

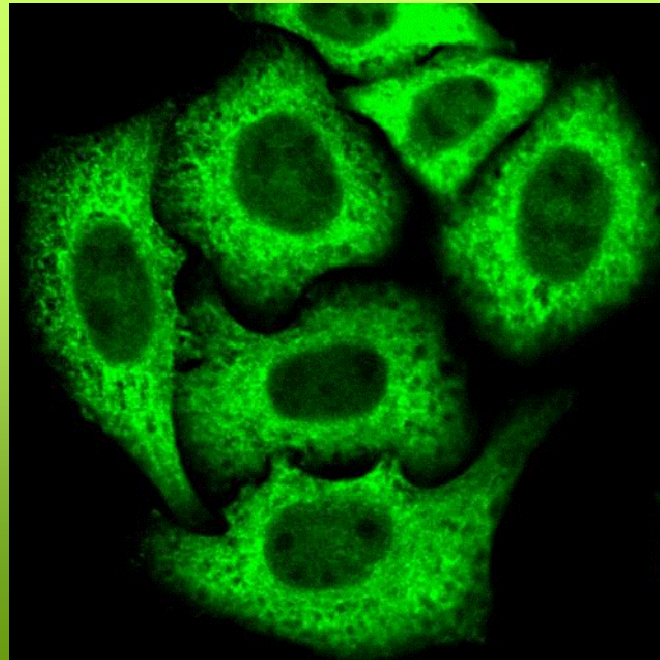
Programma d'esame

- Principi e generalità: tecniche immunologiche, reazione antigene-anticorpo, specificità ed affinità degli anticorpi. Preparazione e conservazione del siero e del plasma.
- Tests immunologici. Sensibilità e specificità
- Anticorpi: monoclonali e policlonali. Anticorpi coniugati con marcatori fluorescenti. Anticorpi coniugati con enzimi. Anticorpi coniugati con proteina A. Anticorpi coniugati con marcatori radioattivi
- Antigeni: solubili e corpuscolari. Immobilizzazione di antigeni solubili su eritrociti. Assorbimento di antigeni solubili in fase solida
- Immunofluorescenza
- immunoistochimica
- Test ELISA
- Fissazione del complemento
- western blotting
- Prove di precipitazione: Precipitazione in gel. Immunodiffusione radiale singola. Immunodiffusione doppia bidimensionale.
- prove di agglutinazione: emoagglutinazione. Emoagglutinazione passiva. Agglutinazione indiretta. Agglutinazione su latex. Applicazioni dei test di agglutinazione
- immunoelettroforesi

A fluorescence microscopy image showing numerous cells with bright green fluorescent nuclei. The cells are arranged in a somewhat regular pattern, and the background is dark. The text 'IMMUNOFLUORESCENZA' is overlaid in a white box with a green border in the center of the image.

IMMUNOFLUORESCENZA

Visualizzazione della reazione antigene-anticorpo
marcando uno dei due reagenti con sostanze,
chiamate fluorocromi (es.: *fluoresceina*, *rodamina*)
che emettono fluorescenza se osservate al
microscopio a luce UV.



Applicabile su:

- ✓ Sezioni di tessuto
- ✓ Colture cellulari
- ✓ Strisci di sospensioni di cellule animali, batteriche e protozoarie



***Substrati ottimali = SEZIONI CONGELATE,
COLTURE CELLULARI***



***Autofluorescenza delle sezioni
tissutali fissate in formalina!!!!***



Svantaggi

- Necessità di un microscopio a fluorescenza
- Campioni NON PERMANENTI (fluorocromi NON resistenti alla disidratazione e ai montanti resinosi)
- "fading"
- Mancanza di informazioni topografiche



Scopi:

- ✓ Individuare un microrganismo patogeno nei tessuti infetti
- ✓ Individuare complessi antigene-anticorpo (malattie autoimmuni)
- ✓ Rilevare gli anticorpi specifici nel siero di sangue
- ✓ Identificare strutture di superficie o markers tumorali

Fattori importanti per il “successo” di una prova di IF

- ✓ Conservazione del substrato antigenico
- ✓ Adeguatezza dell'anticorpo
- ✓ Buona qualità del sistema a fluorescenza
- ✓ Correttezza delle procedure di colorazione e incubazione



Fluorescenza

Proprietà di alcuni atomi e molecole di assorbire la luce ad una particolare λ ed emettere luce ad una λ maggiore

Fluorescenza
primaria
(autofluorescenza)



- vit. A
- porfirine
- clorofilla

Fluorescenza
secondaria



Aggiunta di fluorocromi

Fonti di autofluorescenza nelle cellule:

-Riboflavina ossidata

-Co-enzimi contenenti flavina

-NADH ridotto

-Lipofuscina

-ceroide

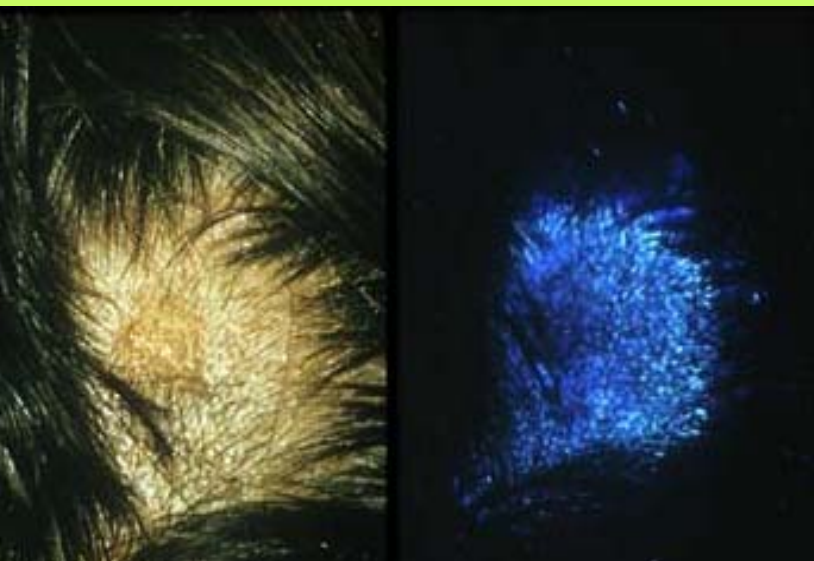
Fluorescent compound	Localization	Excitation maxima [nm]	Emission maxima [nm]
Aromatic amino acid residues:	cofactors in metabolism, concentrated to mitochondria, also present in cytoplasm		
Tryptophan		280	348
Tyrosine		274	303
Phenylalanine		257	282
Pyridine nucleotides (reduced)	cofactors in metabolism, concentrated to mitochondria, also present in cytoplasm		
NADH		290	440
		351	460
NADPH		336	464
Flavins and flavin nucleotides (oxidized)	riboflavin, FMN and FAD, mostly bound to enzymes as coenzymes of flavoproteins, concentrated to mitochondria, also present in cytoplasm and outer membrane	≈223 ≈268 ≈374 ≈449	broad maximum around ≈530
Collagen	connective tissue	280 265 330 450	310 385 390 530
Elastin	connective tissue	290 320 350 410 450	340 405 420 500 520
Endogenous porphyrins	In erythroid cells	400-500	630 690
Lipofuscin	Pigment granules accumulated with age in various cells	≈360	≈450



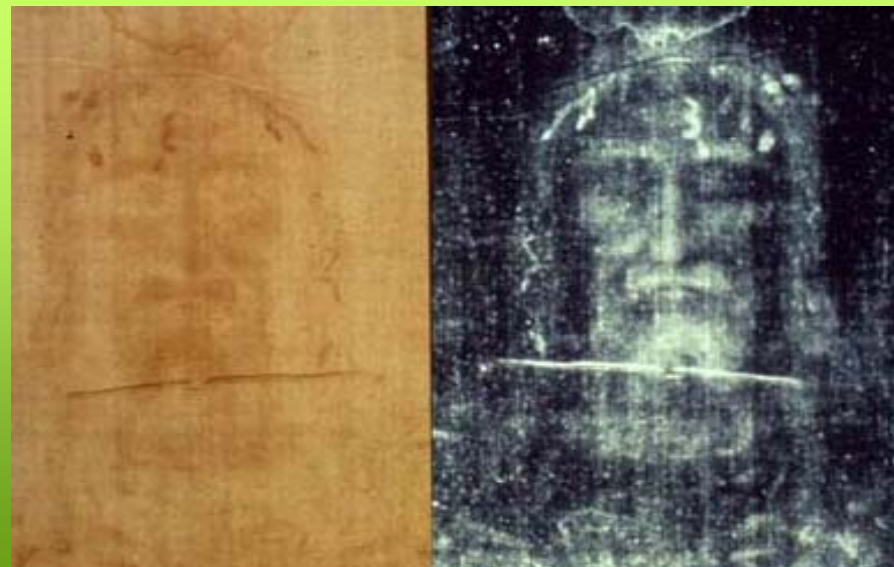
Tetraciclina



porfiriosi



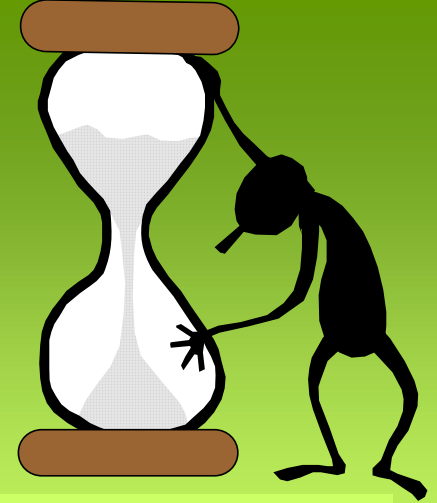
Tinea capitis



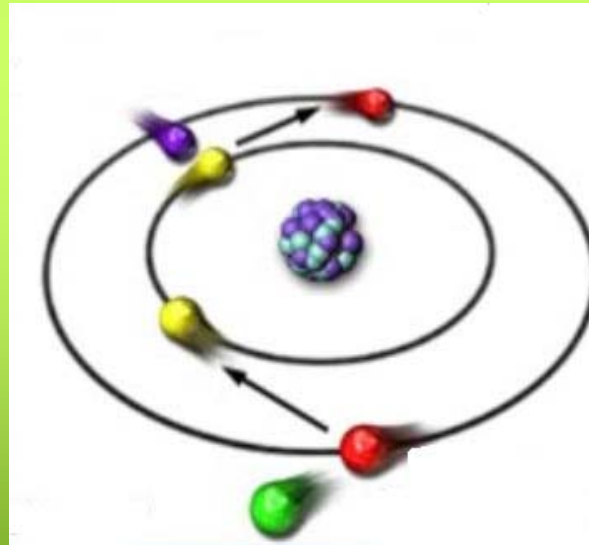
Fluorescenza del plasma

Sir George S. Stokes (1852):

- fluorescenza del minerale fluorspar (fluorite) se illuminato con luce UV
- $> \lambda$ della luce fluorescente rispetto alla luce di eccitazione (*Stokes shift*)



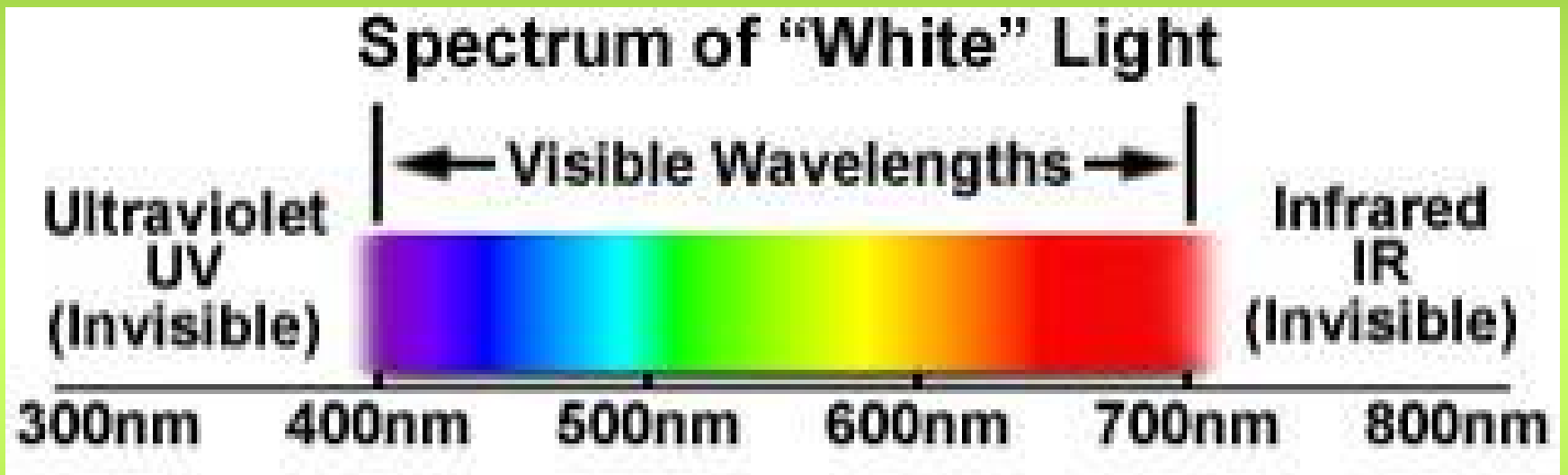
1) Fotone di radiazione UV che collide con un elettrone in un atomo semplice



2) Eccitazione dell'elettrone e passaggio ad un livello di energia più alto

4) Emissione di luce sotto forma di fotone

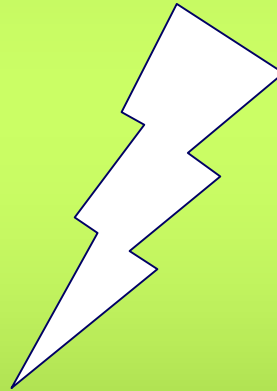
3) l'elettrone eccitato diminuisce ad un livello di energia più basso



