

Reazioni di Immunoistochimica IHC

Laboratorio di Analisi Morfologica di Cellule e
Tessuti

Prof.ssa A. Mauro

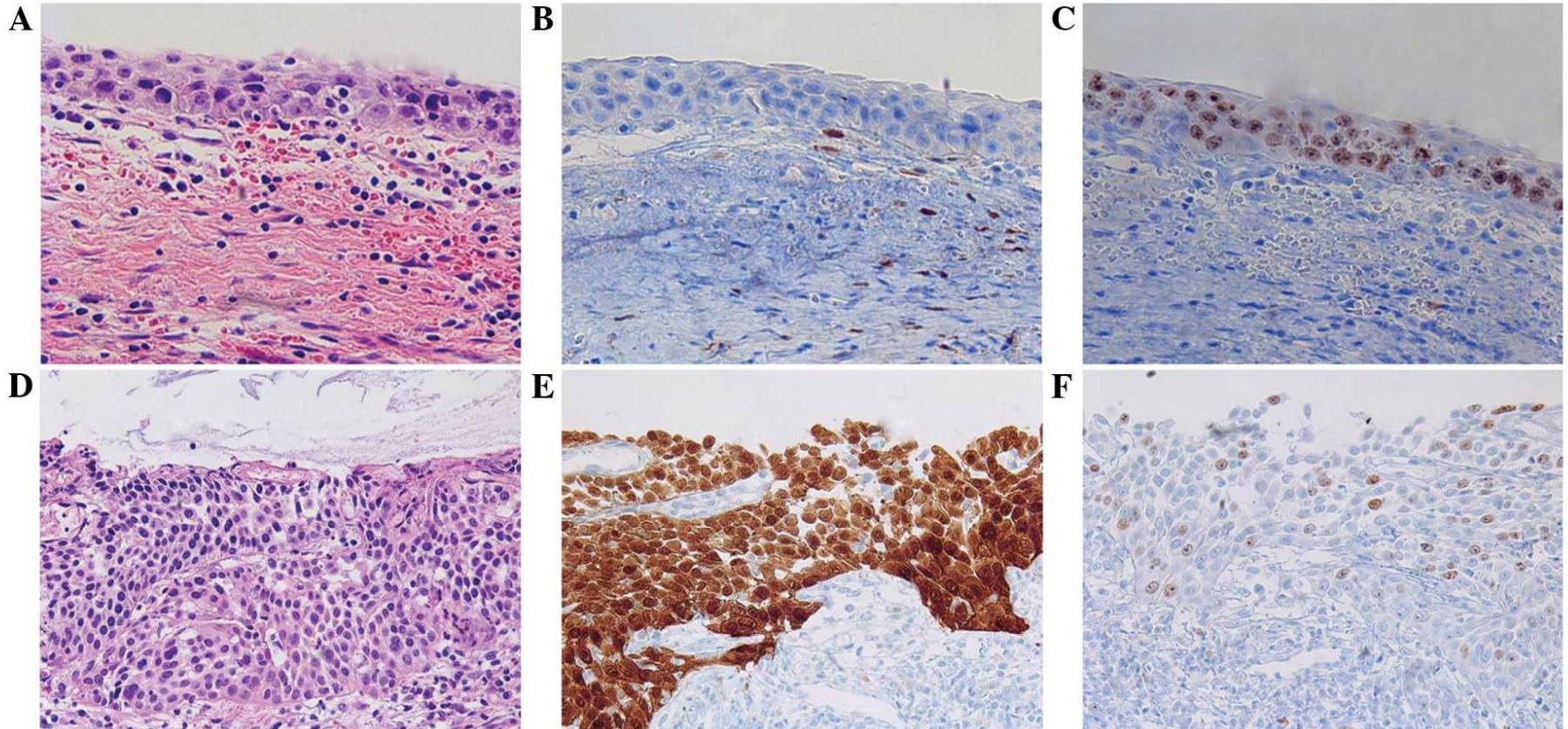
Università degli Studi di Teramo
CdL Biotecnologie



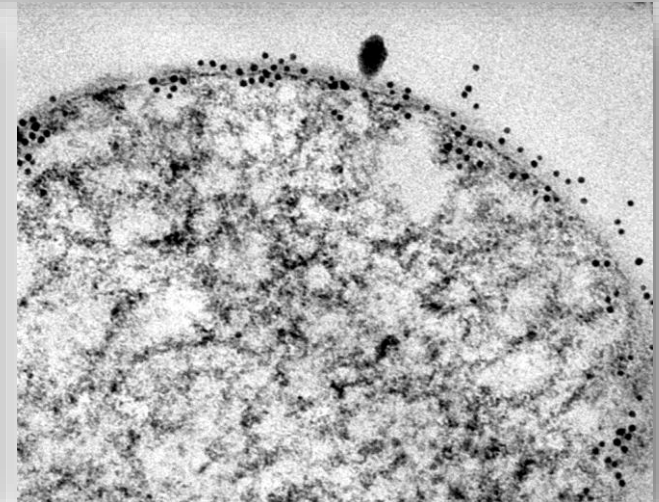
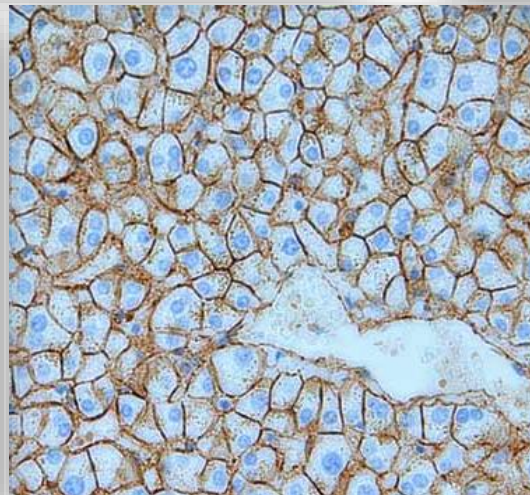
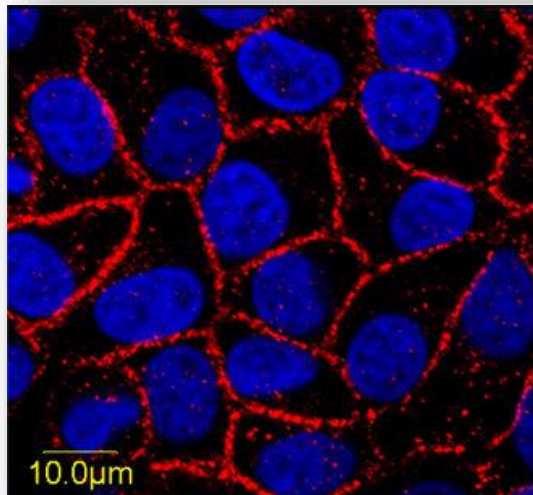
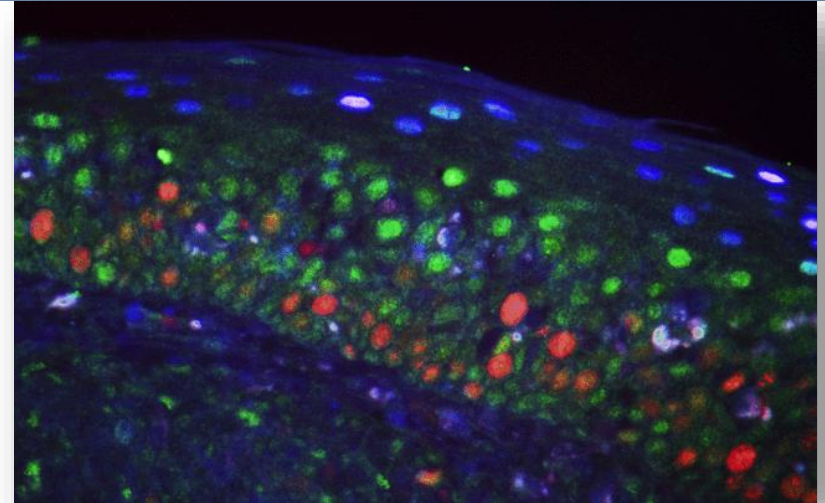
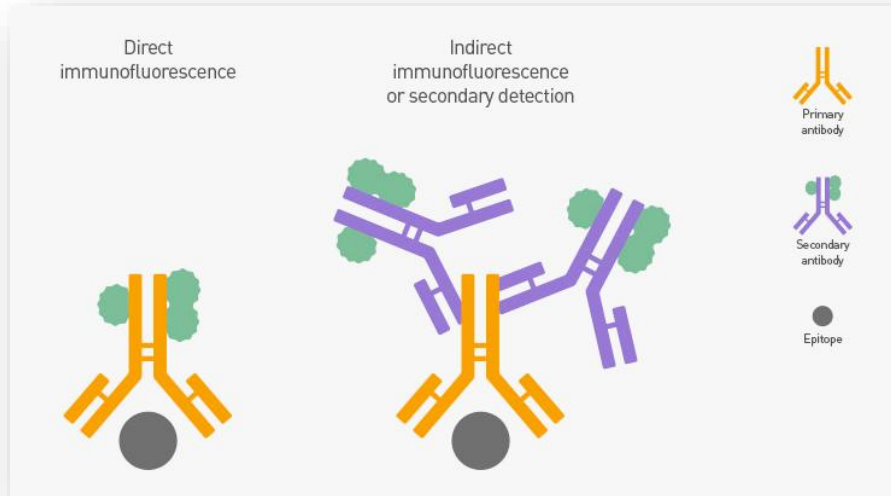
ISTOCHIMICA: SCIENZA CHE COMBINA LE TECNICHE DI BIOCHIMICA E ISTOLOGIA NELLO STUDIO DELLA COSTITUZIONE CHIMICA DEL TESSUTO E DELLE CELLULE.

IMMUNOLOGIA: SCIENZA CHE STUDIA IL SISTEMA IMMUNITARIO, GLI ASPETTI MEDIATI DALLE CELLULE UMORALI DELL'IMMUNITÀ E LE RISPOSTE IMMUNITARIE.

IMMUNOISTOCHIMICA (IHC): TECNICA PER LA LOCALIZZAZIONE DI UN ANTIGENE CONOSCIUTO NEL TESSUTO UTILIZZANDO UN ANTICORPO SPECIFICO DIRETTO CONTRO L'ANTIGENE

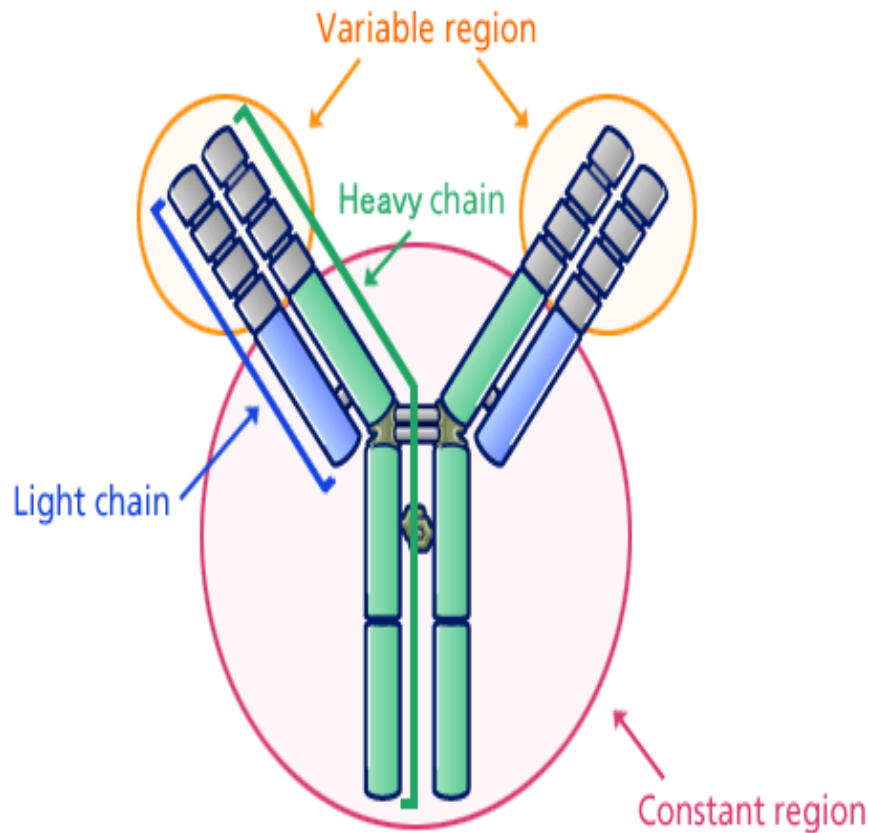


Il principio dell' IHC è di **localizzare gli antigeni** nella coltura cellulare o nella sezione di tessuto mediante l'uso di **anticorpi marcati** attraverso interazioni **antigene-anticorpo** che sono **visualizzati da un marcatore come un colorante fluorescente, enzima o oro colloidale**.



