

Bi8920 Pokročilé mikroskopické metody

Principy a postupy imunofluorescenčního značení buněk

doc. 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.

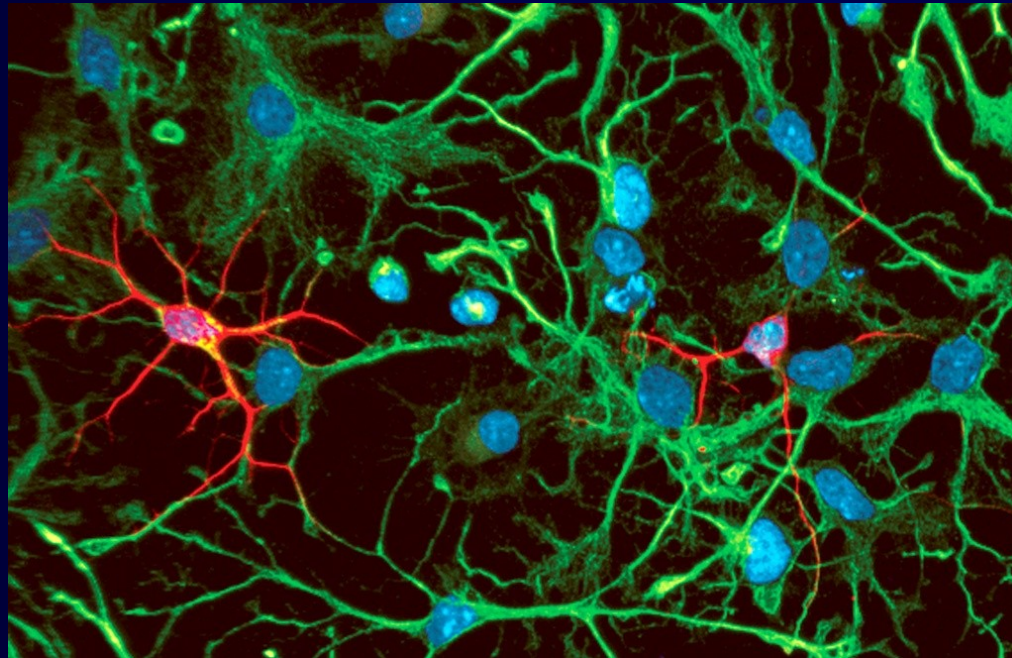
Nepřímá vazba fluorochromu – značky

navázání na imunoglobulin (protilátku) nebo úsek nukleové kyseliny, annexin V, phalloidin..



Imunocytochemie (ICC) / imunohistochemie (IHC)

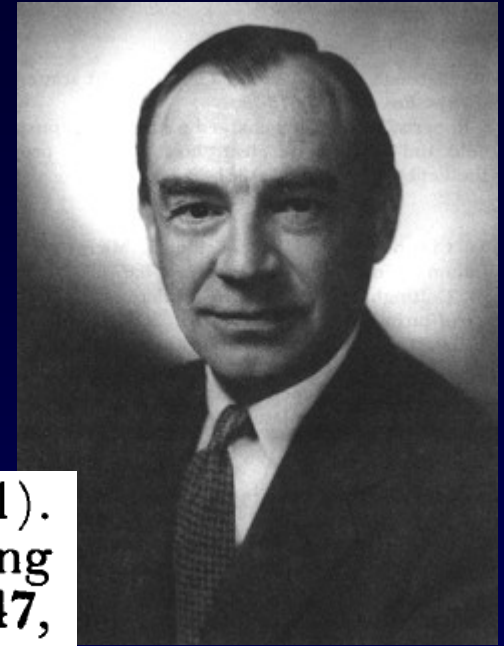
- soubor metod, které umožňují detekci antigenu v buňce nebo tkáni (*in situ*)
- pomocí značených protilátek



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 imunoglobulinů
- **třídy:** IgA, IgD, IgE, IgG, IgM (u savců)
- **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

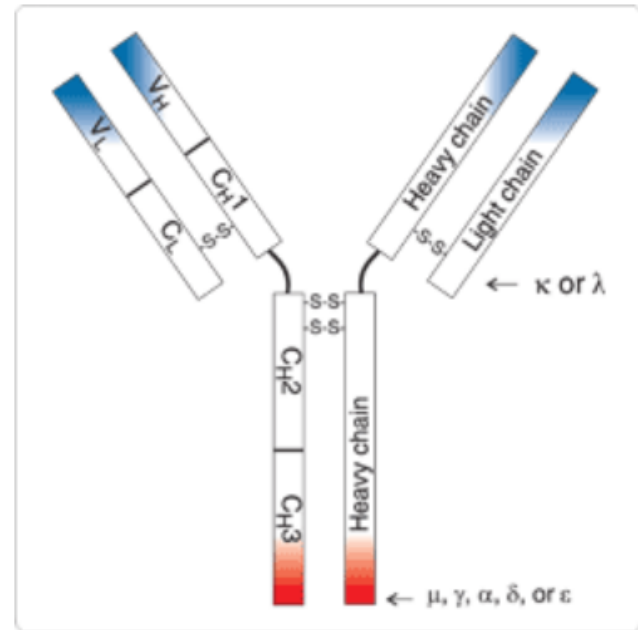


Name	Heavy Chain	Description	Antibody Complexes
IgA 1,2	α	Found in mucosal areas, such as the gut, respiratory tract and urogenital tract, where it prevents colonization by pathogens. Also found in saliva, tears, and breast milk.	 <p>Monomer: IgD, IgE, IgG</p> <p>Dimer: IgA</p> <p>Pentamer: IgM</p>
IgD	Δ	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	ϵ	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	γ	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	μ	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	Human and Mouse			
	Light Chain	Subtype	Heavy Chain	
IgA	κ or λ κ or λ	IgA1 IgA2	α1 α2	
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	IgG1	γ1	κ or λ	IgG1	γ1
	κ or λ	IgG2	γ2	κ or λ	IgG2a	γ2a
	κ or λ	IgG3	γ3	κ or λ	IgG2b	γ2b
	κ or λ	IgG4	γ4	κ or λ	IgG3	γ3



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 :

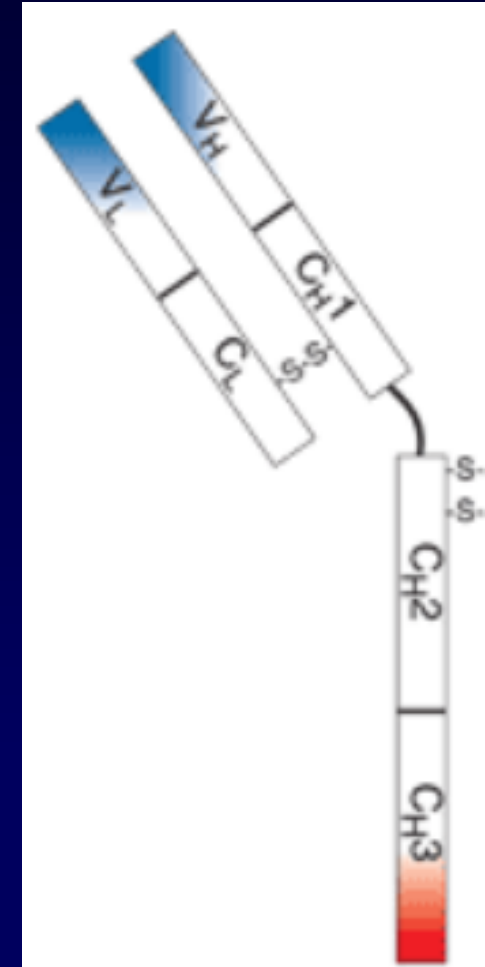
L řetězec: 1x V_L doména

H řetězec: 1x V_H doména

na C-koncích :

