

# INTENZITÁS ALAPÚ FRET-MÉRÉSEK KALIBRÁLÁSA KALIBRÁLT KÖTŐHELYSZÁMMAL RENDELKEZŐ MIKROGYÖNGYÖKKEL

Batta Ágnes, Hajdu Tímea, Nagy Péter

Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet

A Förster típusú rezonancia-energiatranszfer (FRET) képes a biológiai mintákban 2-10 nm tartományban intermolekuláris távolságokat meghatározni, mivel a hatás fordítottan arányos a távolság hatodik hatványával. A FRET-rendszer mindig tartalmaz két fluorofór molekulát: egy donort és egy akceptort. A mérések kalibrálásához elengedhetetlen az ún. alfa paraméter, amely leírja a gerjesztett akceptor detektálási érzékenységét a gerjesztett donorral szemben.

Fluoreszcens antitestek közötti FRET kísérletben az alfa-faktor kísérletileg meghatározható, ha azonos számú gerjesztett donor és akceptor molekula fluoreszcencia intenzitását hasonlítjuk össze. Ezen feltétel teljesítéséhez két mintát használunk, melyek ugyanolyan számú donorral, ill. akceptorral konjugált antitesttel lettek megjelölve. Ha a jelöléshez sejteket használunk, melyek tipikusan nagy kötőhelyszám-variabilitással rendelkeznek, a megközelítés a jó statisztikát nyújtó áramlási citometriában működik csak jól. Mivel konfokális mikroszkópiában sokkal kevesebb sejtet lehet lemérni, célunk volt a módszer olyan módosítása, amely az alfa faktor minél pontosabb meghatározását teszi lehetővé mikroszkópban.

Alacsony (~1) és magas (~4) jelölési arányú antitesteket választottunk ki, amikkel sejteket, illetve Quantum Simply Cellular (QSC) beadeket jelöltünk meg. A QSC beadek kalibrált számú, Fc- specifikus antitest kötőhelyet tartalmaznak. Eredményeink azt mutatják, hogy a jelölési arány mértéke hatással van az alfa faktor értékére, melynek valószínű oka a fluoreszcens jelölés hatása a festék fluoreszcencia kvantumhatásfokára és az antitest affinitására. Összehasonlítottuk az alfa paraméter meghatározásának reprodukálhatóságát fluoreszcens antitesttel jelölt sejtek és beadek esetében. Az utóbbi esetben az alfa faktor értéke jelentősen kisebb szórást mutat, mint az ugyanolyan antitesttel megjelölt sejtek esetében. Ez a különbség akkor a legszembetűnőbb, ha a sejtek alacsony antitestkötőhely számmal rendelkeznek. A jelenség mögött az áll, hogy a beadek sokkal kisebb variabilitást mutatnak az antitestkötőhelyek számában. A módszer könnyen alkalmazható az intenzitásalapú, mikroszkópos FRET mérések kalibrálásához.