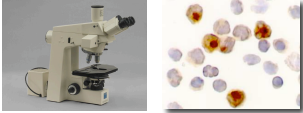
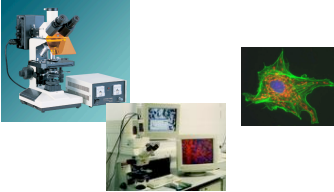

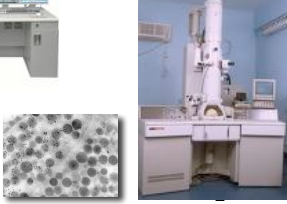


Citologia Animale e Vegetale (corso A - I. Perroteau) - Tecniche morfologiche

Microscopia ottica (per campioni colorati)

- Campo "chiaro" 
- Campo "scuro" (fluorescenza)
 - classico oppure confocale 

Microscopia elettronica

- SEM (a scansione) 
- TEM (a trasmissione) 

Solo per uso didattico, vietata la riproduzione, la diffusione o la vendita

IMMUNOISTOCHIMICA

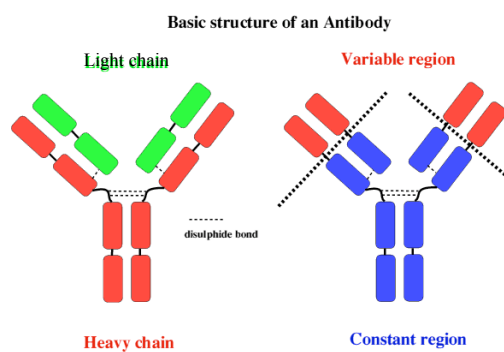
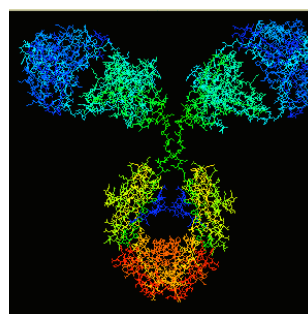
E' una variante dell'istochimica che permette la localizzazione istologica di molecole sfruttando le loro caratteristiche antigeniche. E' quindi una reazione tra un *antigene* e il suo *relativo anticorpo*.

Gli anticorpi sono proteine prodotte dal sistema immunitario come difesa contro sostanze estranee; sono proteine del gruppo delle globuline (*immunoglobuline*).

Sono moltissimi tipi diversi ognuno con un sito di legame diverso che riconosce una specifica molecola bersaglio o *antigene*.

3

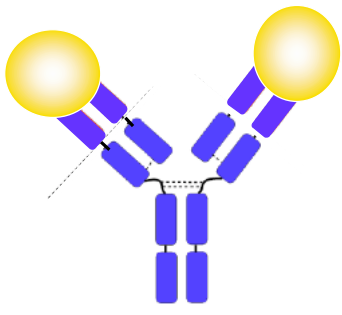
Anticorpi sono proteine formate da 4 catene polipeptidiche legate fra di loro da legami covalenti (ponti di solfuro)



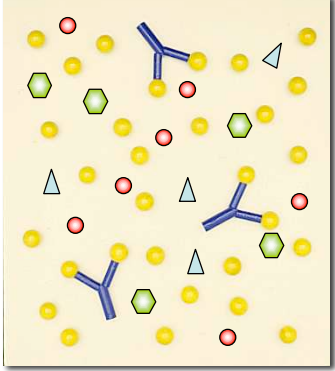
4

Citologia Animale e Vegetale (corso A - I. Perroteau) - Tecniche immunoistochimiche

Regioni "variabili"



Regioni "variabili" are the tips of the Y-shaped antibody, shown in yellow. The "Regione 'costante'" is the base of the Y, shown in blue.



