



EVROPSKÁ UNIE
Evropské strukturální a investiční fondy
Operační program Výzkum, vývoj a vzdělávání



Realizováno v rámci dotačního programu „Operační program výzkum, vývoj a vzdělávání“, program Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy, Výzvy č. 02_18_056 ESF výzva pro vysoké školy II

název projektu: ESF pro VŠ II na UK

reg. č.: CZ.02.2.69/0.0/0.0/18_056/0013322

studijní podpora pro volitelný kurz: CVOL0276

Laboratorní metody imunologie – příprava, zavedení, hodnocení

metoda :

Fluorescenční mikroskopie

Ústav imunologie a klinické biochemie (ÚIKB), 3.LF UK

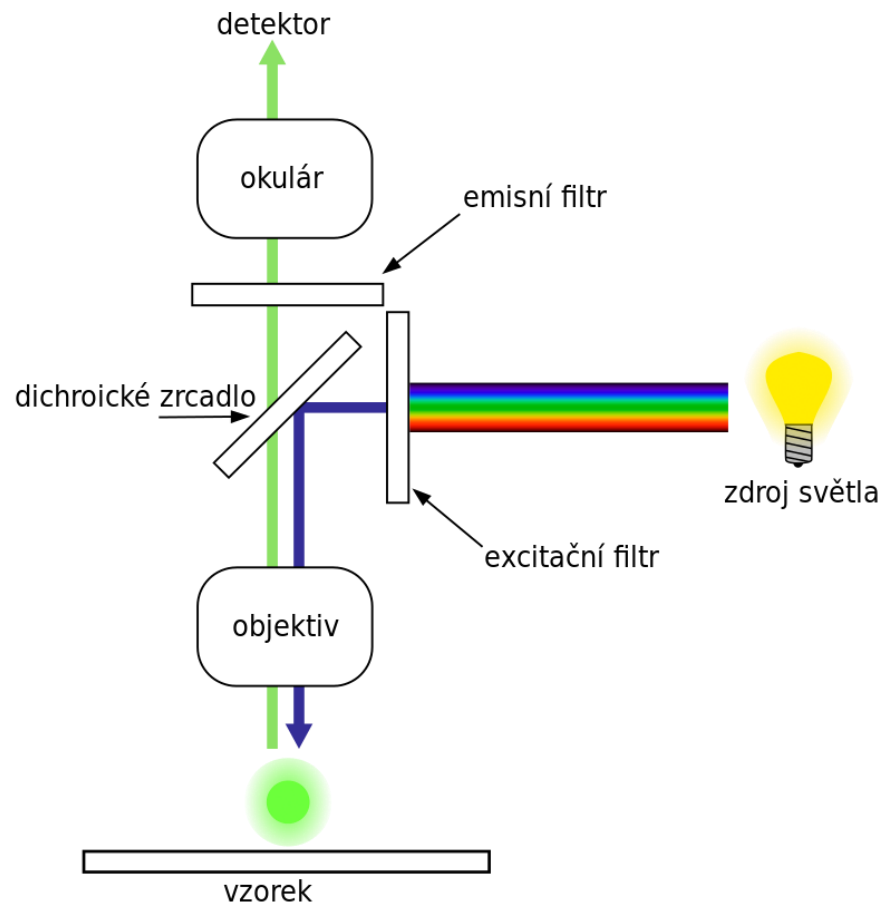
M. Hudec, P. Kučera, K. Riegerová, M. Riegerová, A. Říhová

A. Část teoretická

A.1 Fluorescenční mikroskopie - princip

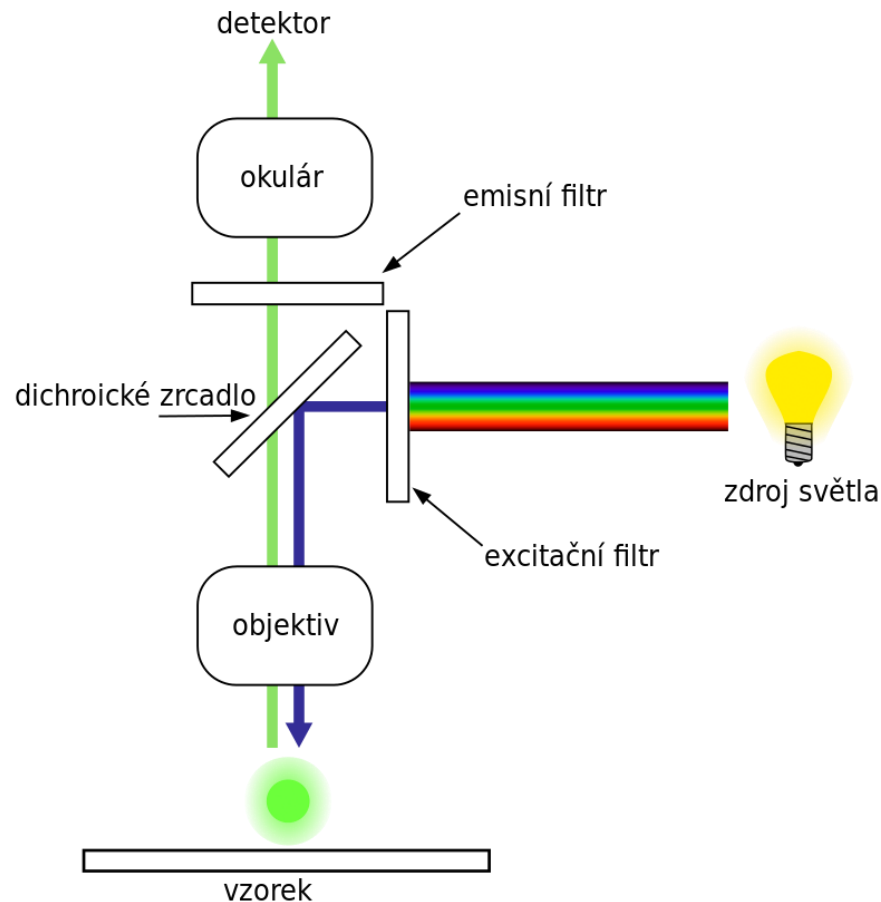
- světelný mikroskop uzpůsobený na snímání fluorescenčního signálu
- základním úkolem fluorescenčního mikroskopu je umožnit, aby dostatečně silné záření osvítilo vzorek a poté oddělit mnohem slabší emitované fluorescenční světlo od jasnějšího excitačního světla
- do lidského oka nebo na povrch jiného detektoru tedy dopadá pouze fluorescence, vzniklá vyzářením ze vzorku
- detekce je umožněná díky kontrastnímu zobrazení fluoreskujících ploch na tmavém pozadí- čím tmavší je pozadí, tím účinnější je přístroj

A.2 Konstrukce fluorescenčního mikroskopu



- **silný zdroj světla**, který při odfiltrování úzkého rozmezí vlnových délek, zůstane natolik silný, aby mohl excitovat vzorek
- systém filtrů: **excitační filtr**, **dichroické zrcadlo** a **emisní filtr** zajišťují výběr požadovaného rozmezí vlnových délek, které dopadnou na vzorek a vyvolané fluorescenční světlo (bez světla ze zdroje) dopadlo na detektor
- **objektiv** zachycuje vysoké procento fluorescence vzorku a je umístěn aby jím procházel nejenom fluorescenční signál ze vzorku, ale i excitační světlo ze zdroje (kondenzor)
- **Detektor**: pro zaznamenání obrazu z fluorescenčního mikroskopu se používají CCD nebo CMOS kamery

A.2 Konstrukce fluorescenčního mikroskopu



- světlo ze světelného zdroje (xenonová oblouková lampa, rtuťová výbojka, výkonné LED nebo i lasery) prochází excitačním filtrem (propouští jen excitační vlnové délky)
- na dichroickém zrcátku je odraženo do objektivu a dále do vzorku
- ve vzorku dojde k excitaci fluorochromu a emitované světlo je opět zachyceno objektivem a směřováno do detektoru
- projde dichroickým zrcátkem (odráží vlnové délky excitačního světla a kratší, zatímco ostatní propouští)
- poté emisním filtrem projde jenom ta část vlnových délek, které odpovídají emisi fluorochromu a je zachycena detektorem

A.3 Primární a sekundární fluorescence

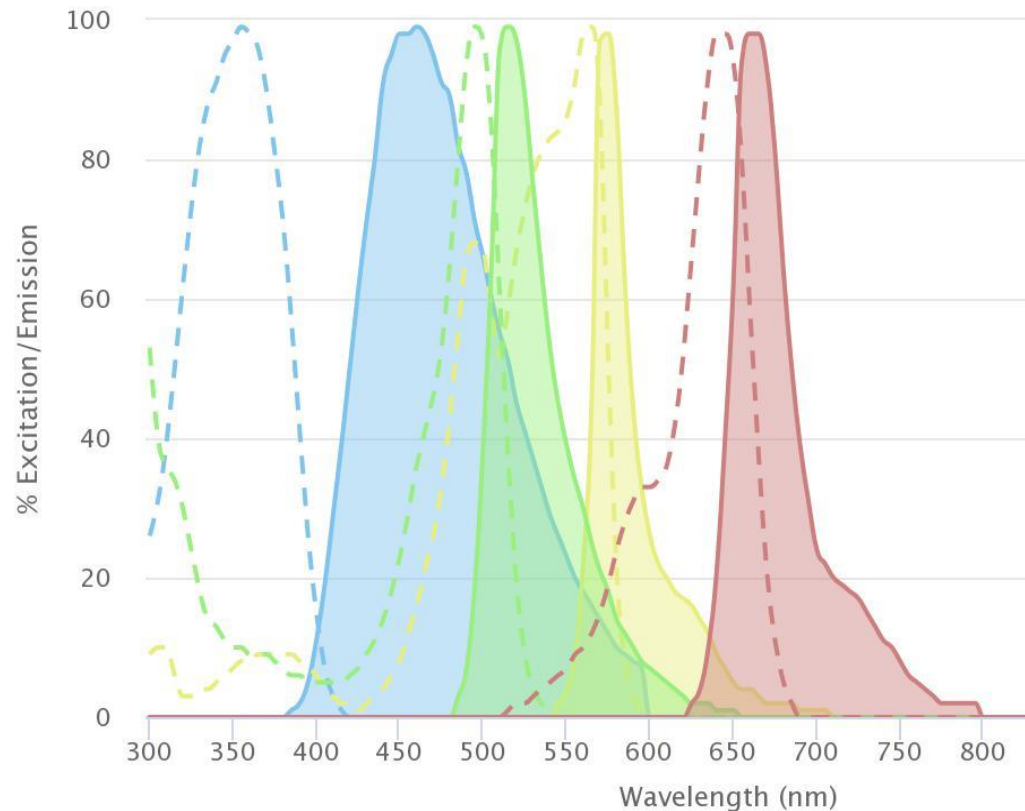
- **Primární fluorescence**

- autofluorescence
- vyskytuje se pouze v některých buňkách a nebývá příliš silná
- UV oblast: aminokyseliny tryptofan, fenylalanin a tyrosin
- viditelné světlo: redukované formy NADH, NADPH, vitamin A, chlorofyl, cytochromy, hemoglobin, myoglobin

