

# 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

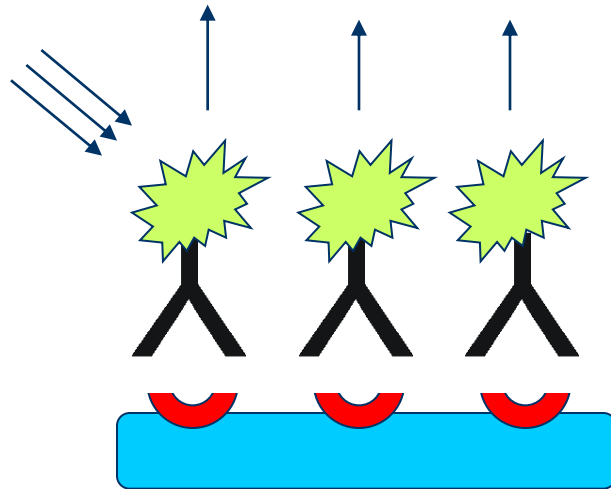
- Značení buněčných struktur pomocí **konjugátu**
  - Protilátka namířená proti určité buněčné struktuře kovaletně navázaná s fluorochromem

## NEPŘÍMÁ

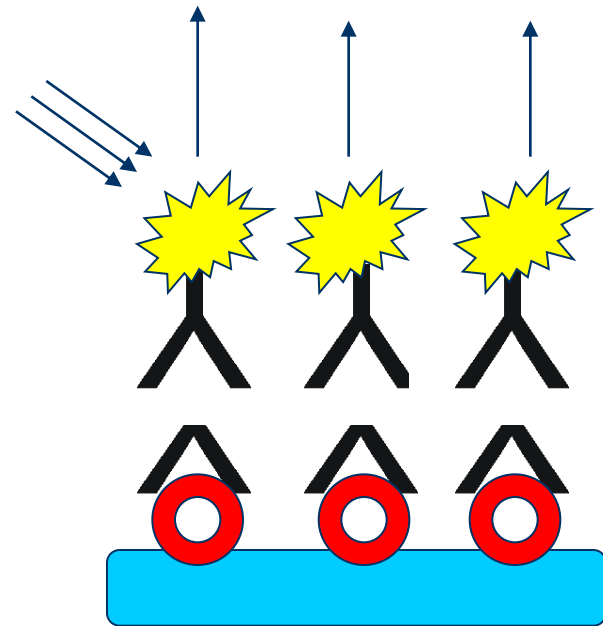
- Značení buněčné struktury pomocí primární zvířecí protilátky proti buněčné struktuře
- Zviditelnění buněčné struktury v druhém kroku pomocí konjugátu fluoresceinu s protilátkou proti zvířecím antigenům