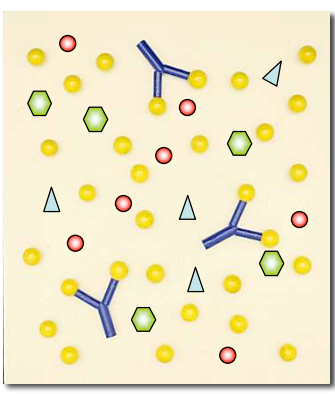
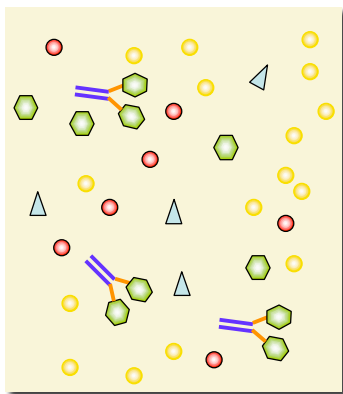
The micrograph shows several Y-shaped antibodies (blue) binding to a variety of antigens (yellow circles, red circles, green hexagons, and blue triangles) on a surface.

Solo per uso didattico, vietata la riproduzione, la diffusione o la vendita

5

Citologia Animale e Vegetale (corso A - I. Perroteau) - Tecniche immunoistochimiche

Due anticorpi prodotti nella stessa specie (parte costanti simili) ma diretti verso antigeni diversi (parte variabili diversi)



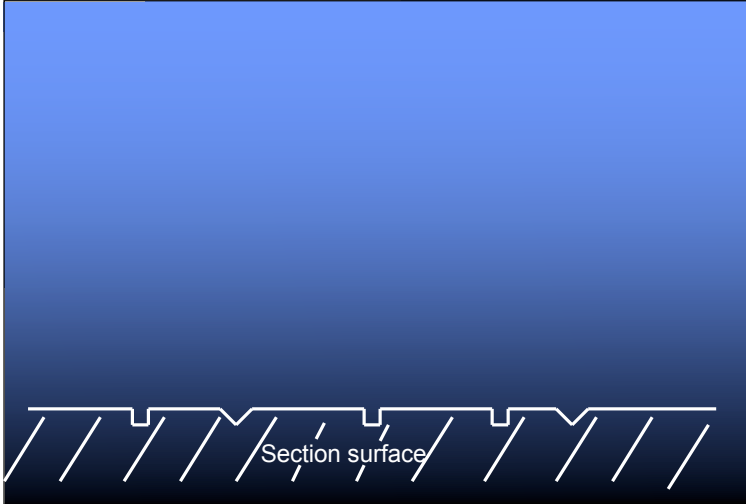
The two micrographs illustrate that antibodies from the same species (blue Y-shapes) can bind to different antigens (yellow circles, red circles, green hexagons, and blue triangles) because their variable regions (tips) are different.

Solo per uso didattico, vietata la riproduzione, la diffusione o la vendita

6

Citologia Animale e Vegetale (corso A - I. Perroteau) - Techniques

① Tessuto (o cellule) fissato (esempio: paraformaldeide), tagliato (esempio microtomo) e fatto aderire su un porta oggetto



7

Solo per uso didattico, vietata la riproduzione, la diffusione o la vendita

Citologia Animale e Vegetale (corso A - I. Perroteau) - Techniques


② Sezione incubata con una goccia di anticorpo "primario" diretto contro uno specifico "antigene". Nell'esempio, l'anticorpo è stato prodotto in coniglio (R=rabbit)

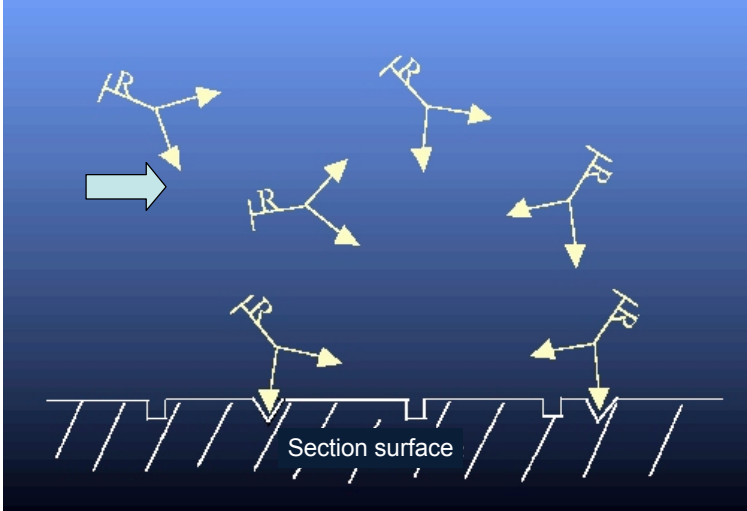


8

Solo per uso didattico, vietata la riproduzione, la diffusione o la vendita

Citologia Animale e Vegetale (corso A - I. Perroteau) - Techniques

② Lavaggio via 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 che non hanno interagito



