

Bi8920 Fluorescenční mikroskopie

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

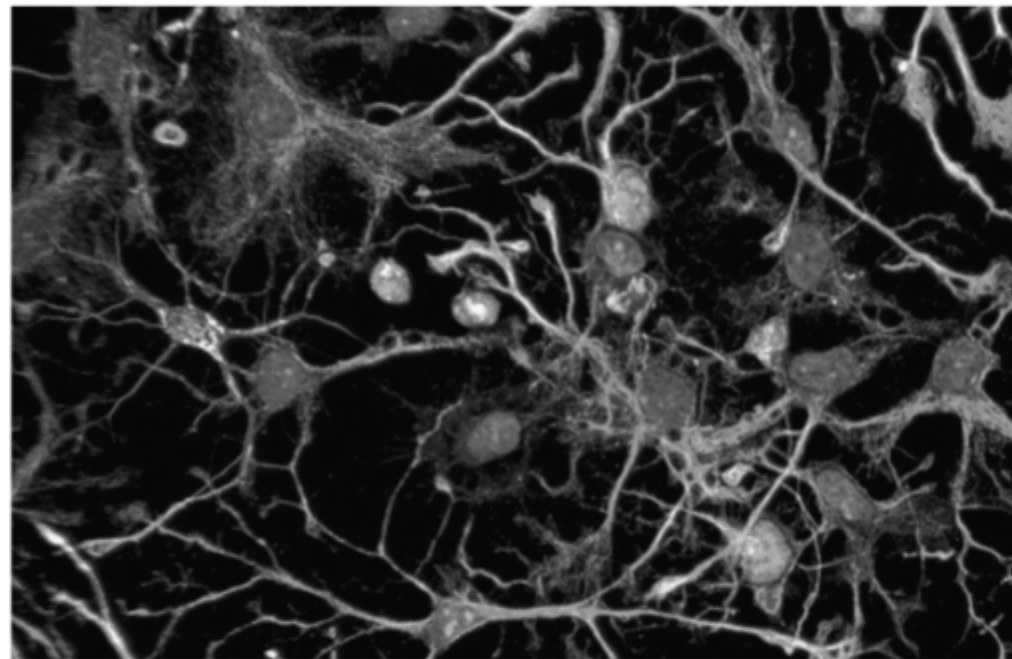
DNA, buněčná stěna, plazmatická membrána...
mitochondriální aktivita - respirační vzplanutí, pH
indikátory, membránový potenciál.

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



Imunocytochemie (ICC)

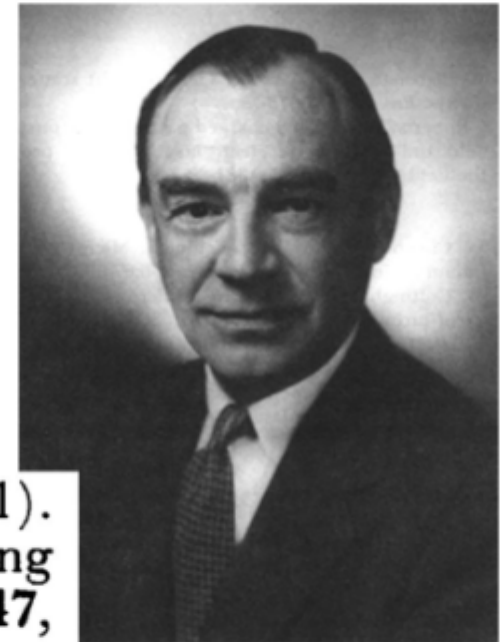
- soubor metod, které umožňují detekci antigenu v tkáni nebo buňce (*in situ*)
- pomocí značených protilátek



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

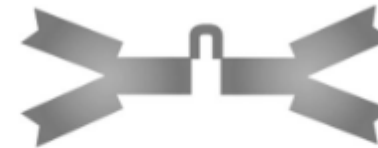
- patří do skupiny imunoglobulinů
- třídy: IgA, IgD, IgE, IgG, IgM (u savců)
- složení: 2x těžký řetězec (H), 2x lehký řetězec (L)
- H řetězce: různé dle antigenních a strukturálních vlastností Ig
-> podtypy (alfa, delta, epsilon, gama, mí)
- L řetězce: lambda nebo kapa – různě, v závislosti na typu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

Name	Heavy Chain	Description
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.
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.

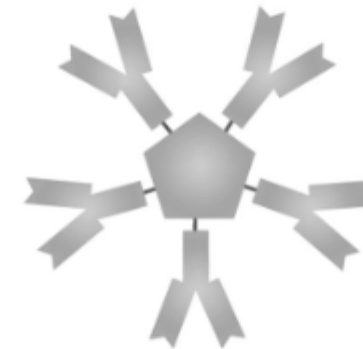
Antibody Complexes



Monomer:
IgD, IgE, IgG



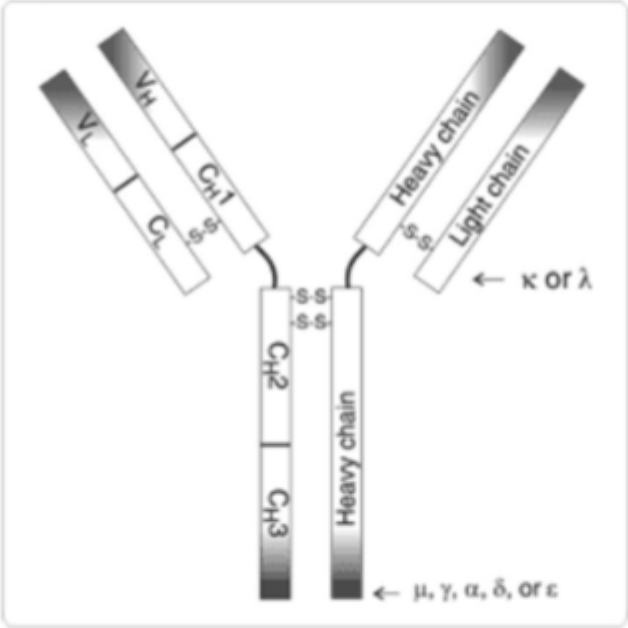
Dimer:
IgA



Pentamer:
IgM



Antibody	Human and Mouse		
	Light Chain	Subtype	Heavy Chain
IgA	κ or λ κ or λ	IgA ₁ IgA ₂	α ₁ α ₂
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 ₁	γ ₁	κ or λ	IgG ₁	γ ₁
	κ or λ	IgG ₂	γ ₂	κ or λ	IgG _{2a}	γ _{2a}
	κ or λ	IgG ₃	γ ₃	κ or λ	IgG _{2b}	γ _{2b}
	κ or λ	IgG ₄	γ ₄	κ or λ	IgG ₃	γ ₃

IgG

obecný vzorec:

$\gamma_2 \lambda_2$ nebo $\gamma_2 \kappa_2$

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 :

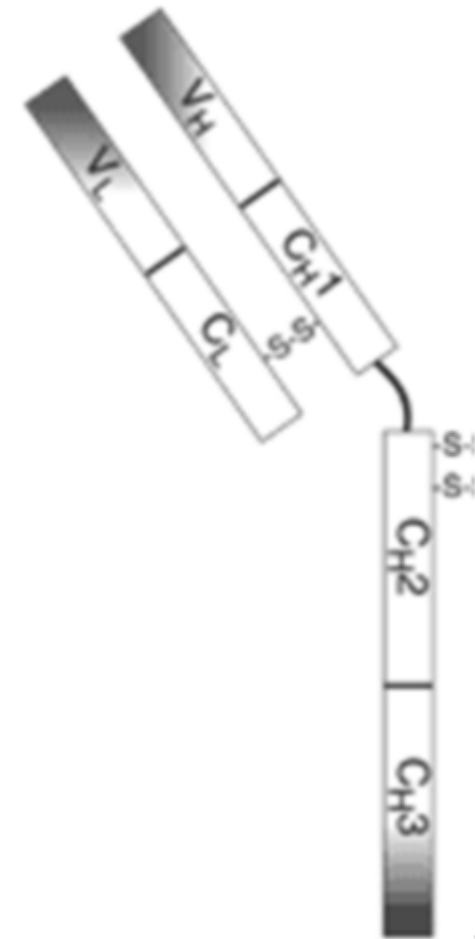
L řetězec: 1x V_L doména

H řetězec: 1x V_H doména

na C-koncích :

