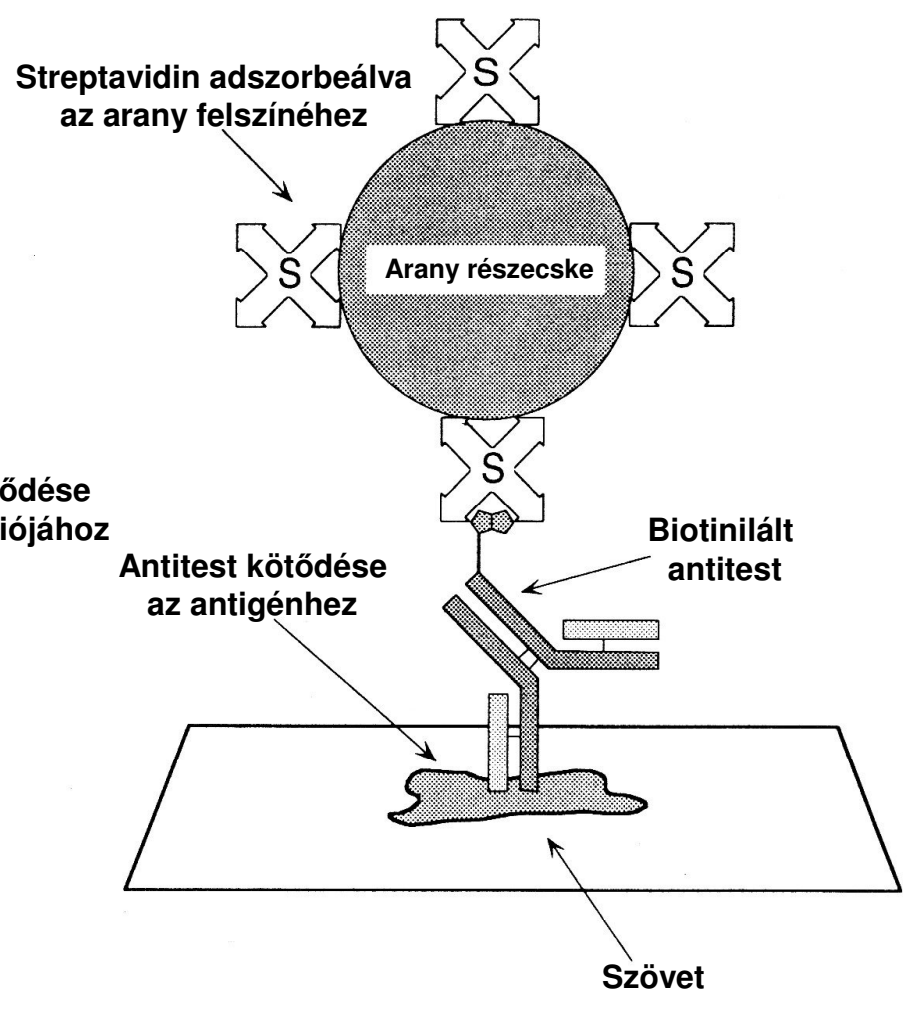
Ellis IO et al. J Histochem Cytochem 36 121-124 (1988)

BOG-Hansen TC et al. J Immunol Meth 22 293 (1978)





Jemmenson R, Agre M
J Histochem Cytochem 35 1277 (1987)



Moreis RE, Saelinger CB
J Histochem Cytochem 32 124-128 (1984)