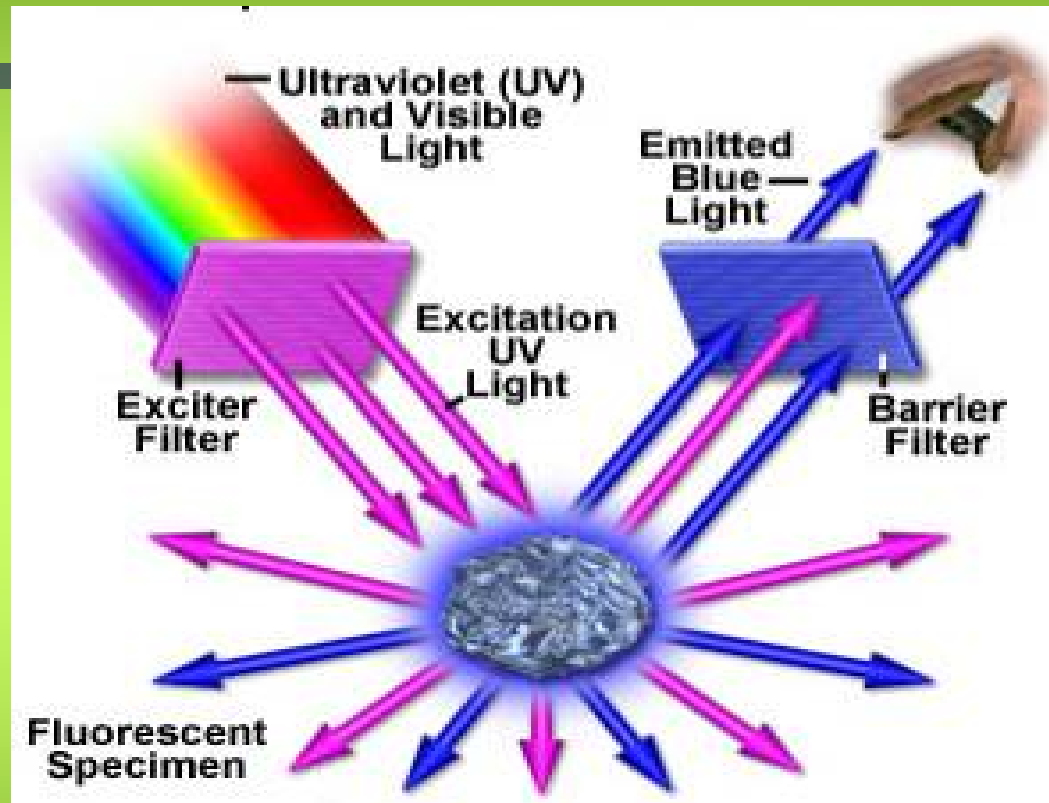
*Regione di luce visibile della
radiazione elettromagnetica*

Microscopio a fluorescenza

- *intensità maggiore della luce*
- *eccitazione sostanze fluorescenti*
- *emissione luce ad una certa λ*
- *ingrandimento*



Produzione luce UV di una specifica λ attraverso il passaggio di luce da una fonte di emissione UV in un filtro di eccitazione



Emissione luce fluorescente dal campione

Filtrazione attraverso un filtro di barriera (NO passaggio luce UV riflessa)

-Lente collimatrice (collima il raggio divergente della fonte di luce)

-Filtro di eccitazione (selezione la λ di eccitazione)

- specchio dicroico: riflette la luce a λ minore (luce di eccitazione), trasmette la luce a λ maggiore (luce fluorescente), dirige il fascio verso la lente obiettivo

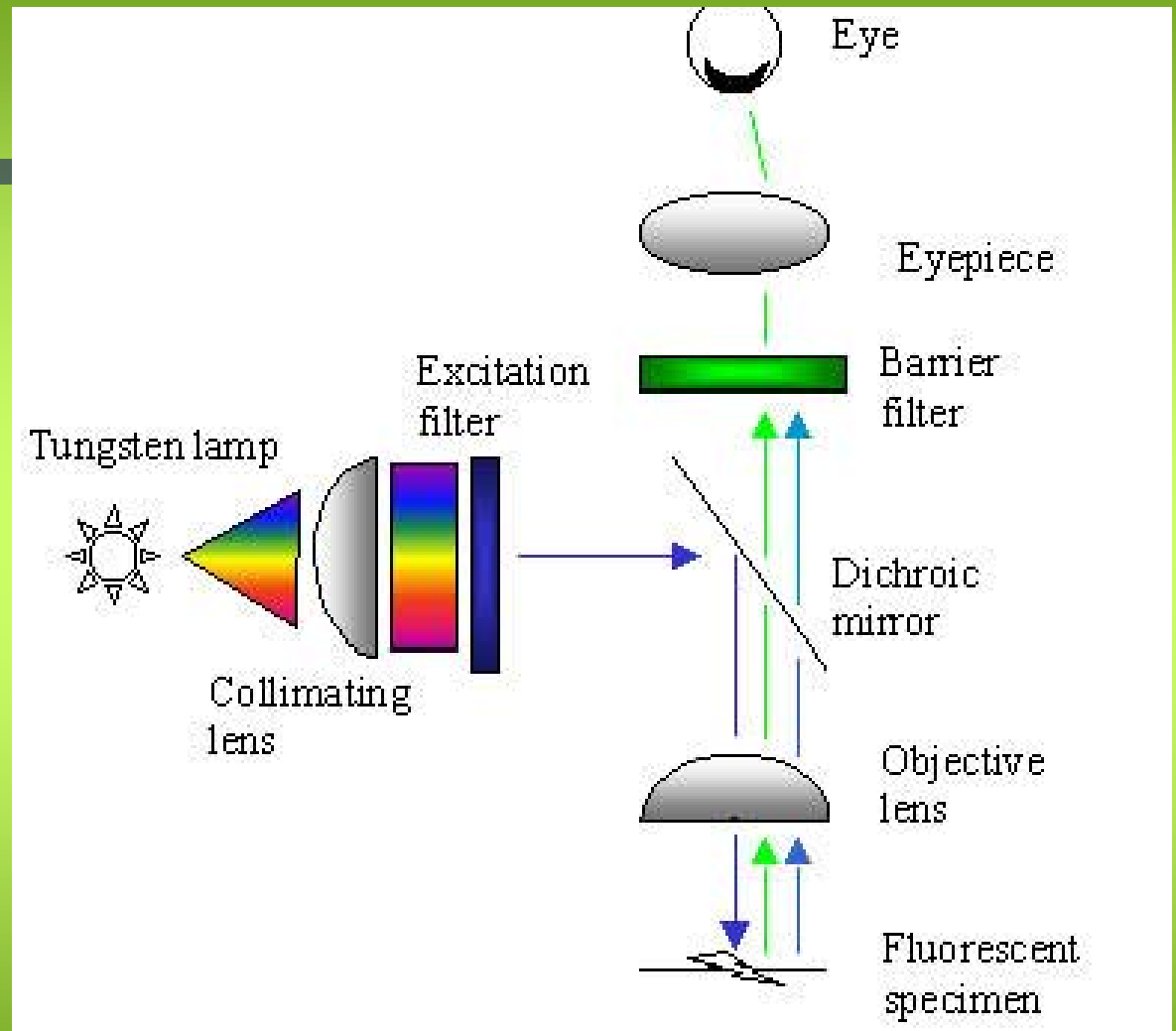
-Lente obiettivo: focalizza il fascio sul campione

-Produzione luce fluorescente

-Luce di eccitazione riflessa e luce fluorescente (fascio collimato)

-Riduzione di intensità luce fluorescente (specchio dicroico)

-Filtro barriera (solo passaggio luce fluorescente)



Fluorocromi

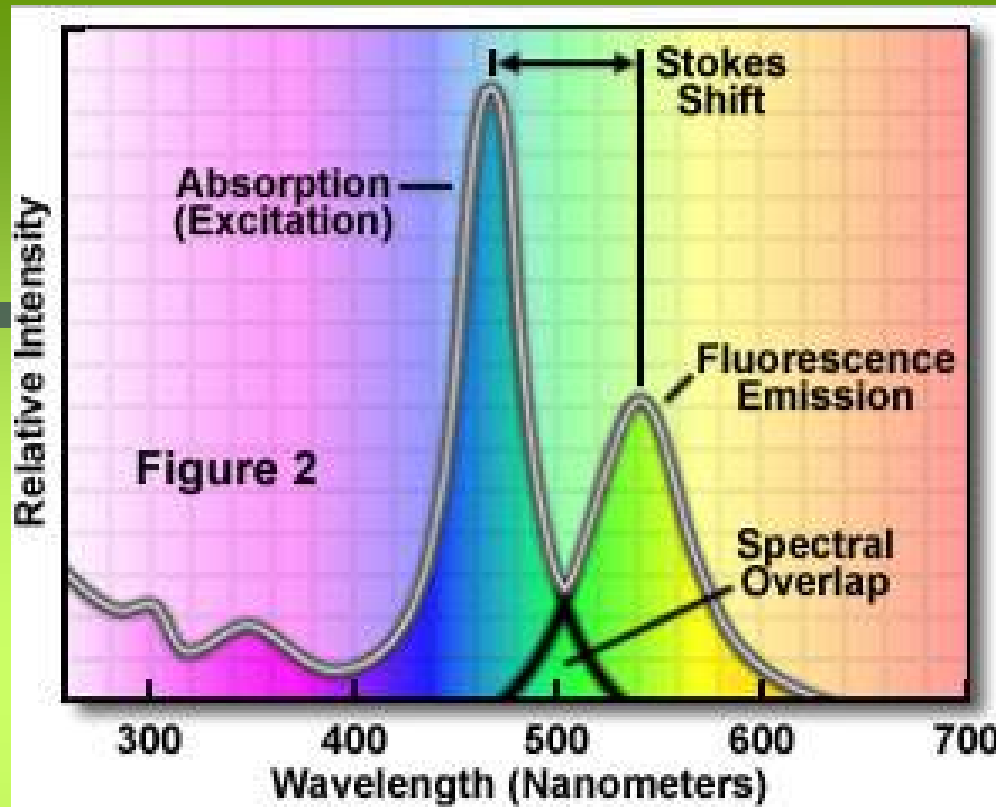
Rara autofluorescenza verde
(spesso blu)

Nome	λ eccitazione (nm)	λ emissione (nm)
Ethidium Bromide	493	620
R-Phycoerythrin (PE)	480	578
Fluorescein	495	519
Texas Red	589	615
Hoechst 33342	343	483

Fluorescent Dye Properties

Fluorochrome	Excitation (nm)	Emission (nm)	Color	Application
Acridine Orange	500	526 (DNA) 650 (RNA)	Green(DNA) Red (RNA)	Nucleic acid stain. Flow cytometry, fluorescence microscopy
Cy3	552	568-574	Red-orange	Protein conjugation. Flow cytometry.
Cy5	649	670	Red	Protein conjugation. Fluorescence microscopy.
DAPI	360	450	Blue	AT, minor groove dsDNA stain. Flow cytometry, fluorescence microscopy.
Dil-C18-(3)	550	565	Red-orange	Membrane stain (ER,CM) - cell fusion/permeabilization. Flow cytometry
Ethidium Bromide	493	620	Red	Nucleic acid stain. Gel electrophoresis.
Fluorescein (FITC)	495	525	Green	Protein conjugation. Flow cytometry, fluorescence microscopy.
Green Fluorescent Protein (GFP)	395 (470)	509	Green	Fusion protein. Recombinant protein expression. Fluorescence microscopy.
Hoeschst 33258	360	470	Blue	AT, minor groove dsDNA stain. Flow cytometry, fluorescence microscopy
R-Phycoerythrin (PE)	488	578	Red-orange	Protein conjugation. Flow cytometry.
PKH2	490	504	Green	Cell membrane stain-cell tracking. Flow cytometry, fluorescence microscopy
PKH26	551	567	Red-orange	Cell membrane stain-celltracking. Flow cytometry, fluorescence microscopy.
PKH67	490	502	Green	Cell membrane stain-cell tracking. Flow cytometry, fluorescence microscopy.
CellVue® Claret	655	675	Far-Red	Cell membrane stain-cell tracking, Flow cytometry, fluorescence microscopy.
Propidium Iodide	493	632	Red	Nucleic acid stain. Flow cytometry fluorescence microscopy.
Quantum Red™	488	670	Red	Protein conjugation. Tandem dye. Flow cytometry
Rhodamine (TRITC)	552	570	Red-orange	Protein conjugation. Flow cytometry, fluorescence microscopy.
Texas Red	596	620	Red	Protein conjugation. Flow cytometry, fluorescence microscopy.