# 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

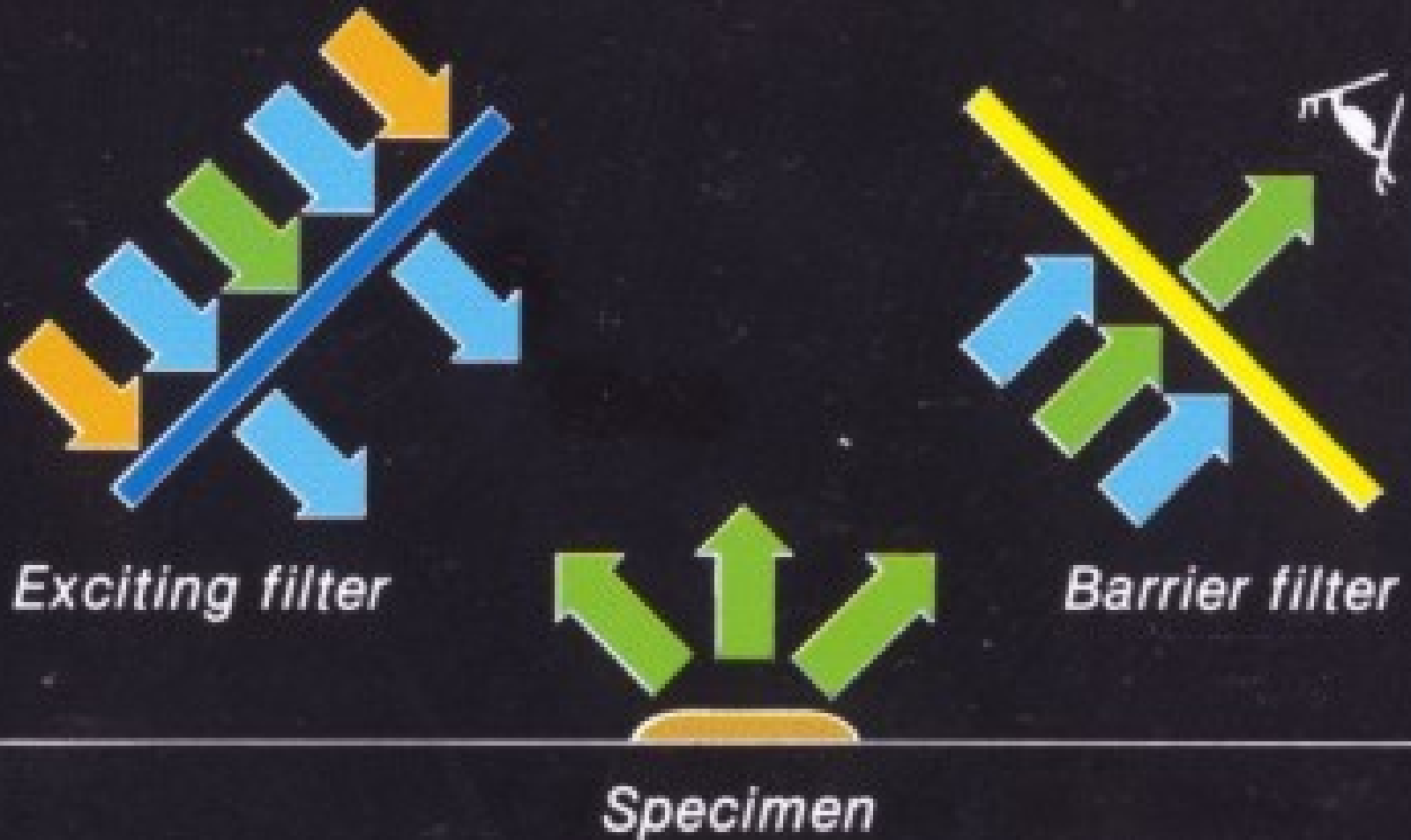
- **EXCITAČNÍ filtr**

- **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**

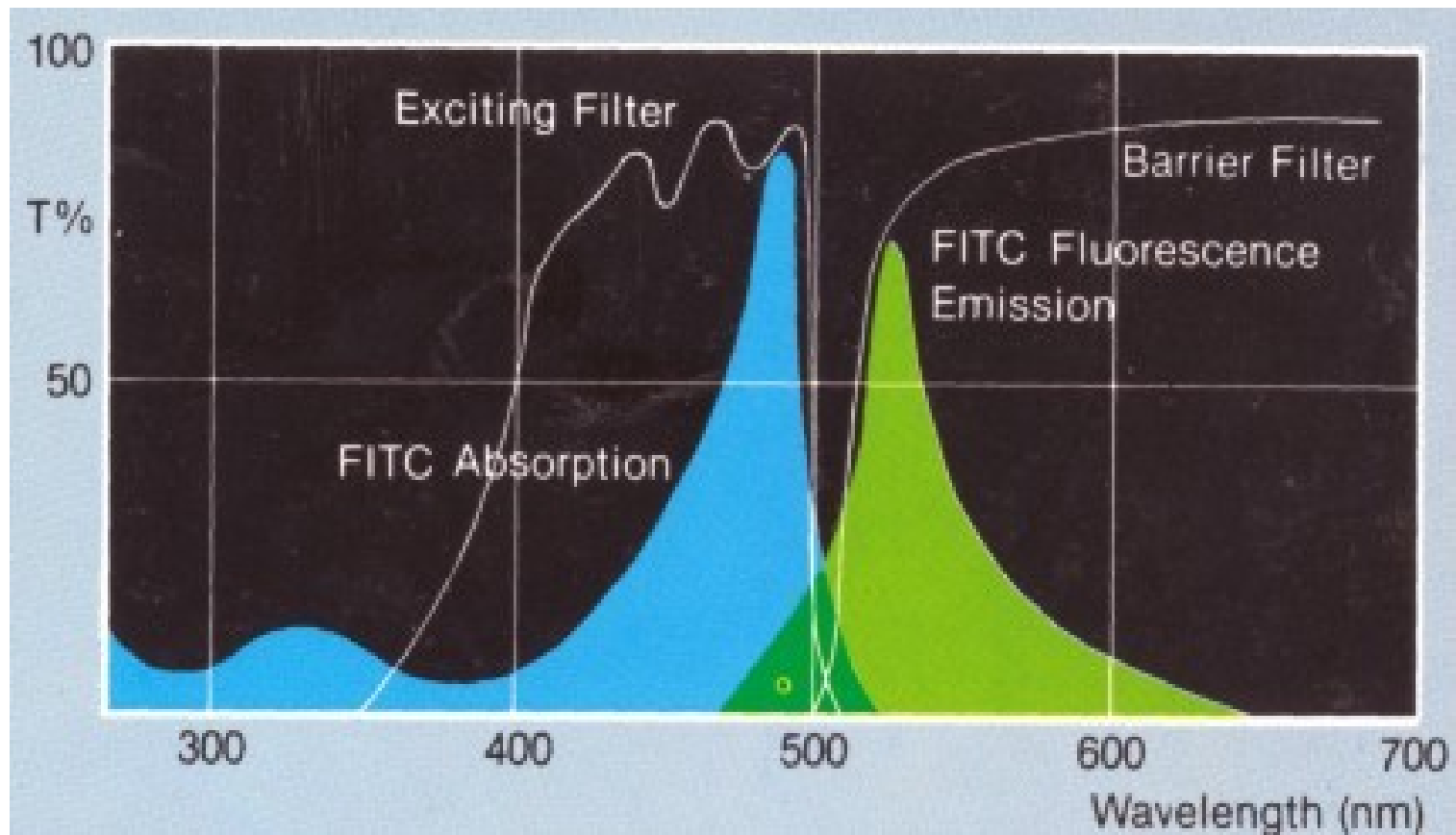
- **propouští** pouze **emisní část spektra** a zabraňuje průchodu excitačnímu světlu

