

**Bi8920** Fluorescenční mikroskopie

Principy a postupy  
imunofluorescenčního značení  
buněk

RNDr. Jakub Neradil, Ph.D.  
Ústav experimentální biologie PŘF MU



## Program přednášky:

- imunocytochemie
- typy protilátek a jejich výroba
- postup imunofluorescenčního barvení

## Nevlastní (vnější) fluorescence

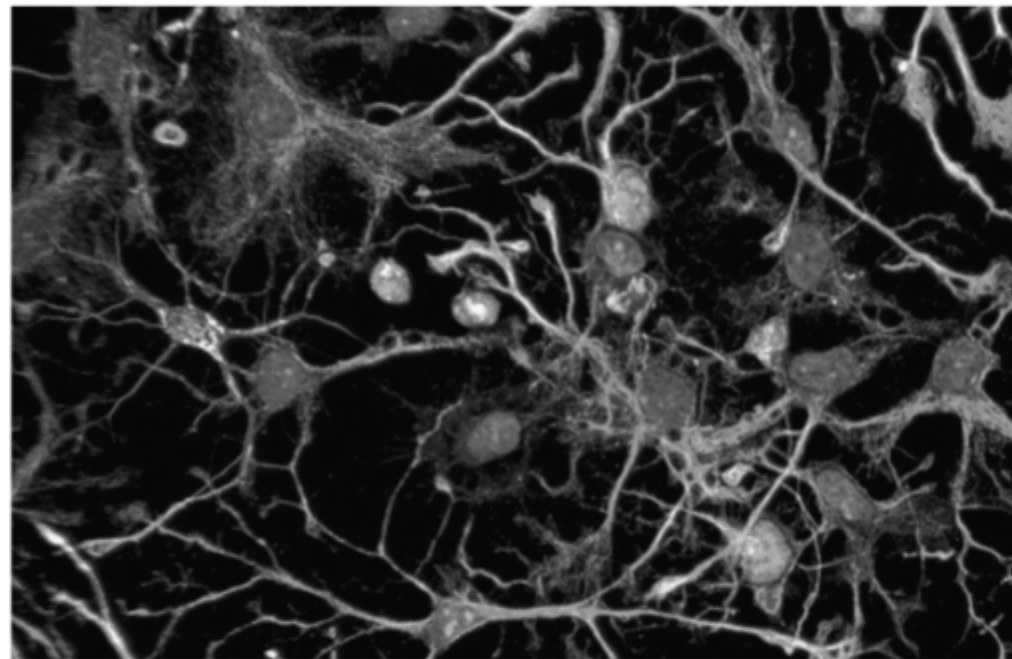
Přímá vazba fluorochromu na molekuly nebo buněčné struktury - sondy

DNA, buněčná stěna, plazmatická membrána...  
mitochondriální aktivita - respirační vzplanutí, pH  
indikátory, membránový potenciál.

Nepřímá vazba fluorochromu – značky  
navázání na imunoglobulin (protilátku) nebo úsek nukleové  
kyseliny, annexin V, phalloidin..

## Imunocytochemie (ICC)

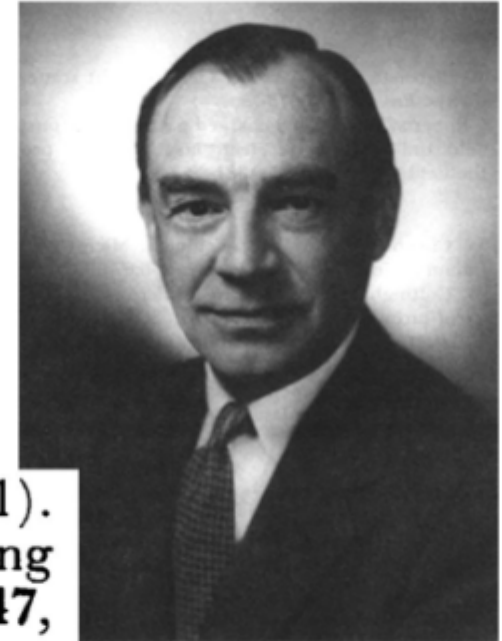
- soubor metod, které umožňují detekci antigenu v tkáni nebo buňce (*in situ*)
- pomocí značených protilátek



# Albert Hewett Coons, M.D.

(1912 - 1978)

- zakladatel imunofluorescence
- použití fluorochromem značené protilátky



COONS, A. H., CREECH, H. J. and JONES, R. N. (1941).  
'Immunological properties of an antibody containing  
a fluorescent group.' *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)*, **47**,  
200.

## LOCALIZATION OF ANTIGEN IN TISSUE CELLS

### II. IMPROVEMENTS IN A METHOD FOR THE DETECTION OF ANTIGEN BY MEANS OF FLUORESCENT ANTIBODY\* †

BY ALBERT H. COONS, M.D., AND MELVIN H. KAPLAN§

*(From the Department of Bacteriology and Immunology, Harvard Medical School, Boston)*

*(Received for publication, August 6, 1949)*



# Protilátky

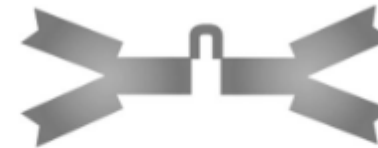
- patří do skupiny imonoglobulinů
- třídy: IgA, IgD, IgE, IgG, IgM
- složení: 2x těžký řetězec (H), 2x lehký řetězec (L)
- H řetězce: různé dle antigenních a strukturálních vlastností Ig  
->podtypy (alfa, delta, epsilon, gama, mí)
- L řetězce: lambda nebo kapa – různě, v závislosti na typu Ig
- H a L – spojení disulfidickými vazbami, podíl na terciární struktuře, udržuje stabilitu Ig
- nejčastěji pro imunofluorescenci IgG a IgM

Name	Heavy Chain	Description
IgA 1,2	$\alpha$	Found in mucosal areas, such as the gut, respiratory tract and urogenital tract, where it prevents colonization by pathogens. Also found in saliva, tears, and breast milk.
IgD	$\Delta$	Functions mainly as an antigen receptor on B cells that have not been exposed to antigens. It has also been shown to activate basophils and mast cells to produce antimicrobial factors.
IgE	$\epsilon$	Binds to allergens and triggers histamine release from mast cells and basophils, and is involved in allergy. Also protects against parasitic worms.
IgG 1,2,3,4	$\gamma$	In its four forms, provides the majority of antibody-based immunity against invading pathogens. The only antibody capable of crossing the placenta to give passive immunity to the fetus.
IgM	$\mu$	Expressed on the surface of B cells as a monomer, and in a secreted form as a pentamer with very high avidity. Eliminates pathogens in the early stages of B cell mediated (humoral) immunity before there is sufficient IgG.

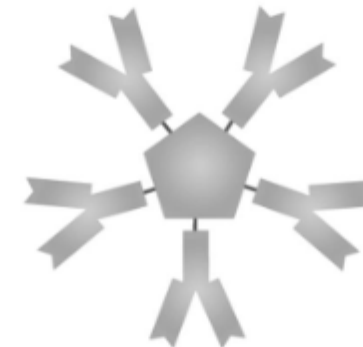
### Antibody Complexes



Monomer:  
IgD, IgE, IgG



Dimer:  
IgA

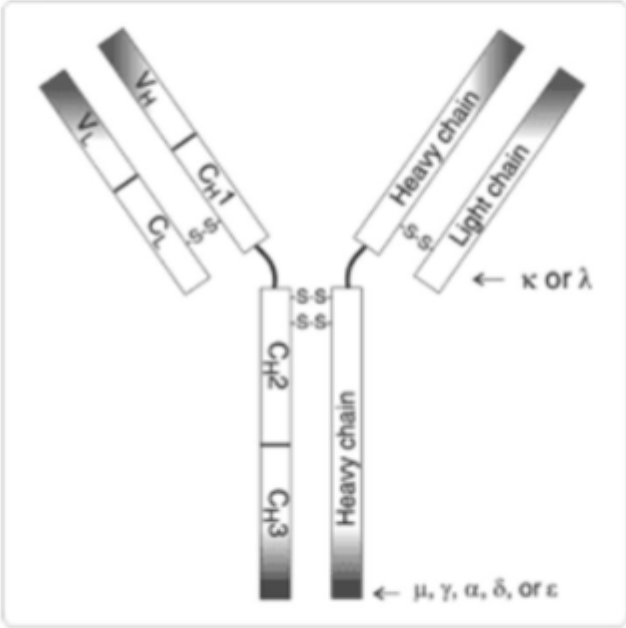


Pentamer:  
IgM



Antibody	Human and Mouse		
	Light Chain	Subtype	Heavy Chain
IgA	κ or λ κ or λ	IgA <sub>1</sub> IgA <sub>2</sub>	α <sub>1</sub> α <sub>2</sub>
IgE	κ or λ	None	ε
IgD	κ or λ	None	δ
IgM	κ or λ	None	μ



IgG	Human			Mouse		
	Light Chain	Subtype	Heavy Chain	Light Chain	Subtype	Heavy Chain
	κ or λ	IgG <sub>1</sub>	γ <sub>1</sub>	κ or λ	IgG <sub>1</sub>	γ <sub>1</sub>
	κ or λ	IgG <sub>2</sub>	γ <sub>2</sub>	κ or λ	IgG <sub>2a</sub>	γ <sub>2a</sub>
	κ or λ	IgG <sub>3</sub>	γ <sub>3</sub>	κ or λ	IgG <sub>2b</sub>	γ <sub>2b</sub>
	κ or λ	IgG <sub>4</sub>	γ <sub>4</sub>	κ or λ	IgG <sub>3</sub>	γ <sub>3</sub>



# IgG

obecný vzorec:

$\text{gama}_2 \text{ lambda}_2$  nebo  $\text{gama}_2 \text{ kapa}_2$

průměrná  $M_r = 150\text{kDa}$ ,  $H = 50\text{kDa}$ ,  $L = 25\text{kDa}$

domény - variabilní (V) a konstantní (C),  
velikost 80-120AA

na N-koncích :

