

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. A central text box is overlaid on 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

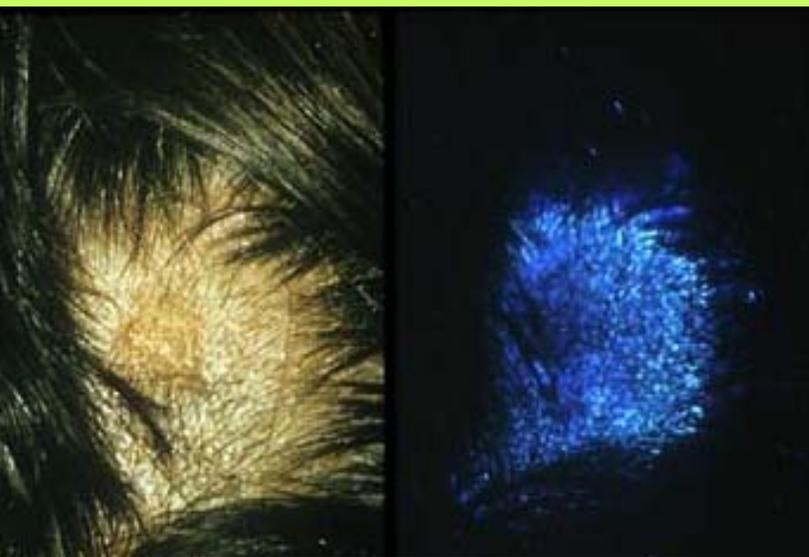
| Fluorescent compound | Localization | Excitation maxima [nm] | Emission maxima [nm] |
|---|--|---------------------------------|---------------------------------|
| Aromatic amino acid residues: | cofactors in metabolism, concentrated to mitochondria, also present in cytoplasm | | |
| Tryptophan | | 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 |



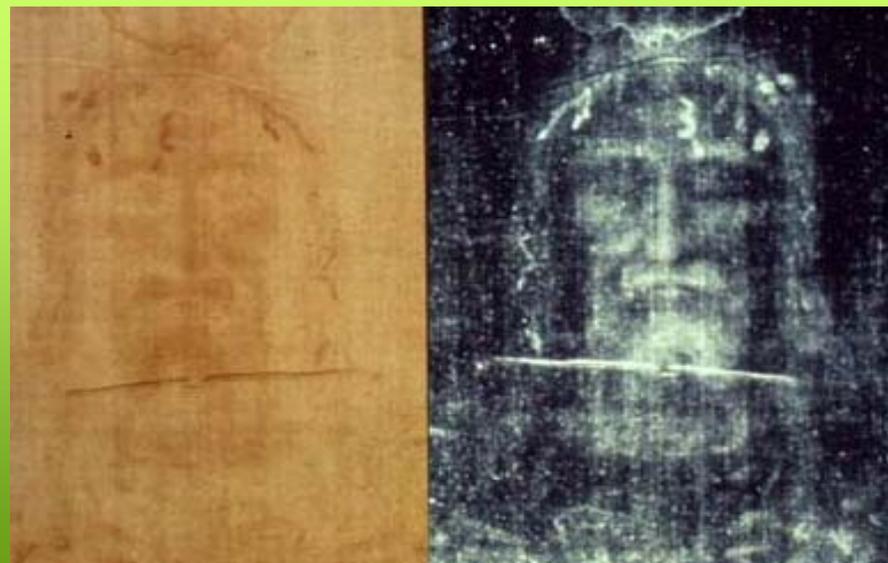
Tetraciclina



porfiriosi



Tinea capitis



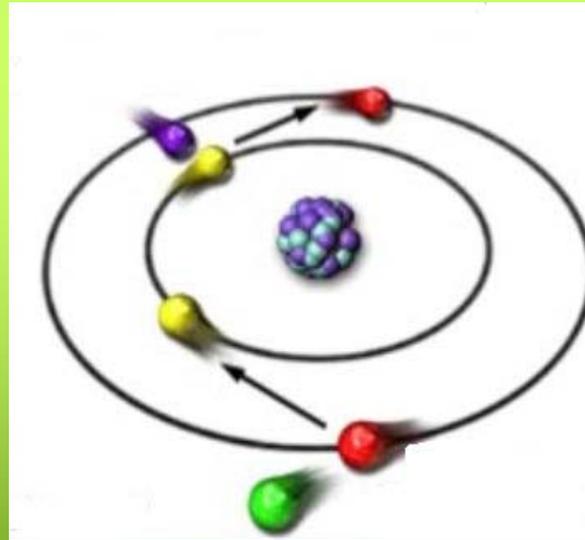
Fluorescenza del plasma

Sir George S. Stokes (1852):

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



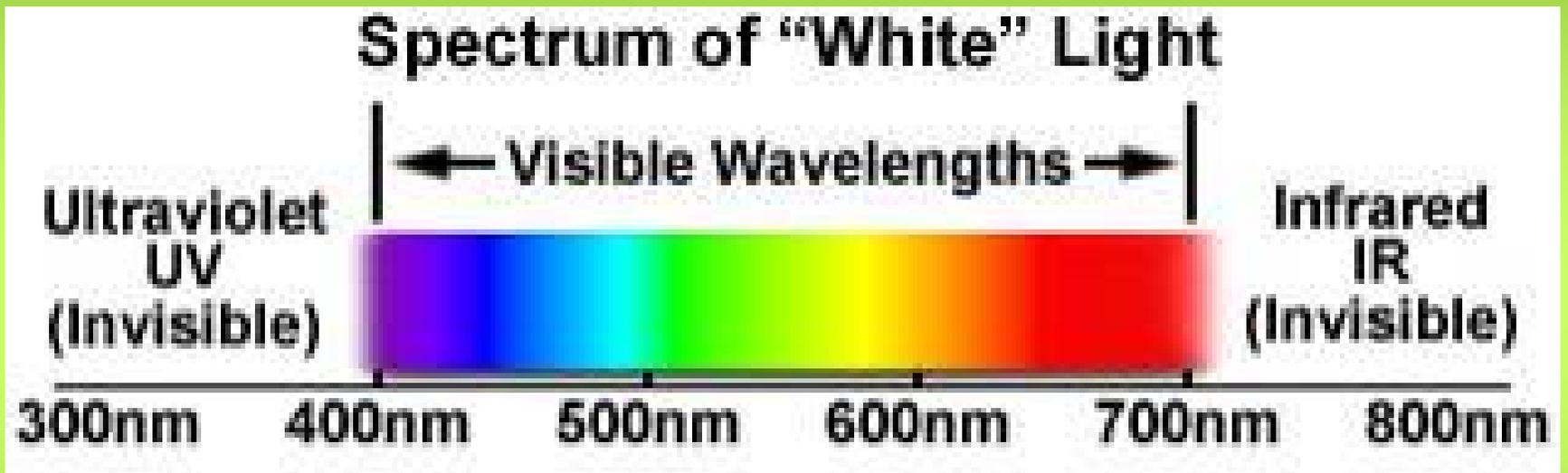
1) Fotone di radiazione UV che collide con un elettrone in un atomo semplice



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

4) Emissione di luce sotto forma di fotone

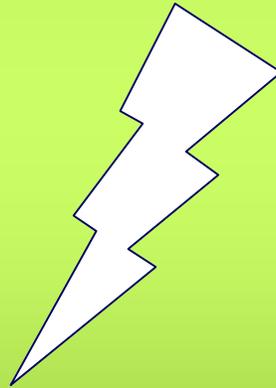
3) l'elettrone eccitato diminuisce ad un livello di energia più basso



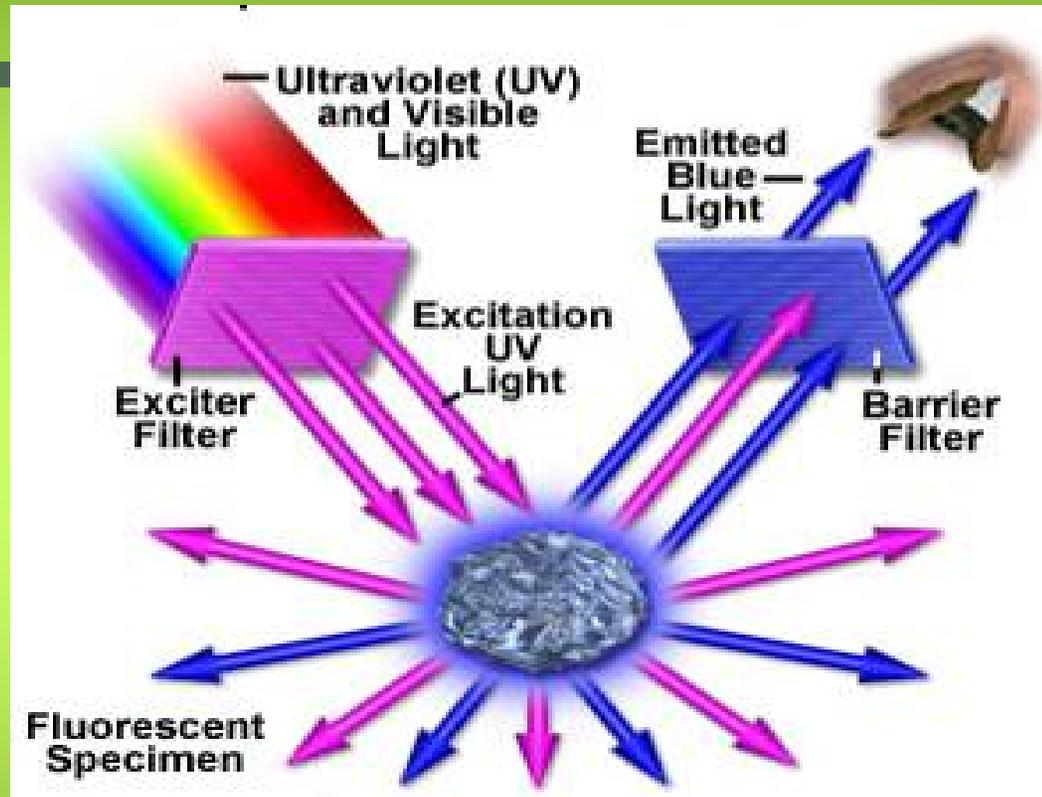
*Regione di luce visibile della
radiazione elettromagnetica*