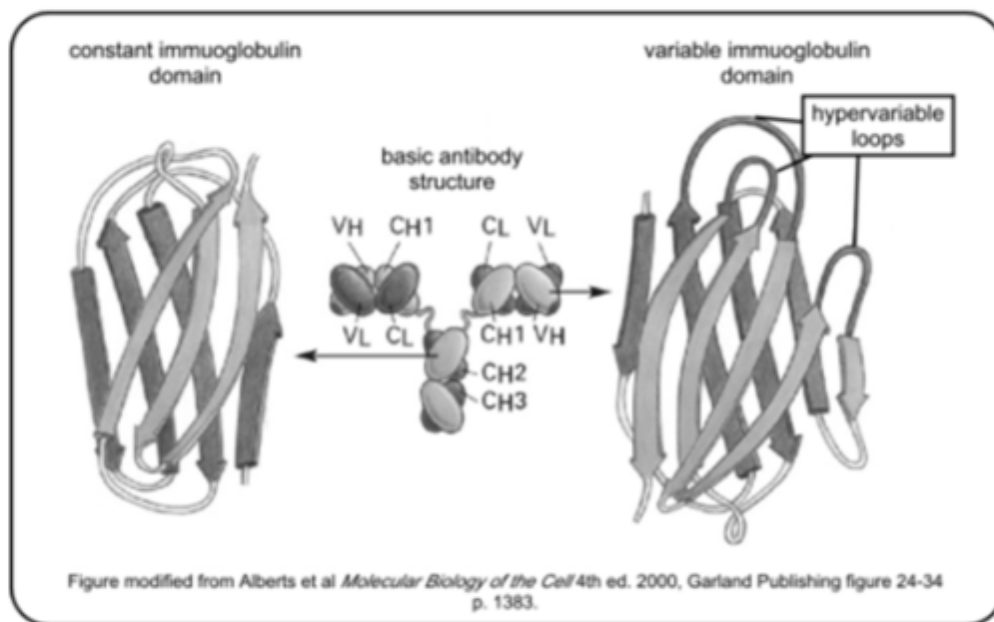
L řetězec: 1x C_L doména

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



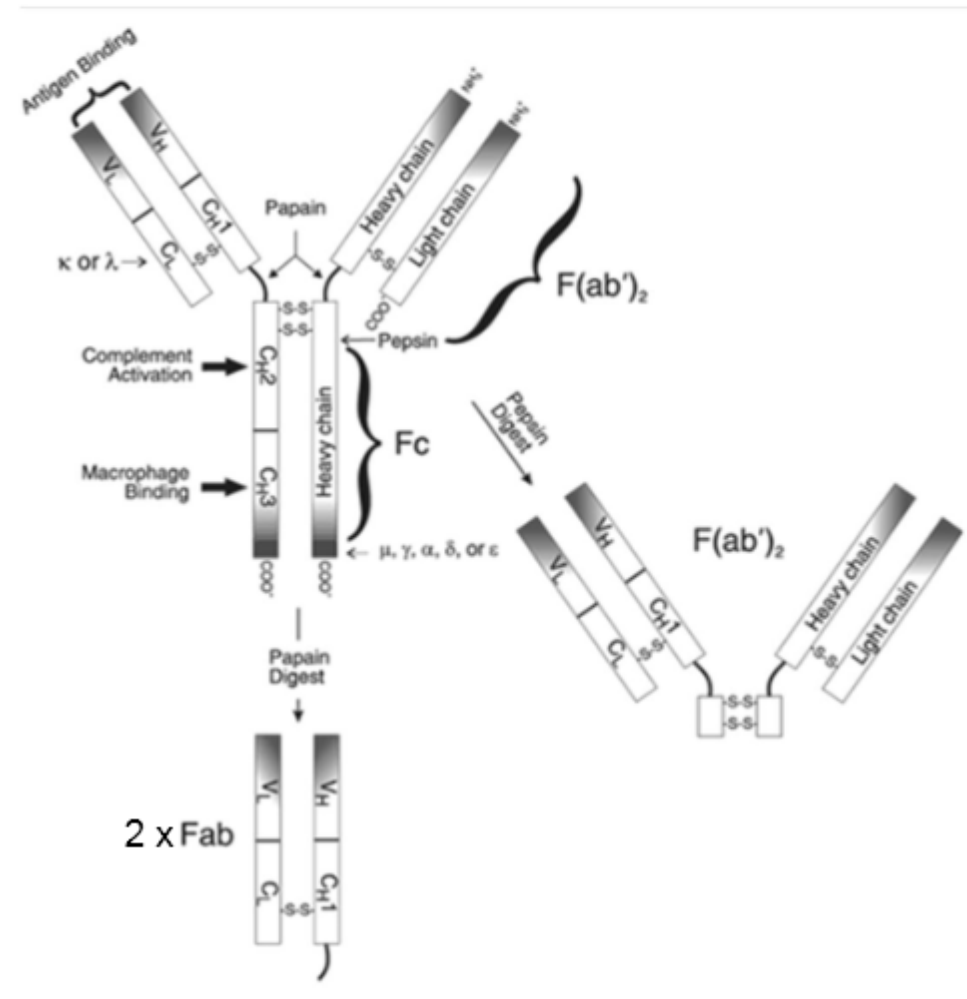
V_L a V_H tvoří vazebné místo antigenu, v této části hypervariabilní oblasti – tyto se během reakce s antigenem dostávají nejbliže (0,2 - 0,3 nm)

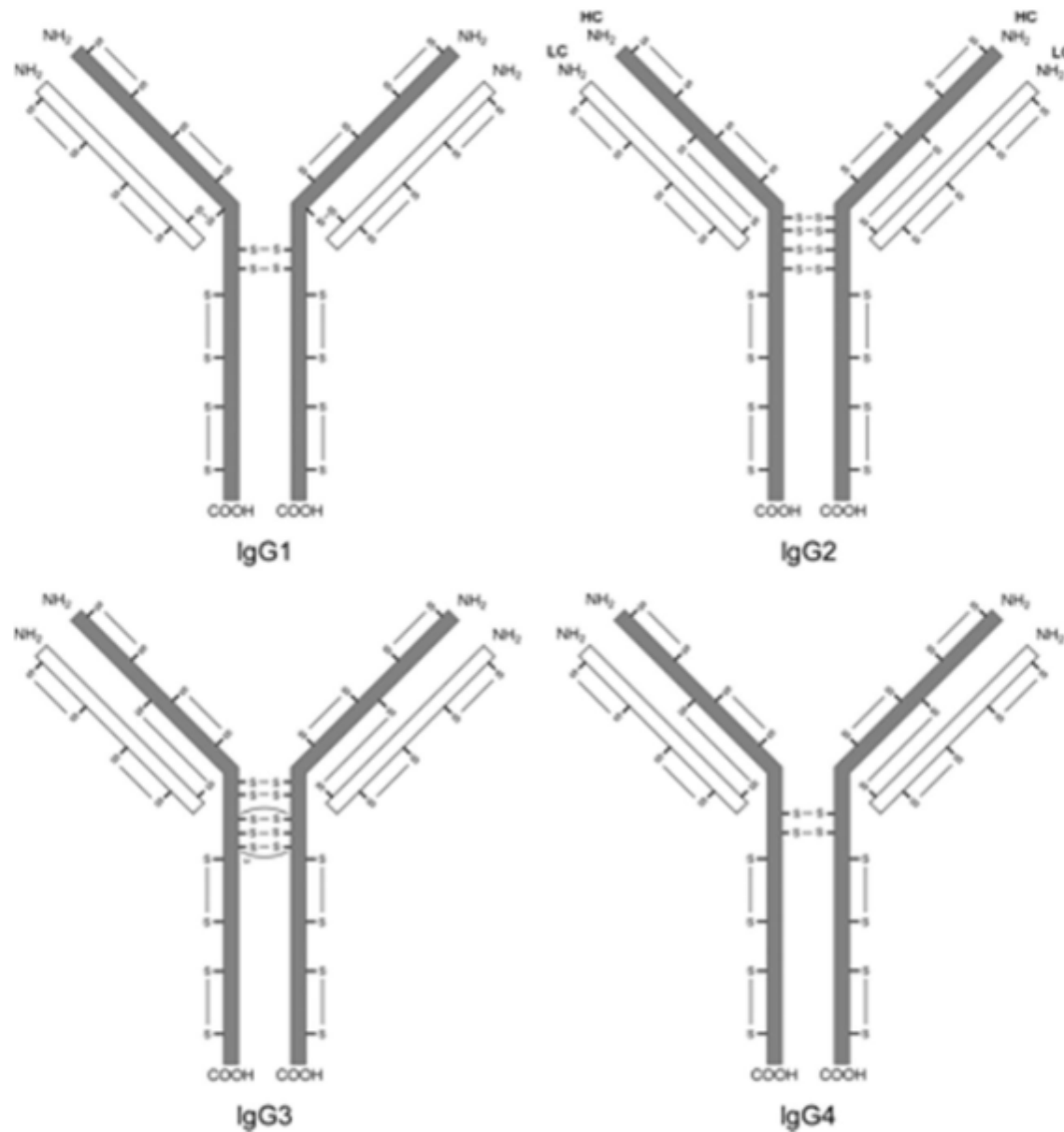
Struktura vazebného místa, která je unikátně charakteristická pro danou protilátku, se nazývá idiotyp -> každý klon protilátky má jiný idiotyp