9

Solo per uso didattico, vietata la riproduzione, la diffusione o la vendita

per identificare l'interazione "anticorpo-antigene" si possono utilizzare diversi approcci in funzione della tecnica che si intende applicare:

Anticorpo coniugato ad un attività enzimatica:

----> Immunocistochemica in campo chiaro ----> microscopio tradizionale

Anticorpo coniugato ad un fluorocroma:

---> Immunofluorescenza (campo scuro) ---> microscopio a fluorescenza tradizionale o confocal

Anticorpo coniugato a particelle d'oro:

---> Immunogold ---> microscopio elettronico a trasmissione (TEM)

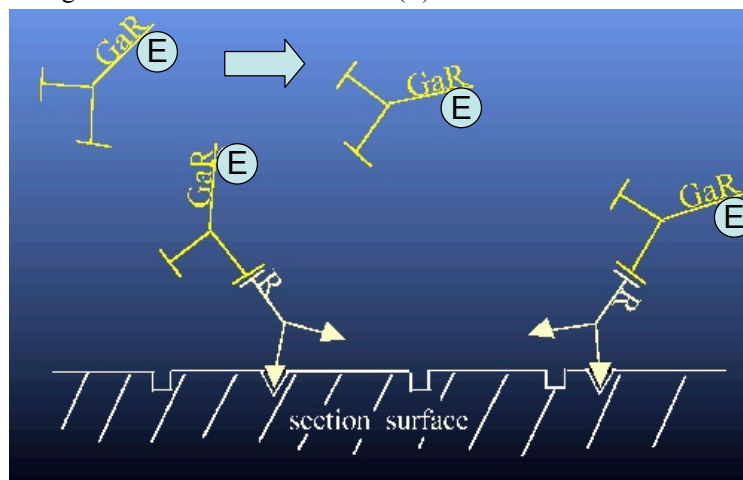
- :=) Reazione immunoistochimica diretta:
l'anticorpo modificato è quello primario.
Questo approccio non è praticamente mai usato perché poco versatile. Necessità di avere per ciascun anticorpo primario le diverse forme modificate
- :=) Reazione immunoistochimica indiretta:
Si rivela l'interazione anticorpo primario (non modificato)- 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 modificato.
Questo approccio è quello scelto nel 90% dei casi.

11

Solo per uso didattico, vietata la riproduzione, la diffusione o la vendita

Anticorpo coniugato ad un attività enzimatica:

- ③ Nell'esempio la sezione della reazione precedente 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)



12

Solo per uso didattico, vietata la riproduzione, la diffusione o la vendita

Citologia Animale e Vegetale (corso A - I. Perroteau) - Techniques

Sezione incubata in presenza del substrato dell'enzima

4 **E** = enzima (perossidasi) **S** = substrato (DAB) **P** = prodotto della reazione enzimatica

13

Solo per uso didattico, vietata la riproduzione, la diffusione o la vendita

Citologia Animale e Vegetale (corso A - I. Perroteau) - Techniques

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

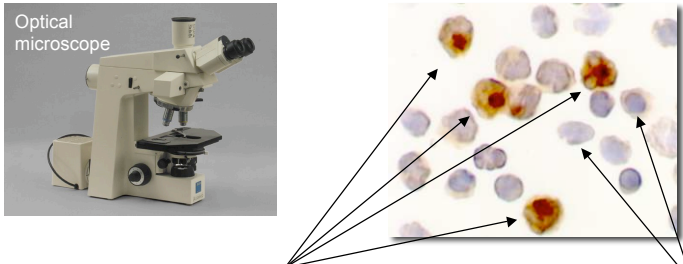
5 **E** = enzima (perossidasi) **S** = substrato (DAB) **P** = prodotto della reazione enzimatica

14

Solo per uso didattico, vietata la riproduzione, la diffusione o la vendita

Citologia Animale e Vegetale (corso A - I. Perroteau) - Techniques

Ad esempio, 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 all'IL-6" (la colorazione rivela la presenza di IL-6)

