

IMUNOFLUORESCENCE

MUDr. Zita Trávníčková

Ústav klinické imunologie a alergologie FN USA a LF MU Brno

7.4.2008

Základní pojmy

LUMINISCENCE

Jev, kdy látka vysílá do prostoru světlo

- při chemické reakci → **CHEMILUMINISCENCE**
- po osvětlení zářením → **FLUORESCENCE**
→ **FOSFORESCENCE**

LUMINISCENCE po osvětlení zářením

Záření **EXCITAČNÍ**

- záření vyvolávající luminiscenci

Záření **EMISNÍ**

- záření vysílané látkou

LUMINISCENCE po osvětlení zářením

FLUORESCENCE

- vyzařování emisního světla trvá **krátkou dobu**
- po zhasnutí excitačního záření téměř okamžitě emise zhasíná (asi za 10^{-8} sekundy)
 - ❖ Látka schopná fluorescence → **FLUOROCHROM**

FOSFORESCENCE

- vyzařování emisního světla trvá i **dlouhou dobu** po zhasnutí excitačního záření

Fyzikální podstata fluorescence a fosforescence

- spočívá ve vlastnostech elektronového obalu atomů v molekulách fluorochromu
 - ❖ **Absorpce fotonu excitačního světla** → zvýšení jejich energie
 - ❖ **Vyzáření části nově nabyté energie jako foton s nižší energií** → tedy delší vlnovou délkou
 - ❖ Stokeovo pravidlo - v důsledku ztráty energie je vlnová délka emisního světla vždy delší než světla excitačního → **POSUN EMISNÍHO SVĚTLA K ČERVENÉ ČÁSTI SPEKTRA**

IMUNOFLUORESCENCE

- Patří mezi IMUNOESEJE

imunokomplex ANTIGEN - PROTIŁÁTKA

+ enzym

ENZYMOVÁ ANALÝZA

+ radioaktivní zářič

RIA

+ fluorochrom

IMUNOFLUORESCENCE

TYPY imunofluorescence

PŘÍMÁ

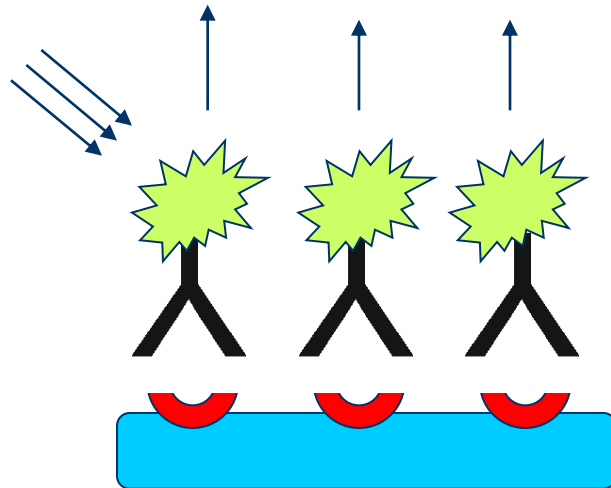
- Značení buněčných struktur pomocí **konjugátu**
 - Protilátka namířená proti určité buněčné struktuře kovaletně navázaná s fluorochromem

NEPŘÍMÁ

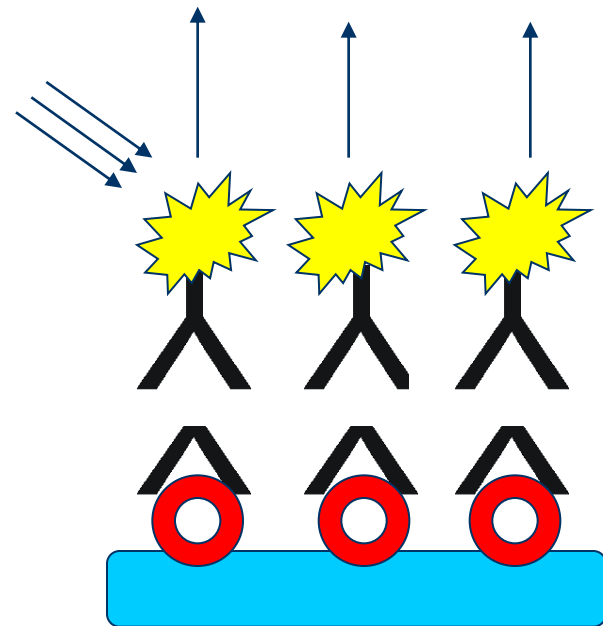
- Značení buněčné struktury pomocí primární zvířecí protilátky proti buněčné struktuře
- Zviditelnění buněčné struktury v druhém kroku pomocí konjugátu fluoresceinu s protilátkou proti zvířecím antigenům

TYPY imunofluorescence

PŘÍMÁ



NEPŘÍMÁ



PŘÍMÁ imunofluorescence

Jednostupňový průkaz antigenu

- 1 **vzorek** (buněčná kultura, tkáň, ...)
- 2 **fixace** (vzorku na podložní sklo)
- 3 **konjugát** (protilátka proti antigenu s navázaným fluorochromem)
- 4 **proplach**
- 5 **fluorescenční mikroskop**

Přímá IF - využití

- Průkaz **antigenu** v tkáňových řezech nebo dalších biologických vzorcích
 - rychlý průkaz patogenů ve sputu nebo bronchoalveolární laváži

Nepřímá imunofluorescence

Průkaz protilátek v séru

- 1 **vzorek** (substrát s antigenem)
- 2 **fixace** (vzorku na podložní sklíčko)
- 3 **přelití vyšetřovaným sérem pacienta**
- 4 **proplach**
- 5 **konjugát** (antisérum proti lidským Ig s navázaným fluorochromem)
- 6 **proplach**
- 7 **fluorescenční mikroskop**

Nepřímá IF - využití

- Průkaz specifických **protilátek** proti antigenům
- Nejčastěji **průkaz autoproti látek**
 - *orgánově nespecifických* (antinukleárních, antimitochondriálních, antiendomysálních)
 - *orgánově specifických* (proti parietálním buňkám žaludku, beta buňkám pankreatu, bazální membráně glomerulů, slinným žlázám, nadledvinám, ...)