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

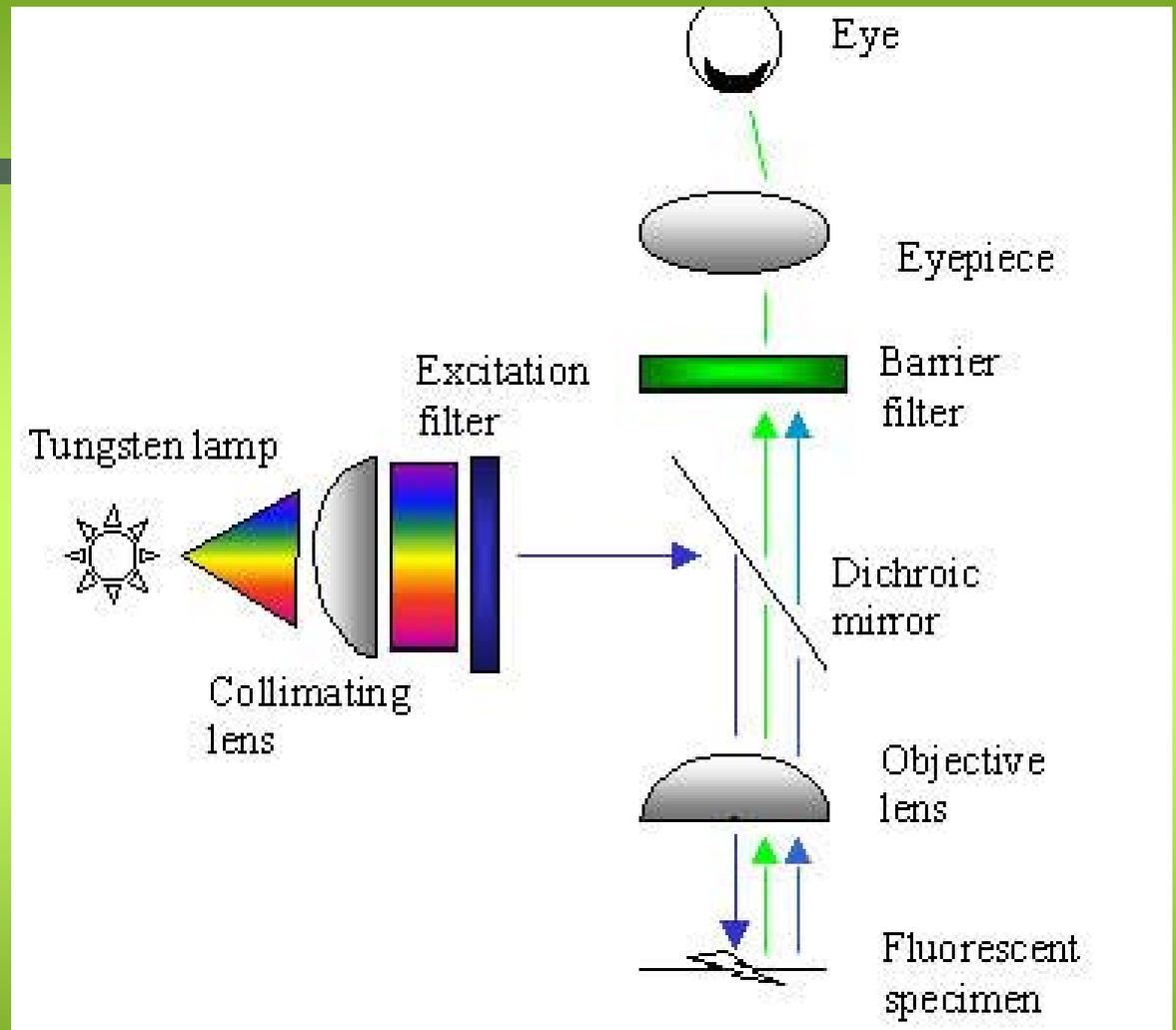
-Lente obiettivo: focalizza il fascio sul campione

-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

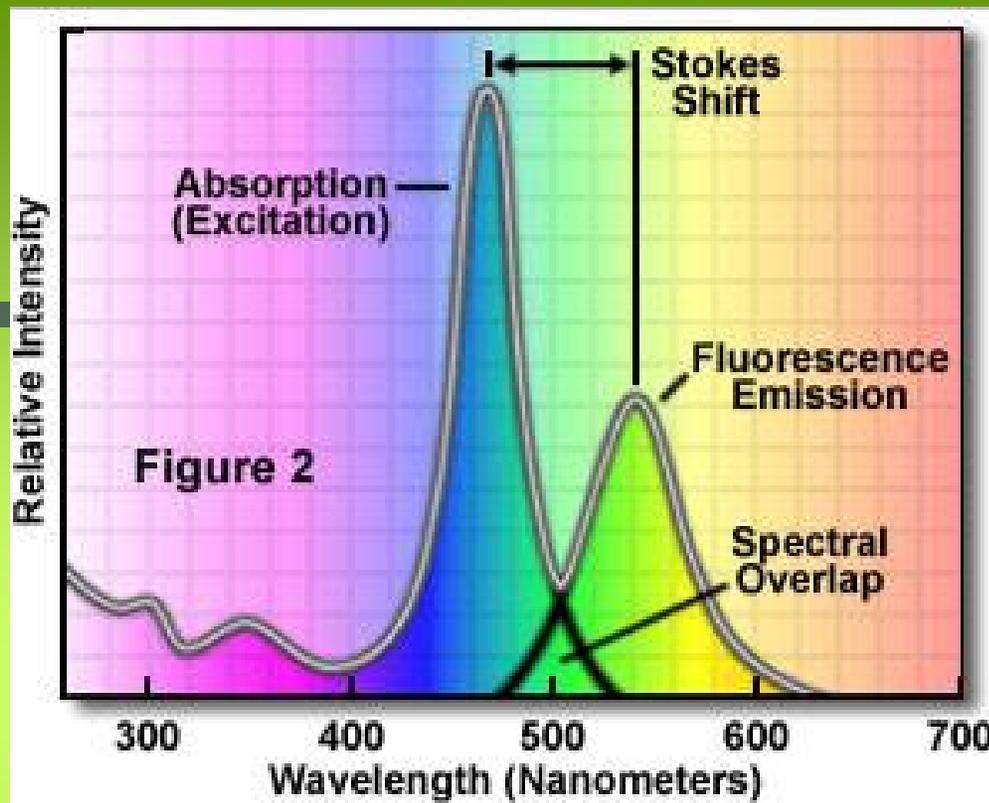
Rara autofluorescenza verde
(spesso blu)

| 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. |

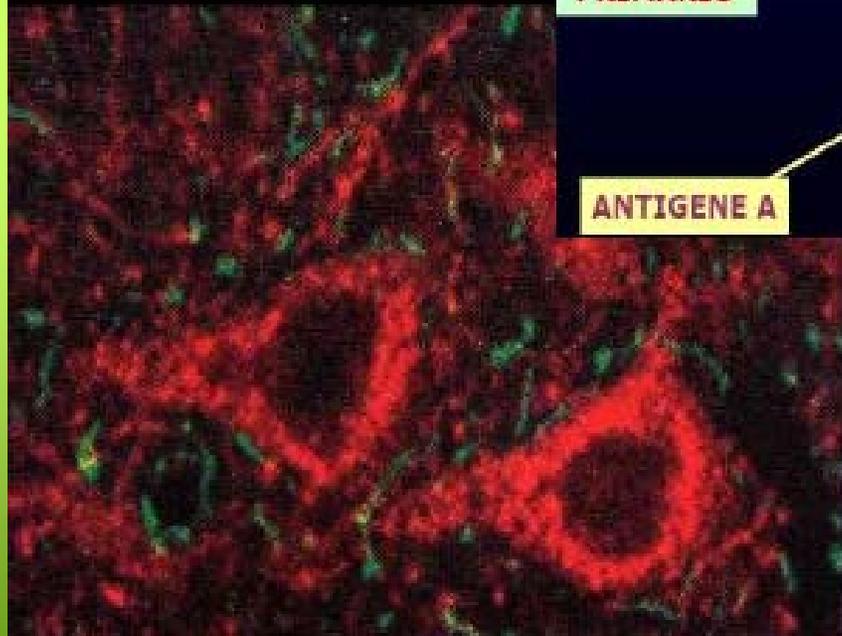
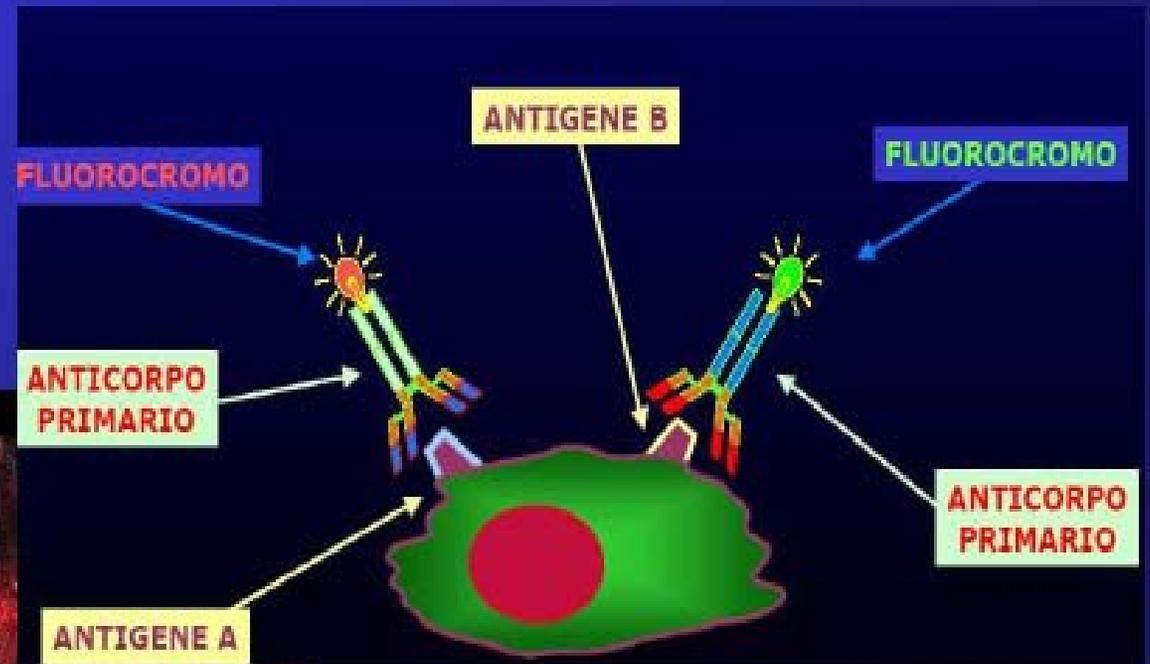
*Lunghezza
d'onda inv.
prop. all'energia
della radiazione*



Attenzione

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

Metodo diretto



Doppia colorazione

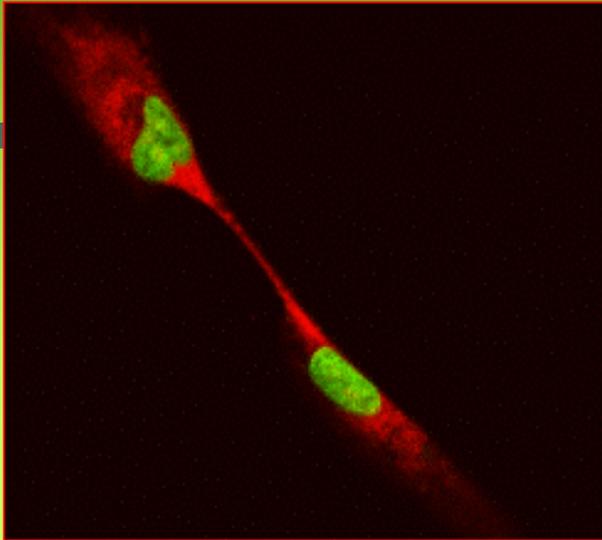
Tipologie di marcatori fluorescenti

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

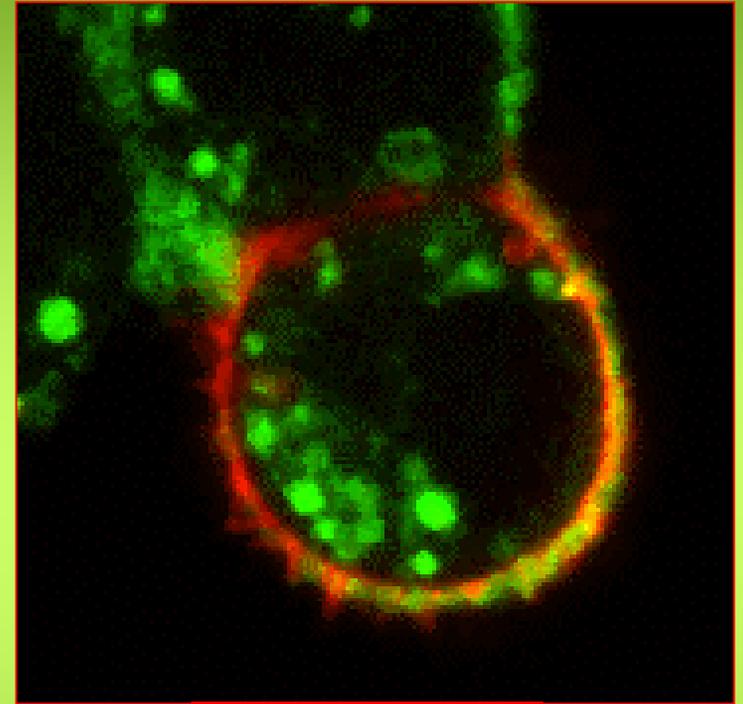
| | |
|--|--|
| <i>Acidi nucleici</i> | acridine orange, Hoechst 33342, DAPI, propidium iodide (ioduro di propidio), ethidium bromide (etidio bromuro) |
| <i>Proteine, membrana plasmatica e reticolo endoplasmatico</i> | DiO, DiI |
| <i>Mitocondri</i> | TMRE |
| <i>Apparato di Golgi</i> | NBD-Ceramide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