ANTICORPI

Gli **Anticorpi**, noti anche come **immunoglobuline**, vengono prodotte da proteine secrete dai linfociti B per neutralizzare antigeni come batteri e virus.



La rappresentazione classica di un anticorpo è una molecola a forma di Y composta da quattro polipeptidi:

due catene pesanti e due catene leggere.

Ogni estremità della "Y" contiene una regione epitopo o determinante antigenico (regione variabile) che riconosce una specifica sequenza sita su un particolare antigene (analogamente analogo a una chiave), consentendo a queste due strutture di legarsi insieme con precisione.

ANTICORPI

La capacità di legarsi a un antigene ha portato al loro uso onnipresente in una varietà di scienze della vita e scienze mediche.

Questi **anticorpi**, per il mezzo con cui vengono creati dai linfociti, possono essere classificati in due tipi primari:

MONOCLONALI e **POLICLONALI**

ANTICORPI POLICLONALI

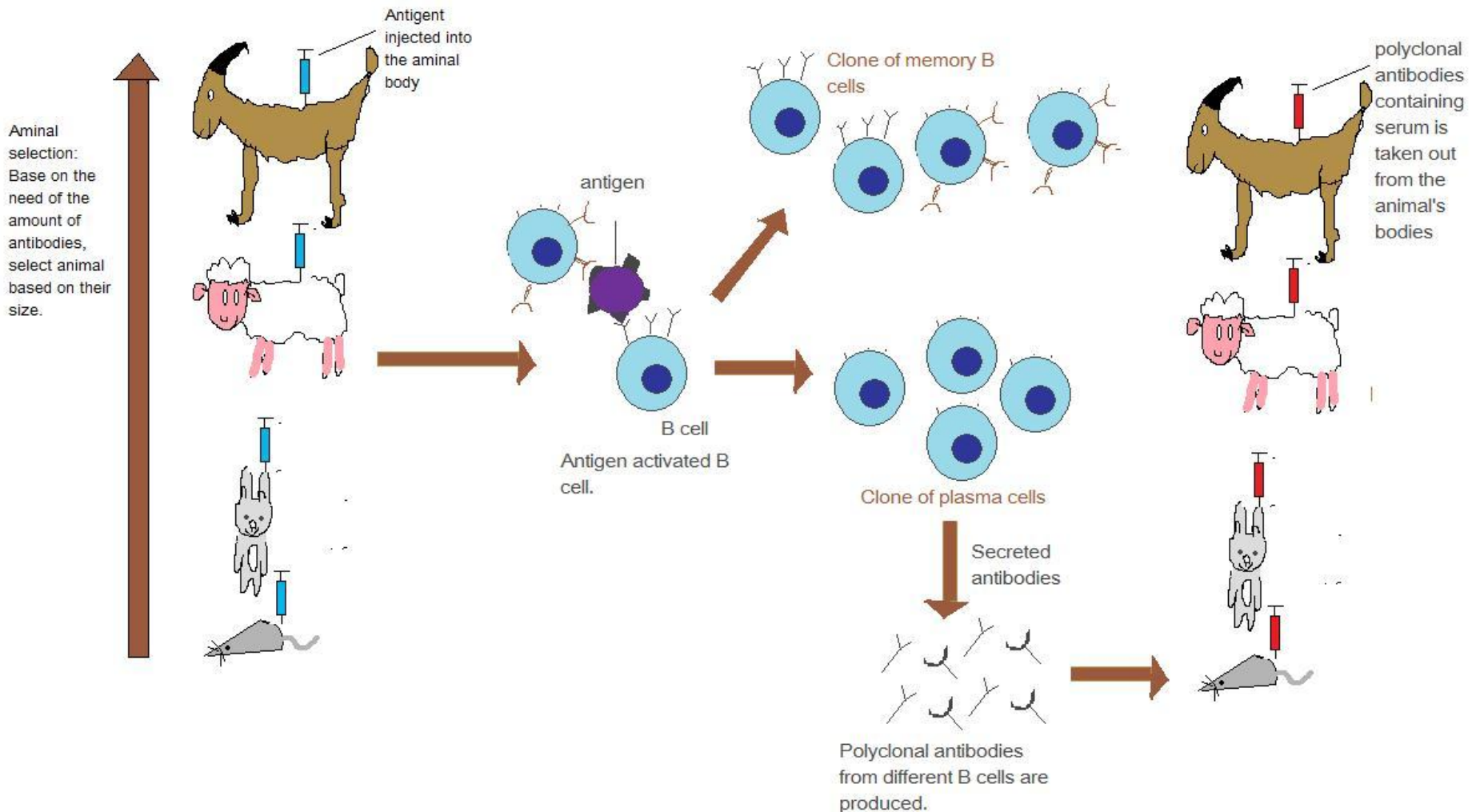
Gli **anticorpi policlonali (pAbs)** sono **miscele eterogenee** che di solito sono prodotte da diversi cloni di cellule B nel corpo.

Possono riconoscere e legarsi a molti epitopi diversi di un singolo antigene.

Gli anticorpi policlonali vengono **prodotti iniettando un immunogeno in un animale.** Dopo essere stato iniettato con un antigene specifico **per suscitare una risposta immunitaria primaria**, l'animale riceve un'immunizzazione secondaria anche terziaria per produrre titoli più elevati di anticorpi contro il particolare antigene.

Dopo l'immunizzazione, **gli anticorpi policlonali possono essere ottenuti direttamente dal siero** (sangue a cui sono state rimosse le proteine della coagulazione e i globuli rossi) o purificati per ottenere una soluzione priva di altre proteine del siero.

ANTICORPI POLICLONALI



POLYCLONAL ANTIBODIES

Advantages:

- Inexpensive to produce.
- Quick to produce. Purified antibody ready to use in under four months.
- Easy to store.
- Highly stable and tolerant of pH or buffer changes.

Disadvantages:

- Variability between different batches produced in different animals at different times
- Higher potential for cross reactivity due to recognizing multiple epitopes
- Affinity purification of the serum will typically be required to minimize cross reactivity

ANTICORPI MONOCLONALI

Gli anticorpi monoclonali (mAbs) sono generati da cellule B identiche che sono cloni di una singola cellula madre.

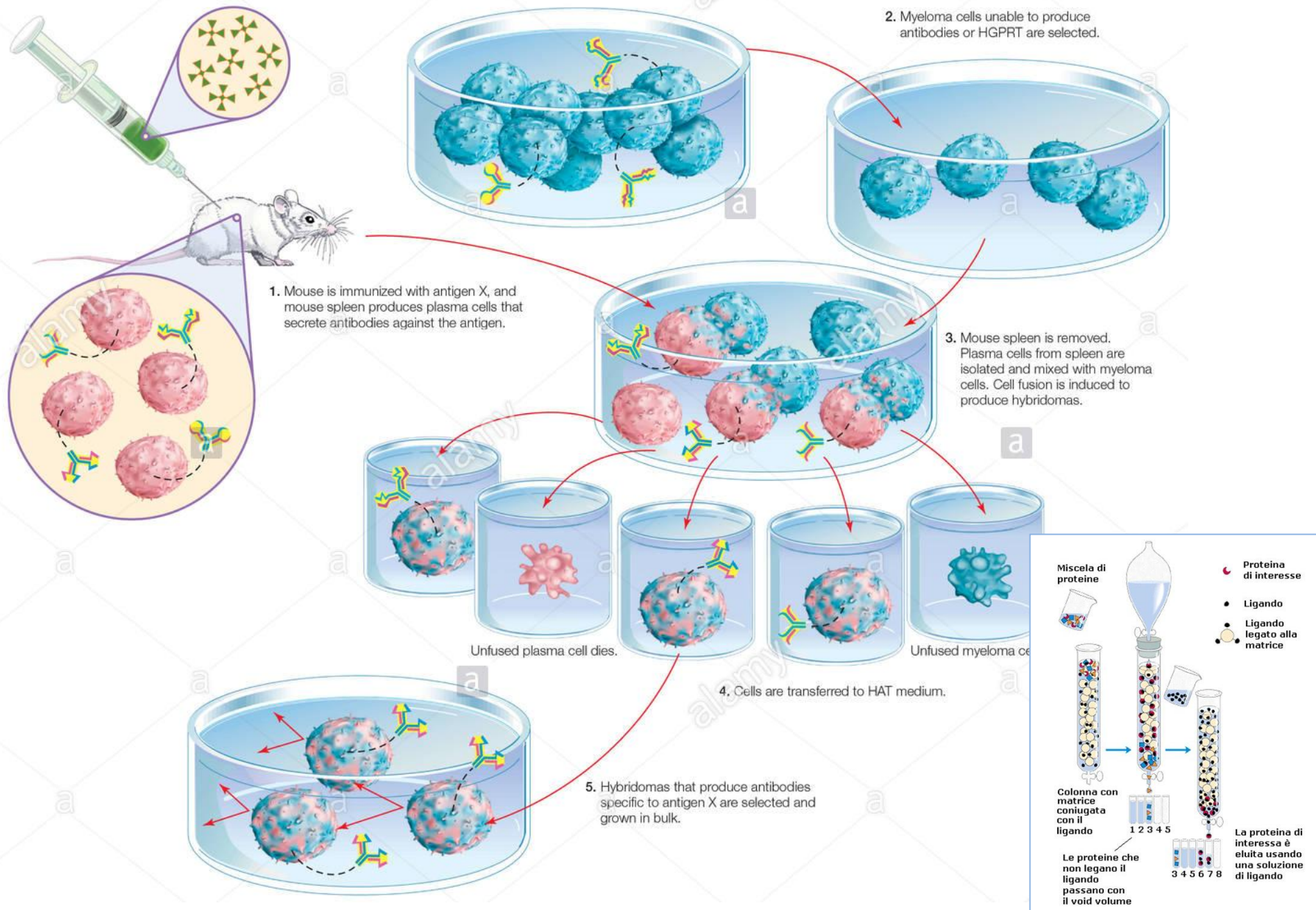
Ciò significa che gli anticorpi monoclonali hanno affinità monovalente e riconoscono solo lo stesso epitopo di un antigene.

A differenza degli anticorpi policlonali, prodotti in animali vivi, gli anticorpi monoclonali vengono prodotti ex vivo utilizzando tecniche di coltura tissutale.

Il processo inizia con un'iniezione dell'antigene desiderato in un animale, spesso un topo. Una volta che l'animale sviluppa una risposta immunitaria, i linfociti B vengono isolati dalla milza dell'animale e fusi con una linea cellulare di mieloma, creando ibridomi di mieloma delle cellule B immortalati.

Gli ibridomi, che sono in grado di crescere continuamente in coltura mentre producono anticorpi, vengono quindi sottoposti a screening per mAb desiderati.

ANTICORPI MONOCLONALI



MONOCLONAL ANTIBODIES

Advantages:

- Can produce large quantities of identical antibody. Batch to batch homogeneity.
- High specificity to a single epitope. Reduced probability of cross reactivity.
- Can provide better results in assays requiring quantification of the protein levels.

Disadvantages:

- Significantly more expensive to produce.
- Requires significantly more time to produce and develop the hybridized clone.
- Small changes in the epitope's structure often render the monoclonal antibody unable to detect the target protein.
- Less ideal for application requiring quick capture of the target protein.
- More sensitive to pH and buffer conditions.

