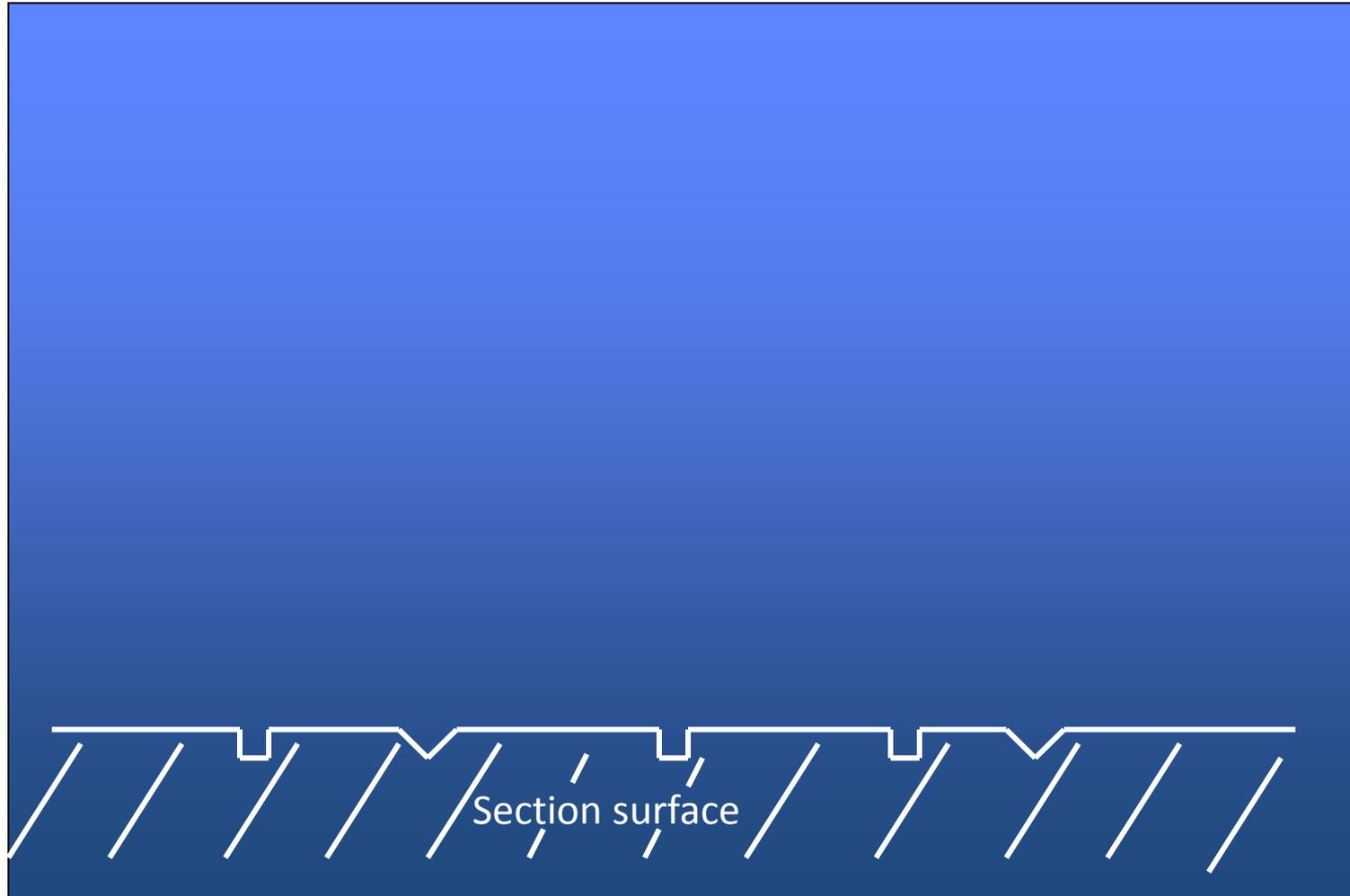


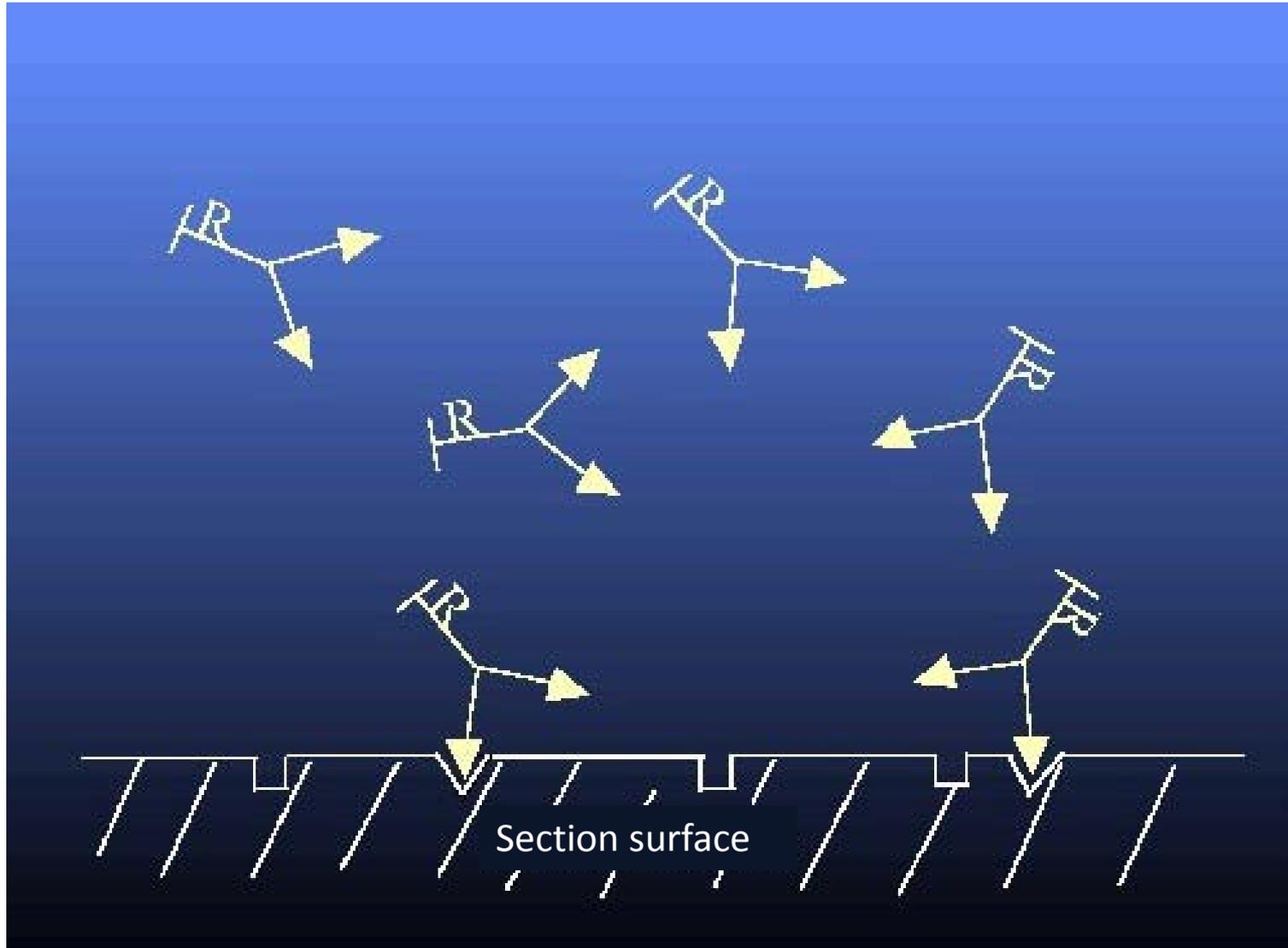
IMMUNOFLUORESCENZA

- 1 Si parte da una sezione di tessuto (o un monostrato di cellule in coltura) fissato (es.: 4%paraformaldeide), tagliato (es.: microtomo) e fatto aderire su un vetrino porta oggetto