# Princip IF mikroskopu





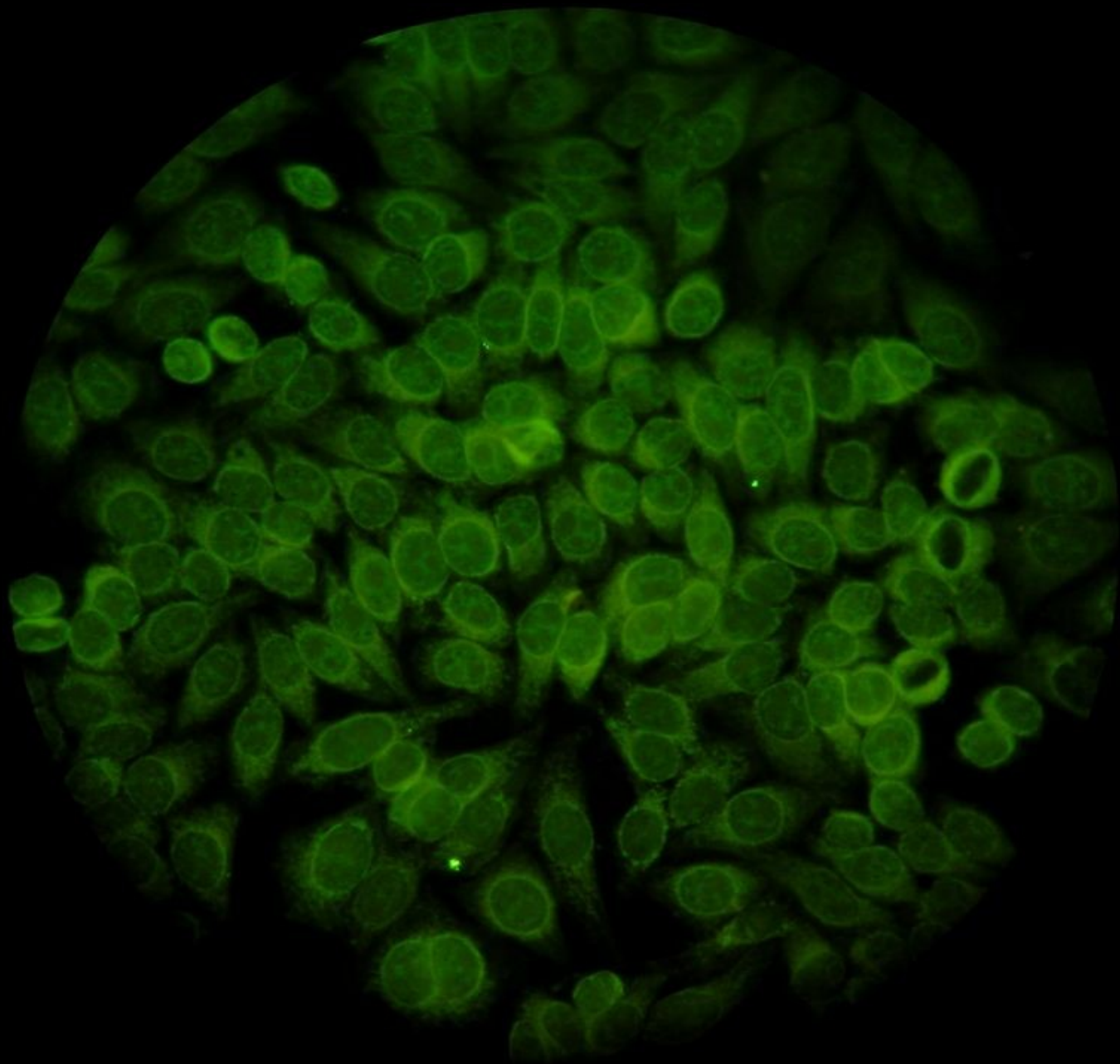
*Excitační (modrá) a emisní (zelená) spektrum fluorochromu FITC a spektra propouštěná excitačním a bariérovým filtrem (bílá čára).*