Polyclonal antibody



Monoclonal antibody

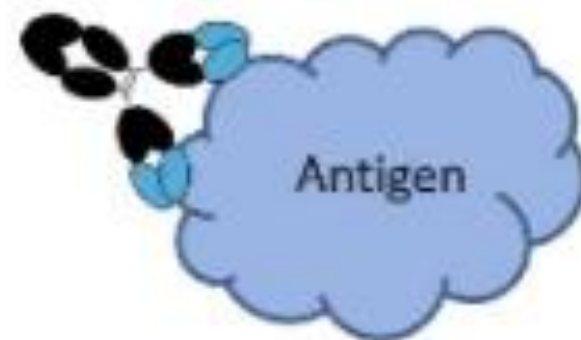
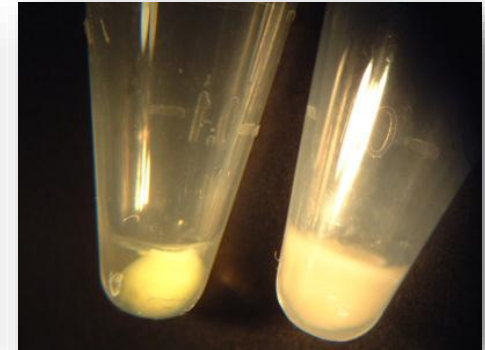


Figure: Polyclonal and Monoclonal Antibodies

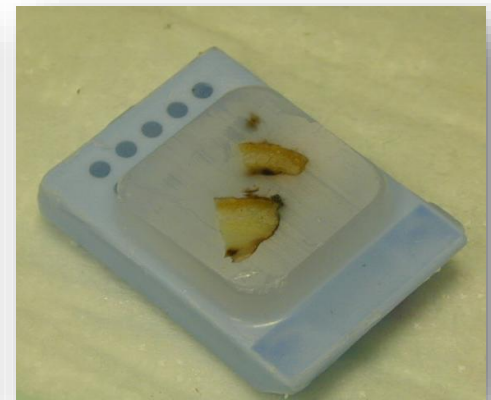
IMMUNOISTOCIMICA- STEPS

- ✓ Preparazione delle sezioni
- ✓ Smascheramento dei siti dell'Antigene
- ✓ Bloccaggio dei siti non specifici
- ✓ Incubazione con Anticorpo (Ab)
- ✓ Lavaggio
- ✓ Rilevamento legame Antigene-Ab
- ✓ Lavaggio
- ✓ Contrasto dei nuclei
- ✓ Montaggio
- ✓ Osservazione Microscopia

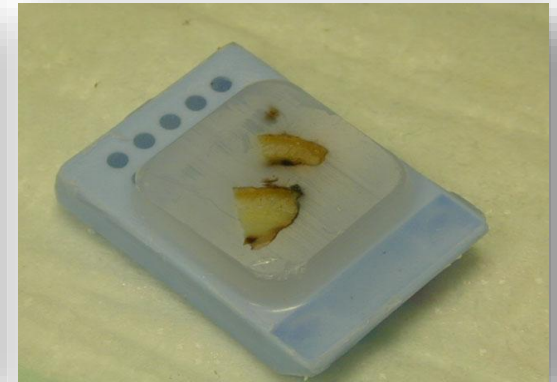
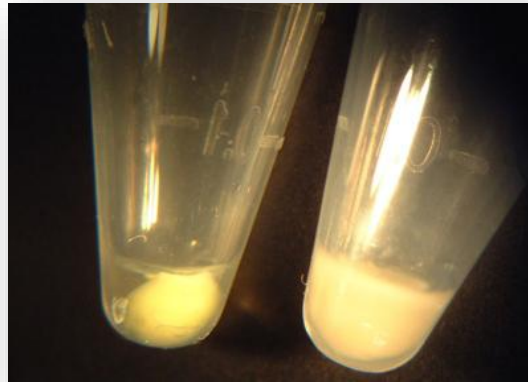
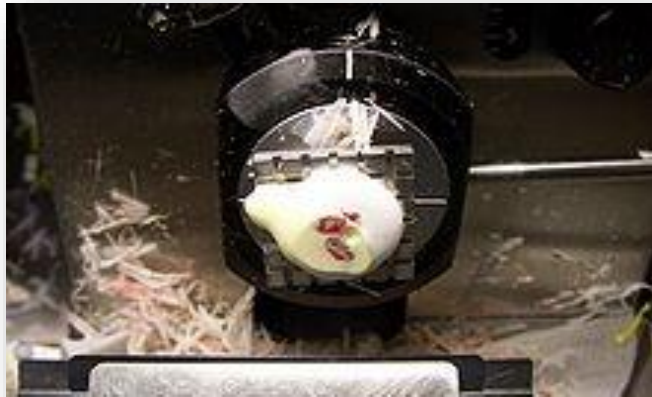
Culture cellulari



Sezioni tissutali



Preparazione delle sezioni



FISSAZIONE FISICA PER CONGELAMENTO:

Gli antigeni sono inalterati ma la morfologia delle sezioni potrebbe essere alterata durante la procedura.

FISSAZIONE CHIMICA (Paraformaldeide) e INCLUSIONE:

La struttura del tessuto viene preservata ma nelle procedure di inclusione il fissativo chimico blocca gli antigeni che devono essere «smascherati»

SPARAFFINATURA

Solvente organico = XYLENE .

REIDRATAZIONE

alcooli discendenti (100%, 70% , 50% e poi H₂O)

PROTOCOLLO IMMUNOISTOCIMICA FATTORE VIII

Numero prova:

GIORNO INIZIO:

SERIE

diluizioni

Xilolo, serie di alcoli decrescenti, acqua distillata

PBS (3 volte per 5')

Tripsina (1mg/ml in PBS) (25')

PBS (3 volte per 5')

PBS/BSA (60')

FVW VIII/PBS/BSA 1% (1:400)

dalle

alle

del

PBS (3 volte per 5')

IgG anti-rabbit CY3 1:100/PBS/BSA 1% (60')

PBS (3 volte per 5')

DAPI 1:100 in PBS (10')

PBS (3 volte per 2')

Lavaggio intenso in dH₂O

Lasciare asciugare e montare con montante acquoso

PROTOCOLLO IMMUNOISTOCIMICA FATTORE VIII

Criosezioni

Numero prova:

GIORNO INIZIO:

SERIE

diluizioni

PBS (1 volta per 5')

Para 4% in PBS (10')

PBS (3 volte per 5')

PBS/BSA (60')

FVW VIII/PBS/BSA 1% (1:400)

dalle

alle

del

PBS (3 volte per 5')

IgG anti-rabbit CY3 1:100/PBS/BSA 1% (60')

PBS (3 volte per 5')

DAPI 1:100 in PBS (10')

PBS (3 volte per 2')

Lavaggio intenso in dH₂O

Lasciare asciugare e montare con montante acquoso

PROTOCOLLO IMMUNOISTOCIMICA FATTORE VIII

PROTOCOLLO IMMUNOISTOCIMICA FATTORE VIII

Criosezioni

Numero prova:

GIORNO INIZIO:

Numero prova:

GIORNO INIZIO:

SERIE

diluizioni

SERIE

diluizioni

Xilolo, serie di alcoli decrescenti, acqua distillata

PBS (3 volte per 5')

Tripsina (1mg/ml in PBS) (25')

PBS (3 volte per 5')

PBS/BSA (60')

FVW VIII/PBS/BSA 1% (1:400)

dalle

alle

del

PBS (3 volte per 5')

IgG anti-rabbit CY3 1:100/PBS/BSA 1% (60')

PBS (3 volte per 5')

DAPI 1:100 in PBS (10')

PBS (3 volte per 2')

Lavaggio intenso in dH₂O

Lasciare asciugare e montare con montante acquoso

PBS (1 volta per 5')

Para 4% in PBS (10')

PBS (3 volte per 5')

PBS/BSA (60')

FVW VIII/PBS/BSA 1% (1:400)

dalle

alle

del

PBS (3 volte per 5')

IgG anti-rabbit CY3 1:100/PBS/BSA 1% (60')

PBS (3 volte per 5')

DAPI 1:100 in PBS (10')

PBS (3 volte per 2')

Lavaggio intenso in dH₂O

Lasciare asciugare e montare con montante acquoso

PROTOCOLLO IHC per Sezioni Incluse

PROTOCOLLO IMMUNOISTOCHEMICA FATTORE VIII

✓ Preparazione delle sezioni

✓ Smascheramento dei siti
dell'Antigene

✓ Bloccaggio dei siti non specifici

✓ Incubazione con Anticorpo (Ab)

✓ Lavaggio

✓ Rilevamento legame Antigene-Ab

✓ Lavaggio

✓ Contrasto dei nuclei

✓ Montaggio

✓ Osservazione Microscopia

Numero prova:

GIORNO INIZIO:

SERIE

diluizioni

Xilolo, serie di alcoli decrescenti, acqua distillata

PBS (3 volte per 5')

Tripsina (1mg/ml in PBS) (25')

PBS (3 volte per 5')

PBS/BSA (60')

FVW VIII/PBS/BSA 1% (1:400)

dalle

alle

del

PBS (3 volte per 5')

IgG anti-rabbit CY3 1:100/PBS/BSA 1% (60')

PBS (3 volte per 5')

DAPI 1:100 in PBS (10')

PBS (3 volte per 2')

Lavaggio intenso in dH₂O

Lasciare asciugare e montare con montante acquoso

PROTOCOLLO IHC per Sezioni Incluse

- ✓ Preparazione delle sezioni
- ✓ Smascheramento dei siti dell'Antigene
- ✓ Bloccaggio dei siti non specifici
- ✓ Incubazione con Anticorpo (Ab)
- ✓ Lavaggio
- ✓ Rilevamento legame Antigene-Ab
- ✓ Lavaggio
- ✓ Contrasto dei nuclei
- ✓ Montaggio
- ✓ Osservazione Microscopia

Smascheramento dell'Antigene

Le sezioni sparaffinate e reidratate devono essere trattate per esporre gli epitopi antigenici attraverso la reversione parziale della fissazione aumentando l'accessibilità dell'anticorpo.



Heat Induced Epitope Retrieval (HIER)

- ✓ Citrate Buffer (pH 6)
- ✓ Tris-EDTA Method (pH 9)

in

- ✓ Water bath
- ✓ Autoclave
- ✓ Microwave oven
- ✓ Pressure cooker

for

15-60 min

Proteolytic Induced Epitope Retrieval (PIER)

- ✓ Proteinase K
- ✓ Trypsin
- ✓ Pepsin
- ✓ Pronase
- ✓ Protease

at 37°C



abcam

Product datasheet

Anti-alpha smooth muscle Actin antibody [EPR5368] ab124964
RabMAb

1/1000 - 1/2500. Perform heat mediated antigen retrieval with citrate buffer pH 6 before commencing with IHC staining protocol.

See protocols (link: <http://www.abcam.com/protocols/ihc-antigen-retrieval-protocol>).

PROTOCOLLO IMMUNOISTOCHEMICA FATTORE VIII

PROTOCOLLO IHC per Sezioni Incluse

Numero prova:

GIORNO INIZIO:

SERIE

diluizioni

Xilolo, serie di alcoli decrescenti, acqua distillata

PBS (3 volte per 5')

Trypsina (1mg/ml in PBS) (25')

PBS (3 volte per 5')

PBS/BSA (60')

FVW VIII/PBS/BSA 1% (1:400)

dalle

alle

del

PBS (3 volte per 5')

IgG anti-rabbit CY3 1:100/PBS/BSA 1% (60')

PBS (3 volte per 5')

DAPI 1:100 in PBS (10')

PBS (3 volte per 2')

Lavaggio intenso in dH₂O

Lasciare asciugare e montare con montante acquoso

✓ Preparazione delle sezioni

✓ Smascheramento dei siti
dell'Antigene

✓ Bloccaggio

✓ Incubazione con Anticorpo (Ab)

✓ Lavaggio

✓ Rilevamento legame Antigene-Ab

✓ Lavaggio

✓ Contrasto dei nuclei

✓ Montaggio

✓ Osservazione Microscopia

PROTOCOLLO IMMUNOISTOCHEMICA FATTORE VIII

Numero prova:

GIORNO INIZIO:

SERIE

diluizioni

Xilolo, serie di alcoli decrescenti, acqua distillata

PBS (3 volte per 5')

Tripsina (1mg/ml in PBS) (25')

PBS (3 volte per 5')

PBS/BSA (60')

FVW VIII/PBS/BSA 1% (1:400)

dalle

alle

del

PBS (3 volte per 5')

IgG anti-rabbit CY3 1:100/PBS/BSA 1% (60')

PBS (3 volte per 5')

DAPI 1:100 in PBS (10')

PBS (3 volte per 2')

Lavaggio intenso in dH₂O

Lasciare asciugare e montare con montante acquoso

✓ Preparazione delle sezioni

✓ Smascheramento dei siti dell'Antigene

✓ Bloccaggio dei siti non specifici

✓ Incubazione con Anticorpo (Ab)

✓ Lavaggio

✓ Rilevamento legame Antigene-Ab

✓ Lavaggio

✓ Contrasto dei nuclei

✓ Montaggio

✓ Osservazione Microscopia

Bloccaggio dei siti non specifici

Prima di utilizzare gli anticorpi per rilevare le proteine mediante immunoistochimica, tutti gli epitopi proteici sul campione di tessuto devono essere bloccati per prevenire il legame non specifico degli anticorpi.

