

FISSAZIONE

rapida uccisione del tessuto che conservi la morfologia

scopo:

impedire l'autolisi

impedire la putrefazione

conferire stabilità strutturale

consentire colorazioni

FISSAZIONE: modalità

FISICA: congelamento

- Immersione in azoto liquido del tessuto (-196°C)
- Taglio del pezzo congelato con il criostato (-20°C)

CHIMICA: immersione
perfusione
vapori

FISSATIVI PRIMARI: aldeidi
alcoli
acidi
sali

FISSATIVI COMPOSTI

Tipi di fissativi

COAGULANTI:

Alcool Etilico (Etanolo)
Cloruro di Mercurio
Triossido di Cromo
Acido Picrico
(2,4,6-Trinitrofenolo)

NON COAGULANTI:

Formaldeide
Tetrossido di Osmio
Acido Acetico

FISSAZIONE CHIMICA

Rende il preparato stabile nel tempo, prevenendo fenomeni di autolisi o di putrefazione

LAVAGGIO

Elimina il fissativo in eccesso

DISIDRATAZIONE

ALCOOL : 50° 2 - 4 ore
70° 4 ore
90° 4 - 12 ore (tutta la notte)
95° 3 ore
100° 1 ora
100° 1 ora

Infiltrazione e Inclusione in Paraffina :

- – Microscopia Ottica

Infiltrazione e Inclusione in Resine Epossidiche:

- – Microscopia Elettronica

INCLUSIONE SEMPLICE IN PARAFFINA

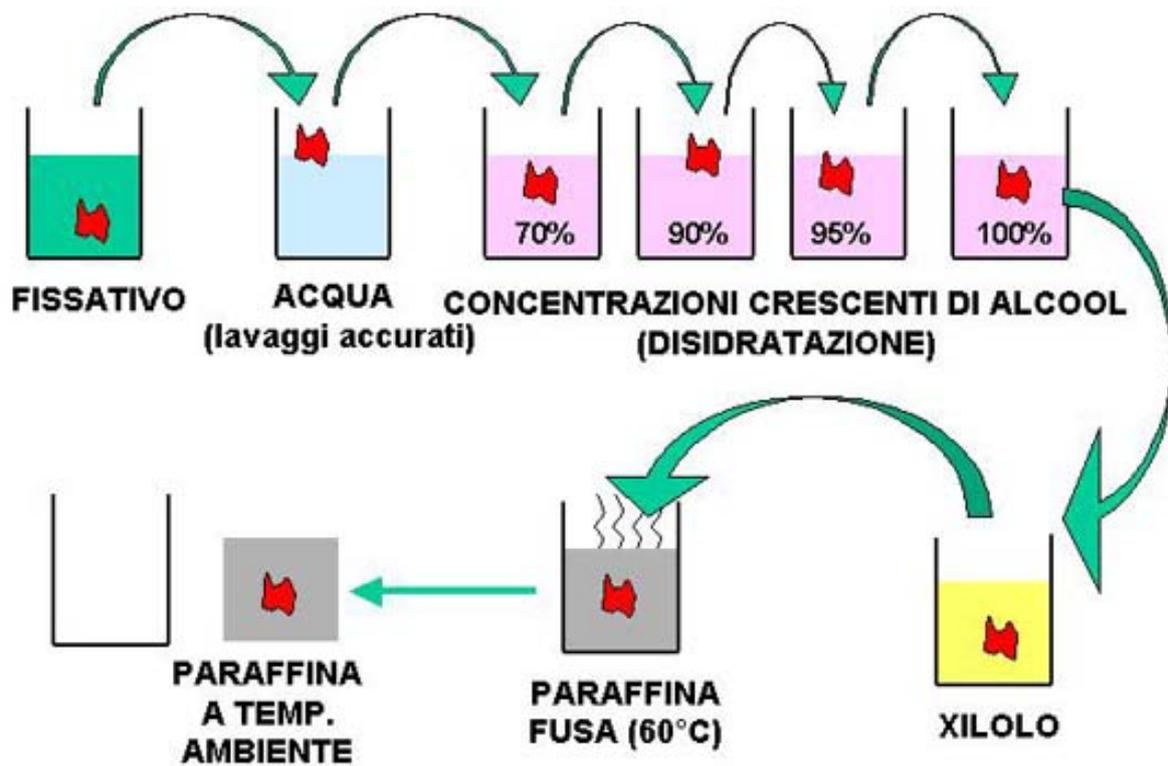
a) SOSTITUZIONE ALCOOL CON SOLVENTI PARAFFINE

XILENE

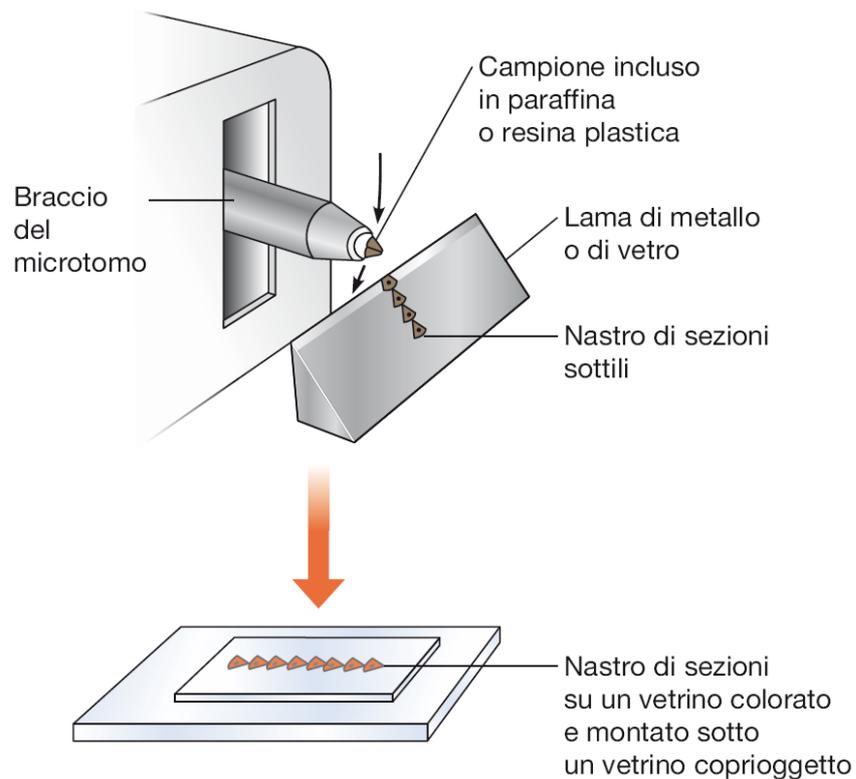
b) PARAFFINE

c) SOLIDI FICAZIONE IN FORMELLE

TAGLIO

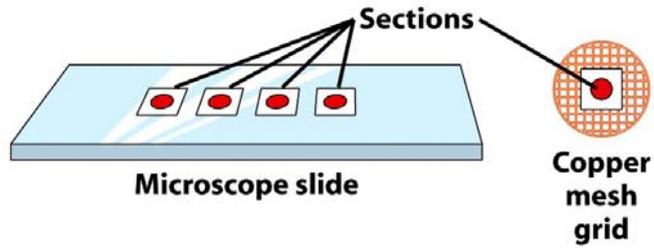
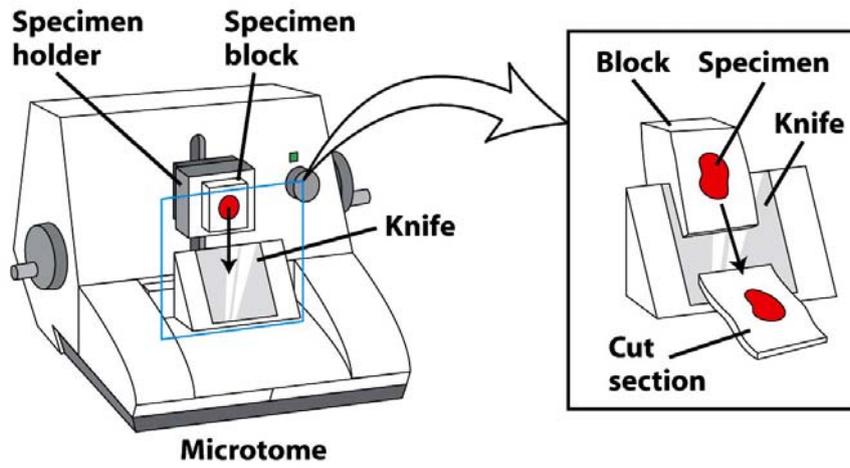


Taglio al microtomo



Microtomo

Ultramicrotomo



Criostato



SPARAFFINATURA

REIDRATAZIONE

COLORAZIONE

DISIDRATAZIONE

MONTAGGIO DEL PREPARATO

COLORAZIONI ISTOLOGICHE

Coloranti 
acidi
basici

(cromoforo + auxocromo)

Coloranti acidi (anionici): il gruppo auxocromo è acido (COOH)

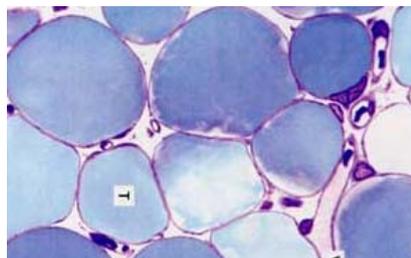
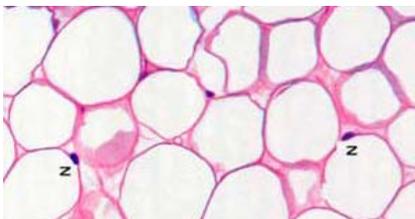
Coloranti basici (cationici): il gruppo auxocromo è basico (NH₂)

- **Strutture acidofile:** componenti del tessuto che hanno affinità per i coloranti acidi
- **Strutture basofile:** componenti del tessuto che hanno affinità per i coloranti basici

COLORAZIONI ISTOCHEMICHE (reazioni)

Metodi per i lipidi:

- Lisocromi (Sudan)