Struktura – odvozena od enzymatického štěpení

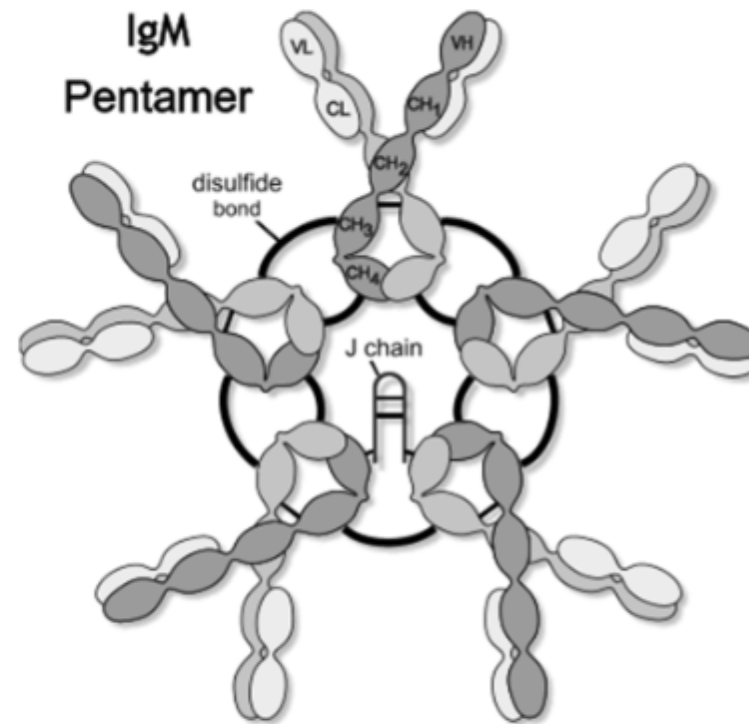
- papain- štěpí v pantové oblasti H řetězce
vznik:
 - 2x monovaletních Fab (Fragment antigen binding)
 - 1x Fc (Fragment crystallizable)
- pepsin – štěpí v C-koncové oblasti H řetězce
vznik:
 - 1x bivalentní $F(ab')_2$
 - zbytek Fc fragmentu je degradován





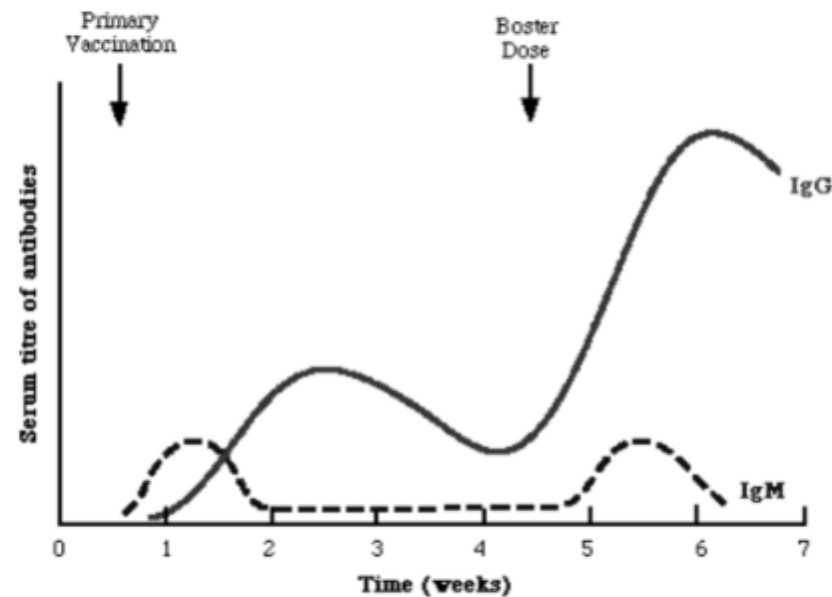
IgM

- 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 štěpení proteinázami jako IgG, vznik 10x Fab a Fc; 5x $F(ab)_2$
- Fc - cyklický pentamer (340kDa)



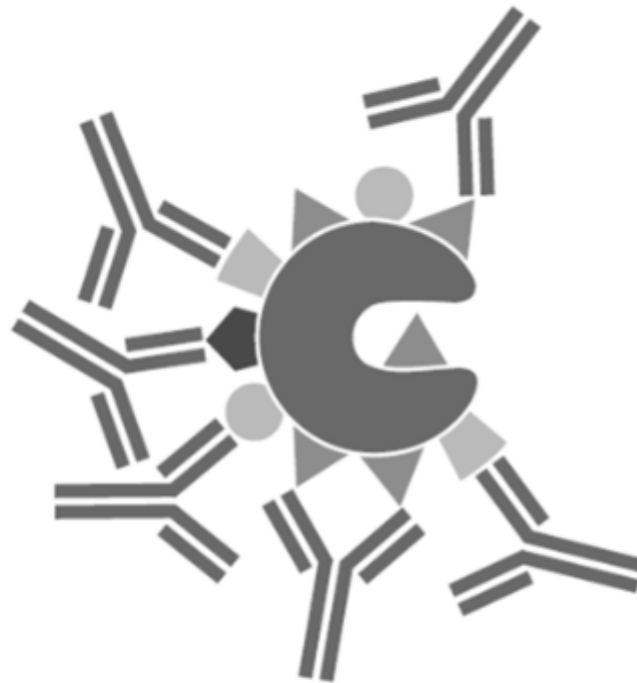
Imunitní odpověď

- 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.

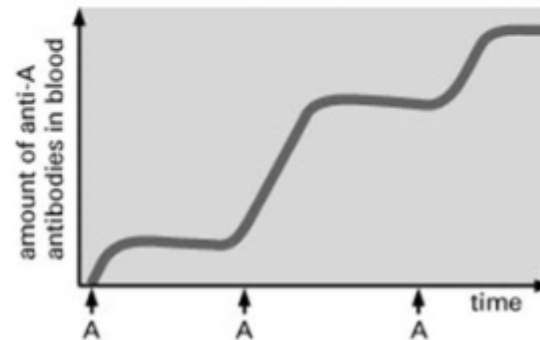


inject antigen A



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.



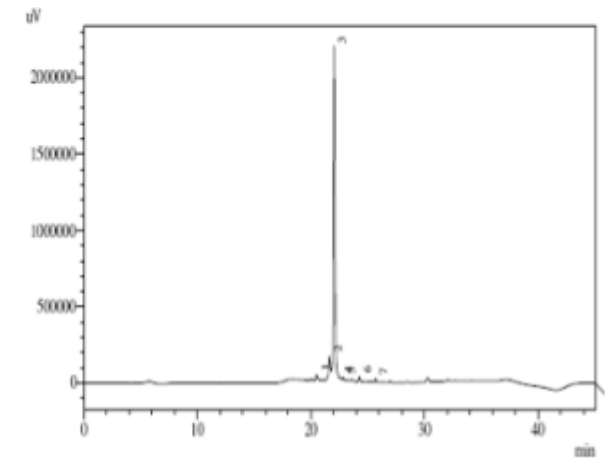
Because many different B cells are stimulated by antigen A, the blood will contain a variety of anti-A antibodies, each of which binds A in a slightly different way.