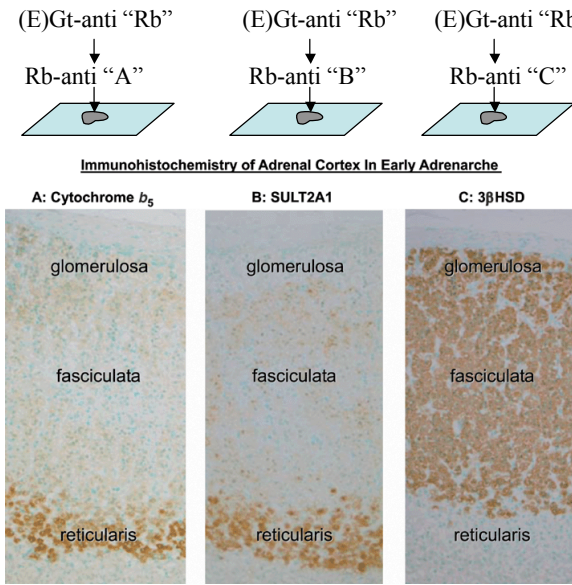
Le altre cellule, nonostante le similitudini morfologiche sono "negative all'IL-6"

15

Solo per uso didattico, vietata la riproduzione, la diffusione o la vendita

Citologia Animale e Vegetale (corso A - I. Perroteau) - Techniques

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



Immunohistochemistry of Adrenal Cortex In Early Adrenarche

A: Cytochrome b_5 B: SULT2A1 C: 3β HSD

glomerulosa glomerulosa glomerulosa
fasciculata fasciculata fasciculata
reticularis reticularis reticularis

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

Risultato dell'osservazione: "C" è espresso da cellule dello strato "glomerulosa e dallo strato "fasciculata". Questa reazione accomuna i 2 strati (non sono indistinguibili). "C" non è espresso dallo strato₆ reticularis.

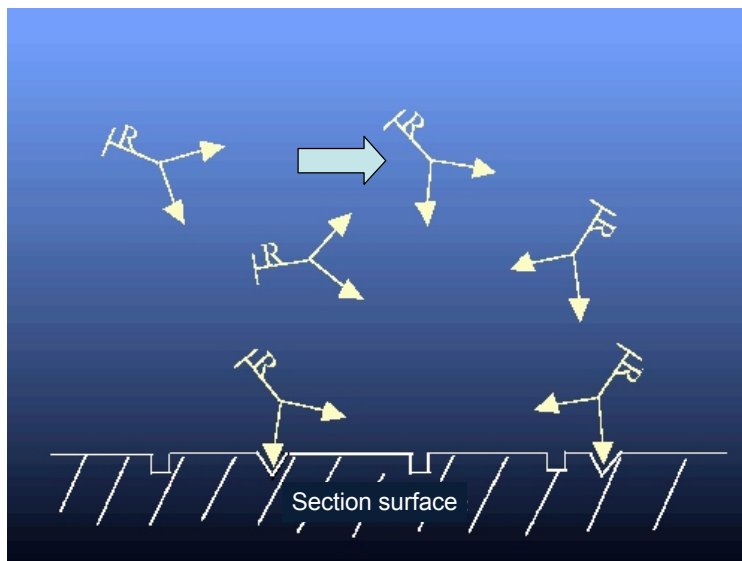
Solo per uso didattico, vietata la riproduzione, la diffusione o la vendita

“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.