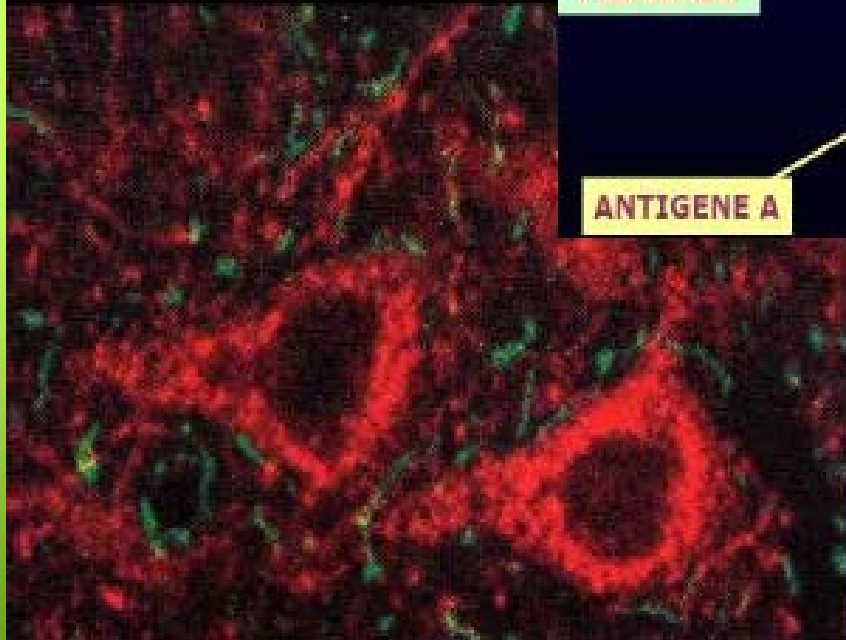
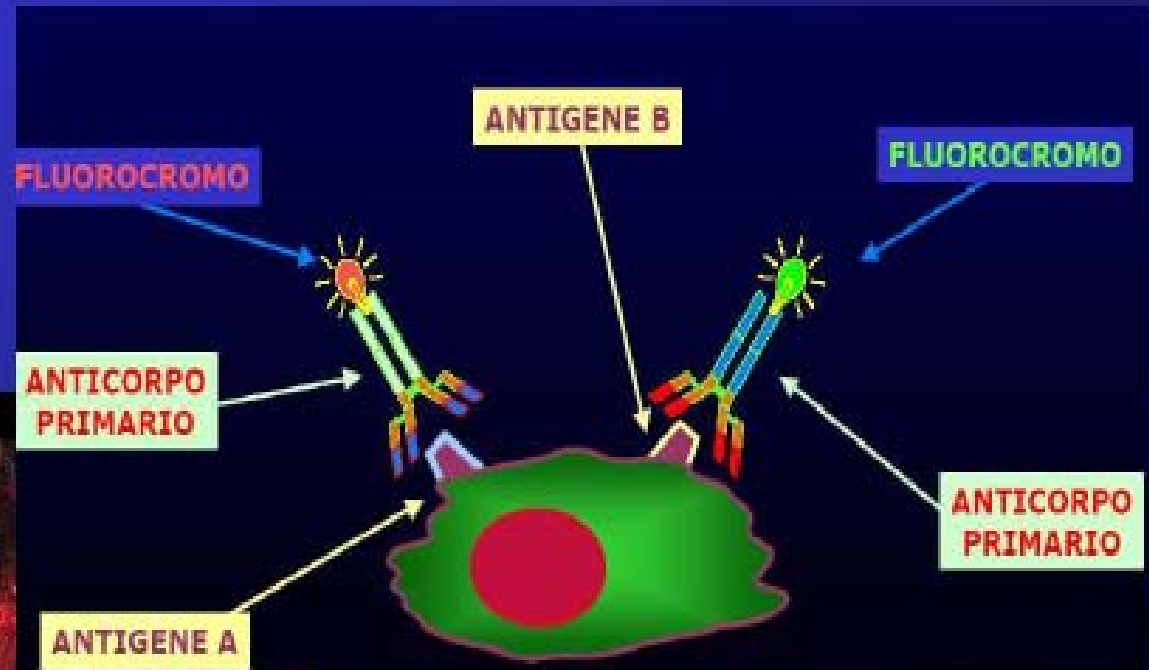
*Lunghezza
d'onda inv.
prop. all'energia
della radiazione*



Attenzione

importante conoscere le proprietà di
emissione ed eccitazione dei
fluorocromi !!!

Metodo diretto



Doppia colorazione

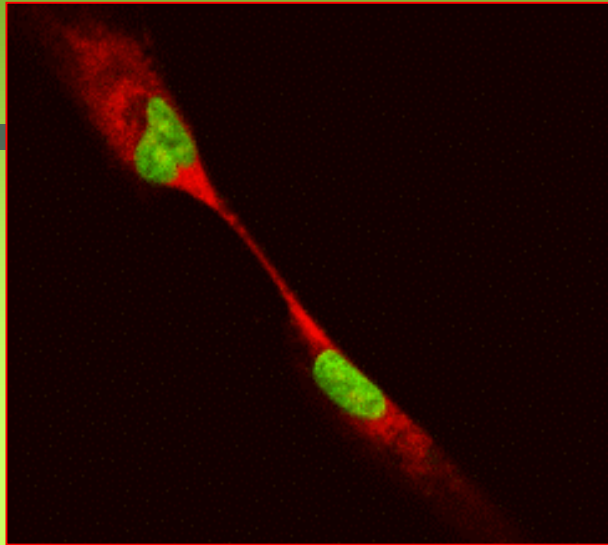
Tipologie di marcatori fluorescenti

1. Con affinità specifica per alcune componenti cellulari
2. Diretti nei confronti di specifiche componenti cellulari previo legame con Abs
3. Con affinità per fattori del microambiente cellulare
4. Substrati di enzimi
5. Altri

Con affinità specifica per alcune componenti cellulari

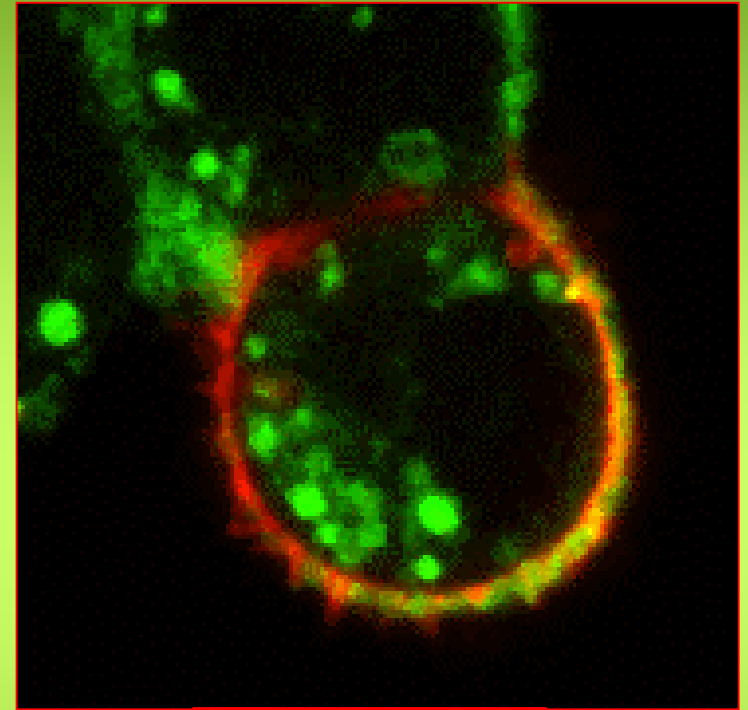
<i>Acidi nucleici</i>	acridine orange, Hoechst 33342, DAPI, propidium iodide (ioduro di propidio), ethidium bromide (etidio bromuro)
<i>Proteine, membrana plasmatica e reticolo endoplasmatico</i>	DiO, DiI
<i>Mitocondri</i>	TMRE
<i>Apparato di Golgi</i>	NBD-Ceramide

AO legato al DNA: fluorescenza verde;
AO legato a RNA: rossa

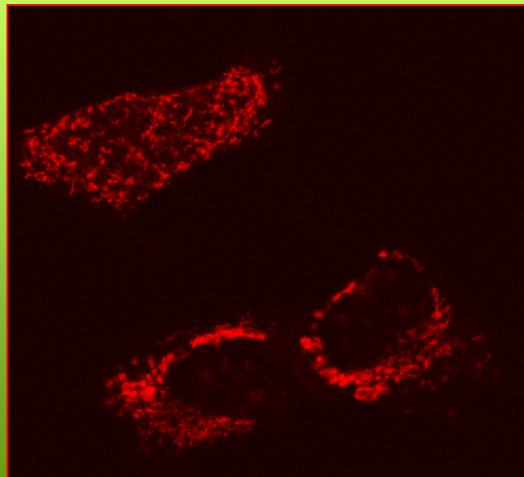


Arancio di acridina

Localizzazione nello strato esterno della
membrana plasmatica



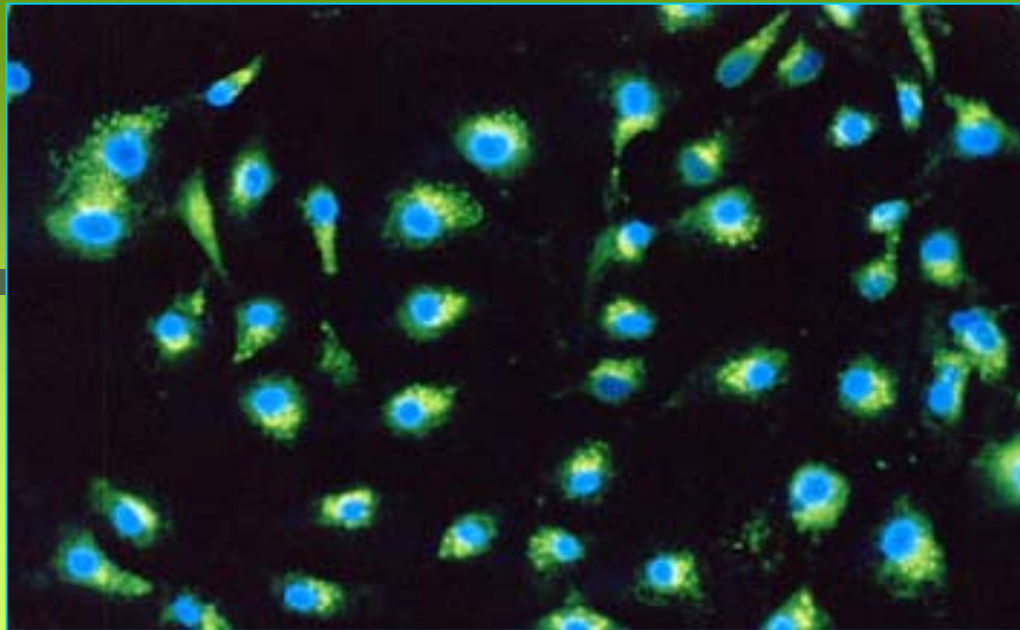
DiI



TMRE

Idrolisi intracellulare e
produzione di tetraetilrodamina;
accumulo nei mitocondri per
l'alto potenziale di membrana

Apparato di Golgi



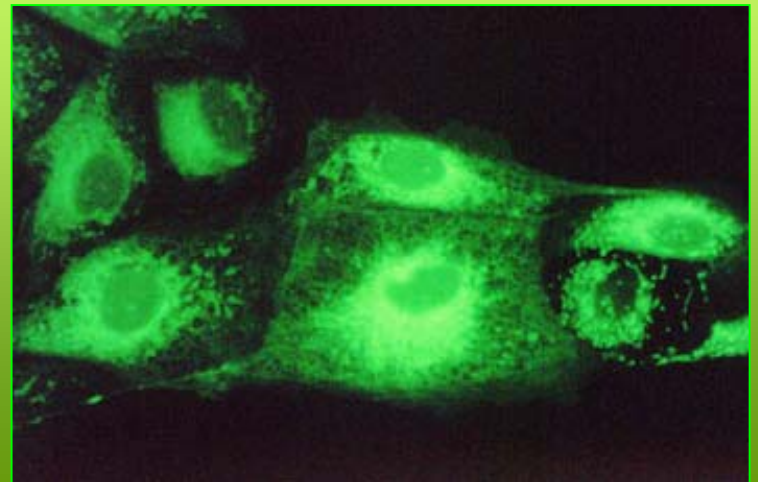
Nucleo

NBD-ceramide

Hoechst 33342

Reticolo endoplasmatico

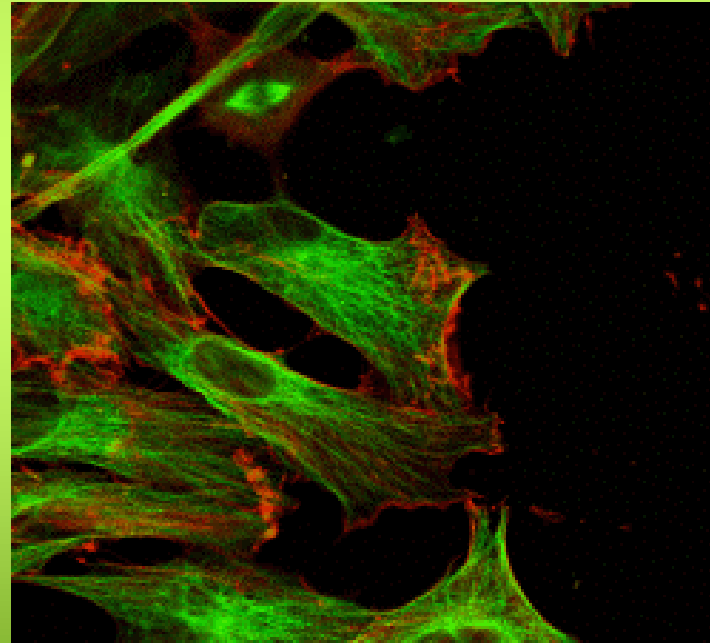
DiO



Diretti nei confronti di specifiche componenti cellulari previo legame con Abs

- Fluoresceina
- Rodamina 123
- Tetrametilrodamina
- Texas red
- Ficoeritrina

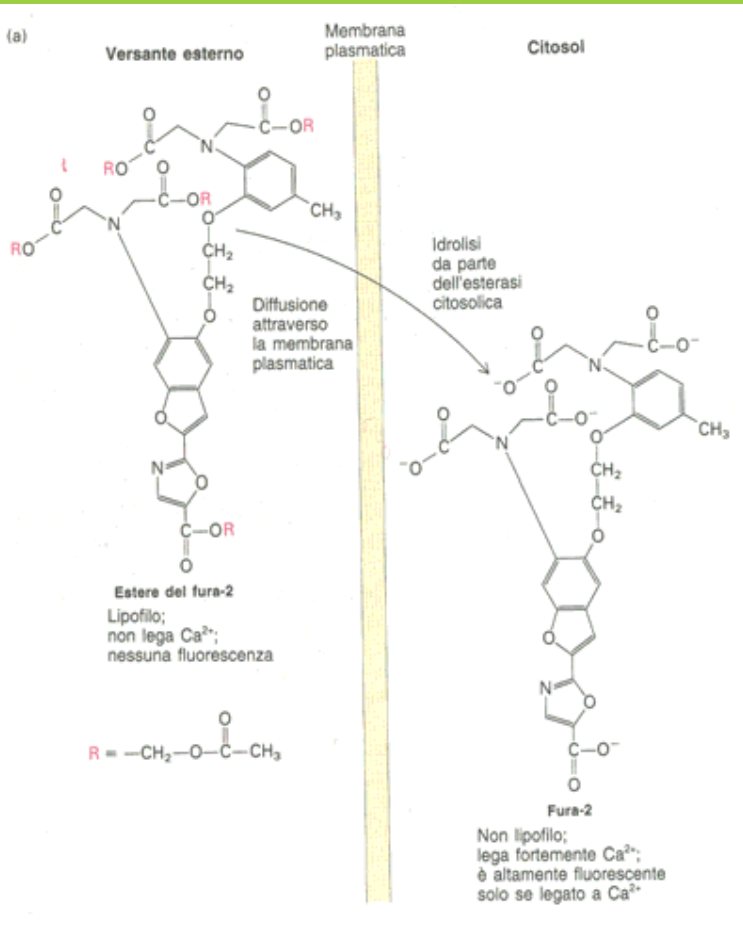
Fibre di actina (rosso) e microtubuli (verde) nei fibroblasti in coltura