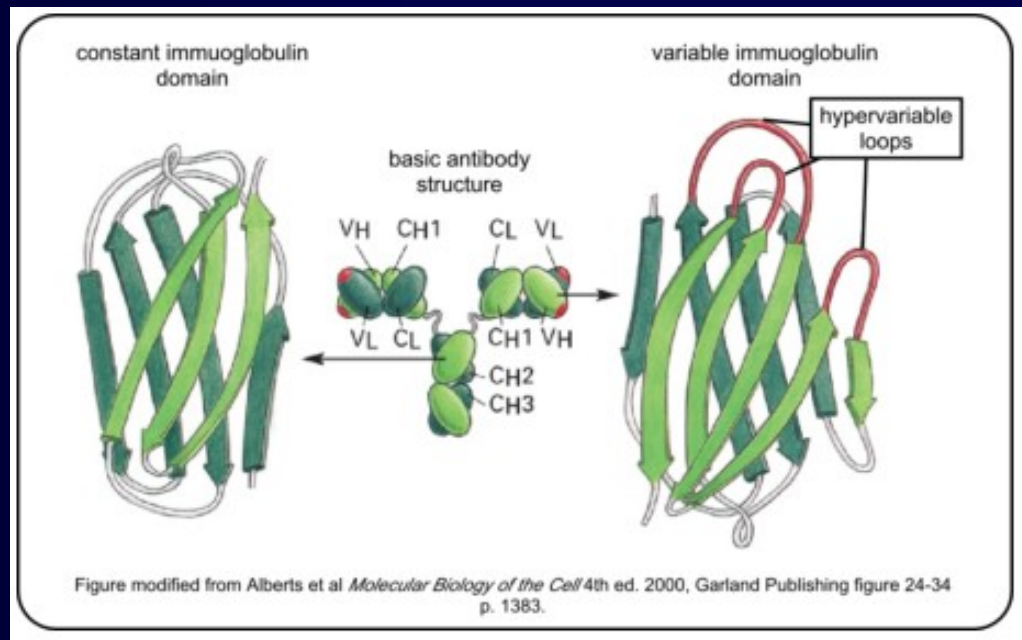
L řetězec: 1x C_L doména

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



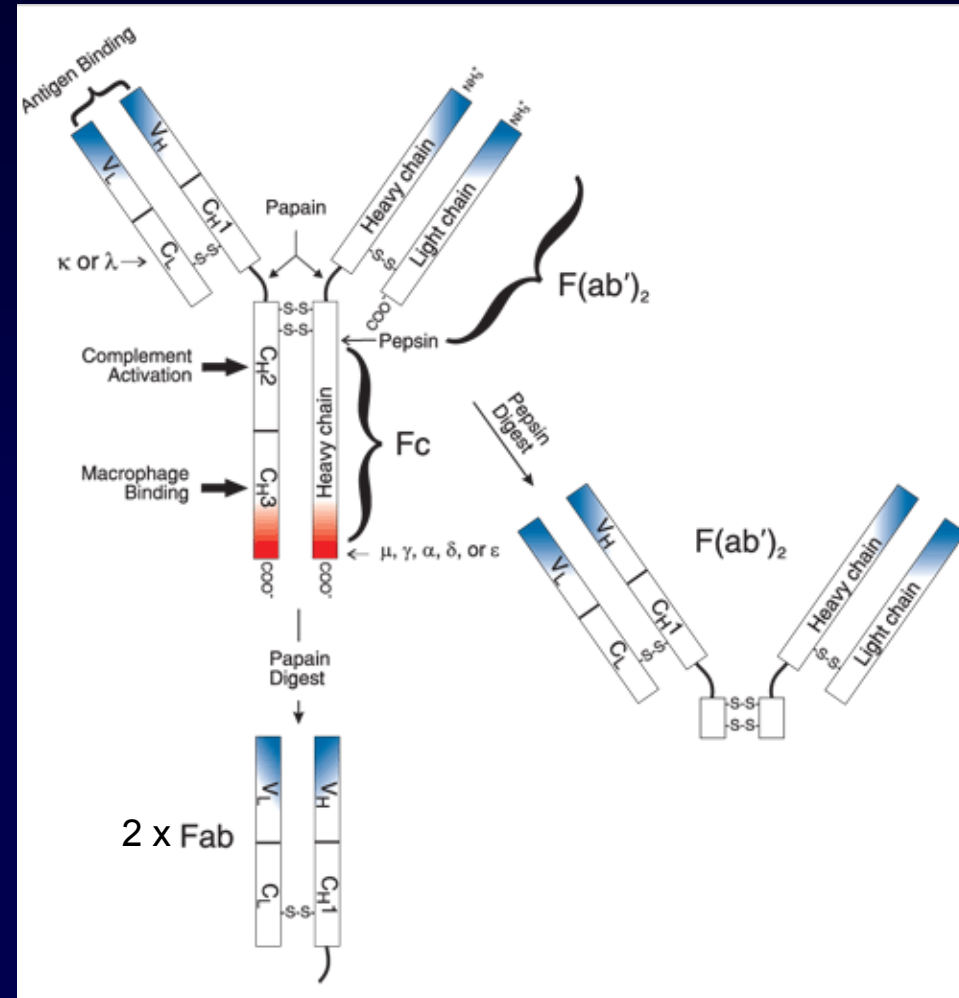
V_L a V_H tvoří **vazebné místo antigenu**, v této části **hypervariabilní oblasti** – tyto se během reakce s antigenem dostávají nejbližší (0,2 - 0,3 nm)

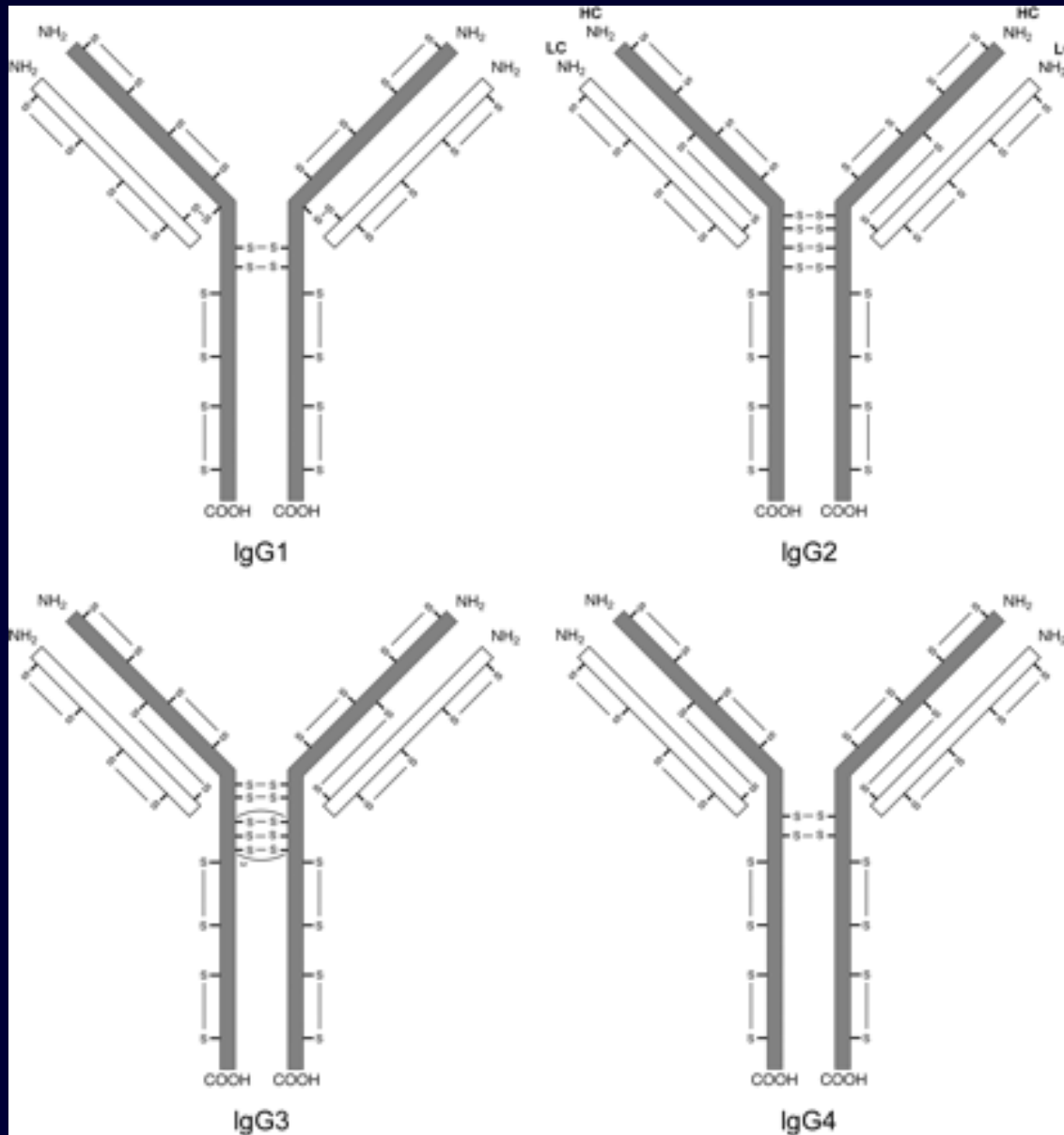
Struktura vazebného místa, která je unikátně charakteristická pro danou protilátku, se nazývá **idiotyp** -> každý klon protilátky má jiný idiotyp



Struktura – odvozena od enzymatického štěpení

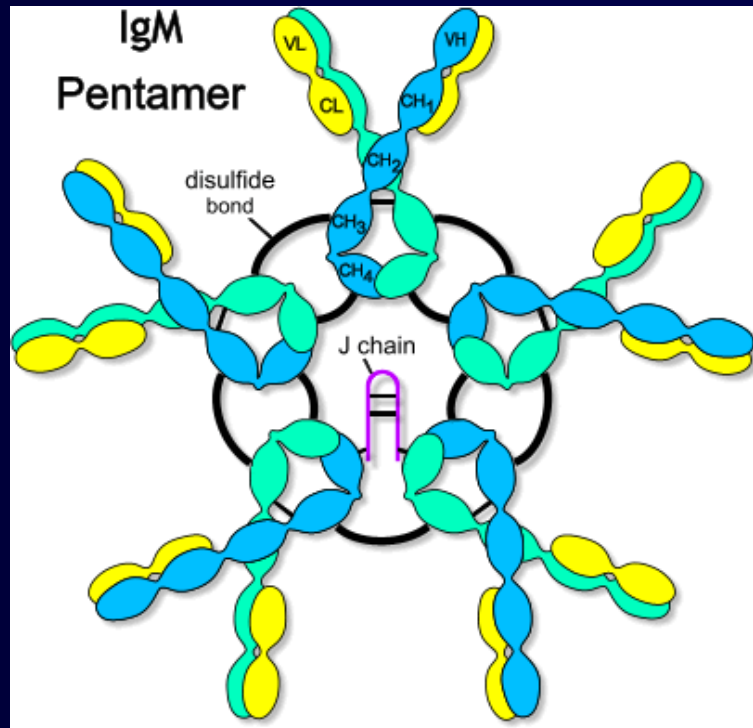
- papain- štěpí v pantové oblasti H řetězce
vznik:
 - 2x monovaletních **Fab** (Fragment antigen binding)
 - 1x **Fc** (Fragment crystallizable)
- pepsin – štěpí v C-koncové oblasti H řetězce
vznik:
 - 1x bivalentní **F(ab')₂**
 - zbytek Fc fragmentu je degradován





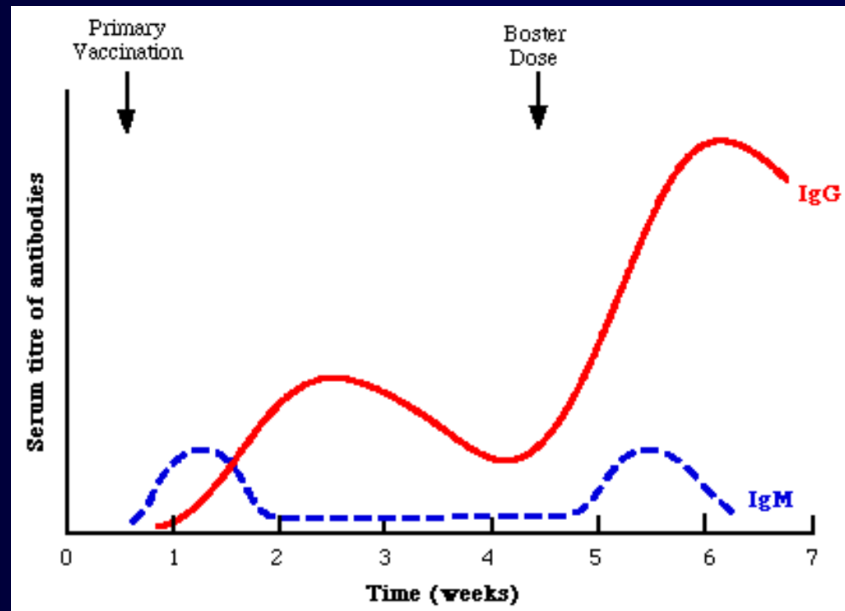
IgM

- pentamer, Mr=900kDa, 5x podjednotka po 180kDa
- obecný vzorec $(\mu_2 \kappa_2)_5$ nebo $(\mu_2 \lambda_2)_5$
- struktura spojena řetězcem „J“ (15kDa)
- stejné štěpení proteinázami jako IgG, vznik 10x Fab a Fc; 5x F(ab)₂
- Fc - cyklický pentamer (340kDa)