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

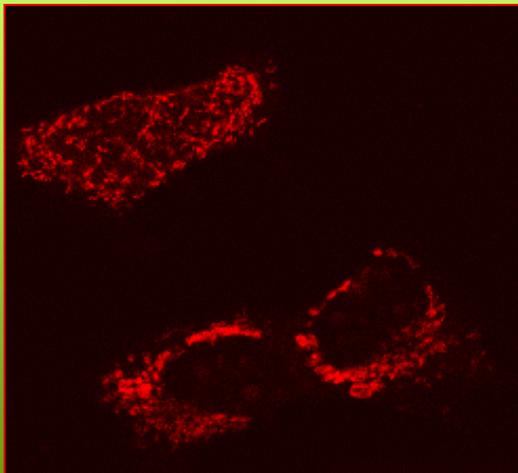


Arancio di acridina

Localizzazione nello strato esterno della
membrana plasmatica



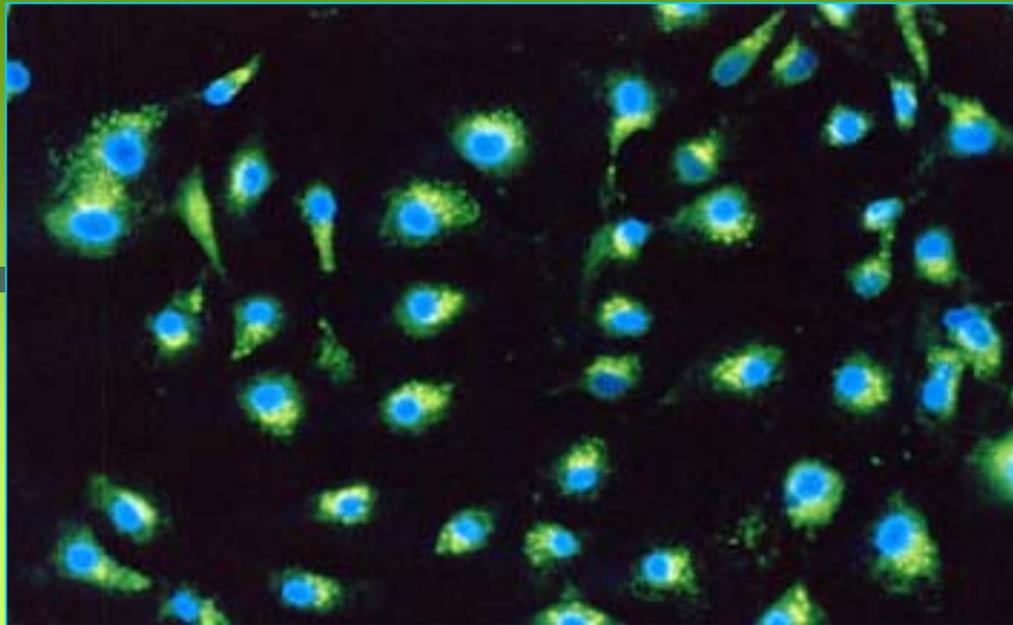
DiI



TMRE

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

Apparato di Golgi



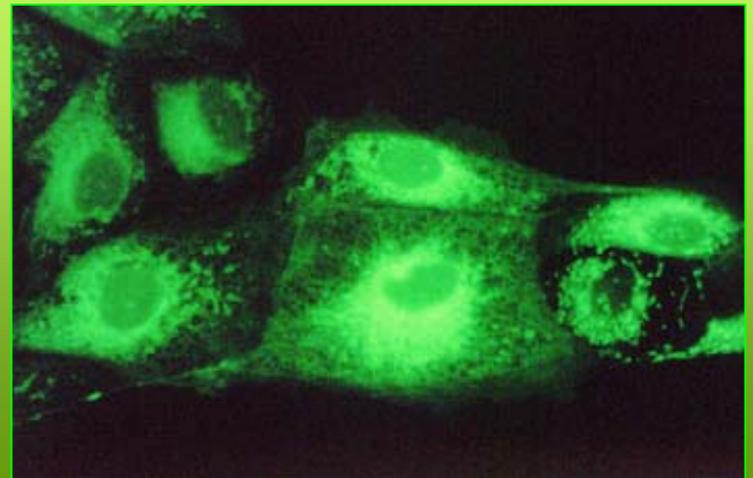
Nucleo

NBD-ceramide

Hoechst 33342

Reticolo endoplasmatico

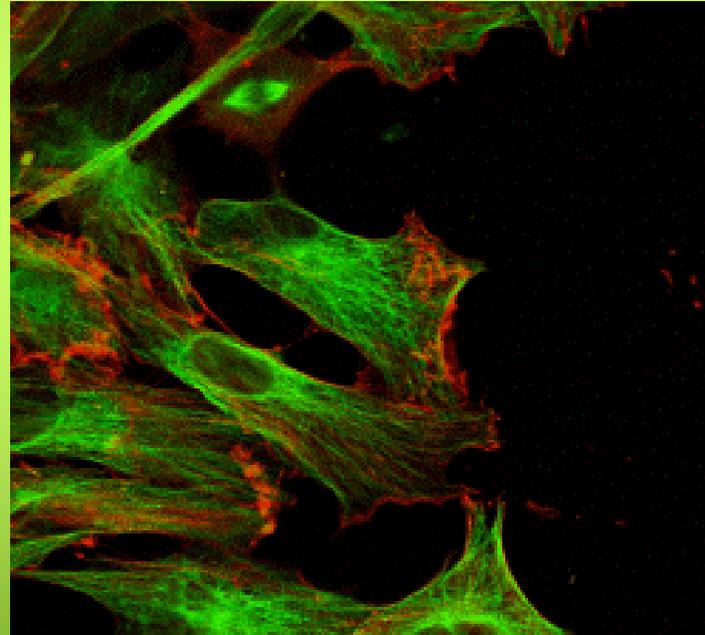
DiO



Diretti nei confronti di specifiche componenti cellulari previo legame con Abs

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

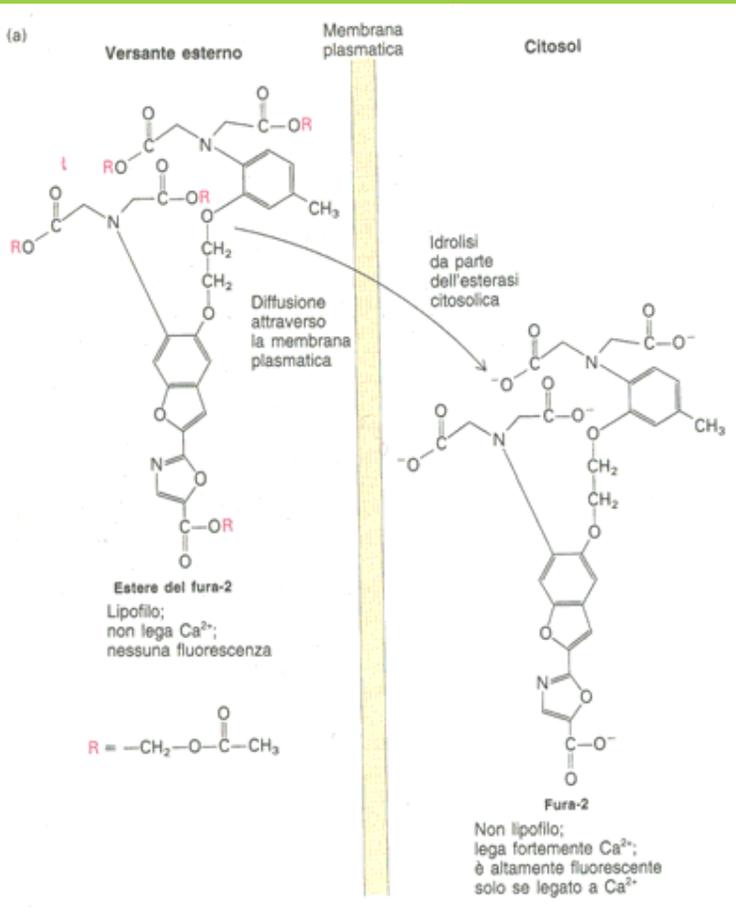
Fibre di actina (rosso) e microtubuli (verde) nei fibroblasti in coltura



Rodamina

Fluoresceina

Con affinità per fattori del microambiente cellulare

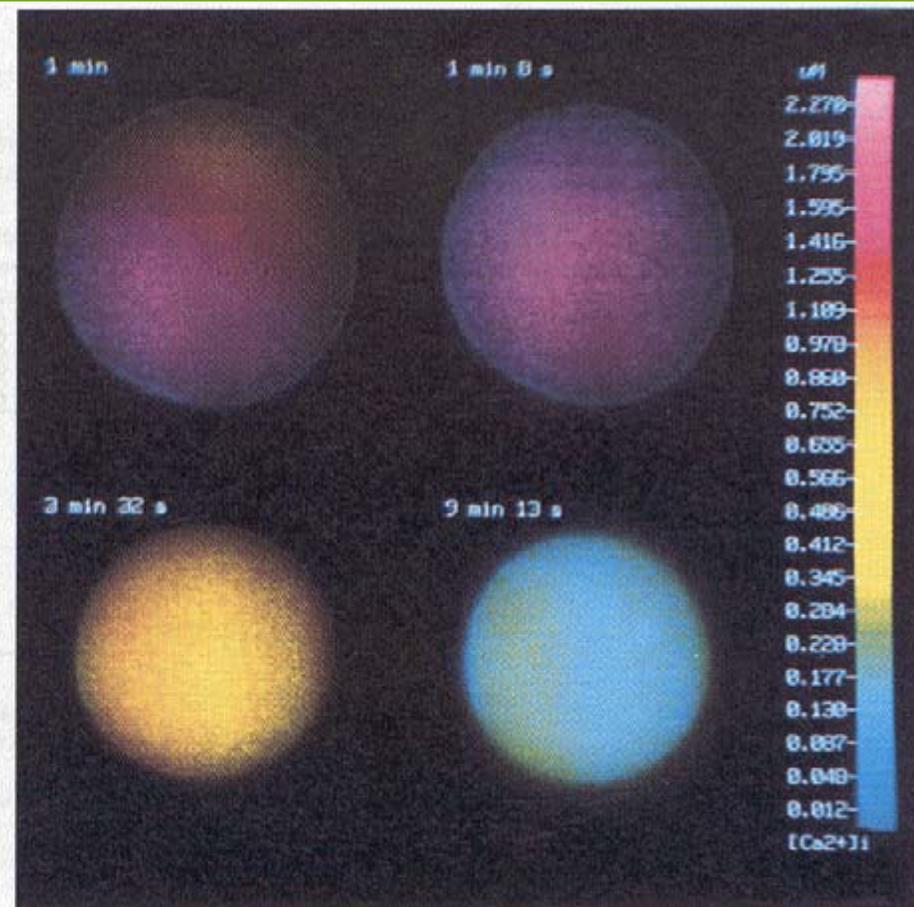
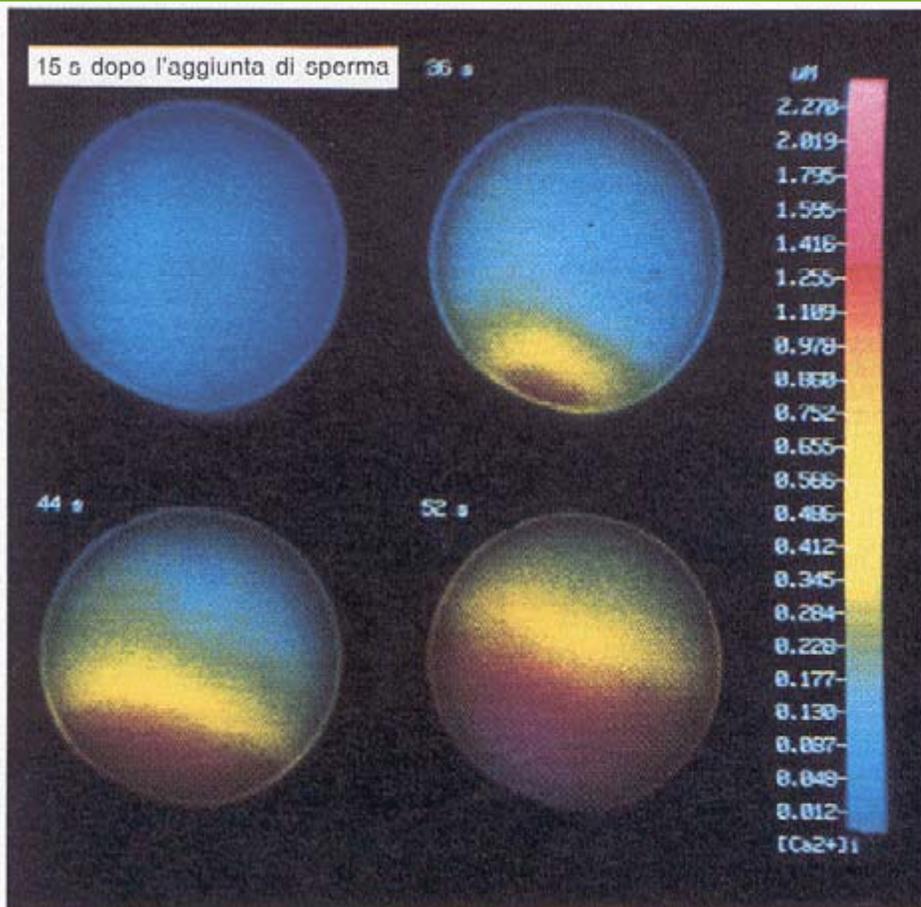