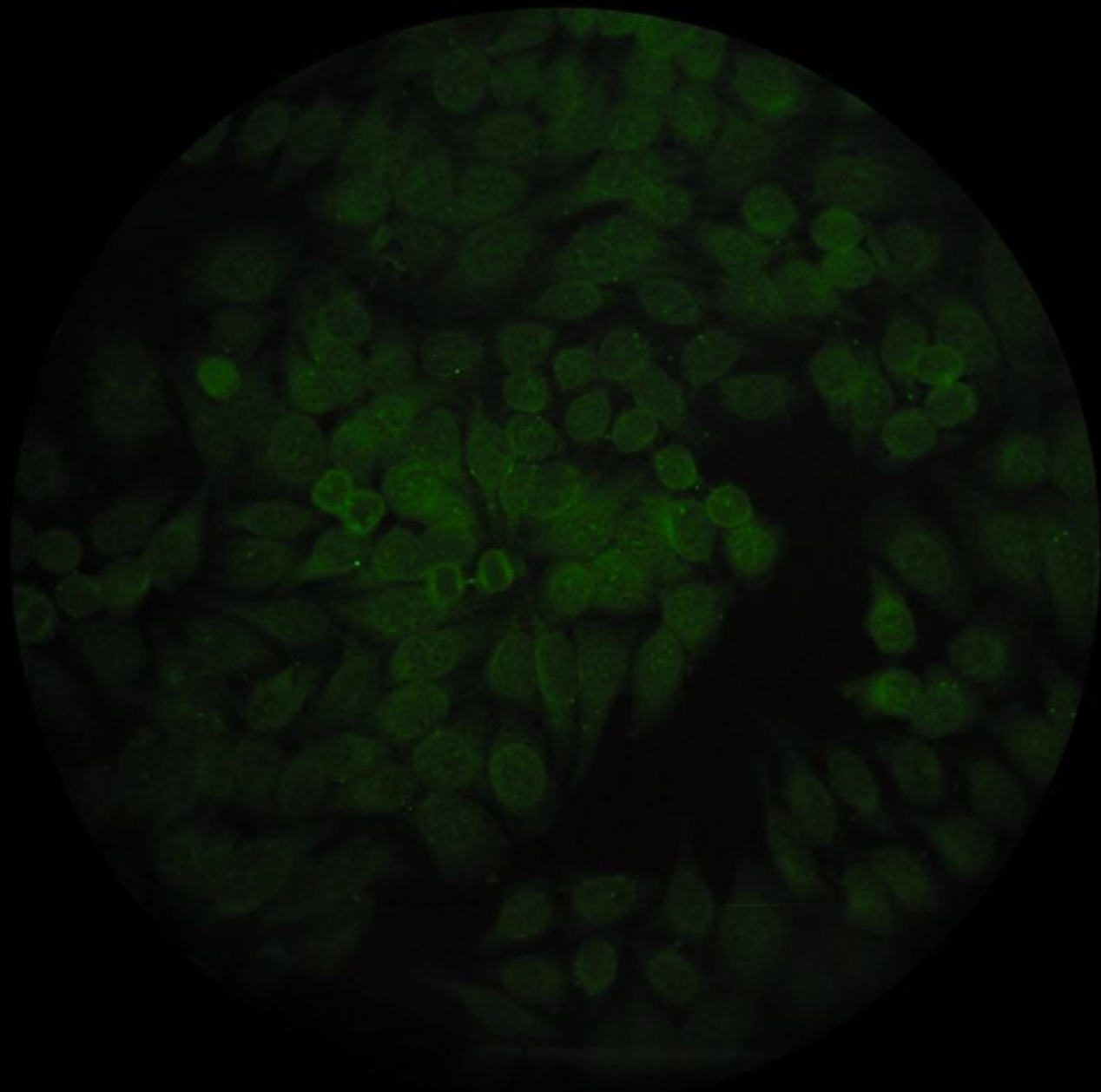
# Typy imunofluorescence

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