- **Sekundární fluorescence**

- nanesení fluorescenční látky na vzorek, po ozáření nám umožní zobrazit zkoumanou strukturu
- nebo fluorochrom konjugovaný s protilátkou která váže antigen ve vzorku
- Označení struktur v buňce pomocí GFP
- Vizualizace NK : akridinová oranž, ethidium bromid, DAPI, FITC

A.4 Fluorochromy

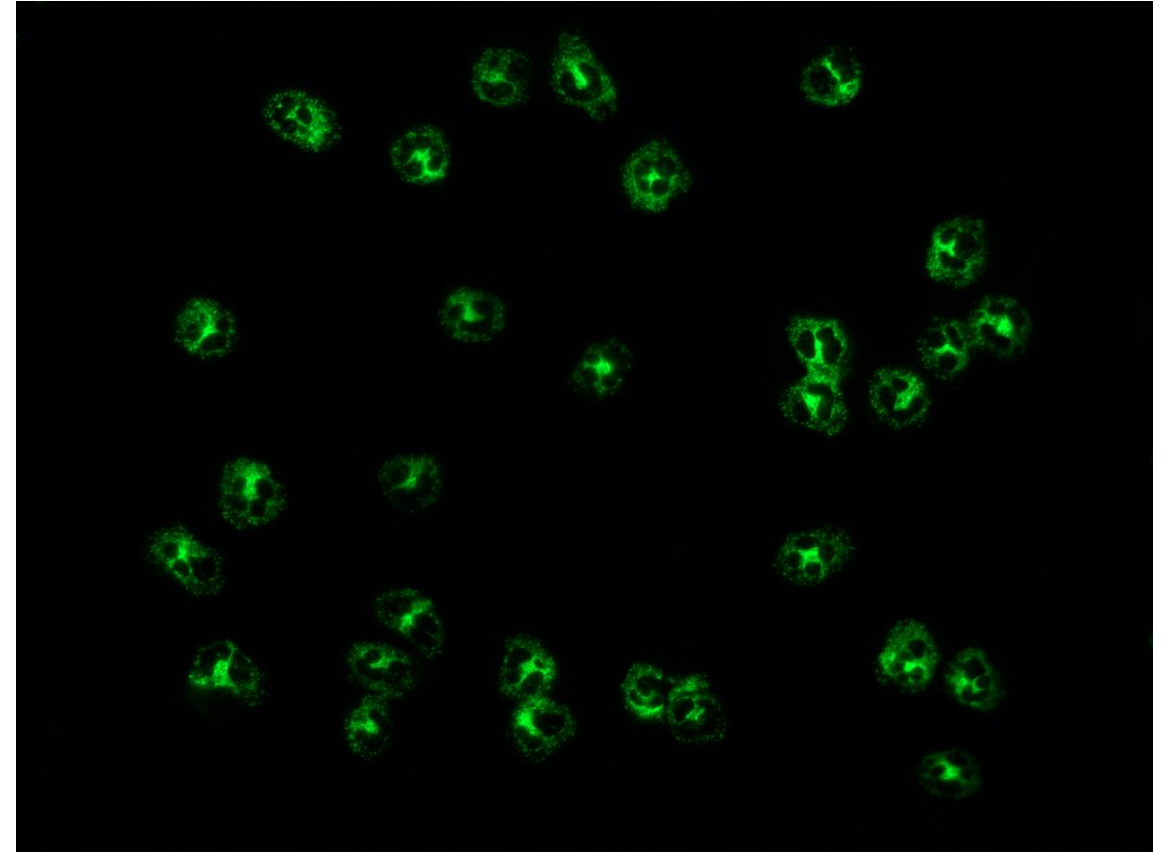


Obr: excitační a emisní spektra vybraných fluorochromů: zleva DAPI, FITC, PE, Cy5

- látky, které, pokud jsou ozářeny světlem o určité vlnové délce (z viditelné či UV oblasti), jsou poté schopny světlo vyzářit zpátky
- mají svá charakteristická excitační a emisní pásma
- ExP- rozsah vlnových délek, které vedou k excitaci daného fluorochromu
- EmP- rozsah vlnových délek, při kterých dochází k emisi
- rozdíl mezi vlnovými délkami EmP a ExP je Stokesův posun
- při výběru fluorochromů je třeba brát na zřetel možný překryv jejich spekter.

A.5 Využití fluorescenční mikroskopie v imunologii

- detekce antigenů v tkáňových řezech nebo jiném biologickém materiálu
- rychlý průkaz patogenů ve sputu nebo bronchoalveolární laváži
- detekce protilátek sdružených s chorobami (př. Detekce protilátek proti *Treponema pallidum* u onemocnění syfilis, **detekce autoprotilátek u autoimunitních chorob**)



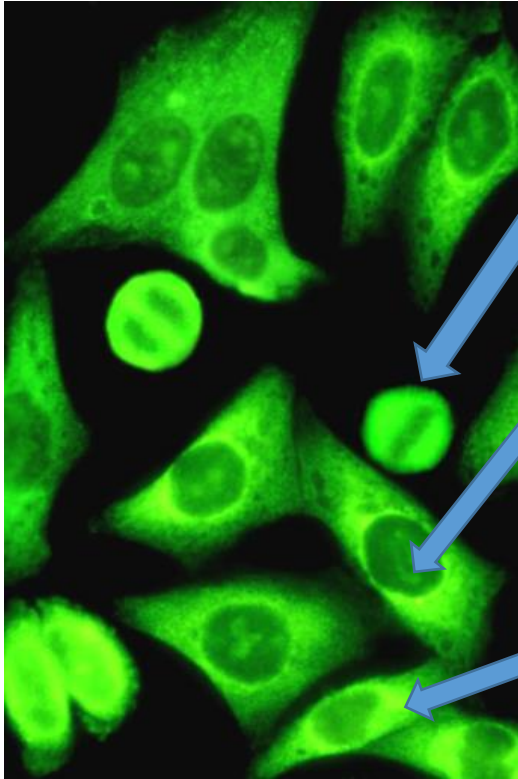
Obr: Immunofluorescence pattern of PR3 antibodies. Produced using serum from a patient with Wegener's granulomatosis on neutrophils with a FITC conjugate

A.6 Detekce autoprotilátek metodou nepřímé fluorescence (NIF)

A.6.1 NIF - princip

- Substrát – buněčná linie, tkáňový řez obsahující struktury s rolí Ag
- Znalost izotypu Ab, podtřídy
- Znalost vhodného ředění séra, pro vyhovující kombinaci senzitivity a specificity
- Vhodný fluorochrom vázaný na anti-human IgG protilátku - FITC
- Fluorescenční mikroskop, detekující vazbu autoprotilátky na organelu, buňky v řezu. Vybaven pro demonstrační, výukové použití

A.6.2 Buněčné struktury - antigeny pro průkaz přítomnosti autoprotilátky



- **Hep-2 buňky**

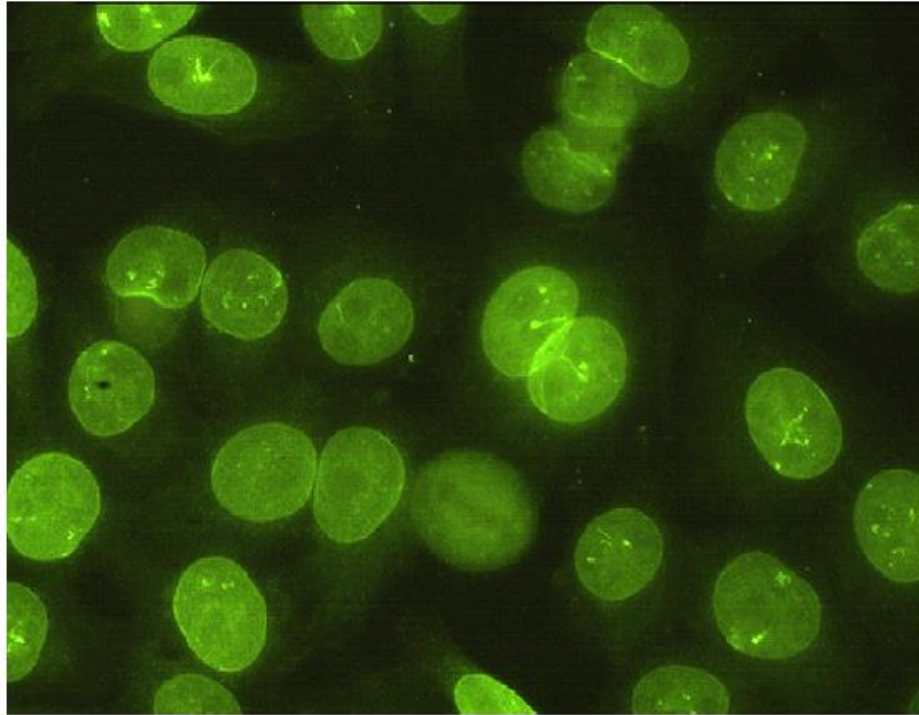
- antigeny asociované s dělením buňky (centriola, dělicí vřeténko)
- jaderné antigeny (polynukleotidy, histony, ribonukleoproteiny, antigeny jadérka, centromera)
- orgánově nespecifické cytoplazmatické antigeny (cytopl. organely, cytoskelet)