- ✓ ioni idrogeno (pH)
- ✓ concentrazione di ioni calcio

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

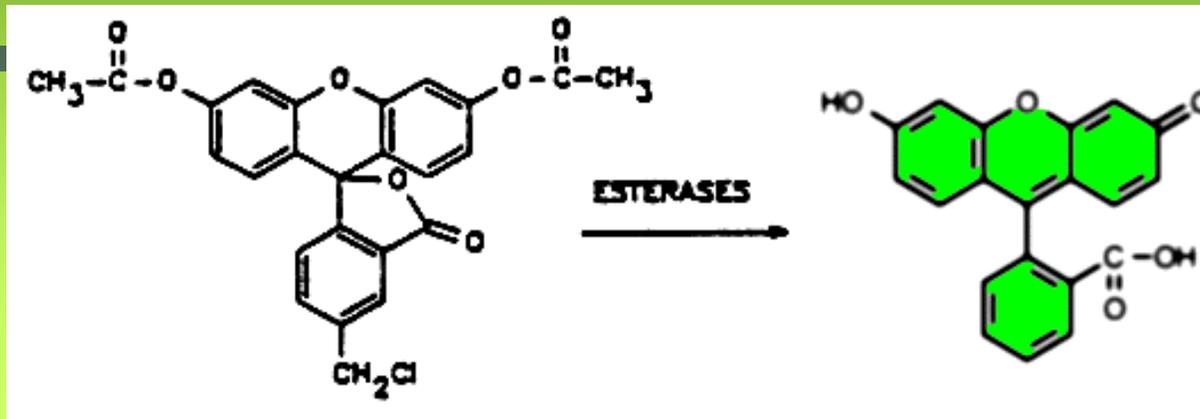
Esempio: Fura-2 = indicatore di Calcio

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

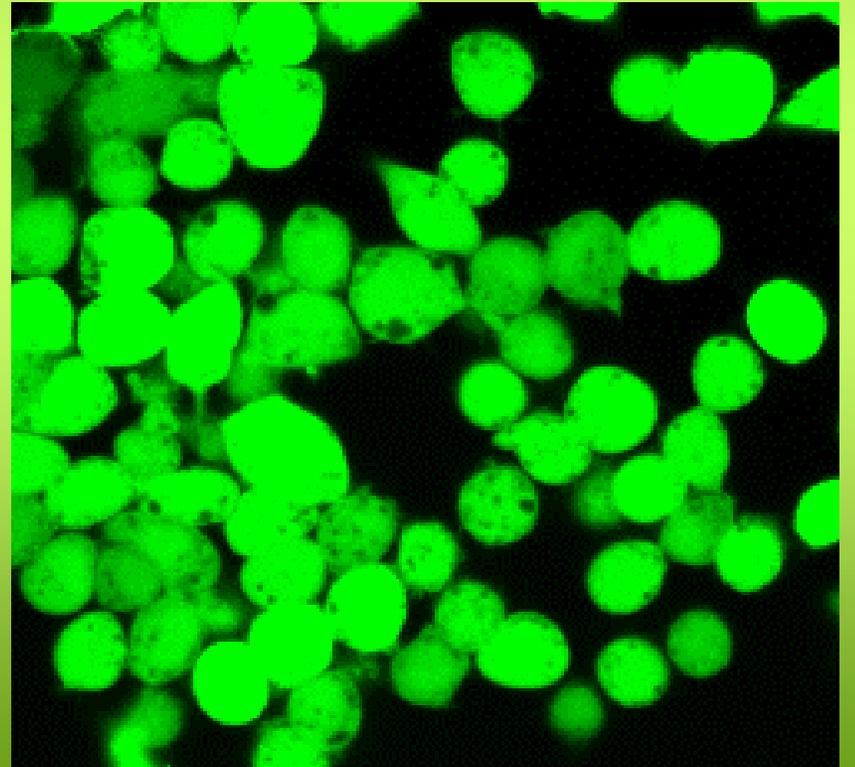
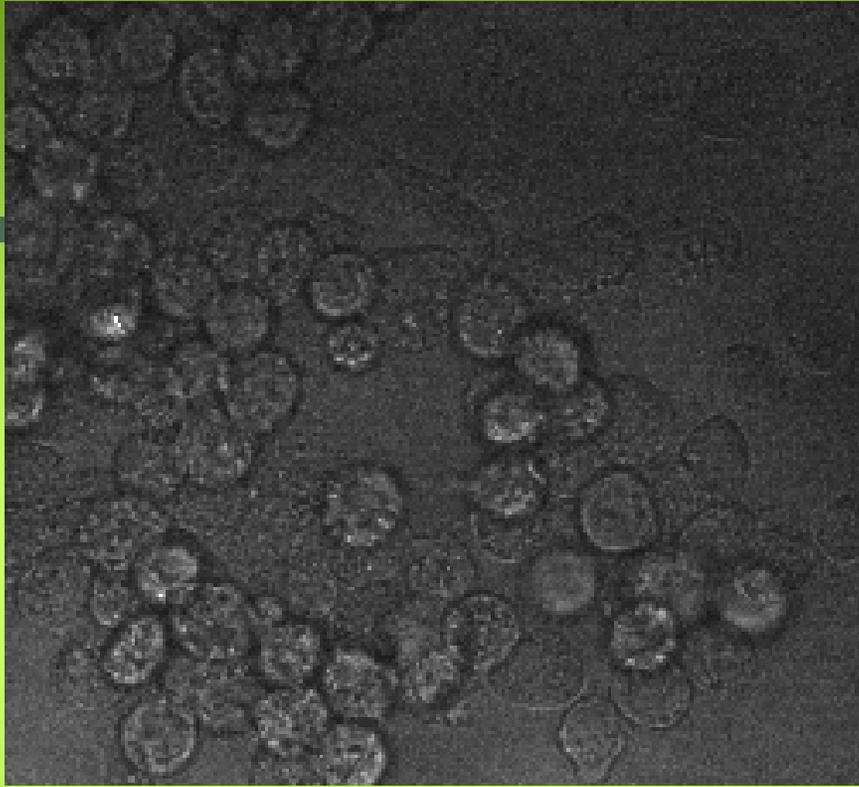


*Fluorescein
diacetate (FDA)*

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

*Cellule vive:
fluorescenti*

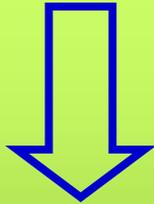
*Cellule danneggiate: non
fluorescenti*



IMMUNOFLUORESCENZA

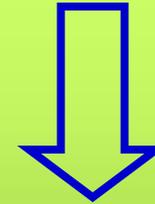
```
graph TD; A[IMMUNOFLUORESCENZA] --> B[Diretta]; A --> C[Indiretta]; B --> D[Ricerca di antigeni]; C --> E["Ricerca di anticorpi nel siero o identificazione di antigeni in tessuti o colture cellulari"];
```

Diretta



Ricerca di antigeni

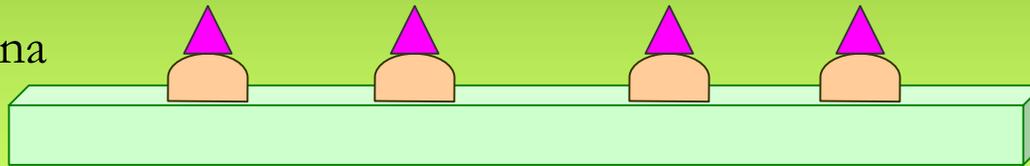
Indiretta



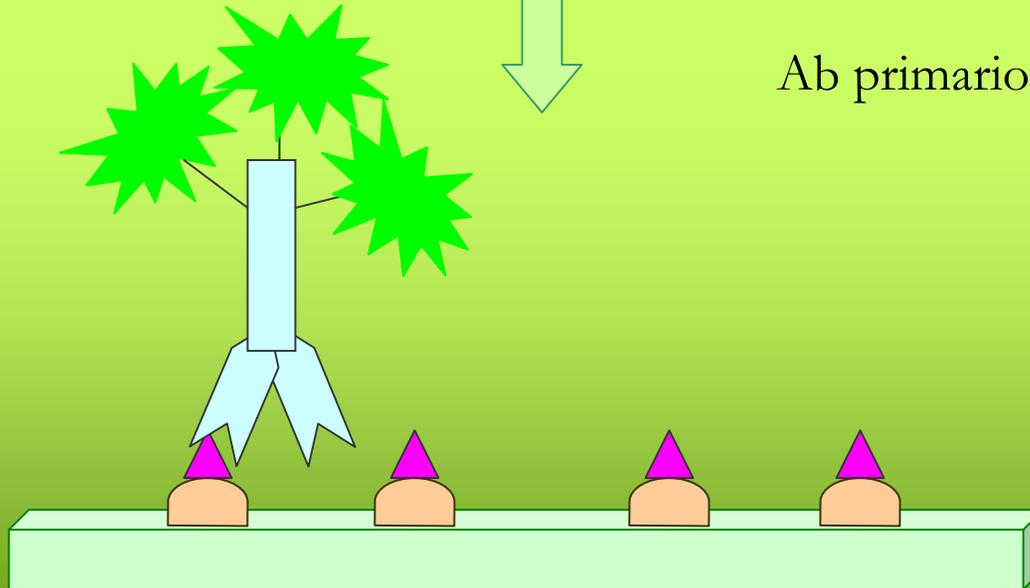
Ricerca di anticorpi nel siero o identificazione di antigeni in tessuti o colture cellulari