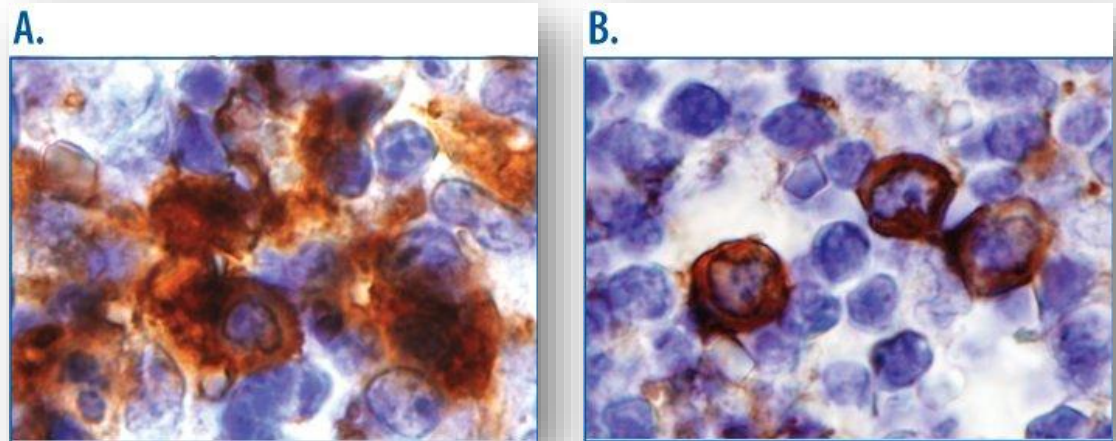
Blocking è effettuato con:

- ✓ Normal serum
- ✓ Bovine Serum Albumin
- ✓ Milk

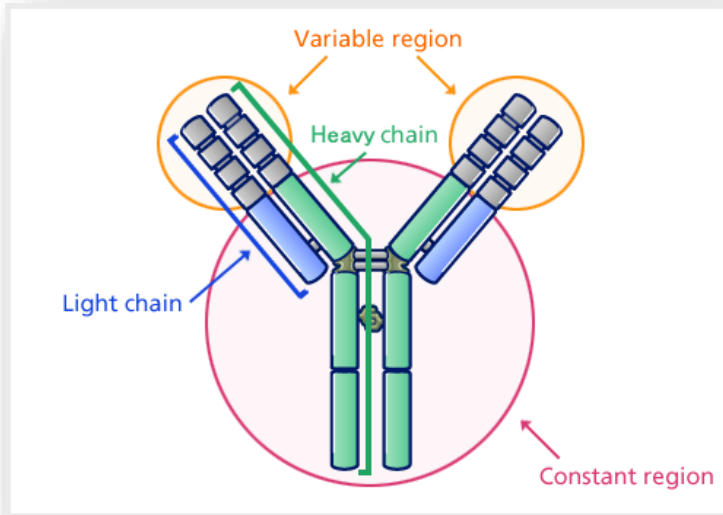
Attenzione!

✓ È importante non utilizzare il siero normale proveniente dalla fonte primaria di anticorpi, poiché le proteine sieriche provenienti da questa fonte saranno riconosciute durante rilevamento del segnale comportando un forte rumore di fondo che non consente la distinzione della proteina specifica.

✓ Un blocco insufficiente comporterà un forte rumore di fondo e un blocco eccessivo può mascherare il segnale.



Incubazione con Anticorpo Primario (I Ab)



- ✓ 1-2 ore a T. ambiente (a volte)
- ✓ Overnight at 4°C (quasi sempre consigliata)

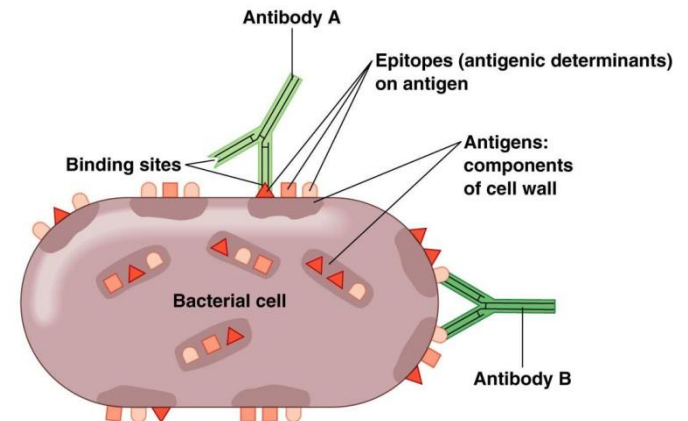
- ✓ Ab Policlonali
- ✓ Ab Monoclonali

Polyclonal antibodies

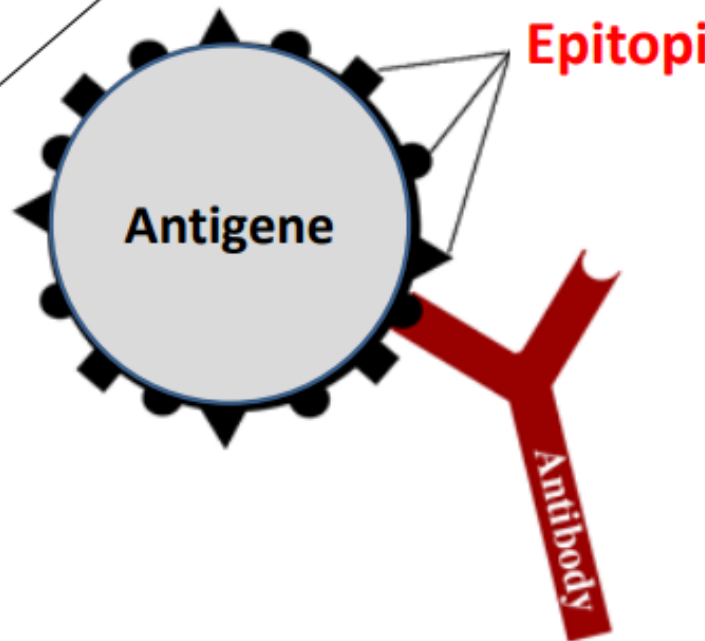
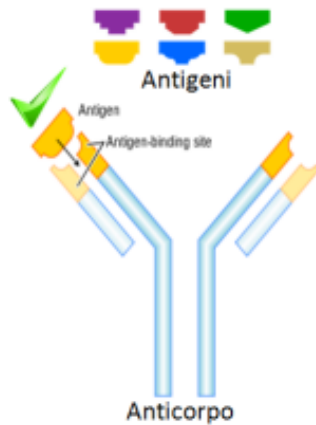
Miscela di Anticorpi diversi che si legano più EPITOPI per un singolo antigene sono chiamati anticorpi policlonali.

Monoclonal antibodies:

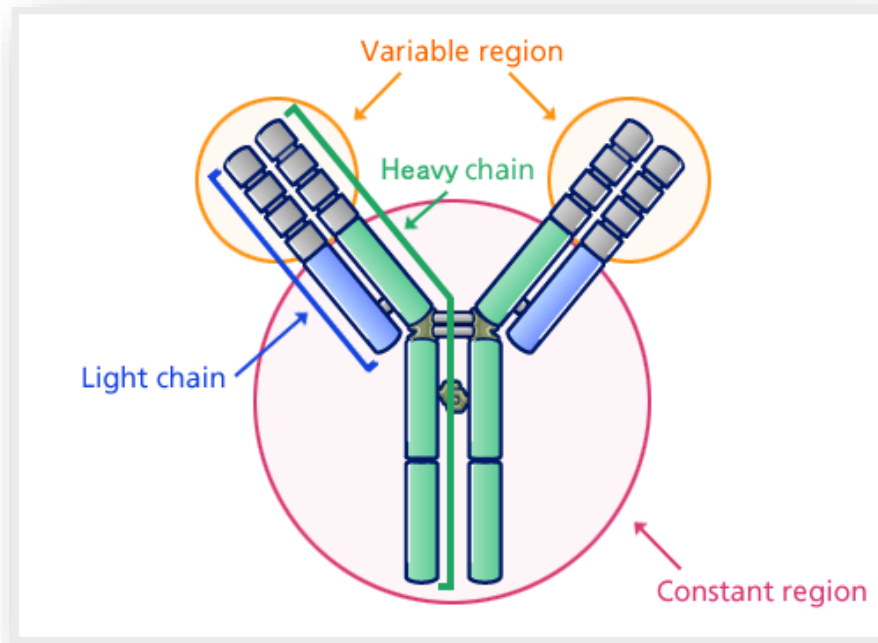
Anticorpi specifici per un singolo EPITOPO e prodotti da un singolo clone sono chiamati anticorpi monoclonali.



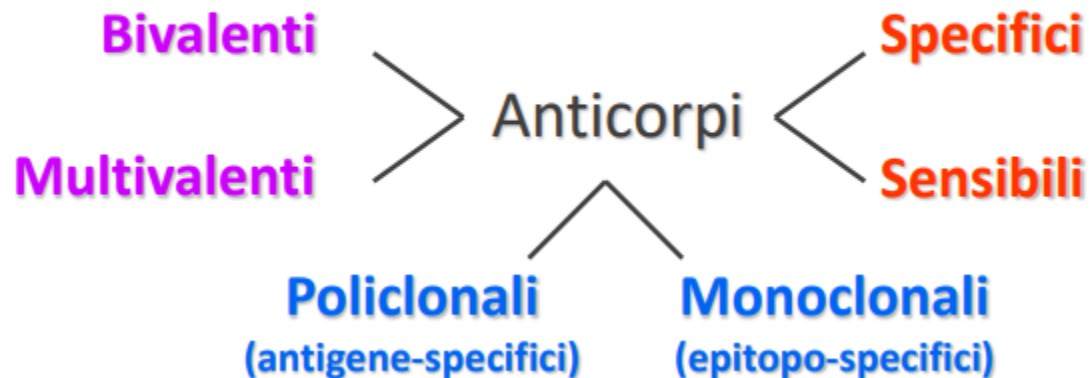
Un **ANTICORPO** riconosce in modo specifico un **EPITOPO** presente sull'**ANTIGENE**



Incubazione con Anticorpo Primario (I Ab)



CARATTERISTICHE DI UN ANTICORPO



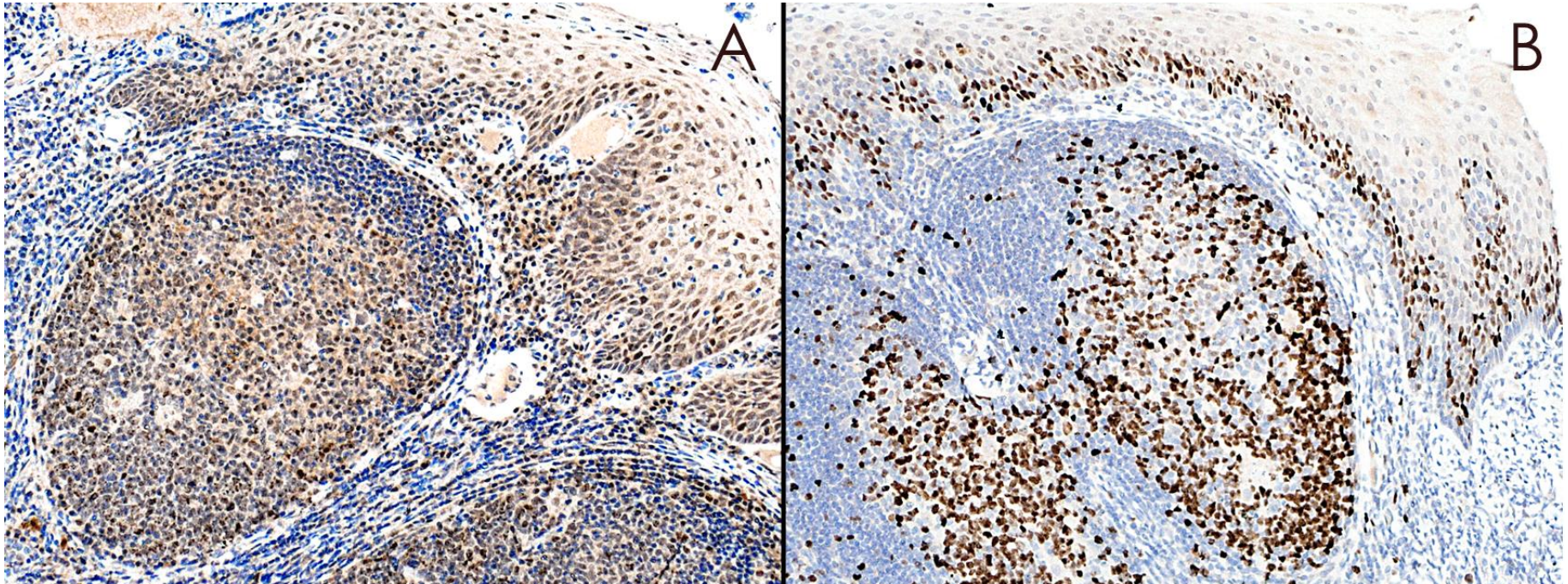
Policlonali vs Monoclonali

Polyclonal antibodies:

- ✓ Economico da produrre
- ✓ Le competenze richieste per la produzione sono basse
- ✓ Relativamente veloce da produrre
- ✓ Genera spesso associazione aspecifica

Monoclonal antibodies:

- ✓ Costoso da produrre
- ✓ La formazione è necessaria per la tecnologia utilizzata
- ✓ Gli ibridomi impiegano molto tempo per essere prodotti
- ✓ Una volta creato un ibridoma, è una fonte costante e rinnovabile
- ✓ Genera associazione specifica