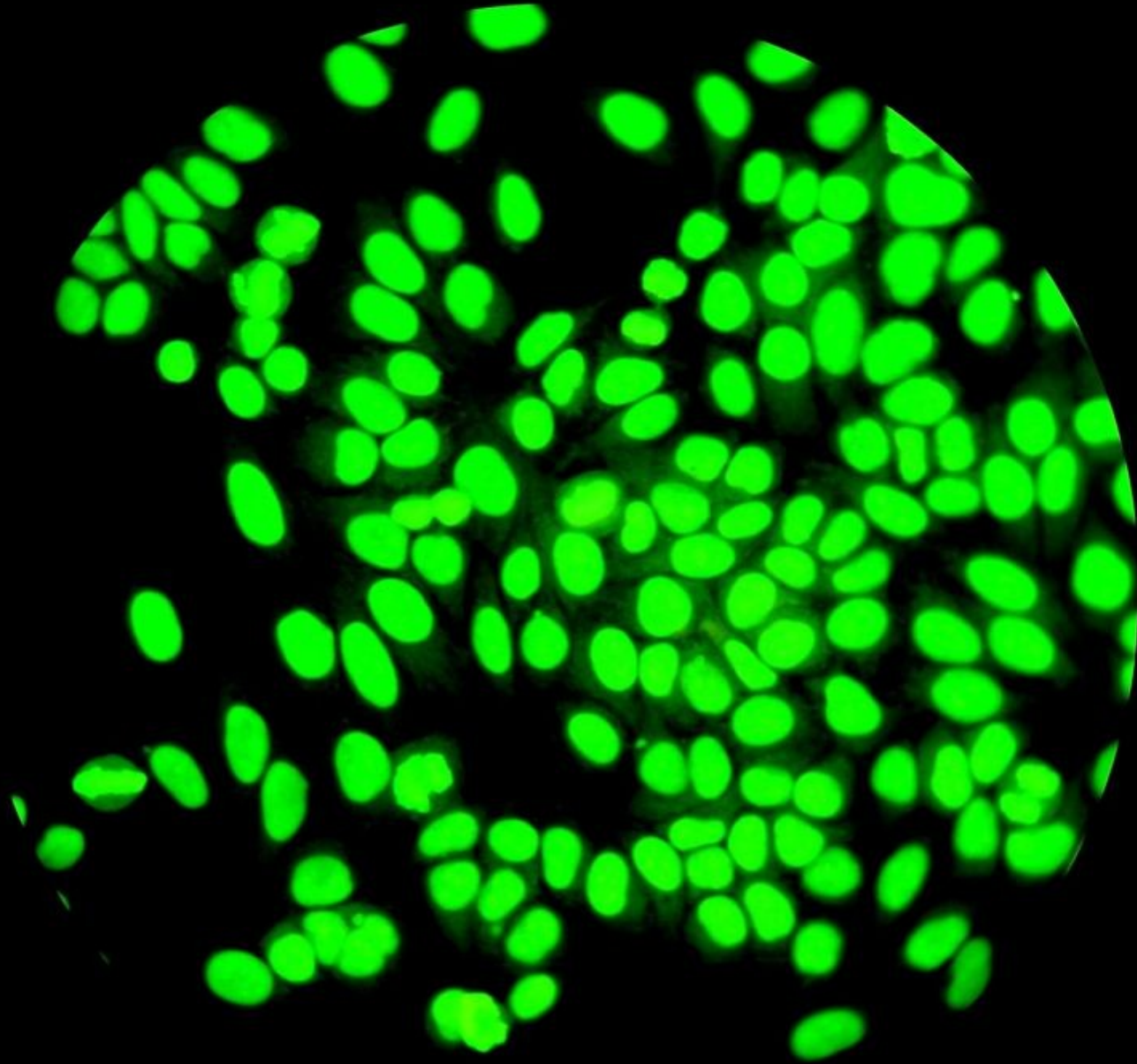
**Negativní**



**Negativní**

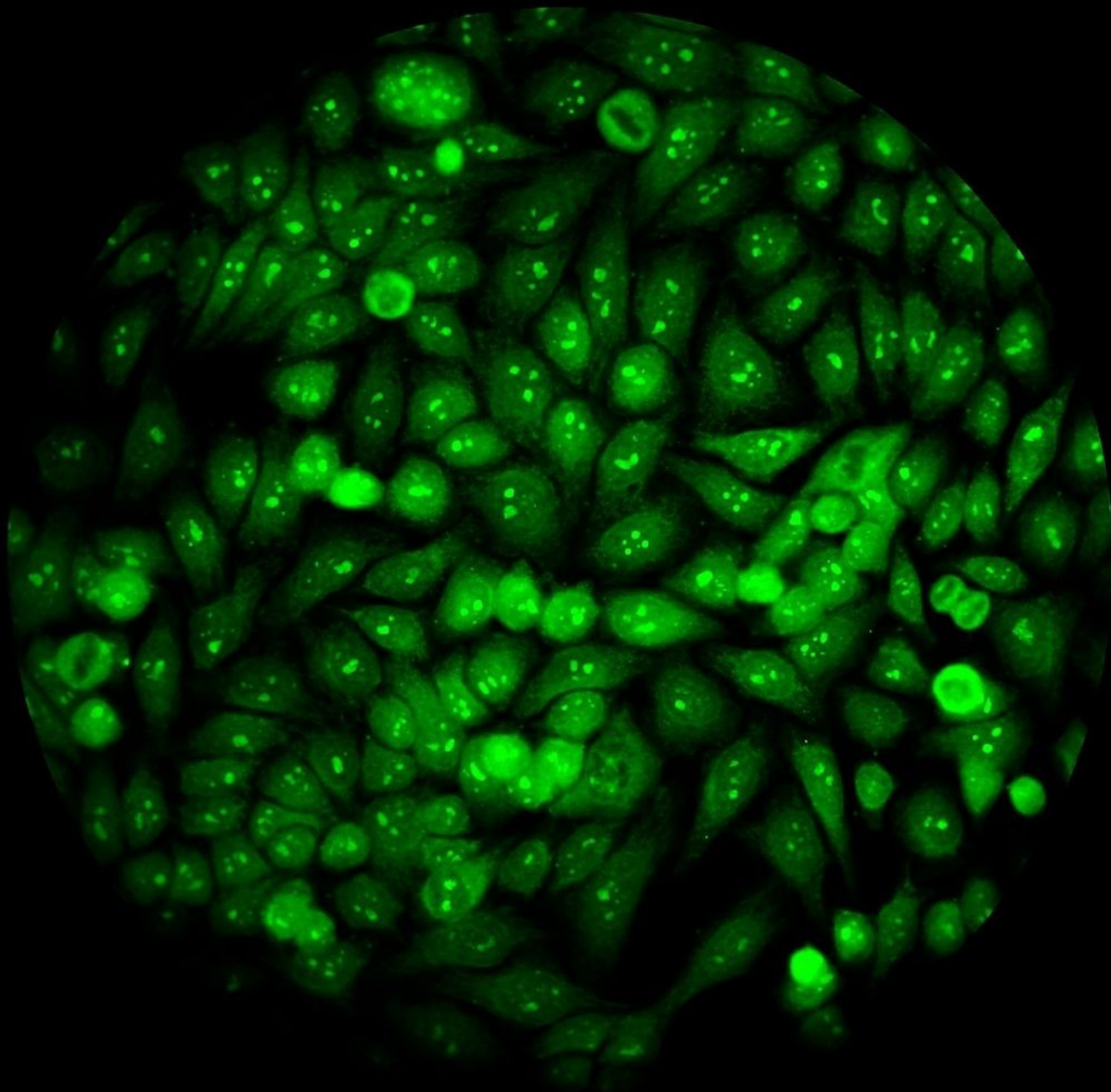