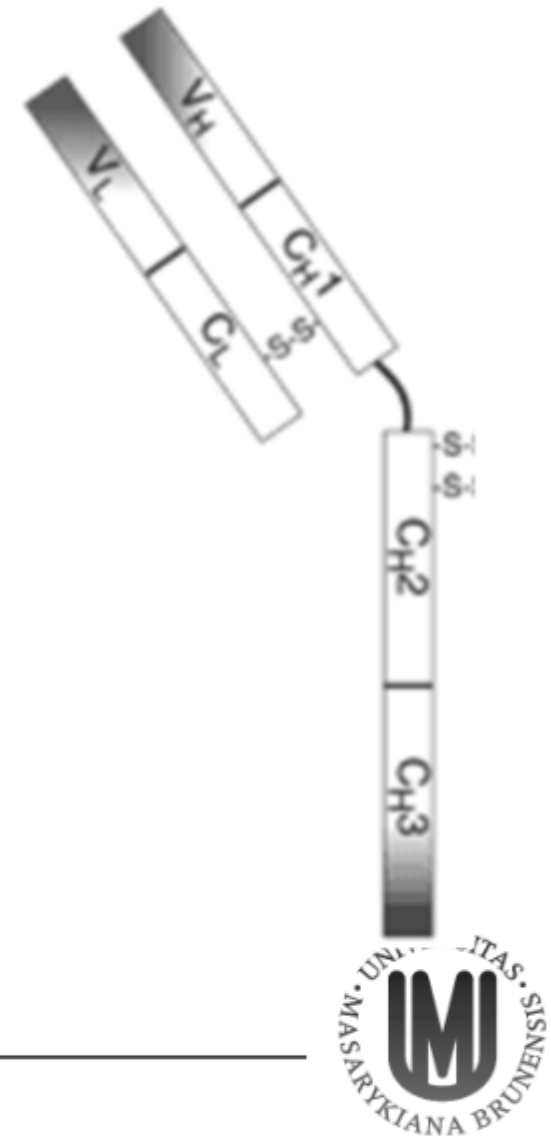
L řetězec: 1x  $V_L$  doména

H řetězec: 1x  $V_H$  doména

na C-koncích :

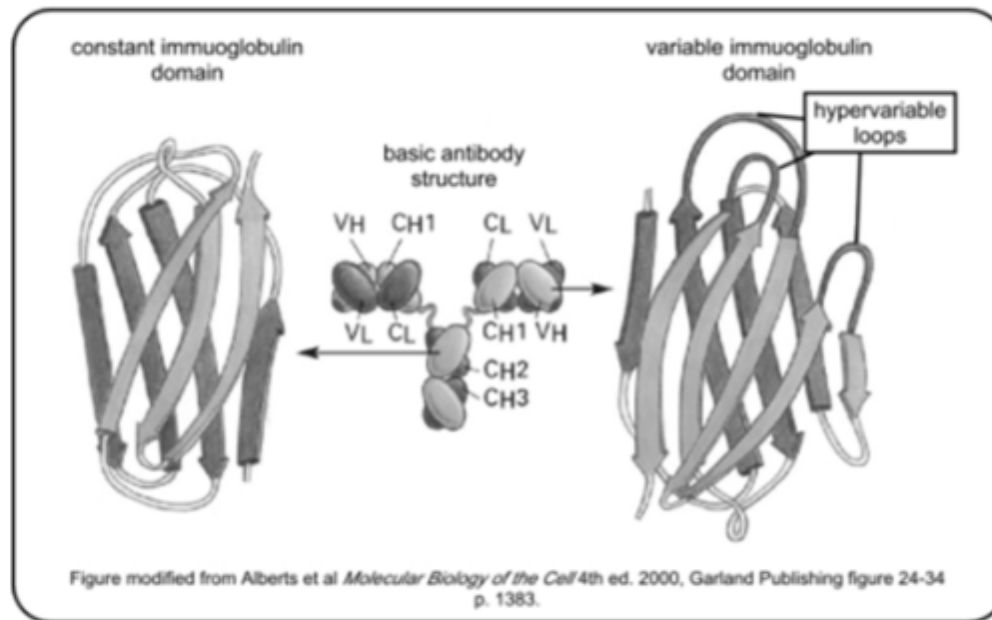
L řetězec: 1x  $C_L$  doména

H řetězec: 3x -  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$ ,  $C_{H3}$



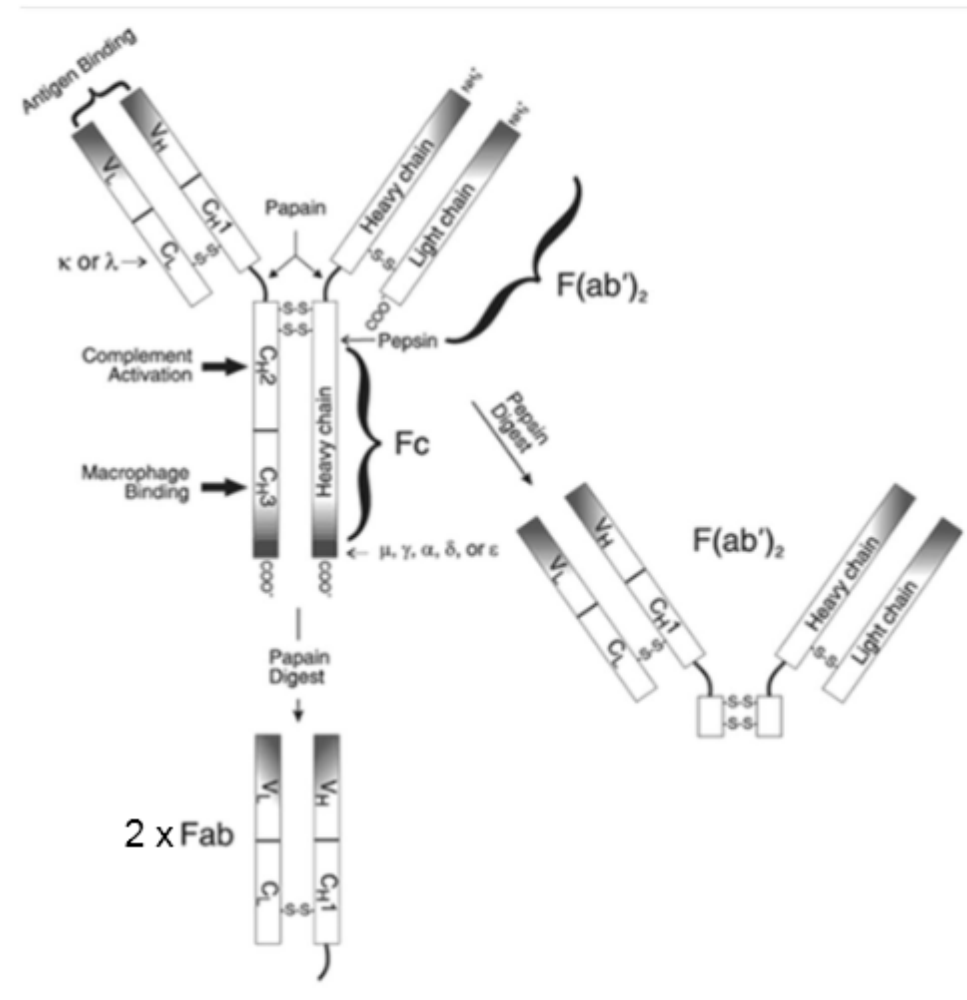
$V_L$  a  $V_H$  tvoří vazebné místo antigenu, v této části hypervariabilní oblasti – tyto se během reakce s antigenem dostávají nejbliže (0,2-0,3 nm)

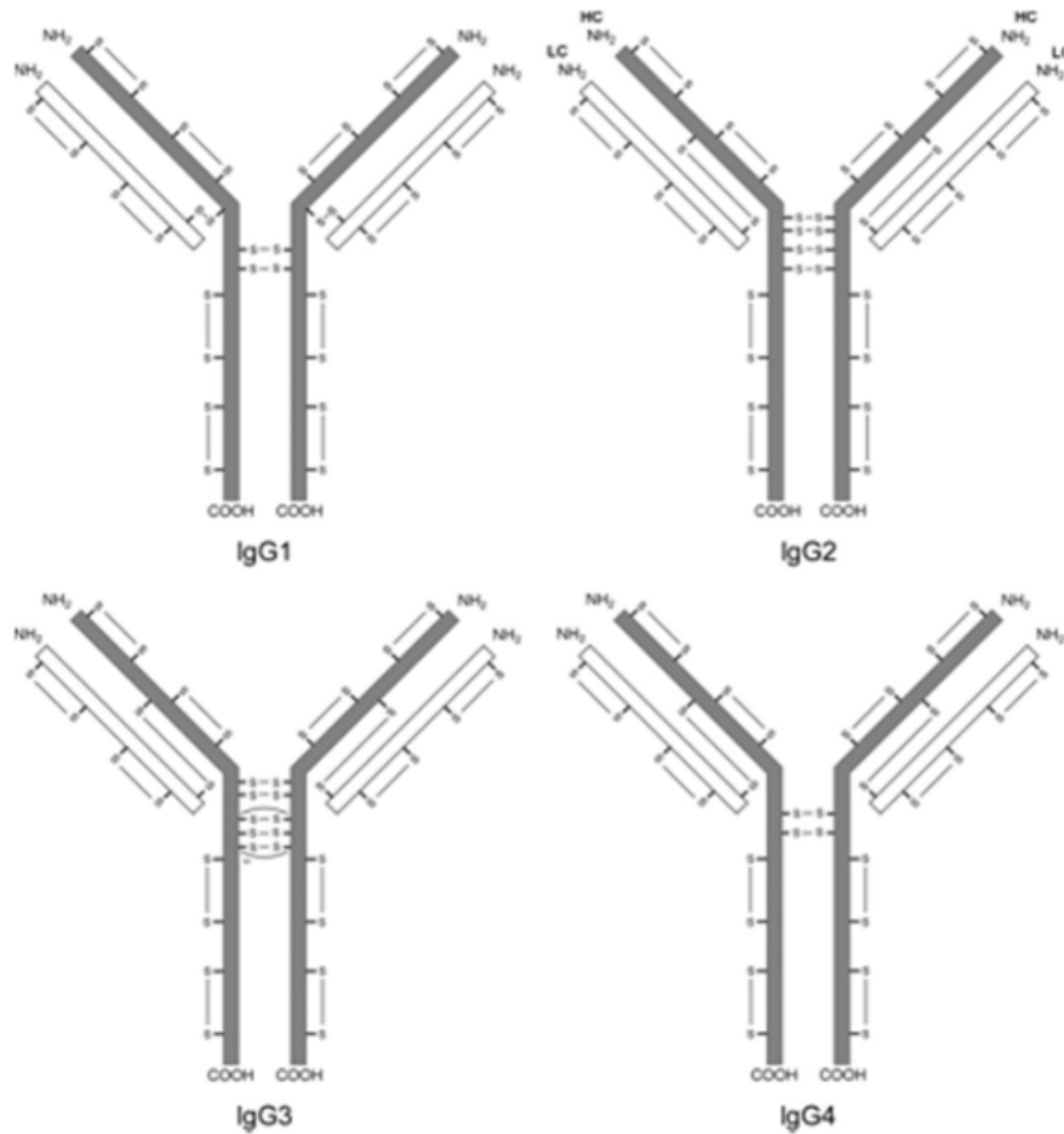
Struktura vazebného místa, která je unikátně charakteristická pro danou protilátku, se nazývá idiotyp -> každý klon protilátky má jiný idiotyp