2

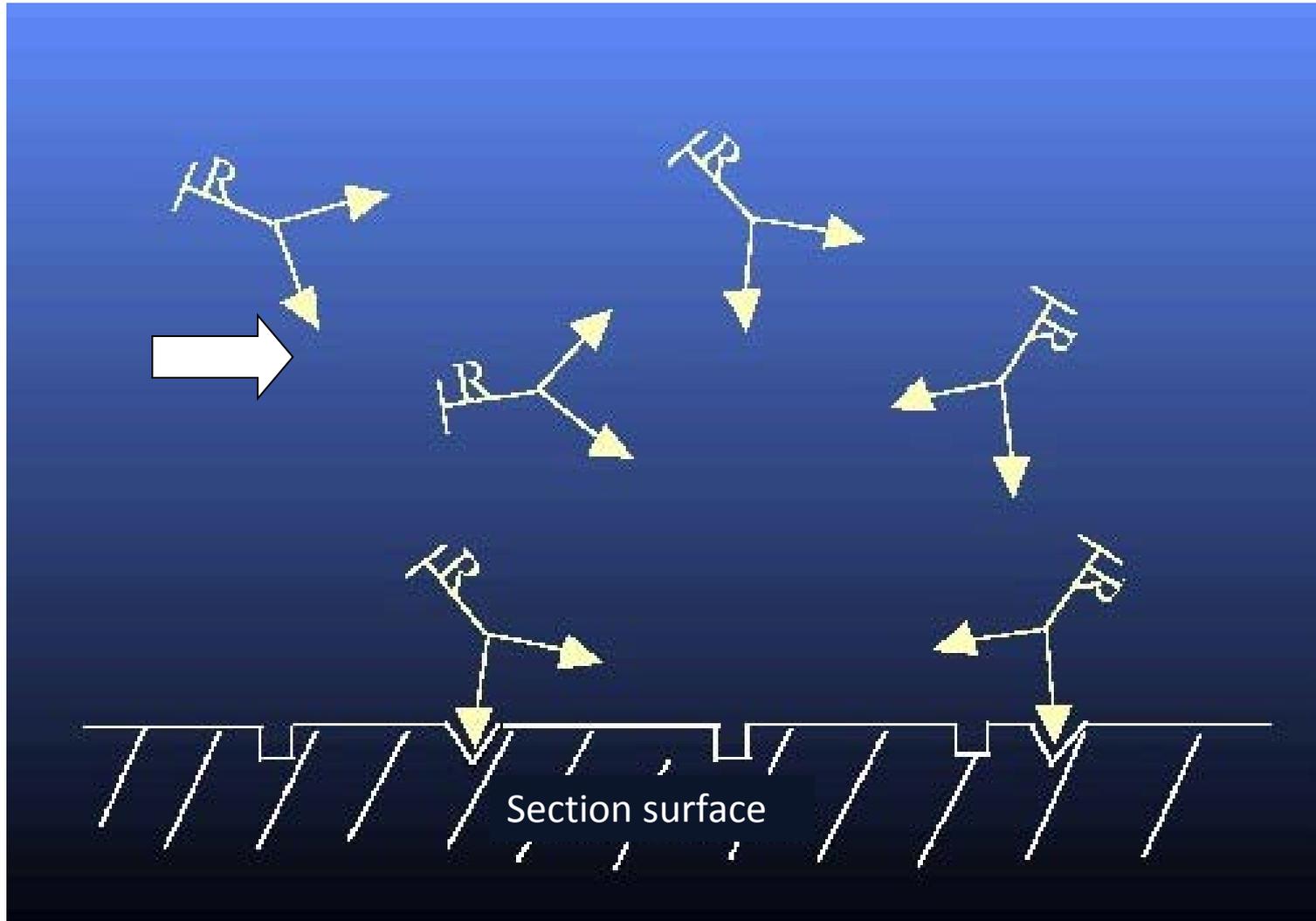
La sezione viene incubata in una soluzione contenente anticorpo “primario” diretto contro uno specifico “antigene”. Nell'esempio, l'anticorpo è stato prodotto in coniglio (R=rabbit)



2

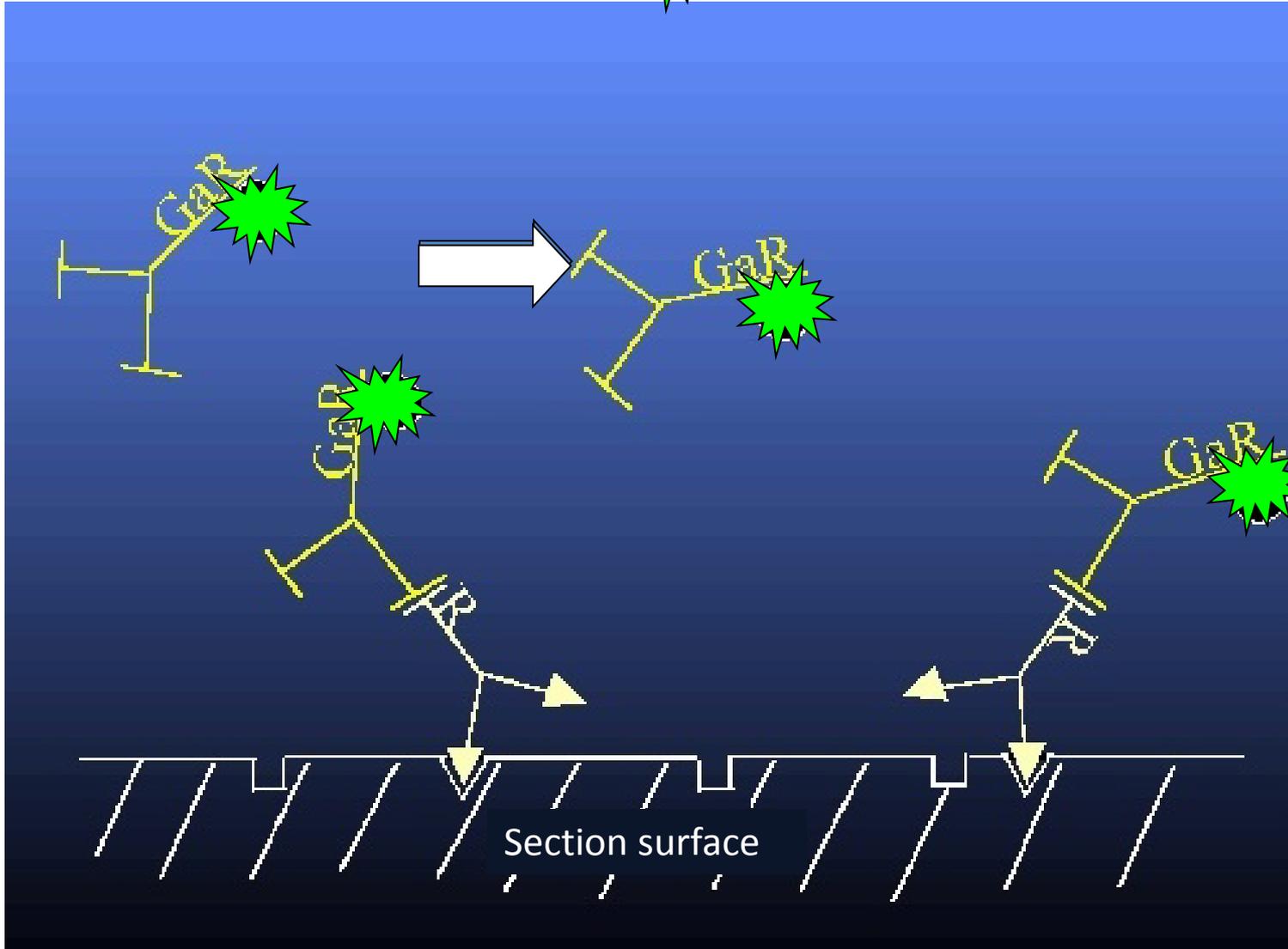
Lavaggio della frazione che non si è legata all'antigene

Nota: nelle diapositive successive lo stesso simbolo  verrà utilizzato per indicare tutte le volte in cui si procede con un "lavaggio" delle molecole di anticorpo che non hanno interagito col tessuto

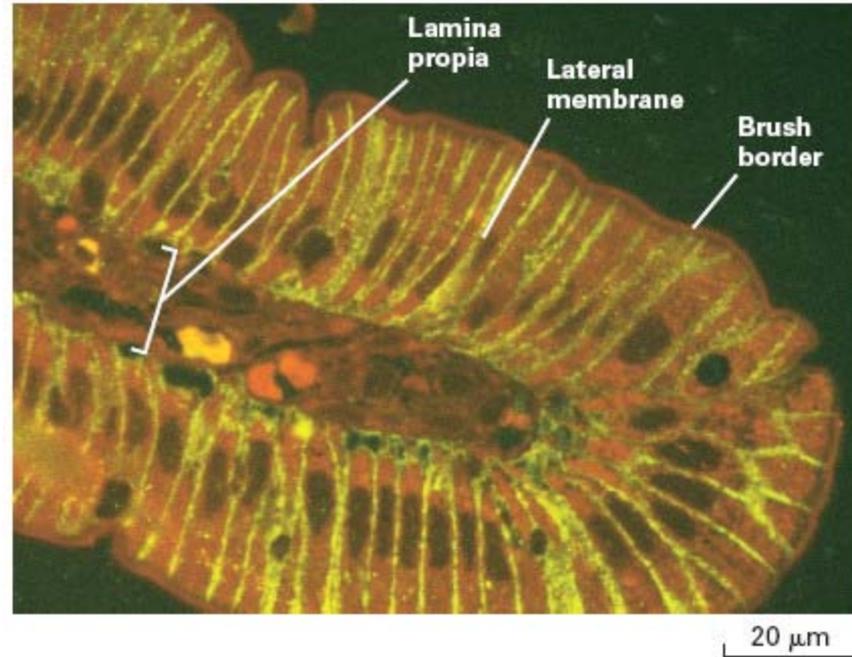


3

Dopo l'incubazione con l'anticorpo primario, la sezione è stata 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 fluorocromo:  Fluorescein isothiocyanate (FITC)



A specific protein can be localized in fixed tissue sections by immunofluorescence microscopy. A section of the rat intestinal wall was stained with Evans blue, which generates a nonspecific red fluorescence, and with a yellow green–fluorescing antibody specific for **GLUT2**, a glucose transport protein. As evident from this fluorescence micrograph, GLUT2 is present **in the basal and lateral sides of the intestinal cells** but is absent from the brush border, composed of closely packed microvilli on the apical surface facing the intestinal lumen. Capillaries run through the lamina propria, a loose connective tissue beneath the epithelial layer.