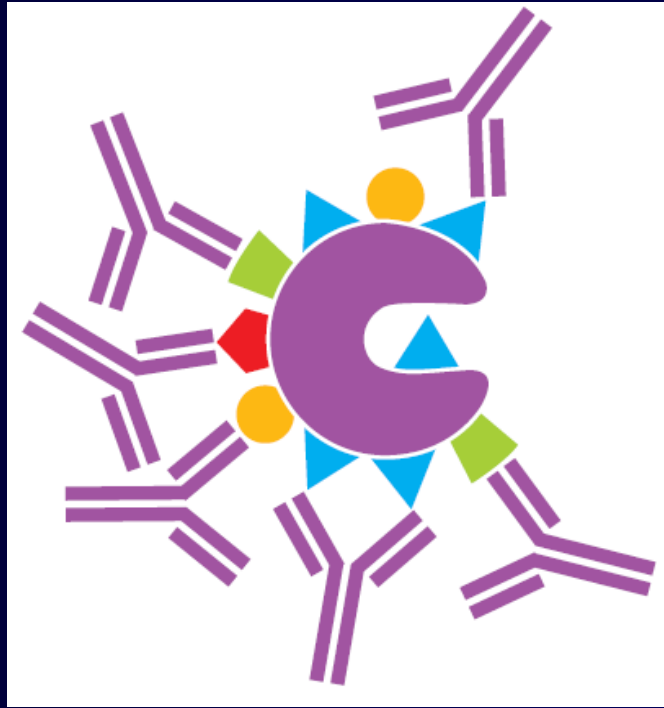
Imunitní odpověď

- 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



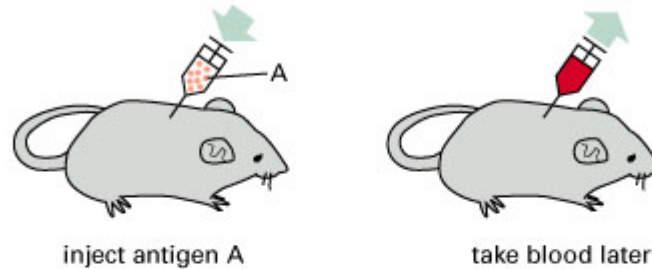
Polyklonální protilátky pro ICC

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

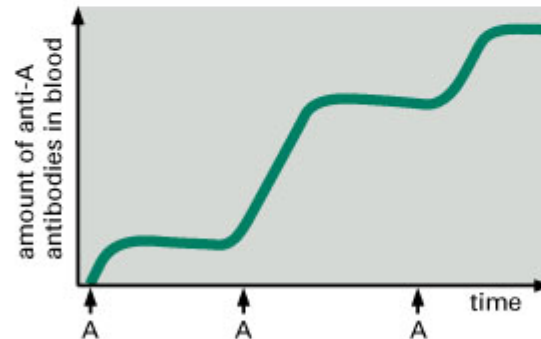


RAISING ANTIBODIES IN ANIMALS

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



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.

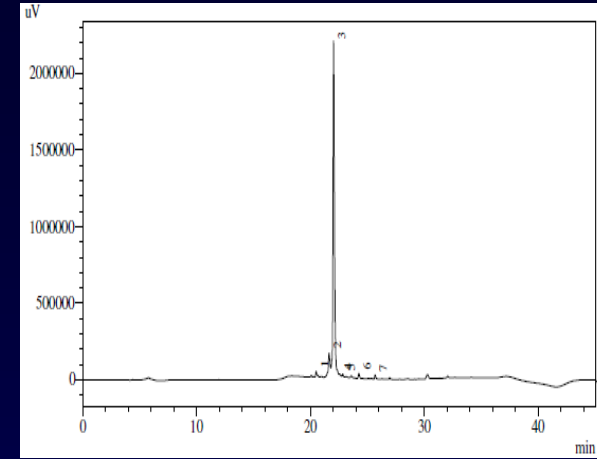


Because many different B cells are stimulated by antigen A, the blood will contain a variety of anti-A antibodies, each of which binds A in a slightly different way.

©1998 GARLAND PUBLISHING

Příprava polyklonálních protilátek

- navržení a syntéza peptidu (antigen)
- ověření čistoty hmotnostní spektrometrií a chromatografií
- coupling – vazba s KLH glykoproteinem
- KLH – Keyhole limpet hemocyanin
- plž (*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

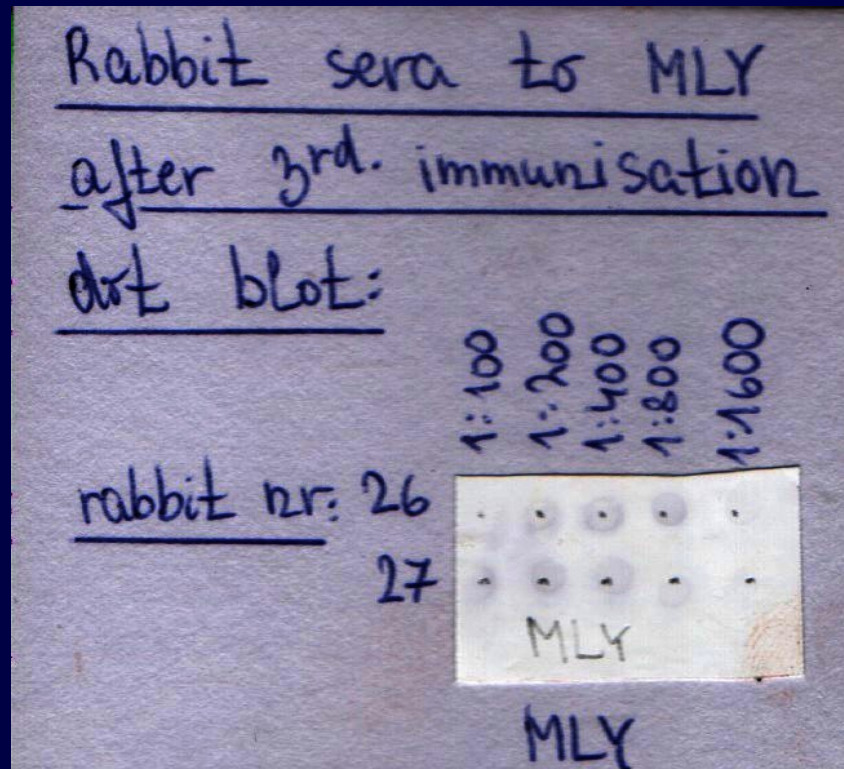
- 1) First injection – *day 1*: subcutaneous injection of 100 – 500 μg of purified protein or peptide coupled to KLH (in complete Freund's adjuvans).
- 2) Second injection – *day 15*: subcutaneous injection of 100 – 500 μg of purified protein or peptide coupled to KLH (in incomplete Freund's adjuvans).
- 3) Test sera – *day 20*: 5 mls of test sera
- 4) Third injection – *day 46*: subcutaneous injection of 100 – 500 μg 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 μg 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