## Struktura – odvozena od enzymatického štěpení

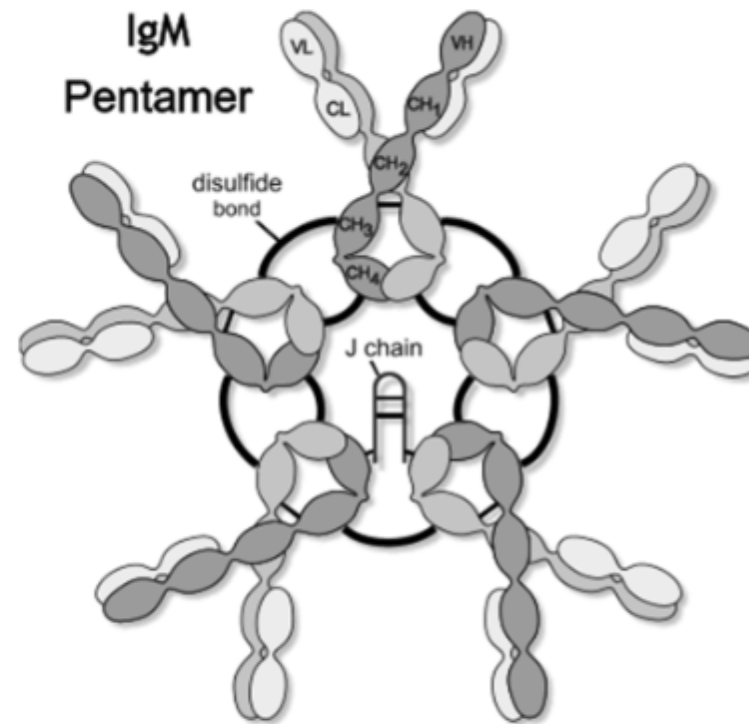
- papain- štěpí v pantové oblasti H řetězce  
vznik:
  - 2x monovaletních Fab (Fragment antigen binding)
  - 1x Fc (Fragment crystallizable)
- pepsin – štěpí v C-koncové oblasti H řetězce  
vznik:
  - 1x bivalentní  $F(ab')_2$
  - zbytek Fc fragmentu je degradován





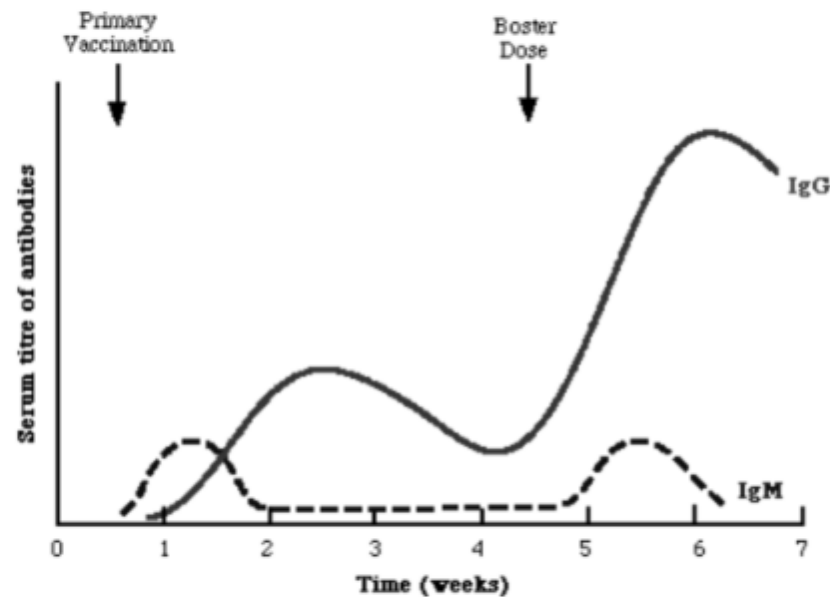
# IgM

- pentamer,  $M_r=900\text{kDa}$ , 5x podjednotka po 180kDa
- obecný vzorec  $(\mu_2 \kappa_2)_5$  nebo  $(\mu_2 \lambda_2)_5$
- struktura spojena řetězcem „J“ (15kDa)
- stejné stěpení proteinázami jako IgG, vznik 10x Fab a Fc; 5x  $F(ab)_2$
- Fc - cyklický pentamer (340kDa)



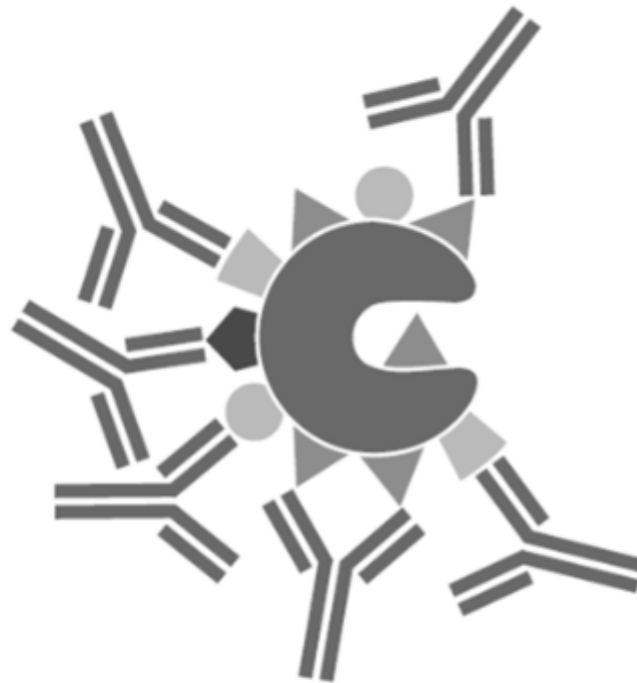
# Imunitní odpověď

- imunizace antigenem - vyrovnání koncentrace mezi intra a extravaskulárním prostorem
- zachytávání antigenu v uzlinách
- latentní (indukční) fáze – asi týden
- první tvorba IgM – primární odpověď
- později nebo po další imunizaci (booster) – převážně tvorba IgG – sekundární odpověď
- různá délka poločasu - IgM = 4-6 dní, IgG = 3 týdny



## Polyklonální protilátky pro ICC

- produkce různými klony B- lymfocytů
- reakce s různými epitopy daného antigenu
- nejčastější producent – králík (New Zealand White rabbit) , koza, prase, ovce...



## RAISING ANTIBODIES IN ANIMALS

Antibodies can be made in the laboratory by injecting an animal (usually a mouse, rabbit, sheep, or goat) with antigen A.

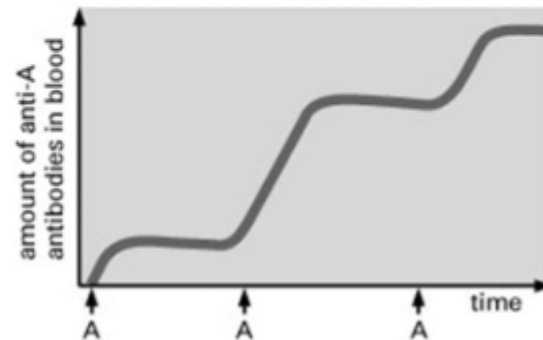


inject antigen A



take blood later

Repeated injections of the same antigen at intervals of several weeks stimulates specific B cells to secrete large amounts of anti-A antibodies into the bloodstream.



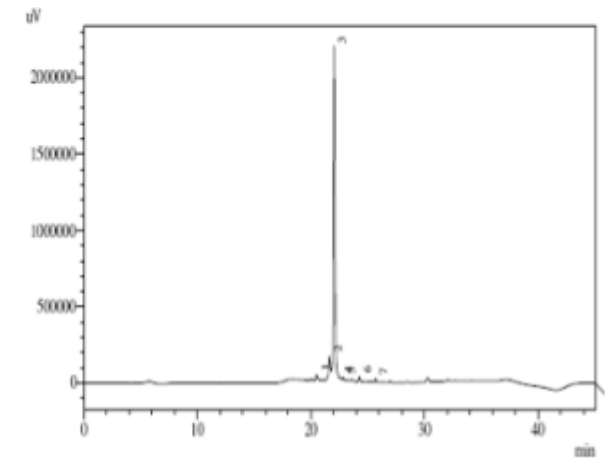
Because many different B cells are stimulated by antigen A, the blood will contain a variety of anti-A antibodies, each of which binds A in a slightly different way.