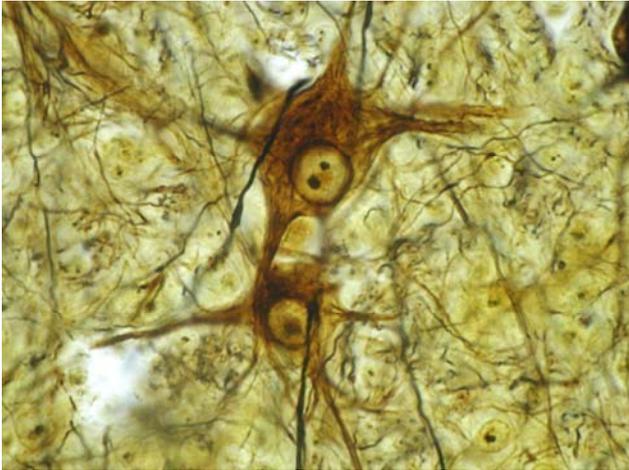


Metodi per i glicidi:

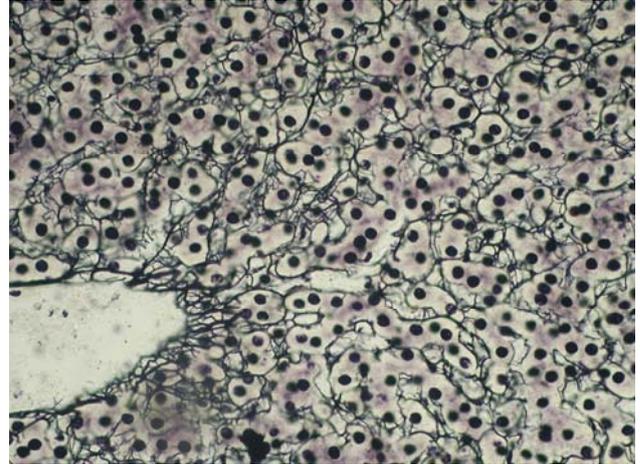
- reazione P.A.S.
- Metacromasia con blu di toluidina

Impregnazione argentica

Cellule nervose



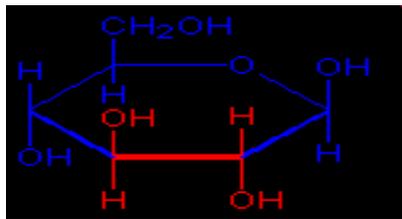
Fibre reticolari



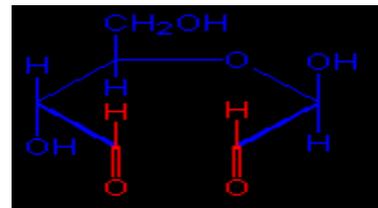
Metodo di von Kossa



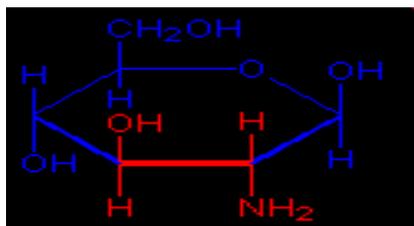
Riduzione ad Ag metallico



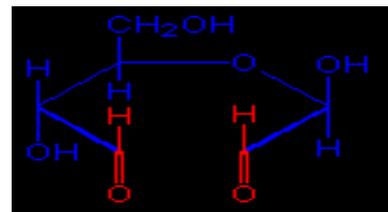
1-2-glycol



Aldehyde

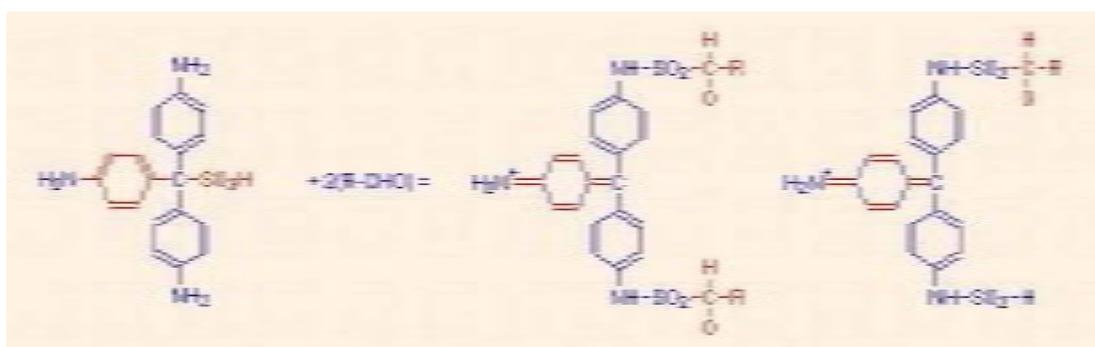
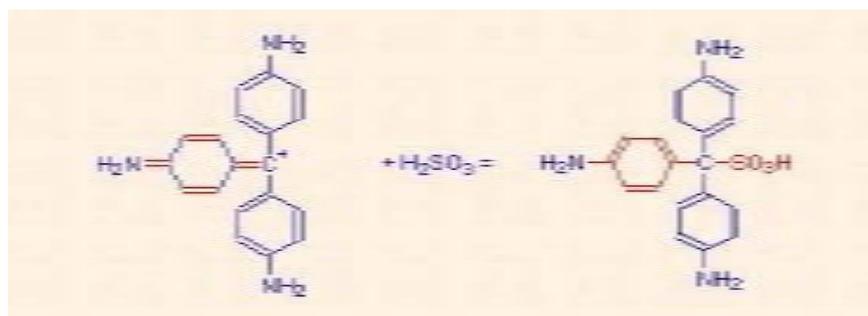


1-amino-2-hydroxy



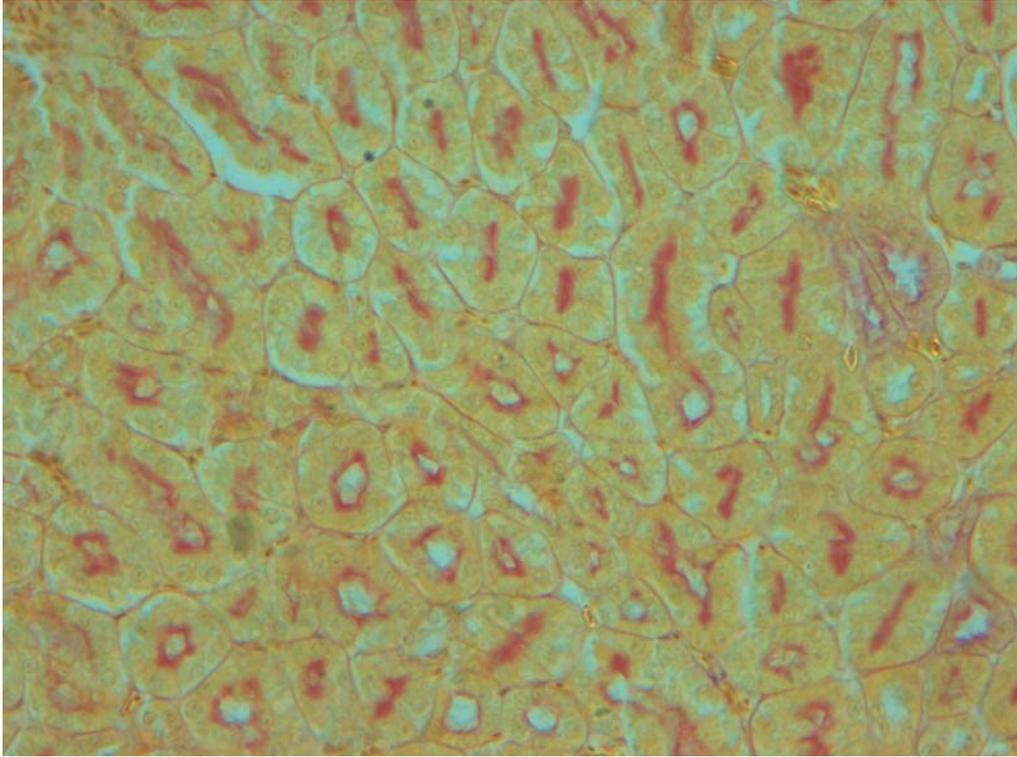
Aldehyde

Pararosanilina (fucsia) + acido solforoso= reattivo di Schiff (incolore)

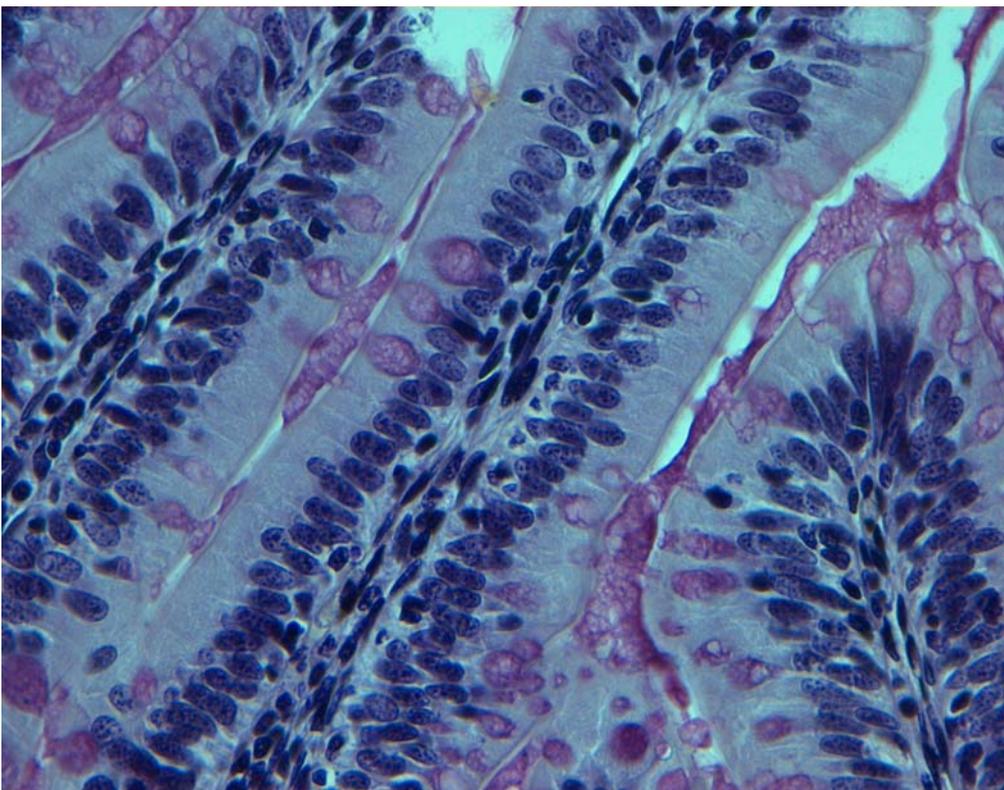


Se lo Schiff si lega a uno o due gruppi aldeidici (per esempio zuccheri ossidati dall'acido periodico) riacquista il colore

Orletto + membrana basale
PAS +



Cellule mucipare PAS+



Metacromasia

È la proprietà che hanno alcuni composti chimici di assumere con certi coloranti basici del gruppo della tiazina (es. blu di toluidina, tionina, azzurro A) una colorazione diversa dalla tinta del colorante in soluzione.