“Doppia” immunofluorescenza

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

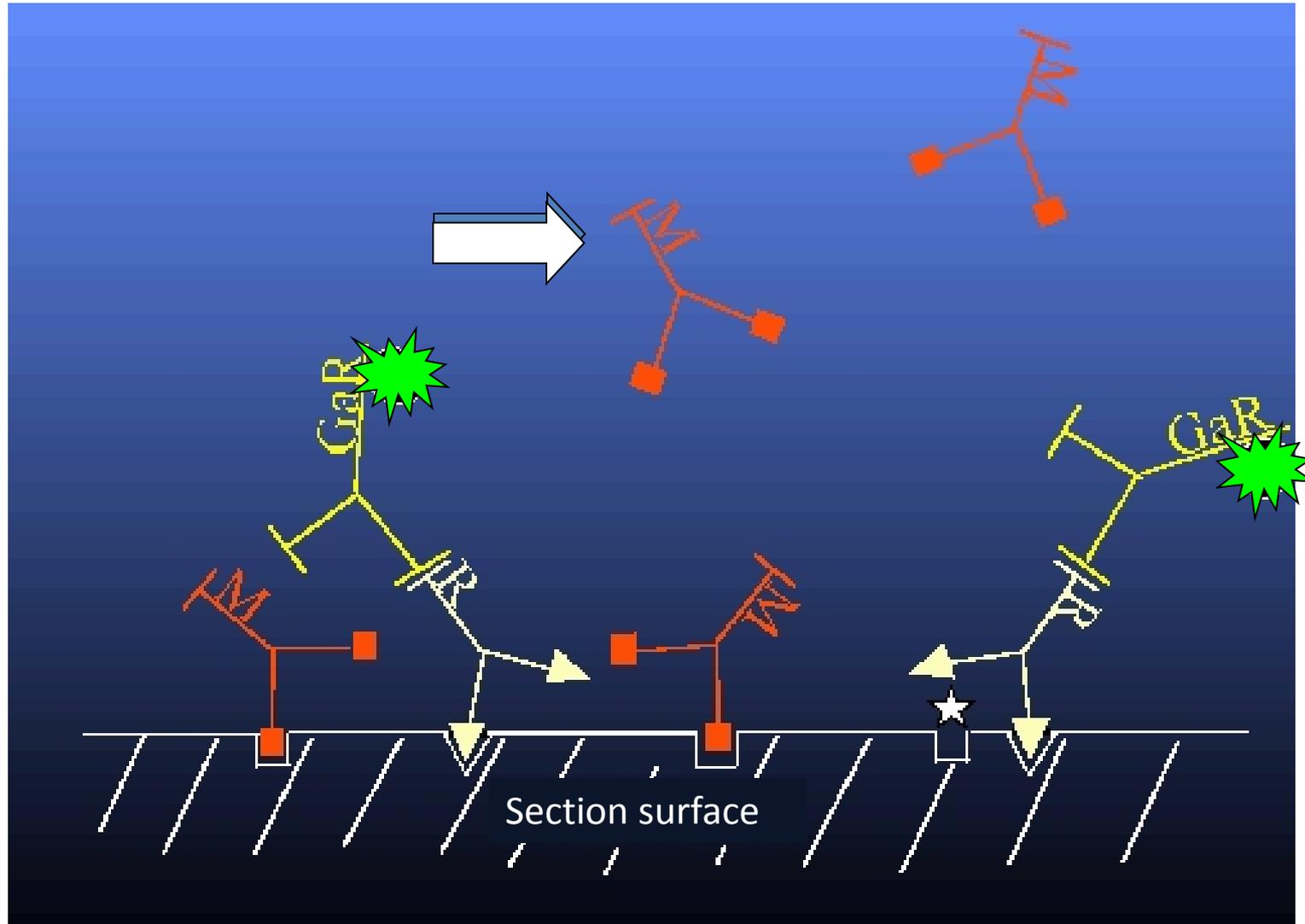
Come principio generale, le doppie marcature sfruttano la possibilità di utilizzare due anticorpi primari specifici per due antigeni diversi e prodotti in specie diverse.

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

Doppia immunofluorescenza

4

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).

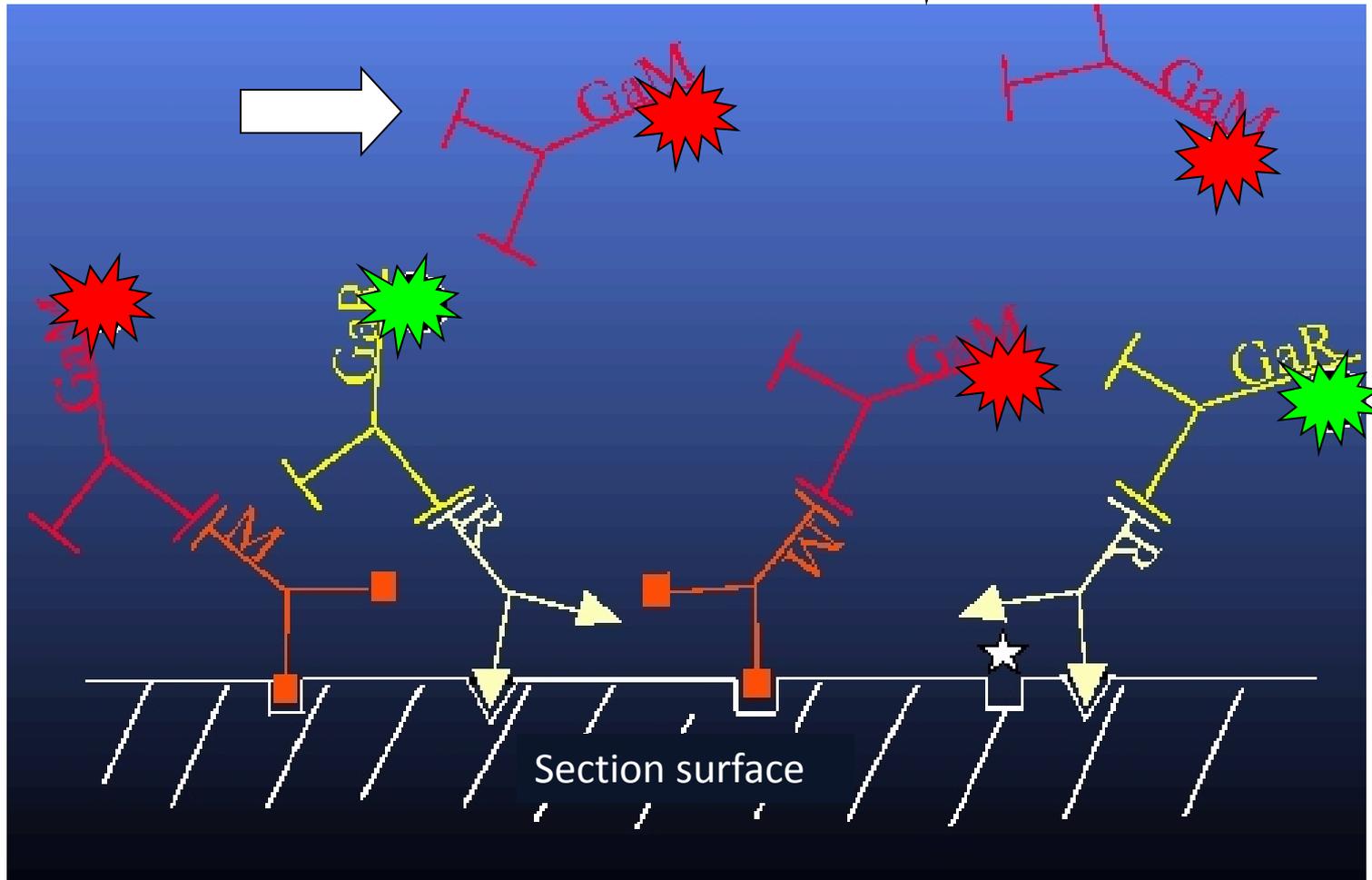


Doppia immunofluorescenza

5

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

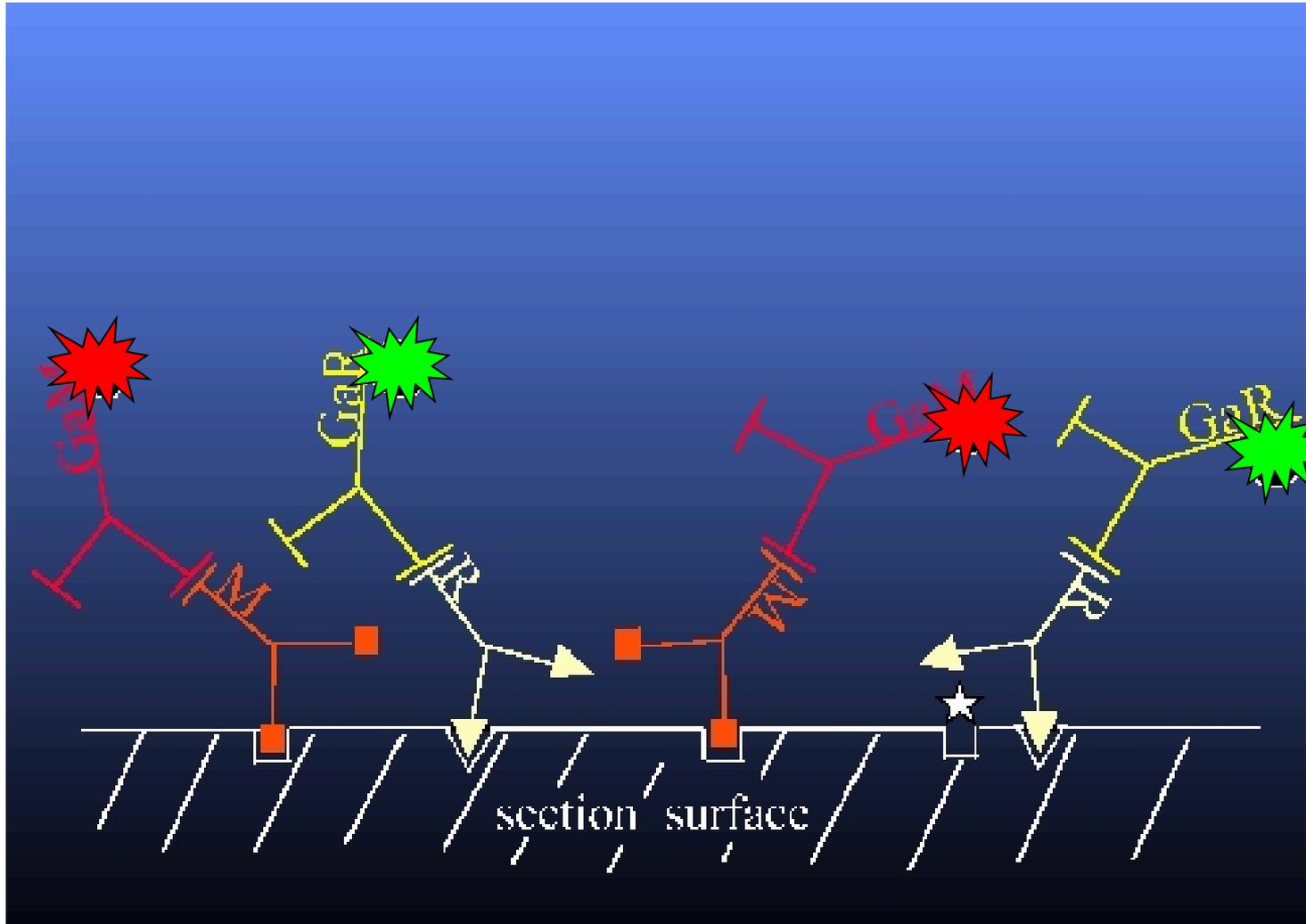
 isothiocyanate (TRITC)