©1996 GARLAND PUBLISHING



## Příprava polyklonálních protilátek

- navržení a syntéza peptidu
- ověření čistoty hmotnostní spektrometrií a chromatografií
- coupling – vazba s KLH glykoproteinem
- KLH – Keyhole limpet hemocyanin
- měkkýš (*Megathura crenulata*)
- produkce vysoce imunogenního glykoproteinu KLH
- dodá imunogenitu i peptidu



## Příprava polyklonálních protilátek

- imunizace – kontrola specificity vůči antigenu
- získání séra

Nom	Date	Description
1	03.12.2009	Peptide ordered
2	28.12.2009	Peptide ready
3	05.01.2010	Peptide coupling via C-terminal cysteine
4	08.01.2010	Immunisation of rabbits number 26 and 27: 1st injection
5	29.01.2010	Immunisation of rabbits number 26 and 27: 2nd injection
6	05.02.2010	Rabbit sera after second injection of antigen
7	09.02.2010	Testing of the sera after 2nd injection of antigen using dotblot
8	01.03.2010	Immunisation of rabbits number 26 and 27: 3rd injection
9	08.03.2010	Rabbit sera after third injection of antigen
10	11.03.2010	Testing of the sera after 3rd injection of antigen using dotblot
11	01.04.2010	Immunisation of rabbits number 26 and 27: 4th injection
12	08.04.2010	Final bleed after fourth injection of antigen

# Příprava polyklonálních protilátek

- imunizace



## *Immunisation protocol*

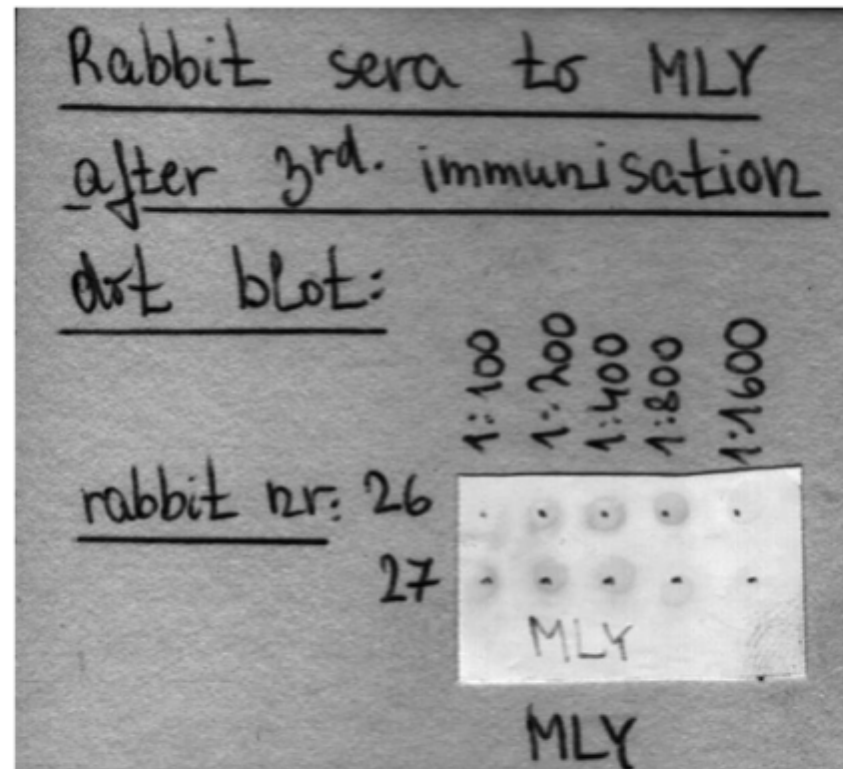
- 1) First injection – *day 1*: subcutaneous injection of 100 – 500  $\mu\text{g}$  of purified protein or peptide coupled to KLH (in complete Freund's adjuvans).
- 2) Second injection – *day 15*: subcutaneous injection of 100 – 500  $\mu\text{g}$  of purified protein or peptide coupled to KLH (in incomplete Freund's adjuvans).
- 3) Test sera – *day 20*: 5 mls of test sera
- 4) Third injection – *day 46*: subcutaneous injection of 100 – 500  $\mu\text{g}$  of purified protein or peptide coupled to KLH (in incomplete Freund's adjuvans).
- 5) Test sera or final bleed – *day 54*: either 5 mls of the test sera or 50 - 80mls of the final sera.
- 6) Fourth injection – *day 76*: subcutaneous injection of 100 – 500  $\mu\text{g}$  of purified protein or peptide coupled to KLH (in incomplete Freund's adjuvans).
- 7) Final sera collection – *day 84*. 50 - 80mls of the final sera.



# Ověřování afinity protilátky k antigenu

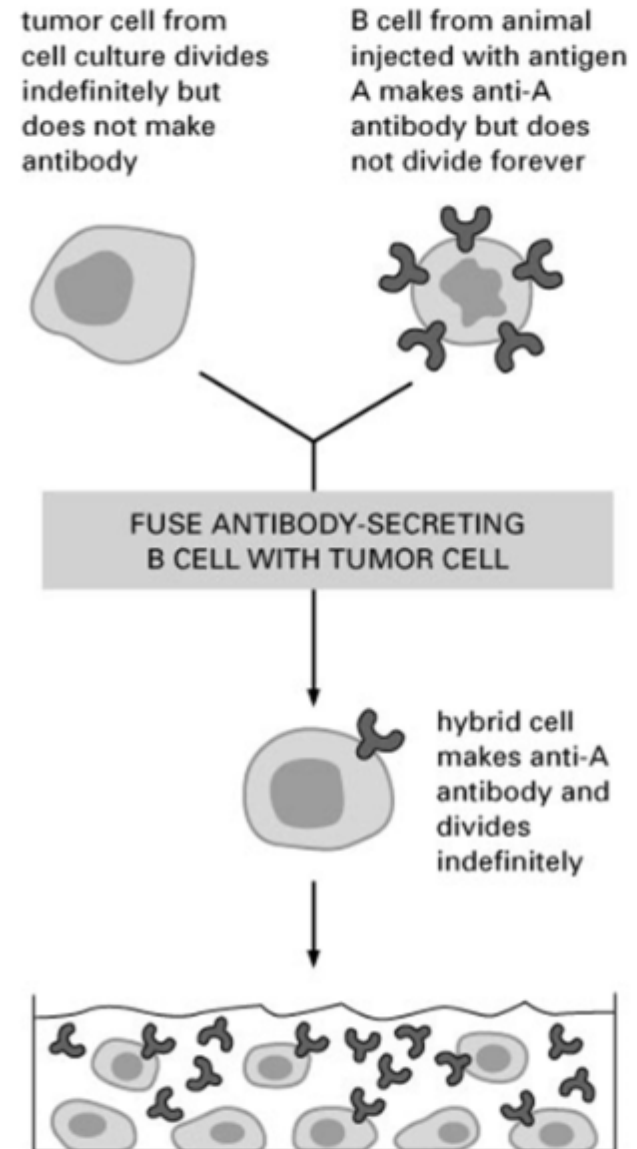
metoda: dot-blot

- 1) na membránu nanesen antigen
- 2) kapka různě ředěné protilátky
- 3) detekce anti-králičí protilátkou konjugovanou s chromogenem



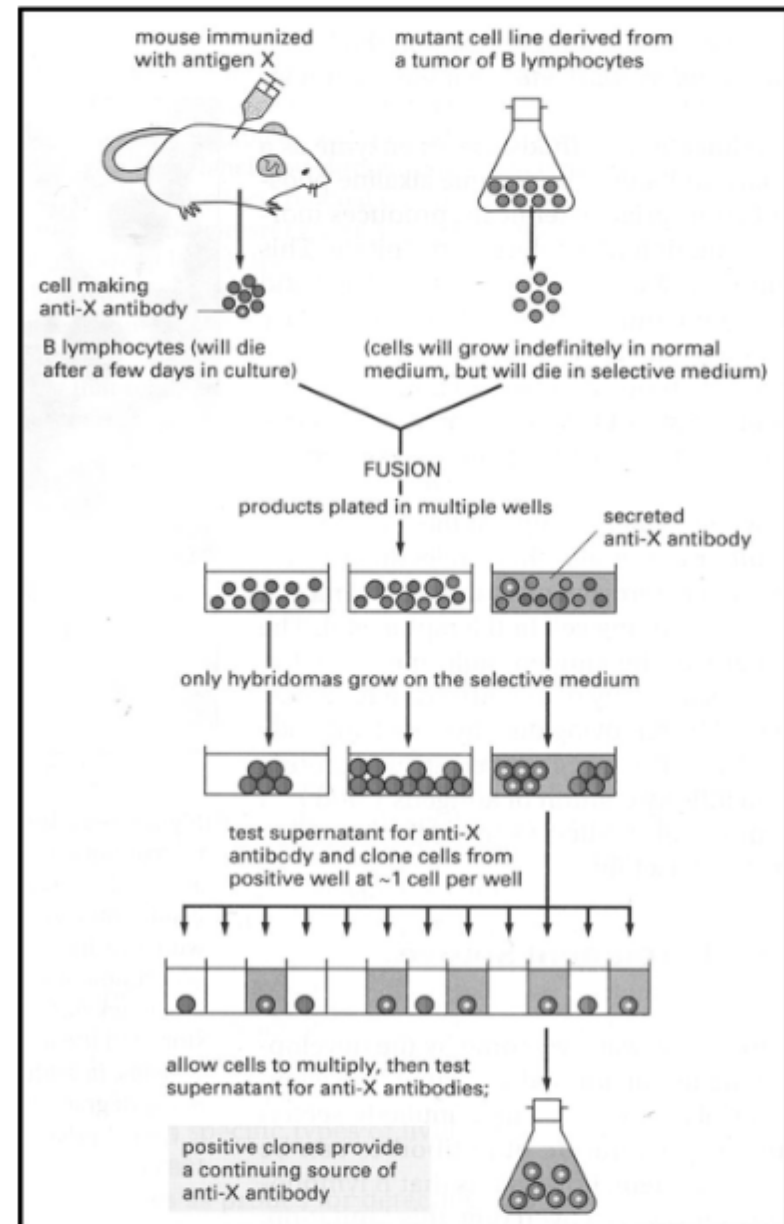
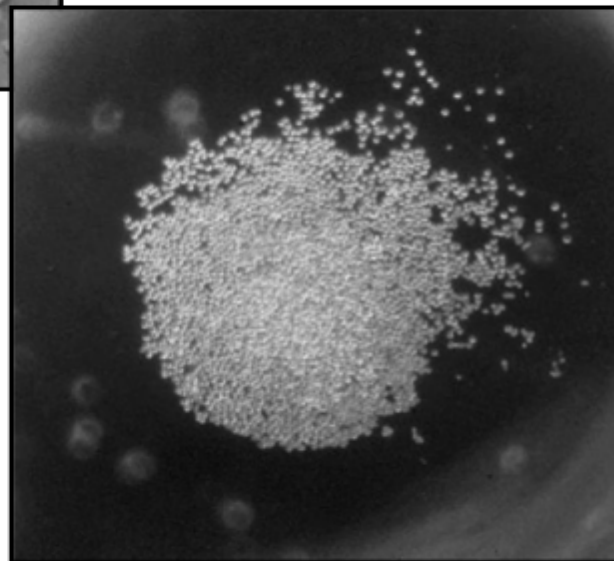
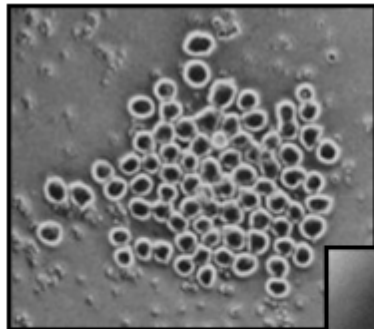
# Monoklonální protilátky pro ICC

- produkovány pouze jedním klonem B-lymfocytů
- všechny molekuly imunoglobulinu jsou totožné
- reagují pouze s jedním specifickým epitopem na antigenu
- nejčastěji myši
- příprava pomocí hybridomů: fúze B-lymfocytu a myelomové b.