©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
- 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

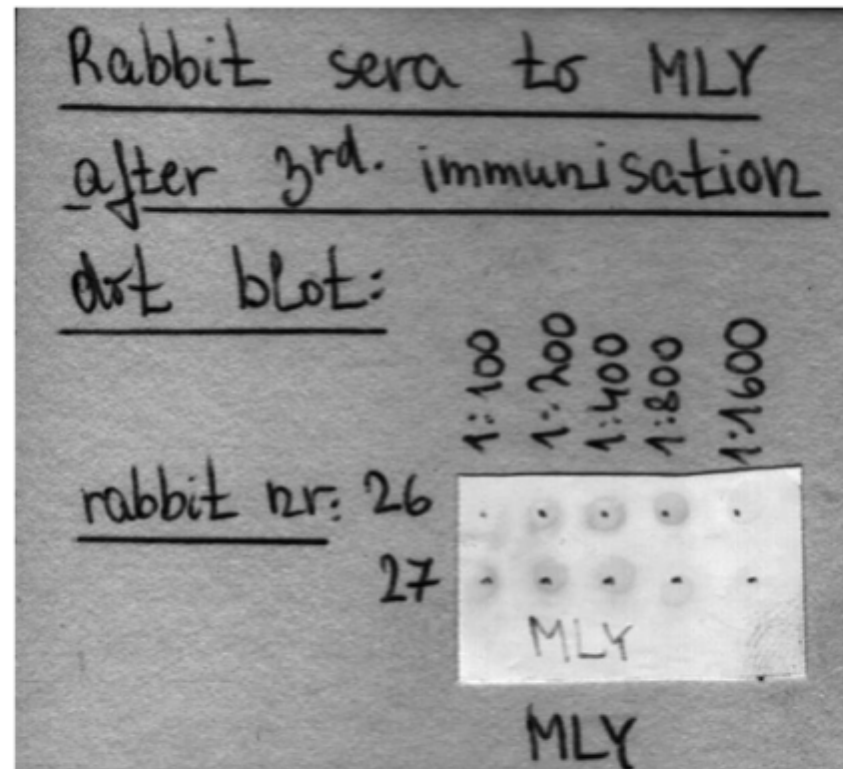
- 1) First injection – *day 1*: subcutaneous injection of 100 – 500 μg of purified protein or peptide coupled to KLH (in complete Freund's adjuvans).
- 2) Second injection – *day 15*: subcutaneous injection of 100 – 500 μg of purified protein or peptide coupled to KLH (in incomplete Freund's adjuvans).
- 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

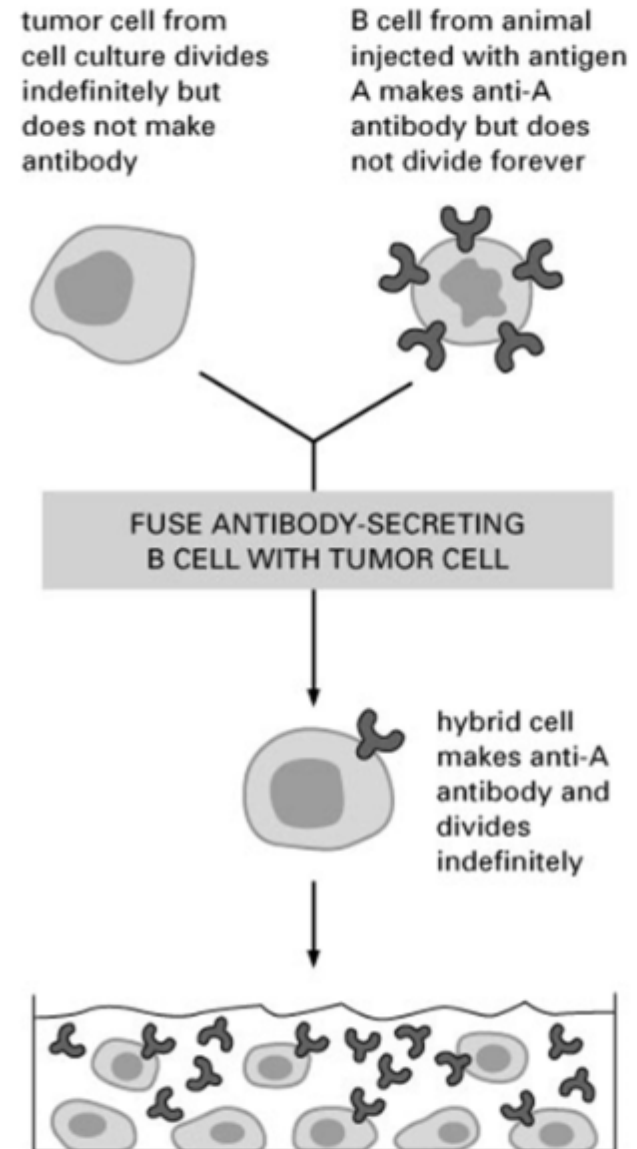
metoda: dot-blot

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



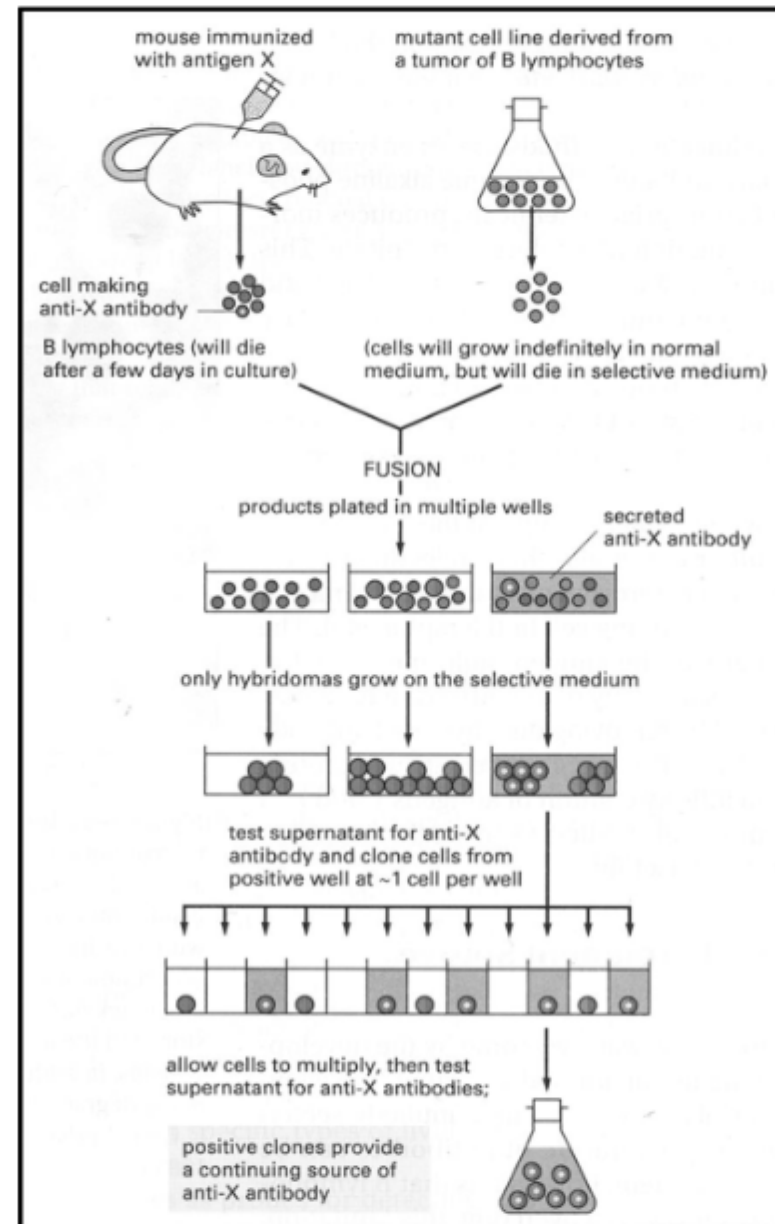
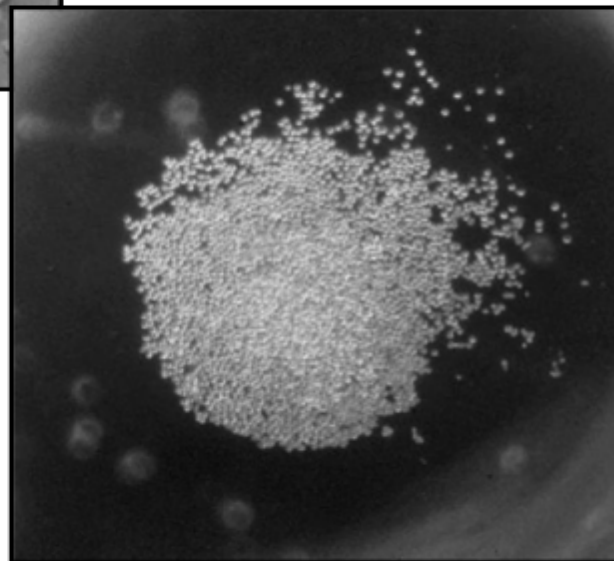
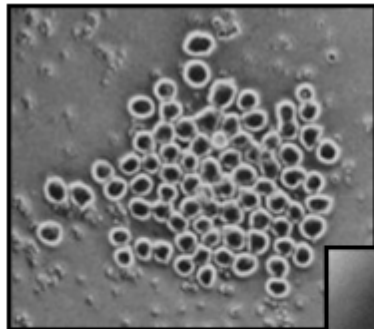
Monoklonální protilátky pro ICC