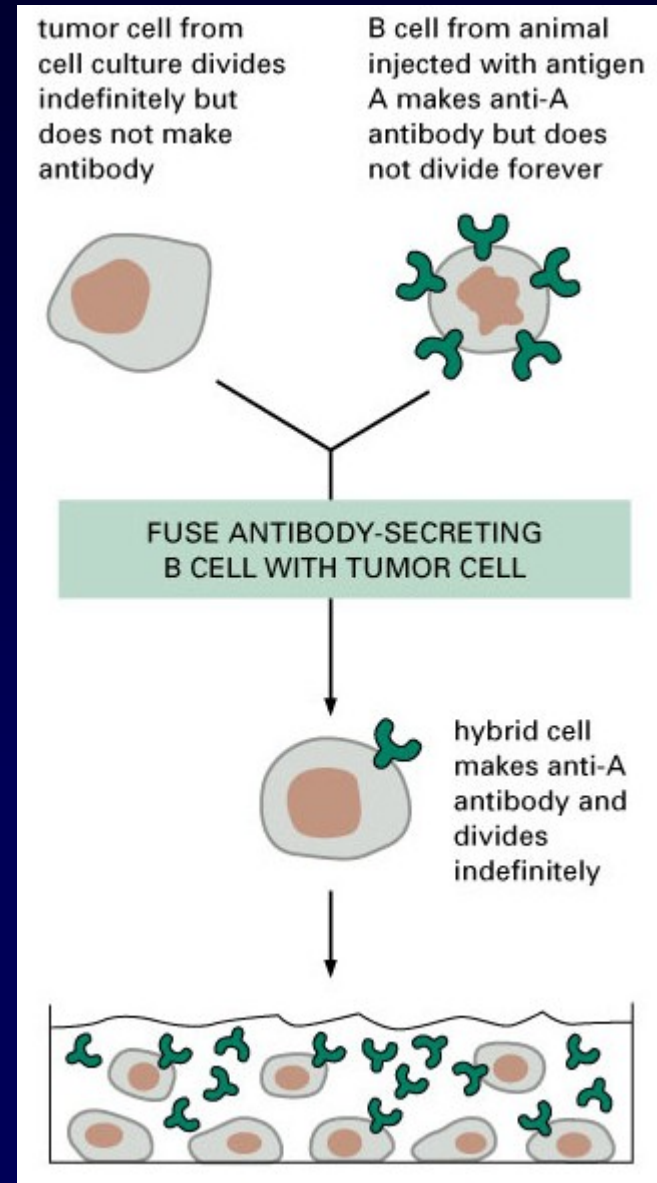
metoda: dot-blot

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

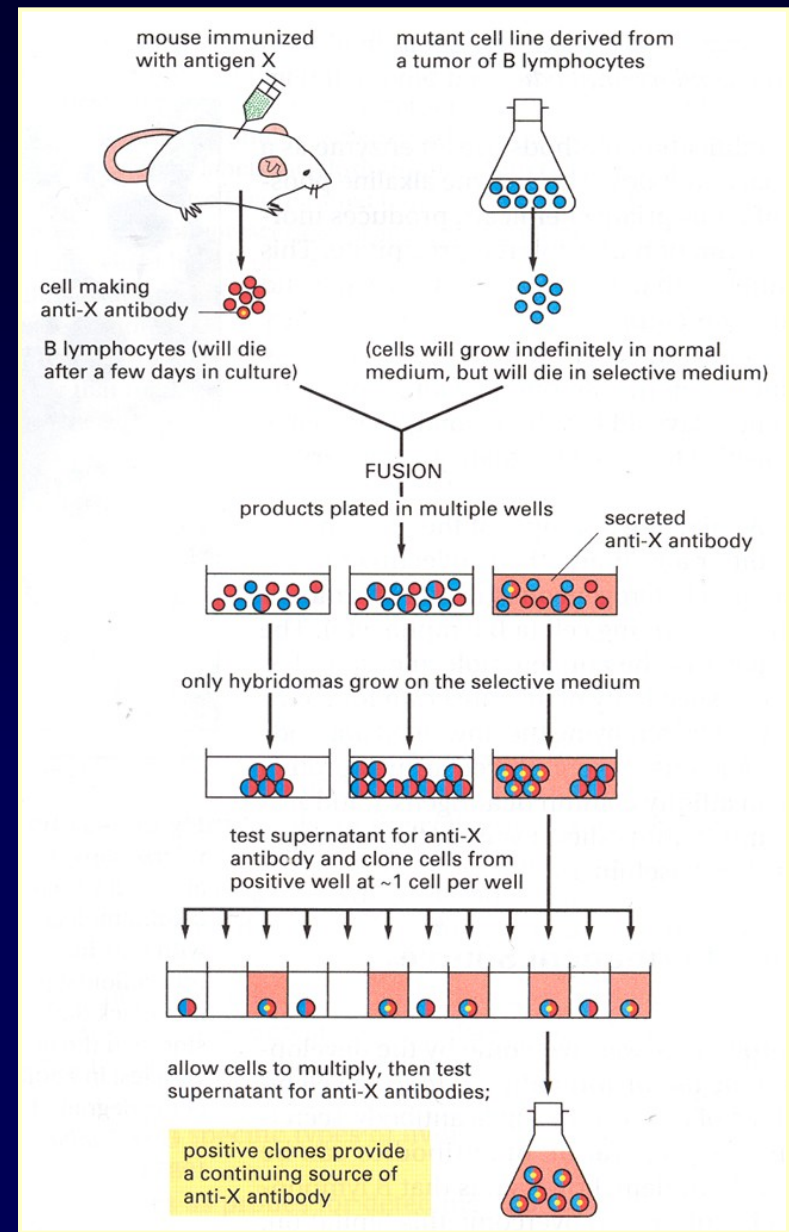
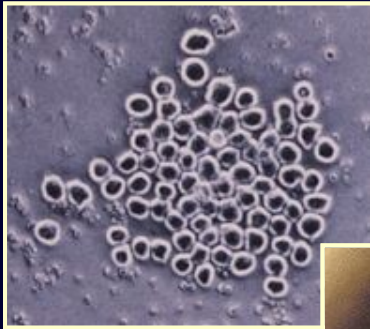


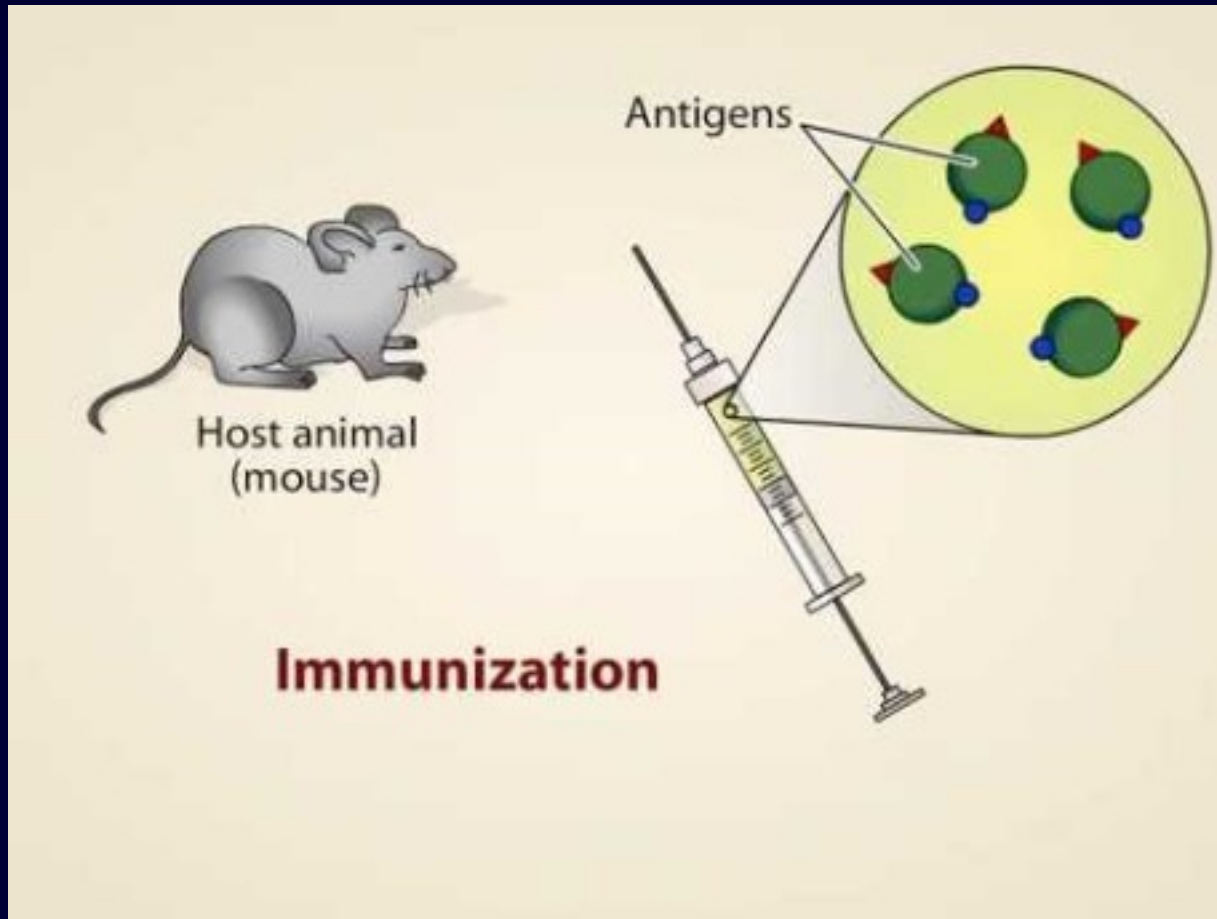
Monoklonální protilátky pro ICC

- 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





https://youtu.be/G3VT_PAqihU

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

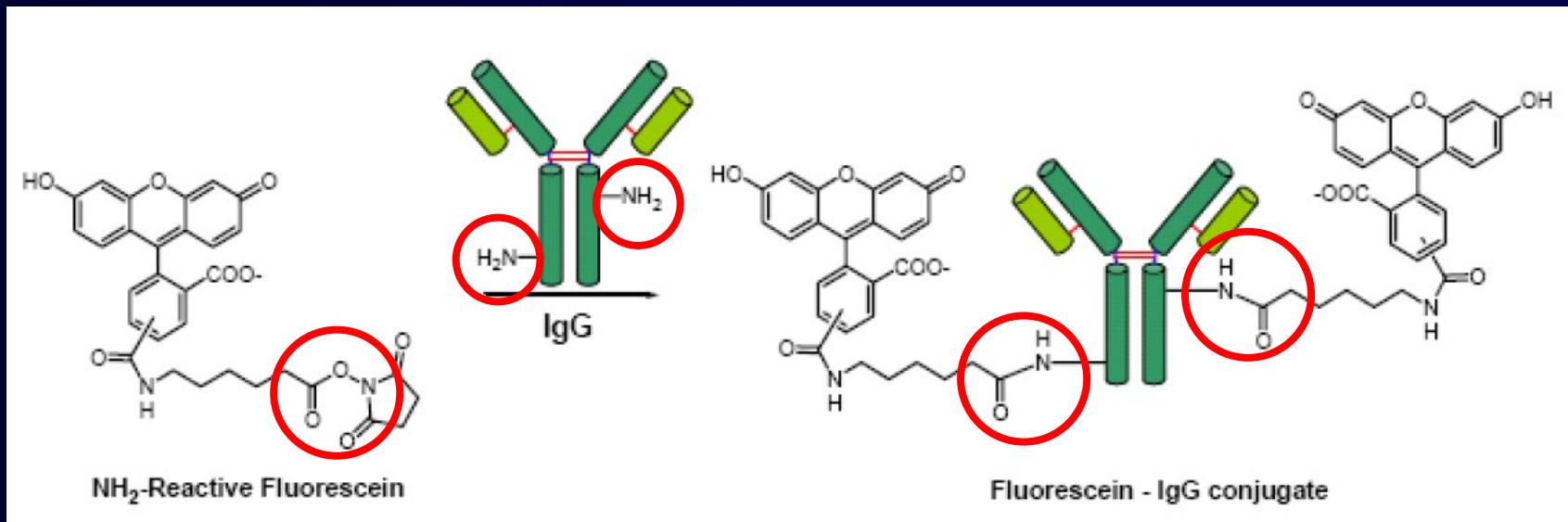
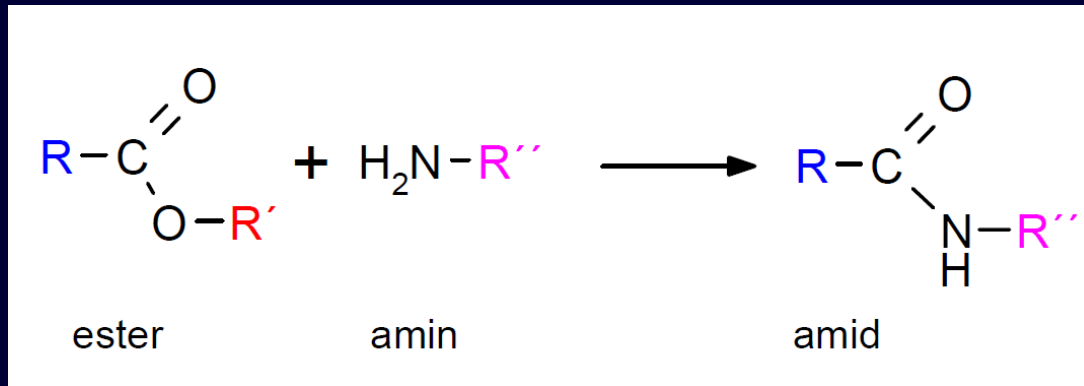
*MRC Laboratory of Molecular Biology,
Hills Road, Cambridge CB2 2QH, UK*

(10^7 P3-X67A g8) were fused to 10^8 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.



