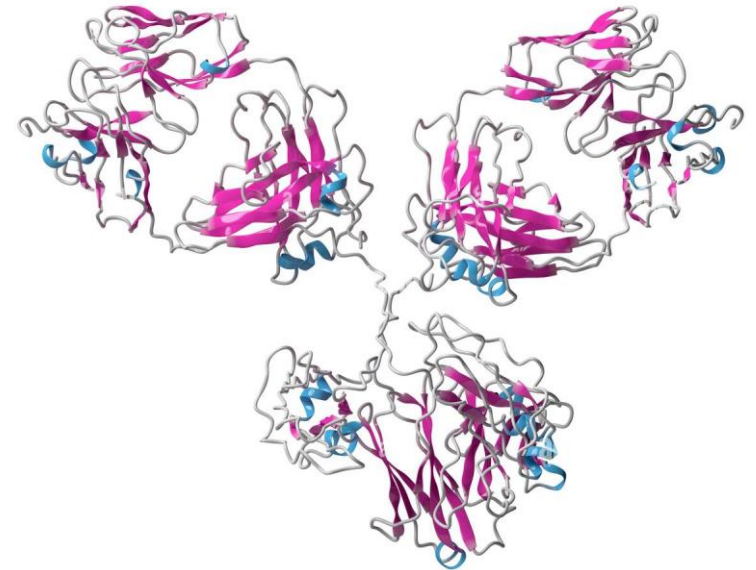


# TECNICHE IMMUNOCHEMICHE nella pratica di LABORATORIO

SI BASANO TUTTE SULL'UTILIZZO di SPECIFICHE MOLECOLE PROTEICHE

## ANTICORPI



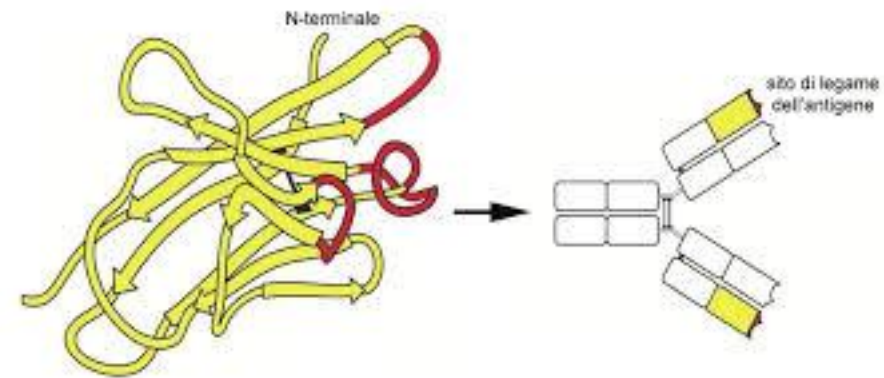
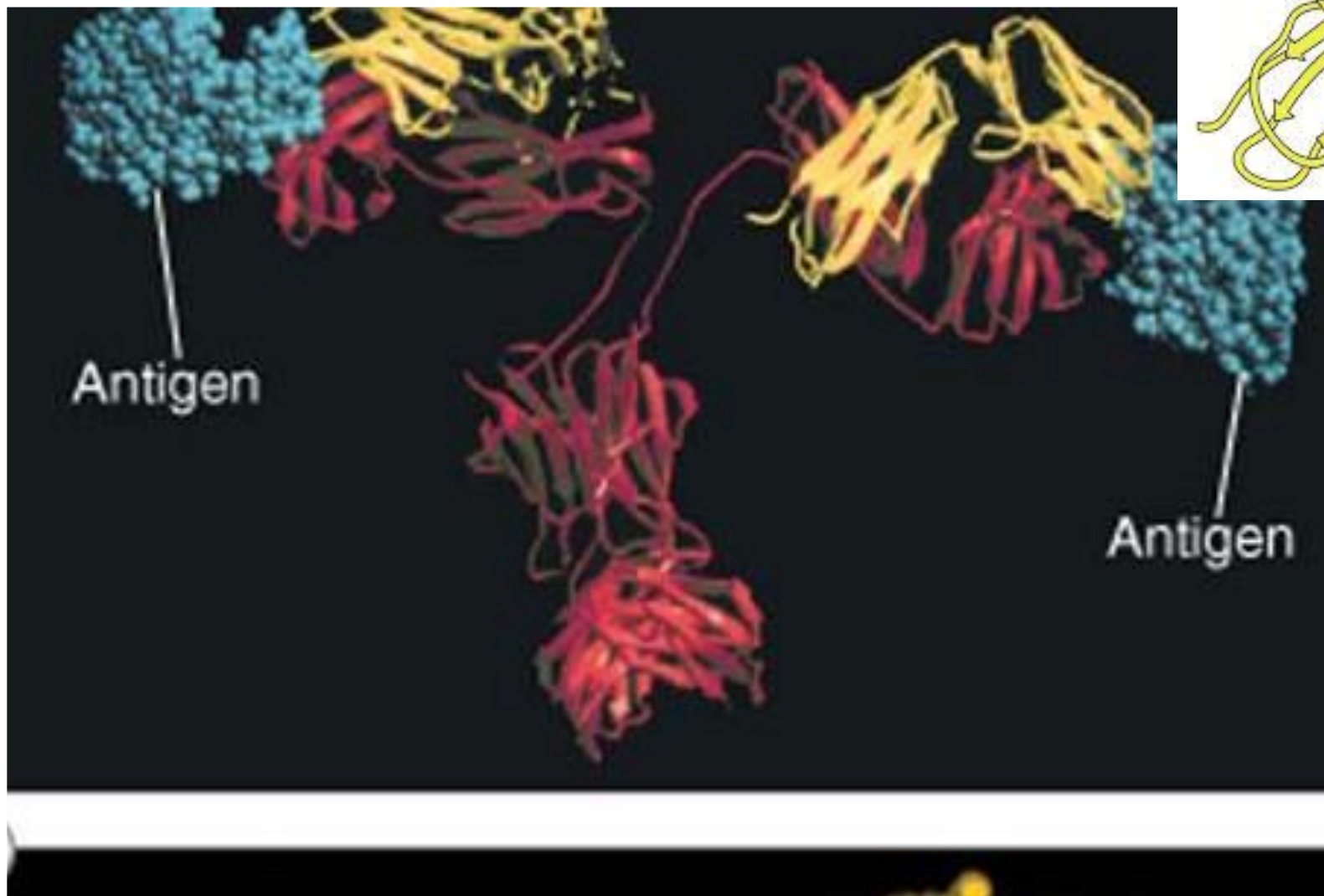
QUALE VANTAGGIO???

alamy

Image ID: JMXCTK  
www.alamy.com

<https://www.alamy.it/la-igg1-anticorpo-monoclonale-immunoglobulina-multi-farmaci-biotech-sono-anticorpi-modello-di-cartoon-la-struttura-secondaria-di-colorazione-eliche-blu-fogli-rosa-image150556915.html>

## LEGAME ANTIGENE - ANTICORPO



$$K_D = 10^{-7} - 10^{-11}$$

# COS'E' UN ANTIGENE?

Gli antigeni possono essere processati in frammenti chiamati **epitopi**.