Rodamina

Fluoresceina

Con affinità per fattori del microambiente cellulare

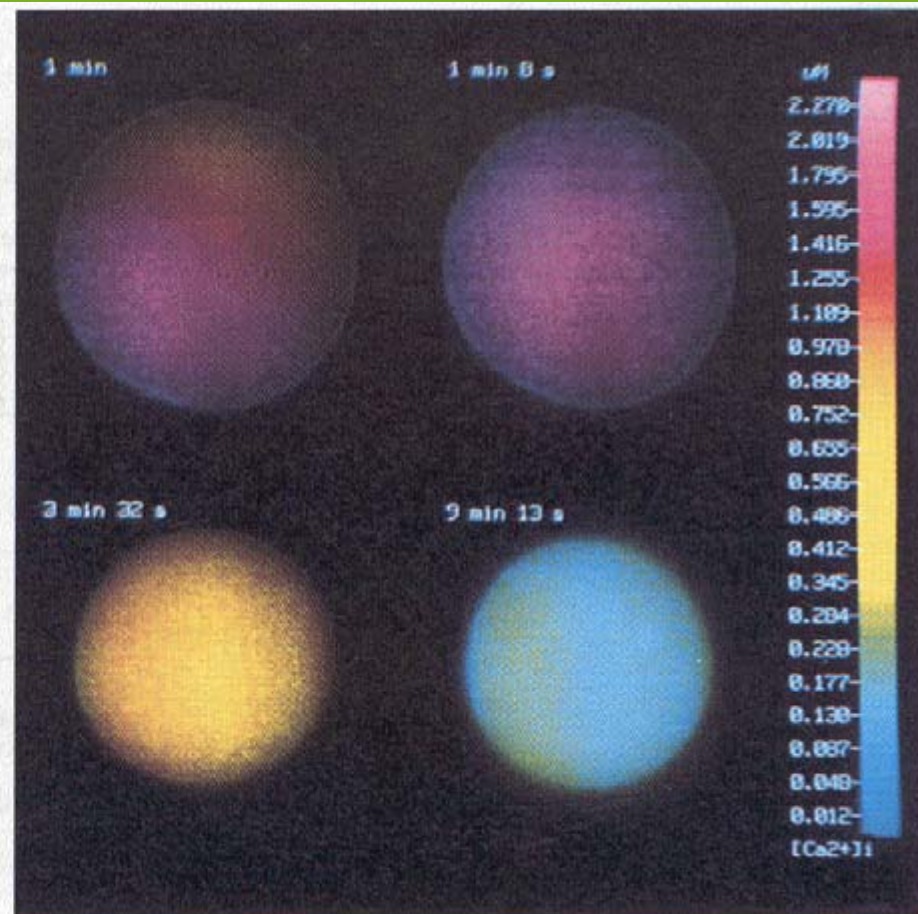
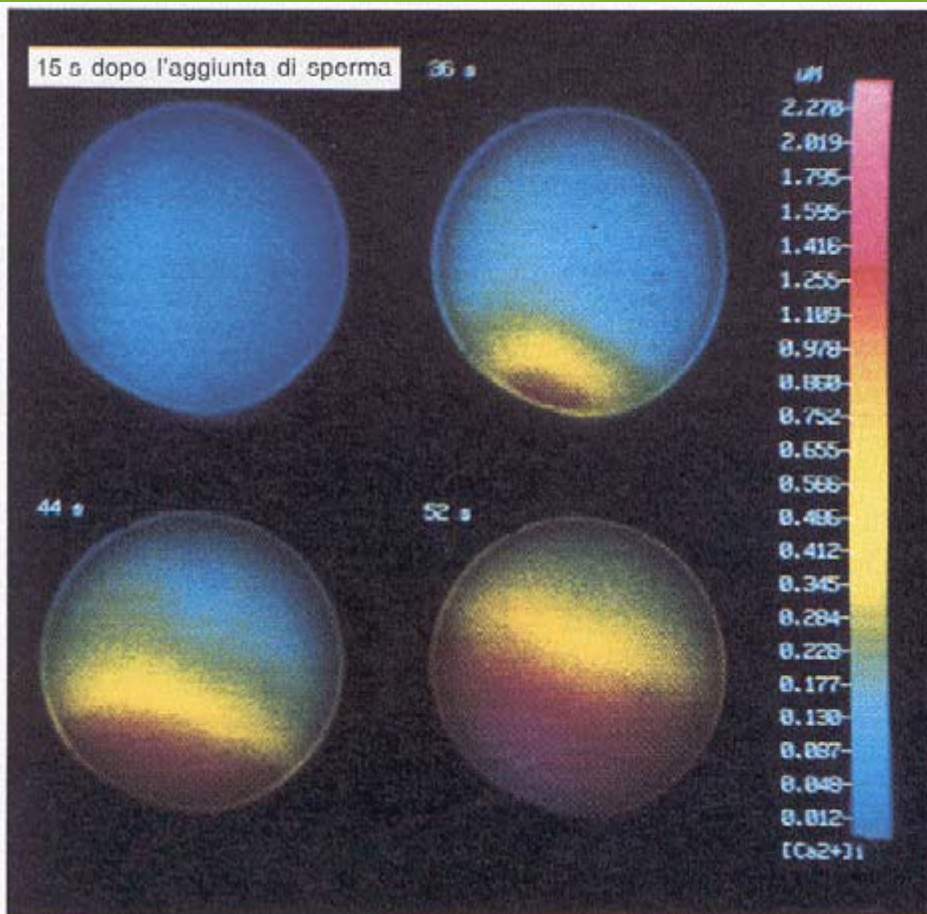


- ✓ ioni idrogeno (pH)
- ✓ concentrazione di ioni calcio

Variatione della concentrazione di questi ioni = modificazione dell'intensità o della λ della fluorescenza

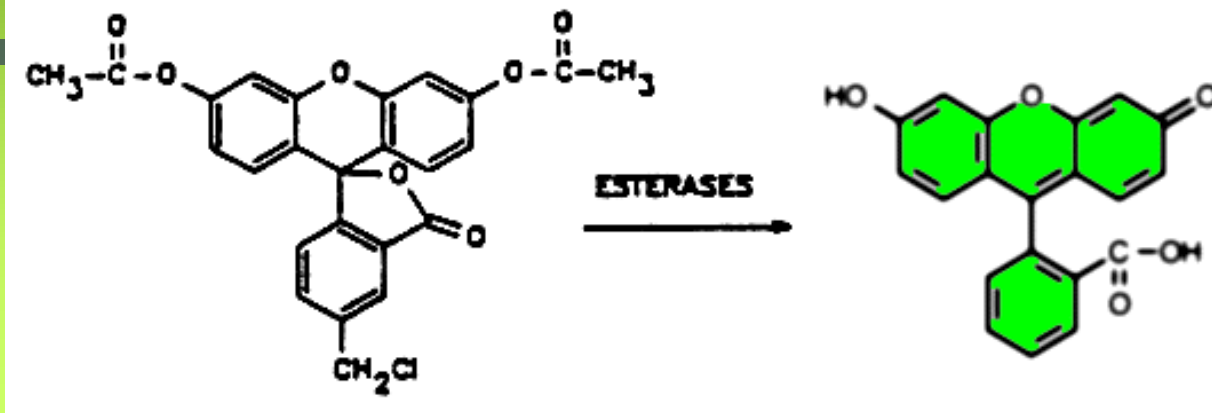
Esempio: Fura-2 = indicatore di Calcio

Dopo legame con Ca, la fluorescenza di eccitazione va incontro ad uno shift blu da 363 nm (Ca libero) a 335 nm (Ca saturato), mentre la fluorescenza di emissione resta a 510 nm. Rapporto delle intensità di fluorescenza delle 2 eccitazioni : calcolo della concentrazione intracellulare di calcio



Variazioni della [Ca²⁺] in uovo di riccio di mare dopo fecondazione

Substrati di enzimi

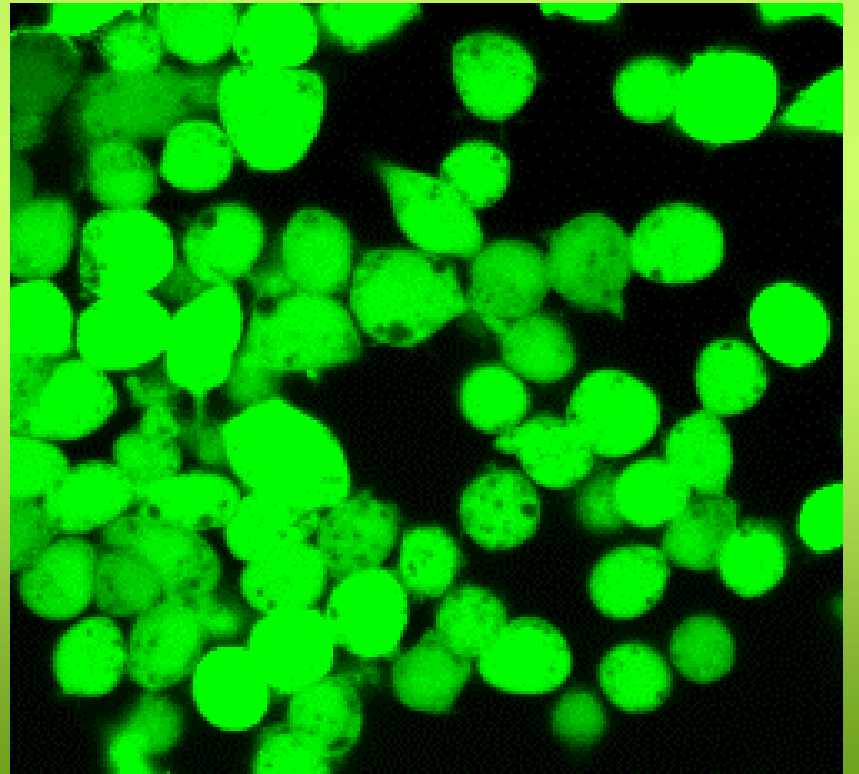
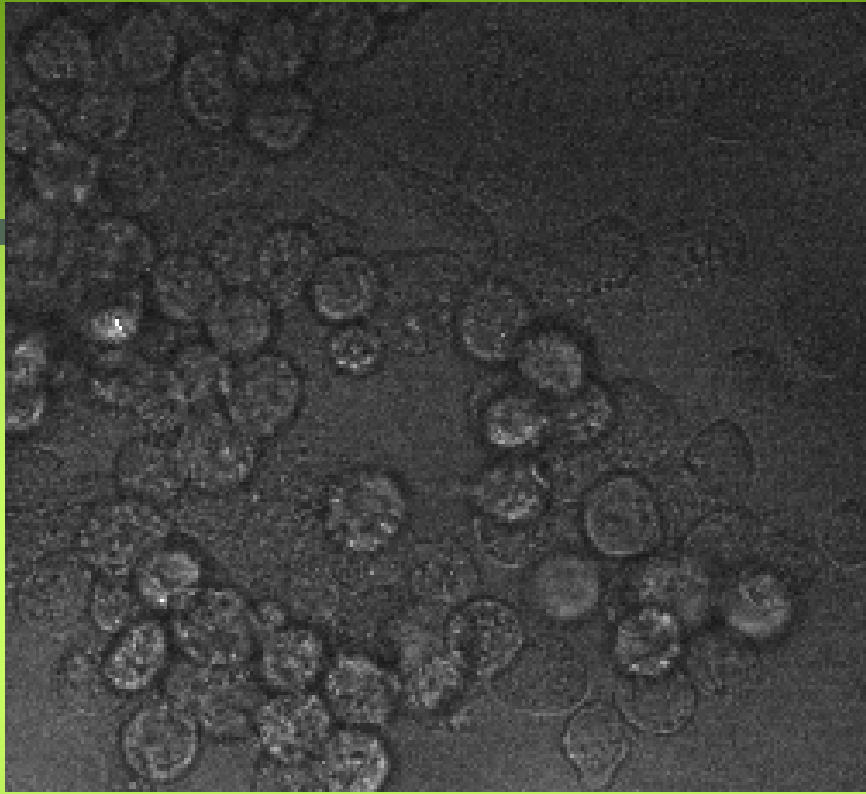