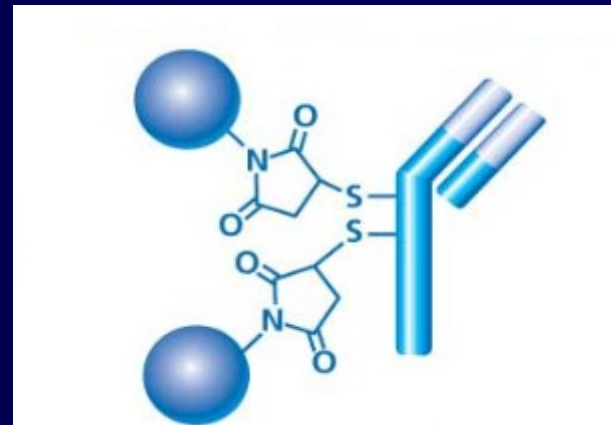
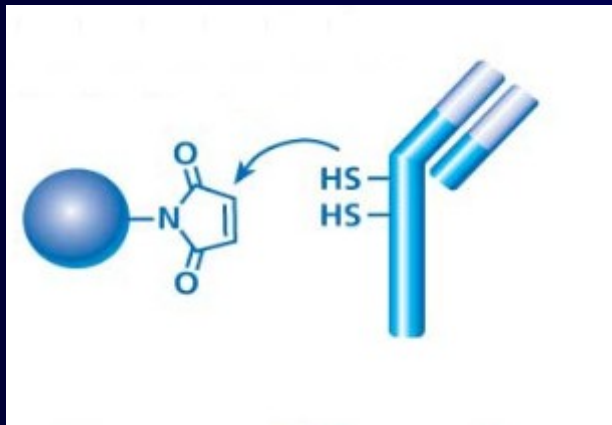
Konjugace protilátky s fluorochromem

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



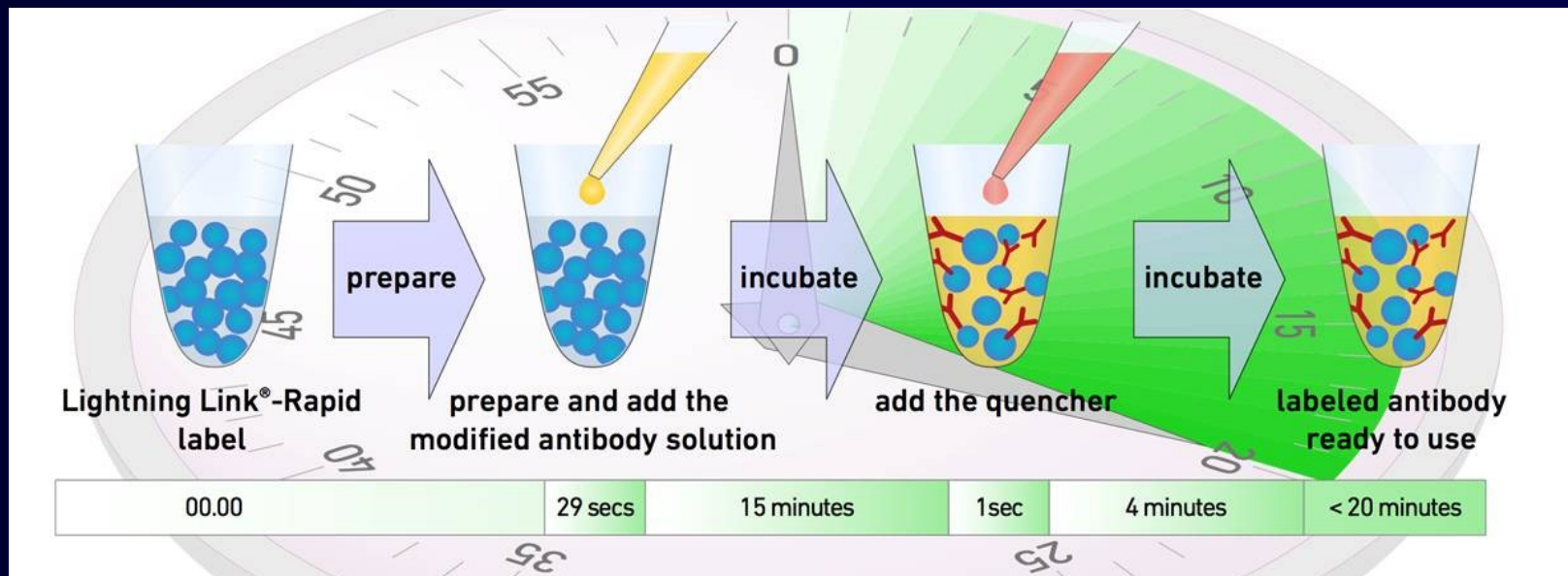
fluorochrom

imunoglobulin

epitop antigenu

Přímá imunofluorescence

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



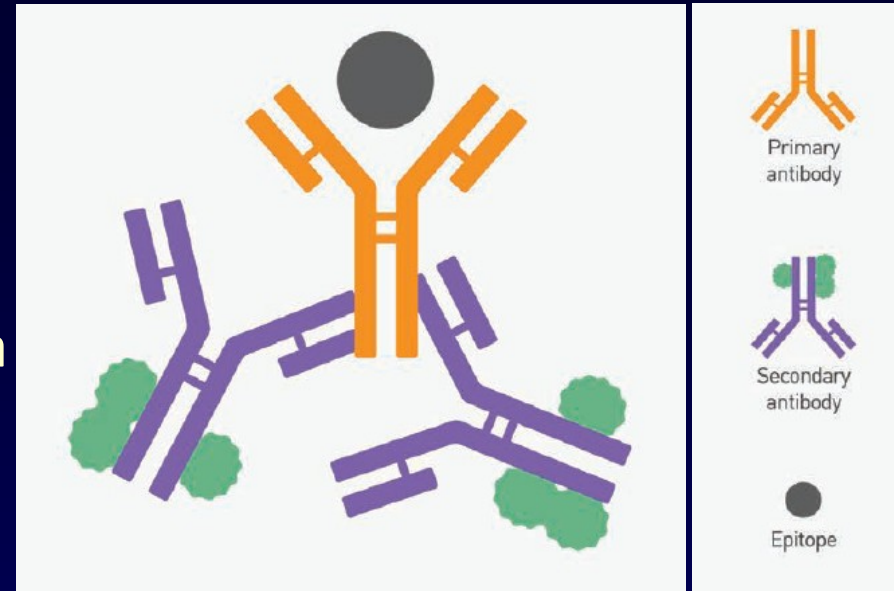
Innova Biosciences, Lightning-Link®



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°C)
- 5) blokování nespecifických vazeb
- 6) inkubace s protilátkou/-ami
(enzym/chromogen – platí pro klasickou IHC)
- 7) counterstaining
- 8) 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

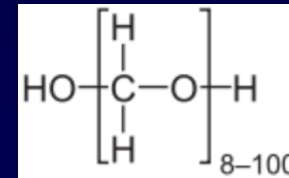
nevýhody

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



Crosslinkující chemická fixativa

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



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

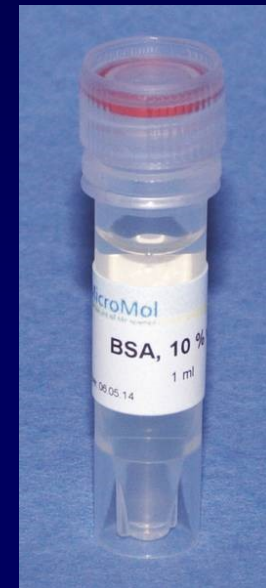
nutnost vyvázání:

- nespecifických vazebných míst, na která by mohla nasednout protilátka
- nevymytého fixativa
- polárních nebo velmi hydrofobních struktur