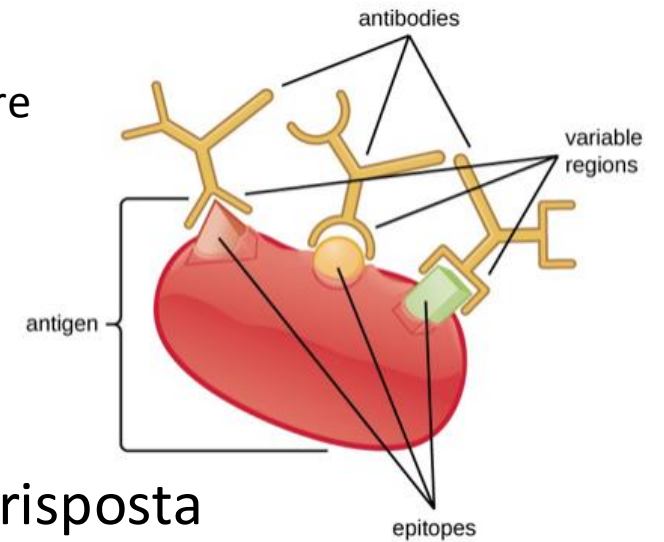


Figure 1. An antibody binds to a specific region on an antigen called an epitope. A single antigen can have multiple epitopes for different, specific antibodies.

- molecola che, introdotta in un organismo, è in grado di attivare la risposta anticorpale
- macromolecole solubili in acqua e che possiedono un alto grado di complessità chimica (maggiore il peso molecolare, maggiori le probabilità che funzionino come antigeni)

Le proteine eterologhe di massa molecolare  $>10000$  Da sono generalmente degli ottimi antigeni, mentre i piccoli peptidi non sono di solito antigenici.

**IMMUNOGENICITA'**

**ANTIGENICITA'**

# DA COSA DIPENDE L'IMMUNOGENICITA'?

**Estraneità:** il sistema immunitario è in grado di discriminare il “self” dal “non self”, di conseguenza, le molecole estranee ad un determinato organismo hanno capacità immunogenica;

**Specie animale:** le proprietà immunogene di un antigene variano a seconda della specie animale utilizzata per la produzione di anticorpi;

**Peso molecolare:** più è elevato il peso molecolare della molecola in esame e maggiore sarà la possibilità di avere una risposta immunogenica;

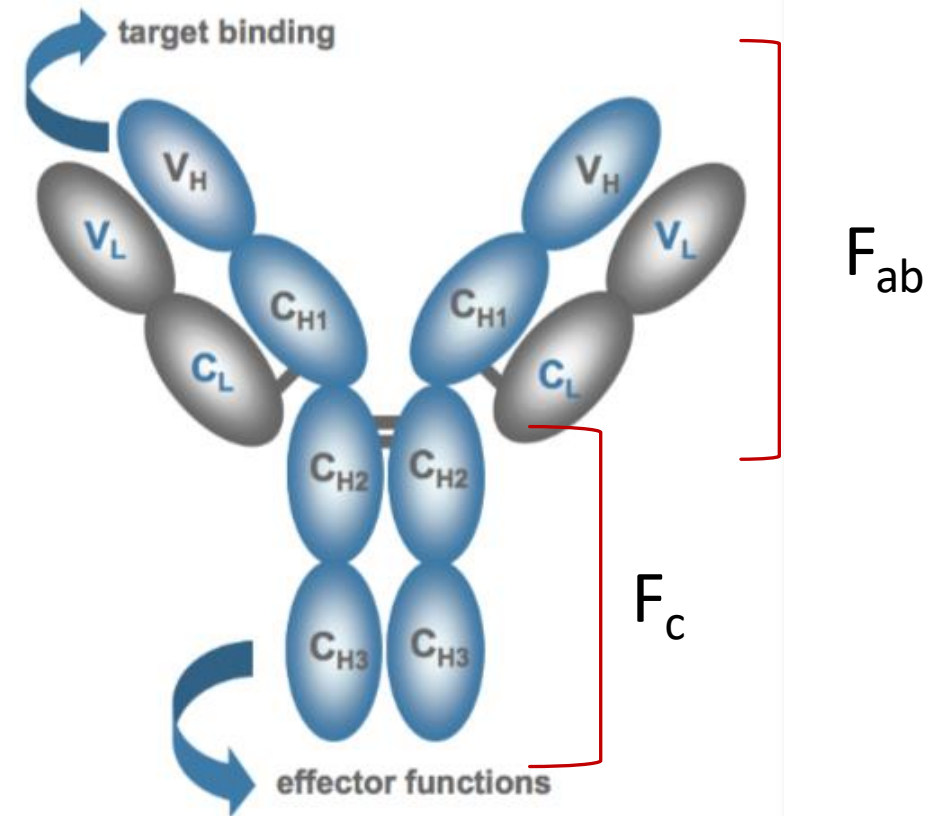
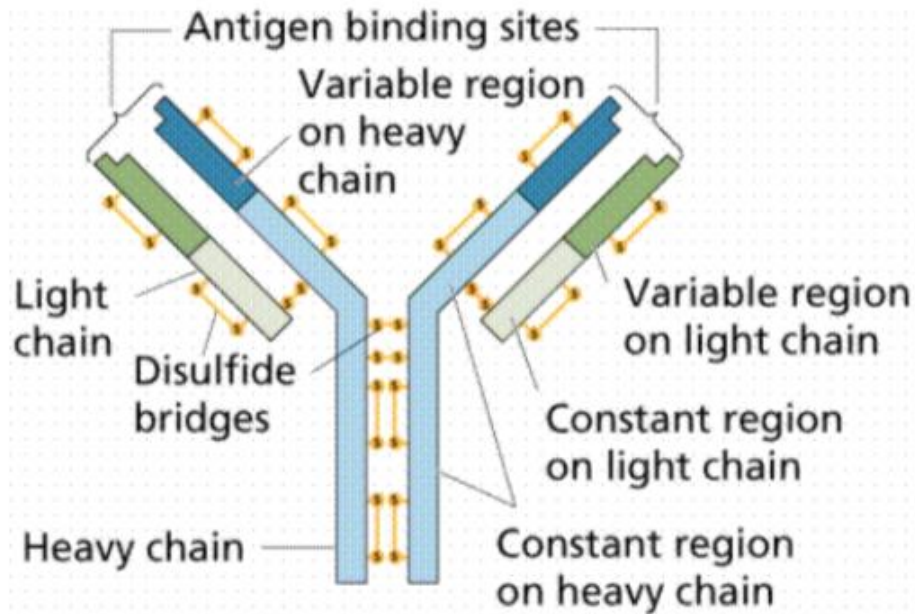
**Degradabilità:** macromolecole insolubili sono più immunogene di quelle più piccole e solubili, poiché vengono più facilmente fagocitate ed elaborate dal sistema macrofagico;

**Complessità chimica e strutturale delle molecole:** l'eterogeneità chimica apporta immunogenicità. Ad esempio omopolimeri anche adeguatamente grandi hanno immunogenicità bassa se confrontata con polimeri, contenenti aminoacidi diversi, dello stesso peso molecolare. D'altra parte, gli antigeni proteici risultano tanto più immunogeni quanto più sono complessi i loro livelli di organizzazione molecolare (struttura terziaria e quaternaria).