Immunofluorescenza diretta

Cellule con
Ags di membrana

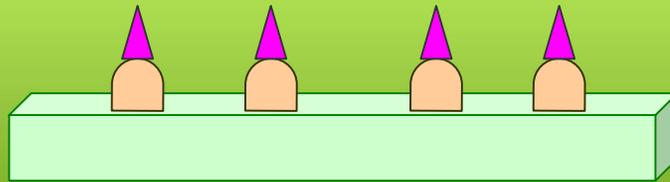
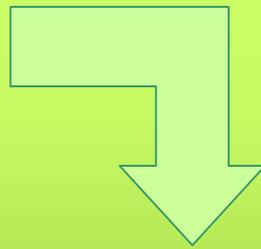
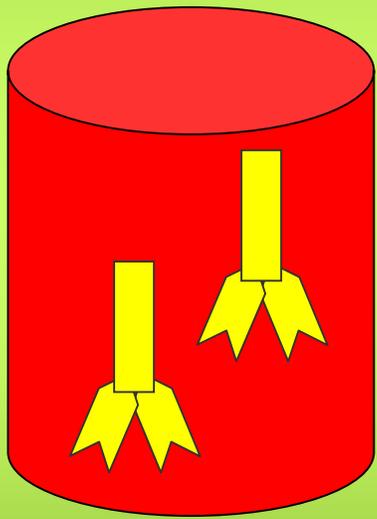


Ab primario coniugato

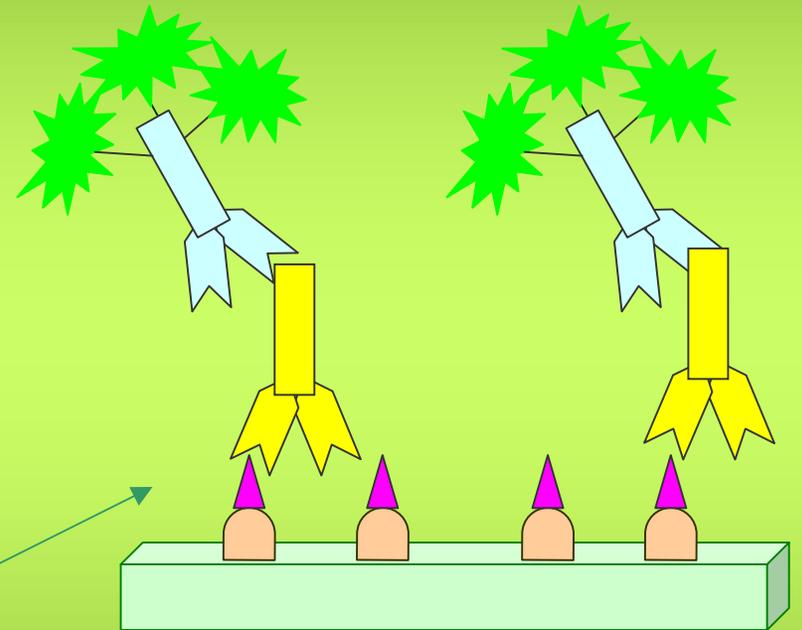


Immunofluorescenza indiretta

Ricerca di anticorpi nel siero



Ag noto



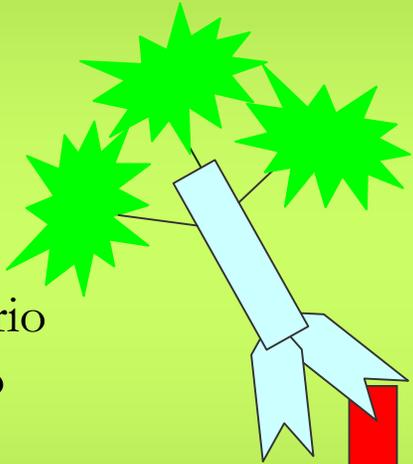
Ab secondario coniugato

Identificazione di antigeni

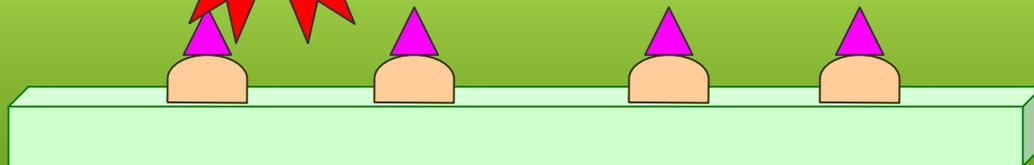
Cellule con
Ags di membrana



Ab secondario
coniugato



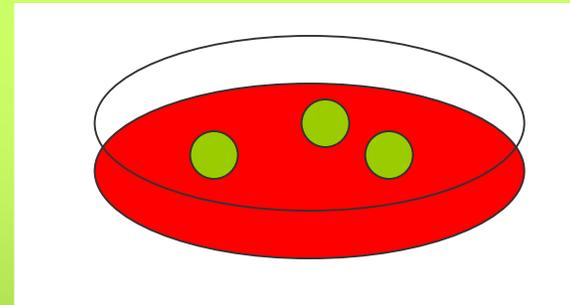
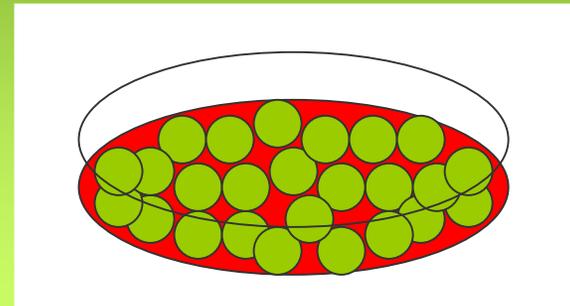
Ab primario



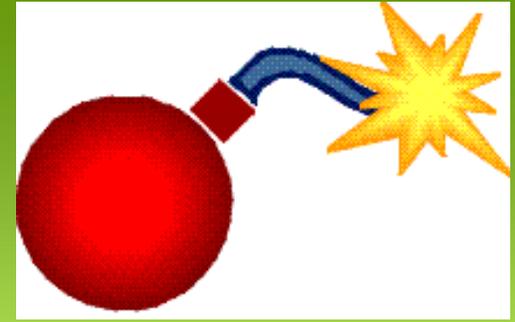
PROTOCOLLO DI IMMUNOFLUORESCENZA

Campioni:

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



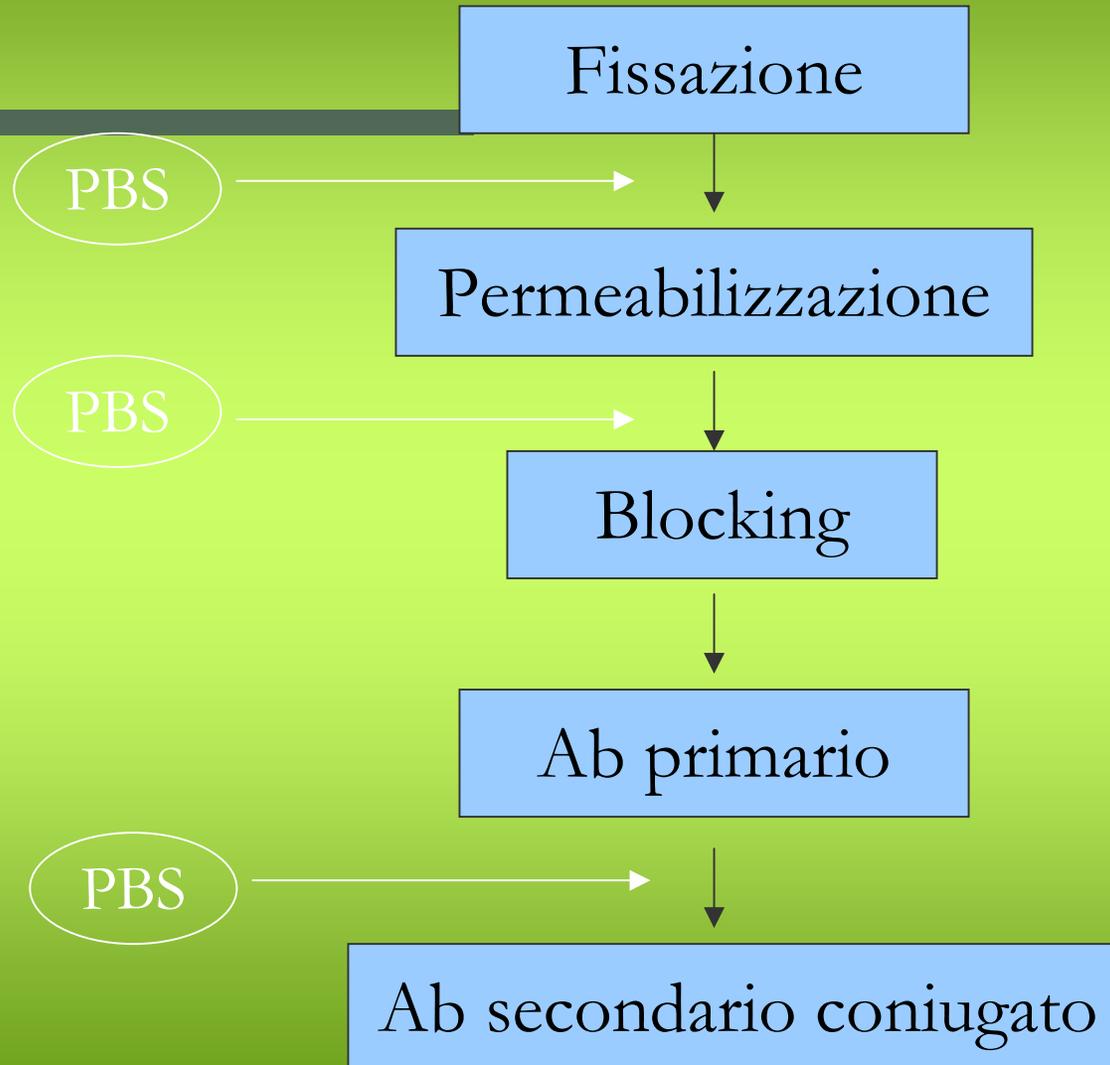
....*Importante*....



