

## 4η ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΑΣΚΗΣΗ ΑΝΟΣΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Επ. Καθ. Αικατερίνη Χλίχλια

### ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΣ (IMMUNOFLUORESCENCE)

Ο ανοσοφθορισμός επιτυγχάνει την ανίχνευση αντιγόνων ή αντισωμάτων στους ιστούς, στα κύτταρα ή σε ολόκληρους οργανισμούς. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στη σήμανση του στόχου με αντισώματα σημασμένα με φθορίζουσες ουσίες. Η πρόσδεση των σημασμένων αντισωμάτων στο στόχο γίνεται ορατή με τη βοήθεια του μικροσκοπίου φθορισμού.

Τα μόρια, τα οποία παράγουν φθορισμό διεγείρονται με φως ενός συγκεκριμένου μήκους κύματος και εκπέμπουν φως χαμηλότερης ενέργειας, δηλ. φως μακρύτερου μήκους κύματος. Κάθε φθορίζον χρωμογόνο χαρακτηρίζεται από συγκεκριμένο μήκος κύματος διέγερσης και από συγκεκριμένο μήκος κύματος εκπομπής. Μερικά παραδείγματα από φθορίζοντα χρωμογόνα είναι η φλουορεσκεΐνη, και το συχνά χρησιμοποιούμενο παράγωγο της, το ισοθειοκυανικό οξύ της φλουορεσκεΐνης, άλλα είναι η ροδαμίνη, η ακριδίνη και η φύκοερυθρίνη. Αν και αυτή η τεχνική είναι πιο δύσχρηστη όταν απαιτείται ποσοτική μέτρηση της συγκέντρωσης του αντισώματος, εν τούτοις παρουσιάζει μερικά πραγματικά πλεονεκτήματα. Χρησιμοποιώντας τομές ιστών (οι οποίοι περιέχουν μεγάλο αριθμό αντιγόνων), είμαστε σε θέση να ανιχνεύσουμε σε ένα και μοναδικό πλακίδιο αντισώματα εναντίον αρκετών διαφορετικών αντιγόνων, ως προς την κατανομή τους σε διαφορετικά κύτταρα ή σε διαφορετικά ενδοκυττάρια διαμερίσματα.

### Άμεσος και έμμεσος ανοσοφθορισμός

Ο ανοσοφθορισμός βασίζεται στην ειδική πρόσδεση του σημασμένου αντισώματος με φθορίζον χρωμογόνο στο δικό του αντιγόνο. Κατά αυτόν τον τρόπο παράγονται συμπλέγματα αντιγόνου-αντισώματος, τα οποία μπορούν να ανιχνευθούν στο μικροσκόπιο ανοσοφθορισμού. Αυτή η μεθοδολογία διακρίνεται σε δύο τύπους, στον άμεσο και στον έμμεσο ανοσοφθορισμό.

### Άμεσος ανοσοφθορισμός

Το αντιγόνο (βιοψία, αιώρημα κυττάρων, αιώρημα βακτηρίων κλπ.) μονιμοποιείται πάνω σε μια αντικειμενοφόρο. Το δείγμα επιστοιβάζεται με αντιγόνο-ειδικό αντίσωμα σημασμένο με φθορίζον χρωμογόνο. Το σημασμένο αντίσωμα προσδένεται στο αντιγόνο, η περίσσεια του αντισώματος που δεν προσδέθηκε απομακρύνεται με την πλύση. Το δείγμα μπορεί να αναλυθεί στο μικροσκόπιο φθορισμού μετά από πρόσθεση μέσου έγκλισης. Υπεριώδες φως στο μικροσκόπιο φθορισμού κατευθύνεται επάνω στην τομή μέσω του αντικειμενικού φακού. Το πεδίο είναι σκοτεινό και οι περιοχές με φθορίζον αντίσωμα εκπέμπουν φθορισμό (πράσινο φθορισμό όταν η φθορίζουσα ουσία είναι η φλουορεσκεΐνη). Το πρότυπο του φθορισμού είναι χαρακτηριστικό για κάθε ιστικό αντιγόνο.

### Έμμεσος ανοσοφθορισμός

Το αντίσωμα τοποθετείται στην τομή ως διάλυμα, και καθίσταται ορατό με τη χρήση αντι-ανοσοσφαιρίνης συνδεδεμένης με φλουορεσκεΐνη. Στην περίπτωση αυτή χρησιμοποιούνται κυρίως αντισώματα που βρίσκονται στον αντι-ορό.

## ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΣΚΗΣΗ ΤΟΥ ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΥ

### Πλύσιμο των αμοιβάδων μονιμοποιημένων σε φορμαλίνη

Από το αιώρημα των αμοιβάδων (*Entamoeba histolytica*, ΗΚ 9) που είναι μονιμοποιημένες σε φορμαλίνη (0.1% φορμαλίνη σε PBS), περίπου 0.5 ml μεταφέρονται σε σωλήνα φυγοκέντρου (15 ml). Η πλύση γίνεται 3 φορές με 10 ml PBS και φυγοκέντρωση για 5 min, 1000 rpm. Το υπερκείμενο το απομακρύνουμε κάθε φορά με προσοχή. Διαλύουμε το ίζημα σε 8-10 ml διάλυμα 0.5% BSA/PBS.

### Προετοιμασία των αντικειμενοφόρων

Το επόμενο βήμα είναι η επίστρωση των αμοιβάδων σε αντικειμενοφόρους. Χρησιμοποιούμε αντικειμενοφόρους με οπές (8 οπές, Firma Medco, Ausfuehrung B). Για να αποφευχθεί πιθανό ξέπλυμα των αμοιβάδων από τους αντικειμενοφόρους, επιστρώνονται οι αντικειμενοφόροι με διαλυμένη κόλλα πριν την τοποθέτηση των παρασίτων. Για το σκοπό αυτό, διαλύουμε υγρή κόλλα χειροτεχνίας Pritt σε PBS (περίπου 1 g στα 100 ml) και ανακινούμε καλά μέχρι να γίνει ένα γαλατώδες διάλυμα. Απλώνουμε μία σταγόνα (3-5 μl) με το δάκτυλο στην αντικειμενοφόρο (έτσι ώστε να γίνει λεπτή επίστρωση σε όλη την επιφάνεια) και αφήνουμε την αντικειμενοφόρο να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου (περίπου 5 min). Η λεπτή επίστρωση με την κόλλα θα πρέπει να είναι ομοιόμορφη σε όλη την πλάκα της αντικειμενοφόρου. Προσοχή: Μεγάλη ποσότητα κόλλας μπορεί να προκαλέσει βρώμικο υπόβαθρο που θα οδηγήσει σε μη-ειδική πρόσδεση.

### Προσκόλληση των αμοιβάδων στις αντικειμενοφόρους

Ανακατεύουμε καλά το αιώρημα των αμοιβάδων με μία πιπέτα Pasteur. Τοποθετούμε μία σταγόνα στις 8 τρύπες της αντικειμενοφόρου. Περιμένουμε για 10-15 sec. Σ' αυτή τη διάρκεια καθιζάνουν οι αμοιβάδες στην αντικειμενοφόρο. Με την πιπέτα Pasteur απορροφάμε την περίσσεια του υγρού και το τοποθετούμε πίσω στο αιώρημα των πλυμένων αμοιβάδων. Με παρατήρηση στο οπτικό μικροσκόπιο προσέχουμε/εξετάζουμε να είναι ομοιόμορφα κατανεμημένες οι αμοιβάδες δημιουργώντας μια απλή στρώση (monolayer). Αφήνουμε τους αντικειμενοφόρους να στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου όλη τη νύχτα. Μπορούμε να διατηρήσουμε τις αντικειμενοφόρους που δεν θα χρησιμοποιηθούν την επόμενη μέρα για πείραμα σε κατάψυξη. Για το λόγο αυτό τις πακετάρουμε διπλώνοντας τες μία-μία σε χαρτομάντηλο και μετά σε αλουμινοχαρτό. Έτσι κάνουμε πακέτα που περιέχουν 3-5 αντικειμενοφόρους και τις καταψύχουμε στους  $-20^{\circ}\text{C}$  ή στους  $-80^{\circ}\text{C}$ . Στους  $-20^{\circ}\text{C}$  διατηρούνται για 6 μήνες περίπου, ενώ στους  $-80^{\circ}\text{C}$  για μερικά έτη.

### **Έμμεσος Ανοσοφθορισμός**

#### Σκοπός της εργαστηριακής άσκησης

Ο σκοπός του ανοσοφθορισμού στην προκειμένη περίπτωση είναι να εξετάσουμε την ύπαρξη αντισωμάτων διαφόρων τάξεων ειδικών έναντι της *Entamoeba histolytica* στον ορό από ασθενείς. Για έναν προσδιορισμό χρειαζόμαστε περίπου 10 μl ορό από ασθενή.