A.6.3 Antinukleární protilátky - ANA

- význam pro diagnostiku některých chronických autoimunitních onemocnění
- skupina protilátek namířených proti **orgánově nespecifickým antigenům** v jádře nebo cytoplasmě
- standardní metoda - **nepřímá imunofluoresce (NIF) s FITC-konjugátem**
- Případná confirmace pomocí metody **ELISA nebo blot**
- Substrát - linie lidských epiteliálních buněk derivovaných z karcinomu hrtanu - HEp-2 buňky,
- Substrát pro stanovení anti-dsDNA Crithidium Lucilliae

A.6.3.1 ANA - Jaderné fluorescenční vzory

Vzor homogenní jaderné membrány

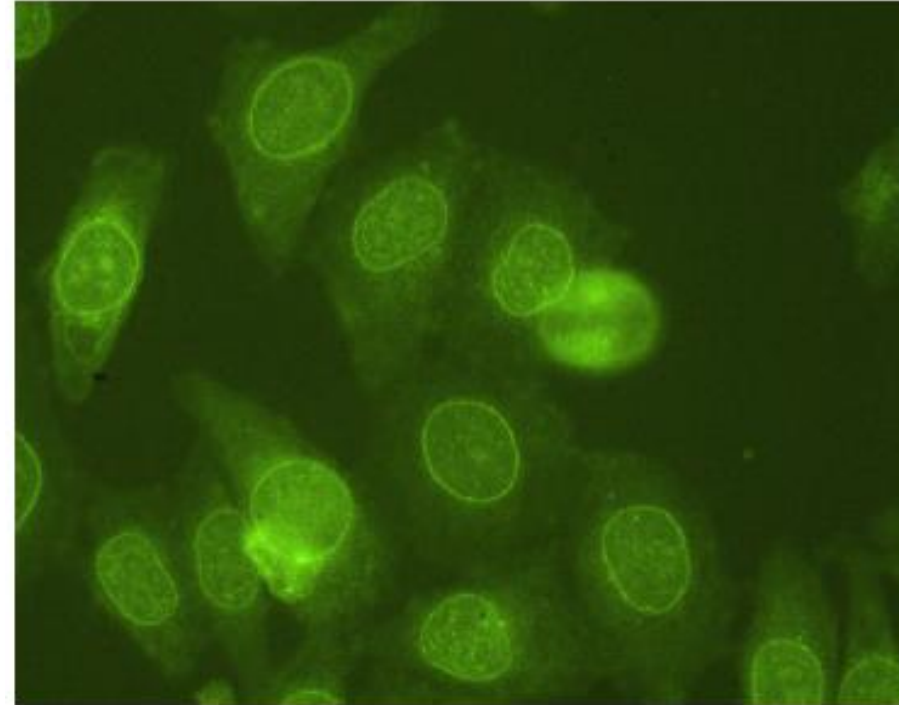


Hladký homogenní kroužek j.m.
V metafázi difúzní signál

Antigen: lamin A,B,C a proteiny asociované s laminem

Klinická asociace: SLE, PBC, AIH

Vzor pórů v jaderné membráně



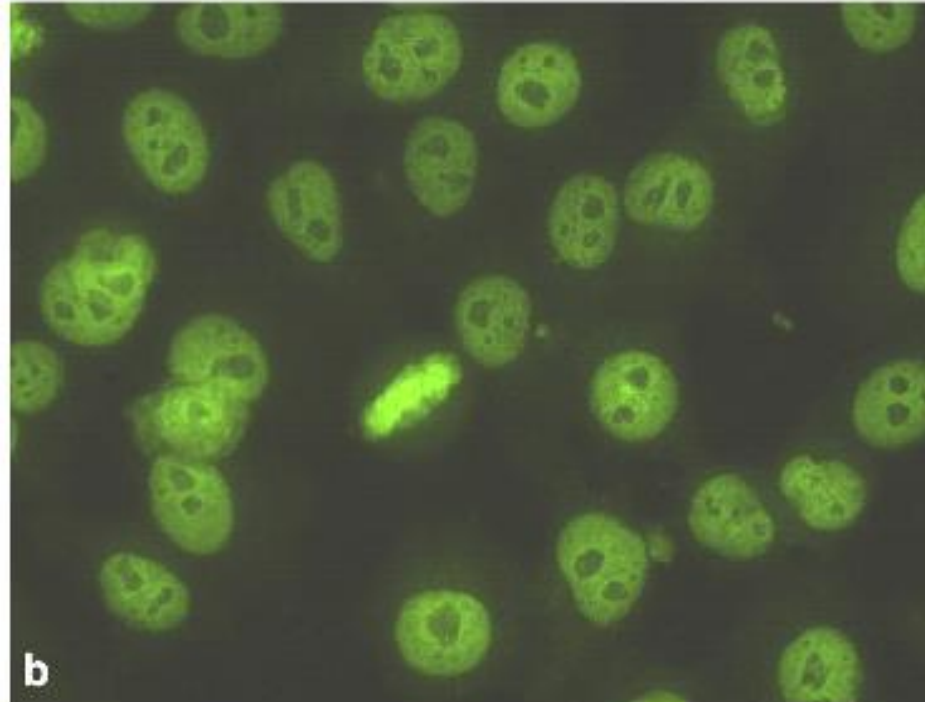
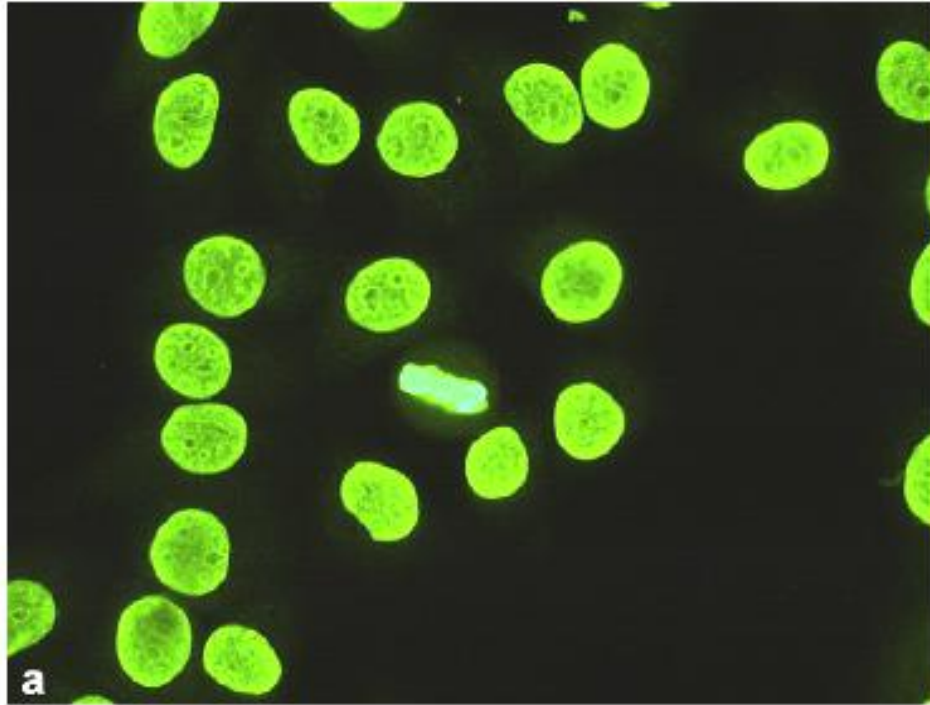
Přerušovaný bodový signál podél j.m.

Antigen: nucleoporiny p62, Nup153, gp210

Klinická asociace: PBC, PM

A.6.3.1 ANA - Jaderné fluorescenční vzory

Vzor homogenního jádra pozitivní negativní fluorescencí jadérek



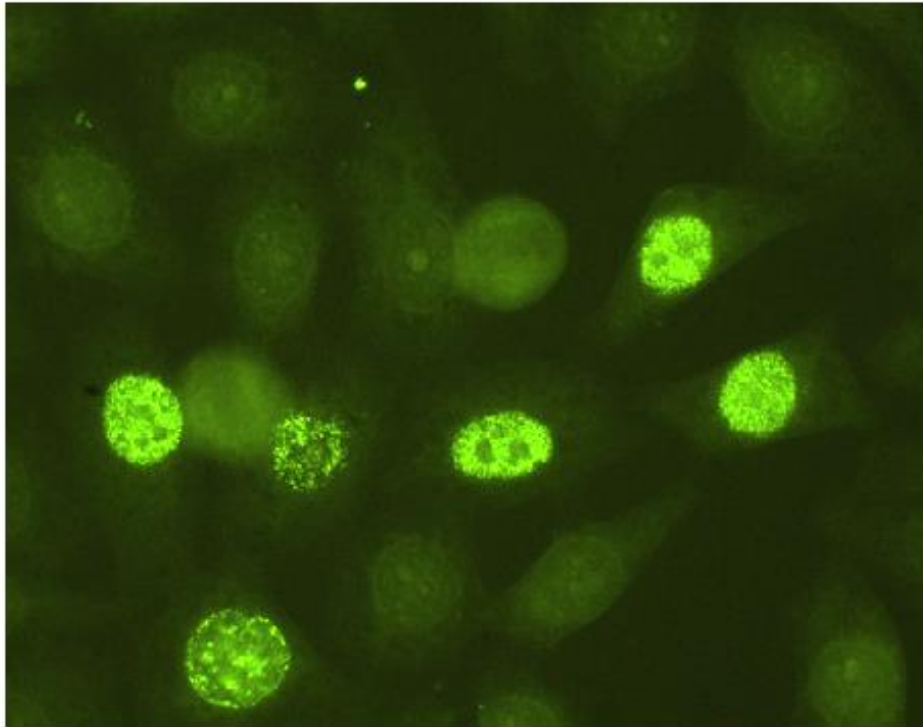
Difúzní signál fluorescence zahrnující celou nukleoplazmu
V metafázi homogenní/periferní signál