**Homogenní**

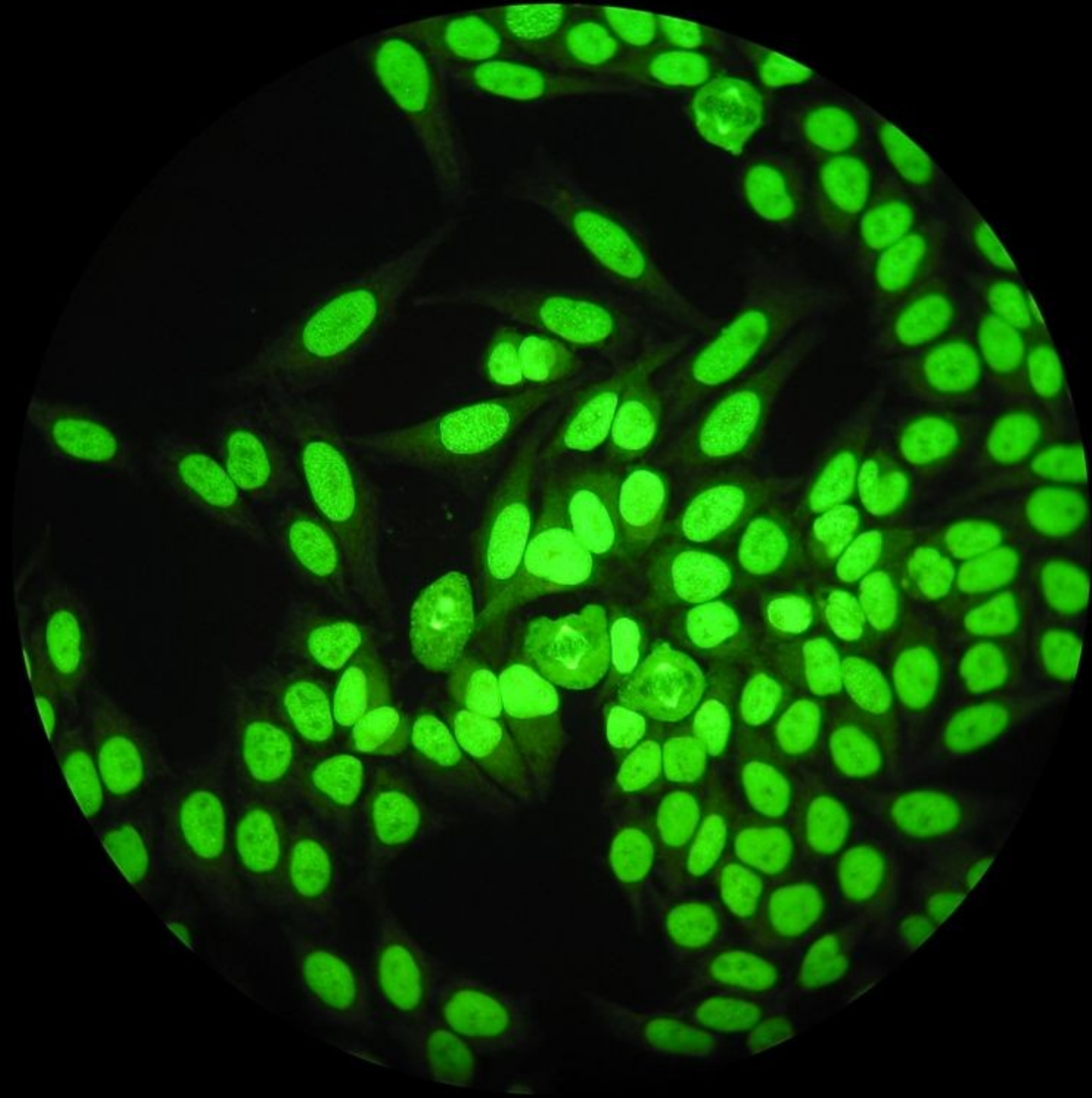




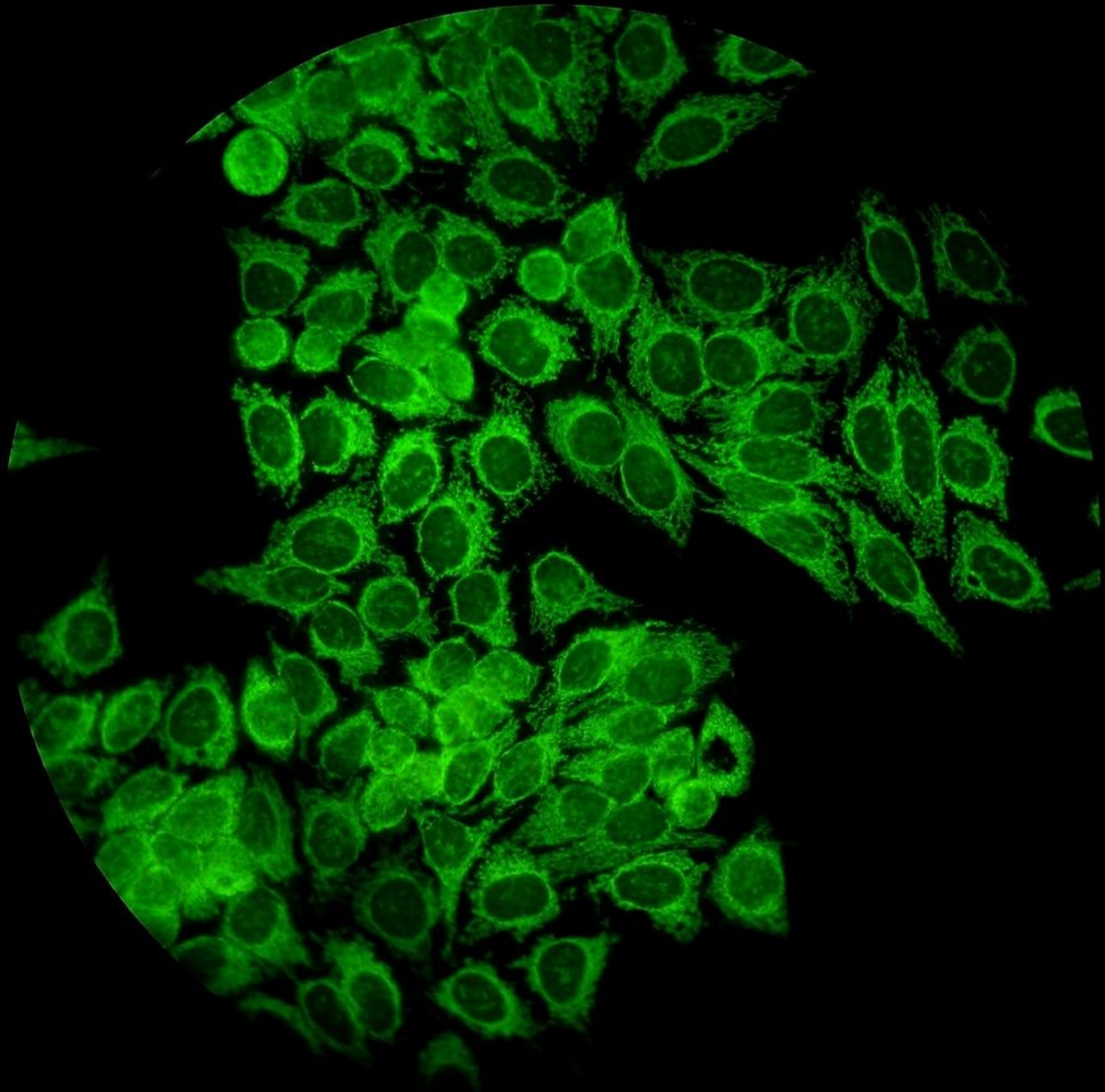
# Nukleolární



**Granulární  