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

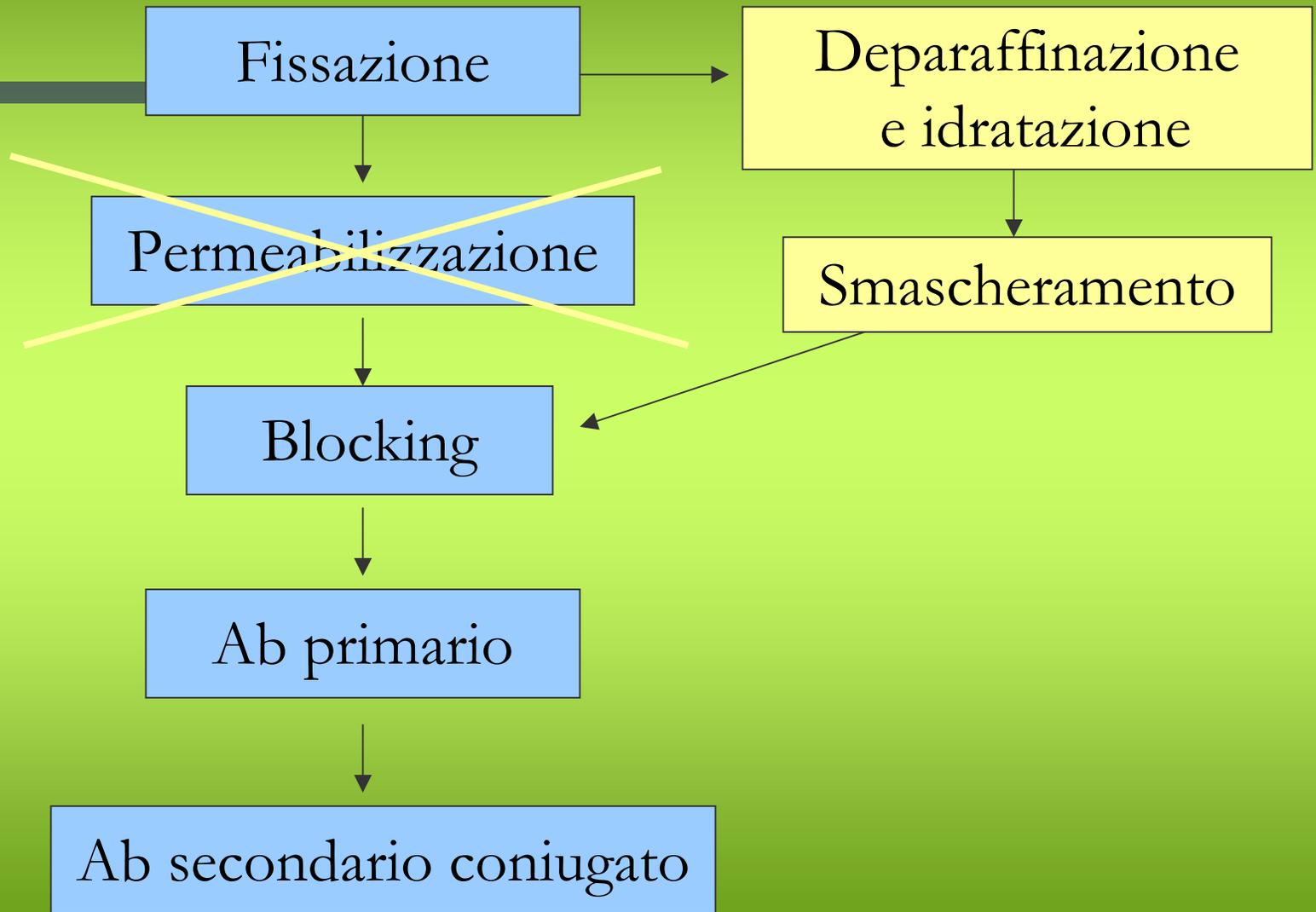
Colorazione positiva del campione non derivante dal legame Ag/Ab

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

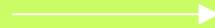
Deparaffinazione in xylolo

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

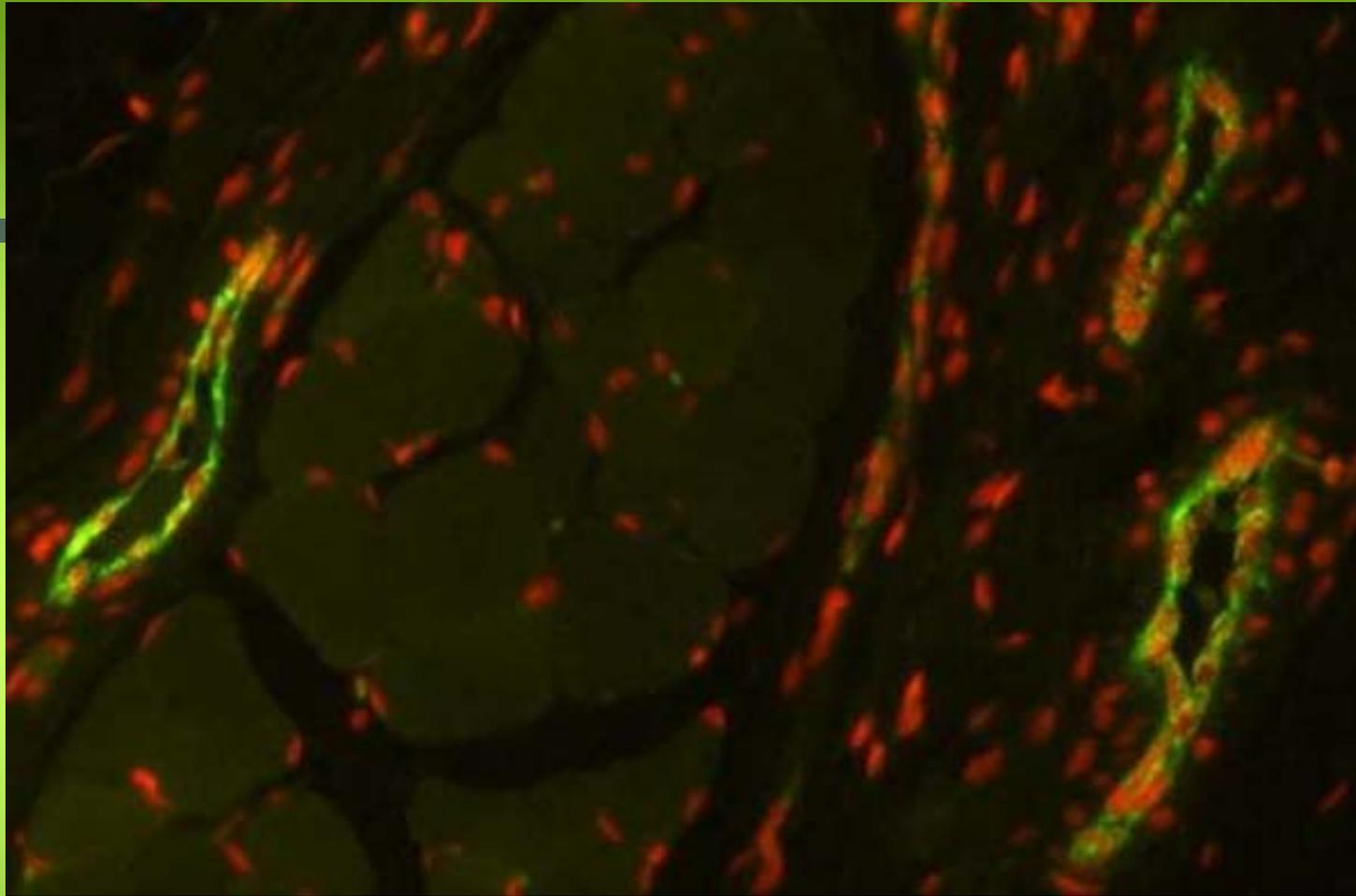
Anticorpo primario diluito con blocking medium overnight, in camera umida

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

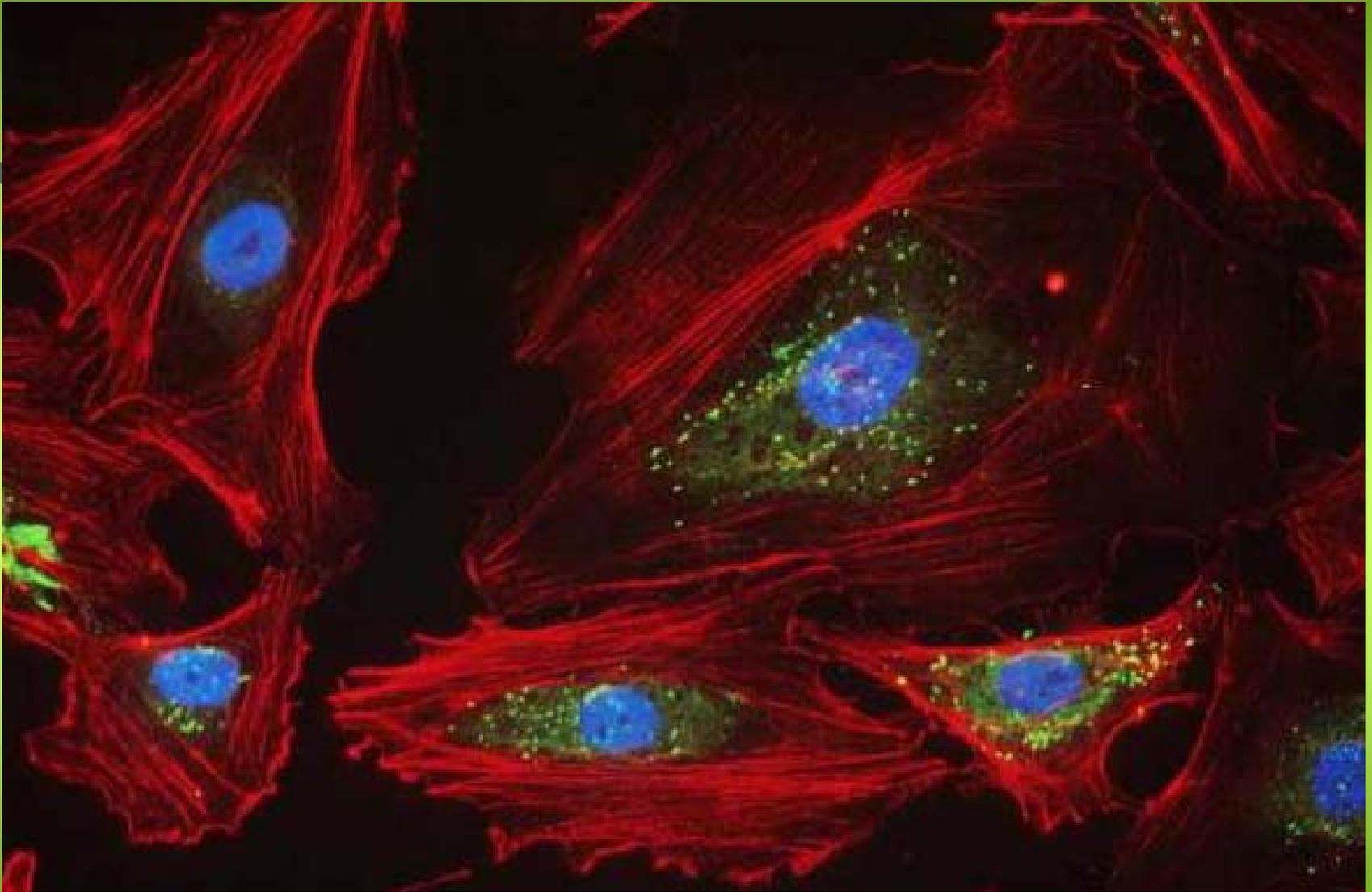
Colorazione del DNA con DAPI o Hoechst per 15
minuti