Antigen: dsDNA, nukleozomy, histony

Klinická asociace: SLE, léky indukovaný SLE, SSc, RA

A.6.3.1 ANA - Jaderné fluorescenční vzory

Pleomorfní vzor - PCNA

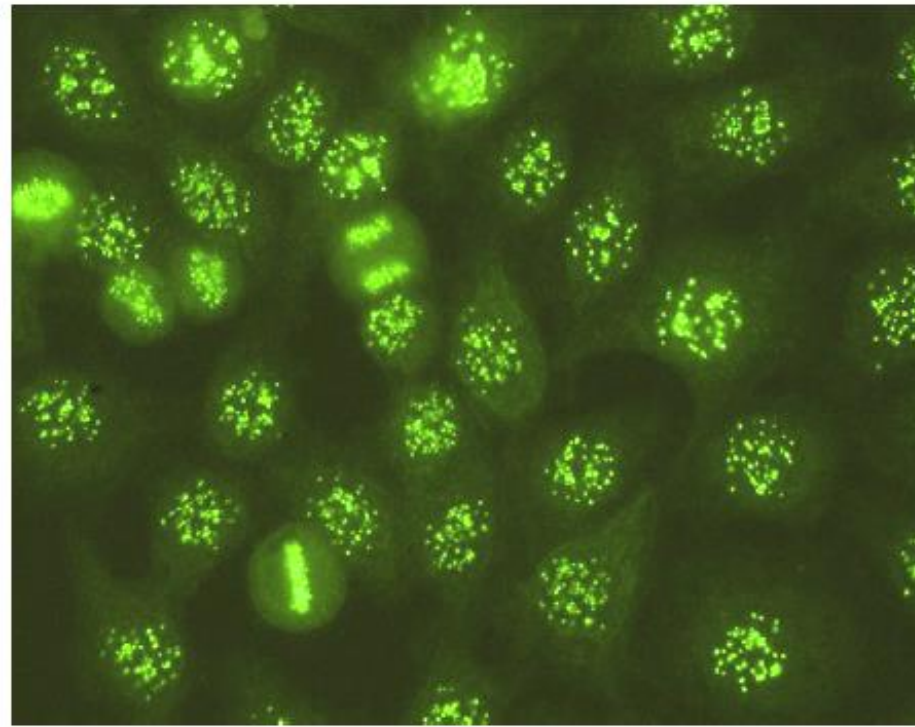


Signál proliferujících buněk (S-fáze),
klidové (G-fáze) a metaf. b. negativní

Antigen: PCNA

Klinická asociace: SLE

Vzor centromer



Uniformní nespojitá zrna (40-
60/jádro), v metafázi signál na
kond.chromatinu

Antigen:

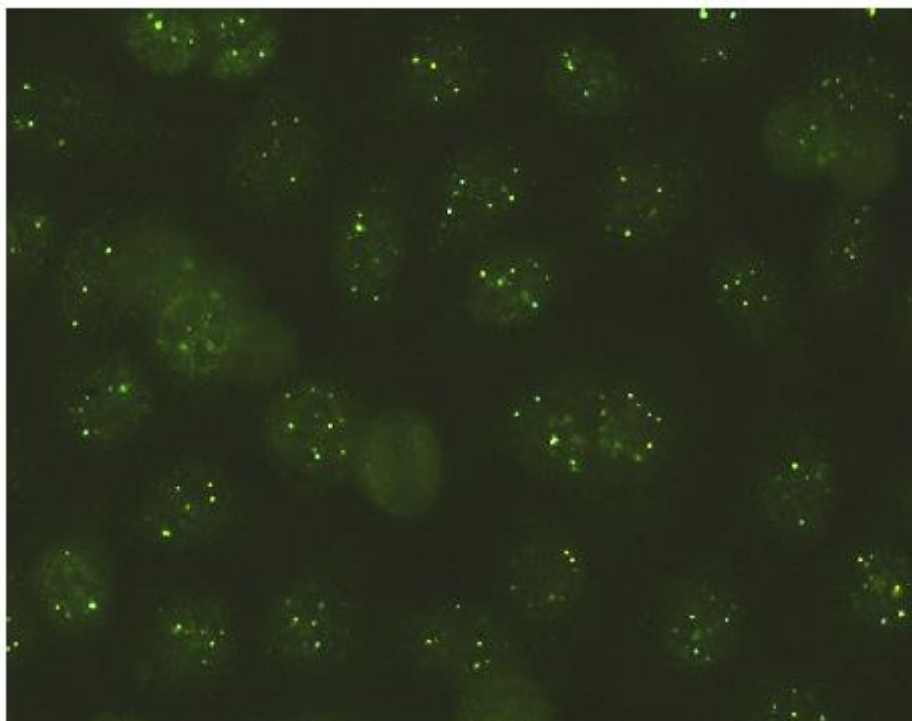
kinetochor/centromera (CENP-
A,B,C,D,E)

Asociace s onemocněním:

CREST syndrom, SSc, PBC

A.6.3.1 ANA - Jaderné fluorescenční vzory

Vzor četných jaderných teček (PML tělíčka)

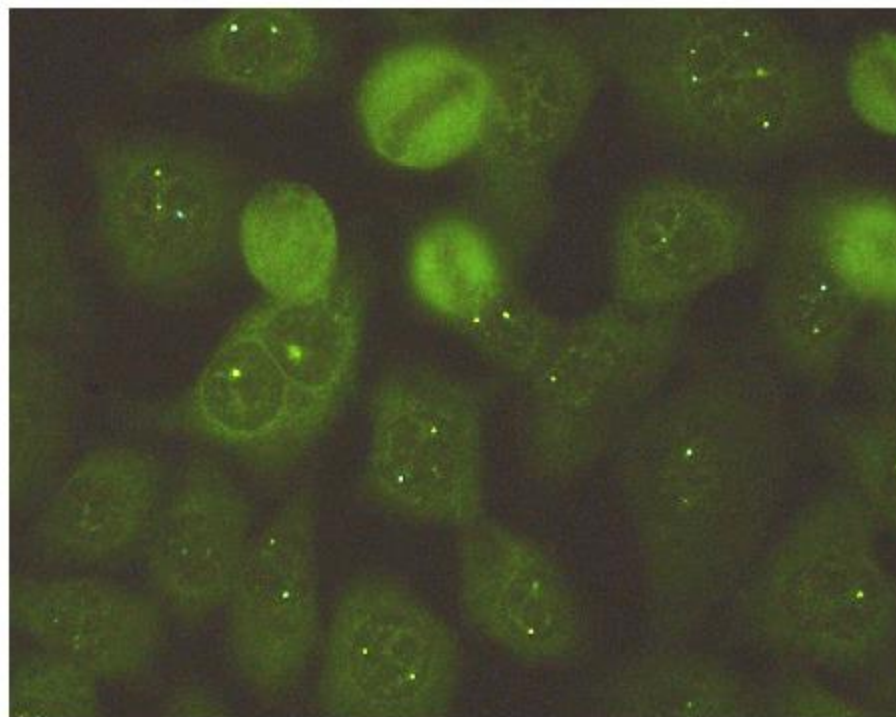


5-10 bodů na jádro, b. v metafázi
negat.

Antigen: nukleoproteiny Sp100,
PML protein

Klinická asociace: PBC, PM/DM

Kachalova tělíčka (vzor ojedinelých teček)



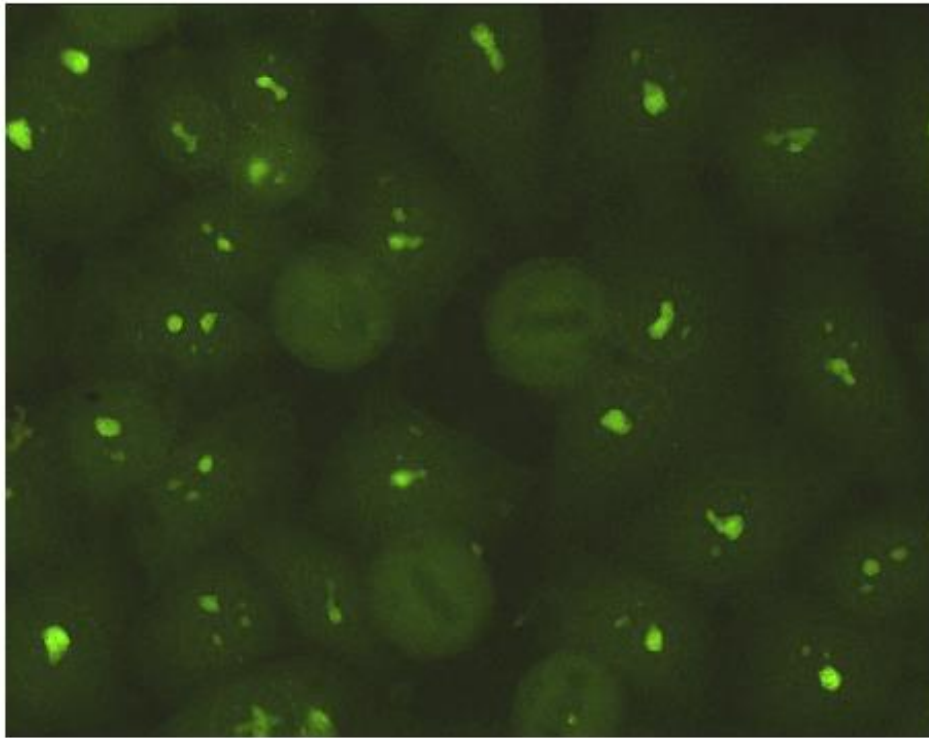
2-6 bodů/jádro, v blízkosti
jadérek, metaf. b. negat.