PROTOCOLLO IMMUNOISTOCHEMICA FATTORE VIII

Numero prova:

GIORNO INIZIO:

SERIE

diluizioni

Xilolo, serie di alcoli decrescenti, acqua distillata

PBS (3 volte per 5')

Tripsina (1mg/ml in PBS) (25')

PBS (3 volte per 5')

PBS/BSA (60')

FVW VIII/PBS/BSA 1% (1:400)

dalle

alle

del

PBS (3 volte per 5')

IgG anti-rabbit CY3 1:100/PBS/BSA 1% (60')

PBS (3 volte per 5')

DAPI 1:100 in PBS (10')

PBS (3 volte per 2')

Lavaggio intenso in dH₂O

Lasciare asciugare e montare con montante acquoso

✓ Preparazione delle sezioni

✓ Smascheramento dei siti dell'Antigene

✓ Bloccaggio dei siti non specifici

✓ Incubazione con Anticorpo (Ab)

✓ Lavaggio

✓ Rilevamento legame Antigene-Ab

✓ Lavaggio

✓ Contrasto dei nuclei

✓ Montaggio

✓ Osservazione Microscopia

legame Antigene-Ab

Due possibilità di metodo

Direct

Indirect

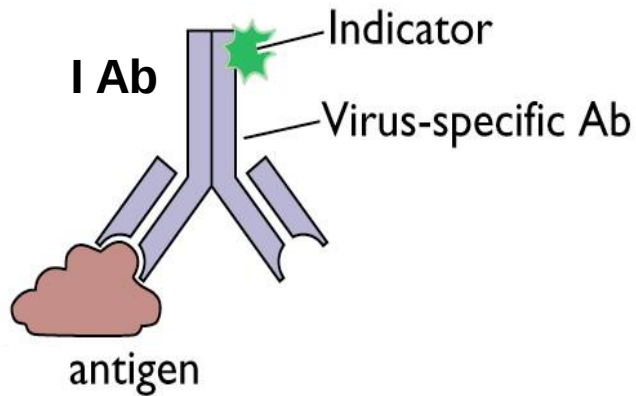
✓ Overnight a 4 °C

La scelta del rilevamento diretto o indiretto è spesso prescritta dal livello di espressione dell'antigene bersaglio

Rilevamento del segnale Antigene-I Ab DIRETTO

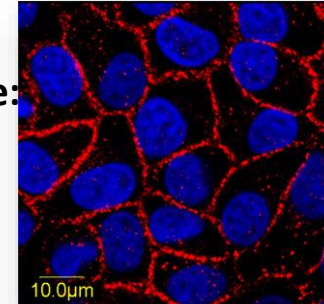
Visualizzazione del legame anticorpo-antigene

Direct



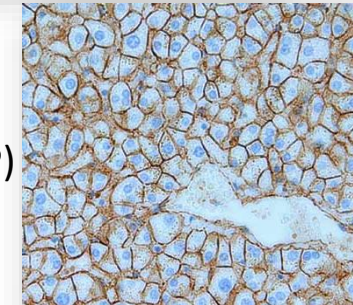
✓ **Marcatore Fluorescente:**

- Fluorescein
- Texas Red

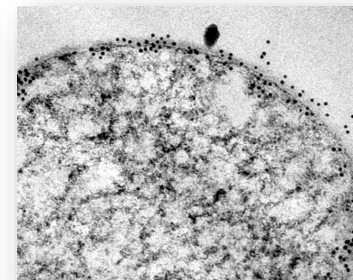


✓ **marcatore Enzimatico:**

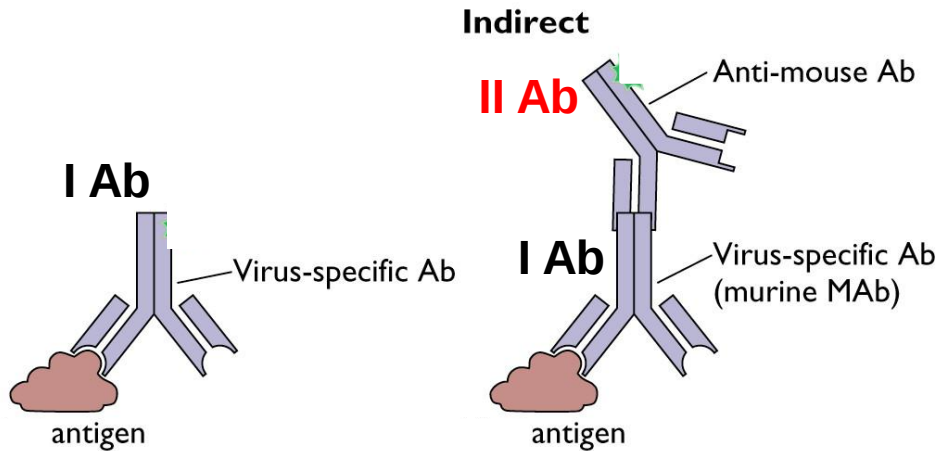
- Horseradish peroxidase (HRP)



✓ **Colloidal gold**



Rilevamento del legame Antigene-I Ab INDIRETTO



✓ INCUBAZIONE CON ANTICORPO SECONDARIO (**II Ab**)

✓ 30-60 min at T.a.

✓ L'anticorpo secondario deve essere diretto contro la regione costante dell'anticorpo primario.

- ✓ Preparazione delle sezioni
- ✓ Smascheramento dei siti dell'Antigene
- ✓ Bloccaggio dei siti non specifici
- ✓ Incubazione con Anticorpo Primario (I Ab)
- ✓ Lavaggio
- ✓ Incubazione con Anticorpo secondario (II AB)
- ✓ Rilevamento legame Antigene-I Ab
- ✓ Lavaggio
- ✓ Contrasto dei nuclei
- ✓ Montaggio
- ✓ Osservazione Microscopia

PROTOCOLLO IMMUNOISTOCHEMICA FATTORE VIII

Numero prova:

GIORNO INIZIO:

SERIE

diluizioni

Xilolo, serie di alcoli decrescenti, acqua distillata

PBS (3 volte per 5')

Tripsina (1mg/ml in PBS) (25')

PBS (3 volte per 5')

PBS/BSA (60')

FVW VIII/PBS/BSA 1% (1:400)

dalle

alle

del

PBS (3 volte per 5')

IgG anti-rabbit CY3 1:100/PBS/BSA 1% (60')

PBS (3 volte per 5')

DAPI 1:100 in PBS (10')

PBS (3 volte per 2')

Lavaggio intenso in dH₂O

Lasciare asciugare e montare con montante acquoso

✓ Preparazione delle sezioni

✓ Smascheramento dei siti dell'Antigene

✓ Bloccaggio dei siti non specifici

✓ Incubazione con Anticorpo (Ab)

✓ Lavaggio

✓ Rilevamento legame Antigene-Ab

✓ Lavaggio

✓ Contrasto dei nuclei

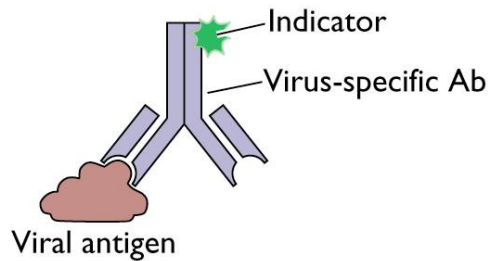
✓ Montaggio

✓ Osservazione Microscopia

Rilevamento del legame Antigene-Ab

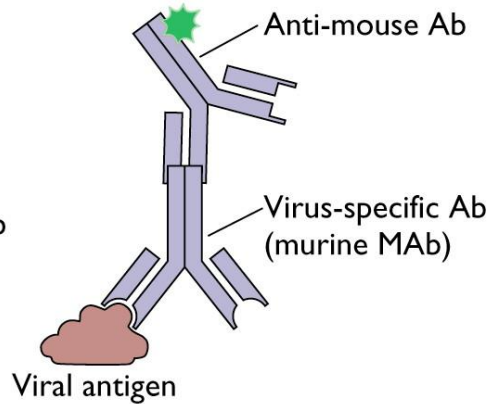
One step method

Direct



Two step method

Indirect



Visualizzazione del legame anticorpo-antigene

✓ Marcatore Fluorescente:

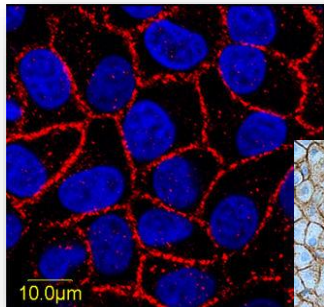
- Fluorescein
- Texas Red

✓ marcatore Enzimatico:

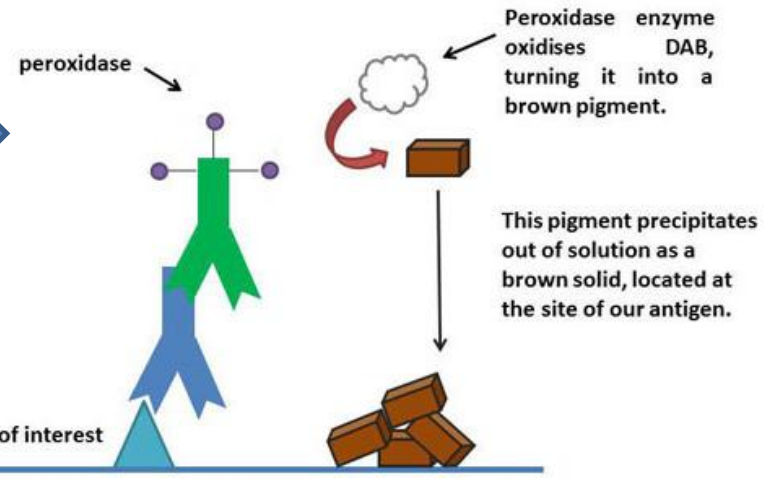
- Horseradish peroxidase (HRP)

✓ Colloidal gold

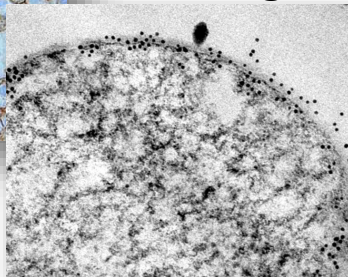
Texas Red



HRP-DAB (3,3'-Diaminobenzidine)



Colloidal gold

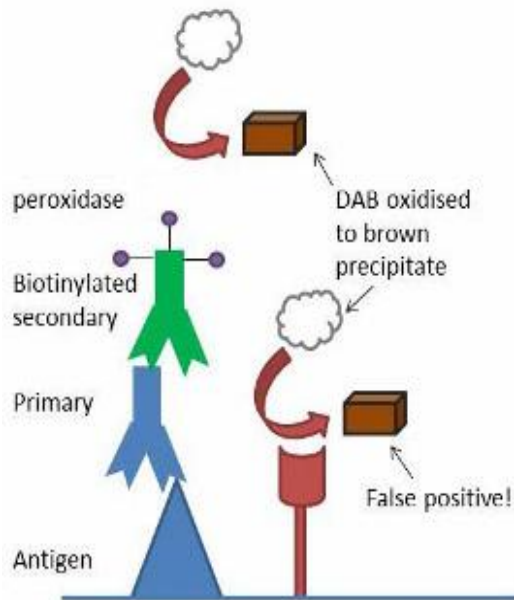


Rilevamento del legame Antigene- Abs



✓ **marcatore Enzimatico:**

- Horseradish peroxidase (HRP)



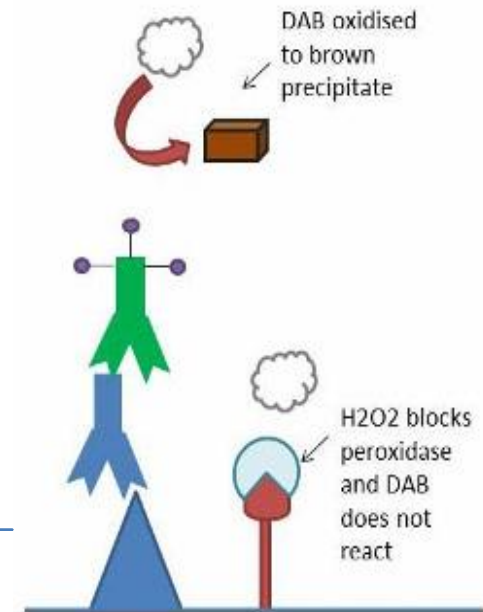
In tissue where endogenous peroxidase activity hasn't been blocked, DAB will react with peroxidase naturally found in the tissue and give a false positive background result.