Si ha con sostanze di alto peso molecolare che presentano molti gruppi anionici liberi quali glicosaminoglicani acidi.

Metacromasia

colore blu (ortocromatico) allo stato monomeric

+

Legame a substrati

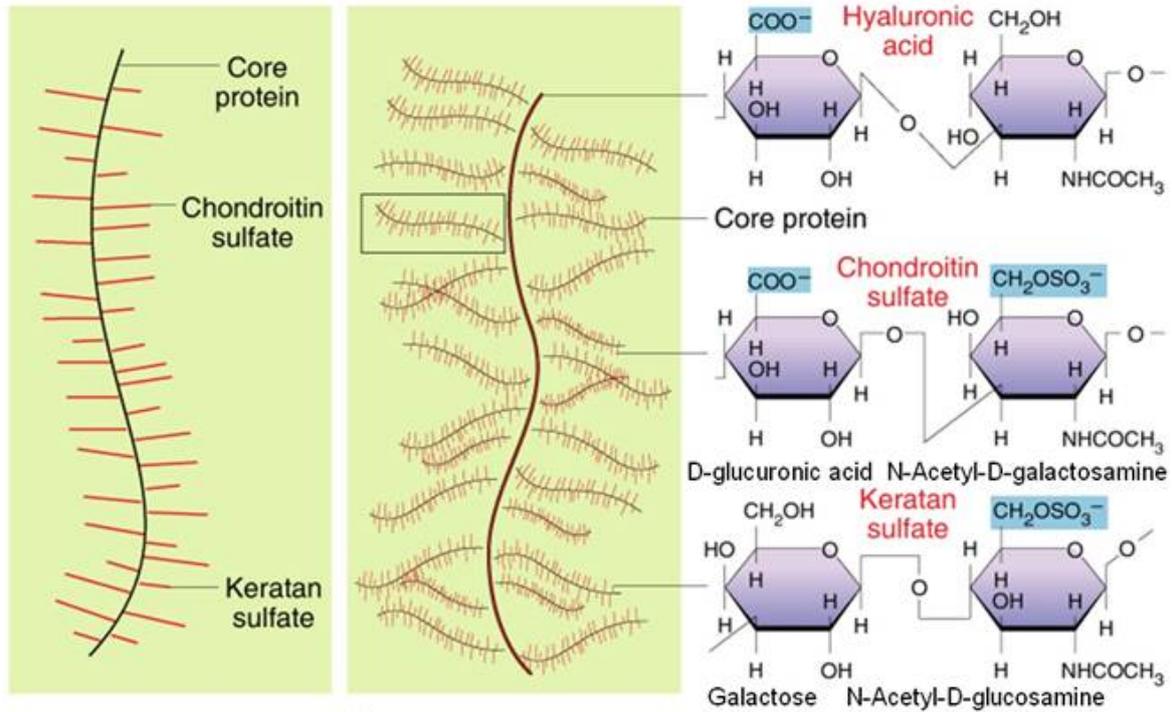


Polimeri che assorbono la luce ad una λ
più bassa

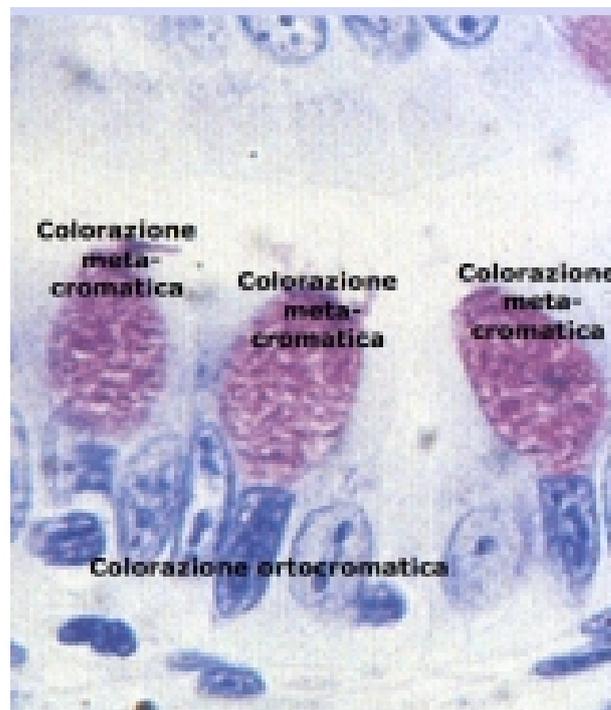


Colorazione rossa (metacromasia)