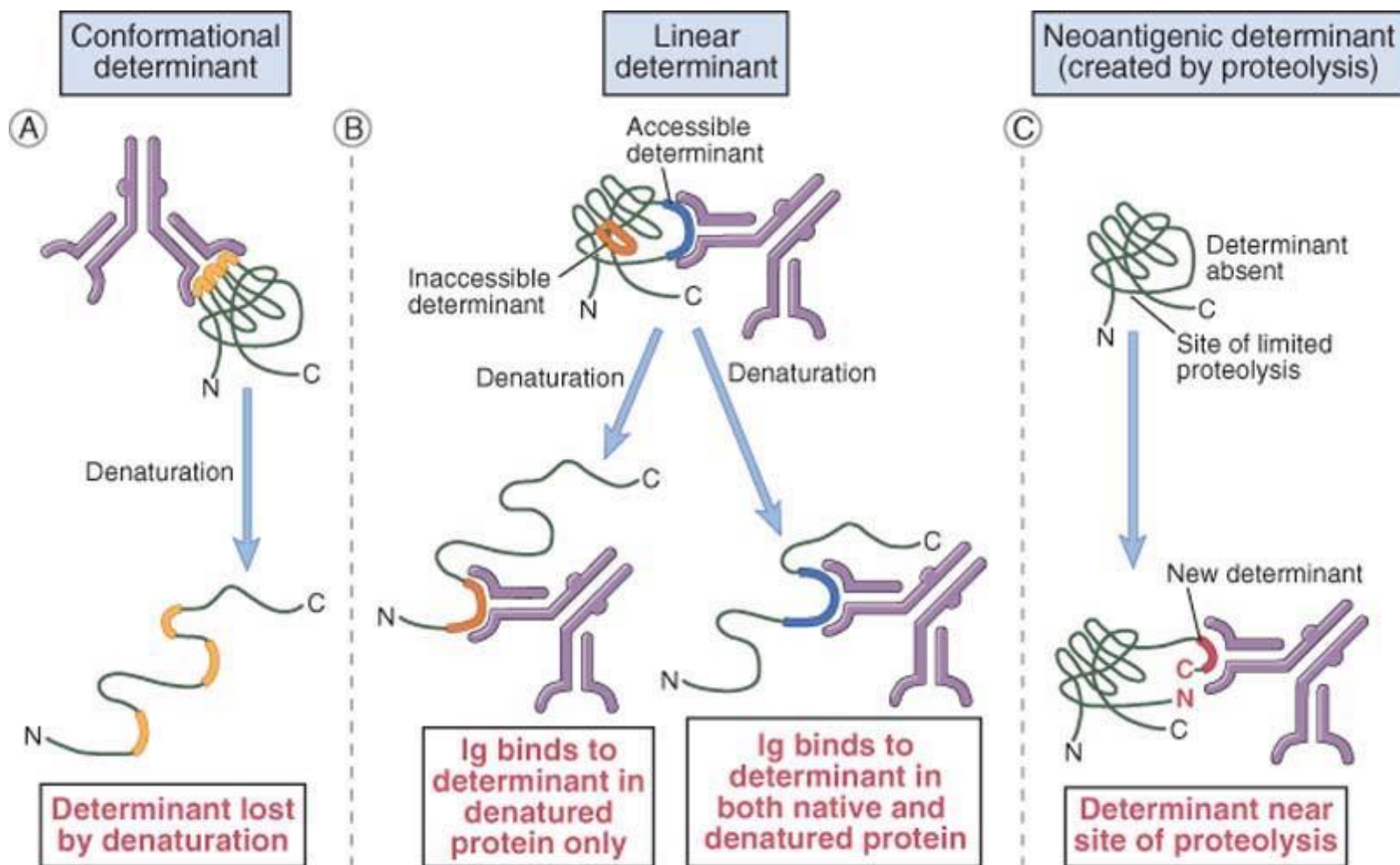
# CARATTERISTICHE COMUNI degli ANTICORPI

Catene leggere:  
25 kDa; 220 aa

Catene pesanti:  
50 kDa; 440 aa



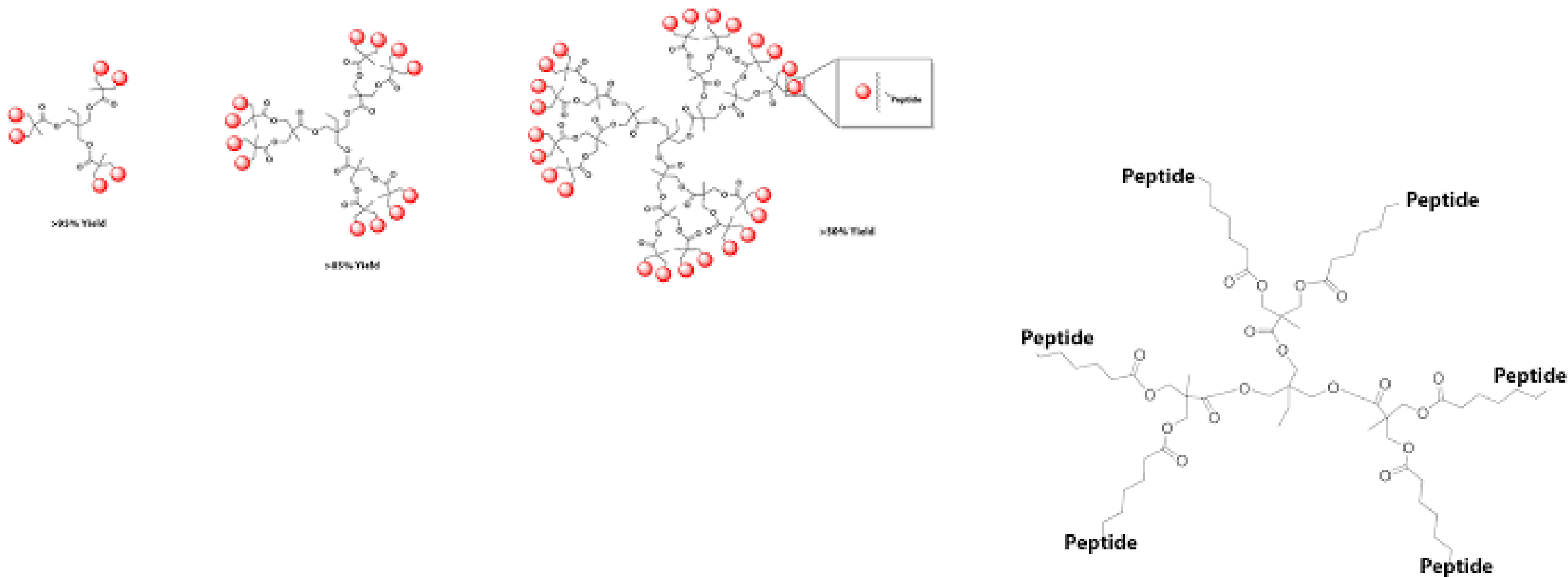
L'**epitopo** è l'entità molecolare più piccola riconoscibile dal sistema immunitario



Abbas et al: Cellular and Molecular Immunology, Updated 6th Edition.  
Copyright © 2009 by Saunders, an imprint of Elsevier, Inc. All rights reserved.