#### Η αρχή της μεθόδου

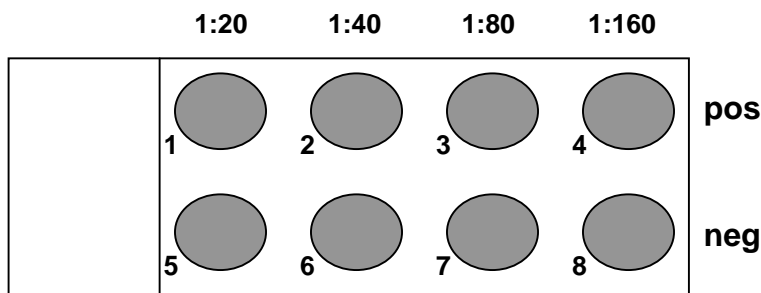
Αντιγόνο από την *E. histolytica* προσκολλάται στην αντικειμενοφόρο και επωάζεται με ορό από ασθενή. Εάν υπάρχουν *E. histolytica*-ειδικά αντισώματα στον ορό, τότε θα προσδεθούν στο αντιγόνο της *E. Histolytica*. Τα προσδεδεμένα αντισώματα θα σημανθούν με σημασμένο αντίσωμα φθορισμού που αναγνωρίζει ανθρώπινα αντισώματα (Fluorescein-conjugated anti-human antibody). Αυτά τα σημασμένα αντισώματα μπορούν να αναγνωρίζουν διαφορετικές τάξεις αντισωμάτων (IgG, IgA, IgM). Εάν υπάρχουν ειδικά αντισώματα στον ορό του ασθενή, τότε εμφανίζεται σύμπλεγμα αντιγόνου-αντισώματος με πράσινο-κίτρινο χρωματισμό στο μικροσκόπιο φθορισμού.

## Υλικά

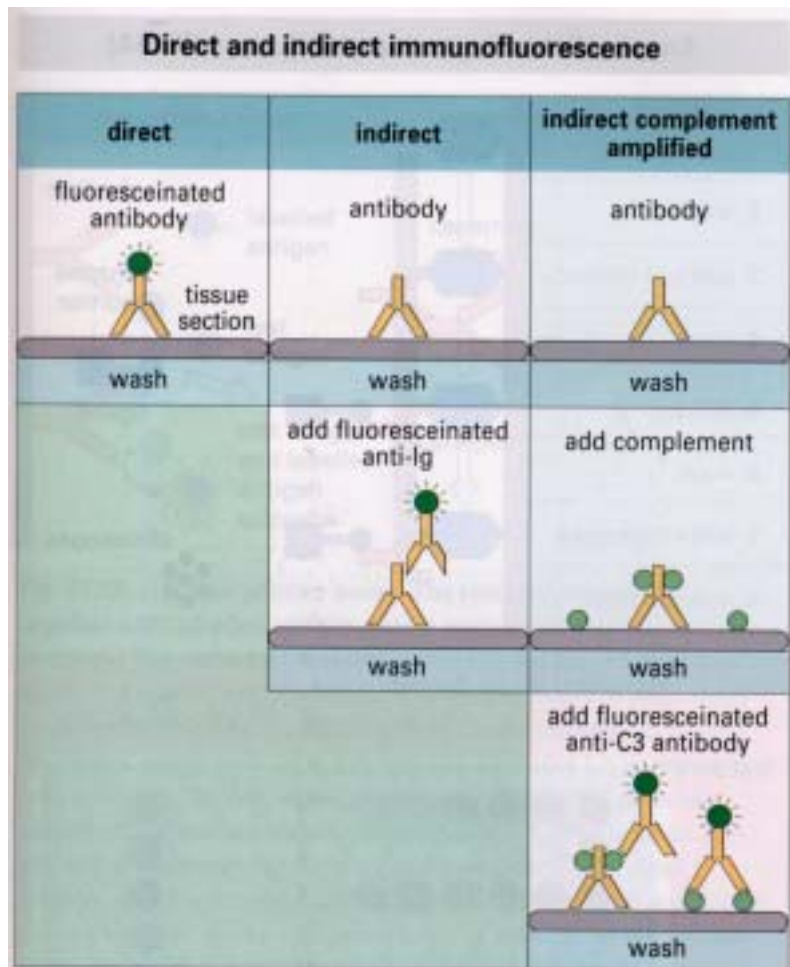
αιώρημα αμοιβάδων, αντικειμενοφόρες πλάκες με 8 οπές, τα προς εξέταση αντισώματα/ορός, σημασμένο αντίσωμα με φλουορεσκείνη  
 ρυθμιστικό διάλυμα 1x PBS, δοχεία ειδικά για αντικειμενοφόρους  
 διάλυμα Evans-blue (0.1% Evans-blue σε PBS, pH 7.2)  
 μέσο έγκλισης (25% γλυκερίνη σε PBS)