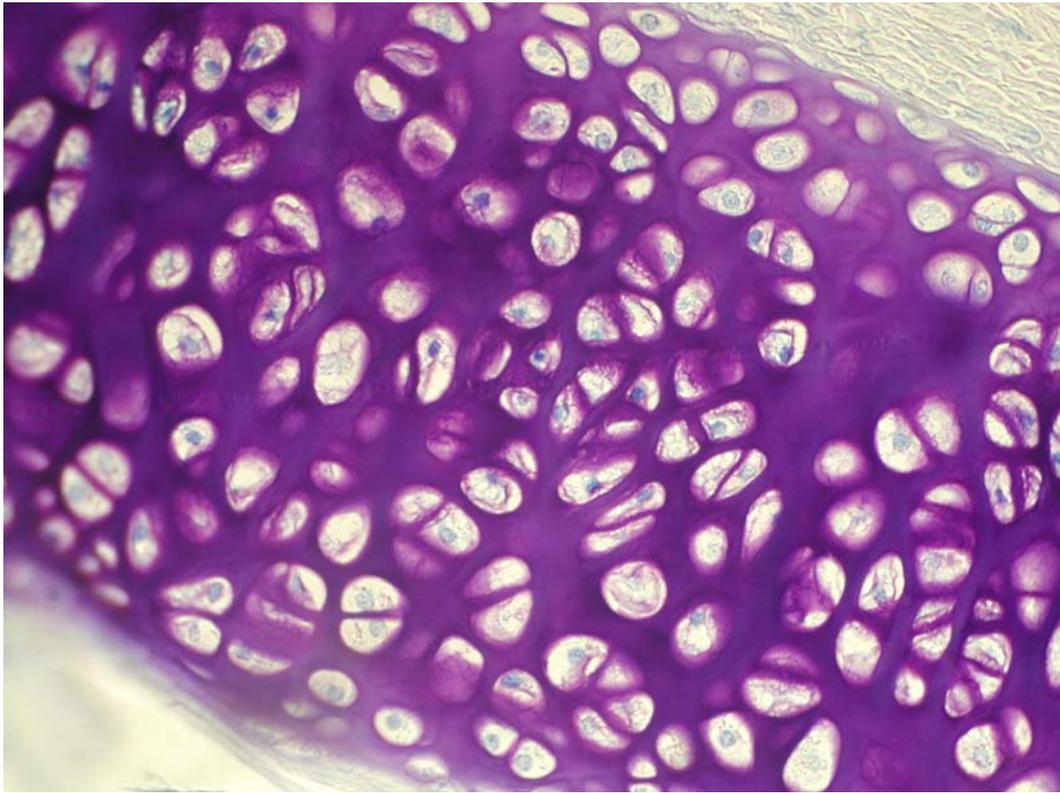
Glucosaminoglicani acidi



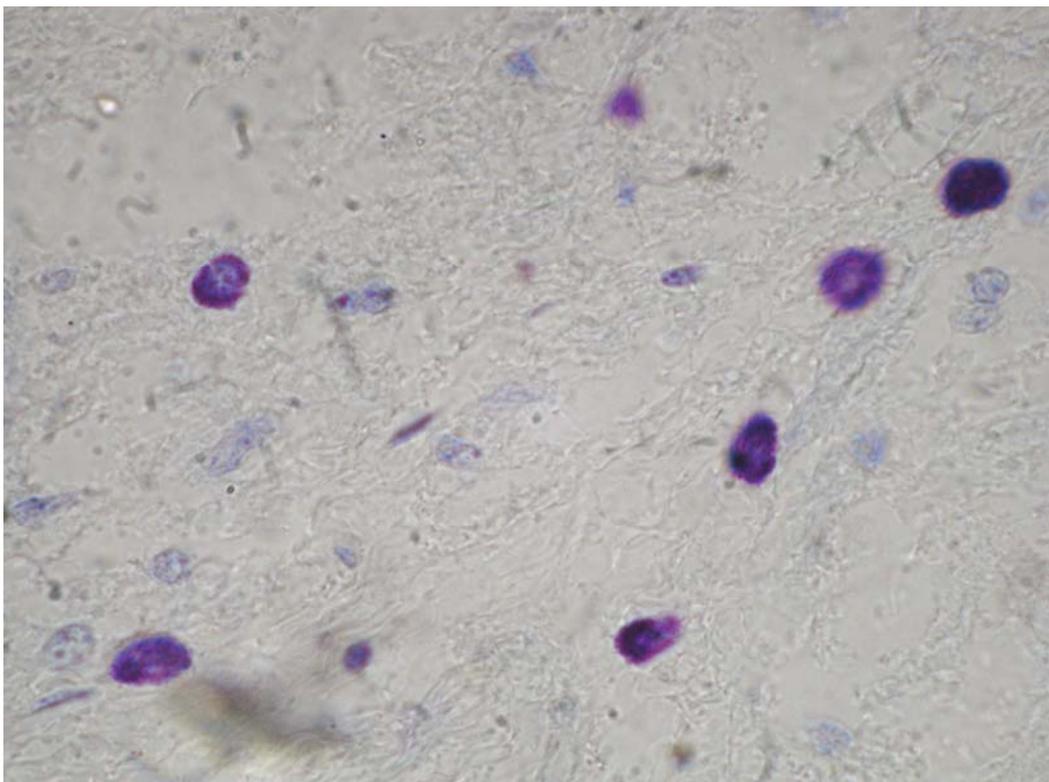
Metacromasia



Metacromasia



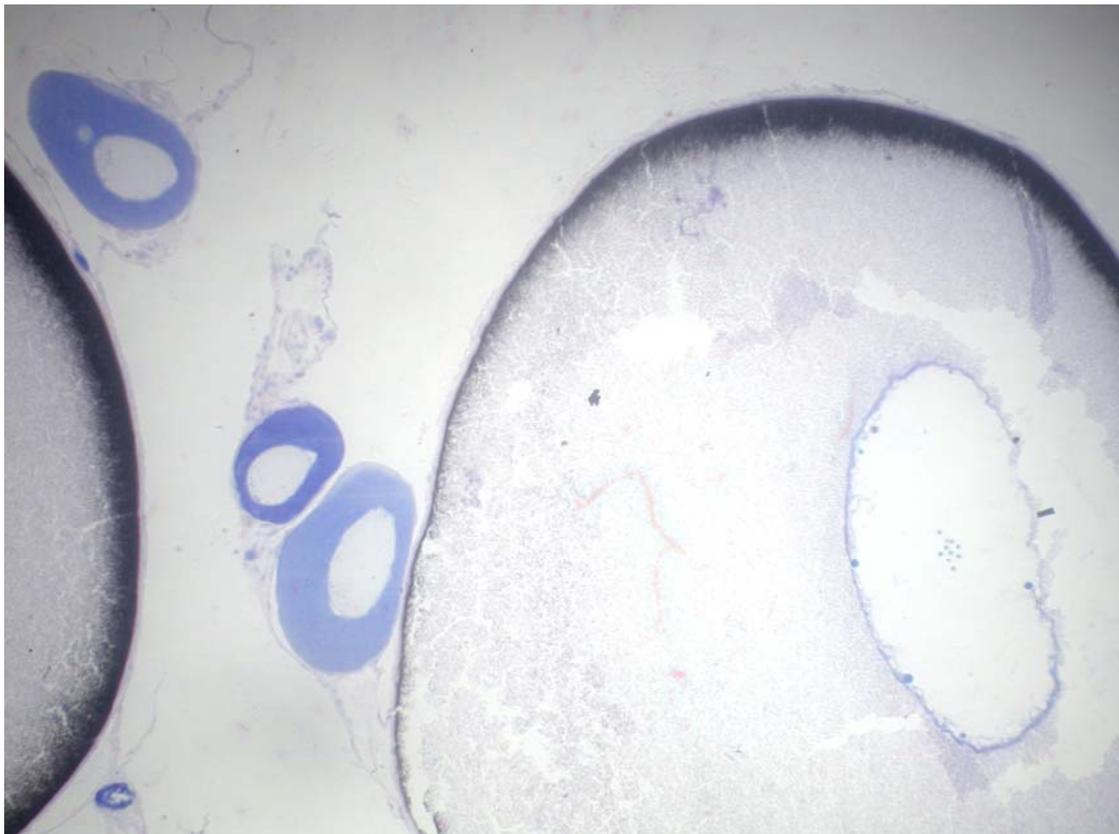
Metacromasia



Metodi per gli acidi nucleici

- **Basofilia**
- **Verde di metile e pironina (test di Brachet)**
- **Reazione Feulgen**

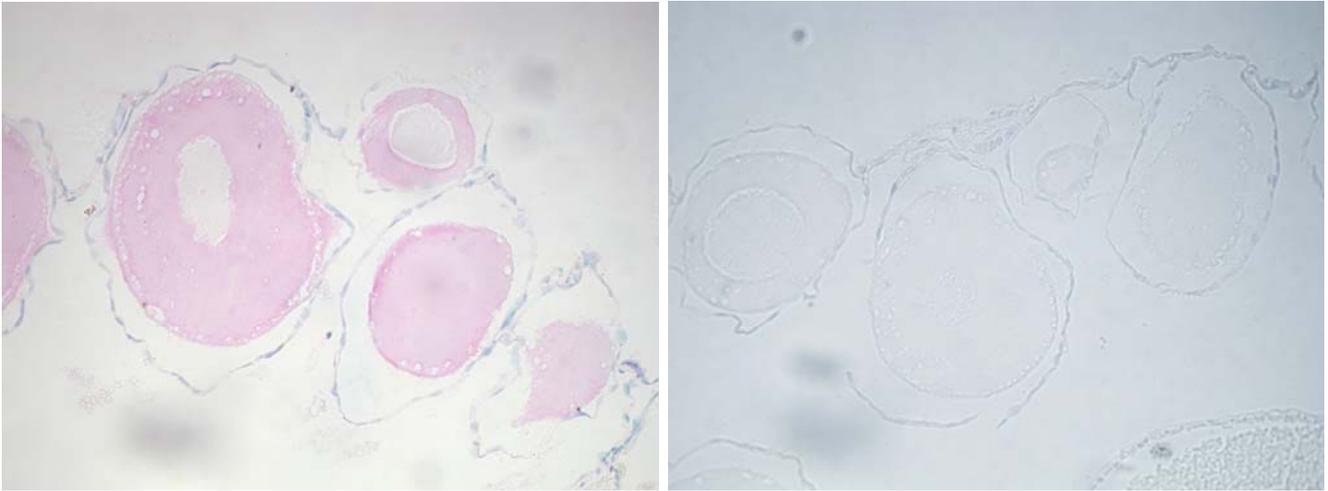
Basofilia



Verde di metile e pironina

Test di Brachet

Colorazione dopo trattamento
con RNAasi



Reazione Feulgen

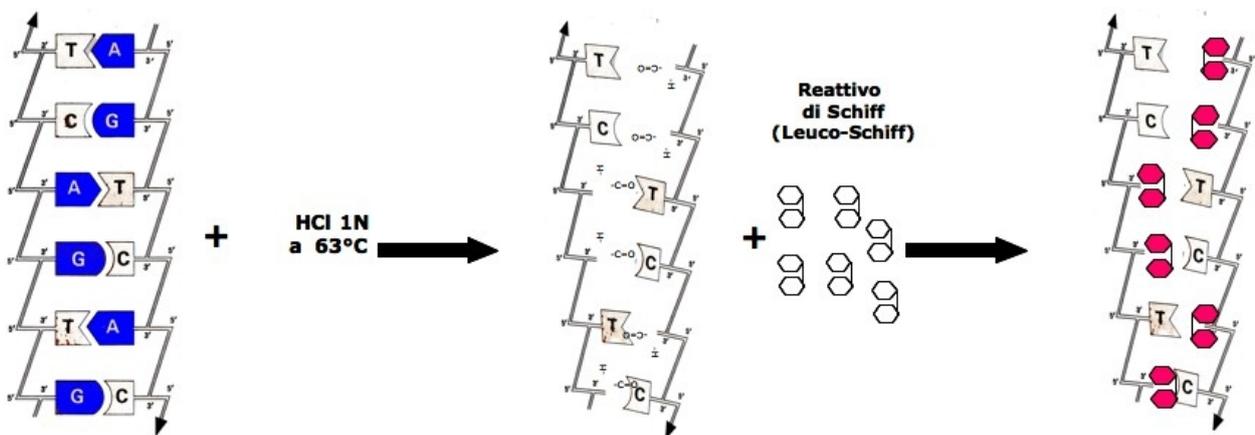




FIGURA 18.5 La colorazione di Feulgen. Questo metodo di colorazione è altamente specifico per il DNA, come dimostrato dalla localizzazione del colorante sui cromosomi di questa cellula di apice radicale di cipolla che era in metafase mitotica al momento della fissazione. (DA ED RESCHKE/PETER ARNOLD, INC.)

Metodi per le proteine:

- **Metodi per gli enzimi**

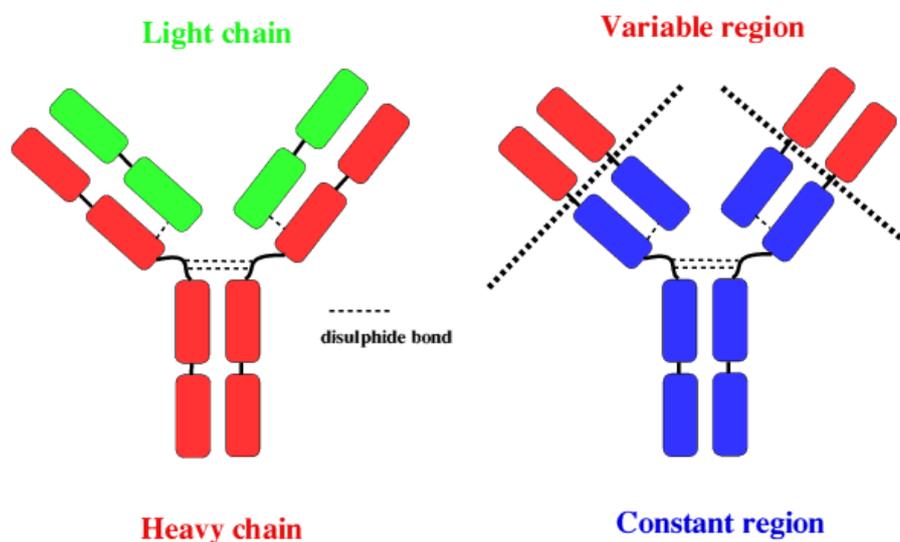
localizzazione del prodotto della reazione catalizzata dall'enzima

- **Metodi immunocitochimici**

localizzazione di antigeni con l'uso di anticorpi specifici

Anticorpi

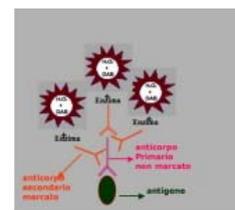
Basic structure of an Antibody



Reazione immunoistochimica diretta:

l'anticorpo marcato è quello primario.