✓ **Block endogenous peroxidase**



Incubation with 3% H_2O_2
for 45 min at RT

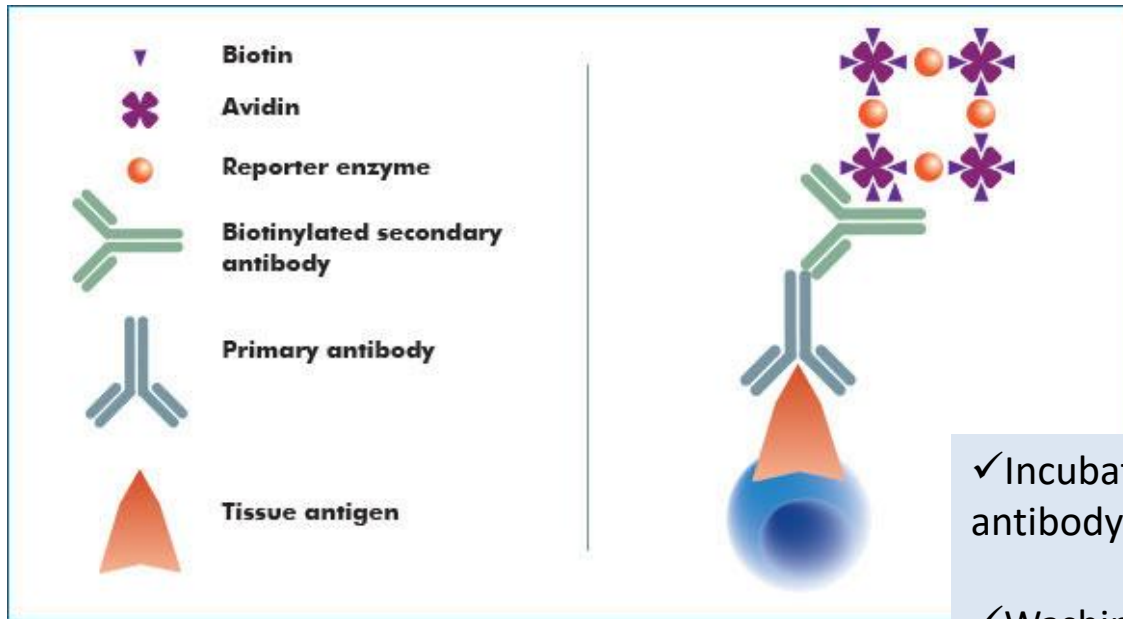


Blocking this peroxidase activity by incubation with hydrogen peroxide (H_2O_2) eliminates this problem.

Rilevamento del legame Antigene-Ab

Amplificazione del segnale

AVIDIN-BIOTIN COMPLEX (ABC)



✓ Incubation with secondary biotynilated antibody for 30-60 min at RT

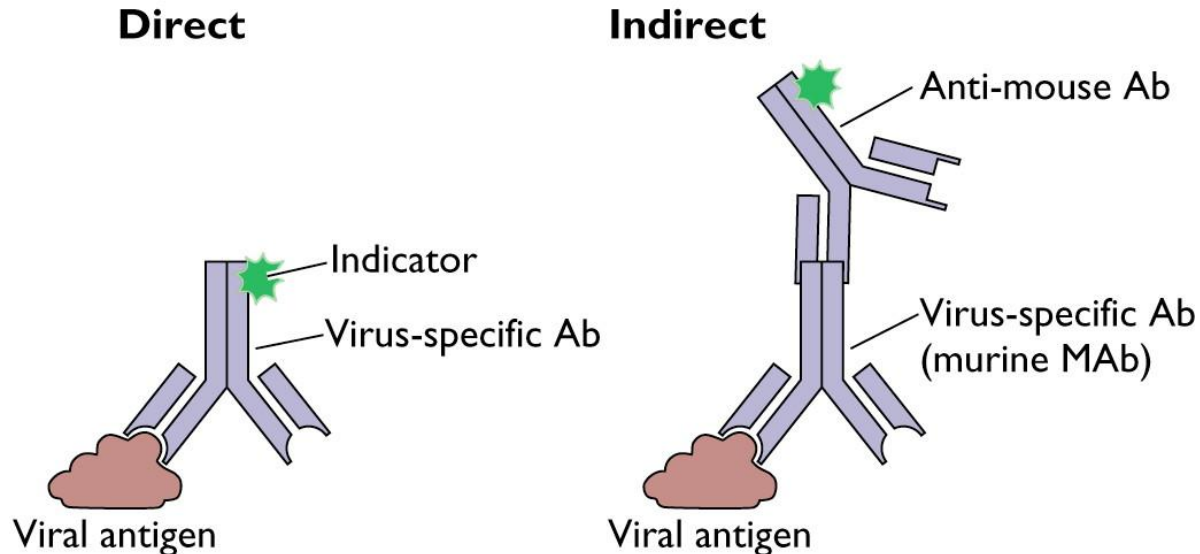
✓ Washing

✓ Incubation with ABC complex for 30 min at RT

✓ Washing

✓ Incubation with DAB + H₂O₂ for 5 min at RT

La scelta del rilevamento diretto o indiretto è spesso prescritta dal livello di espressione dell'antigene bersaglio



Metodo Diretto:

- ✓ Breve e veloce
- ✓ Insensibilità dovuta alla scarsa amplificazione del segnale

Metodo Indiretto:

- ✓ Più sensibile
- ✓ Un singolo anticorpo secondario può essere utilizzato contro più antigeni della stessa specie
- ✓ Più tempo e reagenti

PROTOCOLLO IMMUNOISTOCHEMICA FATTORE VIII

Numero prova:

GIORNO INIZIO:

SERIE

diluizioni

Xilolo, serie di alcoli decrescenti, acqua distillata

PBS (3 volte per 5')

Tripsina (1mg/ml in PBS) (25')

PBS (3 volte per 5')

PBS/BSA (60')

FVW VIII/PBS/BSA 1% (1:400)

dalle

alle

del

PBS (3 volte per 5')

IgG anti-rabbit CY3 1:100/PBS/BSA 1% (60')

PBS (3 volte per 5')

DAPI 1:100 in PBS (10')

PBS (3 volte per 2')

Lavaggio intenso in dH₂O

Lasciare asciugare e montare con montante acquoso

✓ Preparazione delle sezioni

✓ Smascheramento dei siti dell'Antigene

✓ Bloccaggio dei siti non specifici

✓ Incubazione con Anticorpo (Ab)

✓ Lavaggio

✓ Rilevamento legame Antigene-Ab

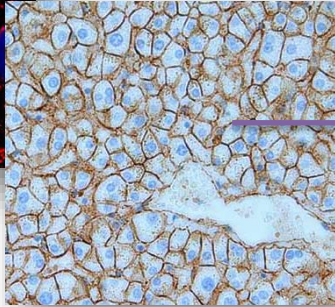
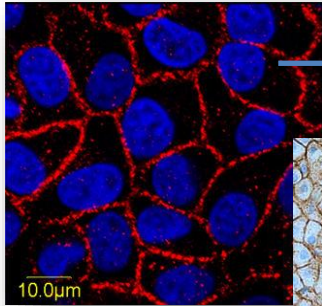
✓ Lavaggio

✓ Contrasto dei nuclei

✓ Montaggio

✓ Osservazione Microscopia

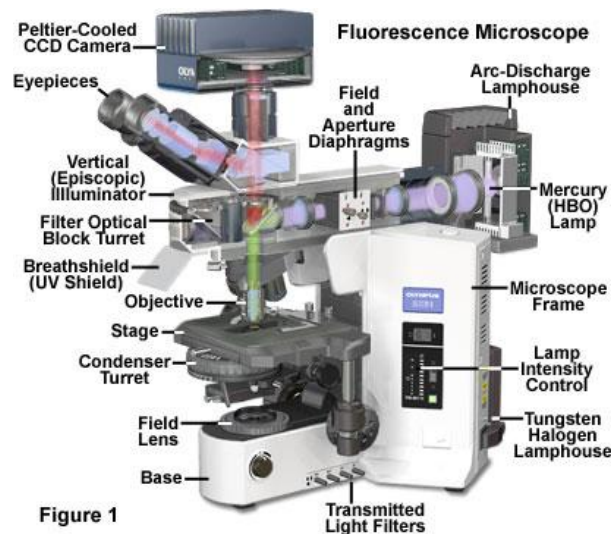
Contrasto dei nuclei e montaggio



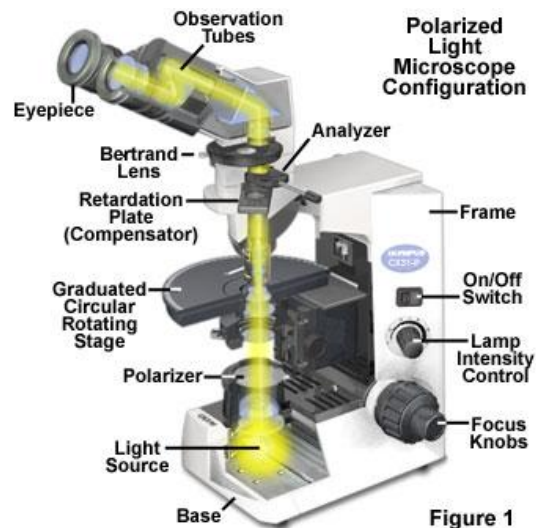
- ✓ Incubazione con DAPI for 1-5 min at RT
- ✓ Montaggio con Aqueous Mounting Medium
- ✓ Incubazione con ENTELLAN per 1-5 min at RT
- ✓ disidrataz. in Alcol (50%, 70% , 100% e Xylene)
- ✓ Montaggio con Non-Aqueous Mounting Medium

Osservazione Microscopio Ottico

MO a Fluorescenza



MO



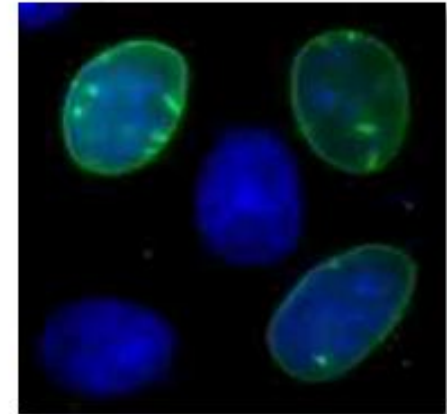
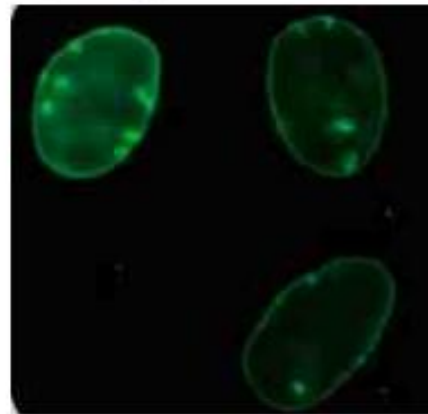
Osservazione al microscopio a fluorescenza (campo scuro)

Esempio di reazione di cellule sottoposte a reazione di immunofluorescenza contro una lamina nucleare B1.



Lamin-B1 (verde) e marcatura generica per il DNA (Hoechst 33342 , blue.

Osservazione con il microscopio a fluorescenza (“campo scuro”: sfondo nero)



Osservazione: Il campo comprende 5 cellule (visibili 5 nuclei) di cui 3 sono immuno positive per la lamina (3/5 cellule con marcatura verde). La localizzazione della lamina B1 segue il perimetro del nucleo e indica una localizzazione intranuclare associata all’involucro nucleare. Da questa osservazione non si conosce la morfologia della cellula (non è visibile il perimetro della cellula).