Antigen: jaderný protein
coillin

Klinická asociace: PBC, SjS,
SLE, SSc, PM

A.6.3.2 ANA - Nukleolární fluorescenční vzory

Vzor homogenního jadérka

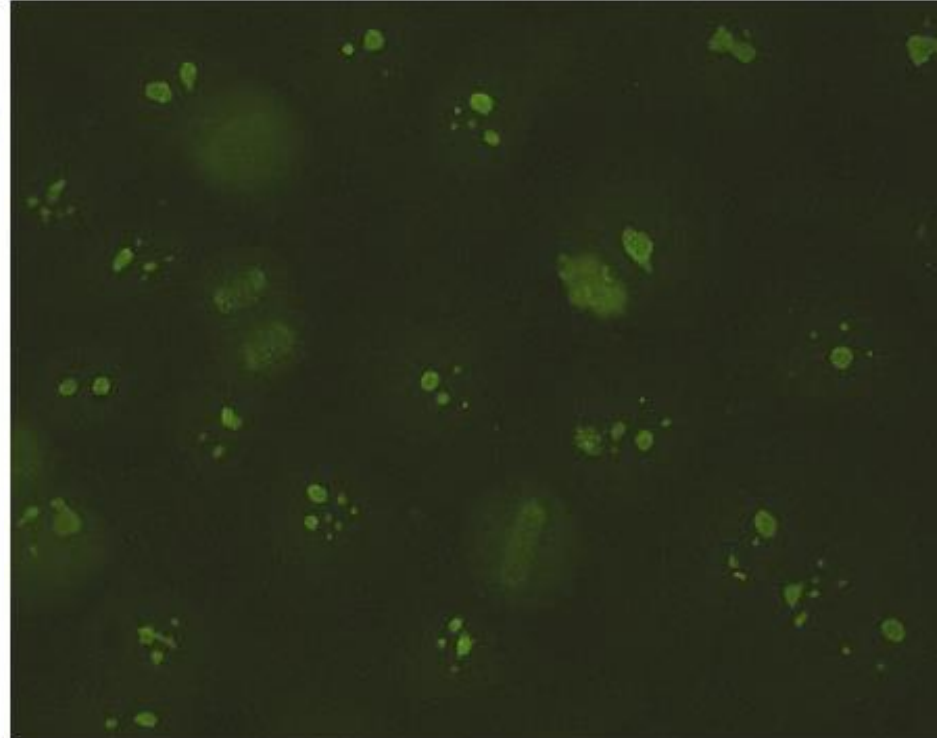


Negat, signál v metafázi b.

Antigen: PM/Scl komplex → exozom

Klinická asociace: PM, SSc

Vzor trsnatého jadérka



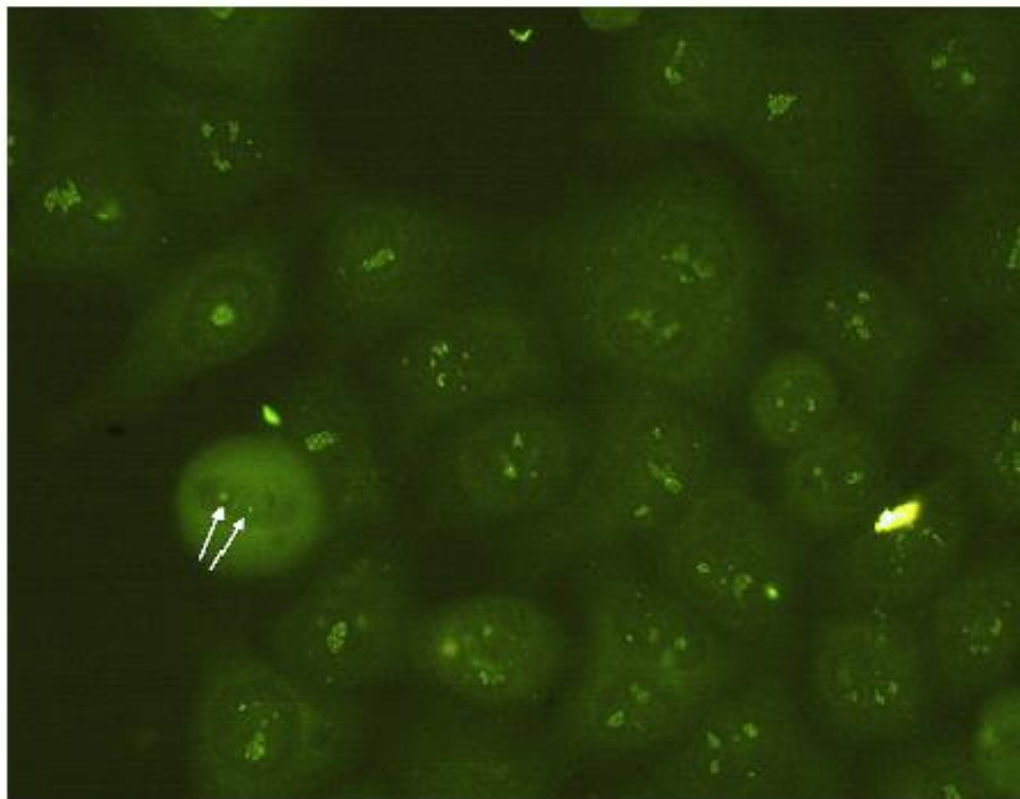
Shluky větších granul, v metafázi u ekvat. destičky vějířový okraj

Antigen: fibrillarin (U3-RNP)

Klinická asociace: SSc

A.6.3.2 ANA - Nukleolární fluorescenční vzory

Vzor tečkovaného jadérka



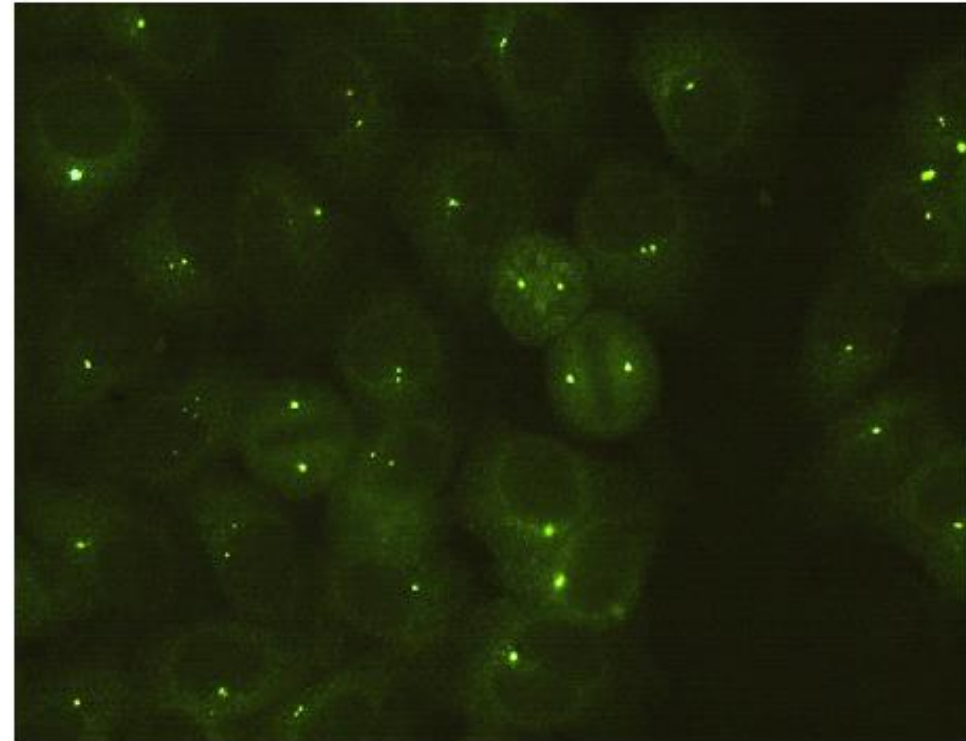
Signál fluorescence koresponduje s oblastní organizátorů jadérka – NOR

Antigen: RNA polymeráza I, NOR-90

Klinická asociace: SSc, Raynaudův syndrom

A.6.3.3 ANA - Fluorescence dělicího aparátu buňky

Centrioly, centrozom



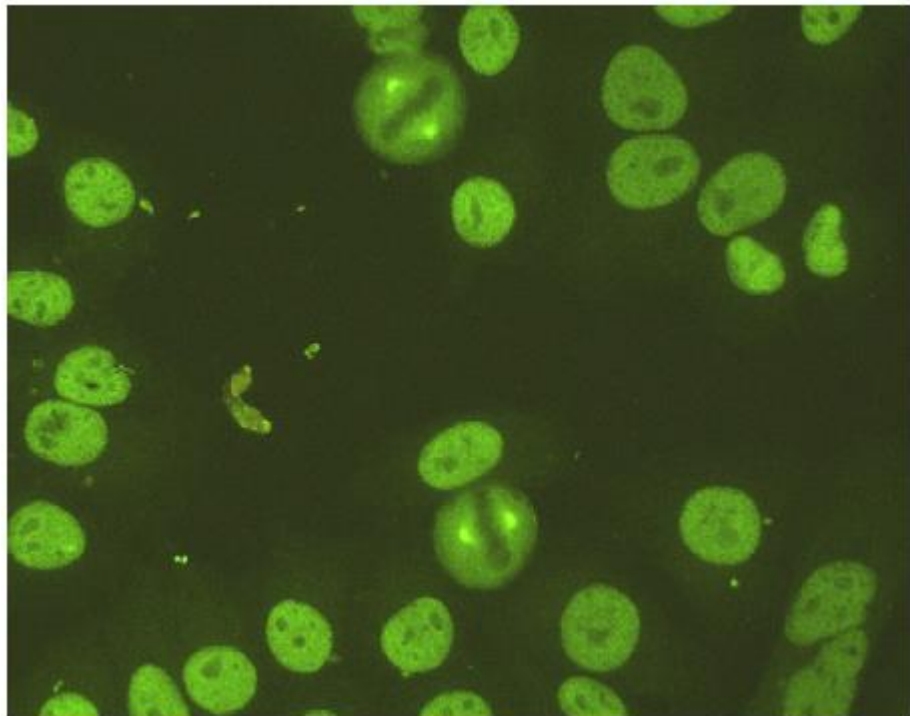
V metafázi 2 samostatné tečky na každém z pólů kolmo k sobě, v interfázi 1-2 tečky přilehlé k jádru