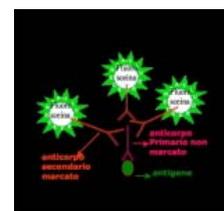
Questo approccio non è praticamente mai usato



Reazione immunoistochimica indiretta:

Si rivela l'interazione anticorpo primario (non marcato)- antigene d'interesse, attraverso l'uso di un anticorpo secondario prodotto in una diversa specie rispetto all'anticorpo primario e diretto contro la parte costante dell'anticorpo primario. In questo caso è **l'anticorpo secondario ad essere marcato.**

Questo approccio è quello scelto nel 90% dei casi.

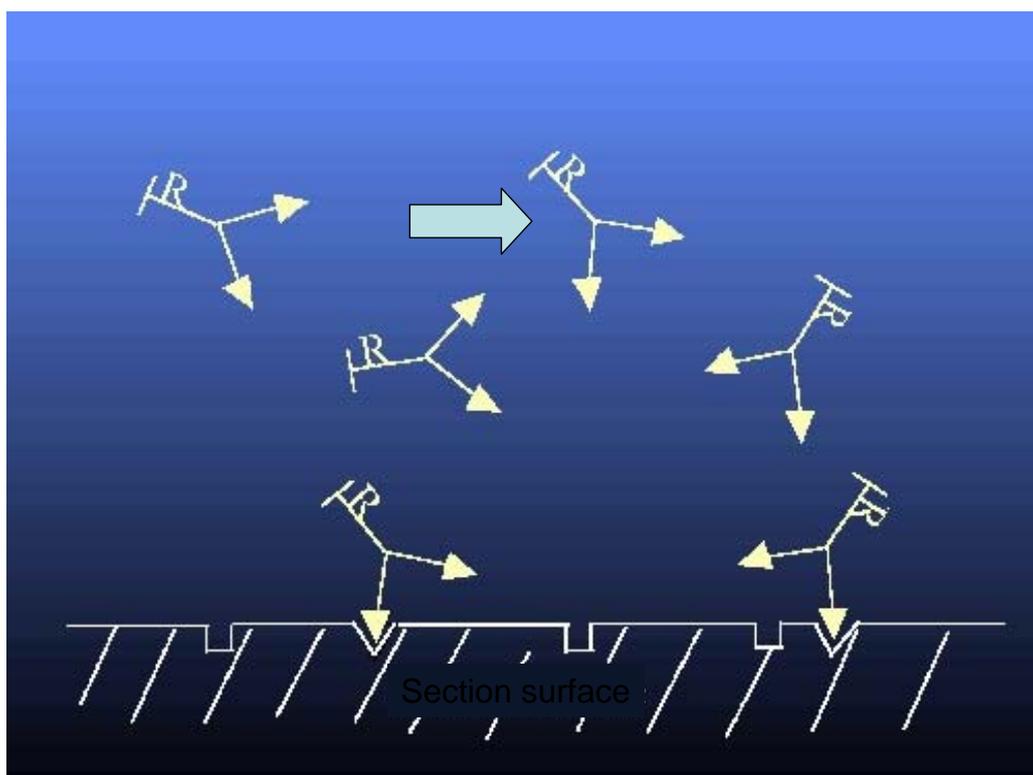


Marker per anticorpi

- **Fluorocromi**
- **Enzimi (perossidasi)**
- **Oro colloidale**

Immunofluorescenza

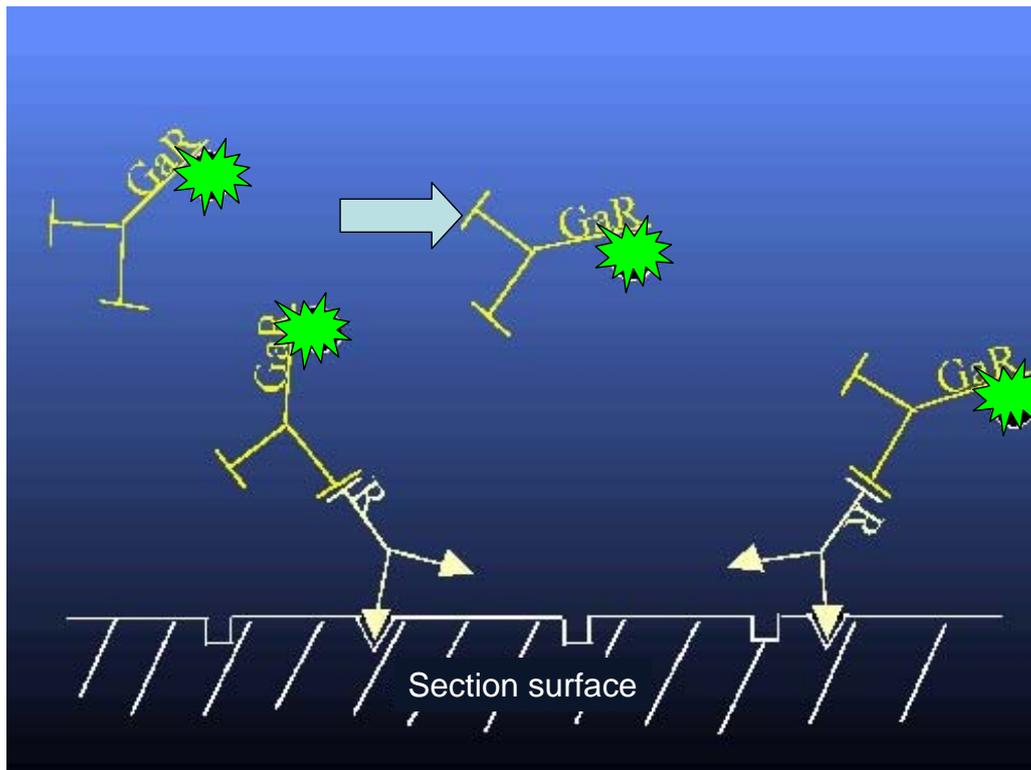
- ① Incubazione con l'anticorpo primario



Anticorpo secondario (GaRa un fluorocromo:) coniugato a un fluorocromo

2

 Fluorescein isothiocyanate (FITC)



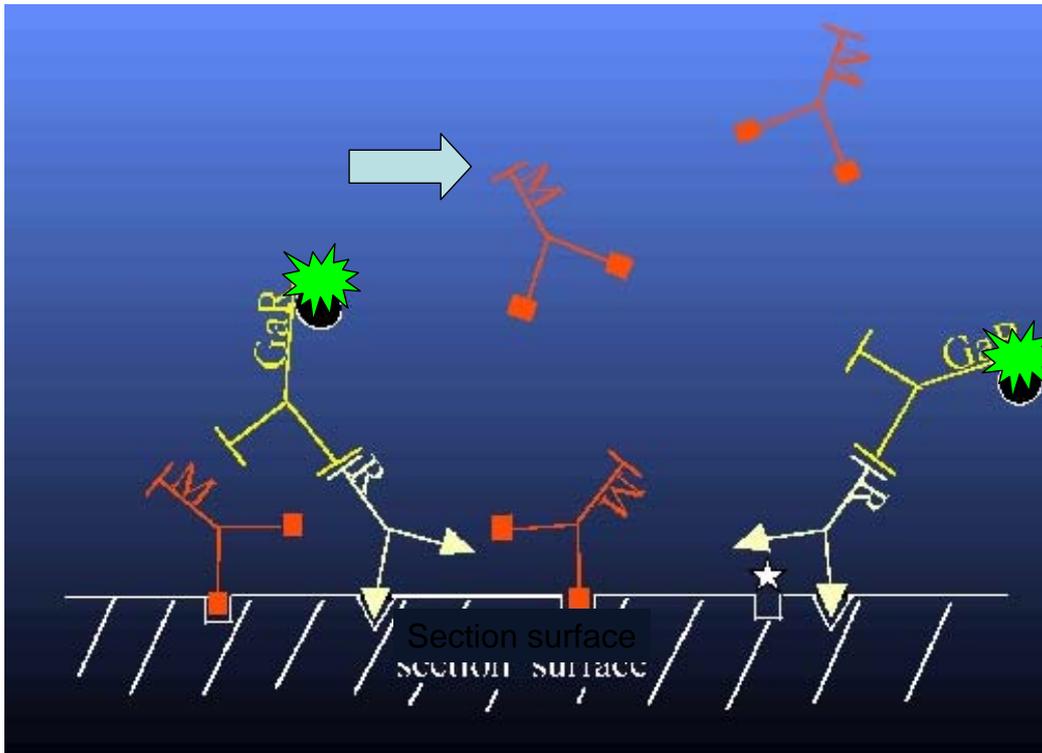
“Doppia” immunofluorescenza

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

Le doppie marcature sfruttano la possibilità di utilizzare due anticorpi primari specifici per due antigeni diversi prodotti in specie diverse.

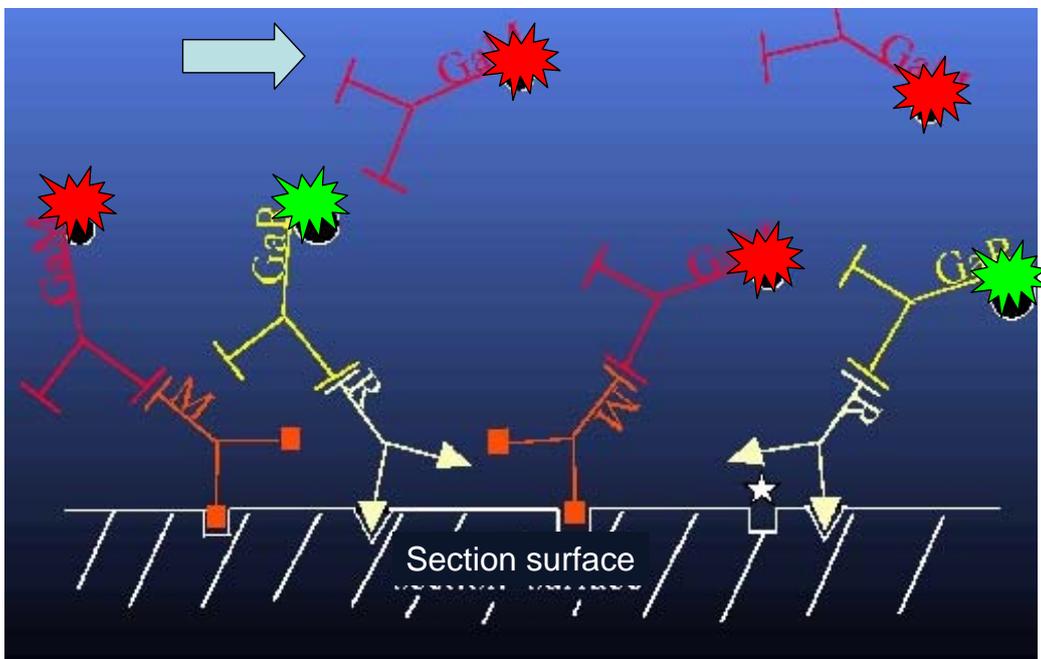
Doppia immunofluorescenza

- 3) Dopo la prima reazione di immunofluorescenza la sezione è incubata con il secondo anticorpo primario. Nell'esempio il secondo anticorpo primario è stato prodotto in topo (M= mouse).