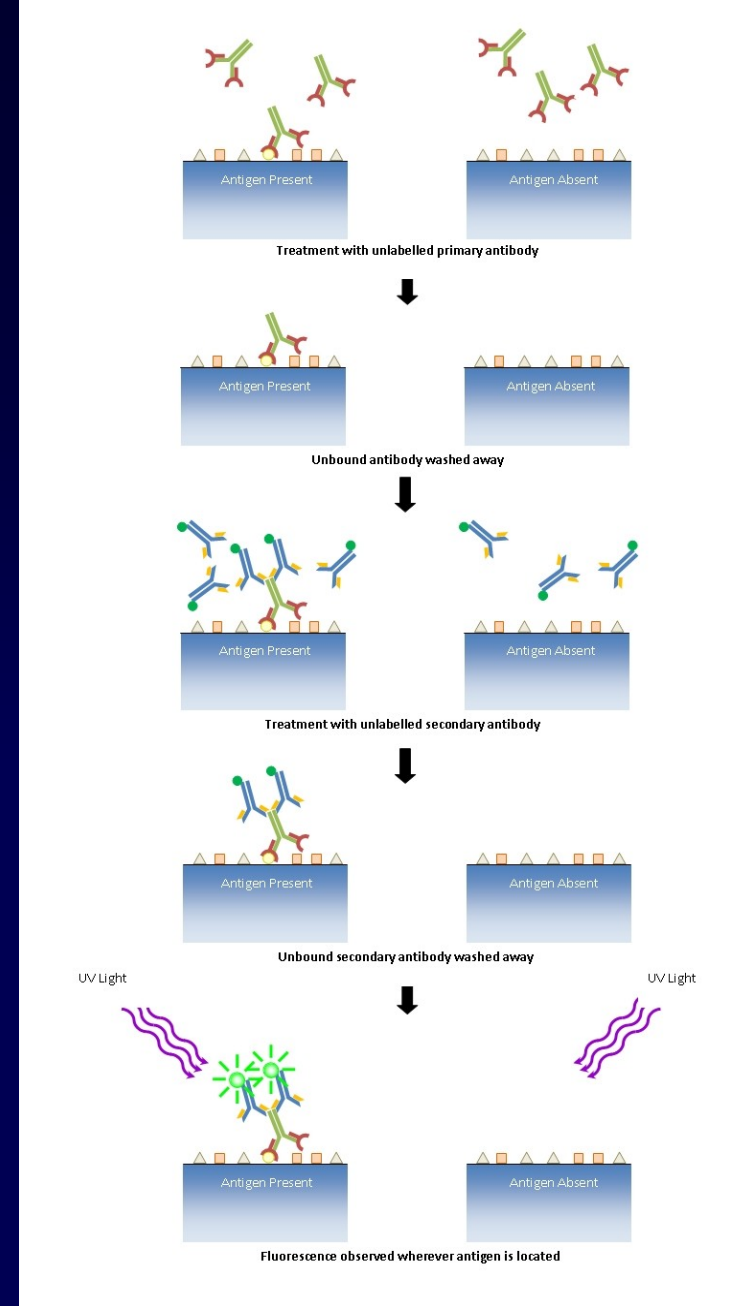
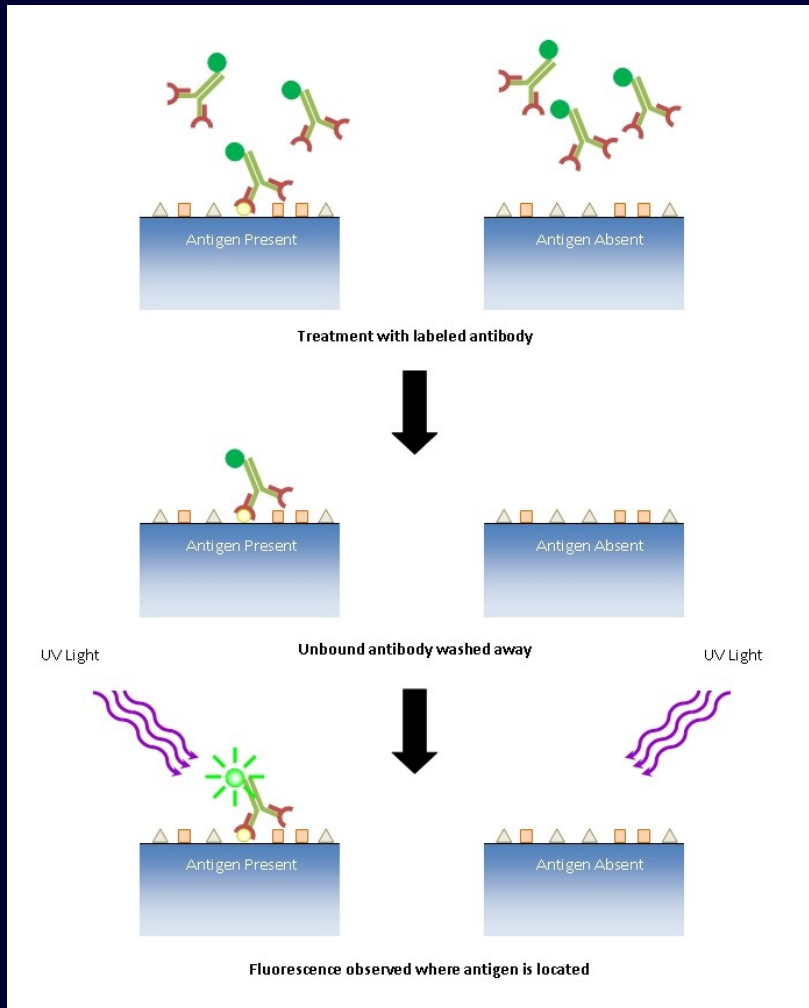
- zvyšuje specificitu protilátky
- snižuje signál z pozadí

nejčastěji používané:

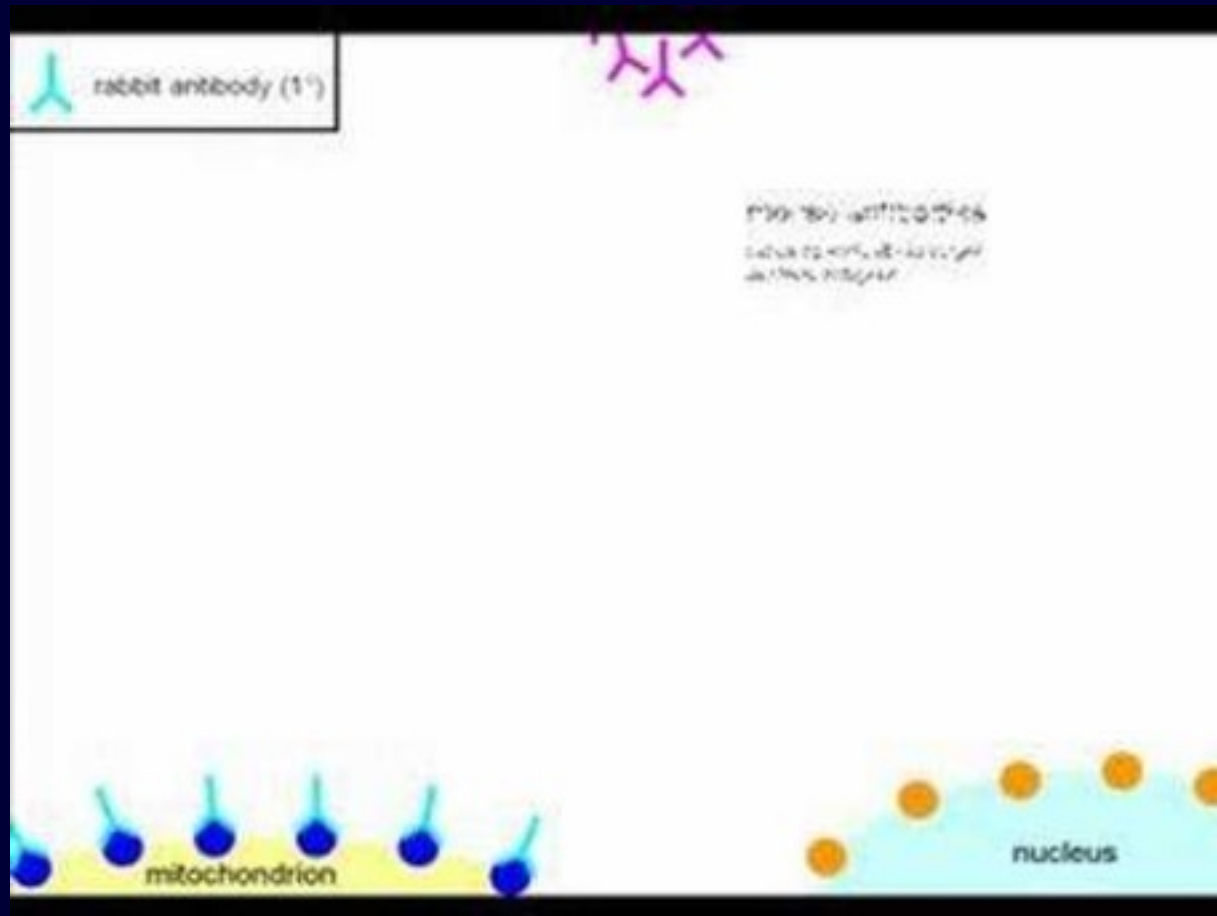
- bovinní sérový albumin (BSA): 1-10%,
- sérum (ze stejného zvířete jako II. Ab, nebo jiné než I. a II. Ab)
- želatina