(+ mitotický  
aparát)**

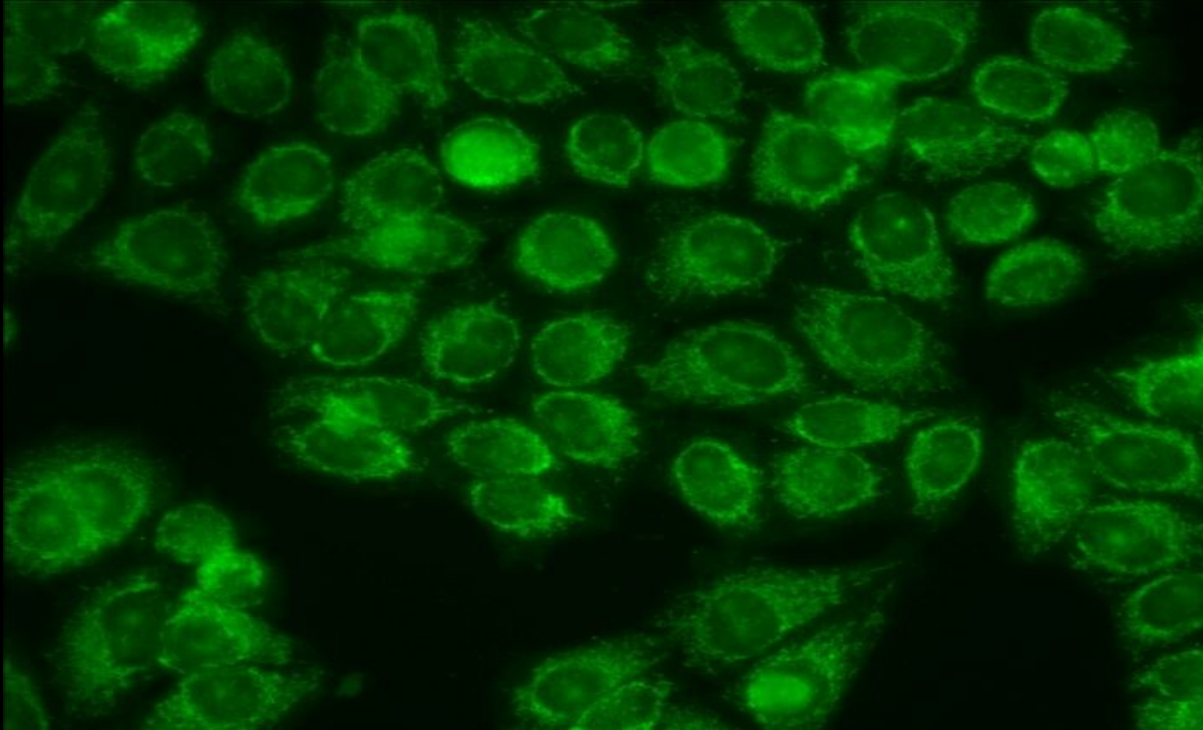


**AMA**

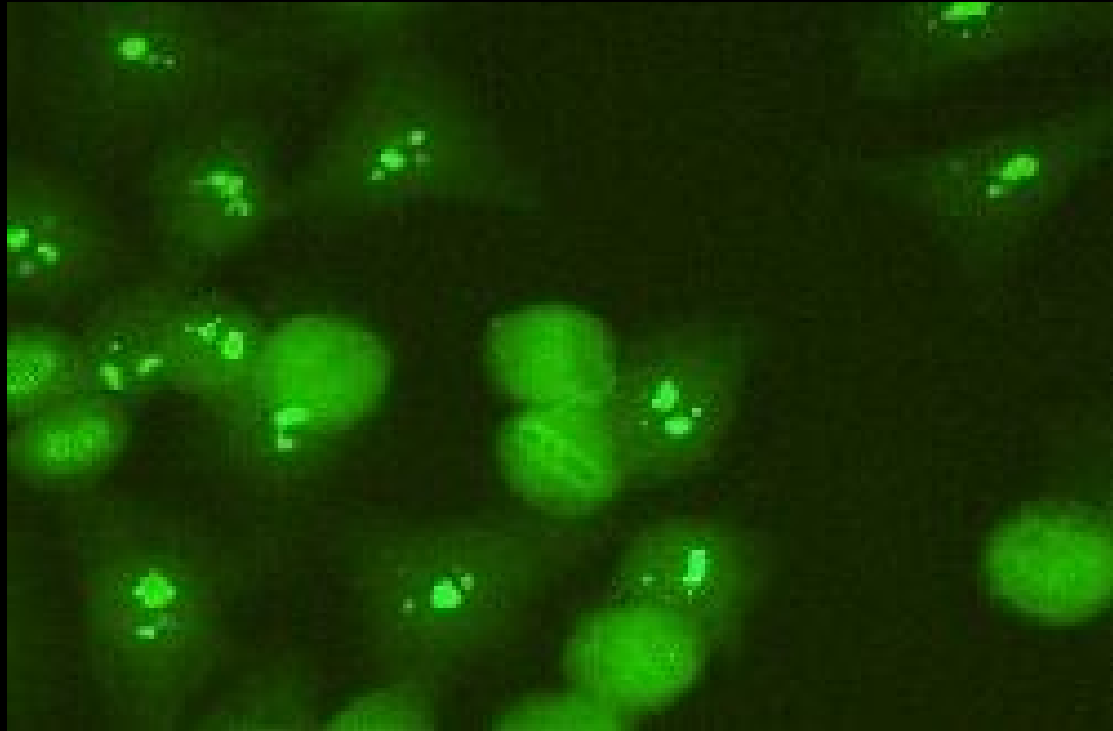