Antigen: centriolové/centrozomové proteiny (pericentrin, ninein, Cep250, Cep110)

Klinická asociace: SSc, Raynaudův syndrom, Sjögrenův syndrom, CREST syndrom

A.6.3.3 ANA - Fluorescence dělicího aparátu buňky

Póly dělicího vřeténka (MSA-1)

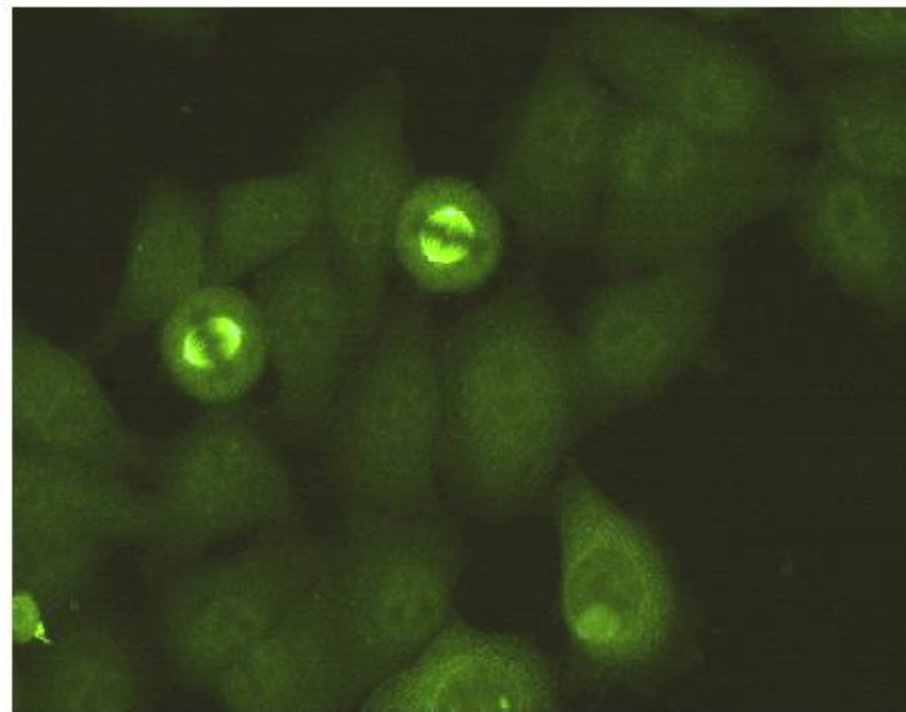


V metafázi Δ signál v oblasti pólů, v interfázi signál jemných jad. zrn a negat, jádérka

Antigen: NuMA

Klinická asociace: SLE, SS, SSc, MCTD, PBC

vlákna dělicího vřeténka



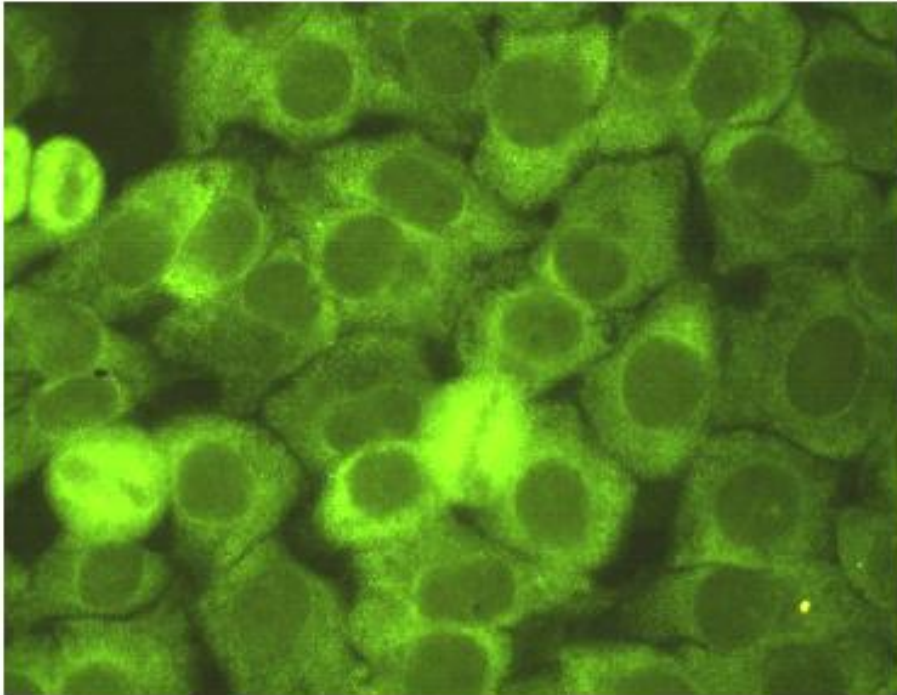
V metafázi signál od pólů k chromatinovému pásu, interf. b. negat.

Antigen: protein HsEg5

Klinická asociace: SLE, onemocnění pojiva

A.6.3.4 ANA - Cytoplazmatické fluorescenční vzory

Vzor homogenní cytoplazmy

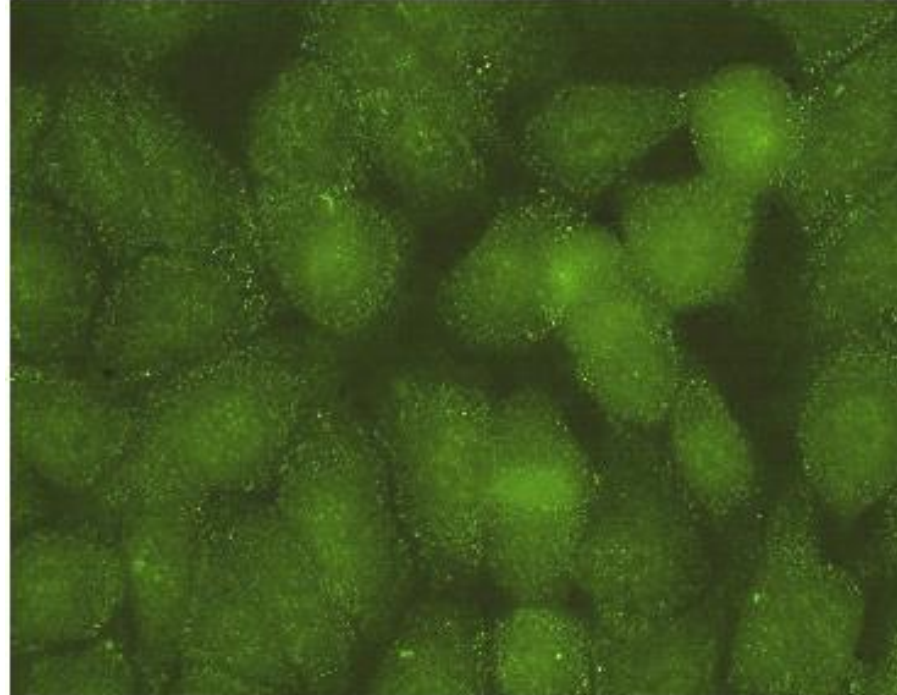


Signál granulární až homogenní,
negat. jaderný signál

Antigen: tRNA-syntetáza (Jo-1, PL-7,
PL-12) Rib-P, SRP

Klinická asociace: PM, DM, SLE

Vzor jemně zrnité cytoplazmy



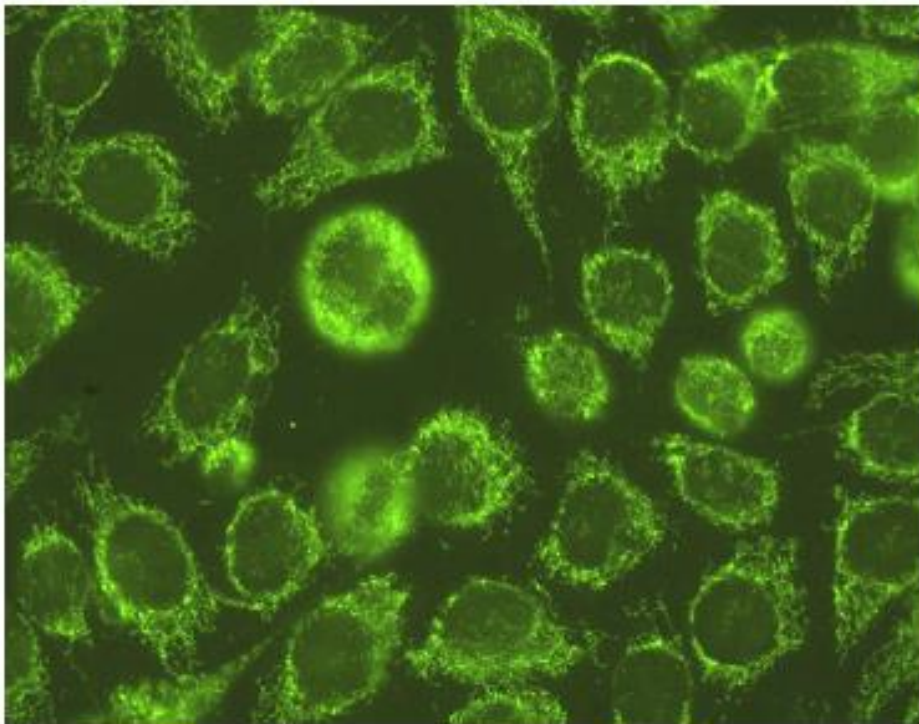
Jednotlivá jemná granula

Antigen: Jo-1 (histidyltRNA-syntetáza)