Queste caratteristiche possono influenzare le applicazioni immunochimiche?

# MODULI SINTETICI PER AUMENTARE IL PESO MOLECOLARE E L'IMMUNOGENICITA' DI UN ANTIGENE



# TIPOLOGIE DI ANTICORPI UTILIZZATI

## - POLICLONALI:

- Diversi Ab capaci di riconoscere ognuno un EPITOPO sul medesimo Ag

- Alta sensibilità

.....Però

- Altra cross-reattività

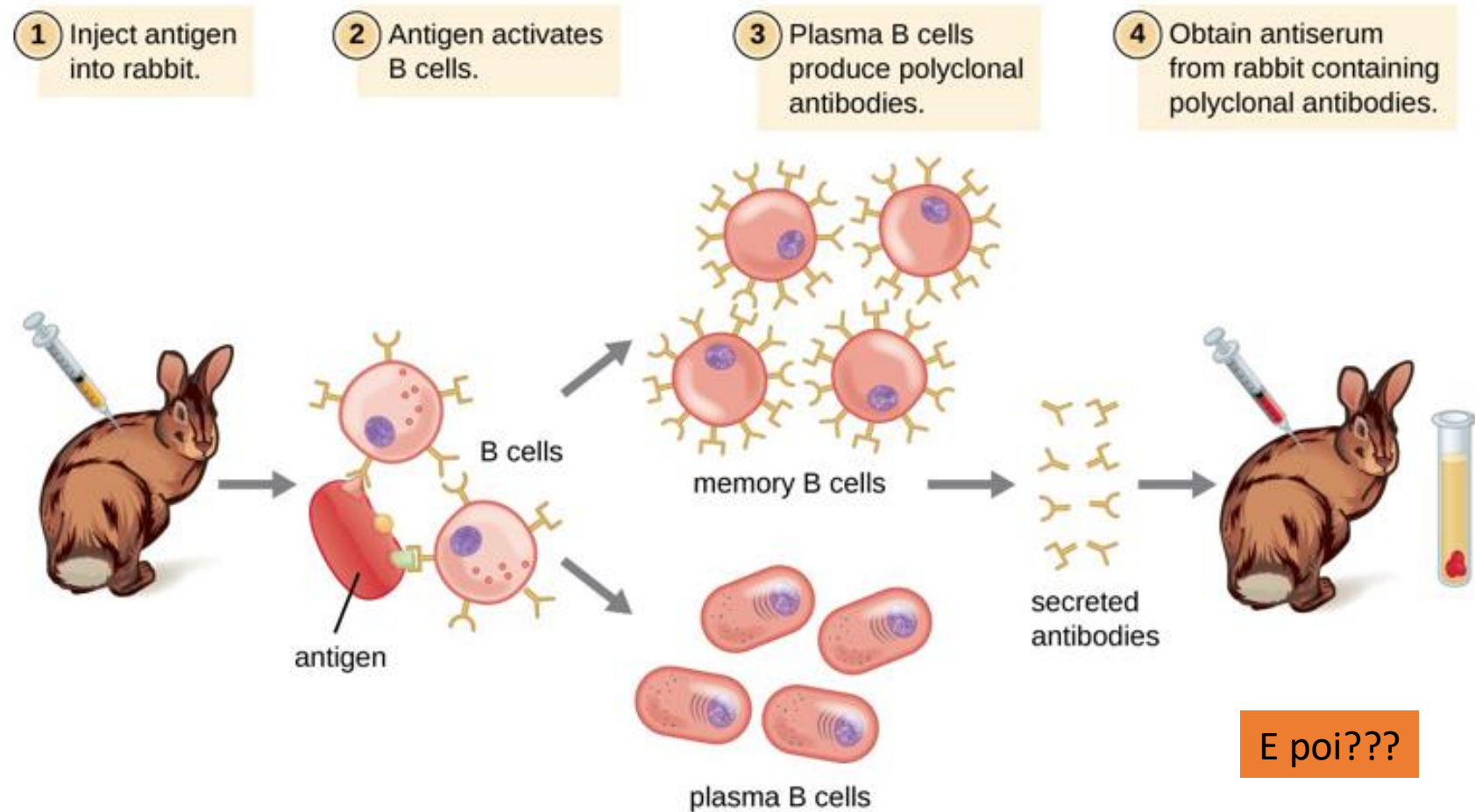


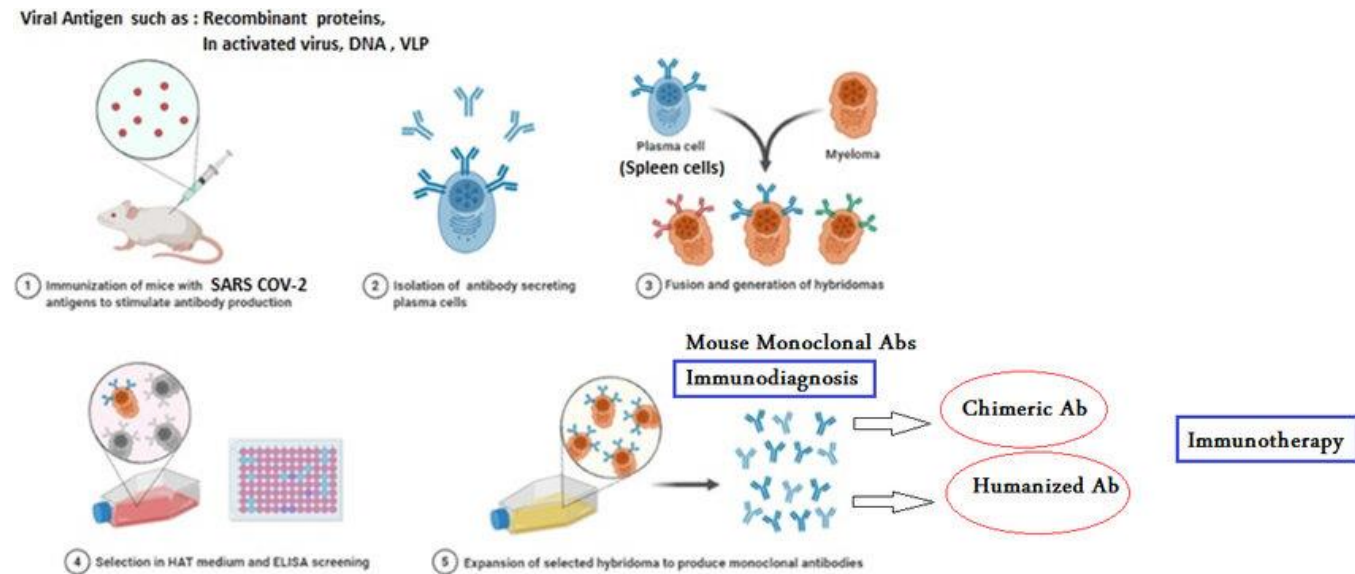
Figure 2. This diagram illustrates the process for harvesting polyclonal antibodies produced in response to an antigen.