Doppia immunofluorescenza

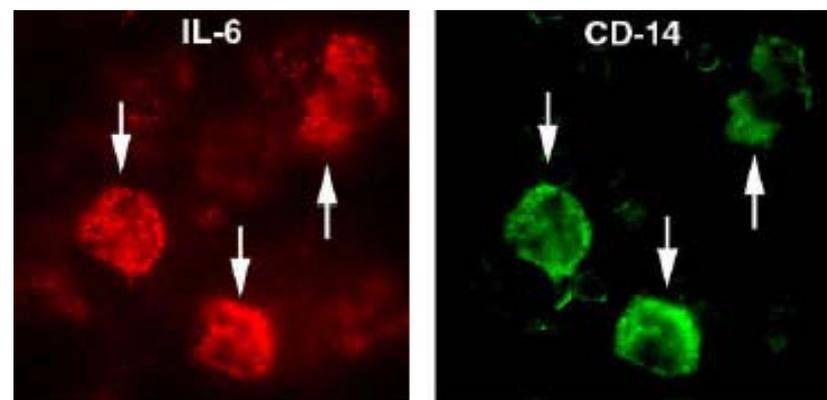
6

Risultato finale osservato al microscopio a fluorescenza tradizionale oppure confocale



Esempio di esperimento di doppia immunofluorescenza. Lo stesso preparato è osservato con filtri per la fluorescenza rossa e poi con filtri per la fluorescenza verde. Le due immagini sono prese sullo stesso campo.

*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 TRIC (rosso) e 2) con un anticorpo primario **anti-CD14** prodotto in coniglio e rivelato con un anticorpo secondario coniugato alla FITC (verde).*



Il CD-14 è una molecola nota per essere espressa dai monociti.

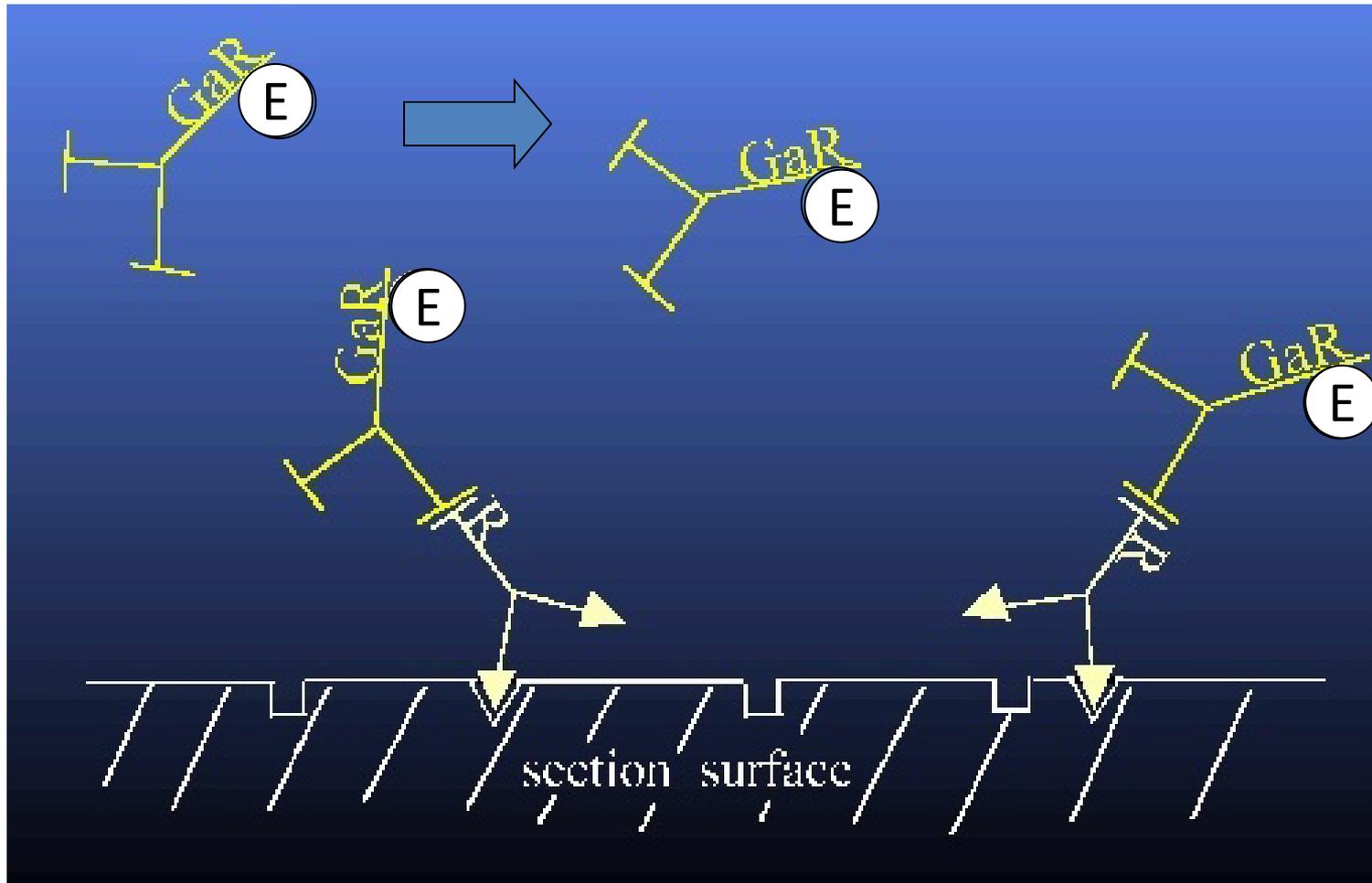
Osservazione: la corrispondenza delle marcature (frecche bianche) indica che le stesse cellule esprimono IL-6 e CD-14. **Il risultato permette di concludere che i monociti esprimono IL-6.**

NB: nella foto di sinistra notare in sottofondo una marcatura rossa meno intensa che sta ad indicare che nel campo sono presenti altre cellule mononucleate non positive per l'IL-6

Anticorpo secondario coniugato ad un attività enzimatica:

3

Dopo l'incubazione con l'anticorpo primario, la sezione è stata 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 attività enzimatica (E)



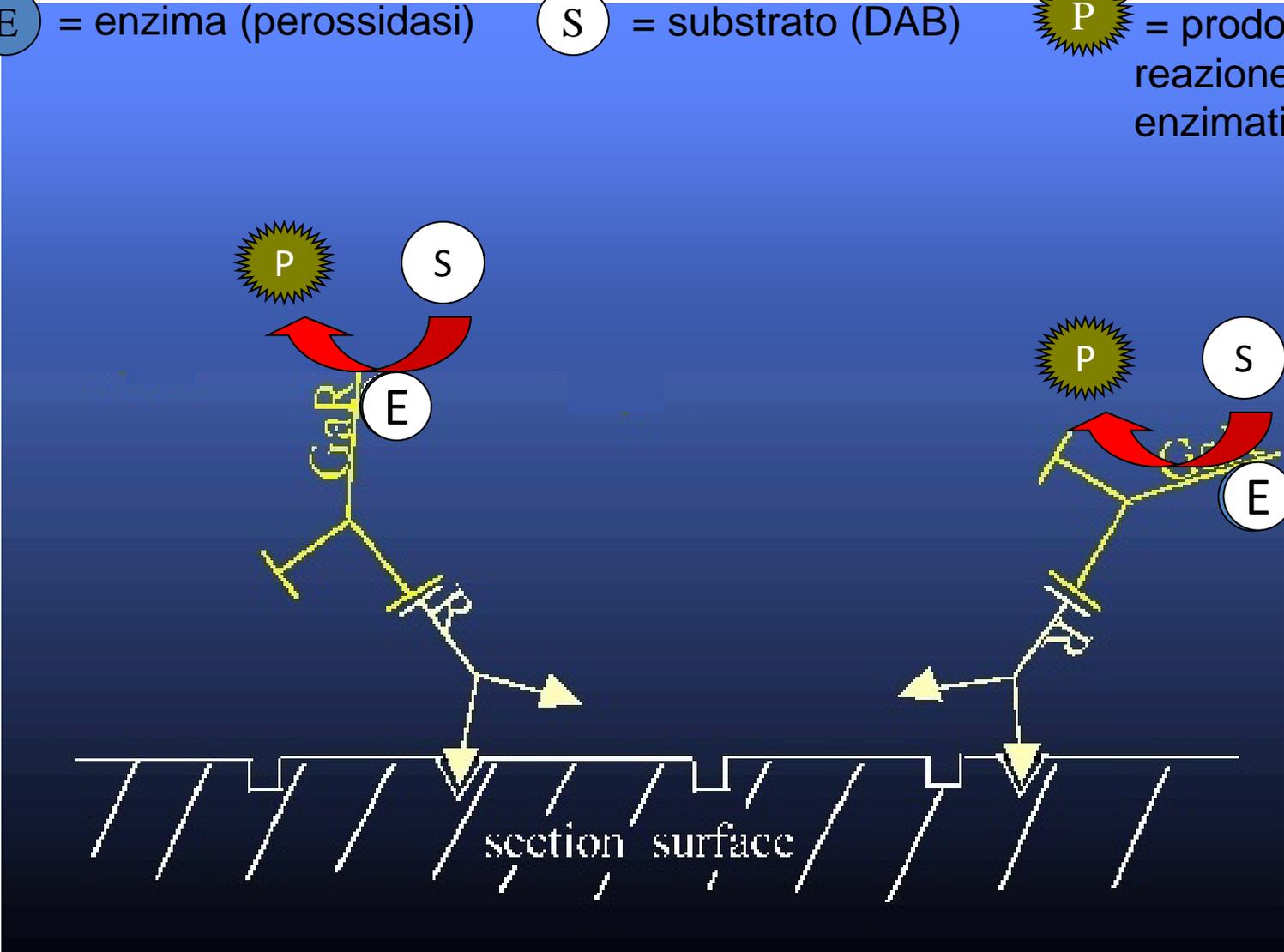
Sezione incubata in presenza del substrato dell'enzima