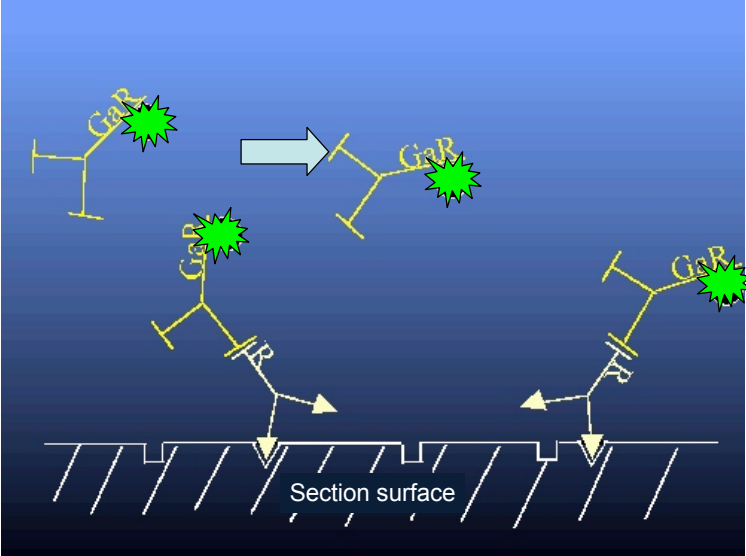
Immunofluorescenza

① Incubazione con l'anticorpo primario



Citologia Animale e Vegetale (corso A - I. Perroteau) - Techniques

2 Anticorpo secondario (GaR) coniugato a un fluorocromo:
Fluorescein isothiocyanate (FITC)



19

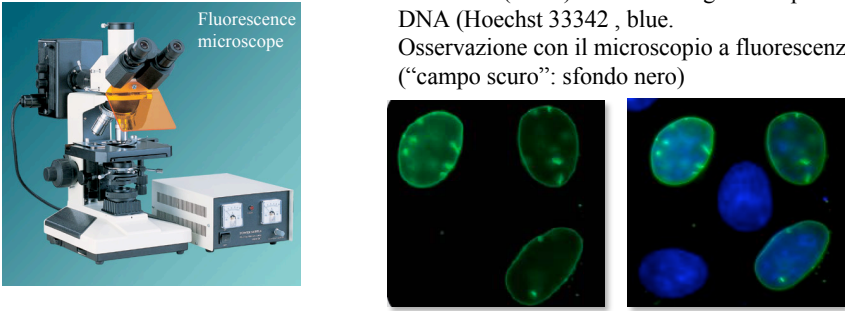
Solo per uso didattico, vietata la riproduzione, la diffusione o la vendita

Citologia Animale e Vegetale (corso A - I. Perroteau) - Techniques

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).

20

Solo per uso didattico, vietata la riproduzione, la diffusione o la vendita

“Doppia” immunofluorescenza

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

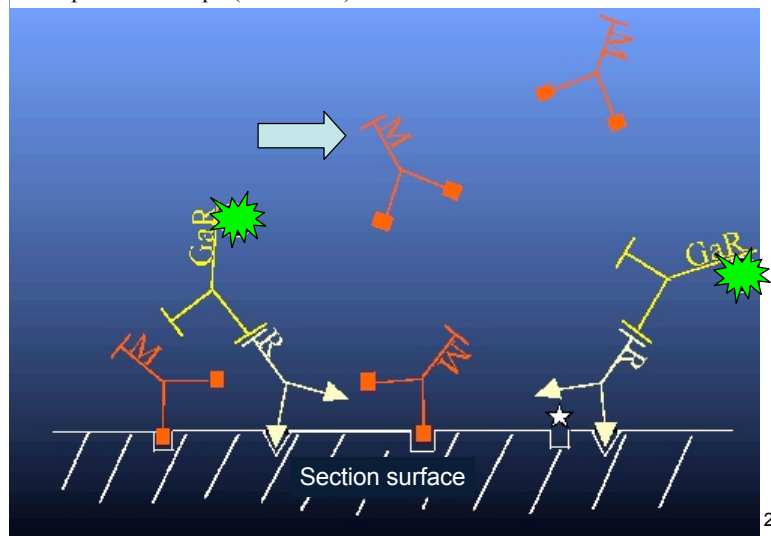
Come principio generale, le doppie marcature sfruttano la possibilità di utilizzare due anticorpi primari specifici di due antigeni diversi e prodotti in specie diverse.

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

21

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).