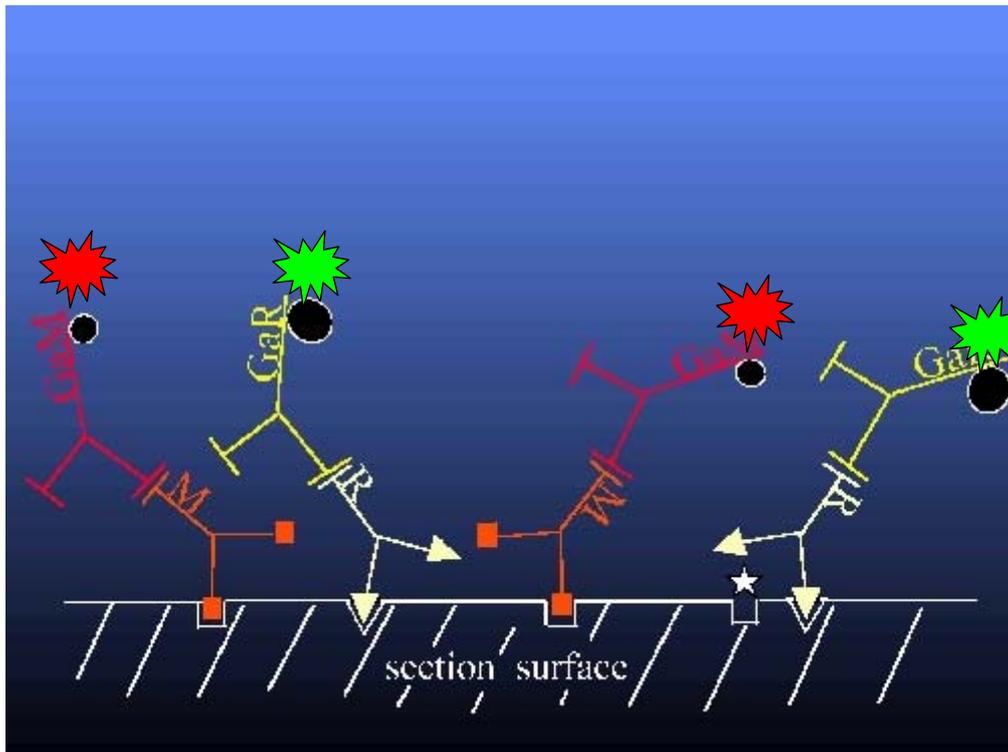


Doppia immunofluorescenza

- 4) Segue l'incubazione con il 2° anticorpo secondario prodotto anche lui in capra ma diretto contro le immunoglobuline di topo (GaM) e coniugato ad un fluorocromo rosso.  isothiocyanate (TRITC)

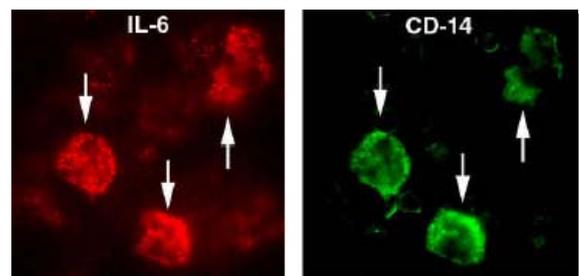


5 Risultato finale osservato al microscopio a fluorescenza tradizionale oppure confocale



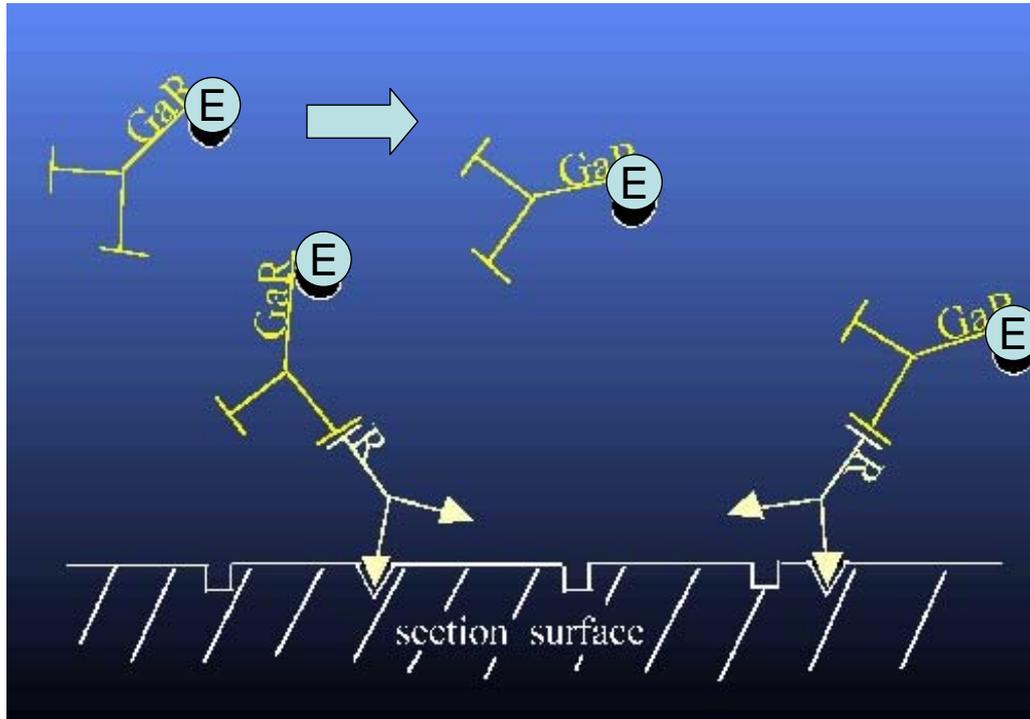
Esempio di risultato di doppia immunofluorescenza. Lo stesso preparato è osservato ad una certa lunghezza d'onda per osservare la fluorescenza rossa e poi ad un'altra lunghezza d'onda per osservare la fluorescenza verde. Le due immagini sono dello stesso campo in due condizioni diverse di illuminazione.

Cellule mononucleate del sangue periferico di uomo sono state 1) incubate con un anticorpo primario anti-IL-6 prodotto in topo e rivelato con un anticorpo secondario coniugato al TRITC (rosso) e 2) con un anticorpo primario anti-CD14 prodotto in coniglio e rivelato con un anticorpo secondario coniugato alla FITC (verde).



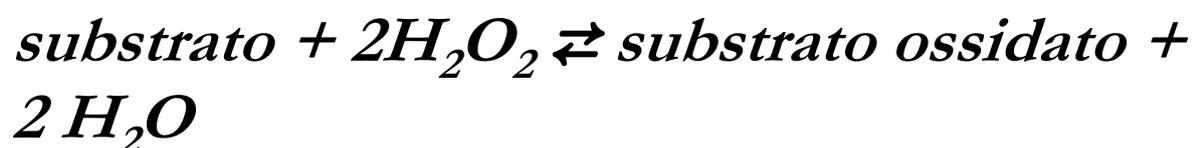
Anticorpo coniugato ad un enzima:

La sezione è incubata con un anticorpo secondario prodotto in capra (goat) diretto contro la parte costante delle immunoglobuline di coniglio (goat-anti rabbit= GaR) e coniugato con un enzima (E)



HRP è la perossidasi del rafano (horse radish)

La perossidasi è un enzima appartenente alla classe delle ossidoreduttasi in grado di catalizzare la seguente reazione:



Cromogeni per la perossidasi

3,3-diaminobenzidina tetraidrocloruro (DAB)

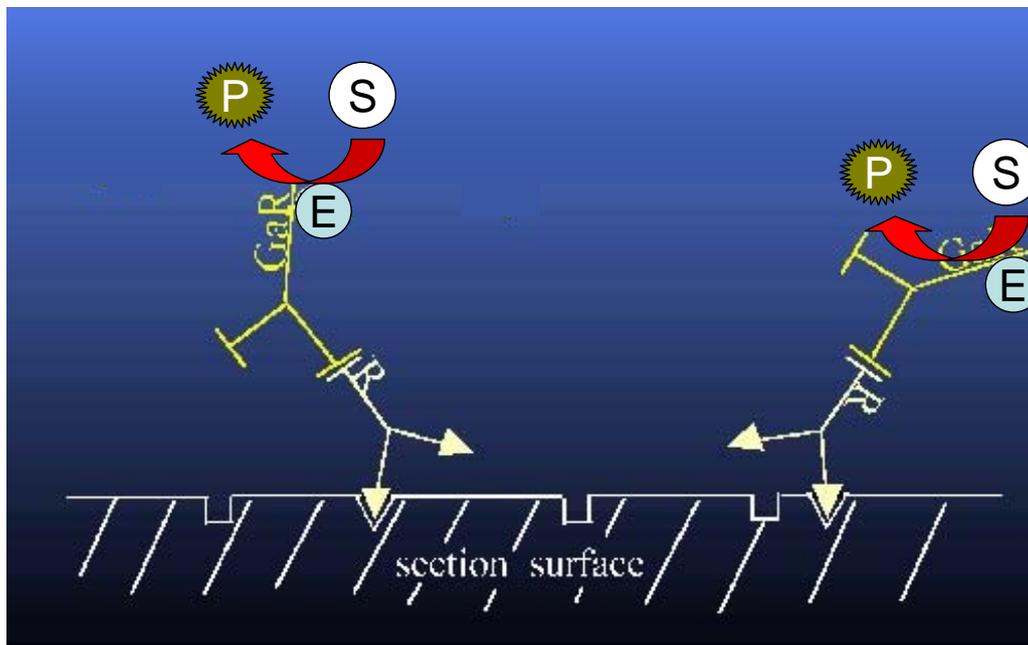
La 3,3-diaminobenzidina (DAB) è il substrato di scelta per la immunoperossidasi. Produce una intensa colorazione marrone resistente all'alcol. I vetrini colorati con DAB possono essere disidratati, montati in mezzi di montaggio con i metodi convenzionali e conservati a lungo, perché la reazione produce un precipitato di colore marrone, non solubile in acqua o alcol. La DAB inoltre è elettroindensa e ciò la rende utile anche per studi di immunoperossidasi ultrastrutturali.