# TIPOLOGIE DI ANTICORPI UTILIZZATI

## - MONOCLONALI

- Nobel 1984 a **Köhler e Milstein** :
- Ab provenienti da un medesimo clone di linfocita B; riconoscono un unico epitopo
- Meno sensibilità
- ....Però
- Minor cross-reattività
- si ottengono in vitro da ibridomi (fusione di cellule di milza di un topo immunizzato con una linea cellulare di mieloma di topo)

Mediante sviluppo di IBRIDOMI



## **MODALITA' ALTERNATIVE DI PRODUZIONE DI ANTICORPI**

### **CLONAZIONE DEI LINFOCITI B**

Le cellule vengono sottoposte a screening e isolate direttamente da campioni di sangue periferico o da campioni di tessuto linfoide.

Si ricorre poi all'amplificazione genica per clonare i geni delle immunoglobuline nella loro interezza (regioni variabili e costanti delle catene leggere e pesanti), per poi procedere con l'espressione ricombinante in coltura cellulare. Uno dei principali vantaggi della clonazione di singoli linfociti B è la possibilità di isolare mAb neutralizzanti da soggetti umani vaccinati o immunizzati naturalmente per clonarli.

### **PHAGE DISPLAY**

Tecnica di selezione di anticorpi in vitro, il phage display è l'approccio più antico e più ampiamente utilizzato. È stato sviluppato per la prima volta da George P. Smith nel 1985. Comporta l'amplificazione dei segmenti VH e VL convertendo l'mRNA isolato dalle cellule B (ottenuto dal sangue umano) in cDNA utilizzando la tecnica PCR.

I segmenti amplificati vengono quindi clonati in un vettore insieme alla proteina PIII del batteriofago. Il costrutto generato viene utilizzato per infettare l'E. coli, con conseguente formazione di una libreria composta da circa  $10^{10}$  cellule con l'ausilio di un fago helper. Segue il rilascio del batteriofago dall'E. coli con segmenti VH e VL come parte del suo rivestimento e la selezione di segmenti VH e VL specifici contro un antigene specifico.

# ANTICORPI PRIMARI e ANTICORPI SECONDARI: quale differenza?

| Anticorpi Policlonali                  | Anticorpi Monoclonali                     |
|----------------------------------------|-------------------------------------------|
| Prodotti da diversi cloni di cellule B | Prodotti da un unico clone di cellule B   |
| Riconoscono più epitopi dell'antigene  | Riconoscono un solo epitolo dell'antigene |
| Alta cross-reactivity                  | Bassa cross-reactivity                    |
| Alto rumore di fondo                   | Basso rumore di fondo                     |
| Alta variabilità tra i diversi batch   | Variabilità tra i diversi batch nulla     |
| Poco costosi                           | Molto costosi                             |
| Tempi di produzione brevi              | Tempi di produzione lunghi                |

# IMMUNODOSAGGI

```
graph TD; A[IMMUNODOSAGGI] --> B[Metodi marcati]; A --> C[Metodi non marcati]; B --> B1["traccianti radioisotopici, enzimatici, fluorimetrici, bioluminescenti, chemiluminescenti"]; C --> D[Agglutinazione]; C --> E[Precipitazione]; D --> D1["Se avviene in soluzione acquosa"]; D1 --> F[Diretta]; D1 --> G[Indiretta]; F --> F1["se l'antigene è corpuscolato (cellule, batteri)"]; G --> G1["se l'antigene, solubile, si fa adsorbire o legare covalentemente a carrier insolubili (sfere di lattice, globuli rossi)"]; E --> E1["Se avviene in matrice solida"];
```

## Metodi marcati

traccianti radioisotopici, enzimatici,  
fluorimetrici, bioluminescenti,  
chemiluminescenti

## Metodi non marcati

### Agglutinazione

Se avviene in soluzione  
acquosa

#### Diretta

se l'antigene è corpuscolato  
(cellule, batteri)

#### Indiretta

se l'antigene, solubile, si fa  
adsorbire o legare  
covalentemente a carrier insolubili  
(sfere di lattice, globuli rossi)

### Precipitazione

Se avviene in matrice solida

# ANTICORPI PRIMARI e ANTICORPI SECONDARI: quale differenza?

## TECNICHE IMMUNOCHEMICHE DIRETTE e INDIRETTE

Quelli secondari sono specie-specifici, diretti contro le regioni  $F_c$  costanti degli Ab

### SISTEMI DI RIVELAZIONE:

- **Fluorescenti** (FITC, TRITC, ALEXA FLUOR 488, 568)
- **Leganti enzimi** (perossidasi-HRP o fosfatasi alcalina-AP) che producono da substrati specifici sostanze colorate, fluorescenti o chemiluminescenti
- **Biotinilati**: reagiscono con complessi avidina-biotina leganti sostanze fluorescenti o enzimi (perossidasi)
- **Radionuclidi**: iodio 125, zolfo 35

# TECNICHE IMMUNOCHEMICHE nella pratica di LABORATORIO

- Su siero/plasma/urine/CSF: **ELISA**
- Su fettine di tessuto/cellule: **Immunoistochimica (IHC); IF**
- Su omogenati: **Western Blotting**

La specificità delle reazioni antigene-anticorpo e la sensibilità di “marcatori” (enzimi, isotopi, sostanze fluorescenti, radicali liberi) possono essere combinate insieme per compiere un “dosaggio immunologico”, ossia quantificare con precisione una sostanza antigenica, presente, nel nostro caso, nei fluidi biologici.

ab133528

Anti-ATG7 antibody [EPR6251]

RabMAb   Recombinant   KO Validated

★★★★★16 reviews

Application: WB, ICC/IF

Reactive species: Rat, Human, Mouse

Conjugation: Unconjugated

6 images   88 publications

ab8227

Anti-beta Actin antibody

★★★★★104 reviews

Application: IHC-P, WB, ICC/IF

Reactive species: Human, Rat, Chicken, Chinese hamster, Cow, Dog, Fish, Rabbit, Xenopus laevis, Mouse

Conjugation: Unconjugated

ab9484

Anti-GAPDH antibody [mAbcam 9484] - Loading Control

★★★★★56 reviews

Application: WB, IHC-P

Reactive species: Chinese hamster, Pig, Cow, Chicken, Xenopus laevis, Rat, Mouse, Human

Conjugation: Unconjugated

ab150077

Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor® 488)

★★★★★20 reviews

Application: IHC-Fr, ELISA, IHC-P, Flow Cyt, ICC/IF

Host species: Goat

Conjugation: Alexa Fluor® 488

39 images   3105 publications

ab125909

Rabbit monoclonal [H169-1-5] Anti-Human IgG Fc

RabMAb   Recombinant

Application: ELISA

Host species: Rabbit

Conjugation: Unconjugated

ab6728

Rabbit Anti-Mouse IgG H&L (HRP)