Přímá a nepřímá imunofluorescence



Dvojité značení nepřímá imunofluorescence



<https://youtu.be/OH2GFeaGV6w>



Celkový postup nepřímá imunofluorescence

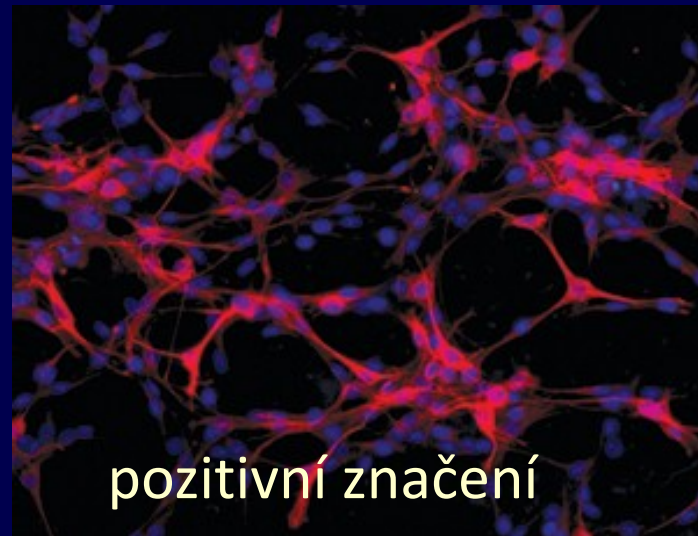


<https://youtu.be/pteO6FRWo3g>



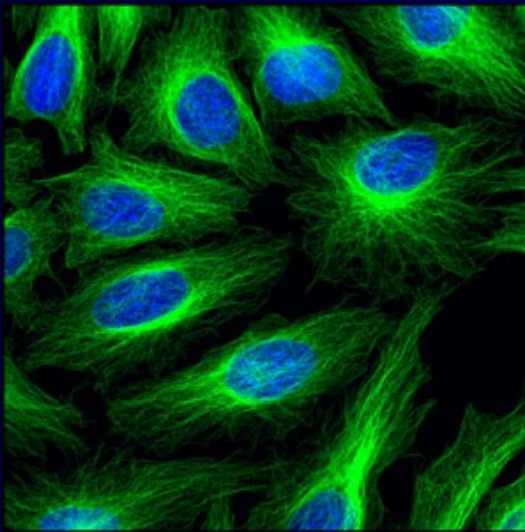
Negativní kontrola

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

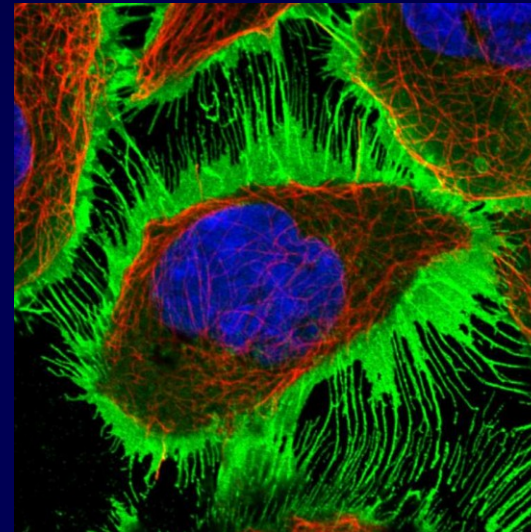


Pozitivní kontrola

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



HeLa: α -tubulin



A431: EGFR

Montování = uzavírání

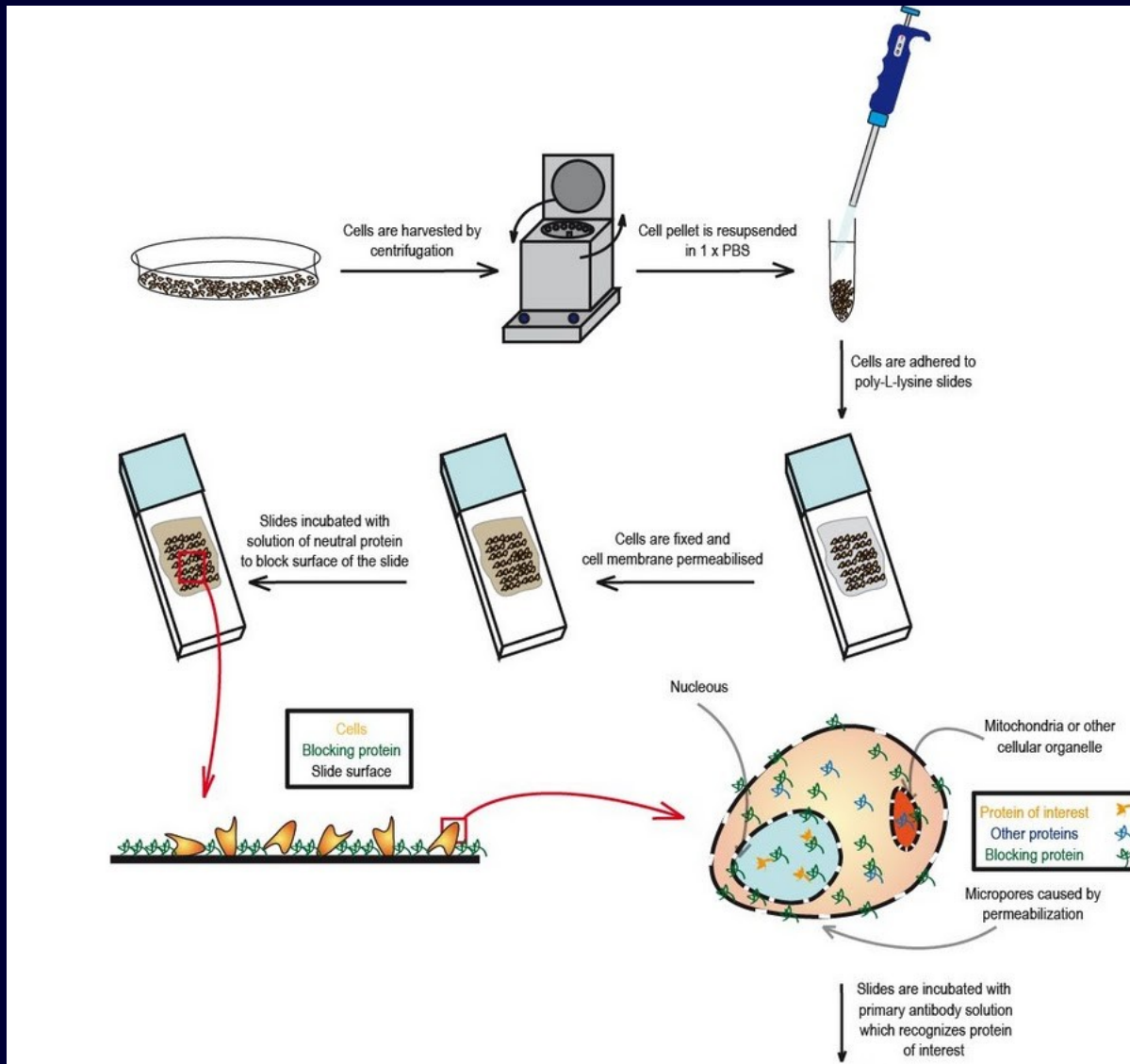
- uchování preparátu na delší dobu
- bez přístupu vzduchu
- v prostředí bránícím vyhasínání fluorescence
- mohou současně označovat nukleové kyseliny (+DAPI, aj.)

tuhnoucí vs. netuhnoucí montovací média

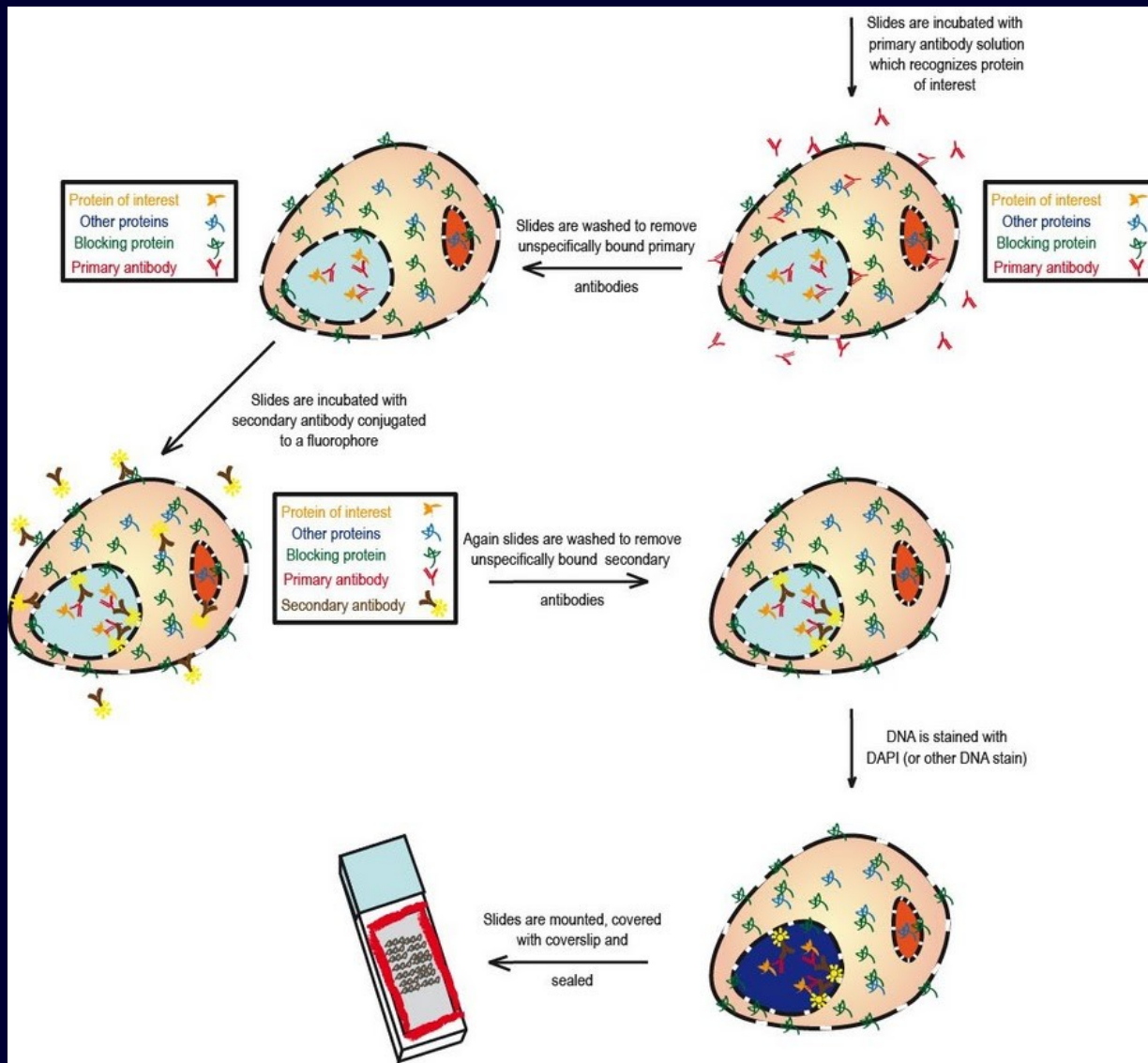
- na bázi polyvinyl alkoholu (např. Mowiol) – tuhne
- na bázi glycerolu (např. Vectashield) – potřeba zarámovat sklo – gel, parafín, lak na nehty..



Celkový postup nepřímého imunofluorescenčního značení – 1. část



Celkový postup nepřímého imunofluorescenčního značení – 2. část

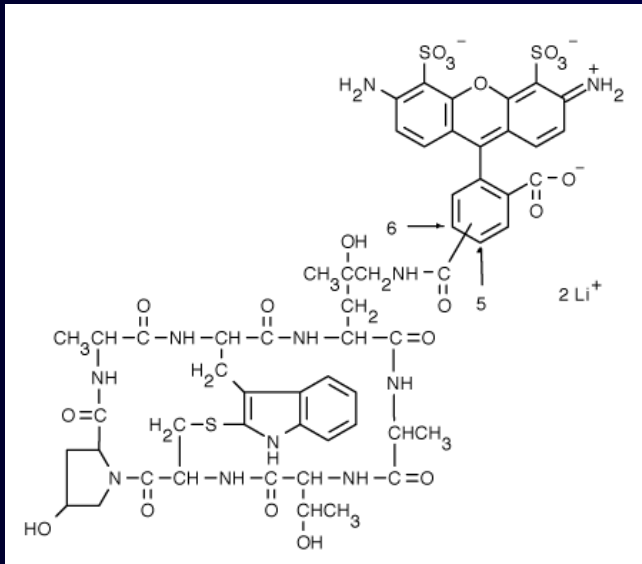


Nepřímá vazba fluorochromu – značky

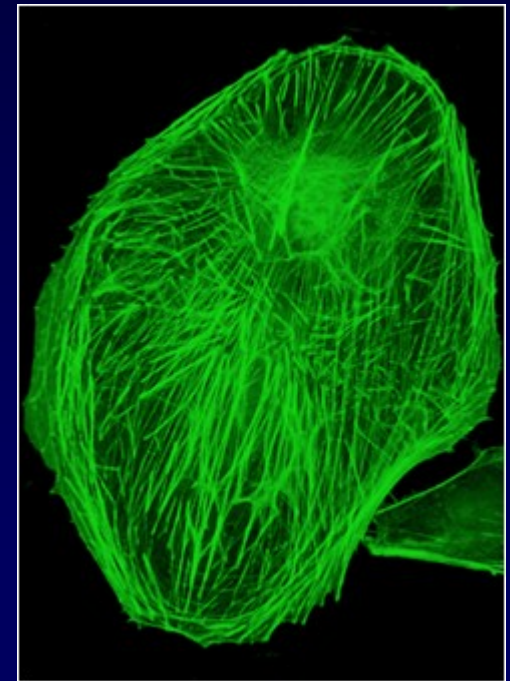
navázání na imunoglobulin (protilátku) nebo úsek nukleové kyseliny, phalloidin..