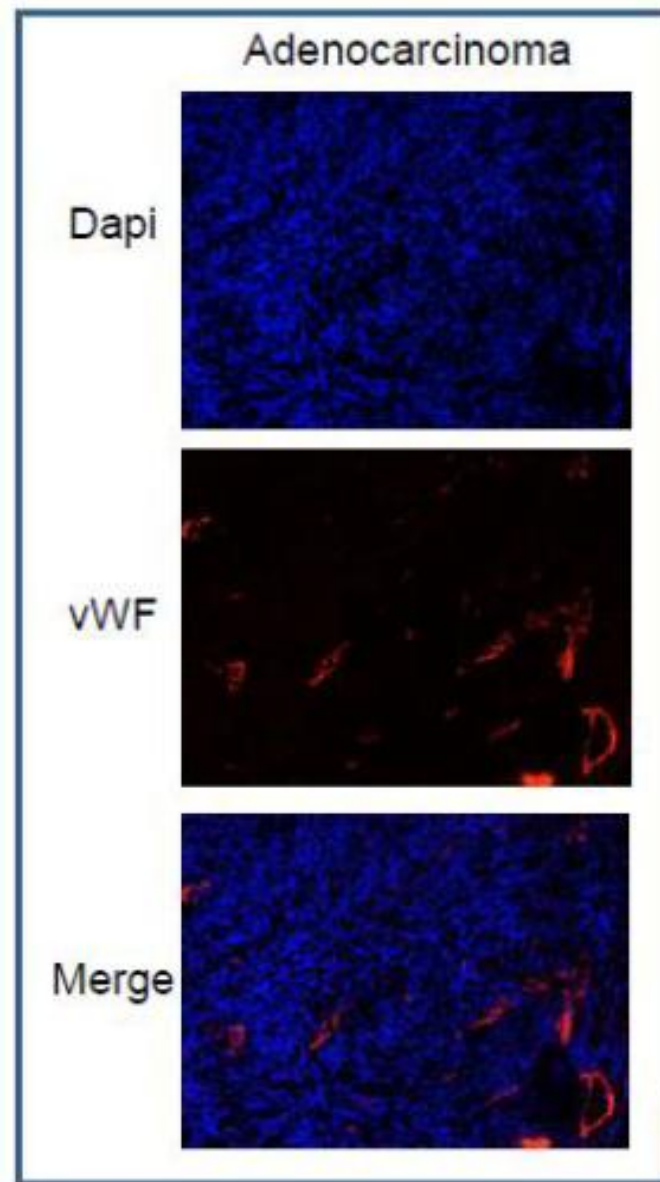
Osservazione al microscopio a fluorescenza (campo scuro)

Esempio di reazione di cellule tissutali sottoposte a reazione di immunofluorescenza contro il fattore FW VIII delle cellule endoteliali

FW VIII (Rosso) e marcatura generica per il DNA (DAPI) (blue). Osservazione con il microscopio a fluorescenza ("campo scuro" sfondo nero)

Osservazione: Il campo comprende cellule (visibili i nuclei in blu) di cui solo poche sono immunopositive per il Fattore VIII (con marcatura rossa). La localizzazione del Fattore VIII indica una localizzazione citoplasmatica che circonda il nucleo.

Da questa osservazione si riconosce la morfologia e tipologia della cellula.



da Vulcano F et al., *Exp Cell Res.* 2016

“Doppia” immunofluorescenza

= Doppia marcatura = due reazioni svolte sulla stessa sezione (non su sezioni consecutive).

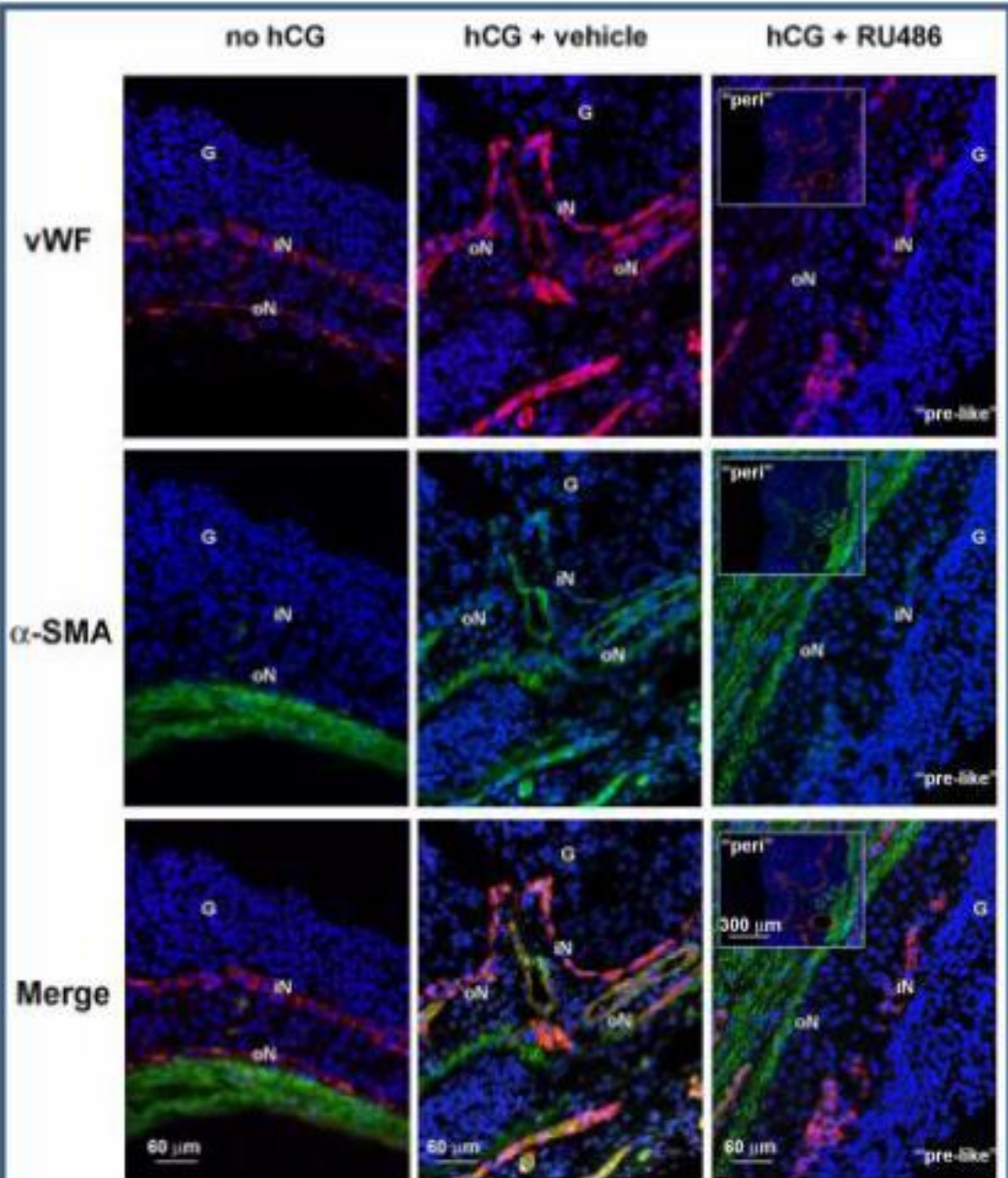
Come principio generale, le doppie marcature sfruttano la possibilità di utilizzare due anticorpi primari specifici di due antigeni diversi e prodotti in specie diverse.

La prima parte della reazione di doppia marcatura è identica a quella della singola marcatura delle diapositive precedenti.

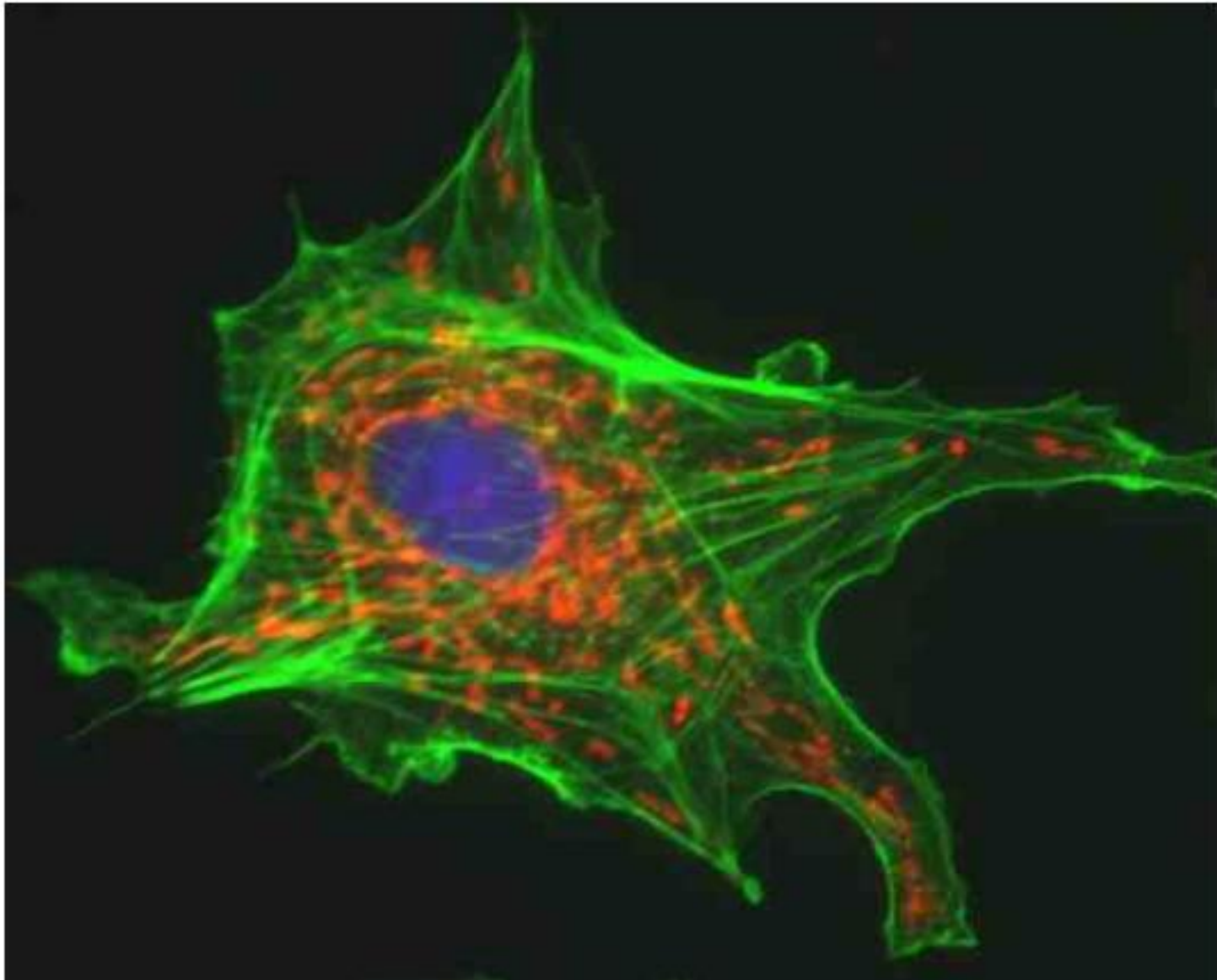
Esempio di doppia reazione di cellule tissutali sottoposte a reazione di immunofluorescenza contro il fattore FW VIII delle cellule endoteliali e contro la proteina muscolare liscia α -SMA.

FW VIII (Rosso), Alpha-SMA (verde) e marcatura generica per il DNA (DAPI) (blue). Osservazione con il microscopio a fluorescenza (“campo scuro” sfondo nero)

Osservazione: Il campo comprende cellule (visibili i nuclei) di cui solo poche sono immuno positive per il Fattore VIII (con marcatura rossa) e α -SMA (marcatura verde). La presenza di un colore giallo indica la localizzazione citoplasmatica nella stessa cellula delle due proteine

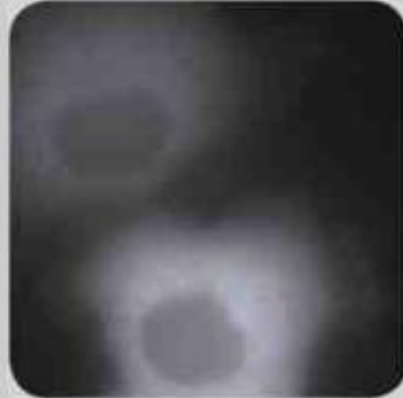
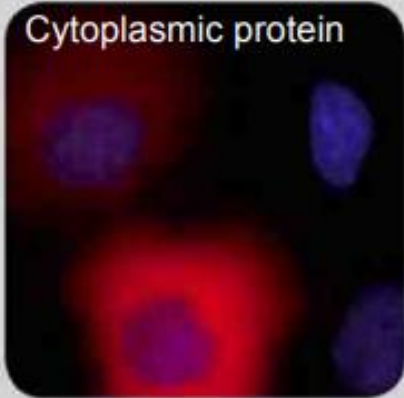


A mammalian epithelial tissue culture cell with mitochondria labeled red, actin labeled green and DNA labeled blue.