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)*



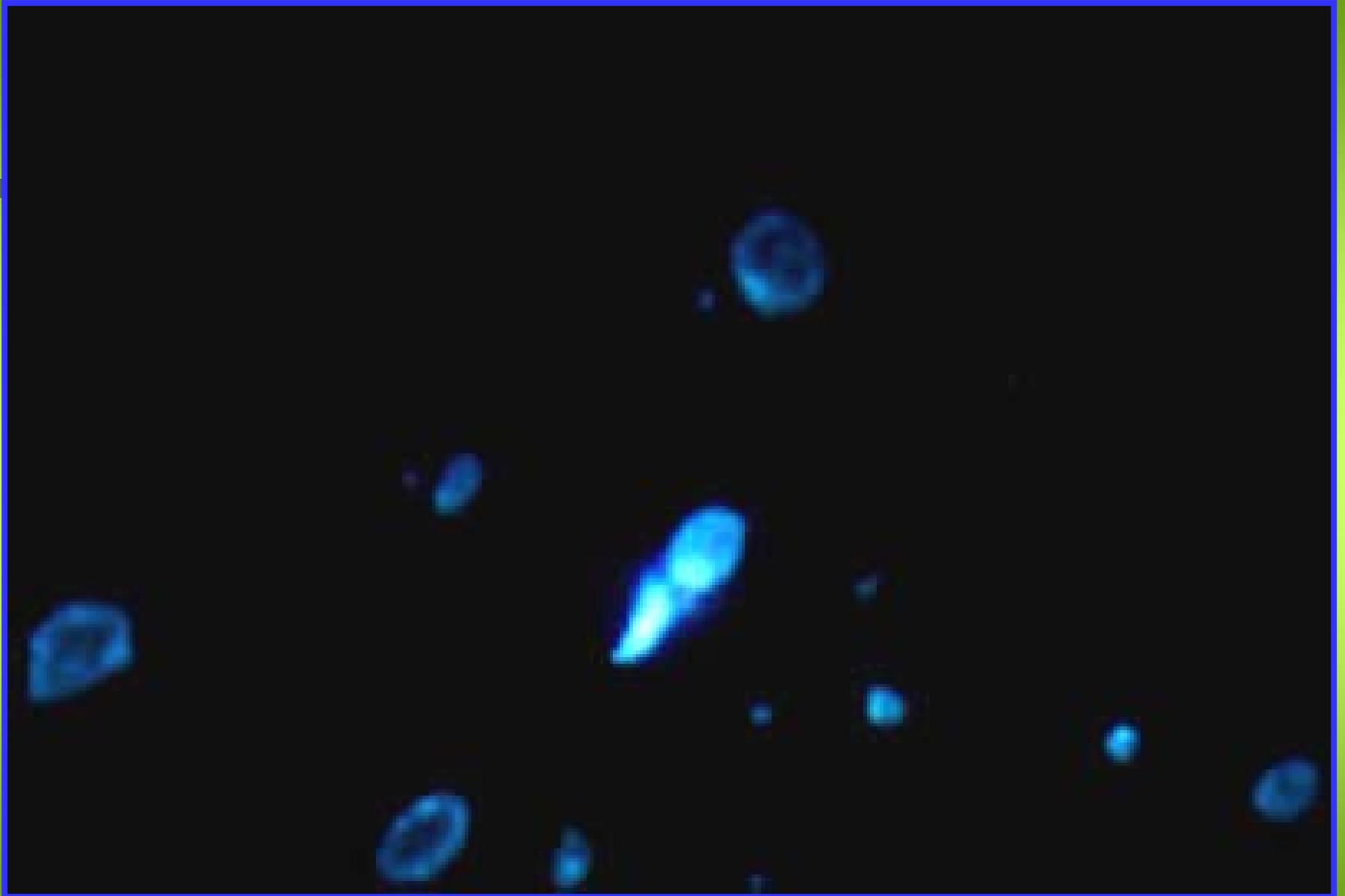
F-Actin microfilaments - red, von Willebrand factor in palade bodies - green, nuclei blue (DAPI).



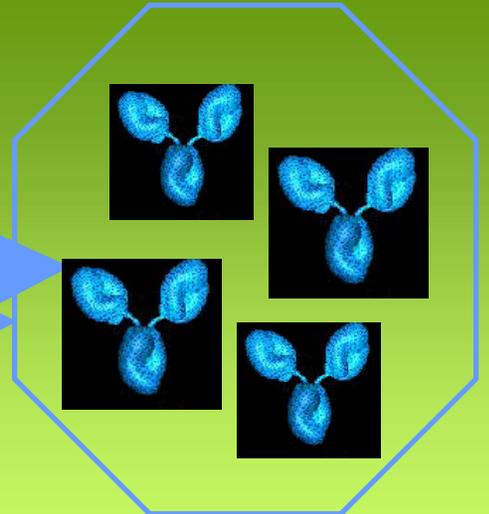
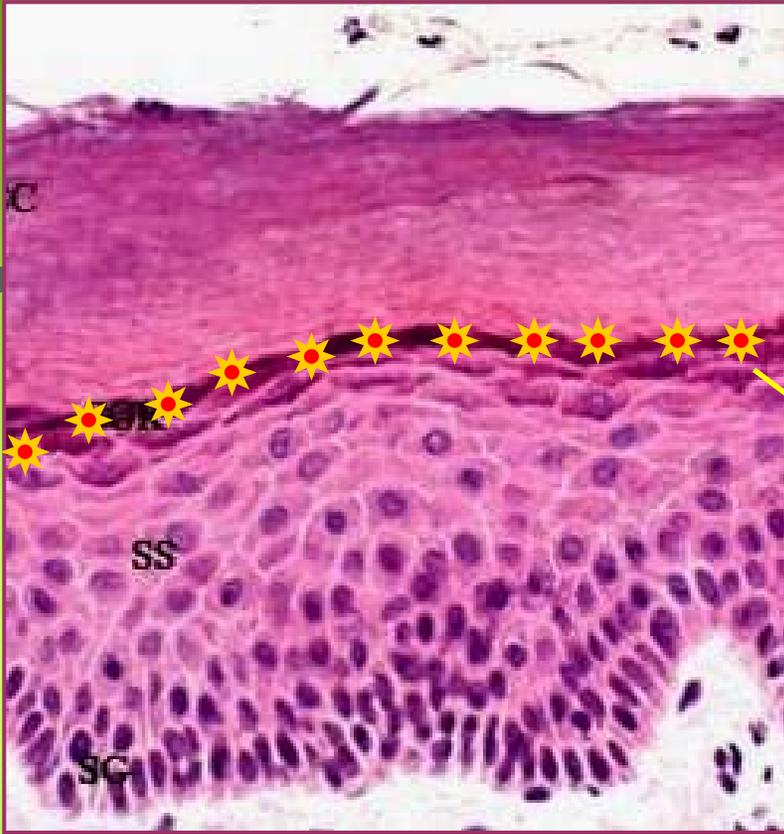
TROUBLESHOOTING

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

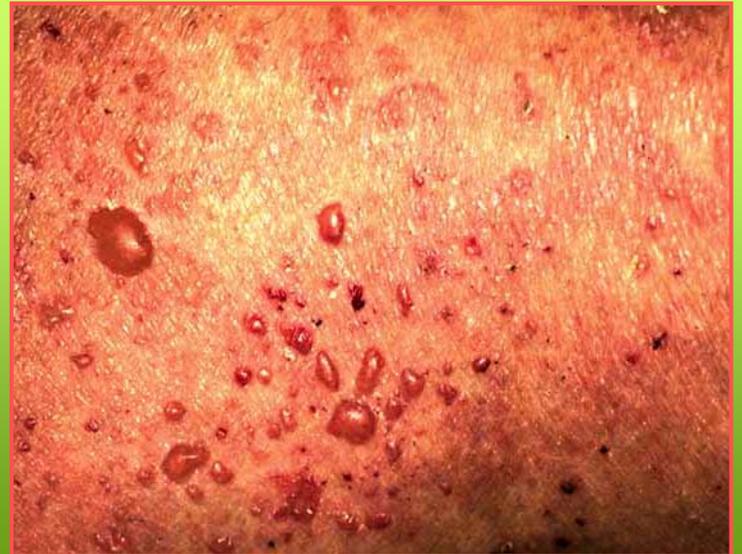
Applicazioni



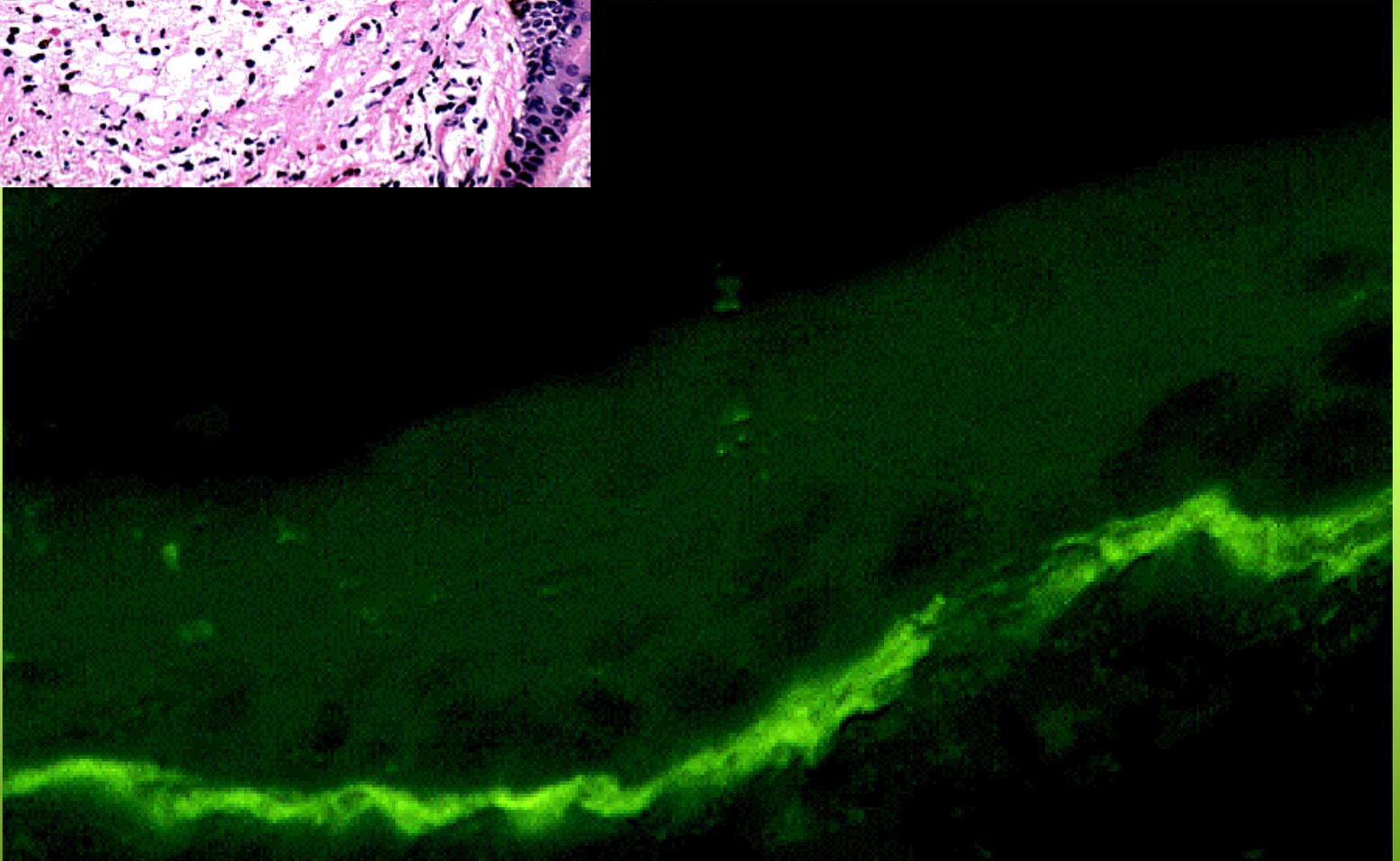
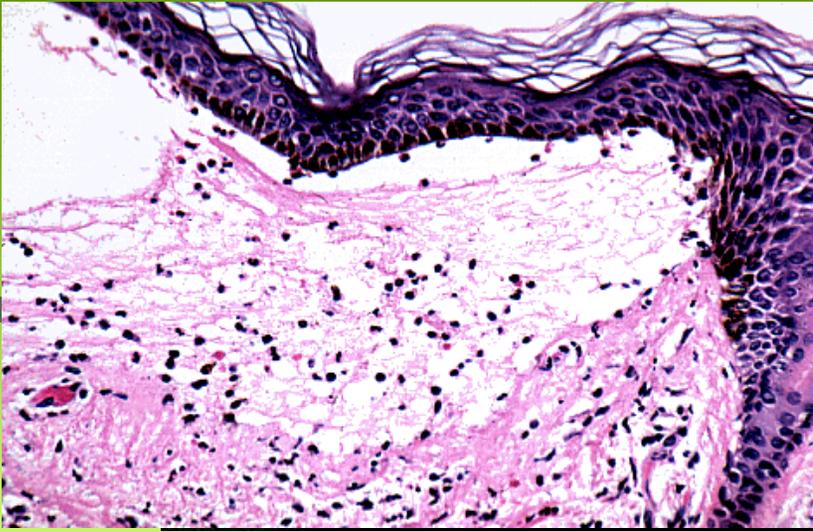
Virus della rabbia (tessuto cerebrale)