Sezione incubata in presenza del substrato dell'enzima

ⓔ = enzima (perossidasi)

Ⓢ = substrato (DAB)

Ⓟ = prodotto della
reazione
enzimatica

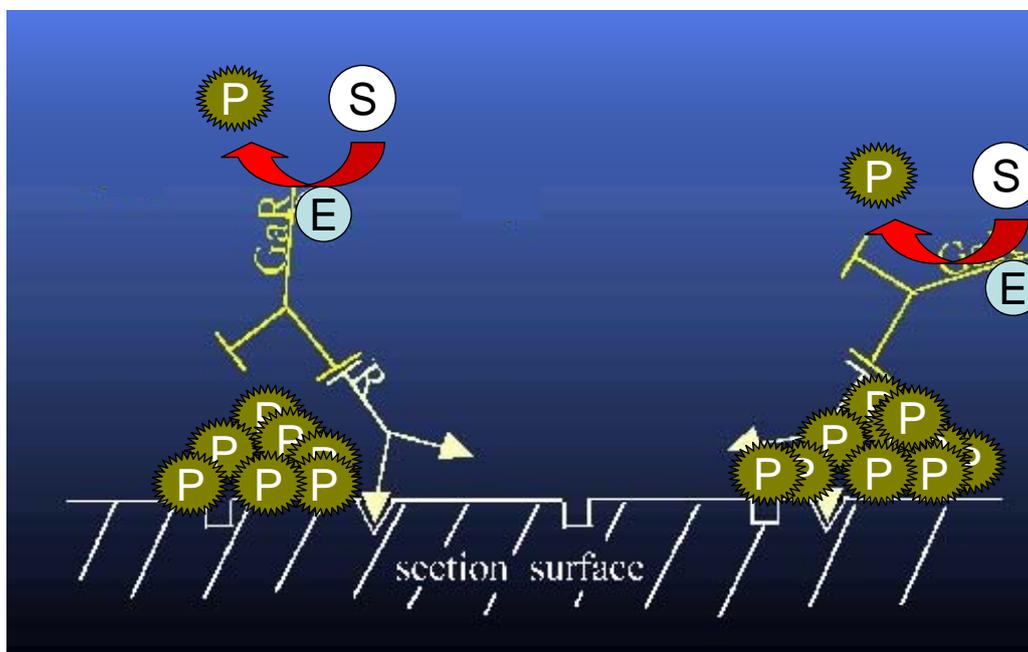


Il prodotto della reazione enzimatica precipita in corrispondenza dei siti di interazione antigene-anticorpo

ⓔ = enzima (perossidasi)

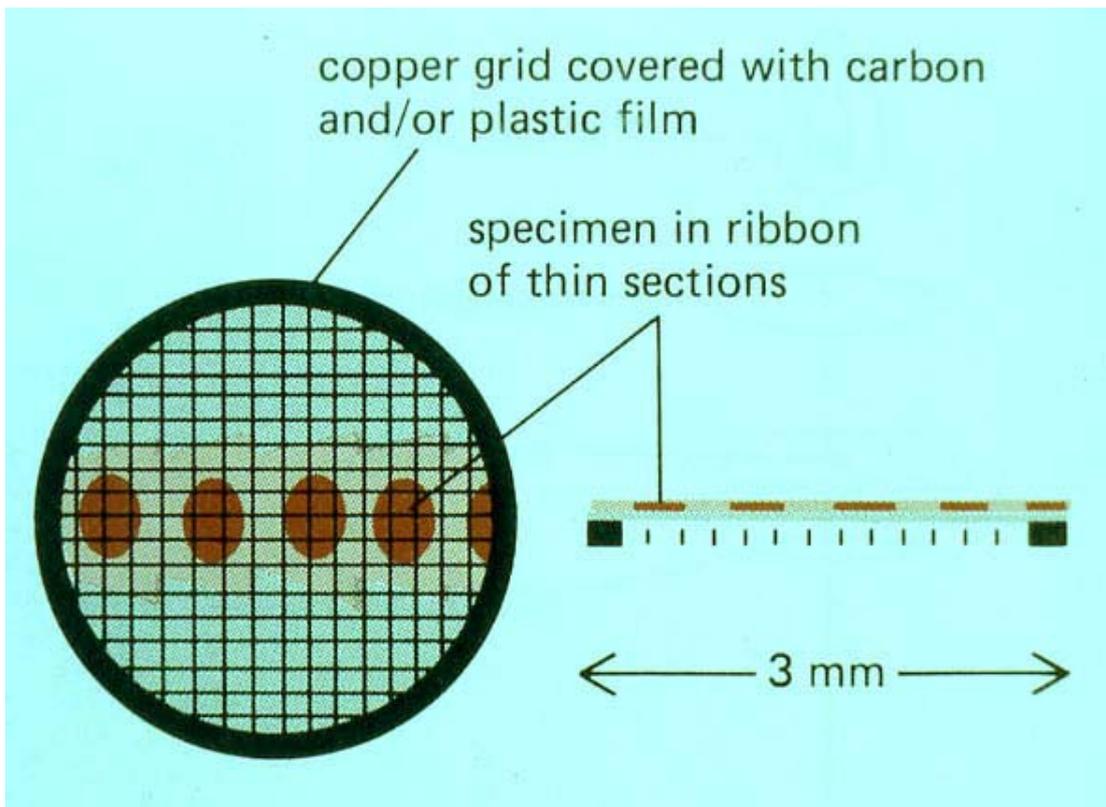
Ⓢ = substrato (DAB)

Ⓟ = prodotto della reazione enzimatica

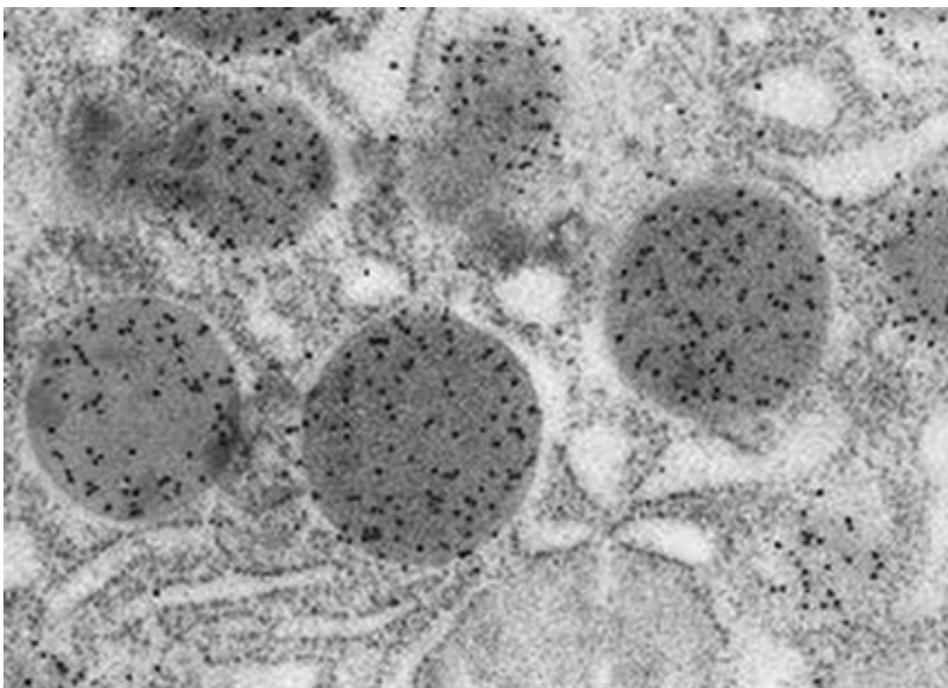


Ipofisi: anti PRL (perossidasi)

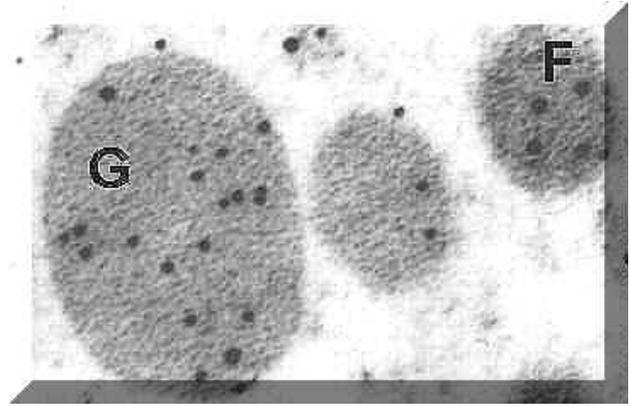
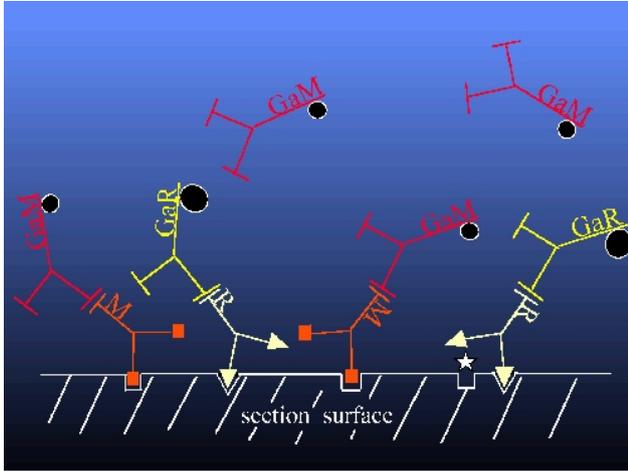