4

E = enzima (perossidasi)

S = substrato (DAB)

P = prodotto della reazione enzimatica



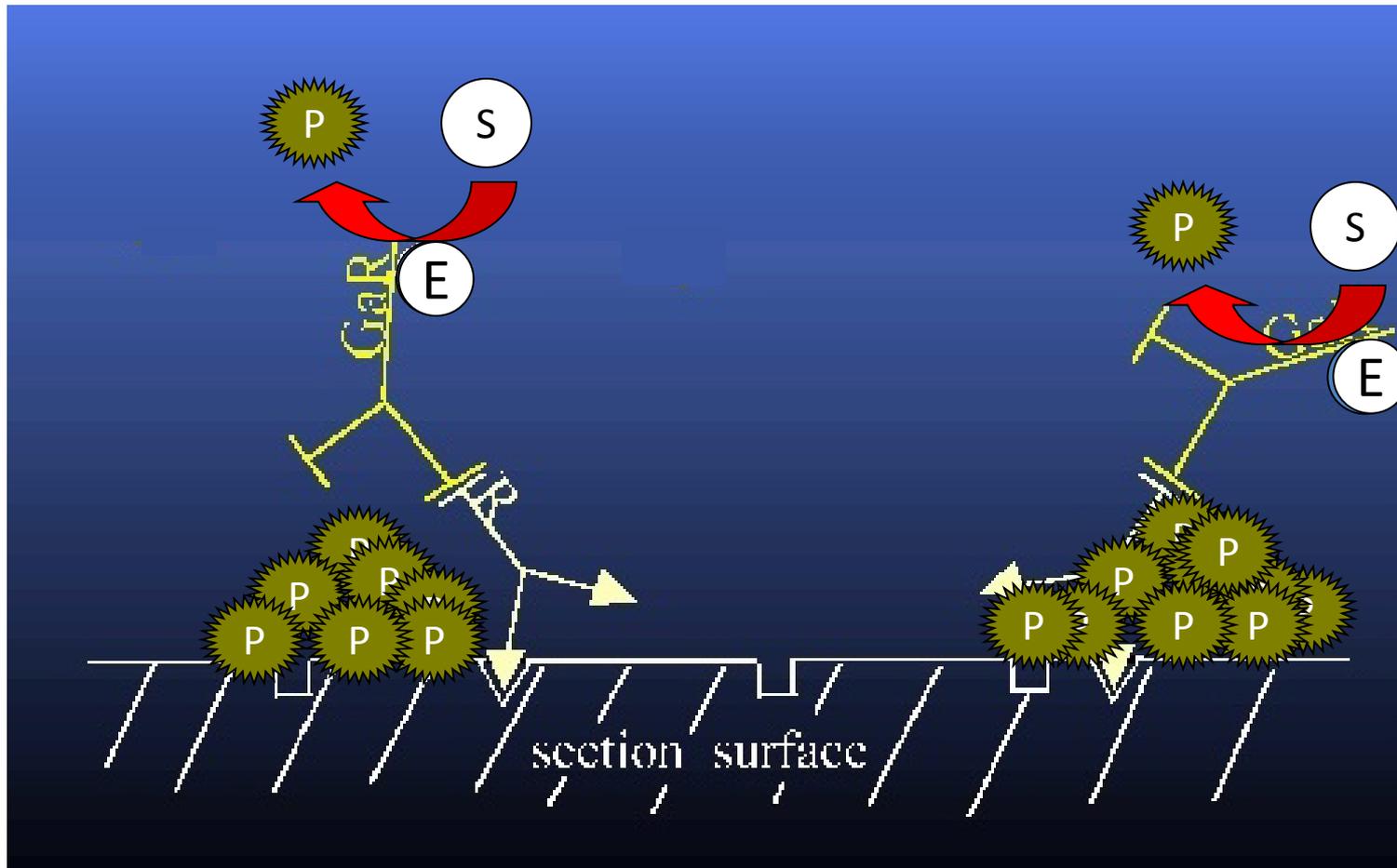
Il prodotto della reazione enzimatica precipita in corrispondenza dell'interazione antigene-anticorpo primario

5

E = enzima (perossidasi)

S = substrato (DAB)

P = prodotto della reazione enzimatica



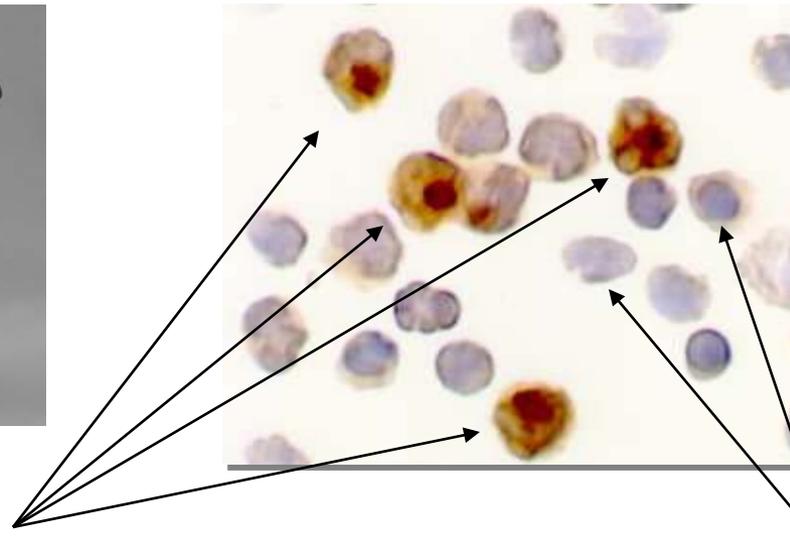
La **perossidasi** è un enzima appartenente alla classe delle ossidoreduttasi in grado di catalizzare la seguente reazione:



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.

Ecco il risultato dell'osservazione di cellule mononucleate del sangue sottoposte a reazione immunoenzimatica con un anticorpo primario diretto contro la molecola "IL-6" (=antigene)



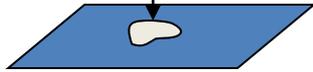
In questo campo, 4 cellule sono
"positive per l'IL-6"
(la colorazione rivela la presenza
di IL-6)

Le altre cellule, nonostante le
similitudini morfologiche sono
"negative all'IL-6"

Altro esempio: sezioni seriali di tessuto di ghiandola surrenale sottoposte a reazioni contro 3 antigeni diversi:

(E)Gt-anti "Rb"

Rb-anti "A"

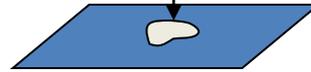


A: Cytochrome b_5



(E)Gt-anti "Rb"

Rb-anti "B"

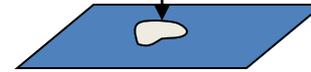


B: SULT2A1

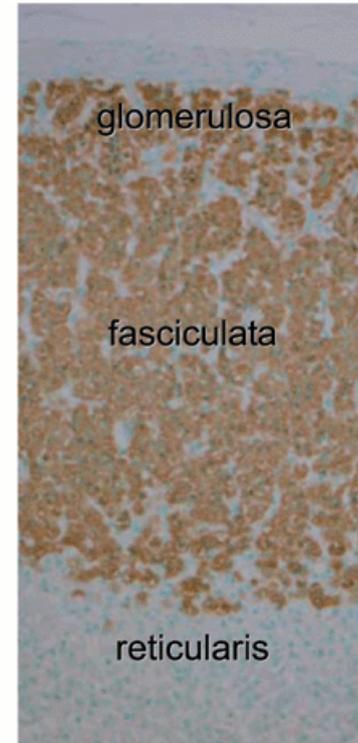


(E)Gt-anti "Rb"

Rb-anti "C"



C: 3 β HSD



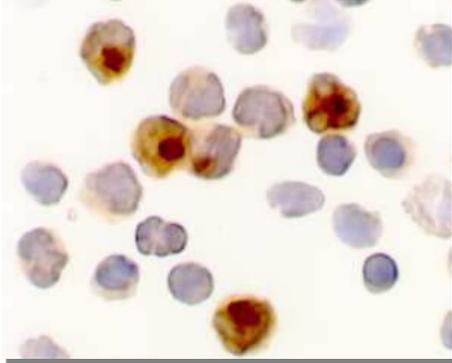
Risultato dell'osservazione: "A" e "B" sono entrambi presenti nello strato reticularis ma non identificati negli altri due strati)

“A” e “B” sono stati identificati nello stesso strato cellulare ma le reazioni immunoenzimatiche non permettono di risolvere se queste due molecole sono espresse dalle stesse cellule o da cellule diverse che appartengono al medesimo strato.