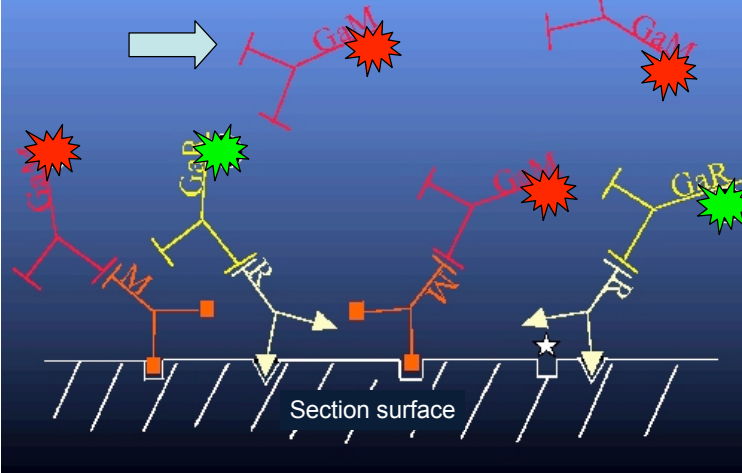


22

Citologia Animale e Vegetale (corso A - I. Perroteau) - Techniques

Doppia immunofluorescenza

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



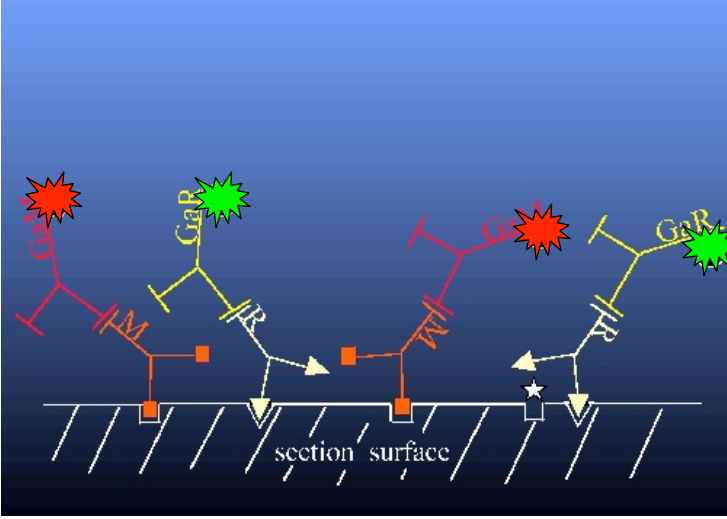
Section surface

23

Solo per uso didattico, vietata la riproduzione, la diffusione o la vendita

Citologia Animale e Vegetale (corso A - I. Perroteau) - Techniques

5 Risultato finale osservato al microscopio a fluorescenza tradizionale oppure confocal



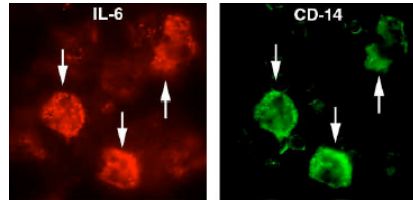
section surface

24

Solo per uso didattico, vietata la riproduzione, la diffusione o la vendita

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'onde 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 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 (flecce bianche) indica che le stesse cellule esprimono IL-6 e CD-14. Il risultato permette di concludere che i monociti esprimono IL-6.

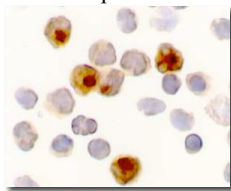
Nota: Nella foto di destra notare in sotto fondo una marcatura rossa meno intensa che sta ad indicare che nel campo sono presenti altre cellule mononucleate non positive per l'IL-6

25

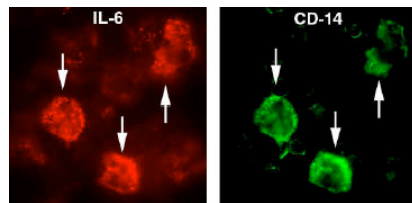
Solo per uso didattico, vietata la riproduzione, la diffusione o la vendita

Risultati a confronto:

Reazione immunoenzimatica precedente per IL-6:



Doppia immunofluorescenza per IL-6 e CD-14



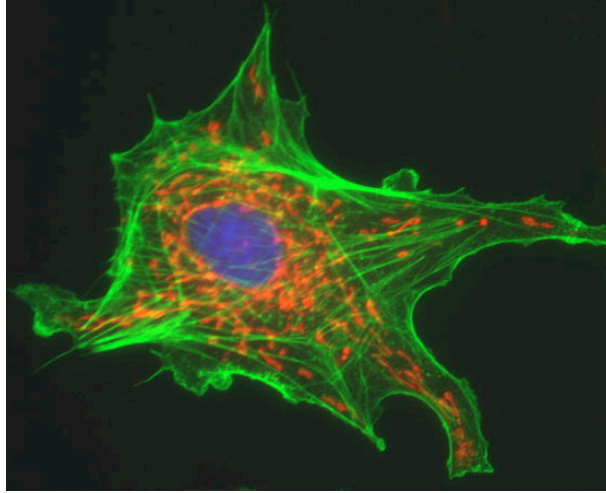
Risultato della reazione immunoenzimatica: alcune cellule mononucleate del sangue umano analizzate contengono IL-6.

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

26

Solo per uso didattico, vietata la riproduzione, la diffusione o la vendita

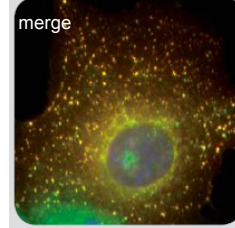
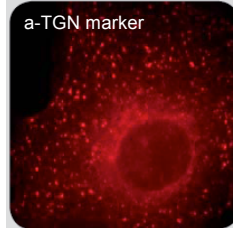
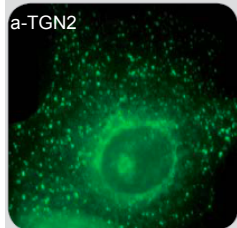
A mammalian epithelial tissue culture cell with mitochondria labeled red, actin labeled green and DNA labeled blue.



27

The trans-Golgi integral network membrane protein 2:

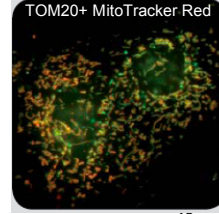
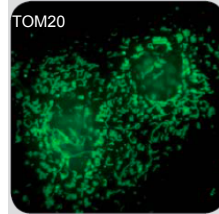
This protein is thought to be involved in the morphology of the TGN as well as in the formation of secretory vesicles.



The mitochondrial import receptor subunit TOM20

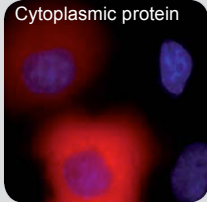
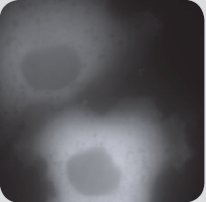
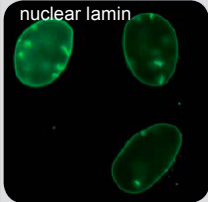
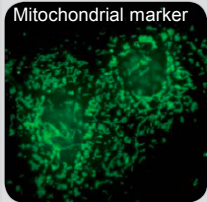
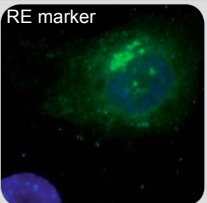
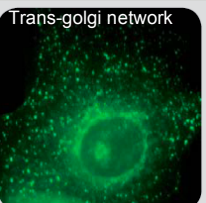
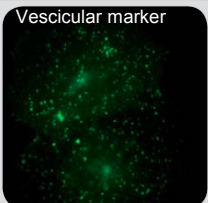
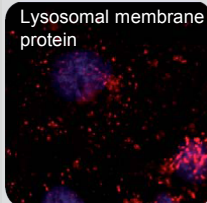
TOM 20 is an outer mitochondrial membrane protein that functions as a major receptor of the import receptor complex for cytoplasmically synthesized mitochondrial pre-proteins.

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



Citologia Animale e Vegetale (corso A - I. Perroteau) - Techniques

Immunohistochemistry

<p>Cytoplasmic protein</p> 		<p>nuclear lamin</p> 	<p>Mitochondrial marker</p> 
<p>RE marker</p> 	<p>Trans-golgi network</p> 	<p>Vescicular marker</p> 	<p>Lysosomal membrane protein</p> 

29

Solo per uso didattico, vietata la riproduzione, la diffusione o la vendita

Citologia Animale e Vegetale (corso A - I. Perroteau) - Techniques

Per la lezione di domani:
Cosè la GFP e a cosa serve?

30

Solo per uso didattico, vietata la riproduzione, la diffusione o la vendita