*Fluorescein
diacetate (FDA)*

FDA non fluorescente; attraversamento membrane; idrolisi da esterasi; liberazione fluoresceina e acido acetico; NO fuoriuscita fluoresceina

*Cellule vive:
fluorescenti*

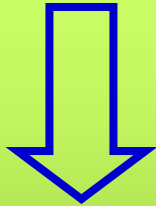
*Cellule danneggiate: non
fluorescenti*



IMMUNOFLUORESCENZA

```
graph TD; A[IMMUNOFLUORESCENZA] --> B[Diretta]; A --> C[Indiretta]; B --> D[Ricerca di antigeni]; C --> E["Ricerca di anticorpi nel siero o identificazione di antigeni in tessuti o colture cellulari"];
```

Diretta



Ricerca di antigeni

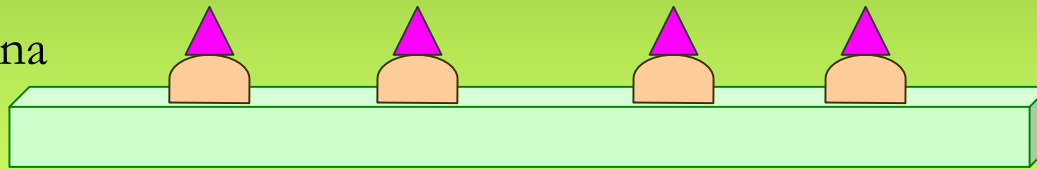
Indiretta



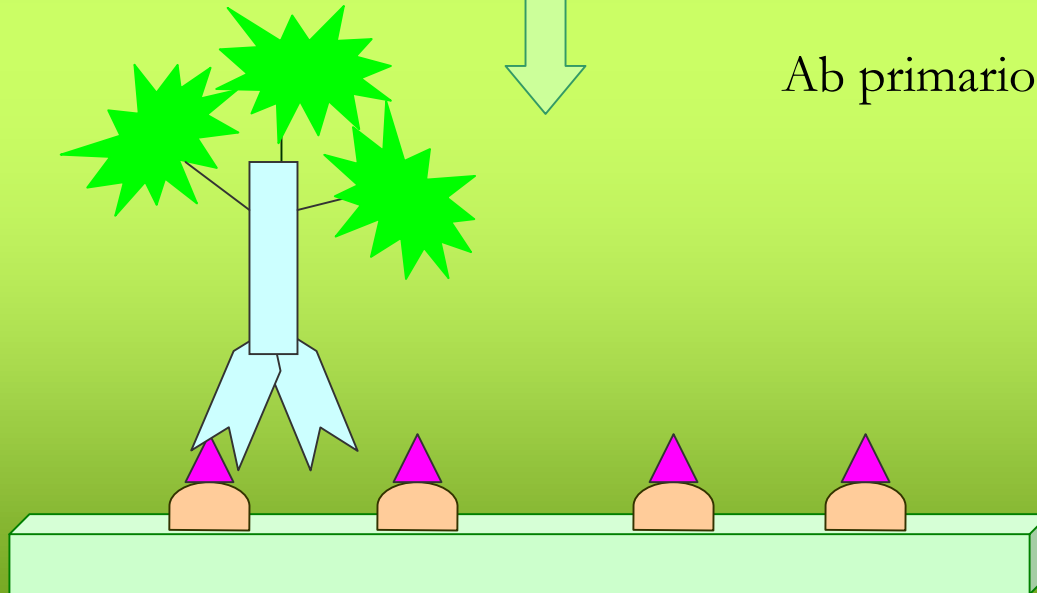
Ricerca di anticorpi nel siero o identificazione di antigeni in tessuti o colture cellulari

Immunofluorescenza diretta

Cellule con
Ags di membrana

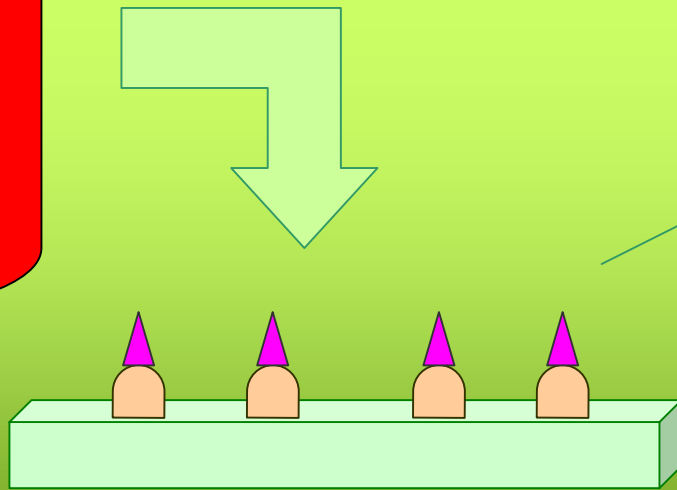
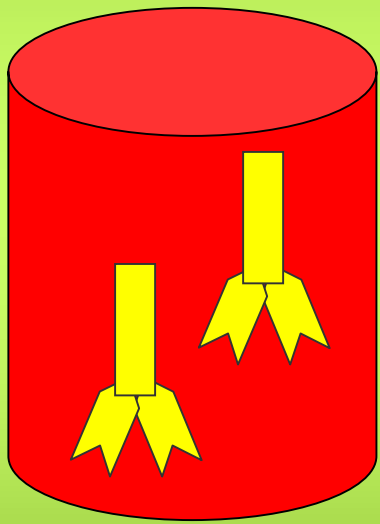


Ab primario coniugato

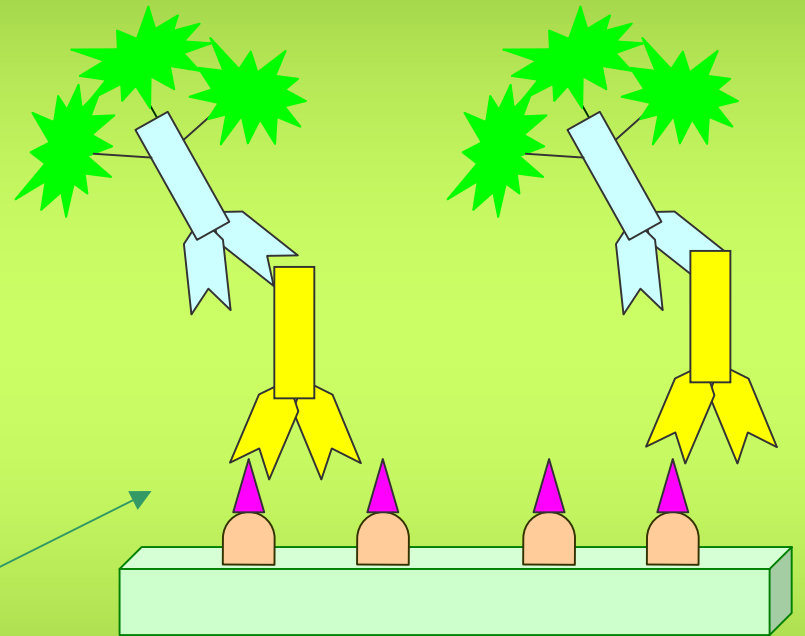


Immunofluorescenza indiretta

Ricerca di anticorpi nel siero



Ag noto



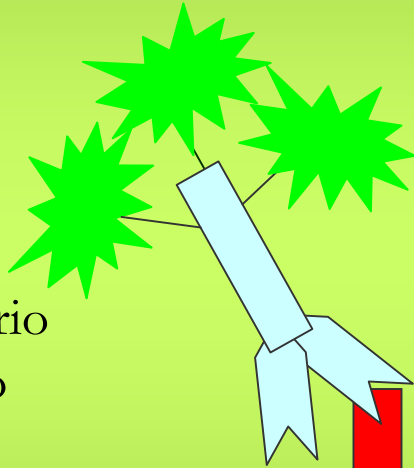
Ab secondario coniugato

Identificazione di antigeni

Cellule con
Ags di membrana



Ab secondario
coniugato



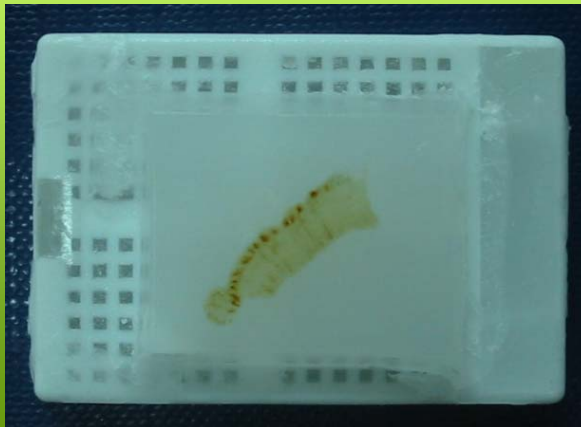
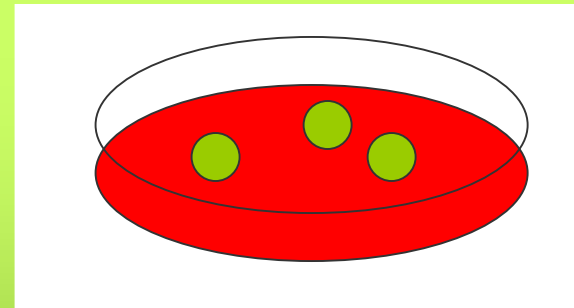
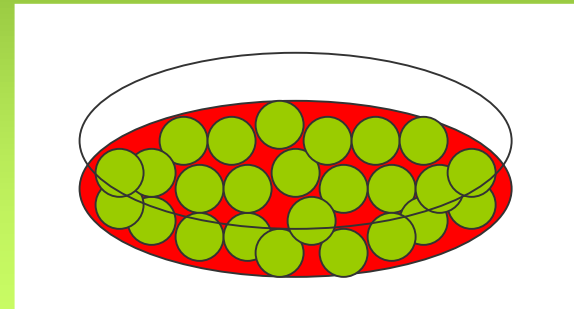
Ab primario



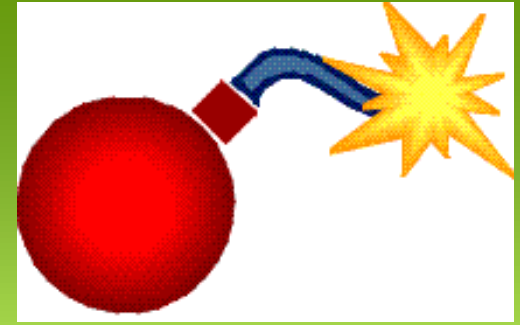
PROTOCOLLO DI IMMUNOFLUORESCENZA

Campioni:

- monostrato cellulare
- cellule singole
- sezioni tissutali congelate
- sezioni incluse in paraffina



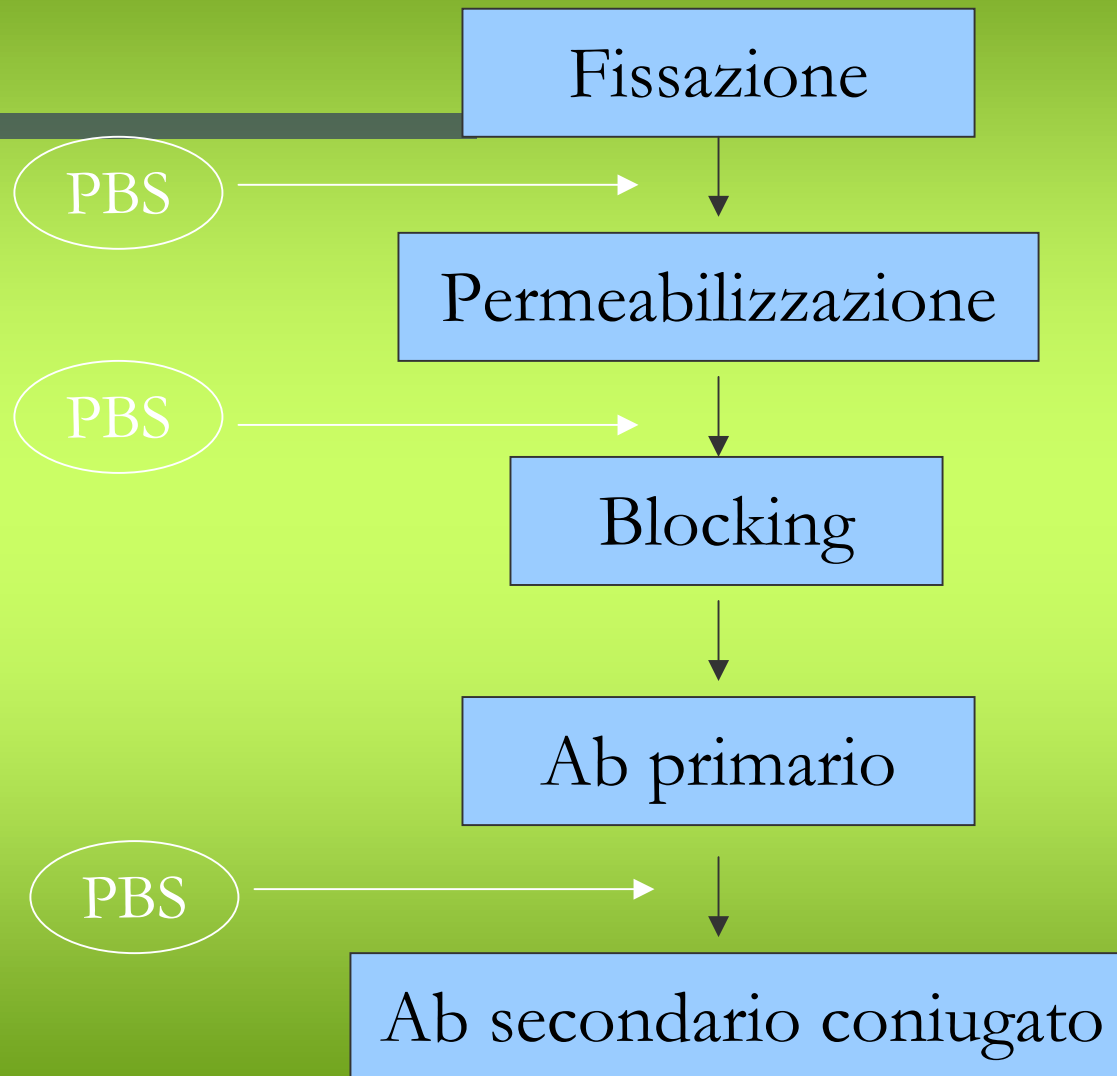
....*Importante*....