Immunogold al ME



Metodo doppio simultaneo con oro



Istoautoradiografia

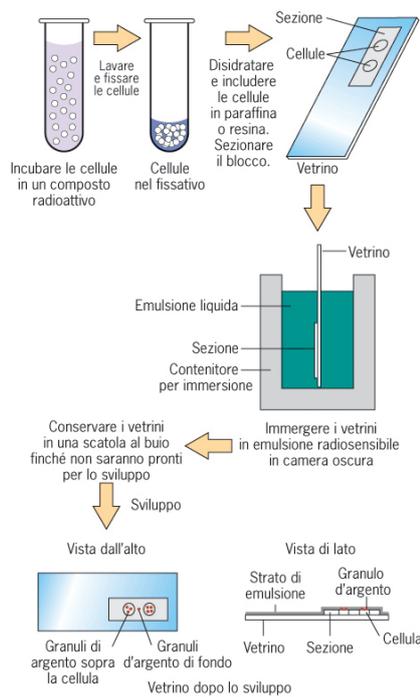
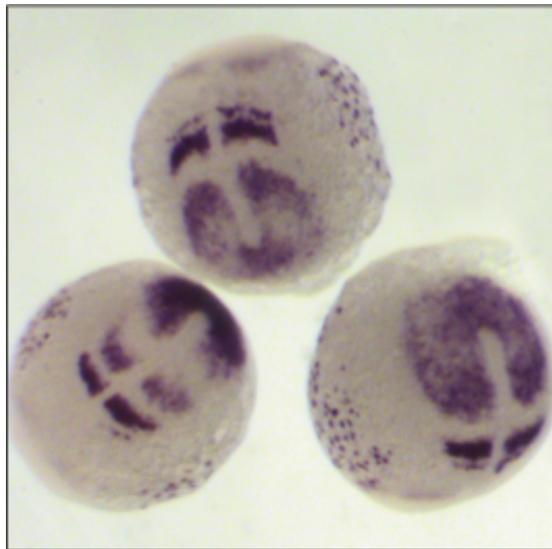


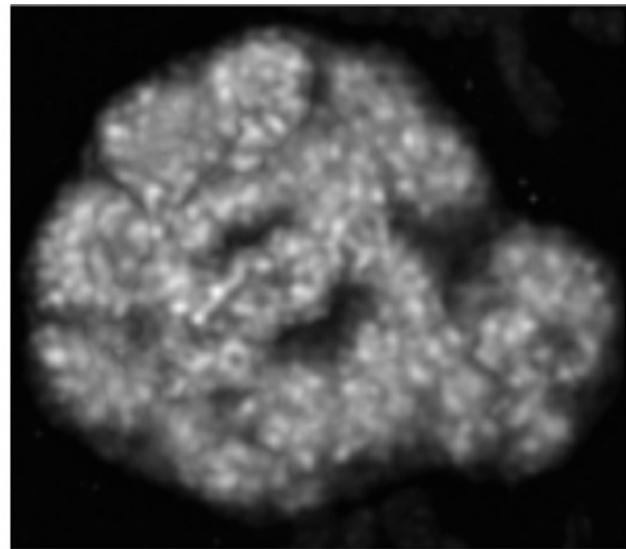
FIGURA 18.20 I diversi passaggi per la preparazione di una autoradiografia.

IBRIDAZIONE *IN SITU*



(A)

0,5 mm

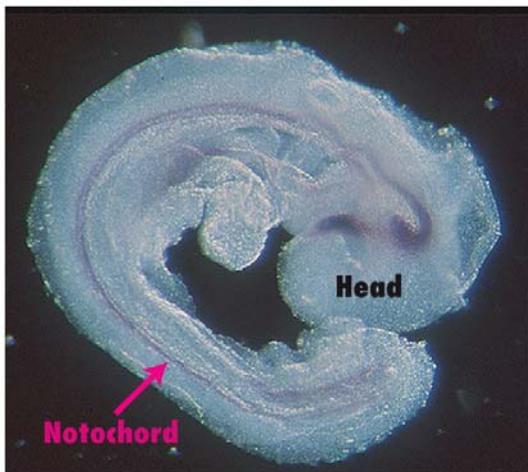


(B)

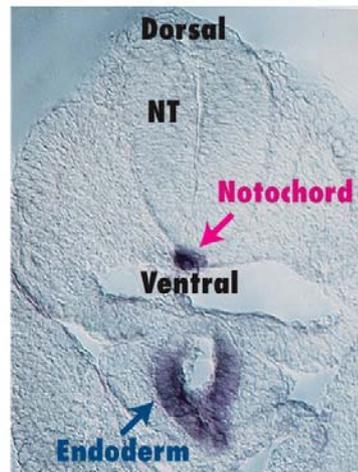
1 μm

IBRIDAZIONE *IN SITU*

(a)



(b)



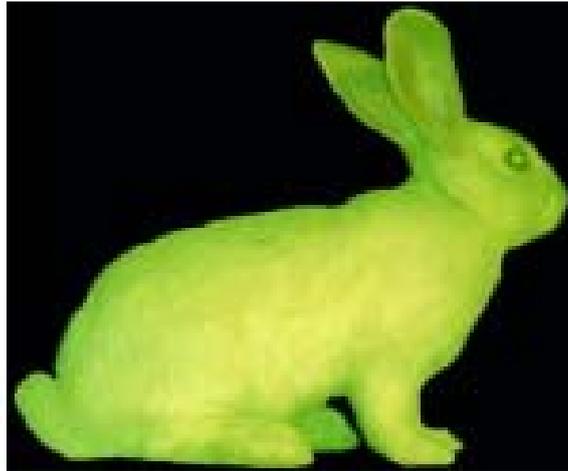
(c)



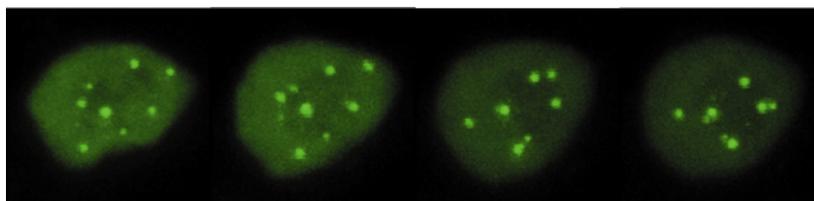
Figure 5-28
Molecular Cell Biology, Sixth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

Coniglio con cellule della pelle modificate con la GFP.

I cheratinociti, cellule dell'epidermide, di questo coniglio sono state modificate in modo da far esprimere la GFP, una proteina naturale di una specie di medusa. Tale proteina dà una intensa fluorescenza verde quando viene eccitata ad una specifica lunghezza d'onda.

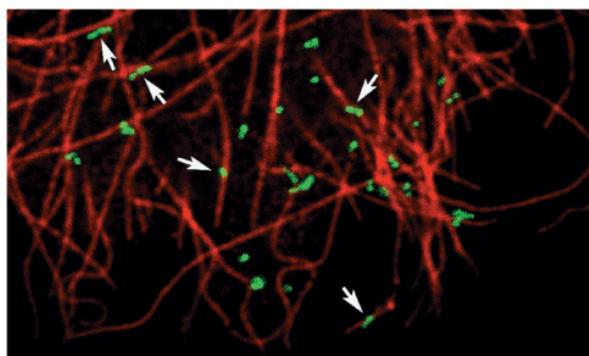


GFP



5 μ m

GFP



5 μ m

FIGURA 9.2 Un esempio del ruolo dei microtubuli nel trasporto degli organelli. I perossisomi di questa cellula (in verde ed indicati da frecce) sono strettamente associati con i microtubuli del citoscheletro (in rosso). I perossisomi appaiono verdi perché contengono una proteina perossisomiale fusa con la proteina fluorescente verde. I microtubuli appaiono rossi perché sono colorati con un anticorpo marcato con fluorescenza. (DA E. A. C. WIEMER ET AL., J. CELL BIOL. 136:78, 1997, PER GENT. CONC. DI S. SUBRAMANI. COPYRIGHT ROCKEFELLER UNIVERSITY PRESS).

 Gerald Karp
Biologia cellulare e molecolare
EdiSES

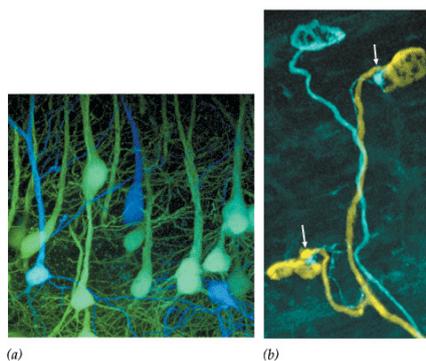


FIGURA 18.7 Impiego di varianti GFP per seguire le interazioni dinamiche tra neuroni e loro cellule bersaglio *in vivo*. (a) Una porzione di cervello di un topo con due neuroni fluorescenti colorati diversamente. Questi topi sono generati per accoppiamento di animali transgenici i cui neuroni sono marcati con l'una o l'altra proteina fluorescente. (b) Micrografia a fluorescenza di porzioni di due neuroni, uno marcato con YFP e l'altro con CFP. Le frecce indicano due diverse giunzioni neuromuscolari su due diverse fibre muscolari in cui la ramificazione assonica YFP-marcata ha soppiantato la ramificazione CFP-marcata. La terza giunzione è innervata dall'assone CFP-marcato in assenza di competizione. (A: PER GENT. CONC. DI B. KASTHURI & J. W. LICHTMAN, WASHINGTON UNIVERSITY SCHOOL OF MEDICINE; B: PER GENT. CONC. DI NARAYANAN KASTHURI AND JEFF W. LICHTMAN, NATURE 424:429, 2003; © COPYRIGHT 2003, MACMILLAN MAGAZINES LTD).

 Gerald Karp
Biologia cellulare e molecolare
EdiSES