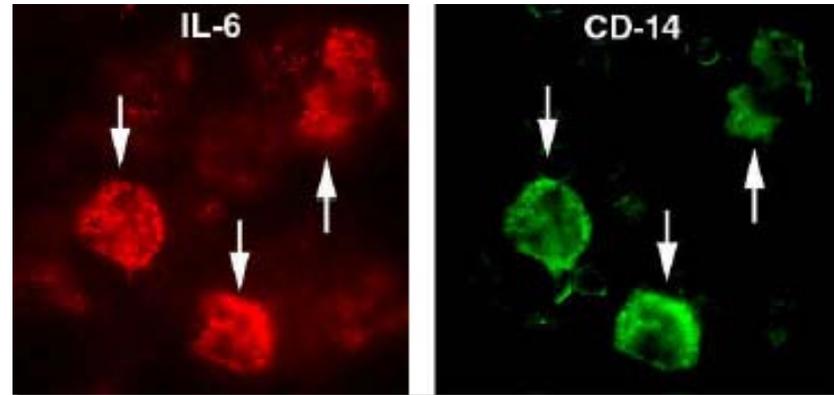
L'immunofluorescenza permette 1) di avere una maggiore risoluzione dell'informazione rispetto alla precipitazione di un cromoforo (reazione enzimatica) e 2) di realizzare più facilmente delle “doppie” marcature.

Risultati a confronto:

Reazione immunoenzimatica
per IL-6:



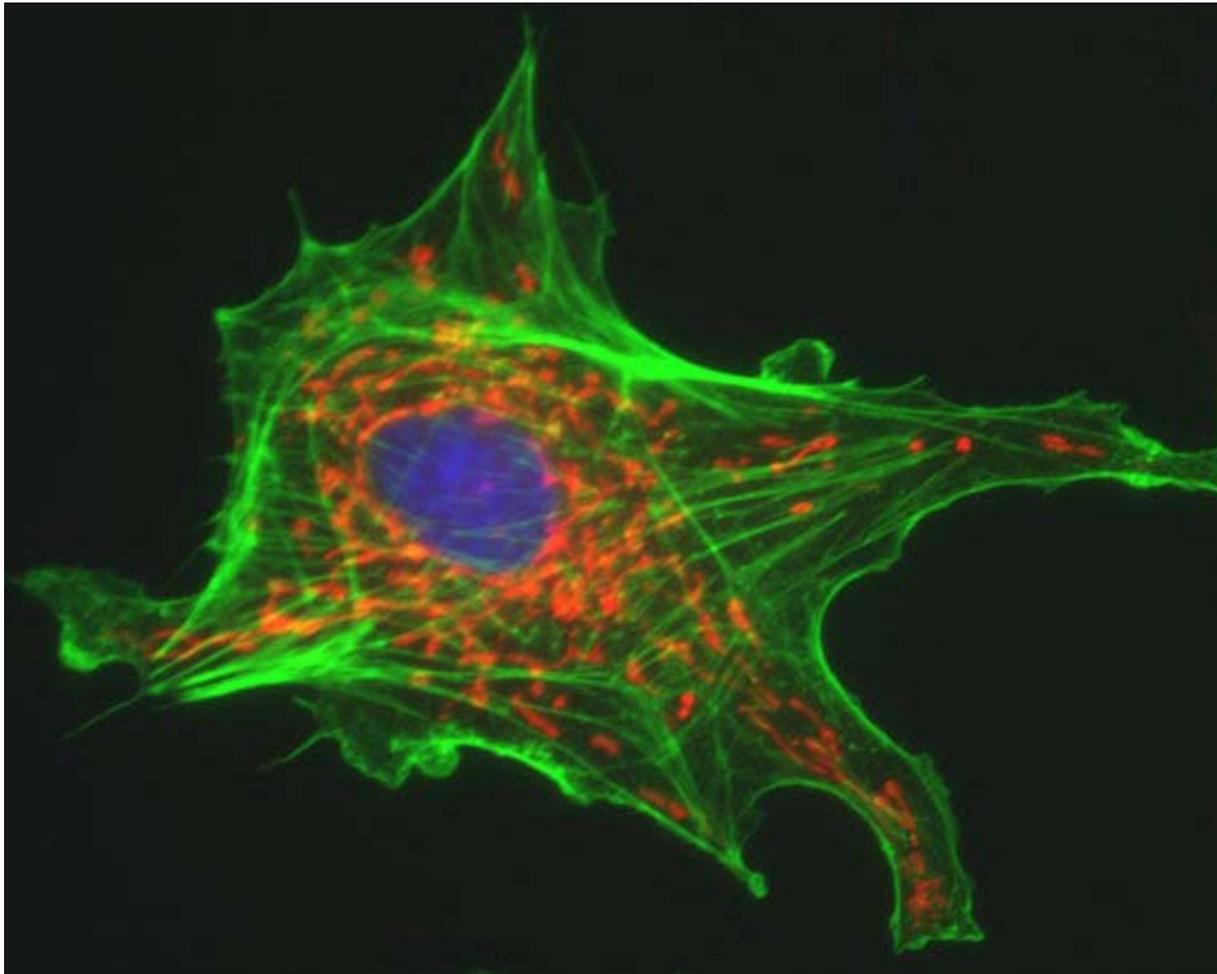
Doppia immunofluorescenza per IL-6 e
CD-14



Risultato della reazione immunoenzimatica: alcune cellule mononucleate del sangue umano analizzate contengono IL-6.

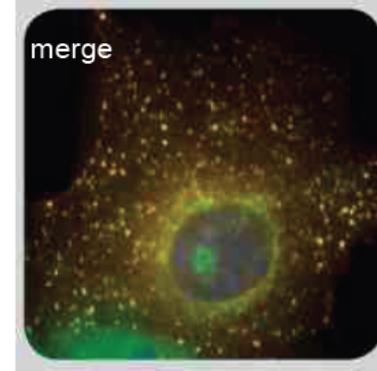
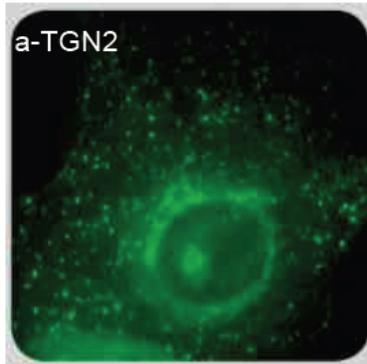
Risultato della doppia immunofluorescenza: Tra le cellule mononucleate del sangue umano i monociti esprimono IL-6

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



The trans-Golgi integral network membrane protein 2:

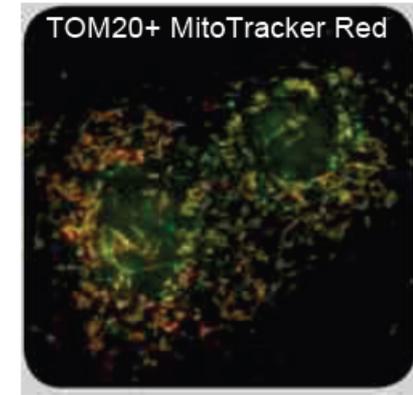
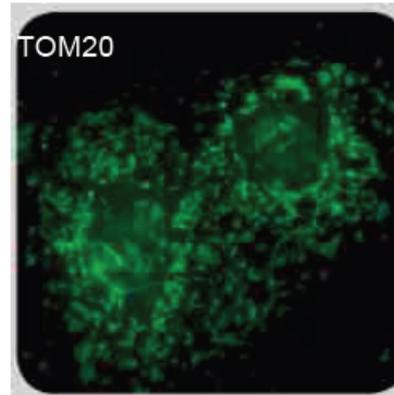
This protein is thought to be involved in the morphology of the TGN as well as in the formation of secretory vesicles.



The mitochondrial import receptor subunit TOM20

TOM 20 is an outer mitochondrial membrane protein that functions as a major receptor of the import receptor complex for cytoplasmically synthesized mitochondrial pre-proteins.