Klinická asociace: PM, DM

A.6.3.4 ANA - Cytoplazmatické fluorescenční vzory

Mitochondriální vzor

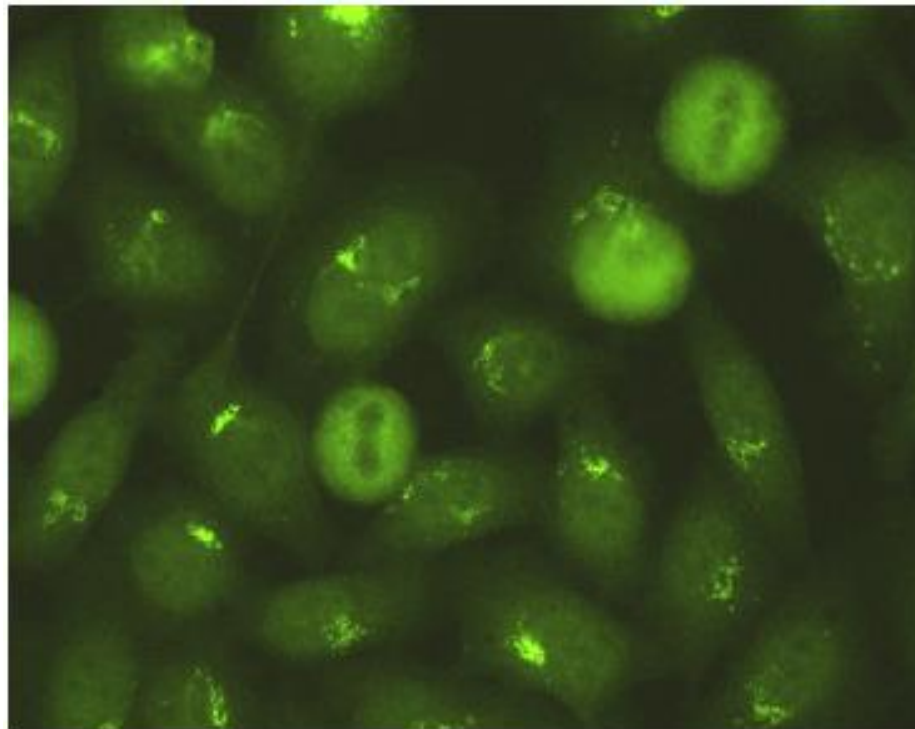


Velká nepravidelná granula
retikulární

Antigen: M2 (E2 enzym a protein X
komplexu pyruvát dehydrogenáza)

Klinická asociace: PBC, SSc

Golgiho komplex



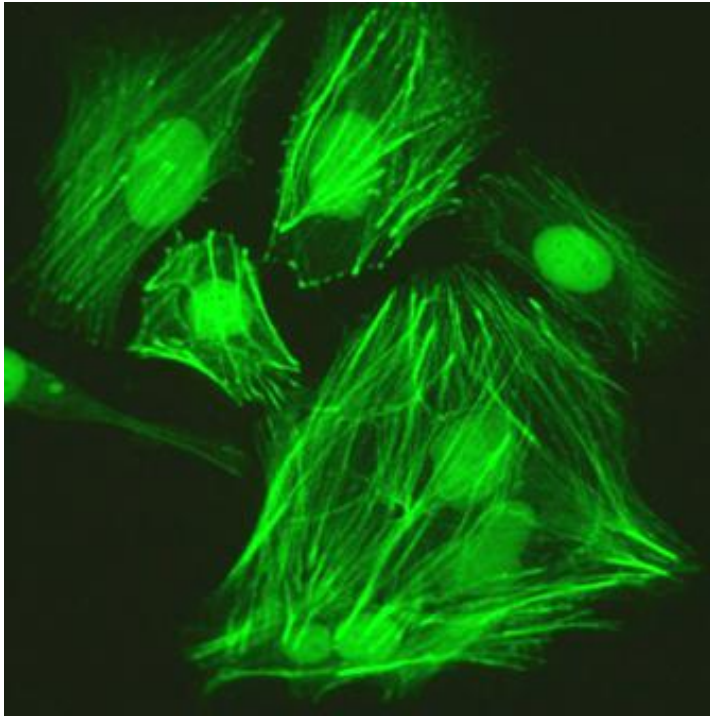
Signál nepravidelných velkých
granul přiléhajících k jádru, signál
metaf. b. difúzní

Antigen: proteiny giantin, golgin

Klinická asociace: SLE, SjS, RA

A.6.3.5 ANA - Cytoskelet

Aktin

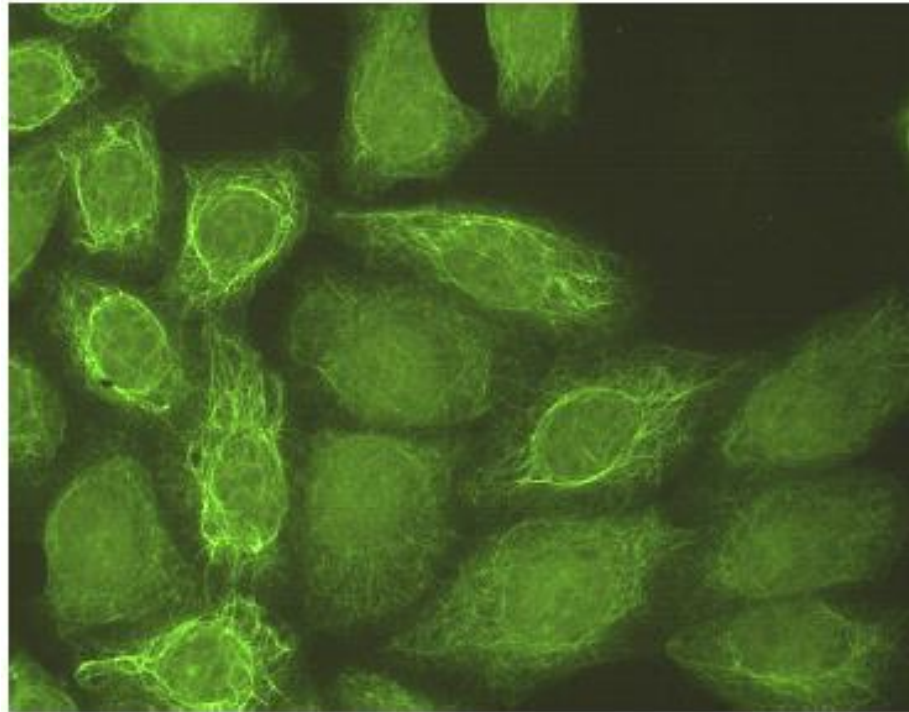


Vlákná přemostující celou délku buňky

Antigen: F-aktin

Klinická asociace: AIH, PBC, MCTD

Vimentin



Jemná vlákna, vytvářejí svazky okolo jádra

Antigen: Vimentin

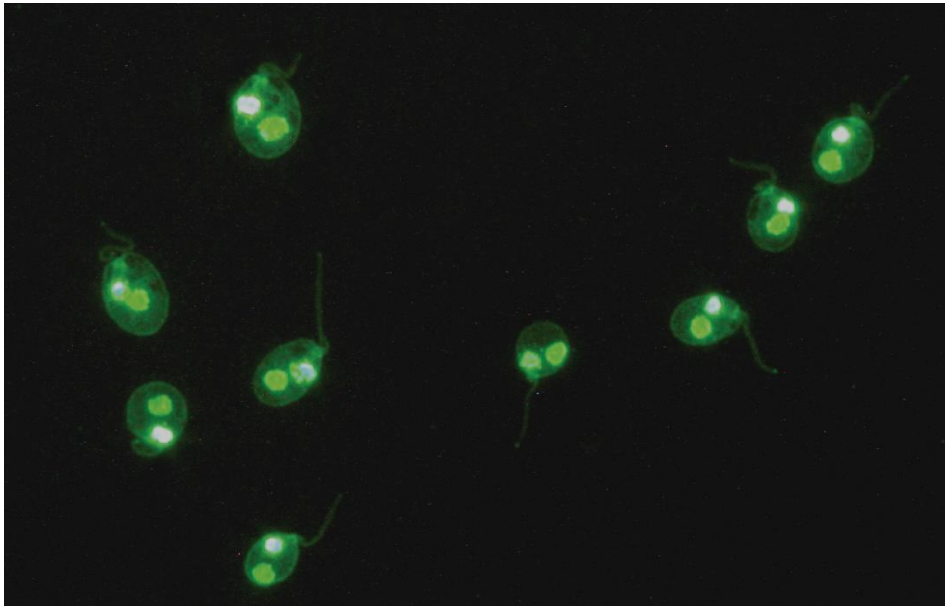
Klinická asociace: infekční nebo zánětlivá onemocnění

A.6.3.7 ANA - Anti-dsDNA



- vyšetření protilátek proti NATIVNÍ DVOUVLÁKNOVÉ DNA
- nepřímá imunofluorescence na substrátu obsahující čistou, nativní dsDNA

A.6.3.7 ANA - Anti-dsDNA



Imunofluorescence na buňkách of *Crithidia luciliae* ukazuje charakteristický vzor dvojího barvení – jádro a kinetoplast (čistá dsDNA)

Samotné zabarvení jádra ukazuje vazbu non-dsDNA jaderných autoantilátok

Anti ds-DNA autoantilátky jsou vysoce specifické pro aktivní SLE, s léčbou mohou vymizet

A.7. Ověření znalostí - zadání

Tvrzení

1. Excitační a emisní spektrum fluorochromu jsou identické
2. IF mikroskop umožňuje posuzovat zabarvení, které vzniklo vlivem ozáření ze stejného směru, jako je směr odečítaného světla
3. Při hodnocení tkáňového řezu nebo populace buněk je zdrojem barevného signálu volný rozpustný imunokomplex, tvořený autoangemem a autoprotilátkou
4. Autoprotilátky nalezené v organismu jsou vždy patologické
5. Výskyt jaderné autoprotilátky je silně asociovaný s přítomností systémového (revmatického) autoimunitního onemocnění
6. Specificita přítomnosti autoprotilátek je různá, jednu z nejvyšších pro jaterní autoimunitní nemoc má anti-PDH, antimitochondriální protilátka, viditelná na Hep-2 buňkách jako hrubě zrnitá cytoplazmatická fluorescence

Pravda

???

Nepravda

???