Některé používané FLUOROCHROMY

- **FITC** (fluorescein isothiokyanát)
 - široce používané
- **Hoechst** (bisbenzimid)
 - DNA
- **DAPI**
 - DNA a RNA
- **Ethidium bromid**
 - Dvouřetězcová DNA a RNA
- **Propidium Jodid**
 - DNA
- **Acridinová oranž**
 - DNA a RNA
- **Congo Red**
 - amyloid

Vizualizace imunofluorescence

Pomocí fluorescenčního mikroskopu

- **TYPY** fluorescenčních mikroskopů
 - transmisní
 - epifluorescenční
- **ZDROJ SVĚTLA**
 - rtuťová výbojka

Princip IF mikroskopu

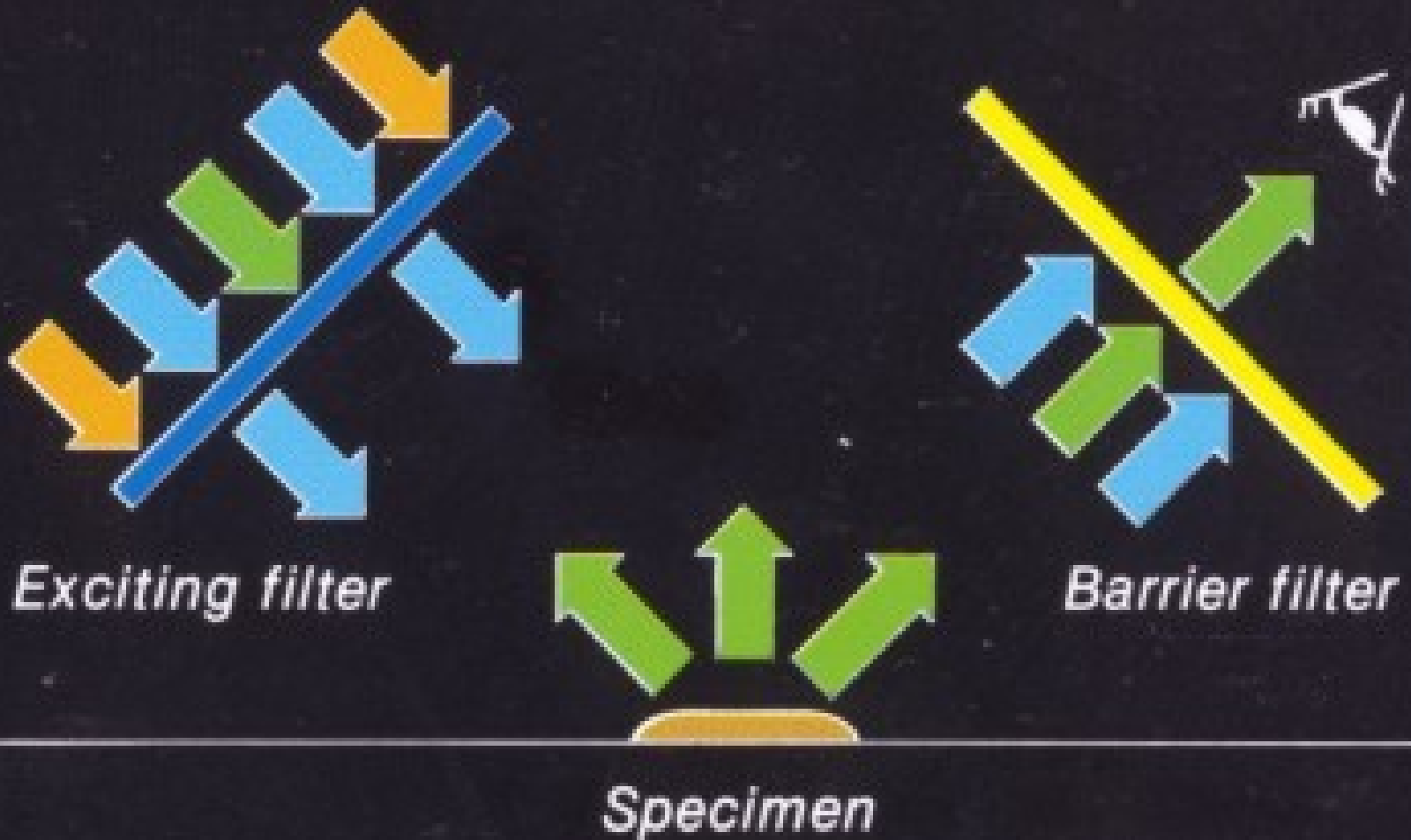
- **EXCITAČNÍ filtr**

- **propouští** z barevného spektra pouze **část potřebnou pro excitaci** fluorescence a zabraňuje průchodu světla o stejné či podobné vlnové délce jako světlo emisní, které by vytvářelo pozadí