★★★★★10 reviews

Application: Dot, ELISA, IHC-Fr, IHC-P, IM, WB, ICC/IF

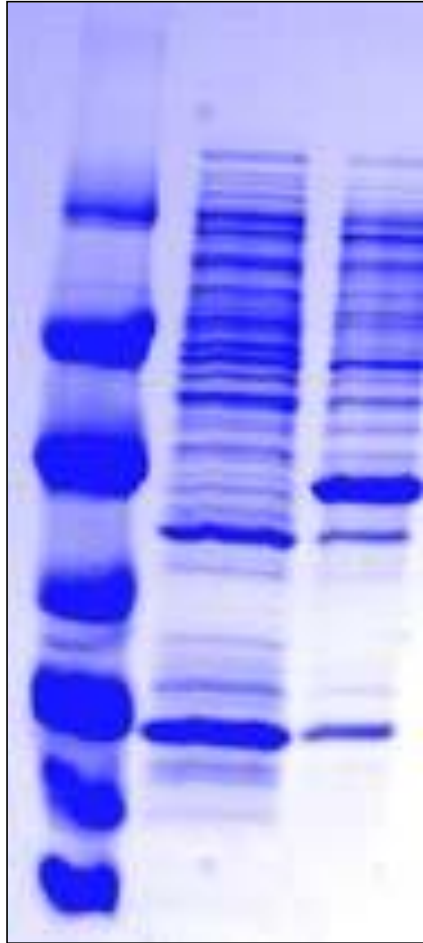
Host species: Rabbit

Conjugation: HRP

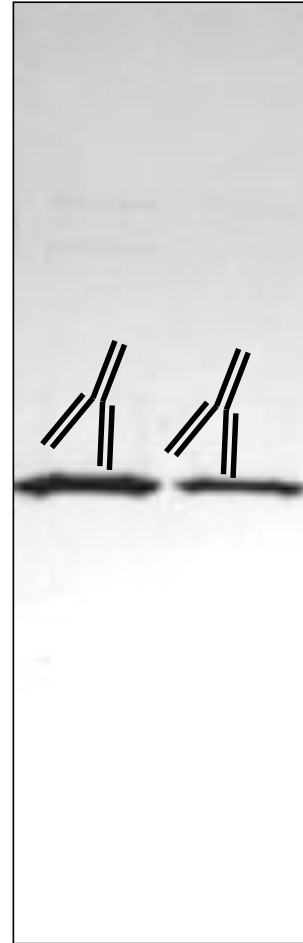
19 images   1100 publications

# WESTERN BLOT: PERCHE'?

Colorazione (**Blue Coomassie**)



Rilevazione con **anticorpi**

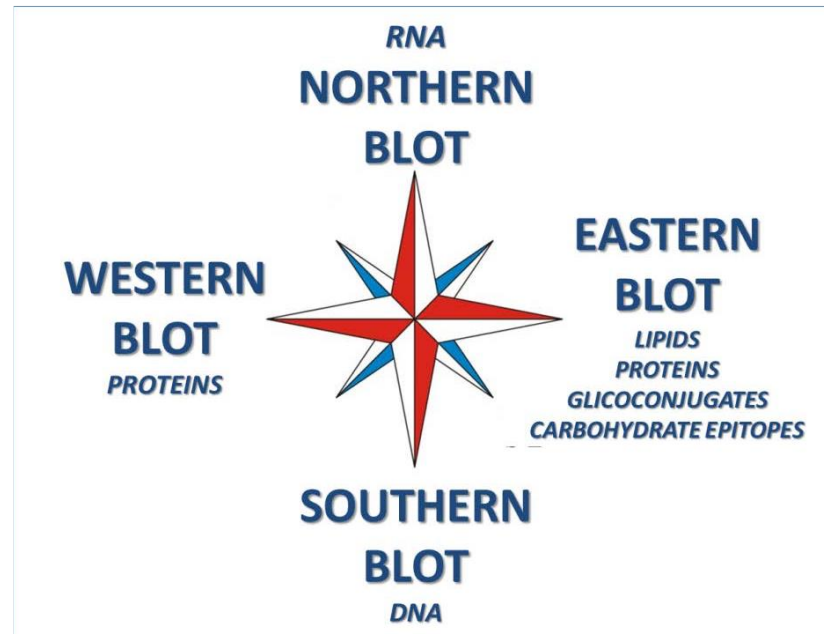


# WESTERN BLOT

George **Stark** alla Stanford University

TRASFERIMENTO di PROTEINE

Il nome **Western blot** è un gioco sul nome Southern **blot**, tecnica per il rilevamento di DNA sviluppato precedentemente da Edwin Southern. Il rilevamento di RNA è chiamato Northern **blot**.