- 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

<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

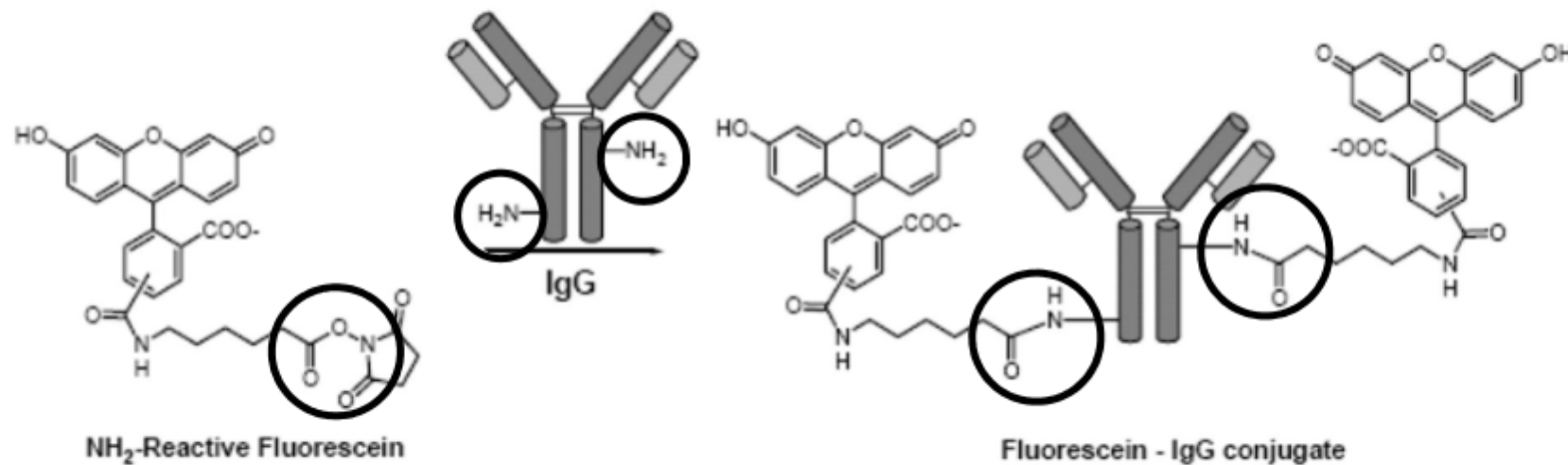
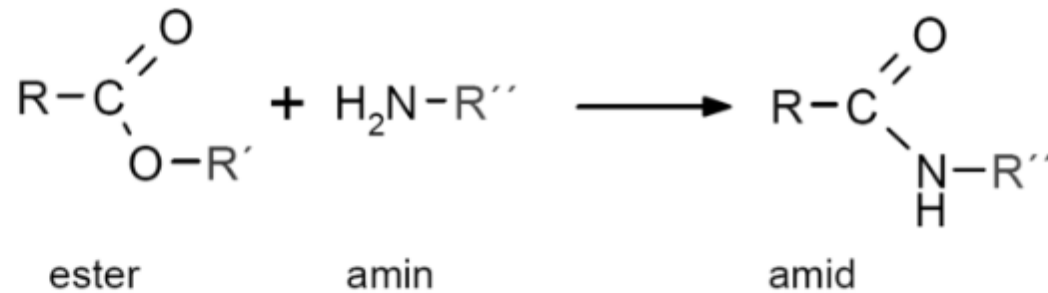
G. KÖHLER
C. MILSTEIN

*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.