**Utilizzare sempre
un controllo negativo !!!!**

*Stesso campione
senza anticorpo primario*

IF su cellule




Fissazione:

- Etanolo: per le componenti del citoscheletro; solubilizza gli Ags di membrana; da usare preraffreddato e a -20°C
- Acetone pre-raffreddato
- Paraformaldeide 4%: per gli Ags di membrana
- Paraformaldeide 4% + 0.02% gluteraldeide in PBS: metodo di elezione per la doppia marcatura di Ags di membrana e del citoscheletro
- EGS (etilene-glicol-bis-succinimidil-succinato) :metodo per preservare i microtubuli e gli antigeni di membrana; è altamente instabile in acqua e viene diluito in DMSO; molto costoso

Permeabilizzazione delle cellule:

0.1% Triton X-100 in PBS



detergente non ionico per la
solubilizzazione delle
proteine di membrana

Non necessaria ...

- *Uso di fluorocromi lipofili*
- *marcatura di strutture di membrana*

Saturazione dei siti di legame aspecifici (blocking):

-1% BSA

-Normal serum block (della stessa specie dell'anticorpo secondario): normal goat/horse/swine/donkey/rabbit serum; solitamente contiene il Tween 20 (azione detergente e riduce la tensione superficiale)

adesione delle proteine al
collagene e agli elementi a carica
elevata del tessuto connettivo

interazioni idrofobiche o
elettrostatiche tra Ab e
componenti della cellula
o del tessuto

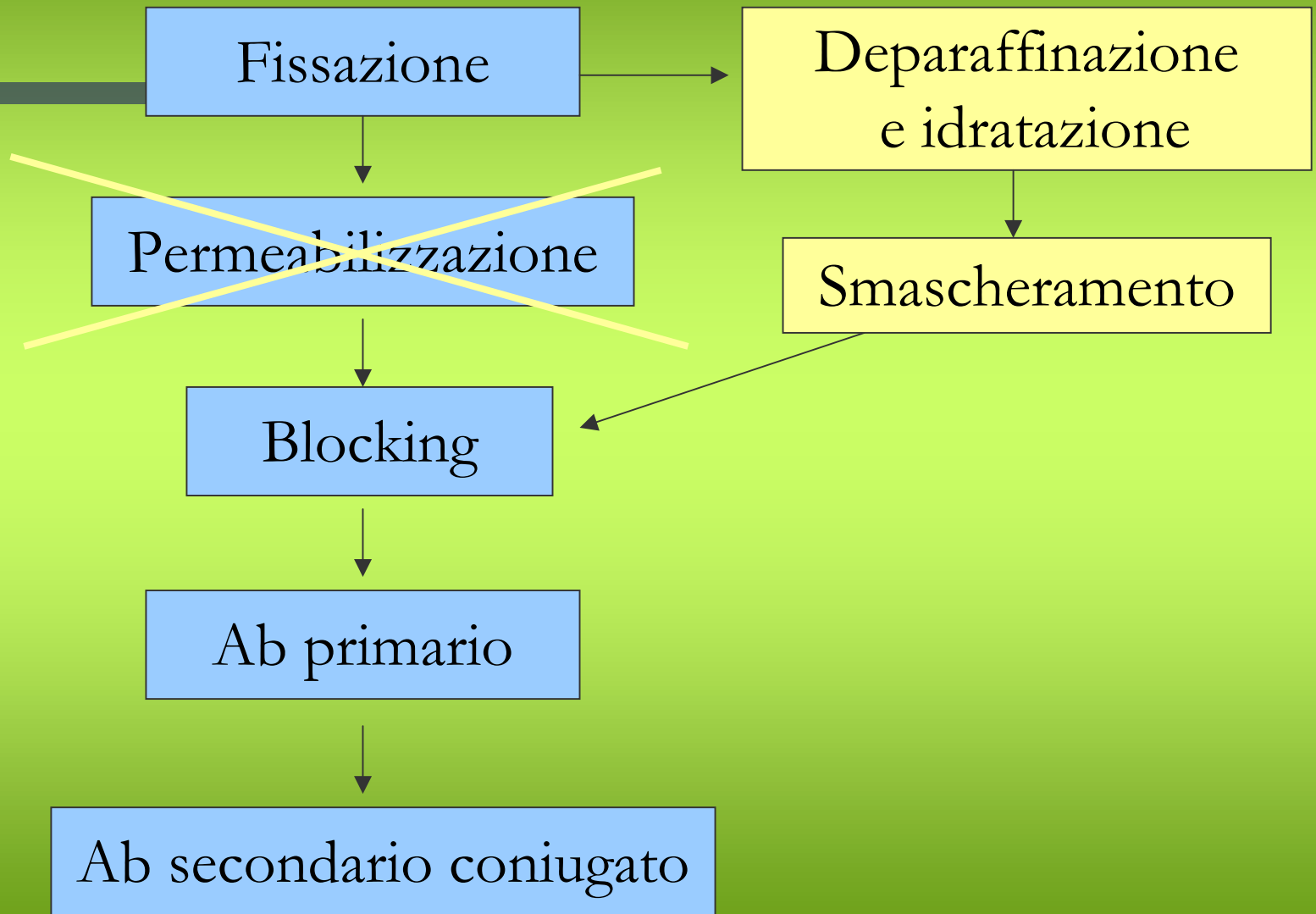
**Colorazione positiva del campione
non derivante dal legame Ag/Ab**

Anticorpo primario diluito nel blocking medium per 1 ora o overnight

Anticorpo secondario coniugato con fluorocromo e diluito in blocking medium per 45-60 minuti (al buio!!!)

Colorazione del DNA con DAPI o Hoechst

IF su sezioni di tessuto



Fissazione in paraformaldeide 4% e inclusione in paraffina

Deparaffinazione in xylolo

Idratazione in serie di alcoli (etanolo 100%-50%)

Pretrattamento per lo smascheramento antigenico:

- forno a microonde in tampone citrato
- Trattamento proteolitico con pronase

Formazione di un eccesso di legami aldeidici



Mascheramento dei determinanti antigenici



Inaccessibilità dell' Ab primario



Saturazione dei siti di legame aspecifici:

-normal serum

-2%BSA, 0.1% Triton X-100

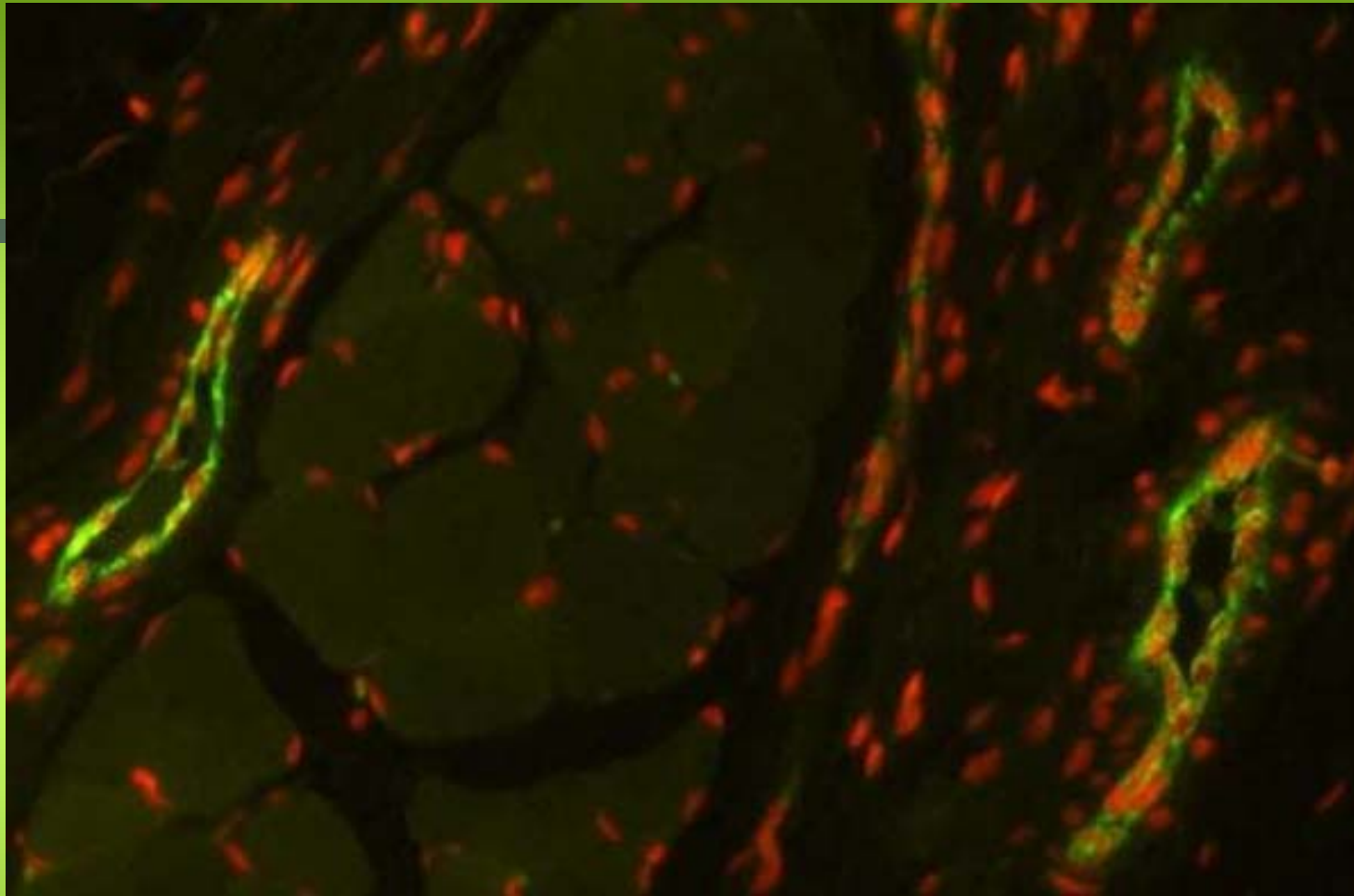
Anticorpo primario diluito con blocking medium overnight, in camera umida

Anticorpo secondario coniugato
con fluorocromo, diluito con blocking medium per 45 minuti (al buio!!!)

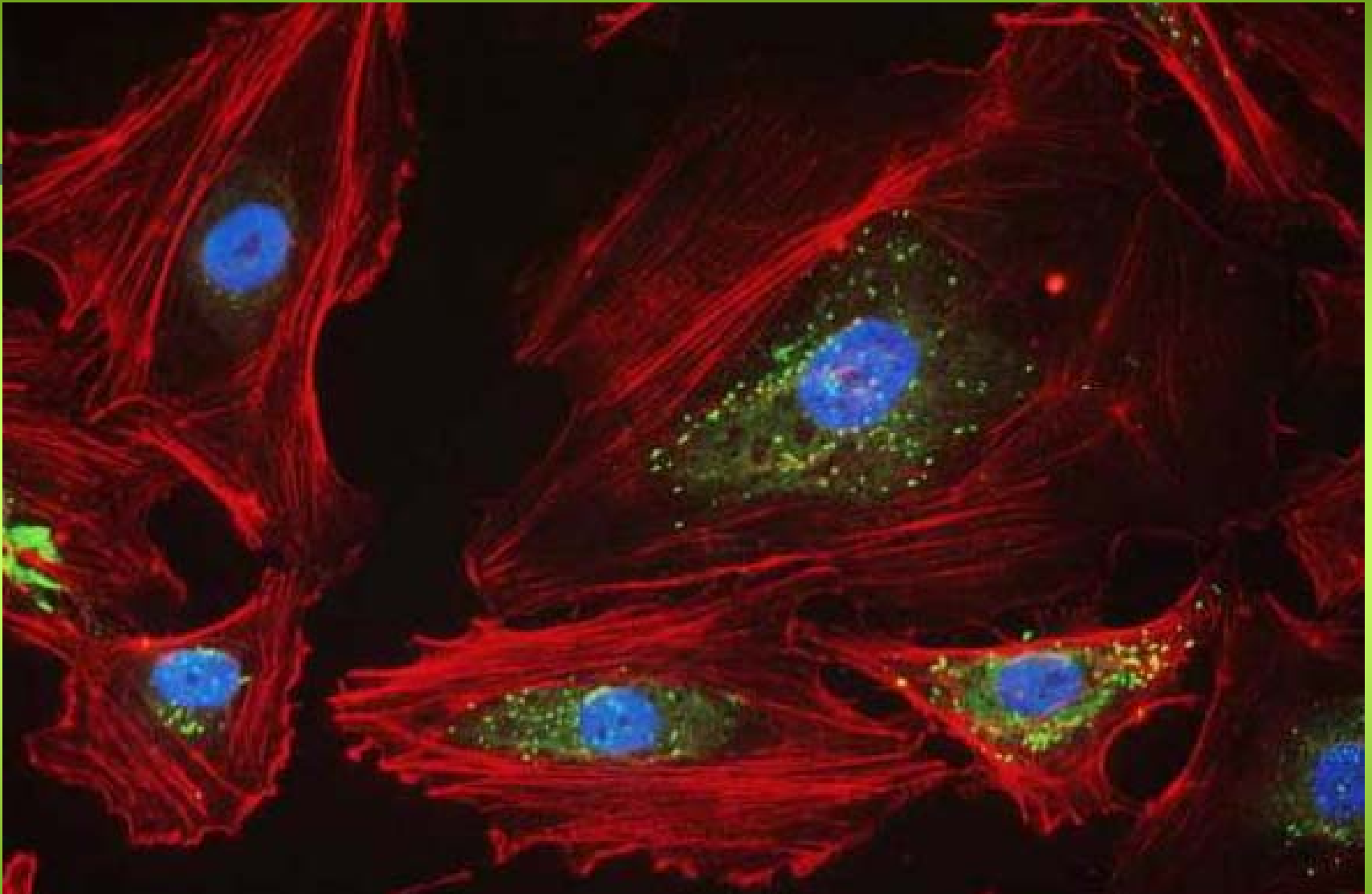
Colorazione del DNA con DAPI o Hoechst per 15
minuti

Montaggio con montante acquoso e applicazione del
vetrino coprigetto con smalto per unghie

....Conservare al buio a 4°C....