## Μέθοδος

1. Απόψυξη των αντικειμενοφόρων με το επιστοιβαγμένο υλικό (στην προκειμένη περίπτωση αμοιβάδες).
2. Καλό στέγνωμα σε θερμοκρασία δωματίου.
3. Μονιμοποίηση σε μεθανόλη, 10 min, 4°C.
4. Καλό στέγνωμα σε θερμοκρασία δωματίου.
5. Πρόσθεση του εξεταζόμενου ορού (αντιορός, πολυκλωνικό αντίσωμα).  
 Χρησιμοποιούμε προς εξέταση ορό από μολυσμένα άτομα (pos) και ως αρνητικό control ορό από μη μολυσμένα άτομα (neg).  
 Δημιουργούμε τις εξείς αραιώσεις των αντισωμάτων σε PBS: 1:20, 1:40, 1:80 και 1:160.  
 Τοποθετούμε 15-20 μl από την κάθε αραιώση στις αντίστοιχες οπές (βλ. σχήμα).
6. Επώαση των αντικειμενοφόρων για 45 min στους 37°C (ή 1 h, RT) σε υγρό περιβάλλον.
7. Πλύσιμο των αντικειμενοφόρων στα ειδικά δοχεία (10 min σε PBS, 2 φορές).
8. Στέγνωμα των αντικειμενοφόρων σε θερμοκρασία δωματίου.
9. Προσθήκη του σημασμένου με φλουορεσκείνη αντισώματος. Το σημασμένο αντίσωμα διαλύεται 1:100 σε διάλυμα Evans-blue (0.1 % σε PBS, pH 7.2).  
 Τοποθετούμε 15-20 μl σε κάθε οπή.
6. Επώαση των αντικειμενοφόρων για 45 min στους 37°C (ή 1 h, RT) σε υγρό περιβάλλον.
7. Πλύσιμο των αντικειμενοφόρων στα ειδικά δοχεία (10 min σε PBS, 2 φορές).
8. Στέγνωμα των αντικειμενοφόρων σε θερμοκρασία δωματίου.
9. Προσθήκη του μέσου έγκλισης (25% γλυκερίνη σε PBS) στις οπές (1 σταγόνα) και επικάλυψη με καλυπτρίδα.
10. Παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού.



## Άμεσος και έμμεσος ανοσοφθορισμός



**Fig. 27.8** Immunofluorescence detects antigen *in situ*. A section is cut on a cryostat from a deep-frozen tissue block. This ensures that labile antigens are not damaged by fixatives.

**Direct:** the test solution of fluoresceinated antibody is applied to the section in a drop, incubated and washed off. Any bound antibody is then revealed under the microscope; UV light is directed onto the section through the objective, thus the field is dark and areas with bound fluorescent antibody fluoresce green. The pattern of fluorescence is characteristic for each tissue antigen.

**Indirect:** antibody applied to the section as a solution is visualized using fluoresceinated anti-immunoglobulin.

**Indirect complement amplified:** this is an elaboration of the indirect method for the detection of complement-fixing antibody (see Fig. 27.7). In the second step fresh complement is added which becomes fixed around the site of antibody binding. Due to the amplification steps in the classical complement pathway (see Chapter 3) one antibody molecule can cause many C3b molecules to bind to the section; these are then visualized with fluoresceinated anti-C3.