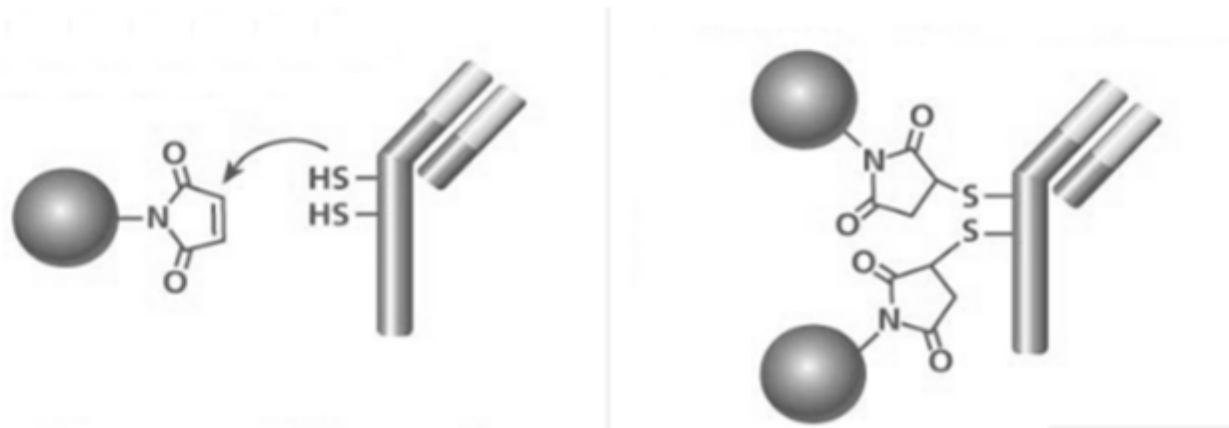
Konjugace protilátky s fluorochromem

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



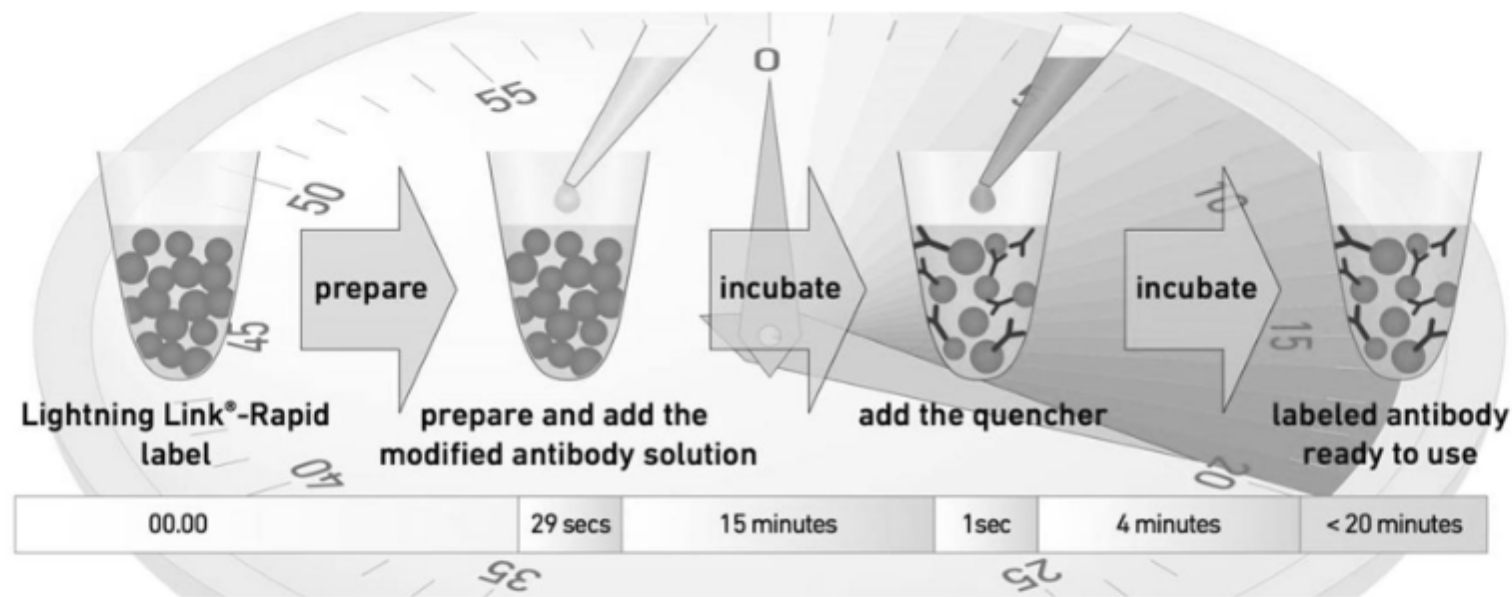
fluorochrom

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°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

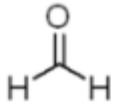

- rychlá fixace, díky dehydrataci
- proteiny jsou koagulovány nebo extrahovány
- zachovává rozpoznání antigenu

nevýhody

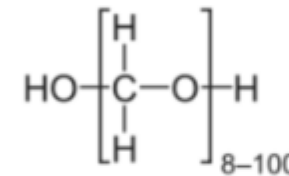
- výrazné smrštění vzorku (až o 50%)
- zkreslení morfologie a velikosti

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

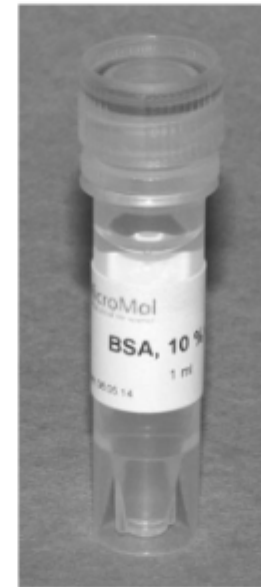
nutnost vyvázání:

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

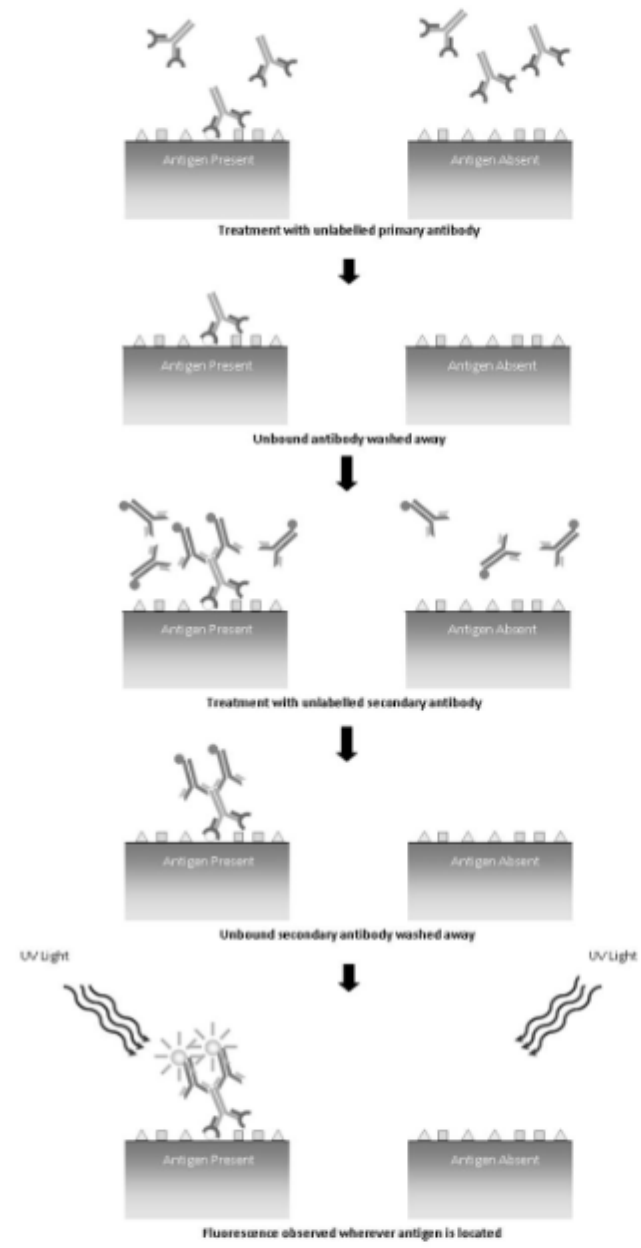
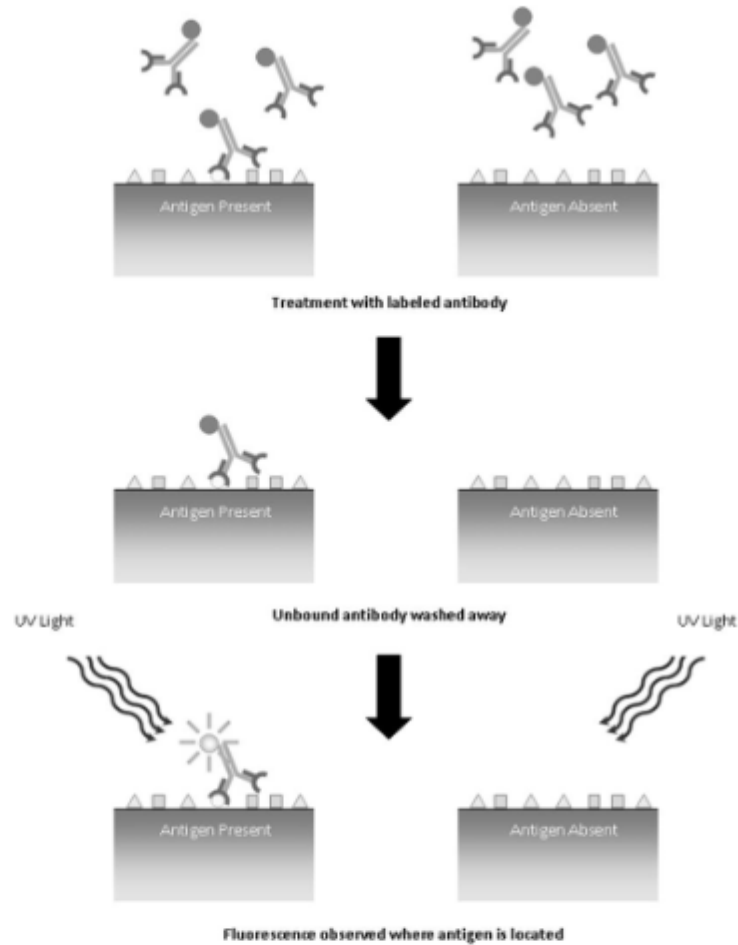
- zvyšuje specifitu protilátky
- snižuje signál z pozadí