TOM20 **colocalizes** with MitoTracker Red, thus demonstrating its correct mitochondrial distribution

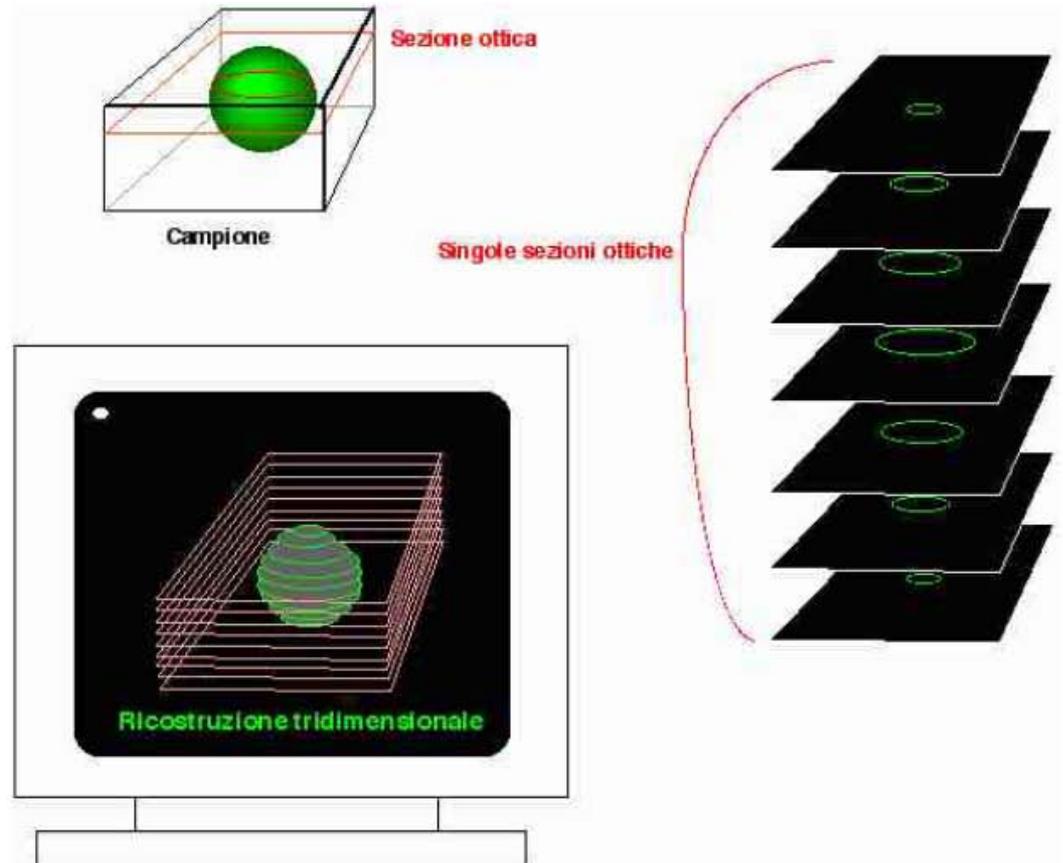


Notare che la sovrapposizione delle immagini in fluorescenza verde e rossa permette di identificare la COLOCALIZZAZIONE di 2 antigeni, grazie alla somma delle emissioni verde + rosso = giallo

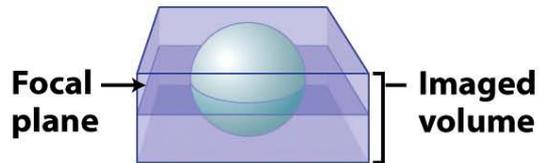
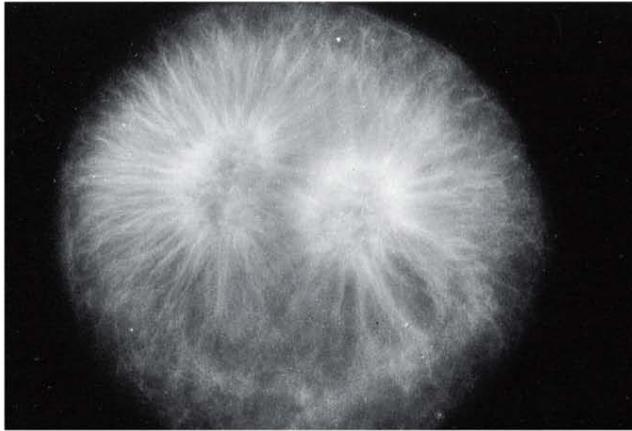
Microscopia confocale



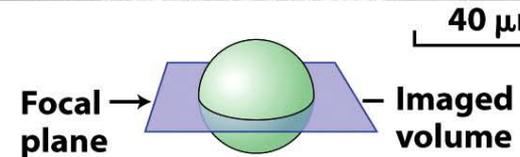
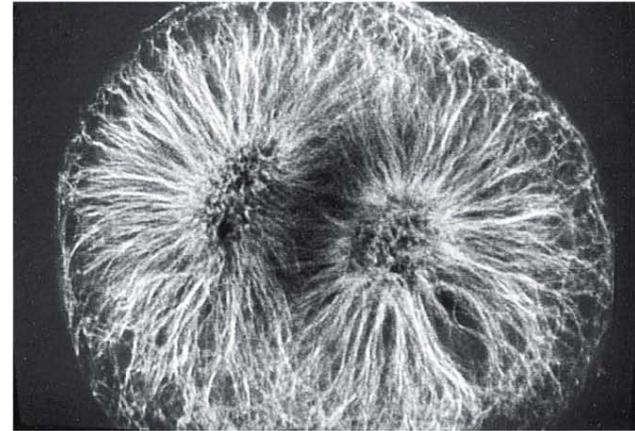
La microscopia confocale utilizza un raggio laser per illuminare un singolo piano del campione alla volta



(a) Conventional fluorescence microscopy

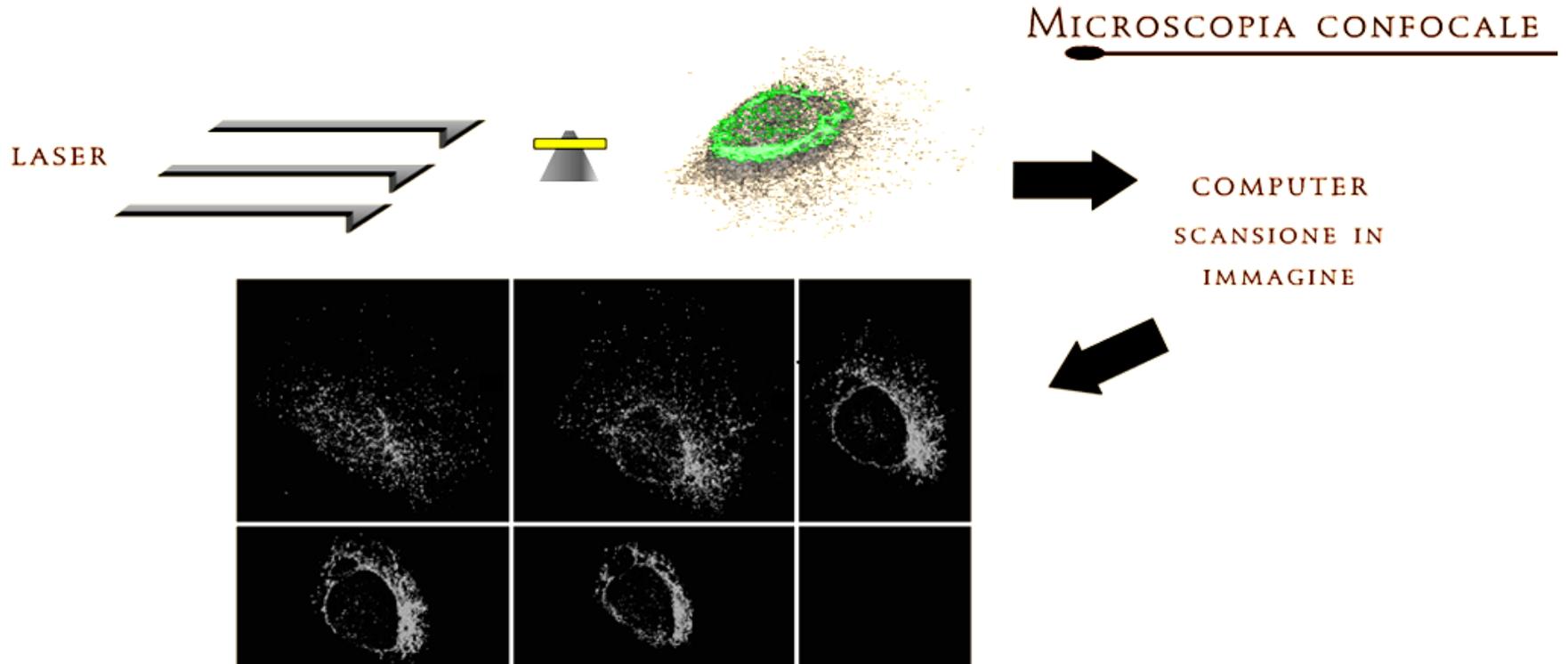


(b) Confocal fluorescence microscopy



Confocal microscopy produces an in-focus optical section through thick cells. A mitotic fertilized egg from a sea urchin (*Psammechinus*) was lysed with a detergent, exposed to an anti-tubulin antibody, and then exposed to a fluorescein-tagged antibody that binds to the anti-tubulin antibody. (a) When viewed by conventional fluorescence microscopy, the mitotic spindle is blurred. This blurring occurs because background fluorescence is detected from tubulin above and below the focal plane as depicted in the sketch. (b) The confocal microscopic image is sharp, particularly in the center of the mitotic spindle. In this case, fluorescence is detected only from molecules in the focal plane, generating a very thin optical section.