# Tvorba monoklonálních protilátek

<http://sites.sinauer.com/cooper7e/animation0413.html>



## První monoklonální protilátka (1975)

- myší monoklonální protilátka – klon Sp1 (IgM)
- proti SRBC (sheep red blood cells)
- fúze myších buněk z myelomu a sleziny

*Nature Vol. 256 August 7 1975*

---

### **Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity**

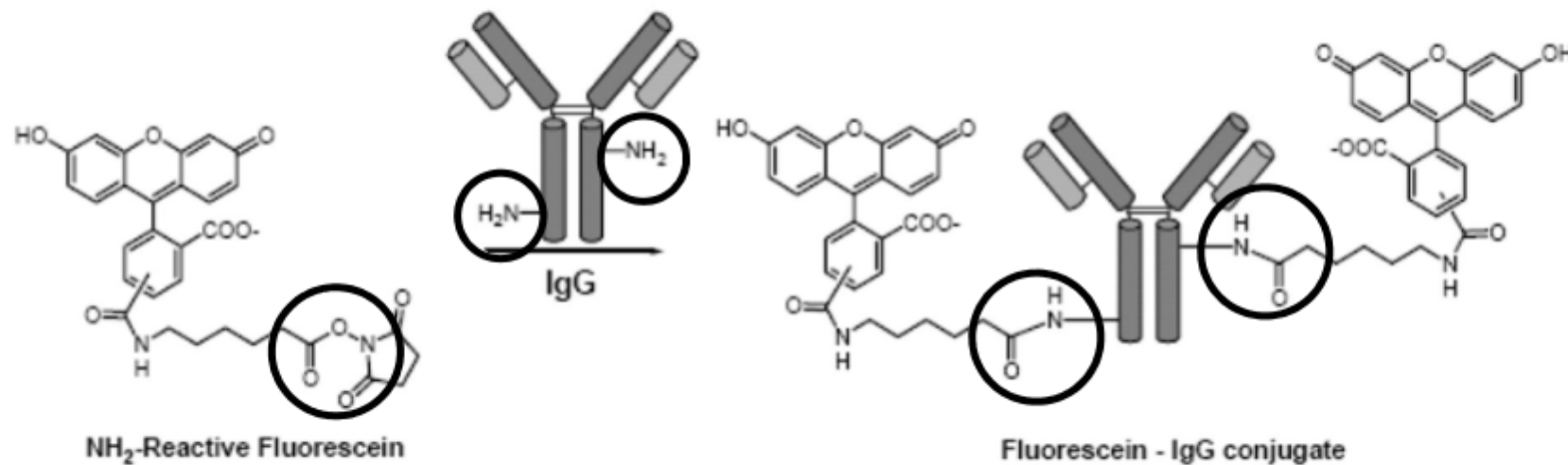
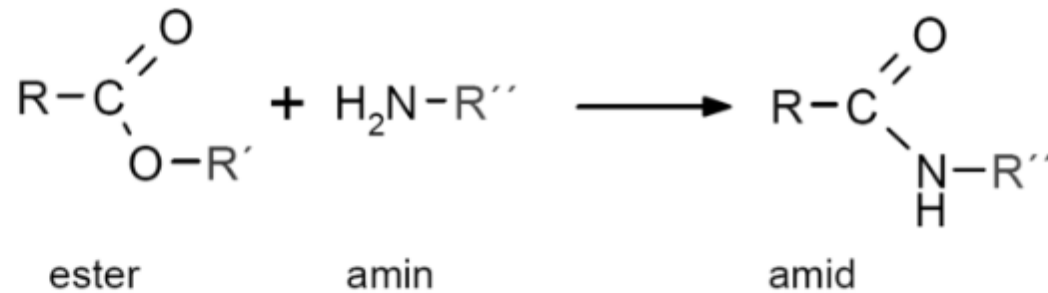
G. KÖHLER  
C. MILSTEIN

*MRC Laboratory of Molecular Biology,  
Hills Road, Cambridge CB2 2QH, UK*

Myeloma cells ( $10^7$  P3-X67A g8) were fused to  $10^8$  spleen cells from an immunised BALB/c mouse. Mice were immunised by intraperitoneal injection of 0.2 ml packed SRBC diluted 1:10, boosted after 1 month and the spleens collected 4 d later. After fusion, cells (Sp-1) were grown for 8 d in HAT medium, changed at 1–3 d intervals. Cells were then grown in Dulbecco modified Eagle's medium, supplemented for 2 weeks with hypoxanthine and thymidine. Forty days after fusion the presence of anti-SRBC activity was revealed as shown in *a*. The ratio of plaque forming cells/total number of hybrid cells was 1/30.

# Konjugace protilátky s fluorochromem

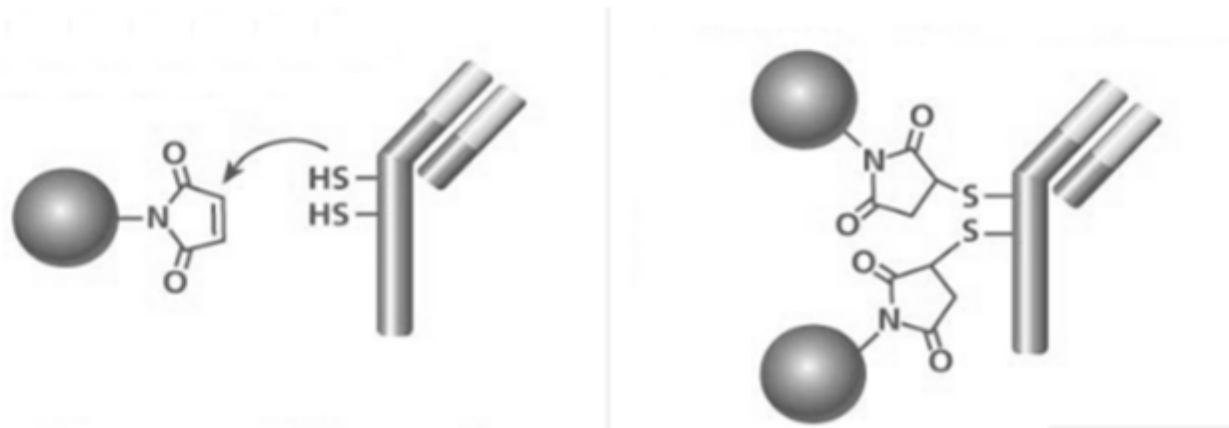
vazba přes aminoskupinu, vznik amidu





## Konjugace protilátky s fluorochromem

- vazba přes thiolovou skupinu (-SH)
- nutné v redukujícím prostředí – porušení disulfidických vazeb
- vyšší senzitivita konjugátu – specifičtější místo značení



## Přímá vs. nepřímá imunofluorescence

- přímá imunofluorescence – původní metoda (1942)
- přímá vazba protilátky s fluorochromem na antigen
- rychlá, méně univerzální, nižší intenzita signálu
- využití pro flow-cytometrii



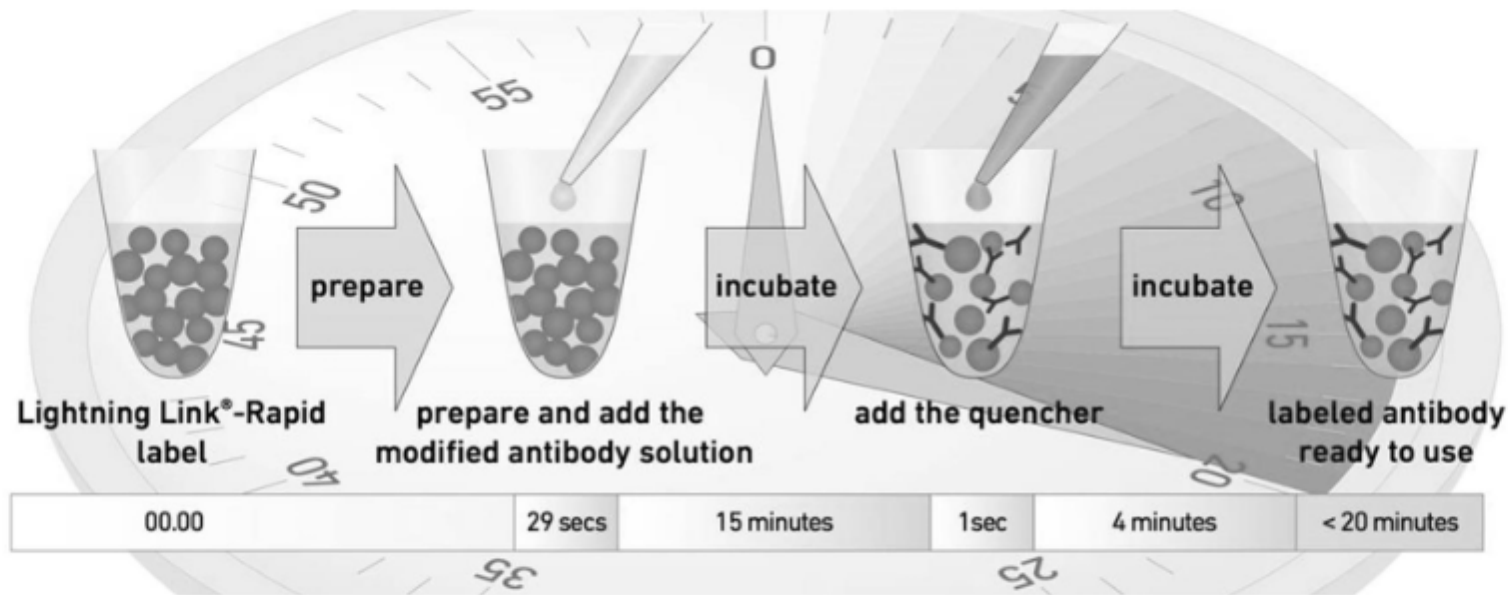
fluorochrom

imunoglobulin

epitop antigenu

# Přímá imunofluorescence

- a) značená protilátka od dodavatele
- b) vlastní označení zvolené protilátky vybraným fluorochromem