A.7. Ověření znalostí - řešení

Tvrzení	Pravda	Nepravda
1. Excitační a emisní spektrum fluorochromu jsou identické		X
2. IF mikroskop umožňuje posuzovat zbarvení, které vzniklo vlivem ozáření ze stejného směru, jako je směr odečítaného světla	X	
3. Při hodnocení tkáňového řezu nebo populace buněk je zdrojem barevného signálu volný rozpustný imunokomplex, tvořený autoantigenem a autoprotilátkou		X
4. Autoprotilátky nalezené v organismu jsou vždy patologické		X
5. Výskyt jaderné autoprotilátky je silně asociovaný s přítomností systémového (revmatického) autoimunitního onemocnění	X	
6. Specificita přítomnosti autoprotilátek je různá, jednu z nejvyšších pro jaterní autoimunitní nemoc má anti-PDH, antimitochondriální protilátka, viditelná na Hep-2 buňkách jako hrubě zrnitá cytoplazmatická fluorescence		X

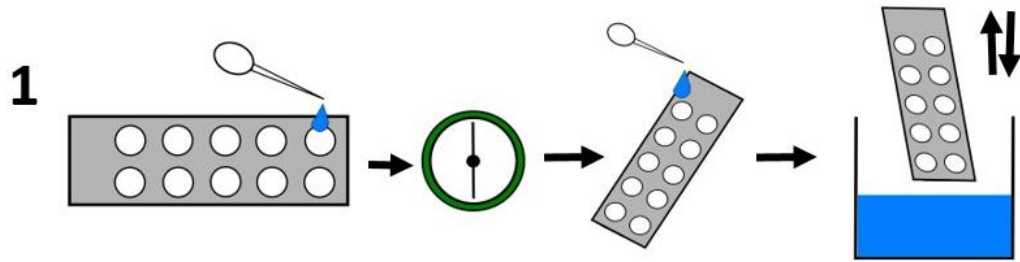
B. Část praktická

B.1 ANA-HEp-2 nepřímý imunofluorescenční test pro detekci jaderných a/nebo cytoplazmatických autoantilátěk v lidském séru.

B.1.1 Princip testu, informace o soupravě

Detekce protilátek je založena na principu nepřímé imunofluorescenční analýzy. Sklíčka mikroskopického mikroskopu jsou potažena tkáňovými řezy nebo buňkami (HEp-2 buňky). Pokud sérum pacienta obsahuje specifické protilátky, vážou se během první inkubace. Po odstranění nenavázaného materiálu promývacími kroky se během druhé inkubace detekují navázané protilátky anti-humánními imunoglobuliny konjugovanými s fluoresceinem. Specifické zelené fluorescenční barvení komplexu antigen-protilátka může být vizualizováno pomocí fluorescenčního mikroskopu.

B.1.2 Schéma pracovního postupu



charakterizace, příprava inkubační misky, 1. inkubace, promytí

Vyjměte požadovaný počet sklíček z pouzdra a označte si je. Nedotýkejte se jamek. Nedovolte, aby sklíčka vyschla. Příprava inkubační misky: Umístěte malý objem destilované vody do inkubační komůrky a umístěte sklíčko/a na podpěry do inkubační komůrky.

Inkubujte sklíčko/a 30 minut \pm 10 minut při pokojové teplotě ve vlhké inkubační komůrce. Pro konjugát použijte konzistentní doby inkubace.

První inkubace: pipetujte odpovídající objem každého zředěného séra a kontrol ("ready to use") do příslušných jamek,

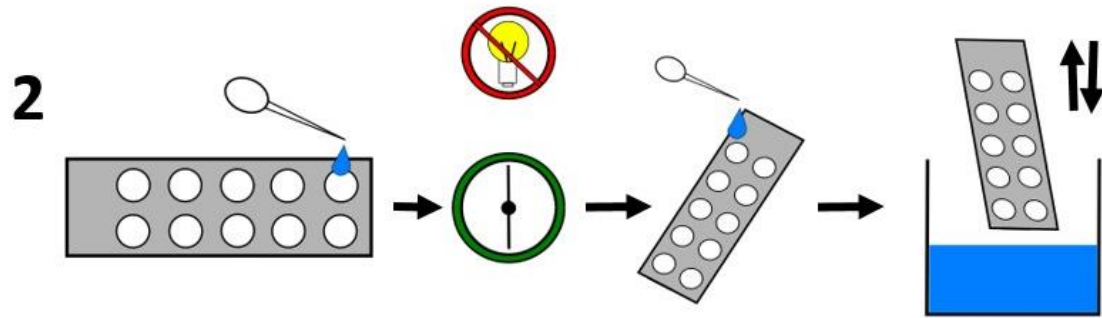
Promývání: Po inkubaci vyjměte sklíčka z inkubační misky a krátce propláchněte promývacím pufrem s použitím stříčky. Nestříkejte pufr přímo na jamky.

POZNÁMKA: Chcete-li zabránit křížové kontaminaci, sklopte sklíčko nejprve směrem k jednomu řádku jamek a opatrně spusťte proud promývacího pufru podél středové čáry sklíčka, aby umývací pufr stékal z dolního okraje sklíčka. Potom sklíčko nakloňte směrem k dalšímu řádku a opakujte tento postup, aby promývací pufr mohl odtéct.

Omyjte sklíčko/a 10 minut promývacím pufrem v barvicí vaničce. Vyvarujte se přímého kontaktu pevných předmětů se substrátem. Pro dosažení optimálních výsledků měňte roztok pufru jednou za 5 minut.

Zvedněte sklíčka z barvicí misky a opatrně odstraňte přebytek promývacího pufru.

B.1.2 Schéma pracovního postupu

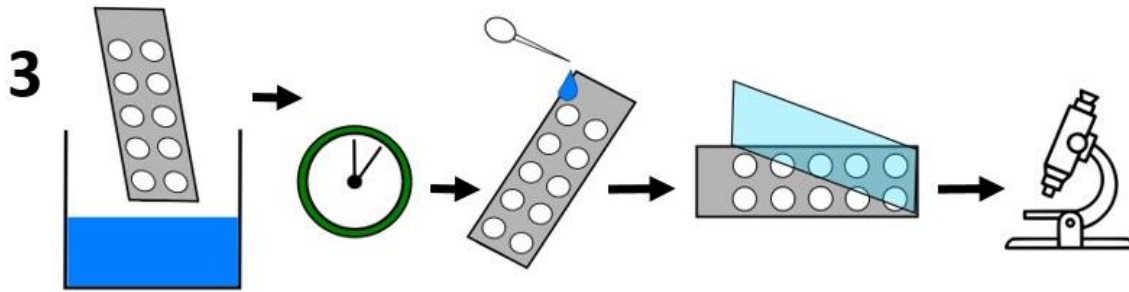


2. inkubace, promytí

Druhá inkubace: Po promývacím postupu vraťte sklíčka okamžitě do inkubační komůrky a každou jamku zakryjte odpovídajícím objemem konjugátu FITC a ujistěte se, že je jamka zcela zakrytá. Inkubujte sklíčko/a ve tmě 30 minut \pm 10 minut při pokojové teplotě.

Promývání: Po inkubaci vyjměte sklíčka z inkubační komůrky a krátce propláchněte promývacím pufrem s použitím stříčky. Nestříkejte pufr přímo na jamky. Omyjte sklíčko/a 10 minut promývacím pufrem v misce na barvení sklíček. Pro dosažení optimálních výsledků jednou za 5 minut vyměňte roztok pufru.

B.1.2 Schéma pracovního postupu



barvení
3. inkubace,
oplach,
montážní médium,
odečet

* Volitelné barvení kontrastním barvivem: Zředte kontrastní barvivo (Evansovu modř) 1: 3000 v promývacím pufru a dobře promíchejte. Nakloňte kontrastní barvivo do barvicí vaničky a inkubujte v něm sklíčka. Pro podrobnosti o době inkubace nahlédněte do předchozí části do kapitoly Pracovní postup, kde jsou detaily týkající se doby inkubace soupravy, kterou používáte. Evansova modř pokrývá nespecifickou fluorescenci pozadí.

Po inkubační době sklíčko vyjměte a krátce opláchněte promývacím pufr. Odstraňte přebytek promývacího pufru. Nesnažte se žádným způsobem sklíčko osušovat.

Zalévací médium: Přidejte odpovídající objem zalévacího média podél středové čáry každého sklíčka. Opatrně umístěte krycí sklíčko na místo tak, aby se zabránilo vzniku vzduchových bublin.

Odečítání: Ihned odečtěte sklíčko/a při zvětšení 400 - 800 × pomocí fluorescenčního mikroskopu. (Excitační filtr 490 nm, bariérový filtr 510 nm).

C. Použitá literatura, elektronické zdroje

- ALBERTS, Bruce. "**Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky.**" Ústí nad Labem: Espero Publishing, [2005]. ISBN 80-902906-2-0.
- Alberts B (2002). *Molecular biology of the cell (4th ed.)*. New York: Garland Science. p. 207. ISBN 978-0-8153-4072-0.
- Ogg SC, Lamond AI. "**Cajal bodies and coilin-moving towards function.**" *Cell Biol.* 2002 Oct 14;159(1):17-21. doi: 10.1083/jcb.200206111. Epub 2002 Oct 14. PMID: 12379800; PMCID: PMC2173504.
- Moldovan GL, Pfander B, Jentsch S. "**PCNA, the maestro of the replication fork.**" *Cell.* 2007 May 18;129(4):665-79. doi: 10.1016/j.cell.2007.05.003. PMID: 17512402.
- Wiik AS, Høier-Madsen M, Forslid J, Charles P, Meyrowitsch J. "**Antinuclear antibodies: a contemporary nomenclature using HEP-2 cells.**" *Autoimmun.* 2010 Nov;35(3):276-90. doi: 10.1016/j.jaut.2010.06.019. Epub 2010 Jul 22. PMID: 20650611.
- EKL Chan et al. "**The International Consensus on ANA Patterns (ICAP) in 2021—The 6th Workshop and Current Perspectives.**" *JALM*, 2022, 322–330, <https://doi.org/10.1093/jalm/jfab140>

- AESKU diagnostics (Aeskuslides) – Návod k použití a interpretace výsledků
- <https://www.genome.gov> – NIH Glossary of Genetic Therms
- <https://www.birmingham.ac.uk> – Hep-2 image library
- <https://www.biovendor.cz/katalog/hep-2-kit-k-51100>