Esempio di analisi confocale



Immunogold per la microscopia elettronica

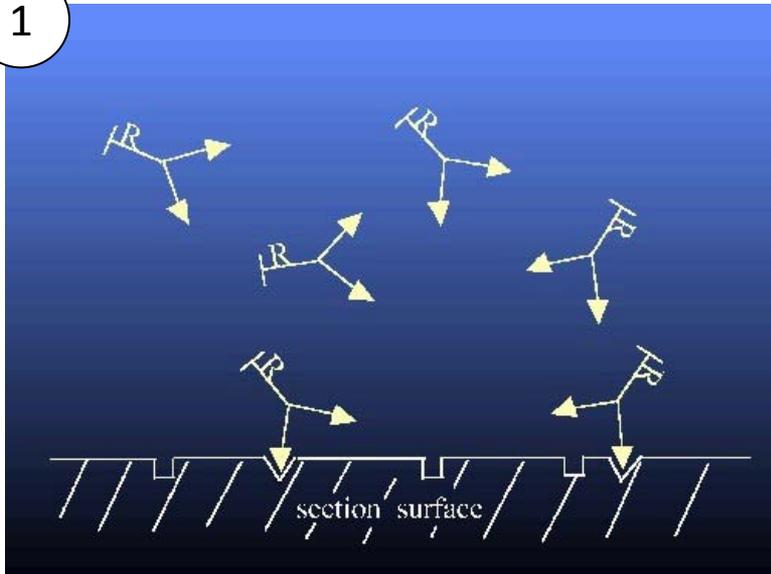
marcature singole o doppie
analizzate al microscopio
elettronico a trasmissione (TEM)

Incubazioni con anticorpi primari e
anticorpi secondari come nel caso
dell'immunofluorescenza ma in
questo caso gli anticorpi secondari
sono coniugati con **particelle d'oro**
(opache agli elettroni) di diametro
diverso

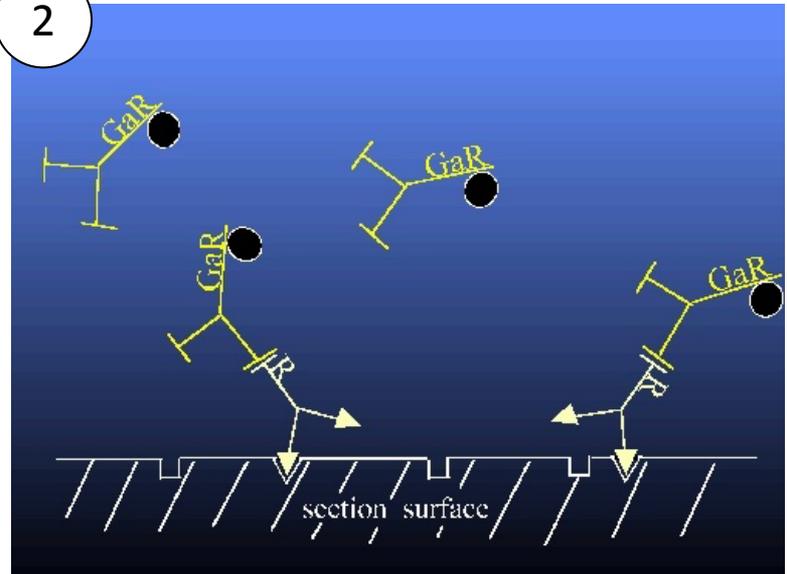


IMMUNOGOLD

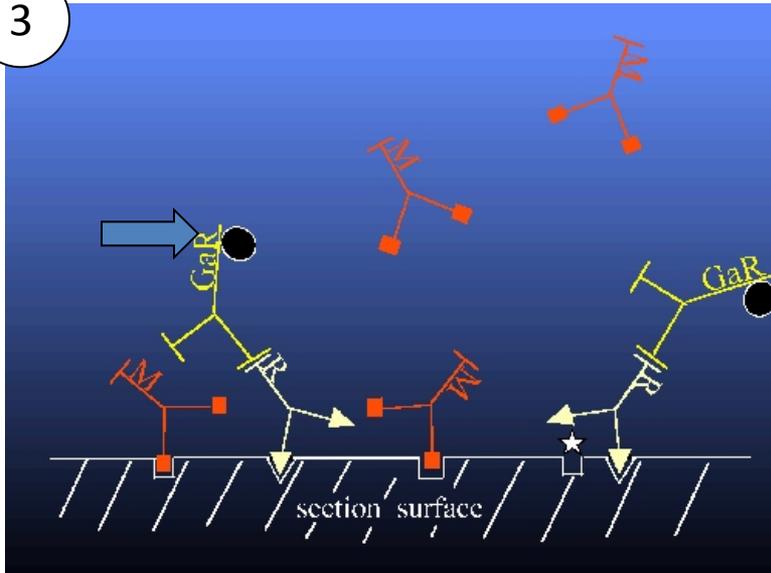
1



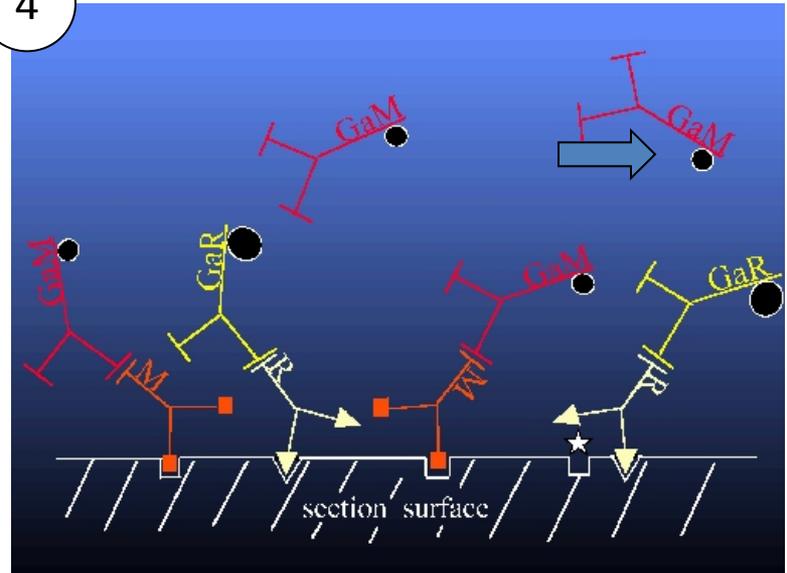
2



3



4

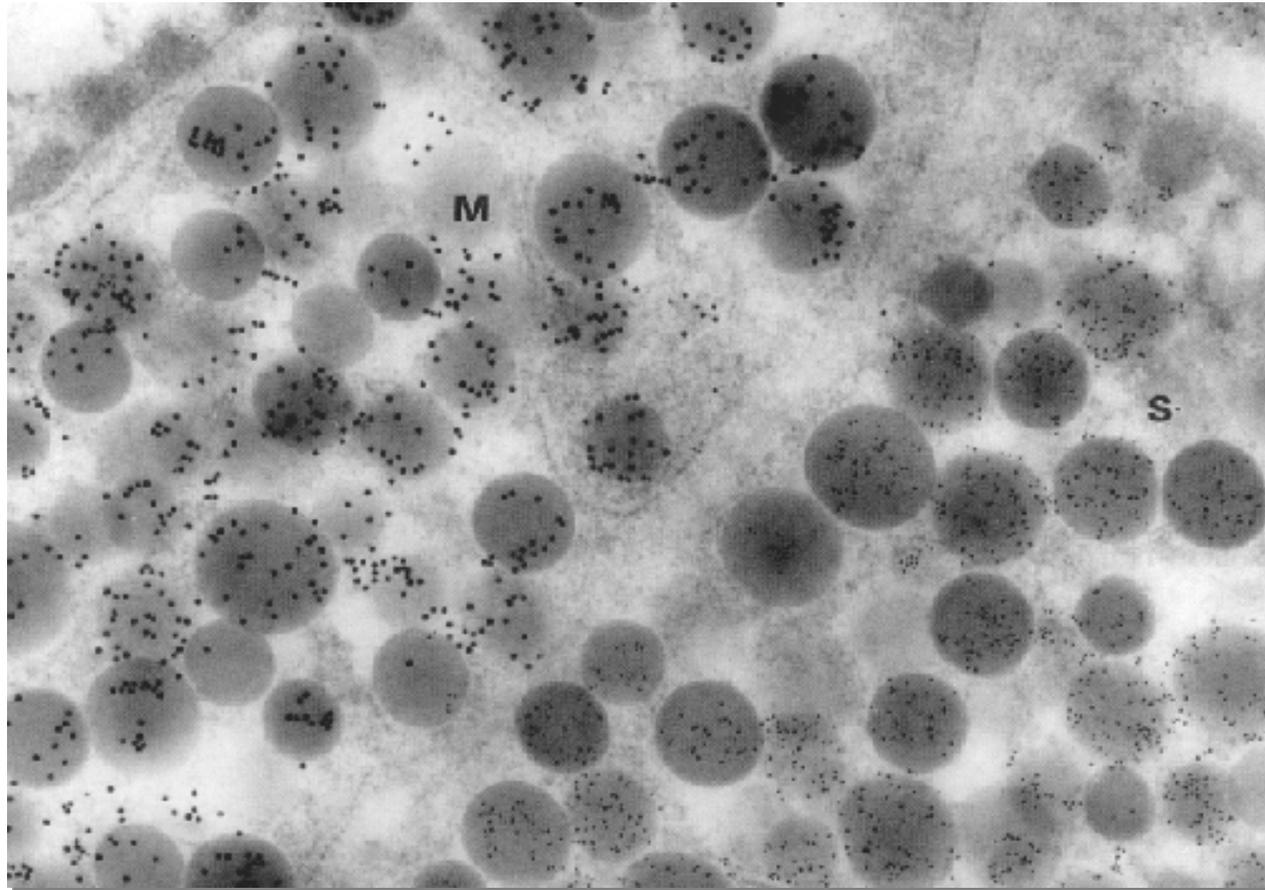


Esempio marcatura doppia con immunogold esaminata al TEM.

Sezione di ipofisi analizzata con un *anticorpo primario anti-prolattina* rivelato con un anticorpo secondario coniugato a **particelle d'oro di 20 nm** di diametro e con un *anticorpo primario anti-ormone della crescita* rivelato con un anticorpo secondario coniugato a **particelle d'oro di 10 nm** di diametro.

A sinistra cellule le cui vescicole di secrezione sono marcate con particelle d'oro di 20 nm (diametro maggiore): questa cellula contiene prolattina: si tratta di una cellula "mammotropa" (M).

A destra le vescicole sono marcate con particelle d'oro di diametro inferiore (10 nm): si tratta di una cellula "somatotropa" (S) le cui vescicole di secrezione contengono l'ormone della crescita.



Colorazioni istologiche
Immunoistochimica
Immunofluorescenza
Immunogold



Tecniche che richiedono
la fissazione del
preparato (cellule o
sezioni di tessuto)
= materiale morto

**Green Fluorescent
Protein (GFP)**



Tecniche che non
lo richiedono
compatibili con
cellule o tessuti
vivi