## Μικροσκόπιο ανοσοφθορισμού

**FITC: fluoresceine isothiocyanate**

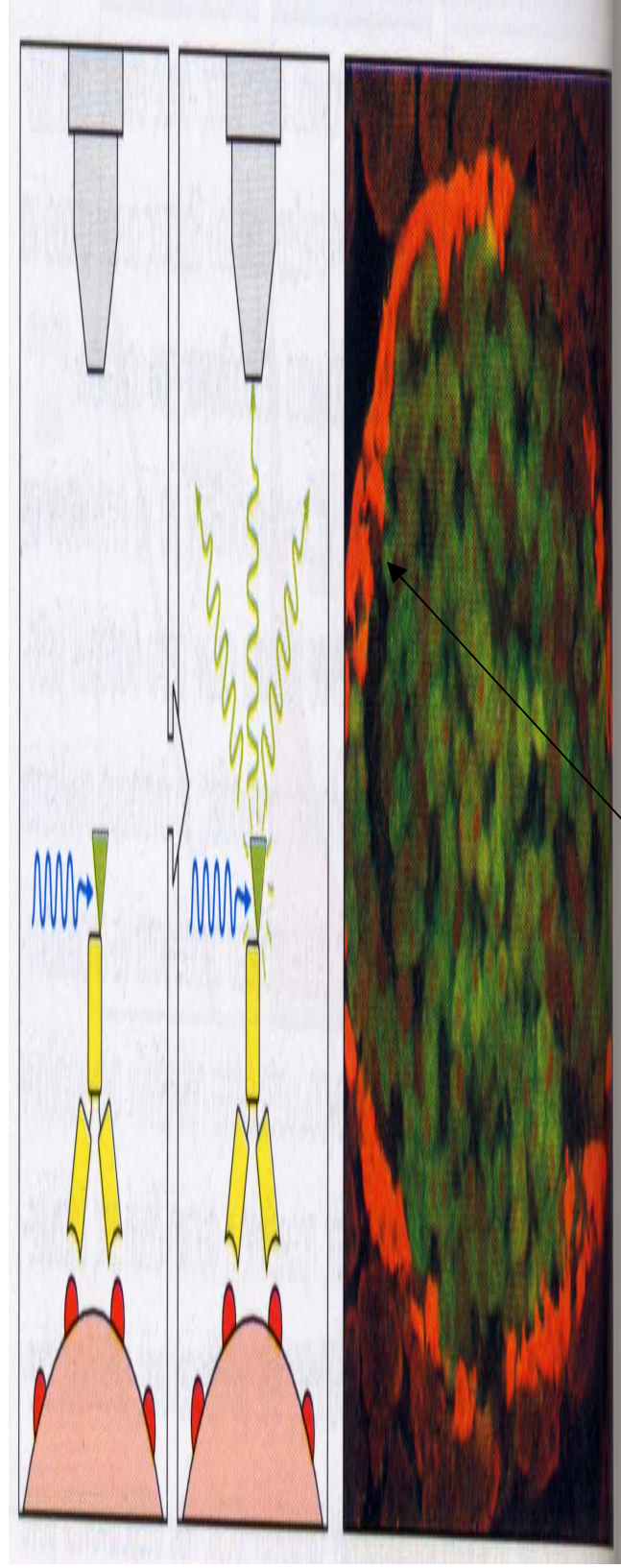
Παρουσία /προσδιορισμός συγκεκριμένων αντιγόνων σε κύτταρα

Αντίσωμα σεσημασμένο με φθορίζουσα χρωστική π.χ. φλουρεσκεΐνη (FITC) (πράσινο τρίγωνο)

Η φθορίζουσα χρωστική διεγείρεται μετά από έκθεση σε υπεριώδες φώς (σε μικροσκόπιο ανοσοφθορισμού)

Απελευθέρωση φωτός ενός χαρακτηριστικού μήκους κύματος, το οποίο είναι ορατό, αφού δούμε το δείγμα

μέσα από ένα εκλεκτικό φίλτρο



Αποκαρβοξυλάση του γλουταμικού οξέος (ΑΓΟ) → β κύτταρα παγκρεατικών νησίδων του Langerhans

Γλουκαγόνο → α κύτταρα (πορτοκαλί χρωστική)

## Τα μήκη κύματος διέγερσης και εκπομπής μερικών κοινών φθορίζοντων χρωμογόνων

Fig. A.16 Excitation and emission wavelengths for common fluorochromes.

Excitation and emission wavelengths of some commonly used fluorochromes	
Probe	Emission (nm)
R-phycoerythrin (PE)	480; 565
Fluorescein	495
PerCP	490
Texas Red	589
Rhodamine	550