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>

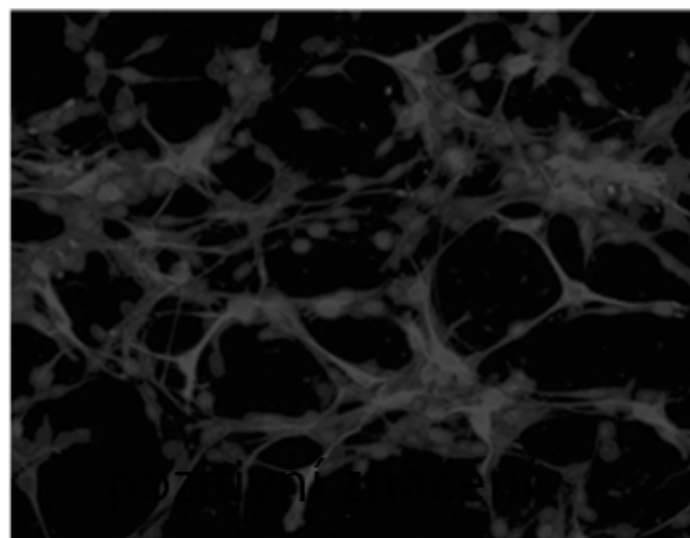
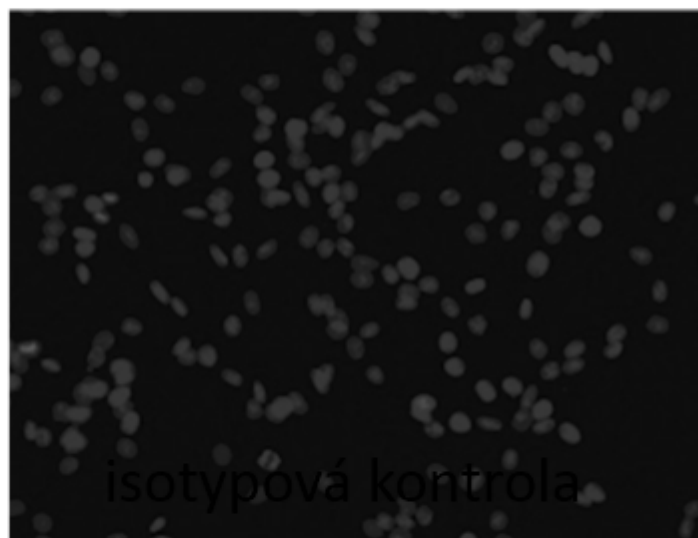
Celkový postup
nepřímá imunofluorescence