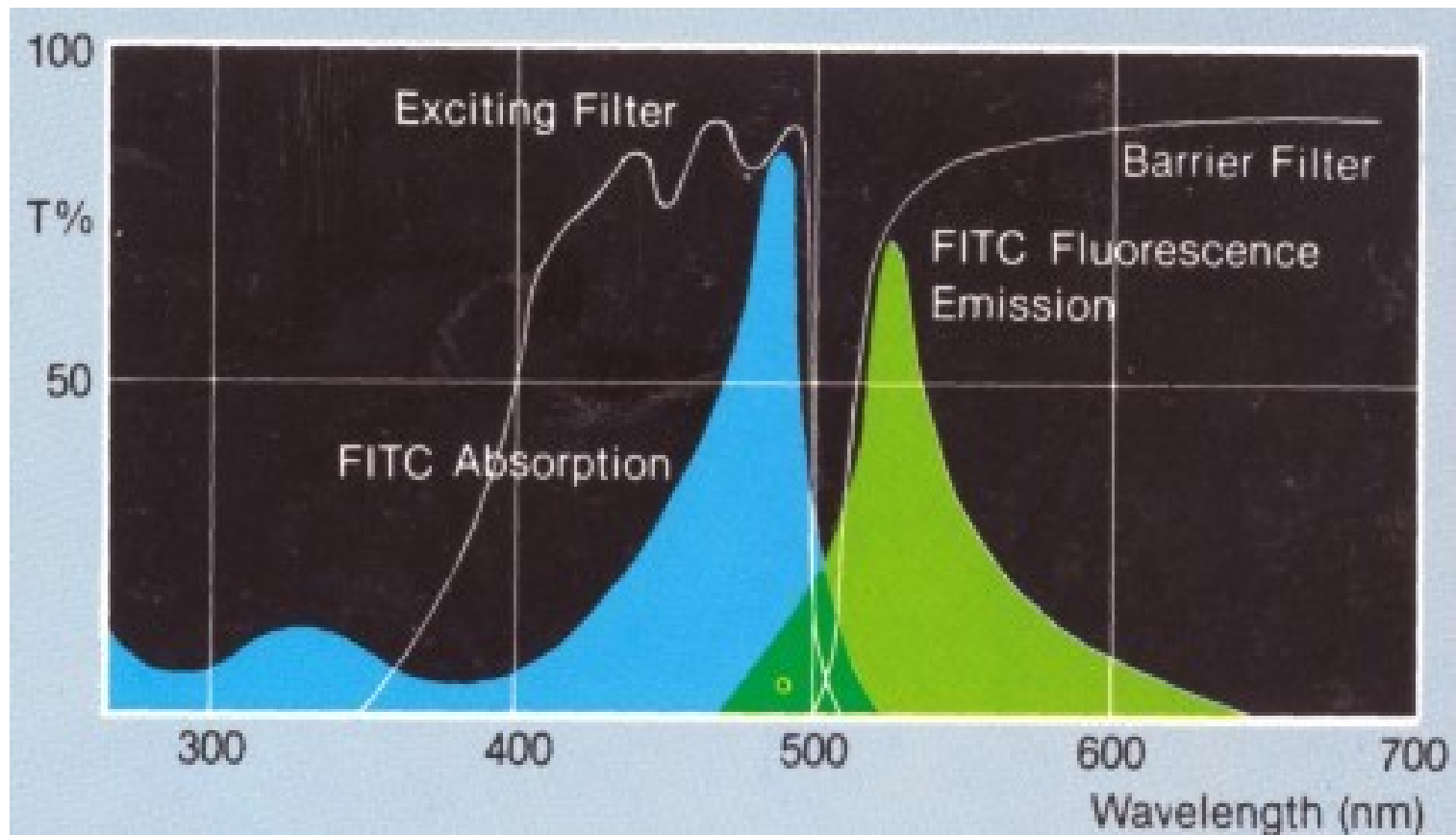
- **BARIÉROVÝ filtr**

- **propouští** pouze **emisní část spektra** a zabraňuje průchodu excitačnímu světlu

Princip IF mikroskopu



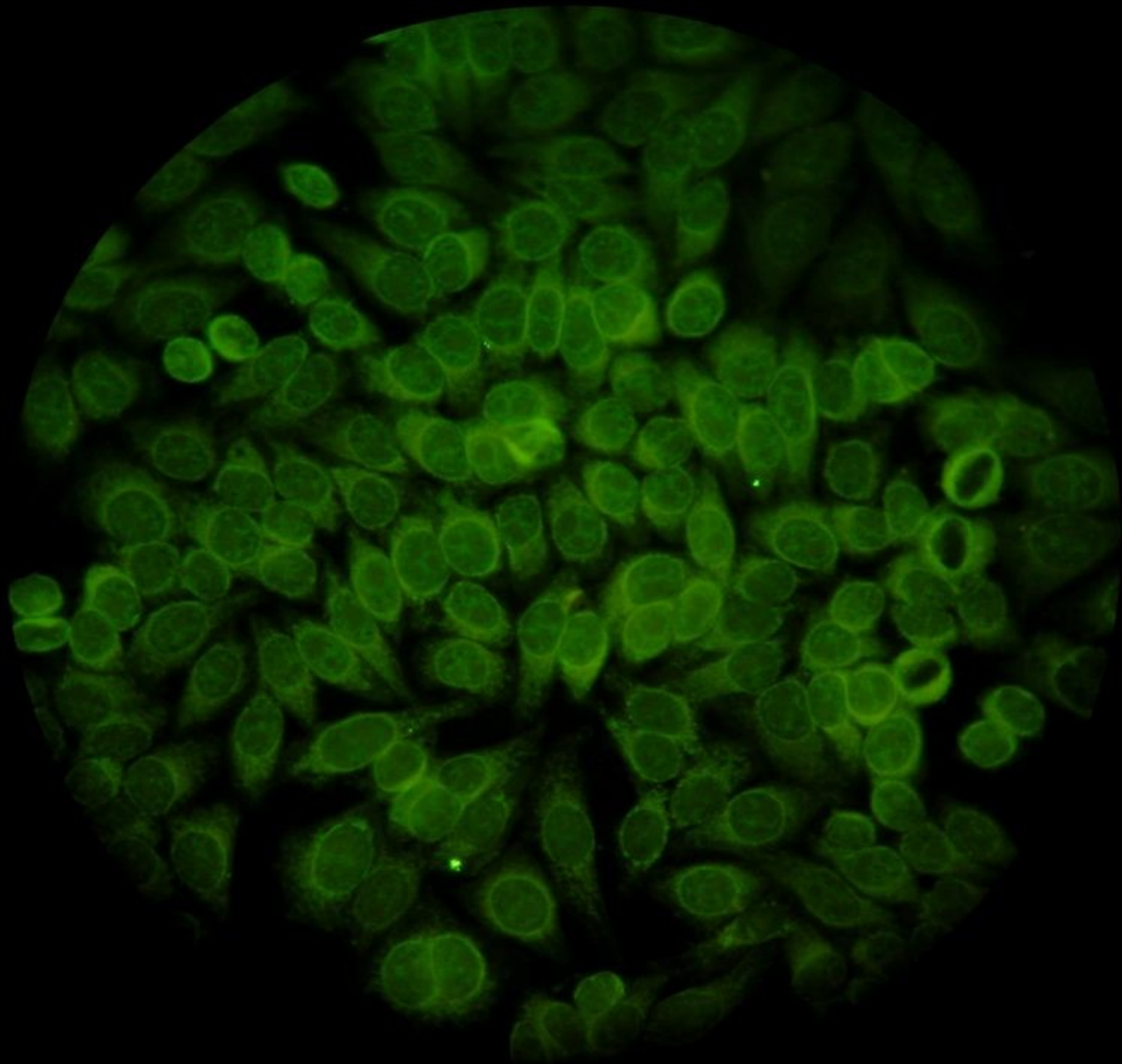
Excitační (modrá) a emisní (zelená) spektrum fluorochromu FITC a spektra propouštěná excitačním a bariérovým filtrem (bílá čára).