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

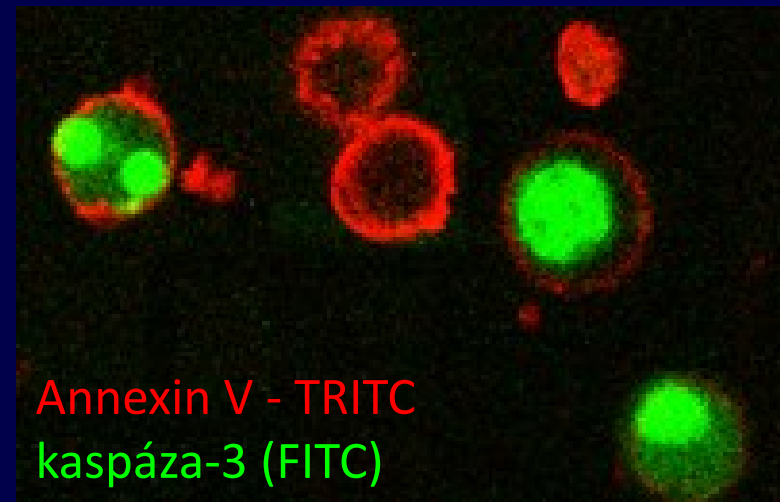
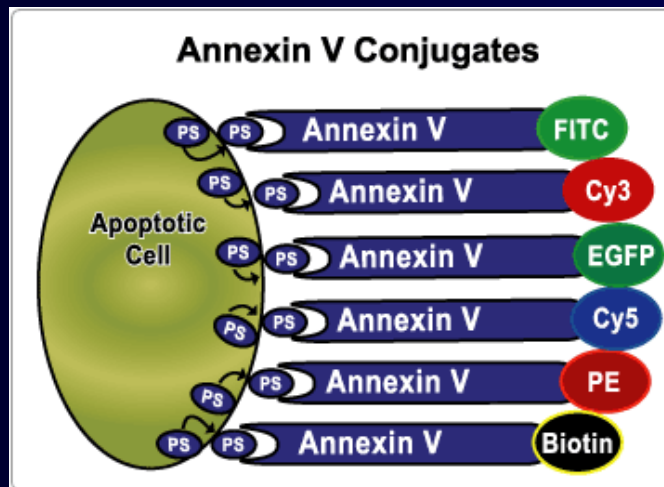
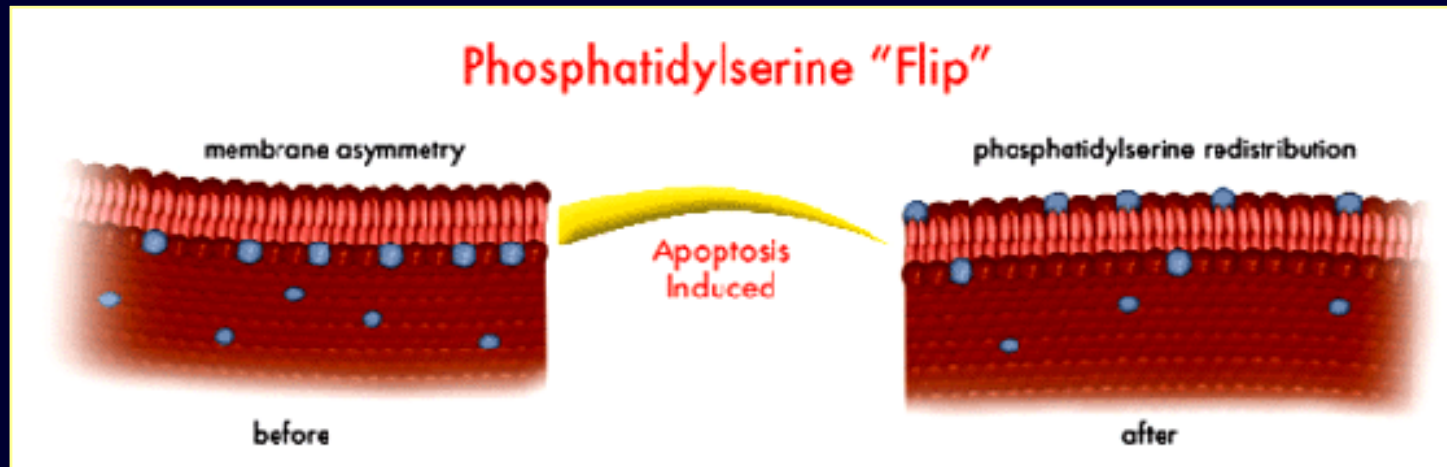


Alexa Fluor 488 phalloidin



Annexin V + fluorochrom

detekce fosfatidylserinu („eat me“ signal) v apoptóze



Interaktivní materiály

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



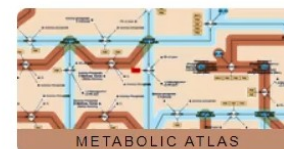
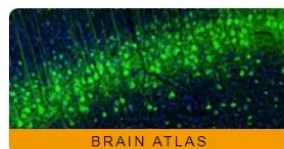
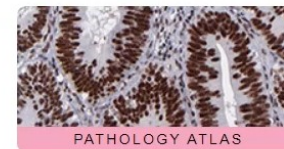
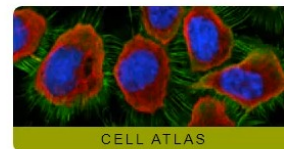
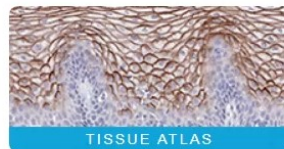
THE HUMAN PROTEIN ATLAS

≡ MENU HELP NEWS

SEARCH[†]

 [Fields »](#)
e.g. RBM3, insulin, CD36

SARS-CoV-2 relevant proteins



Science Research Article
An atlas of the protein-coding genes

Recent news

Tue, 28 Apr 2020

Interaktivní materiály

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

- <http://www.protilatky.cz/>





[CST Updates During COVID-19 | Click here >>](#)

Tools for Researching the Host-Immune Response to SARS-CoV-2 and the COVID-19 Pandemic

EXPLORE

[Viral Entry, Replication, and Transcription ▶](#)

[Virus Detection and Innate Immune Activation ▶](#)

[Type I Interferon and Viral Restriction Factors ▶](#)

[Adaptive Immune Response ▶](#)

[Cytokines and Inflammation ▶](#)

[Cell Death and Viability ▶](#)

Interaktivní materiály

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

- <http://www.protilatky.cz/>



Search All ▼ Search 🔍

[Home](#) > [Brands](#)

Molecular Probes

Popular products

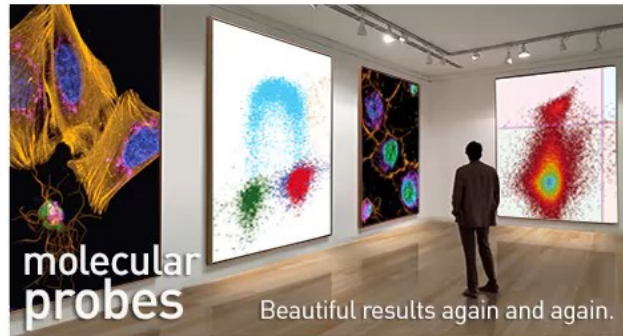
- [Countess II FL Automated Cell Counter](#)
- [Imaging Reagents](#)
- [Microplate Assays](#)
- [Flow Cytometry Reagents](#)
- [Secondary Detection Tools](#)
- [Alexa Fluor Dyes](#)
- [Fluorophores](#)
- [View all Molecular Probes Product Lines](#)

Key applications

- [Flow Cytometry](#)
- [Fluorescence Microscopy](#)
- [Cell Viability & Function](#)
- [Cell Structure Labeling](#)
- [Antibody & Protein Labeling Kits](#)
- [Labeling Chemistry](#)
- [Super-Resolution Microscopy](#)

Resources

- [Molecular Probes School of Fluorescence](#)
- [Molecular Probes Handbook](#)
- [Fluorescence SpectraViewer](#)
- [Cell Staining Tool](#)
- [BioProbes Journal](#)



[School of Fluorescence >](#)

[Molecular Probes Handbook >](#)

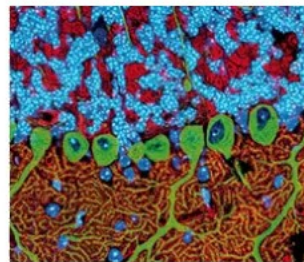
[Fluorescence SpectraViewer >](#)

[Antibodies >](#)

[Fluorophore selection guides >](#)

Invitrogen Molecular Probes fluorescence reagents are among the most peer-referenced in all of life science research. Trusted Molecular Probes product lines, including Alexa Fluor, SYTOX, and Click-iT, empower scientists working in cell biology, genetic analysis, protein biology, and cell engineering to make the discoveries that advance our understanding today and catalyze the research goals of tomorrow.

Popular Molecular Probes products



[Imaging Reagents](#)



[Microplate Assays](#)



[Flow Cytometry Reagents](#)

Interaktivní materiály

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

- <http://www.protilatky.cz/>