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



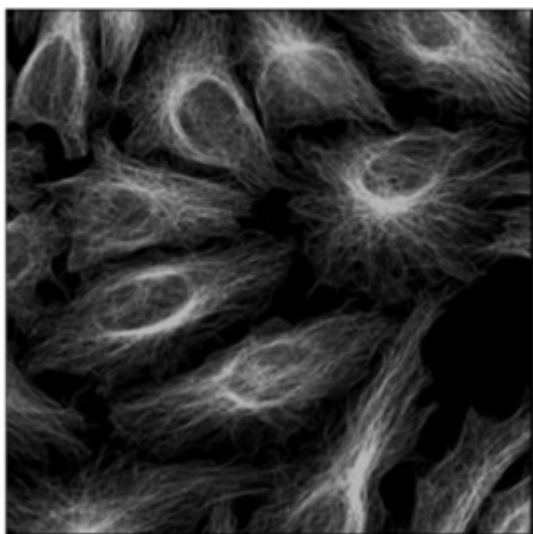
Negativní kontrola

- 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

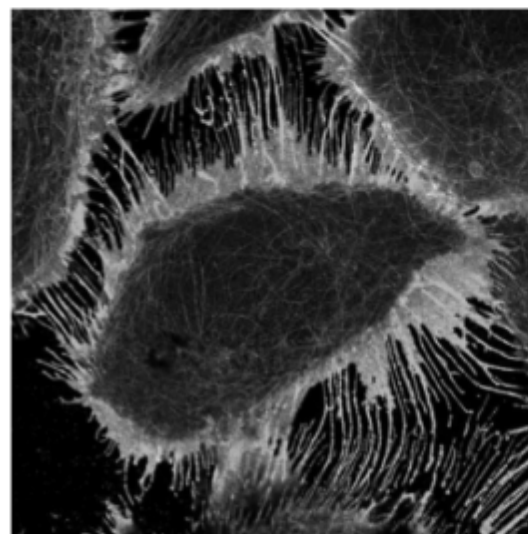


Pozitivní kontrola

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



HeLa: α -tubulin



A431: EGFR



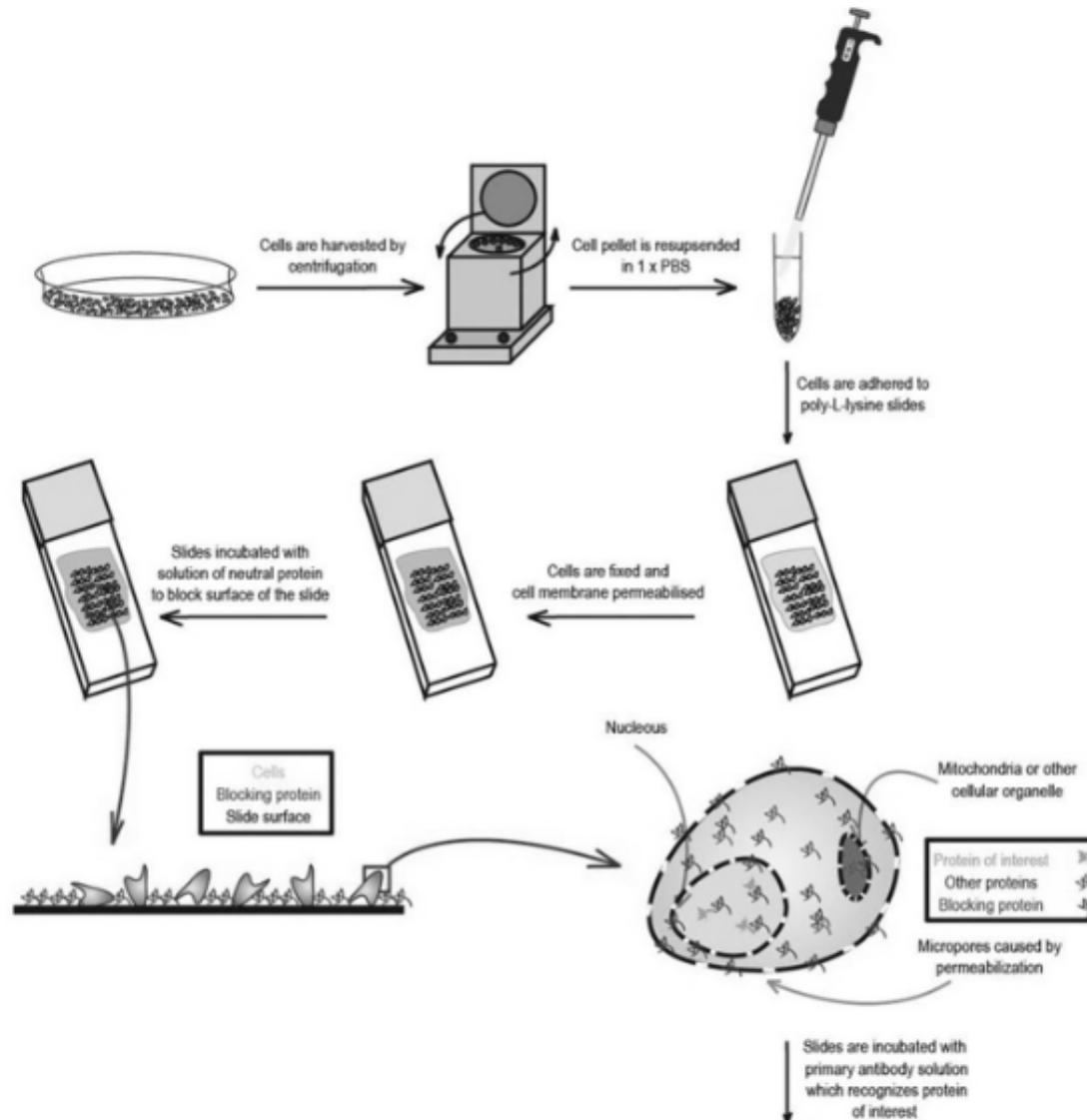
Montování = uzavírání

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

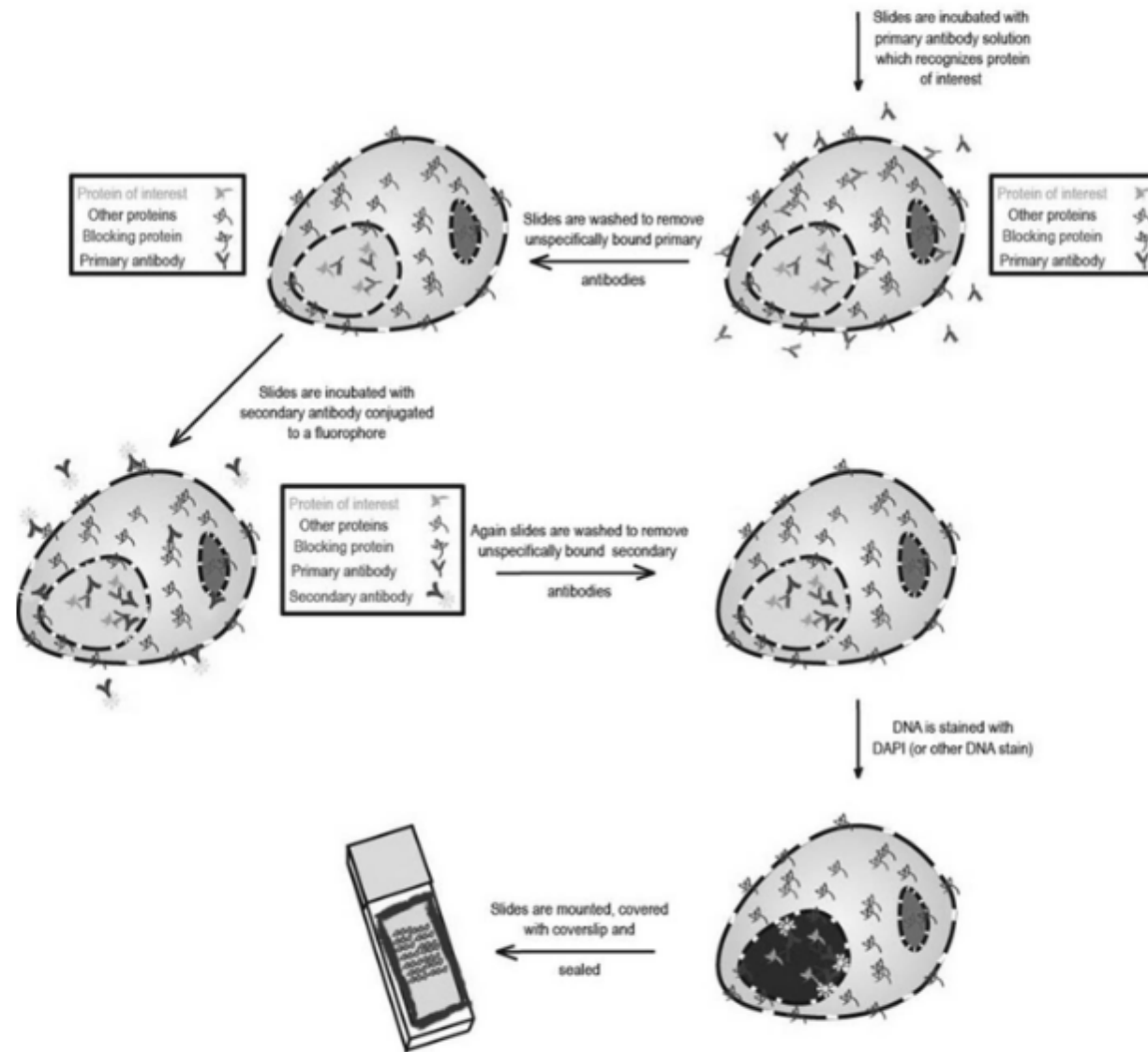
tuhnoucí vs. netuhnoucí montovací média

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

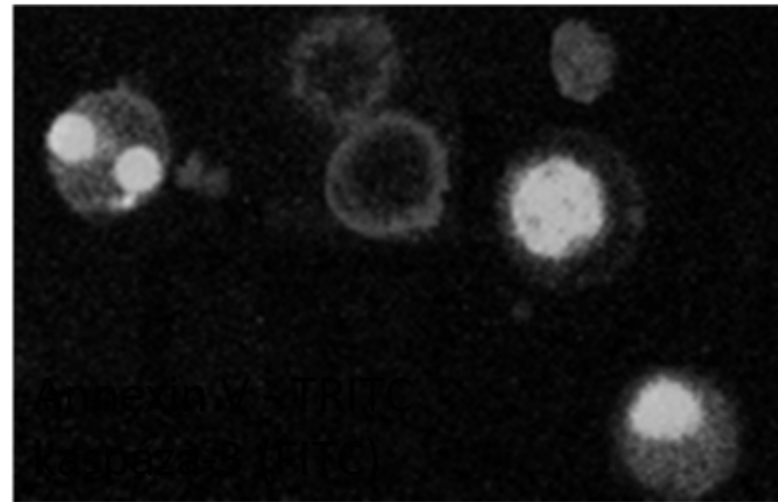
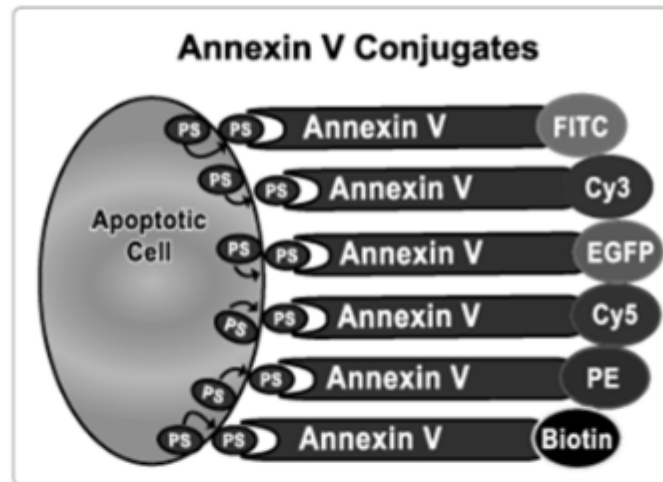
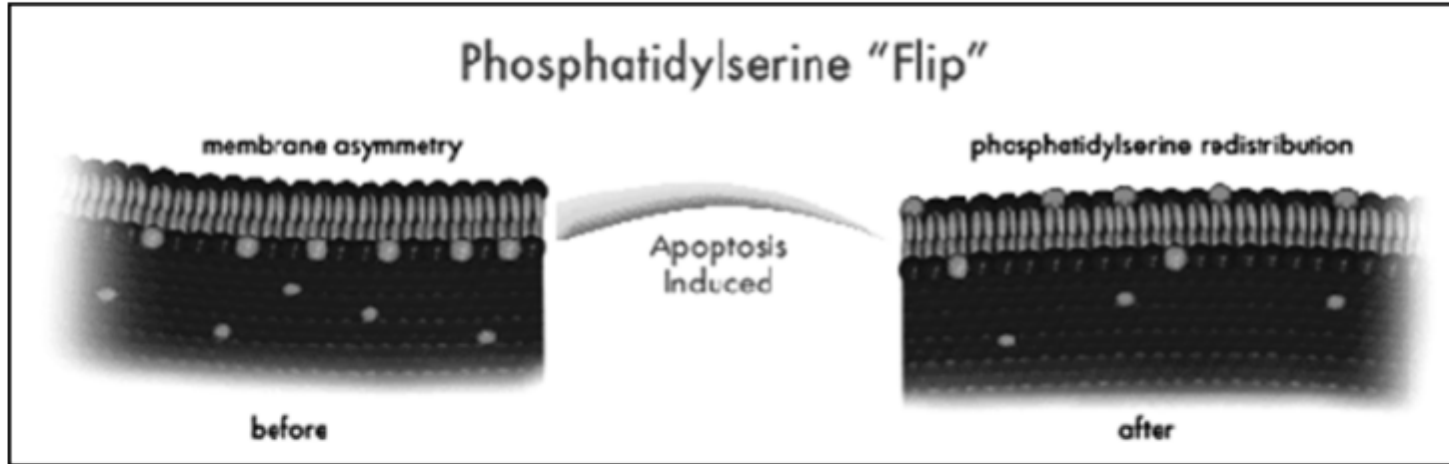
Celkový postup nepřímého imunofluorescenčního značení – 1. část



Celkový postup nepřímého imunofluorescenčního značení – 2. část



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/>