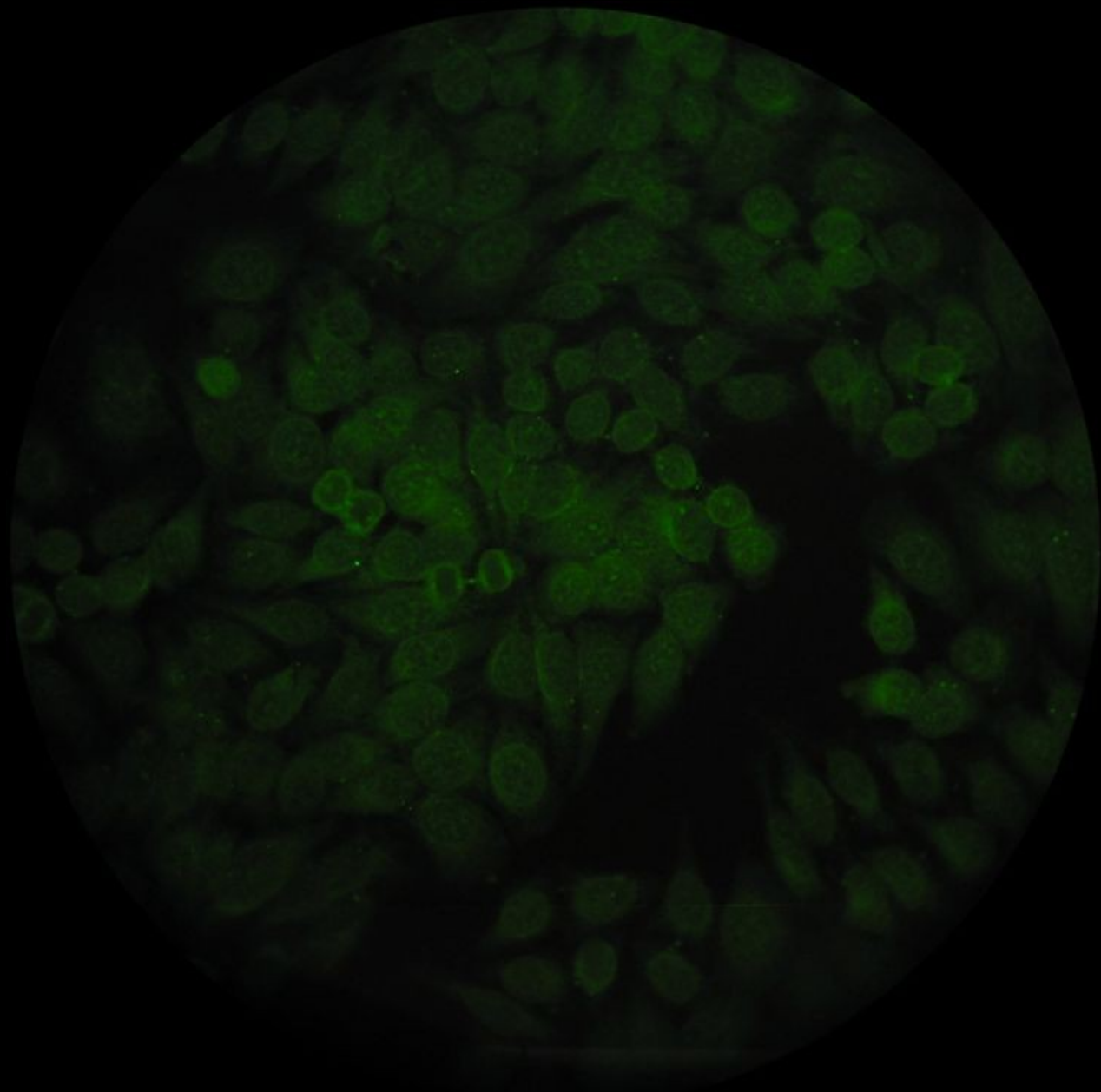
Typy imunofluorescence

- HOMOGENNÍ
- OKRAJOVÝ
- SKVRNITÝ
- NUKLEOLÁRNÍ (homogenní, chomáčkovitý skvrnitý)
- TEČKOVANÝ
- CYTOPLAZMATICKÝ