Innova Biosciences, Lightning-Link®



## Nepřímá imunofluorescence

dvoukroková

- 1) primární protilátka x antigenu
- 2) sekundární značená protilátka x primární protilátce



- univerzální, více primárních protilátek z jednoho organismu lze kombinovat s jednou sekundární protilátkou
- vyšší citlivost - na I. Ab více rozeznatelných epitopů, více navázaných molekul II. Ab

## Základní postup imunofluorescenčního barvení buněčných kultur

- 1) fixace
- 2) permeabilizace
- 3) blokování nespecifických vazeb
- 4) inkubace s protilátkou / protilátkami
- 5) counterstaining (detekce DNA)
- 6) montování



# Základní postup imunofluorescenčního barvení tkáňových řezů

- 1) parafínové řezy ( $\pm 4 \mu\text{m}$ ) na podložním skle
- 2) deparafinizace – xylén
- 3) rehydratace – sestupná alkoholová řada
- 4) reaktivace antigenů (antigen retrieval) v tlakové komoře při vyšší teplotě ( $97^\circ\text{C}$ )
- 5) blokování nespecifických vazeb
- 6) inkubace s protilátkou/-ami  
(chromogen – platí jen pro IHC)
- 5) counterstaining
- 6) montování



# Fixativa

## požadavky

- rychle proniká do buňky/tkáně
  - fixuje b. struktury a zabraňuje reakci buňky a tím vzniku strukturálních artefaktů
  - zamezí ztrátě rozpustných proteinů
  - nesmí vykazovat autofluorescenci
  - rozdíly v závislosti na detekované struktuře
- 
- chemická fixativa
  - mrazová substituce
  - mikrovlnná fixace

# Chemická fixativa

## koagulační chemická fixativa

- MetOH - nejčastěji/-20°C, bez permeabilizace
- EtOH
- aceton

## výhody

- rychlá fixace, díky dehydrataci
- proteiny jsou koagulovány nebo extrahovány
- zachovává rozpoznání antigenu

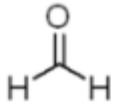

## nevýhody

- výrazné smrštění vzorku (až o 50%)
- zkreslení morfologie a velikosti

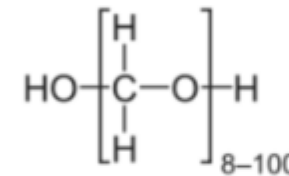


## Crosslinkující chemická fixativa

vytváří metylenové vazby  $-CH_2-$  (crosslinks) mezi různými skupinami makromolekul

- formaldehyd 
- glutaraldehyd.. 

nejčastěji paraformaldehyd (4% PFA)



- reaktivní skupiny: amidová, guanidinová, thiolová, fenolová, imidazolová a indolylová
- crosslinky i v nukleových kyselinách (ne však v lipidech)
- pomalejší vytváření crosslinků, ale rychlejší průnik do buňky (než glutaraldehyd)
- toxický, potenciální karcinogen

# Permeabilizace

- použití v závislosti na umístění detekované molekuly
- na externí straně pl. membrány – netřeba
- po fixaci aldehydy, nutnost permeabilizovat membránu, aby mohly být detekovány intracelulární molekuly
- použití organických rozpouštědel nebo detergentů

nejčastěji:

- TRITON X-100 (0,1-1%),
- Tween 20
- NP-40 (= Igepal)
- Brij...



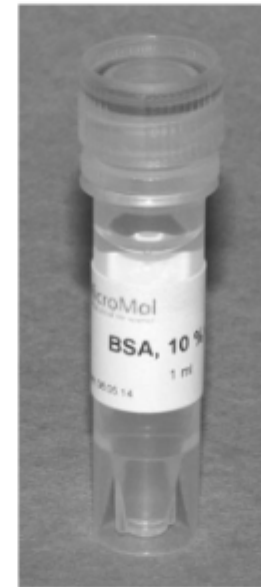
# Blokování nespecifických vazeb

nutnost vyvázání:

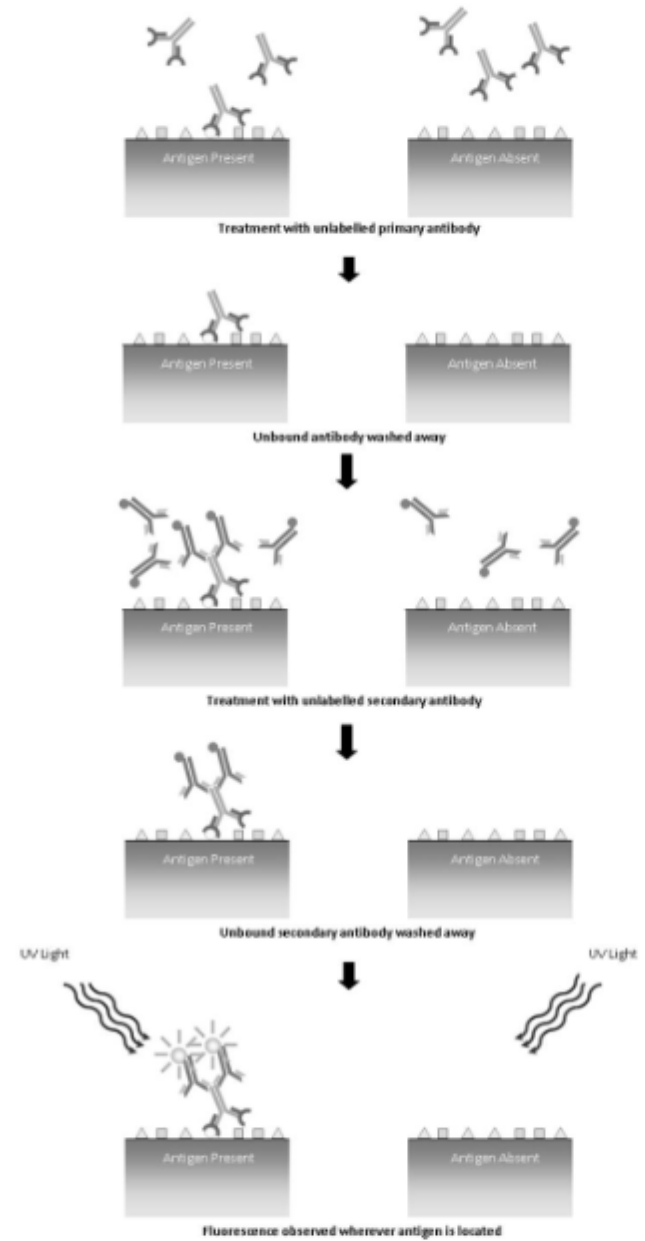
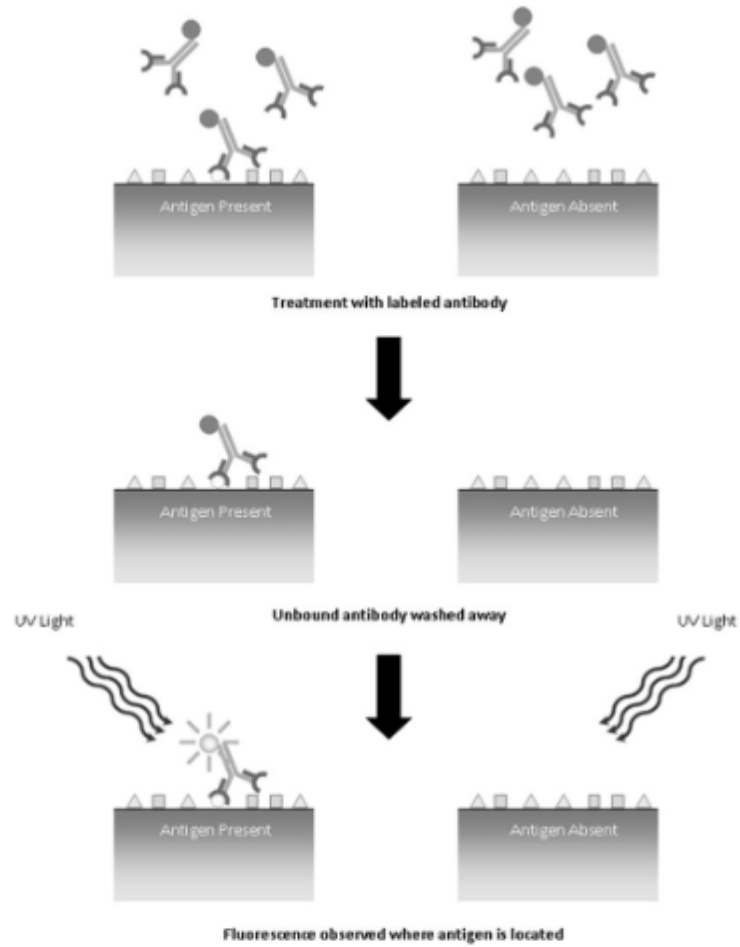
- nespecifických vazebných míst, na která by mohla nasednout protilátka
- nevymytého fixativa
- polárních nebo velmi hydrofobních struktur
  
- zvyšuje specifitu protilátky
- snižuje signál z pozadí

nejčastěji používané:

- bovinní sérový albumin (BSA): 1-10%,
- sérum (ze stejného zvířete jako II. Ab, nebo jiné než I. a II. Ab)
- želatina