*Endothelial cells of skin blood vessels
positive for vWF (green)*



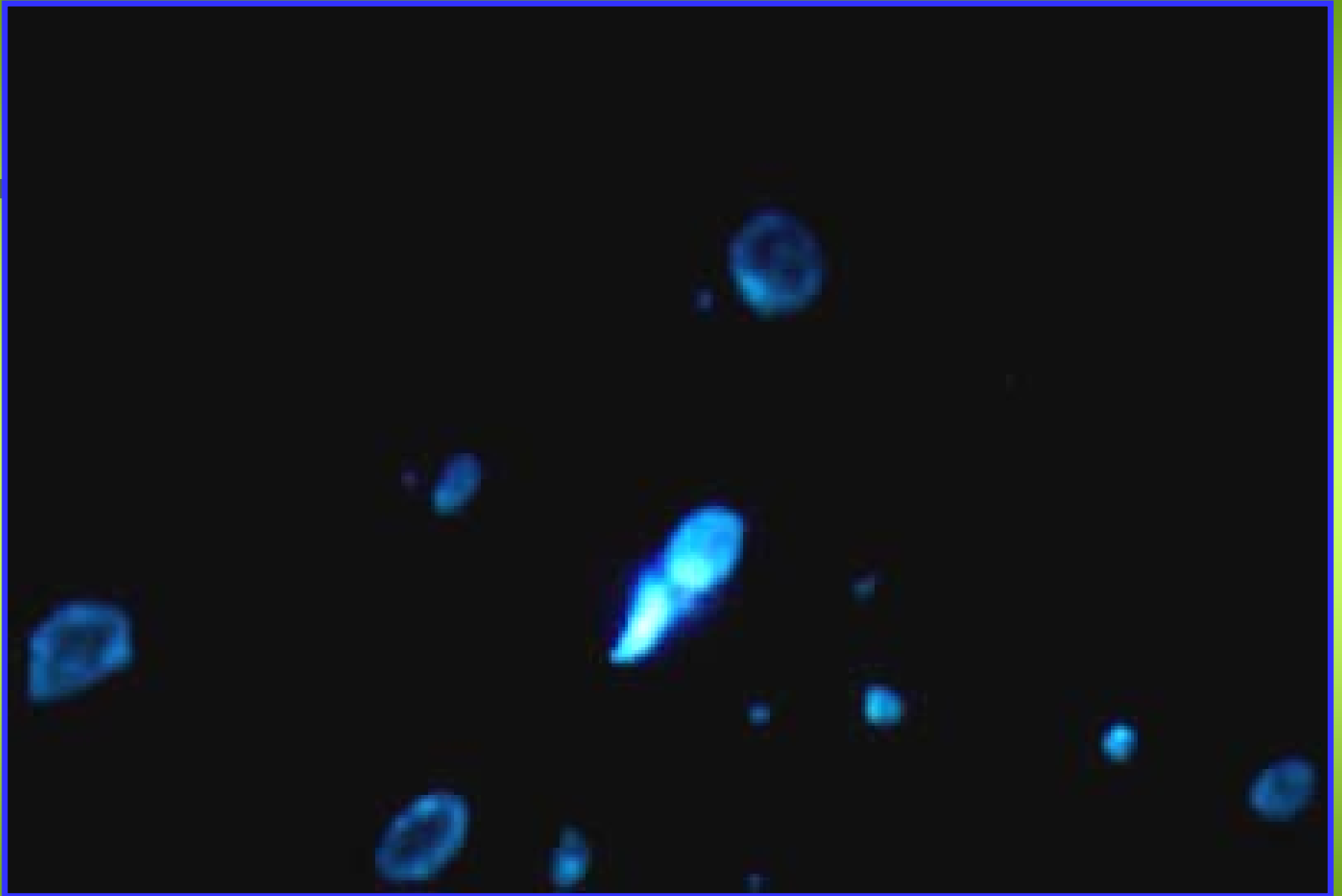
F-Actin microfilaments - red, von Willebrand factor in palade bodies - green, nuclei blue (DAPI).



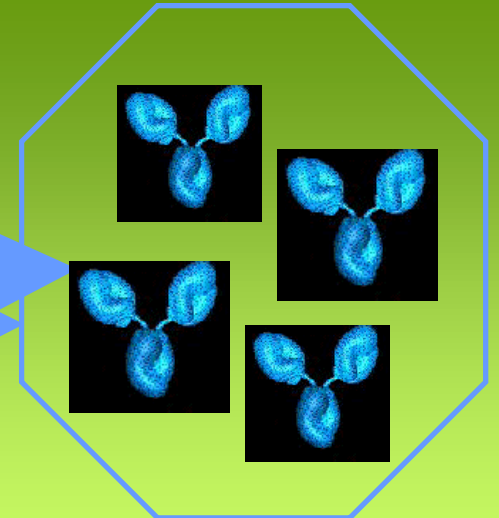
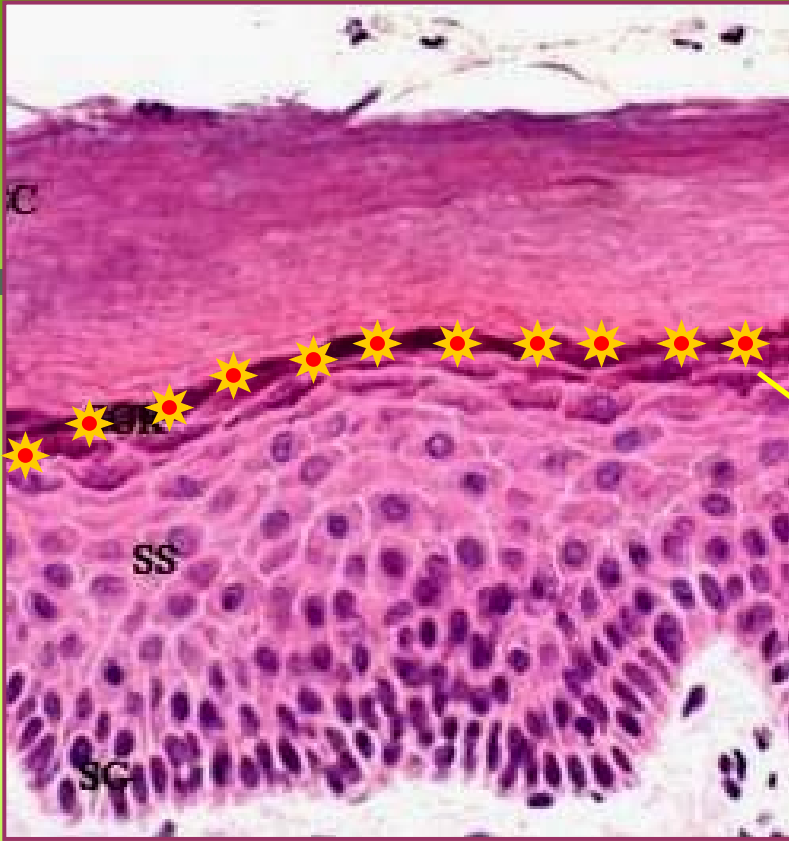
TROUBLESHOOTING

- a. Elevato background???*
- b. Assenza di segnale???*
- c. Ridotta intensità del segnale???*

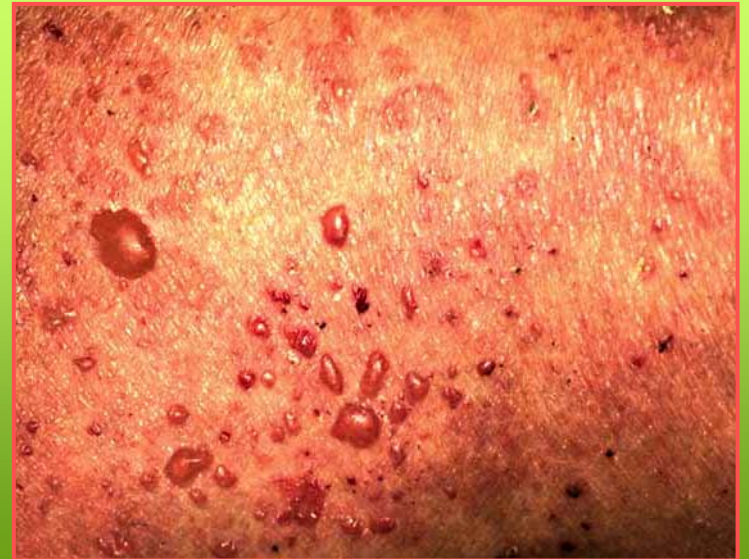
Applicazioni



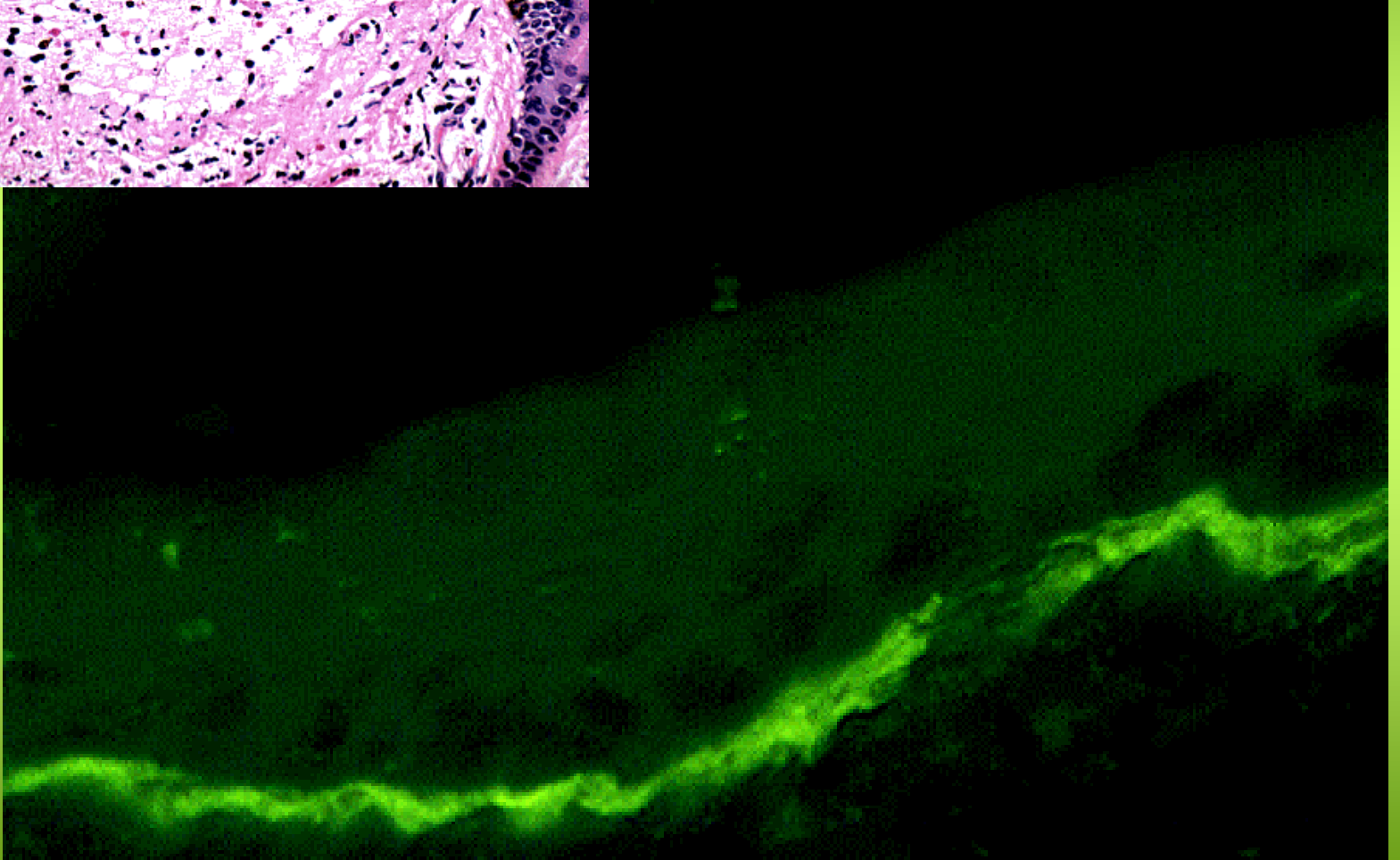
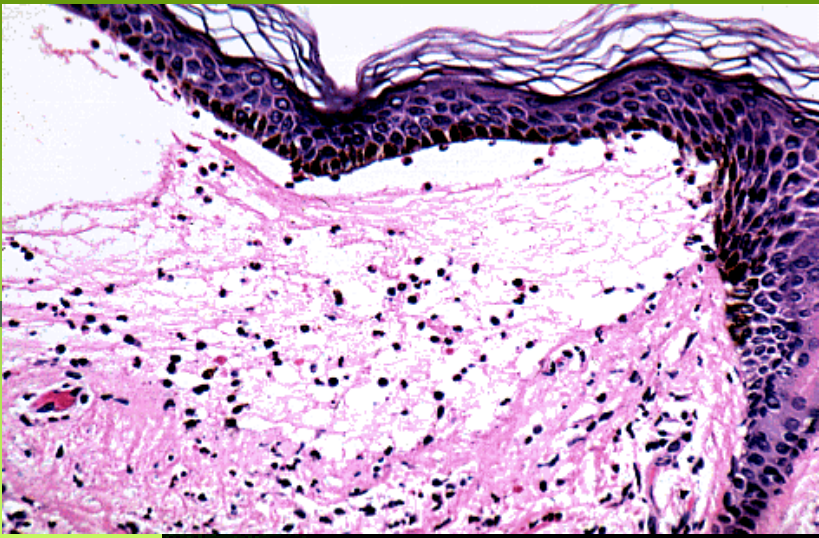
Virus della rabbia (tessuto cerebrale)