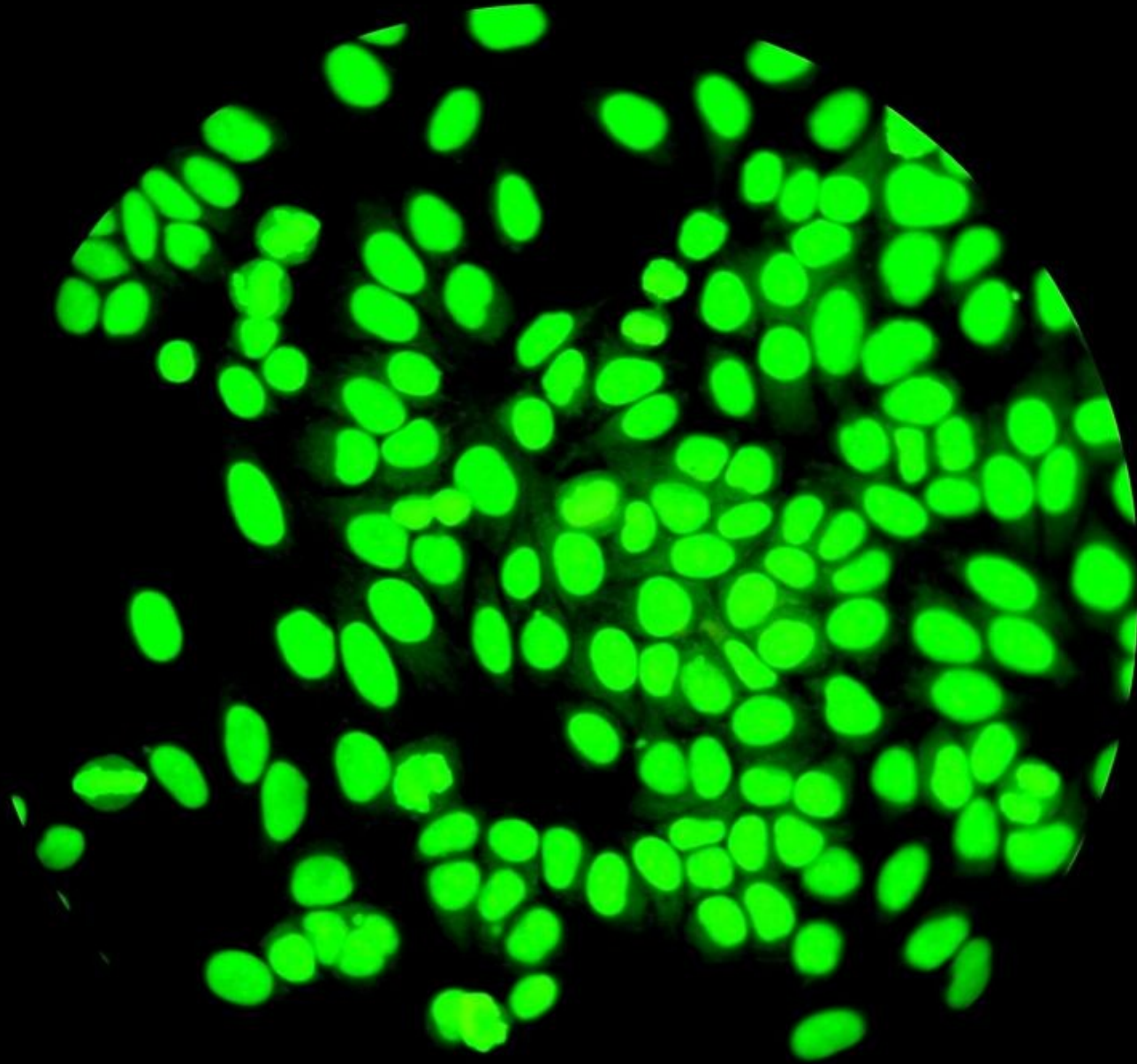
Negativní



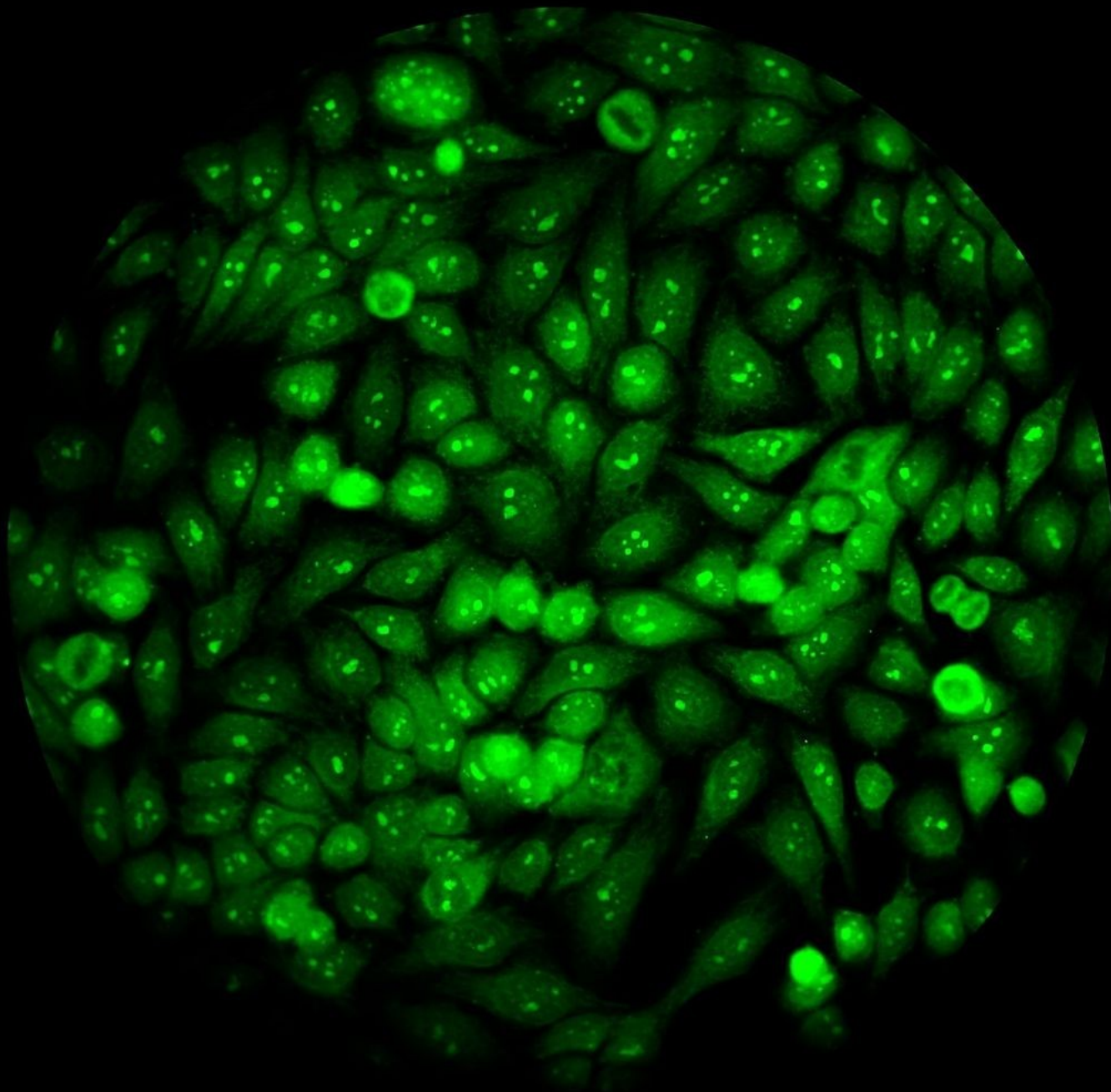
Negativní



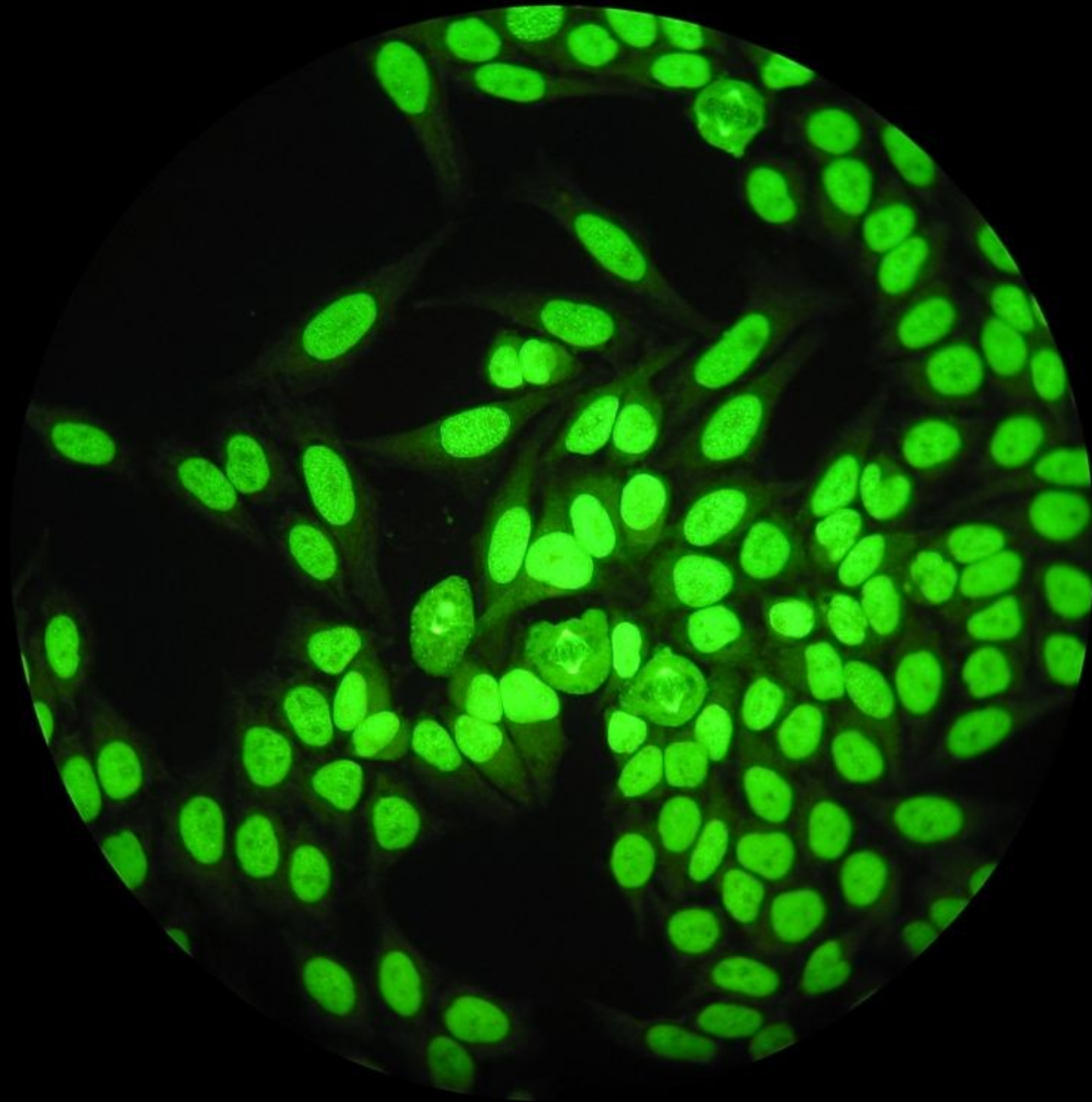
Homogenní



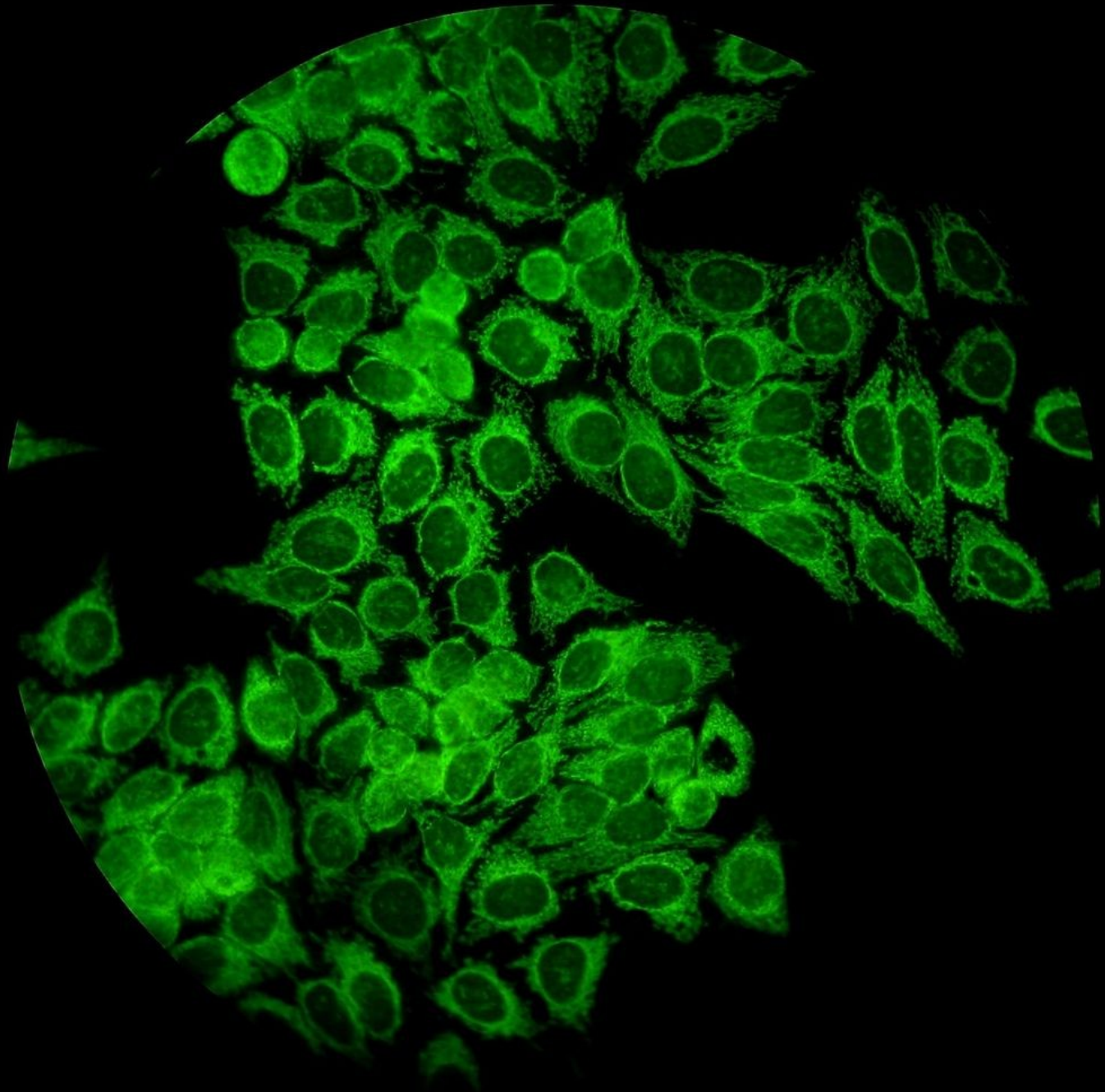