# Přímá a nepřímá imunofluorescence



Dvojité značení  
nepřímá imunofluorescence

<http://www.youtube.com/watch?v=OH2GFeaGV6w>

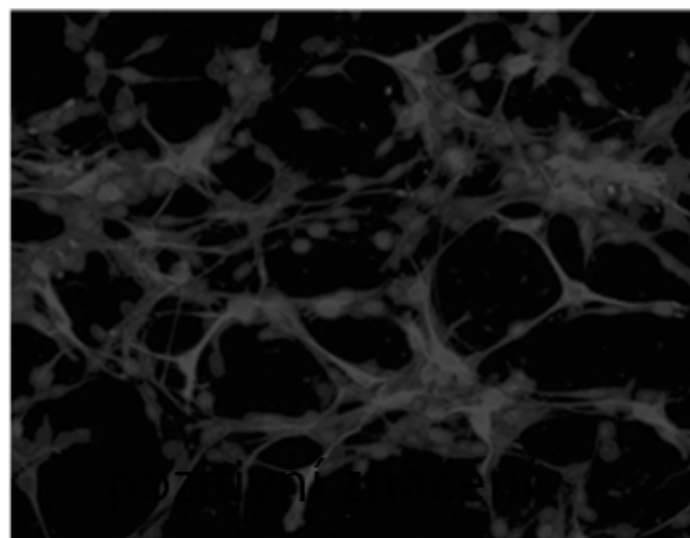
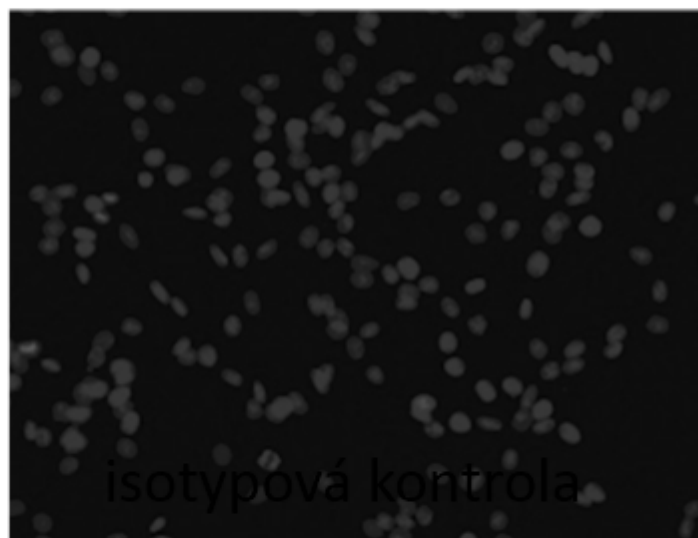
Celkový postup  
nepřímá imunofluorescence

<http://www.youtube.com/watch?v=pteO6FRWo3g>



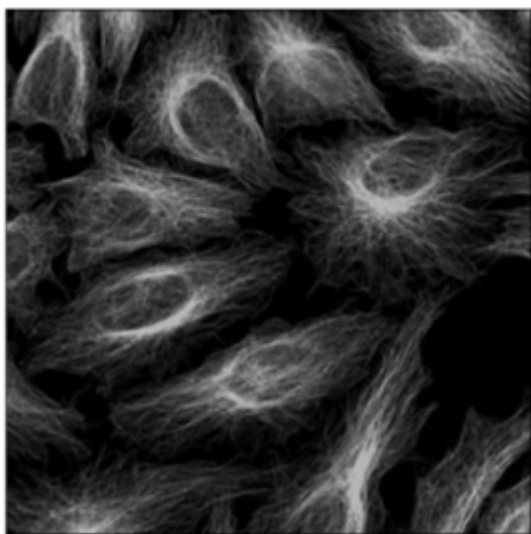
## Negativní kontrola

- nutné pro vyloučení falešných výsledků
- vícenásobné značení – kontroly pro jednotlivé fluorochromy
- použití isotypové kontroly – stejný typ protilátky s fluorochromem bez specifity
- použití neznačených buněk – vyloučení autofluorescence

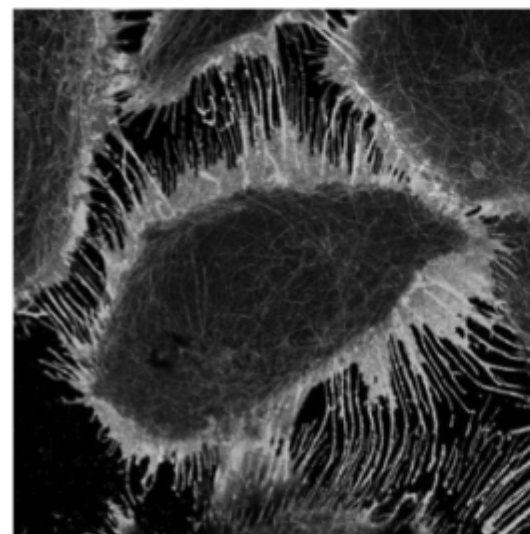


## Pozitivní kontrola

- detekce „ověřeného“ proteinu (tubulin, aktin)
- linie s ověřenou expresí daného proteinu
- transfekovaná linie s over-expresí daného proteinu



HeLa:  $\alpha$ -tubulin



A431: EGFR



## Montování = uzavírání

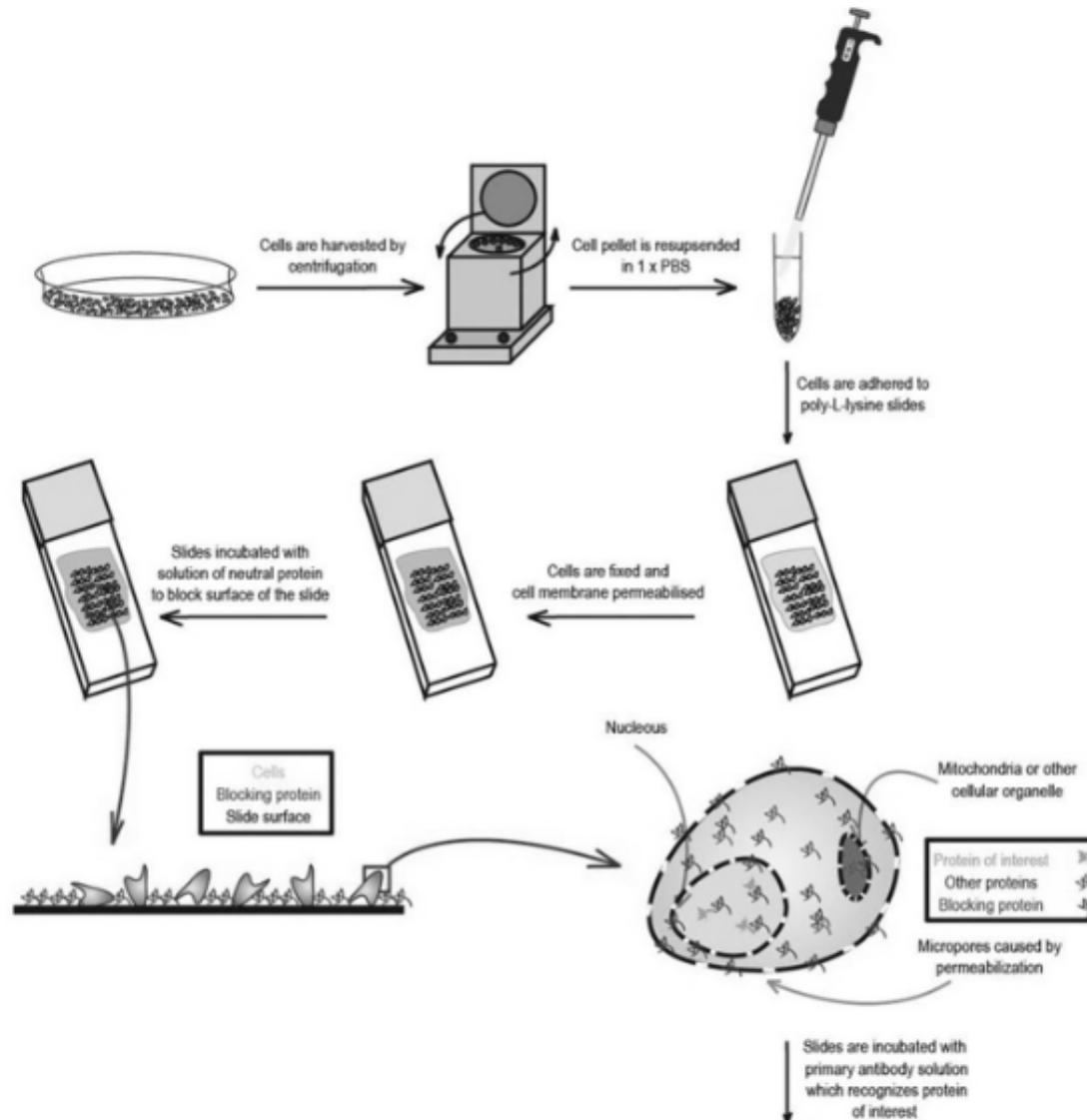
- uchování preparátu na delší dobu
- bez přístupu vzduchu
- v prostředí bránícím vyhasínání fluorescence
- mohou současně označovat nukleové kyseliny (+DAPI, aj.)