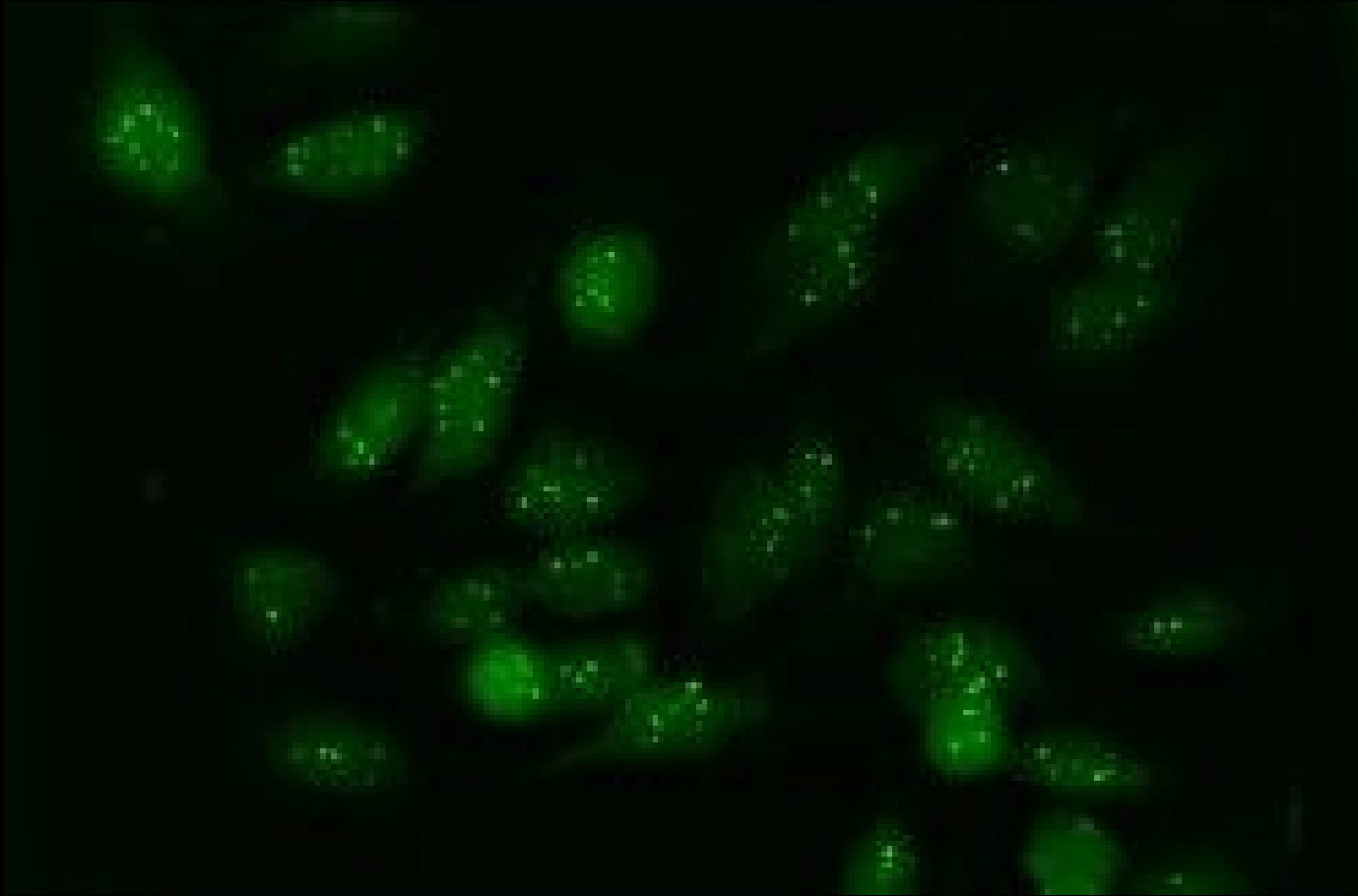
# Mitochondrie



# 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**