Nukleolární



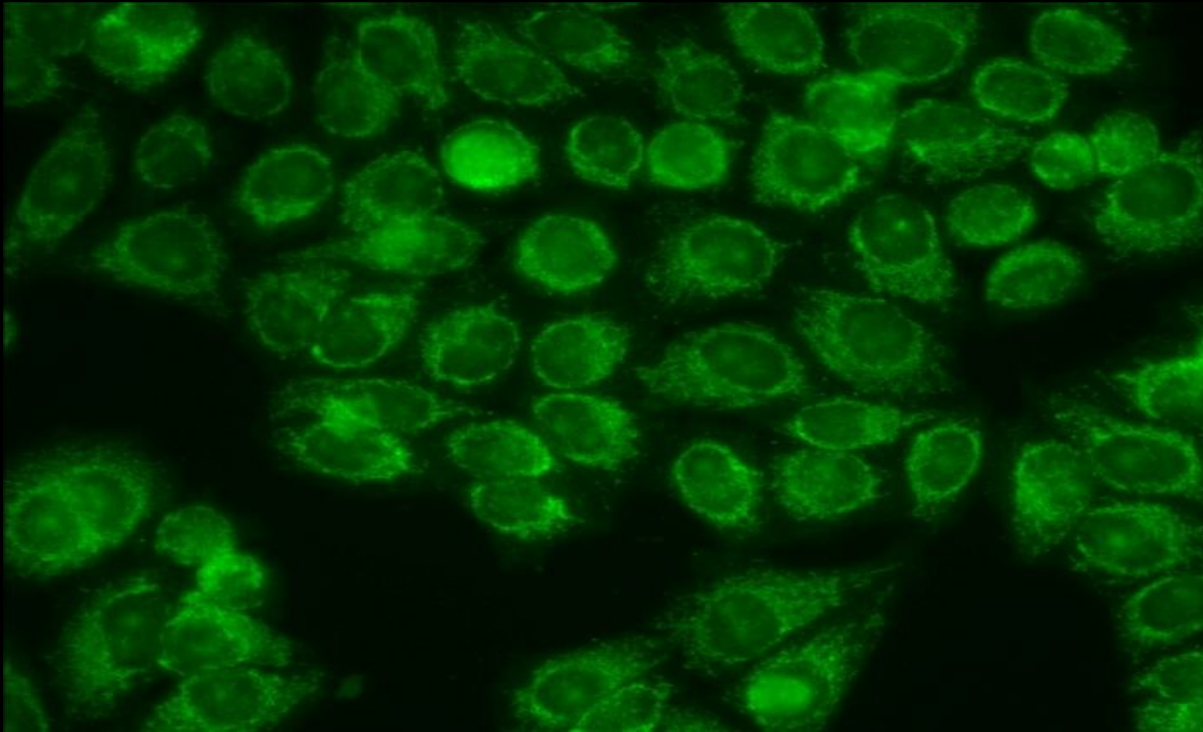
**Granulární
(+ mitotický
aparát)**



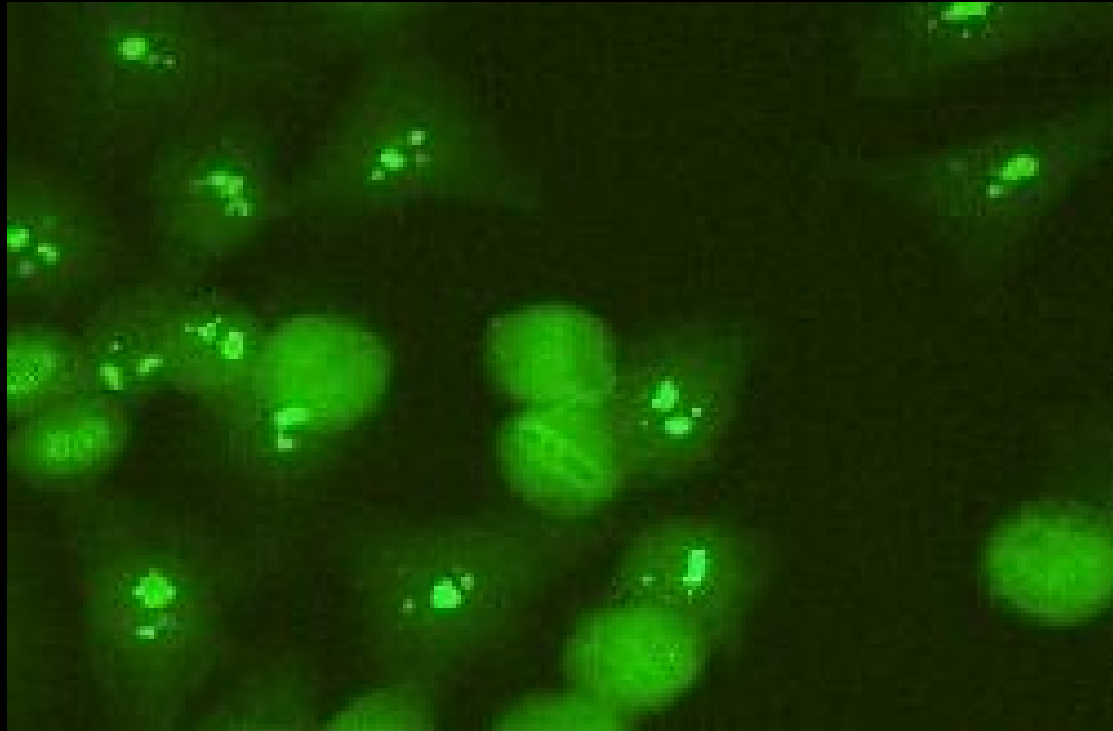
AMA



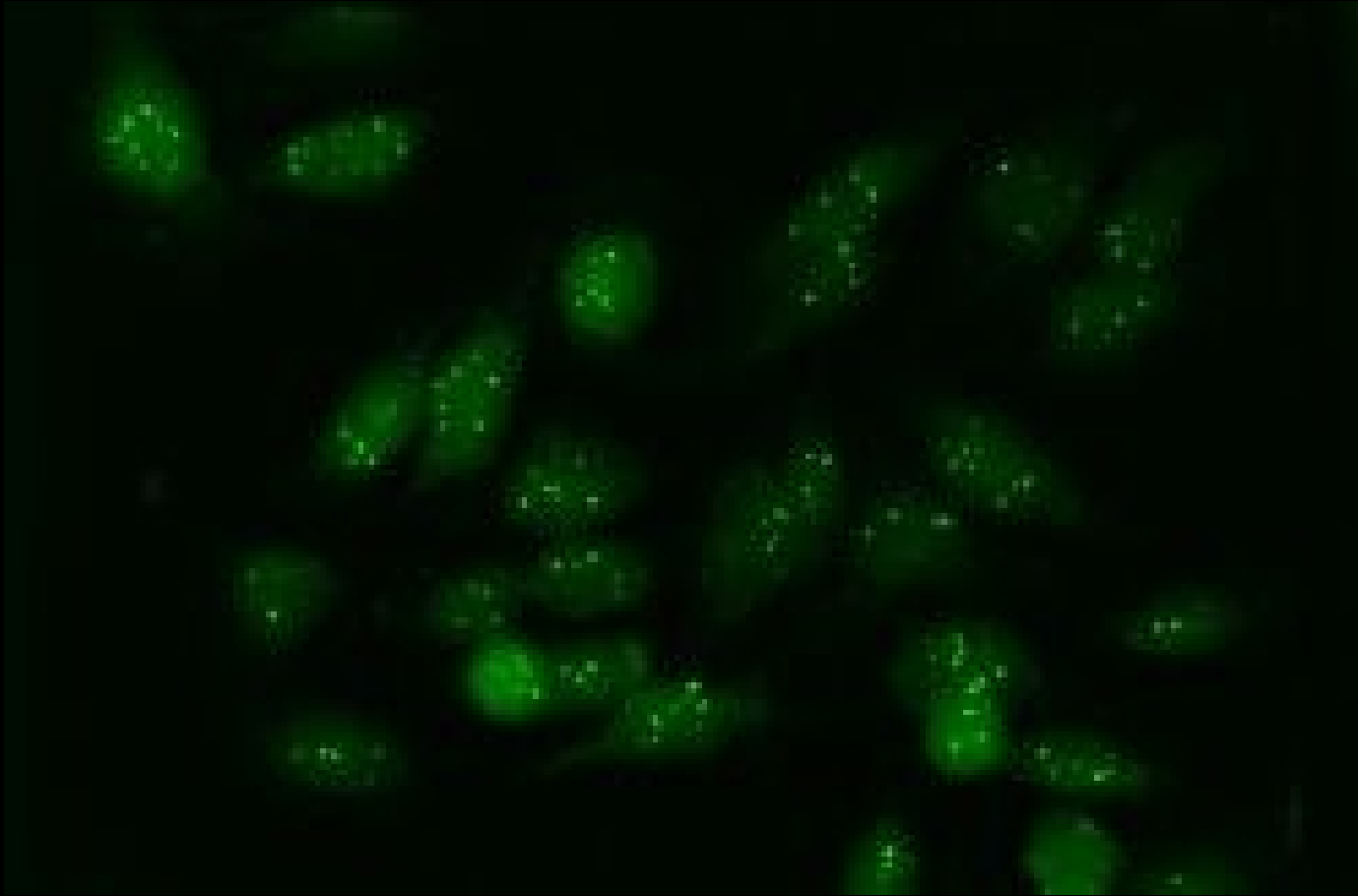
Mitochondrie



Nukleolární homogenní



Mnohočetné jaderné tečky



Přehled vyšetření pomocí IF

- ANCA - cytoplazma neutrofilů
- DNA - ds DNA
- ENA - extrahovatelné nukleární antigeny
- AMA - mitochondrie
- ANA = ANF = antinukleární faktor (antigen)
- RET – Ab proti retikulínu (IgA a IgG)
- ASMA – Ab proti hladkému svalu
- GPC – Ab proti parietálním buňkám žaludku
- EMA – antiendomysální protilátky

DĚKUJI ZA POZORNOST