### tuhnoucí vs. netuhnoucí montovací média

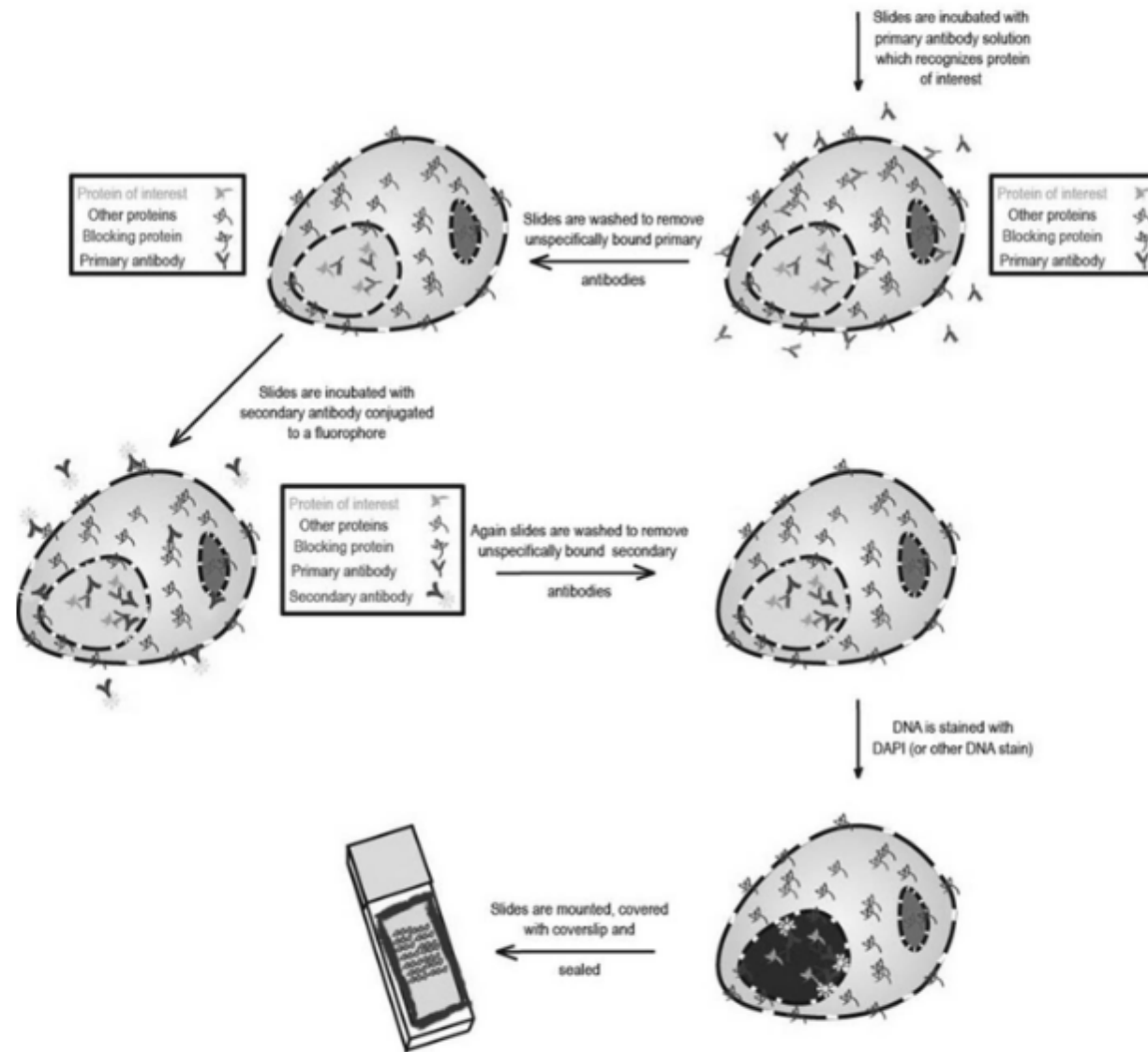
- na bázi polyvinyl alkoholu (např. Mowiol) – tuhne
- na bázi glycerolu (např. Vectashield) – potřeba zarámovat sklo – gel, parafín, lak na nehty..



# Celkový postup nepřímého imunofluorescenčního značení – 1. část



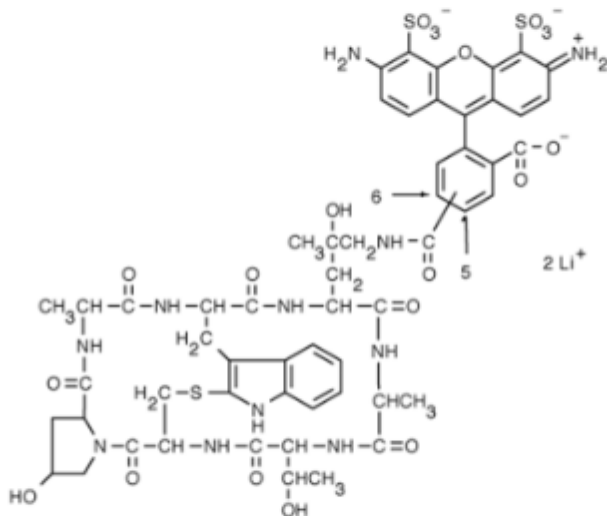
# Celkový postup nepřímého imunofluorescenčního značení – 2. část



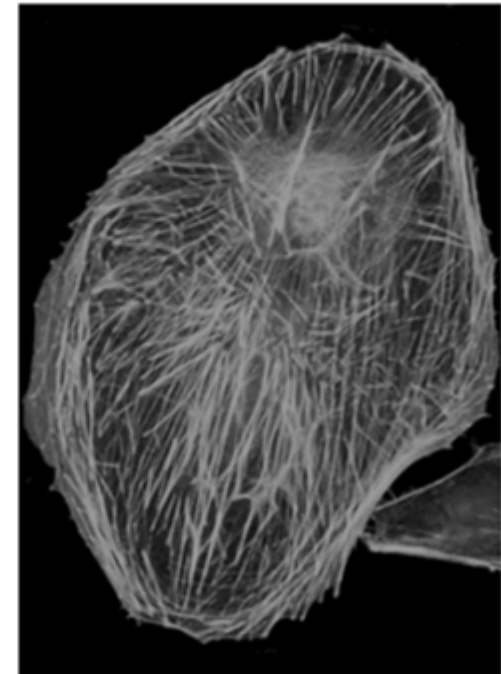
Nepřímá vazba fluorochromu – značky navázání na imunoglobulin (protilátku) nebo úsek nukleové kyseliny, phalloidin..

## Phalloidin

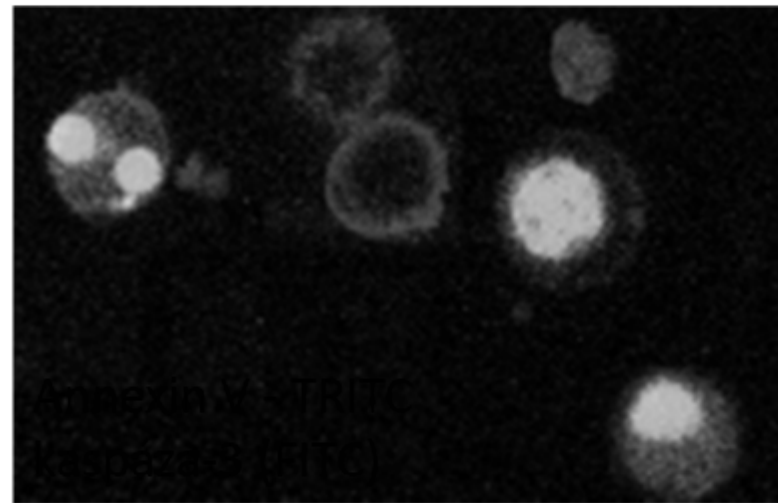
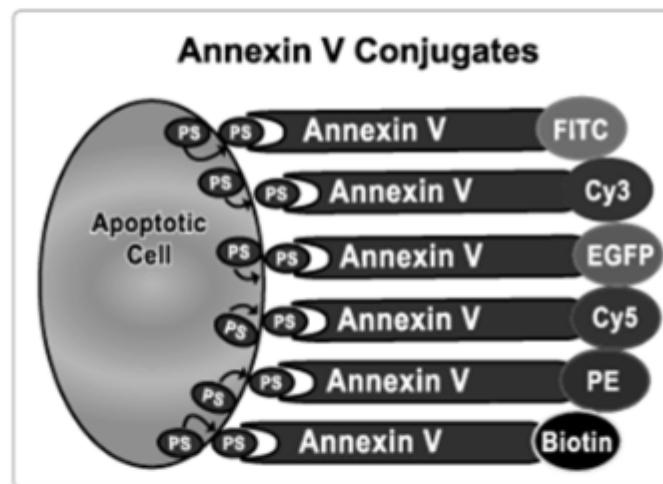
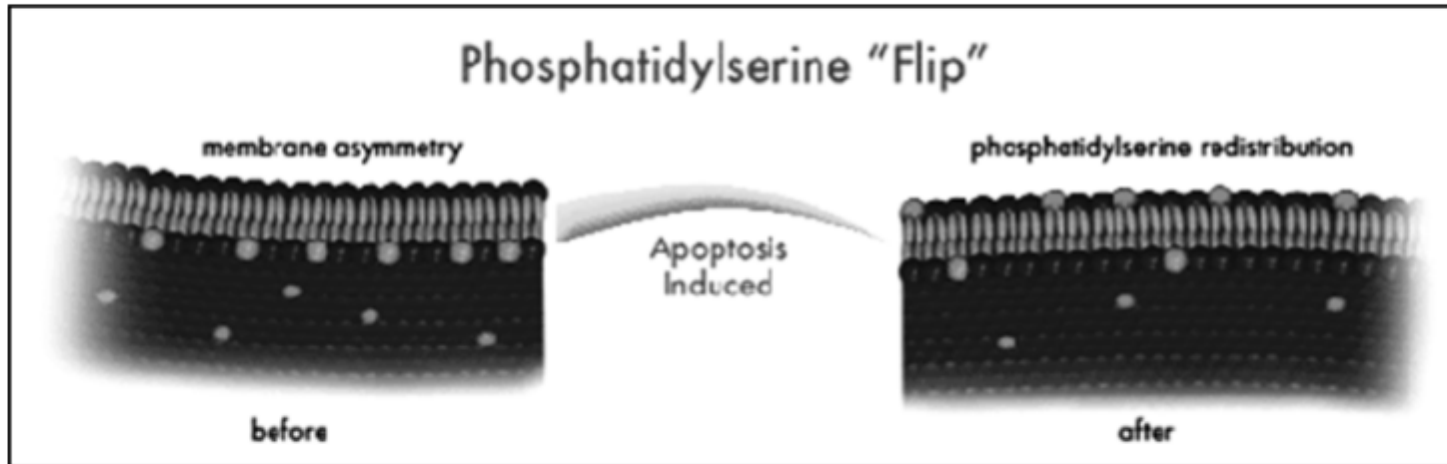
- mykotoxin - obsažen v některých jedovatých druzích muchomůrek
- *Amanita phalloides* - muchomůrka zelená (obsah přibližně 0,01 %)
- inhibice depolymerizace aktinových filament
- vazba na F-aktin
- konjugace s fluorochromy



Alexa Fluor 488 phalloidin



# Annexin V + fluorochrom detekce fosfatidylserinu („eat me“ signal) v apoptóze



# Interaktivní materiály

- <http://www.proteinatlas.org/>
  
- <http://www.abcam.com/>
- <http://www.cellsignal.com/index.jsp>
- <http://www.agilent.com/en/dako-products>
- <http://www.thermofisher.com/cz/en/home/brands/molecular-probes.html>
- <https://www.scbt.com/scbt/home/>
- <http://www.sigmaaldrich.com/czech-republic.html>
  
- <http://www.protilatky.cz/>