*IgG anti-D
(desmoplachine)*



Pemfigo

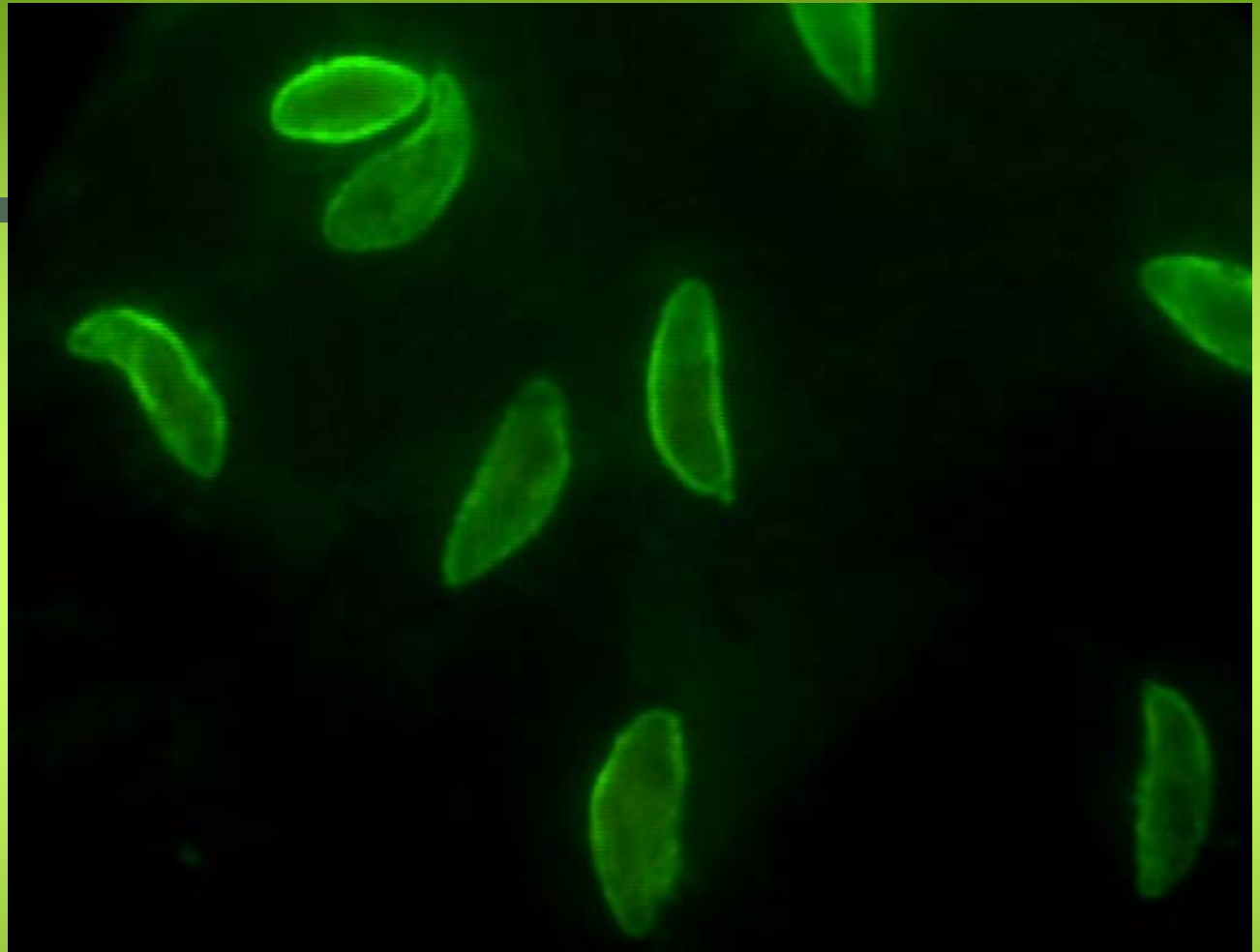


Toxoplasma
adsorbito su vetrino

Siero da testare

Antiglobulina
marcata con
fluoresceina

Fluorescenza verde
che borda il
toxoplasma



Test di immunofluorescenza indiretta per la rilevazione di anticorpi nei confronti di Toxoplasma gondii

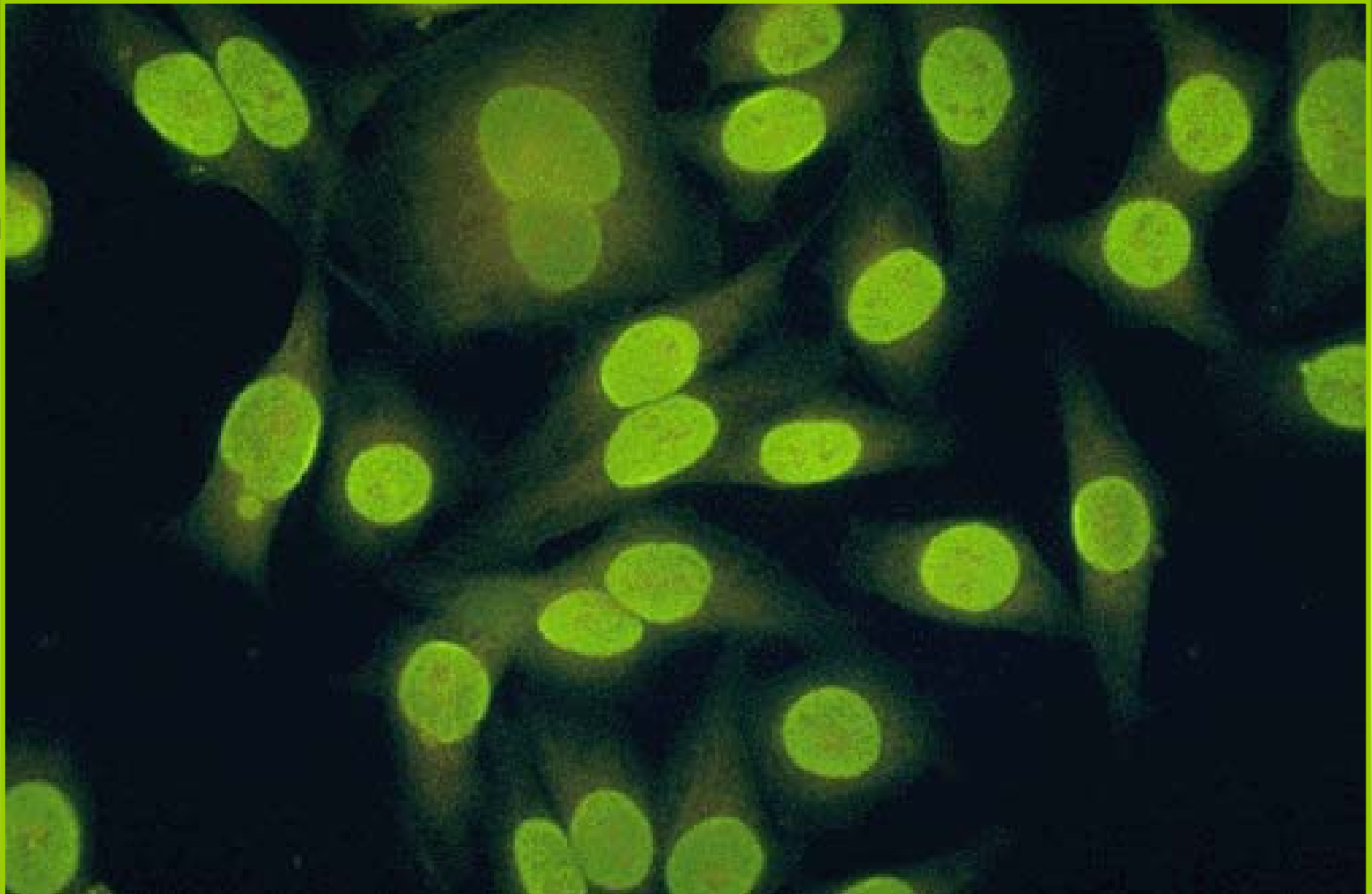
ANA test

Substrato cellulare:

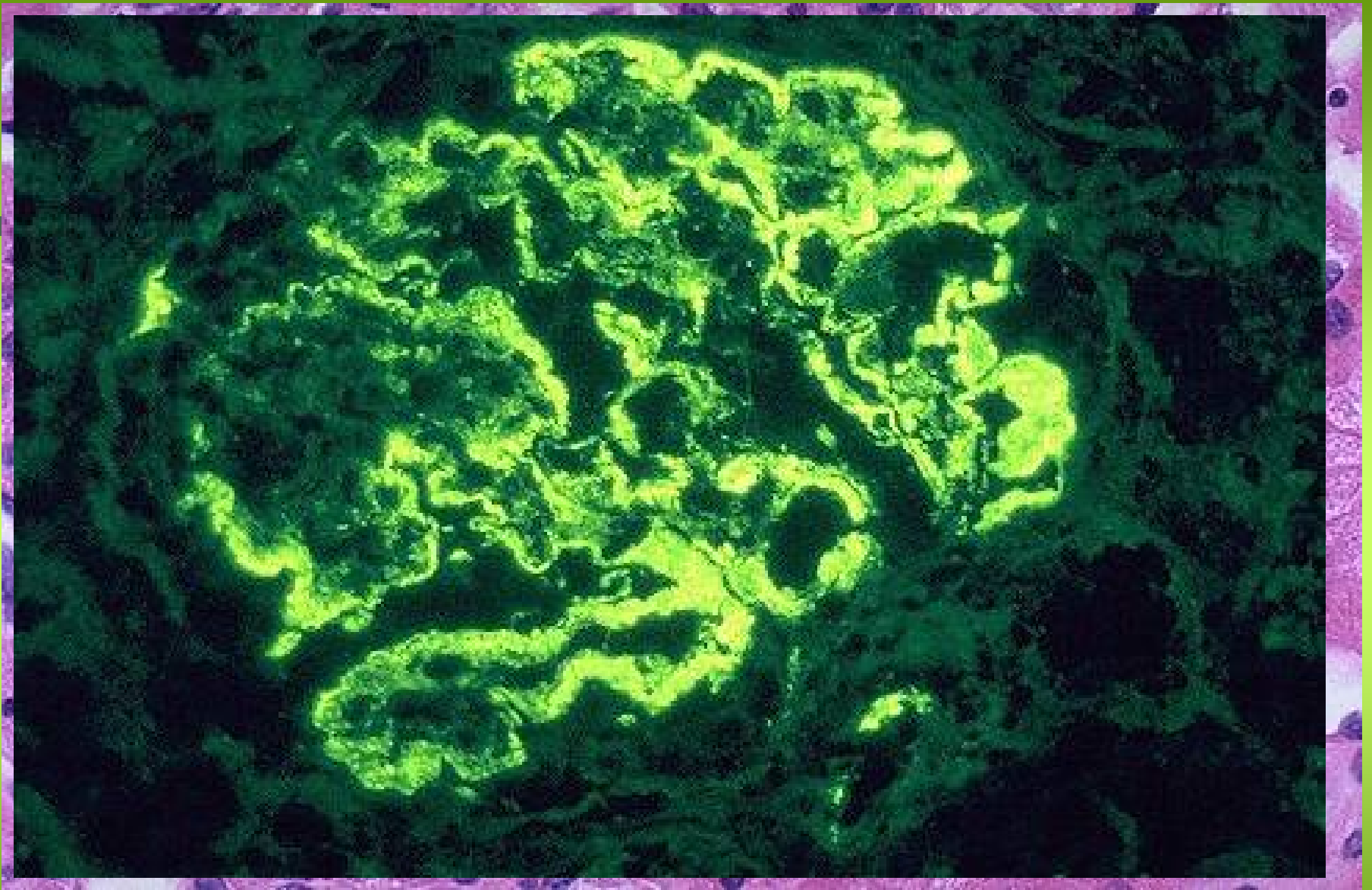
- sezioni sottili di fegato di topo o ratto
- monostrati cellulari tumorali (HeLA, KB)

Siero in esame (Abs anti-nucleo?)

Siero anti-gammaglobuline marcato con fluoresceina



Test di immunofluorescenza indiretta per la rilevazione di anticorpi antinucleari



Glomerulonefrite membranosa

IgG e C3 (deposito granulare, diffuso)