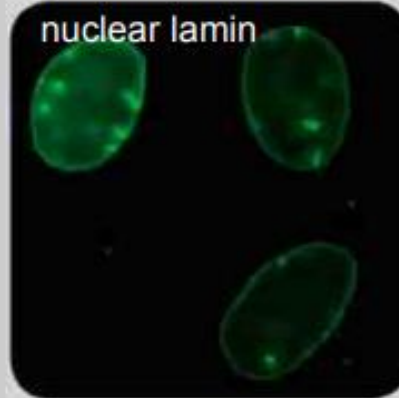


Immunohistochemistry

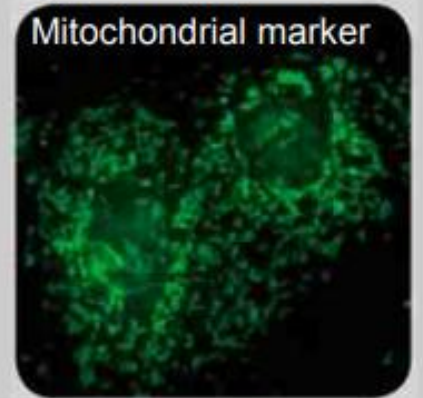
Cytoplasmic protein



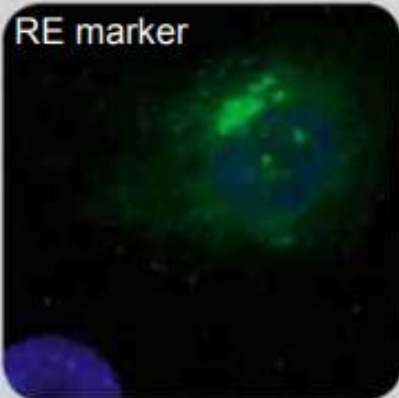
nuclear lamin



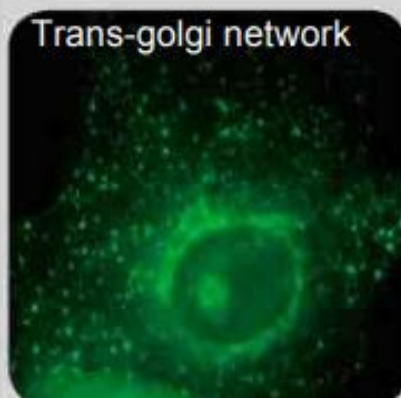
Mitochondrial marker



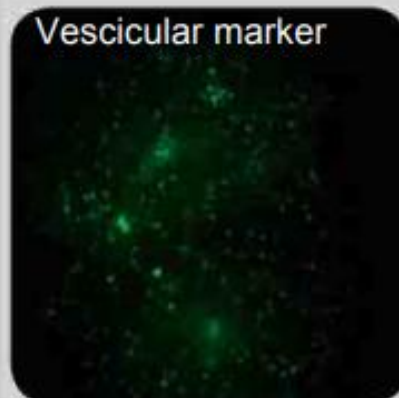
RE marker



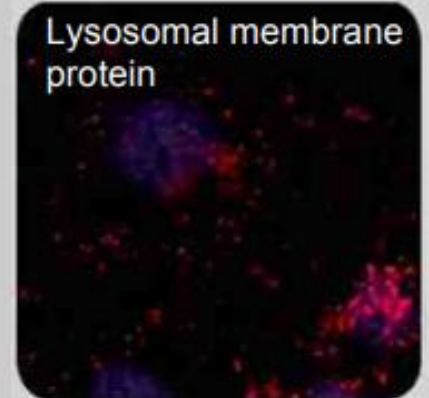
Trans-golgi network



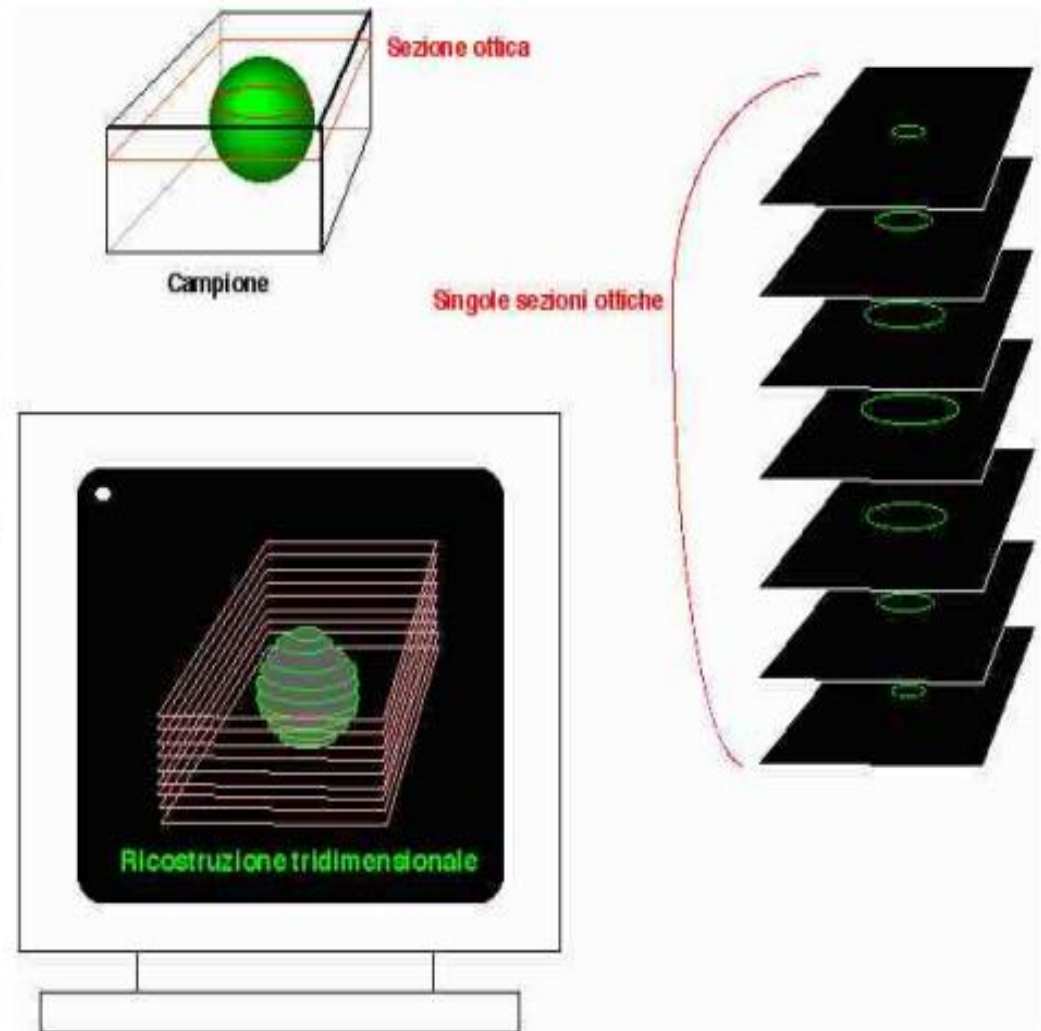
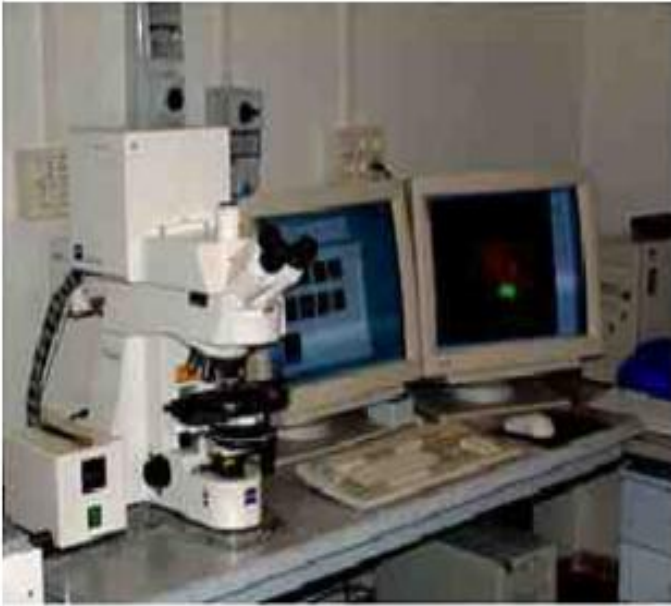
Vesicular marker



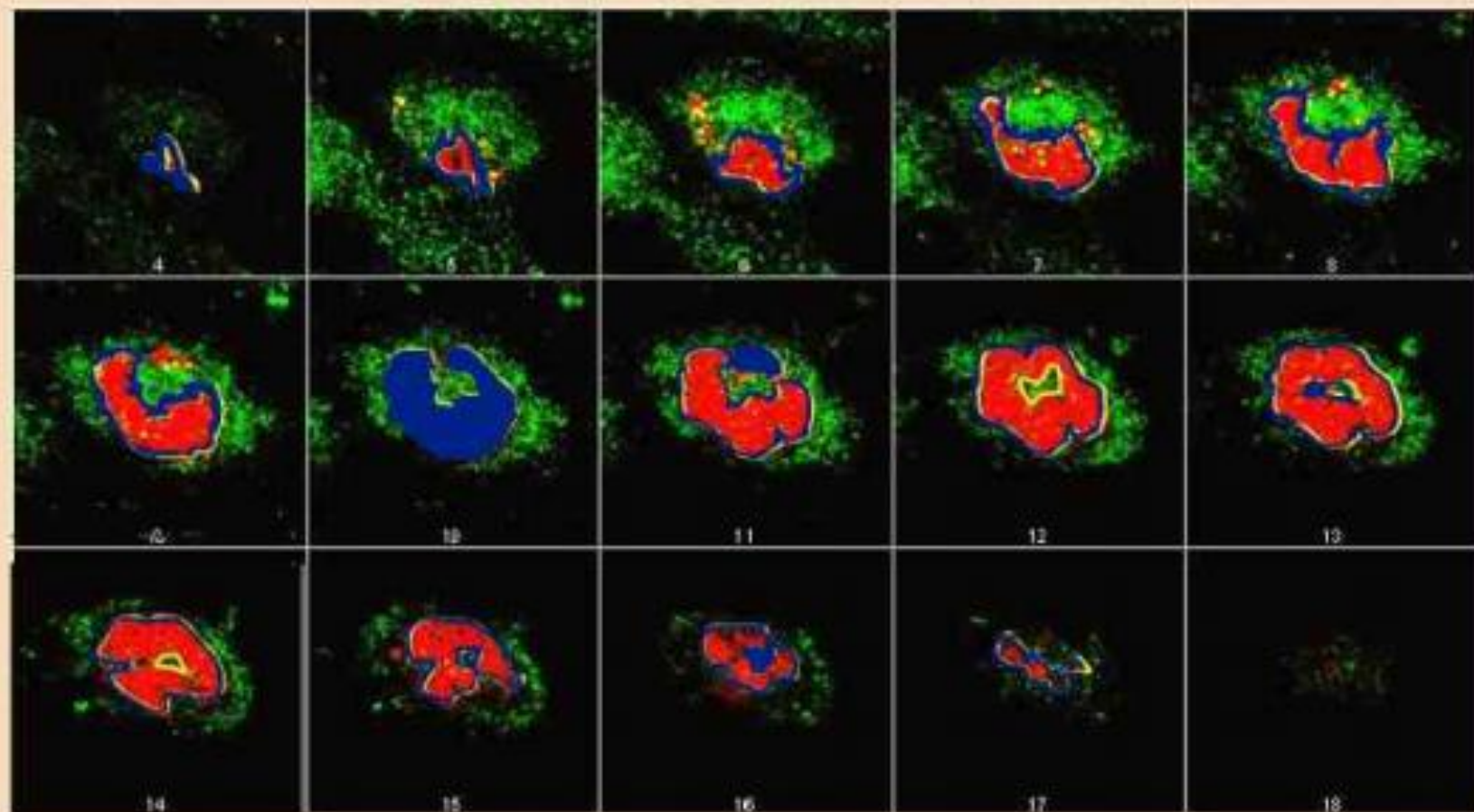
Lysosomal membrane protein



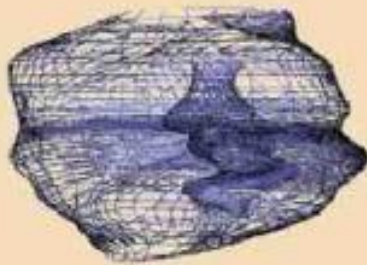
Microscopia confocale



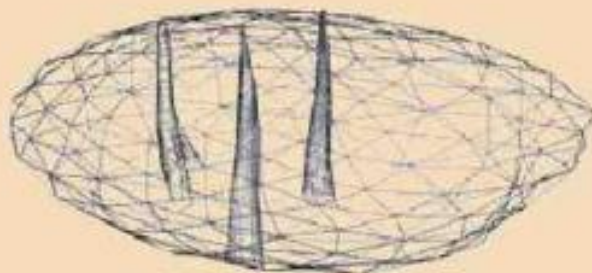
TRACCIAMENTO MANUALE DEI CONTORNI NUCLEARI DALLE SCANSIONI



Ricostruzione tridimensionale di nuclei di altre linee cellulari che presentano anche loro delle invaginazioni dell'involucro nucleare

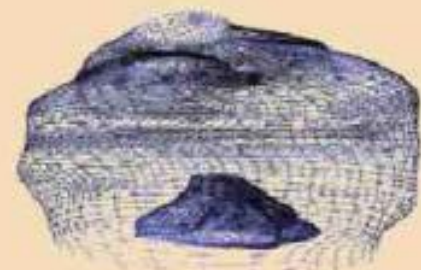


ST₁₄A



GN₁₁

MORFOLOGIE TIPICHE



ALTRE MORFOLOGIE RITROVATE

Video Confocal Time Lapse Imaging

<https://www.jove.com/video/51949/confocale-time-lapse-imaging-come-un-metodo-efficiente-per-la?language=Italian>