*IgG anti-D
(desmoplachine)*



Pemfigo

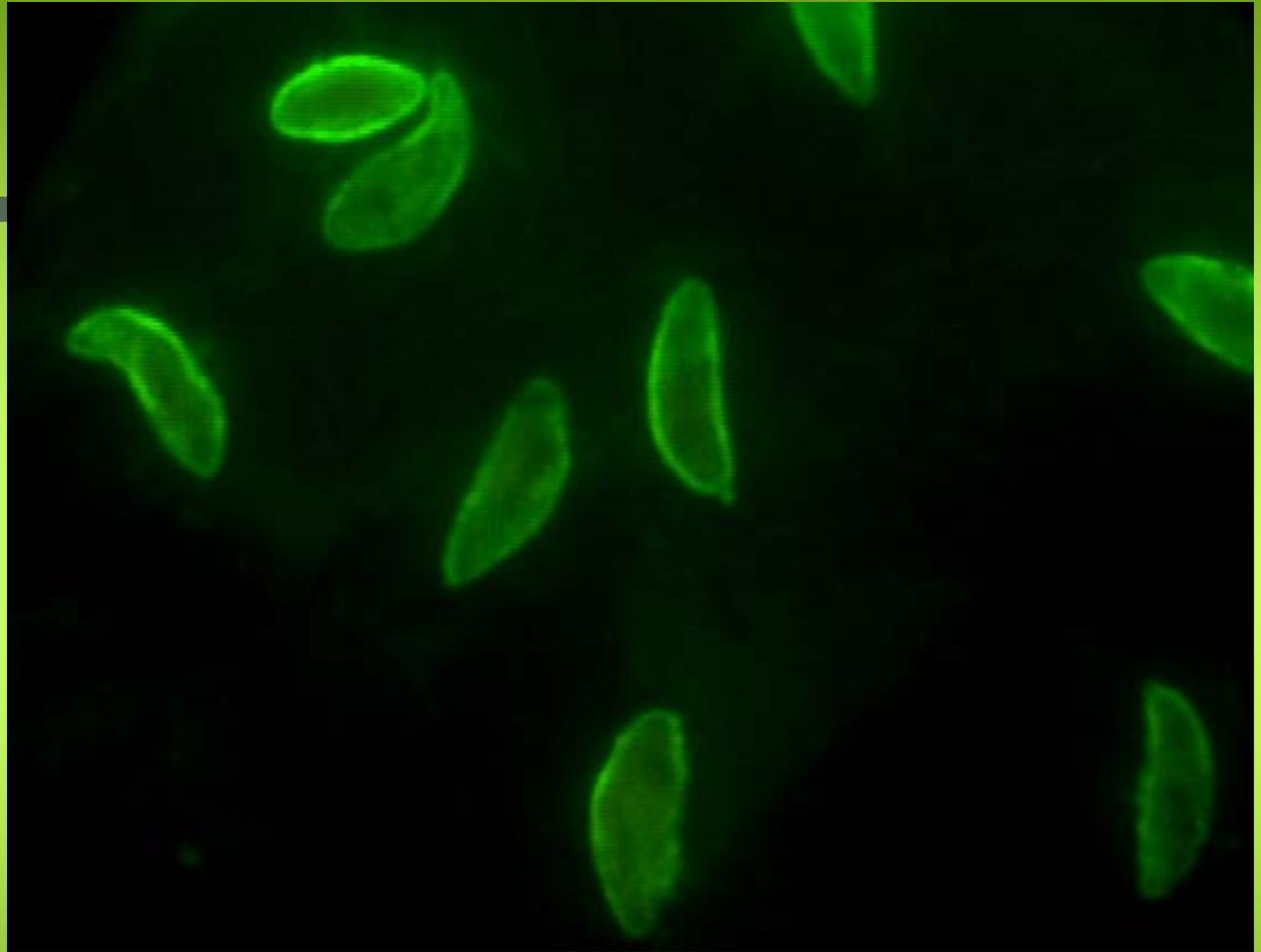


Toxoplasma
adsorbito su vetrino

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

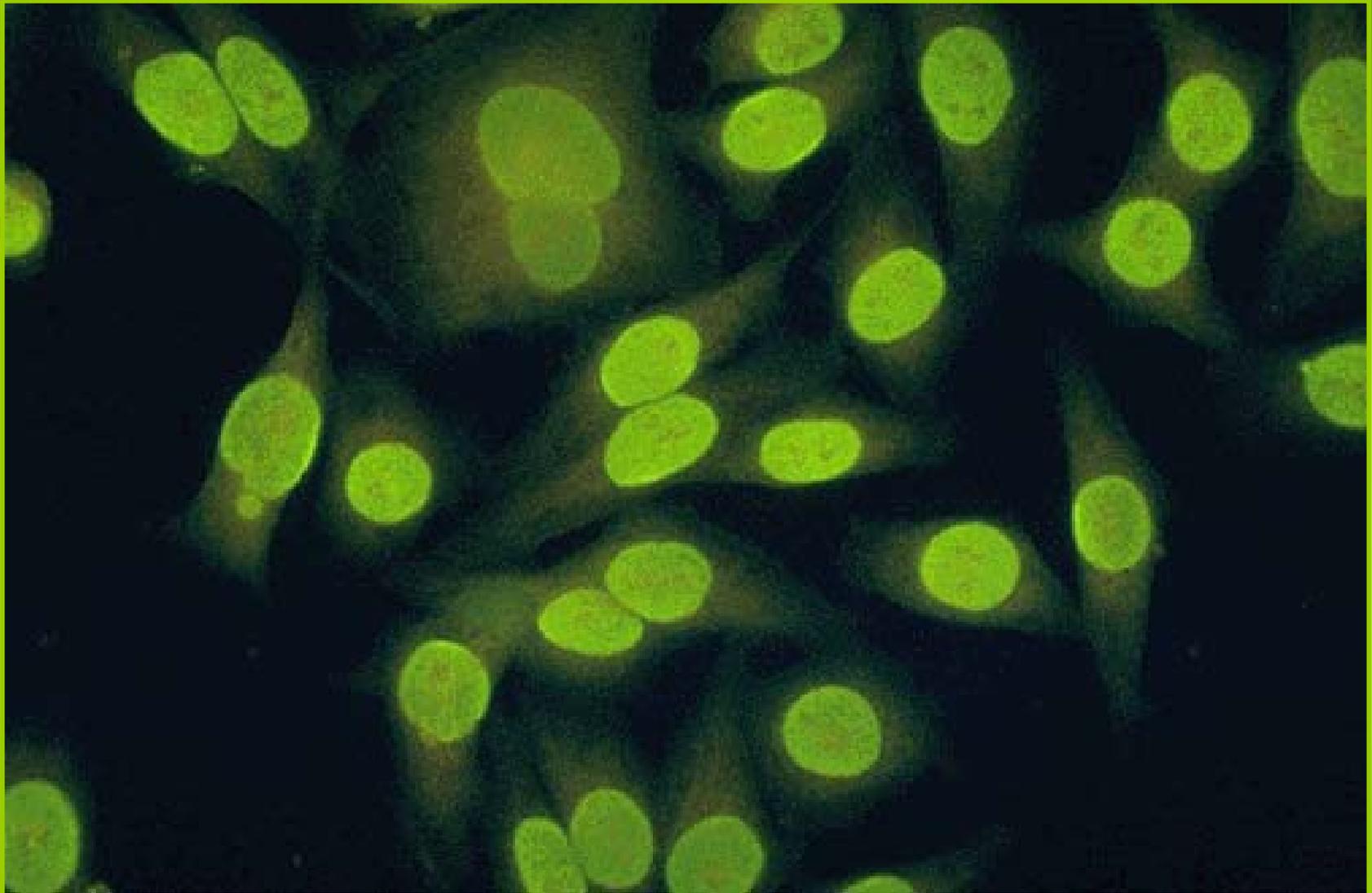
ANA test

Substrato cellulare:

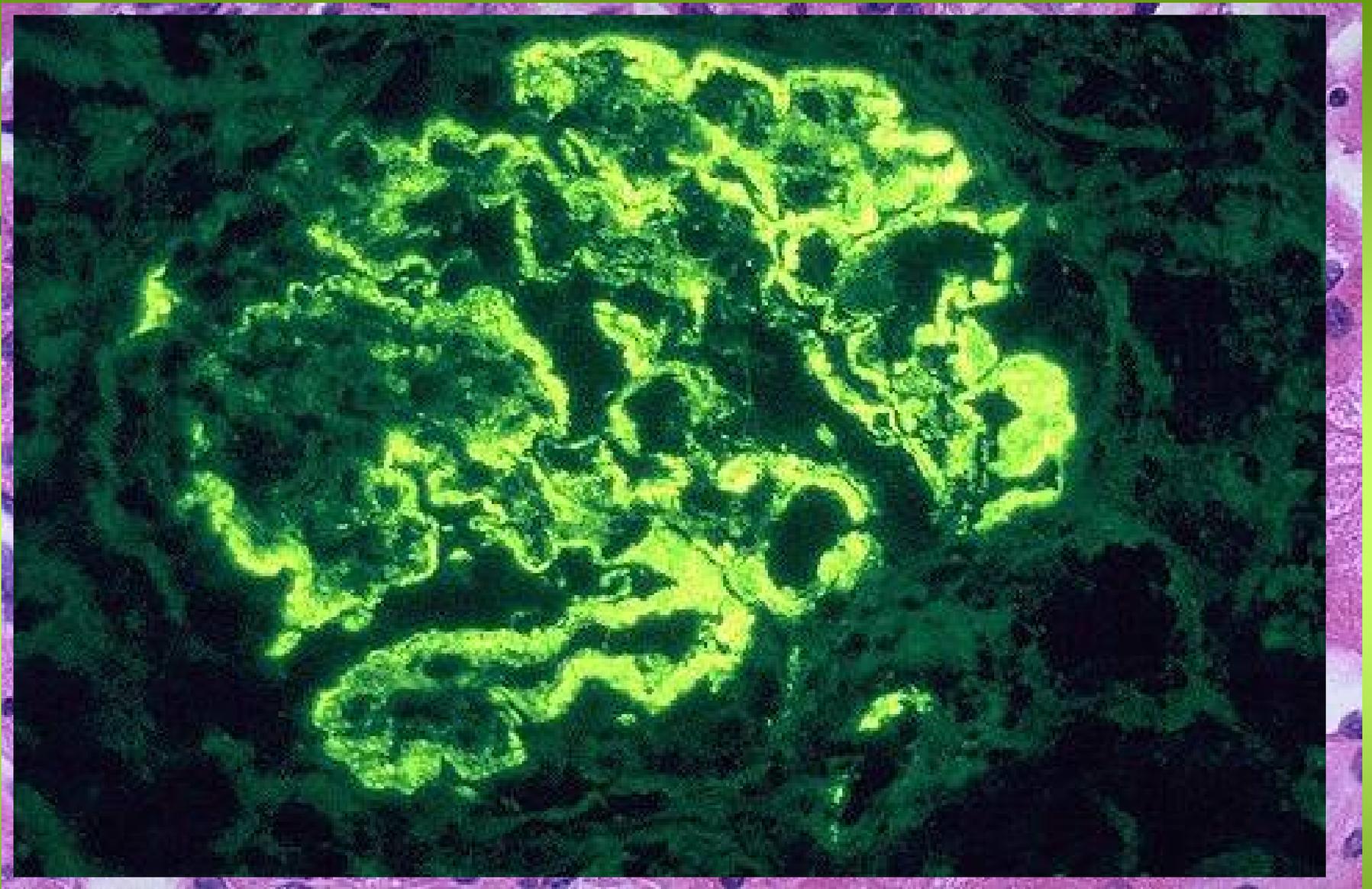
- sezioni sottili di fegato di topo o ratto
- monostrati cellulari tumorali (HeLA, KB)

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)