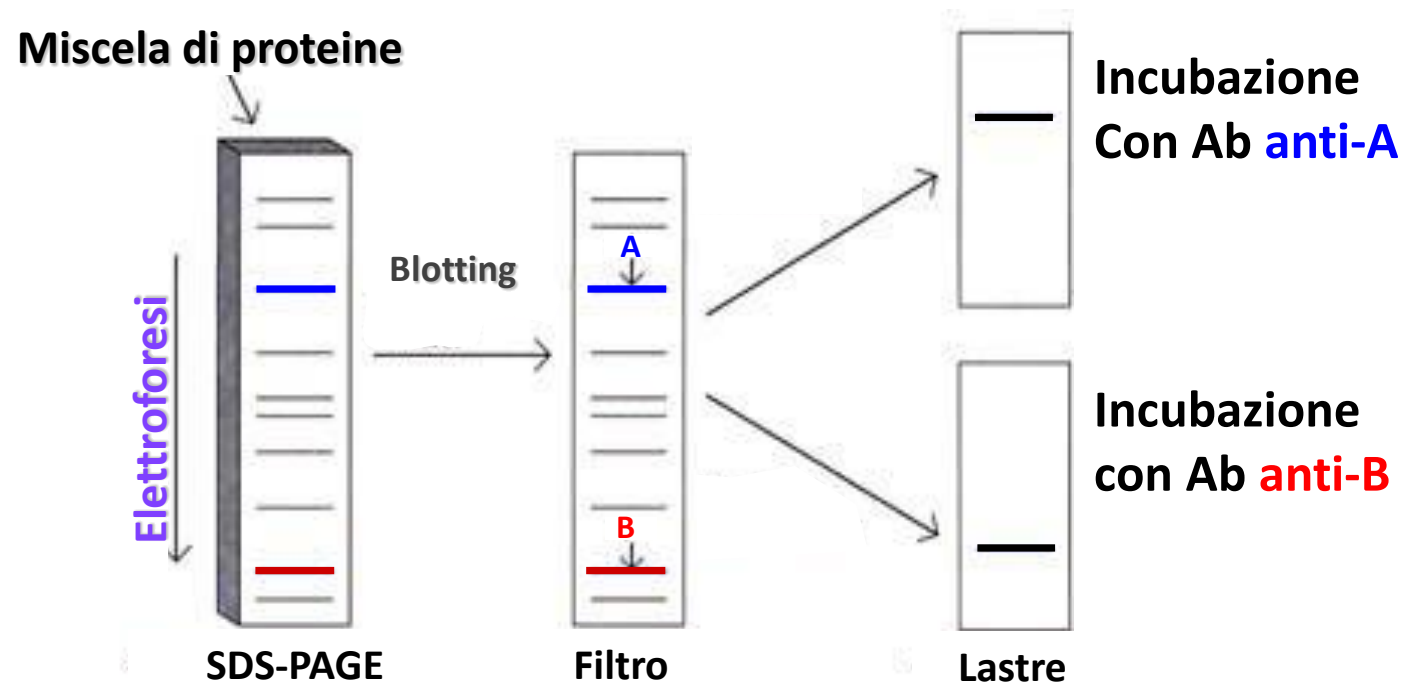


# WESTERN BLOT

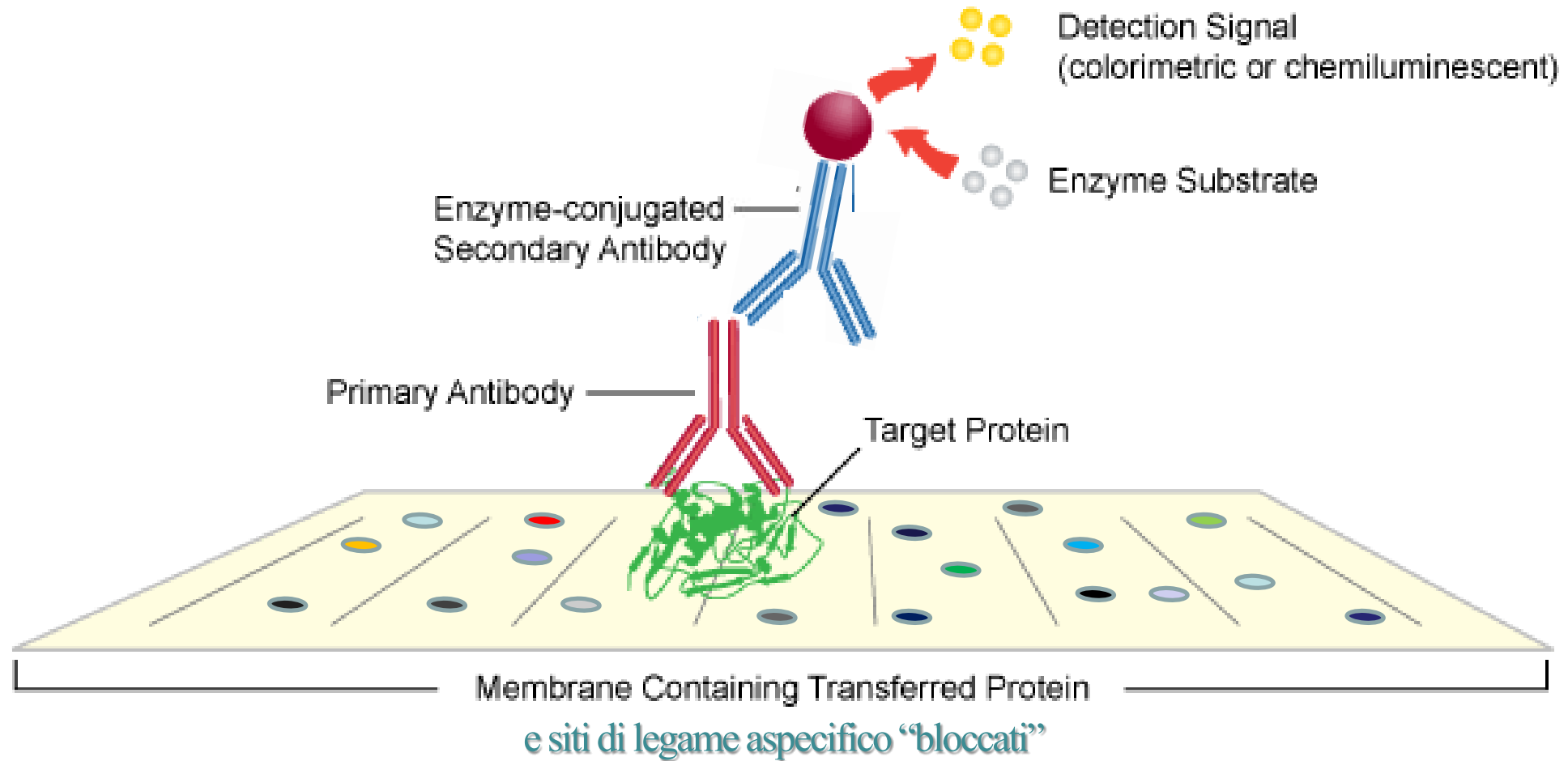
Tecnica **QUALITATIVA** che consente di **visualizzare/individuare** UNA **proteina** tra milioni, grazie all'utilizzo di anticorpi

Questo sistema unisce:

- La **risoluzione** delle separazioni elettroforetiche
- La **sensibilità** delle rivelazioni immunochimiche



# WESTERN BLOT



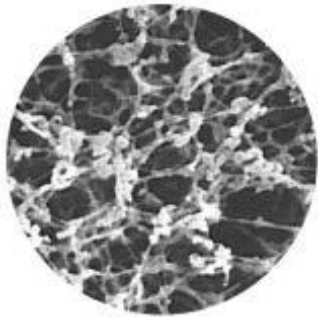
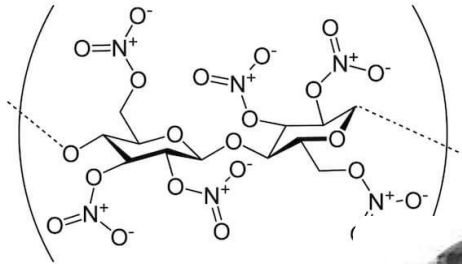
# WESTERN BLOT

Trasferimento di proteine dal gel ad una membrana in presenza di un campo elettrico

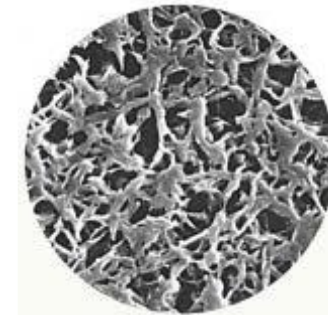
Le membrane hanno il compito di:

**IMMOBILIZZARE** (inibisce la diffusione)

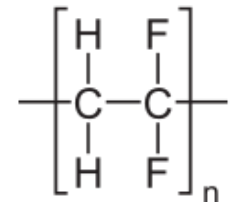
**MIGLIORARE L'ACCESSO AGLI EPITOPPI**



**Nitrocellulosa**  
80-100 µg/cm<sup>2</sup>



**PVDF**  
(Polyvinylidene fluoride)  
100-300 µg/cm<sup>2</sup>

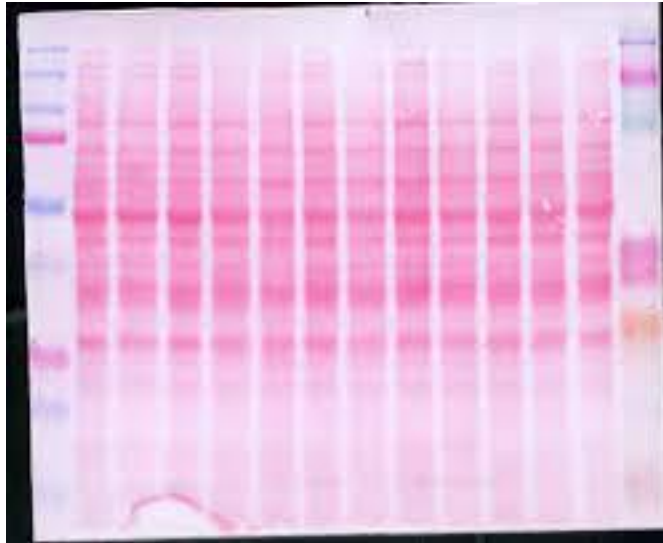


**Table 11.3. Total protein blot stains.**

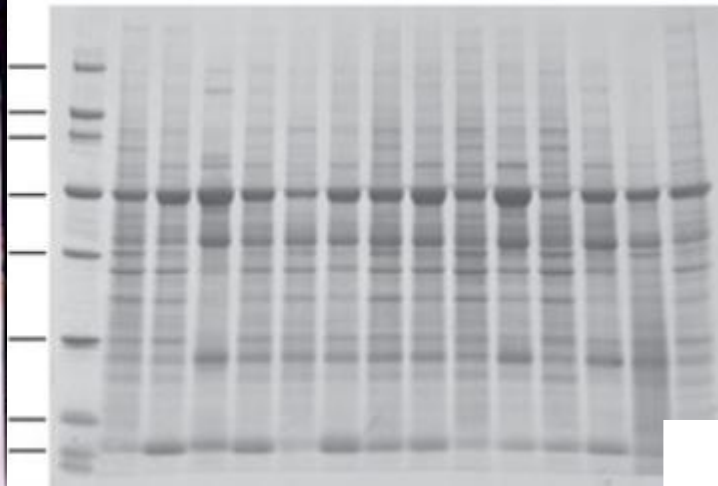
| Method                                                                 | Sensitivity  | Protein Load<br>(µg/Band) | Advantages                                                                                       | Disadvantages                                                                 | Imaging                                                                    |
|------------------------------------------------------------------------|--------------|---------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|
| SYPRO Ruby protein blot stain                                          | 2–8 ng       | ~0.2                      | Compatible with mass spectrometry, Edman-based sequencing, and standard immunological procedures | Multistep protocol requires UV, LED, or laser imaging for maximum sensitivity | Fluorescence visualization with UV, LED epi-illumination or laser scanning |
| Colloidal gold stain                                                   | 1 ng         | ~0.1                      | High sensitivity; single-step protocol                                                           | Incompatible with nylon membranes                                             | Photography with epi-illumination or reflectance densitometry              |
| Anionic dyes (amido black, Coomassie R-250, Ponceau S, Fast Green FCF) | 100–1,000 ng | ~5.0                      | Inexpensive, rapid                                                                               | Low sensitivity                                                               |                                                                            |

# PERCHE' COLORARE LA MEMBRANA?

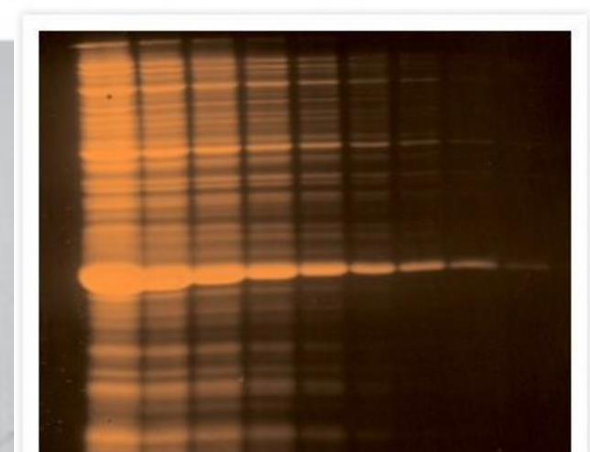
- Per valutare l'efficienza del trasferimento delle proteine al blot
- Per determinare se le corsie sono caricate allo stesso modo
- Per avere dei buoni riferimenti nel caso fosse necessario tagliare la membrana



PONCEAU



AMIDO BLACK



SYPRO RED

# WESTERN BLOT: passaggi sperimentali

## SATURAZIONE DELLA MEMBRANA e BLOCCO dei siti aspecifici

La membrana ha una elevata capacità di legare le proteine su tutta la superficie. Risulta quindi **INDISPENSABILE** bloccare i siti aspecifici di legame, ossia tutta la superficie non impegnata in legami con le proteine trasferite

Questo consente agli anticorpi di legarsi **SOLO** alle proteine di interesse e non in modo casuale alla superficie della membrana (background)

### Tra i più utilizzati:

**Non-Fat Dry Milk**

Mix di proteine del latte privo di grassi

**BSA (Bovine Serum Albumin)** Albumina di siero bovino

## **PASSAGGI:**

1. anticorpo primario (la scelta dipende se si vuole utilizzare riconoscimento diretto o indiretto)
2. Lavaggio dell'anticorpo in eccesso
3. anticorpo secondario (la scelta dipende dalla tipologia dell'Ab primario e dal metodo di rilevamento)

Gli anticorpi possono essere coniugati con un enzima: **perossidasi di rafano (HRP) o fosfatasi alcalina (AP)**

### **Substrati cromogeni per HRP:**

4-cloro-1-naftolo (4-CN)

3, 3'-diaminobenzidina (DAB)

3,3',5,5'- Tetrametilbenzidina (TMB).

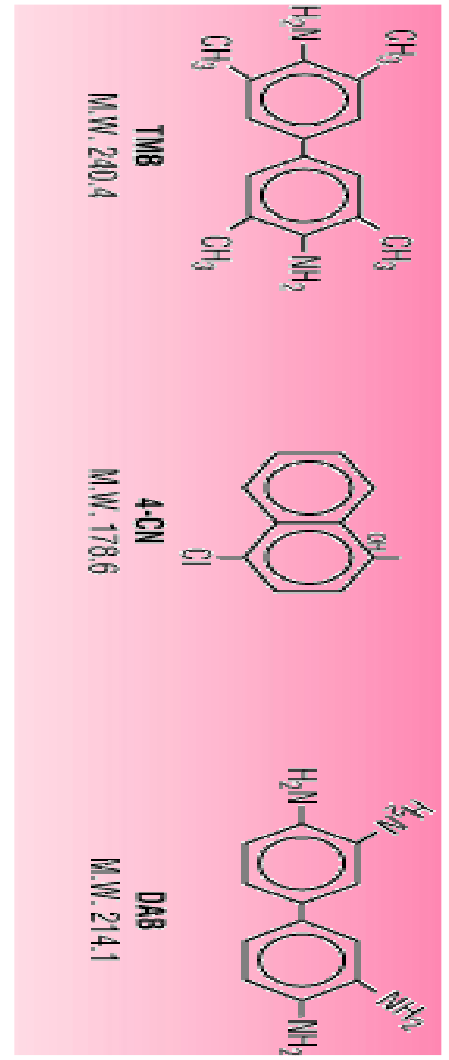
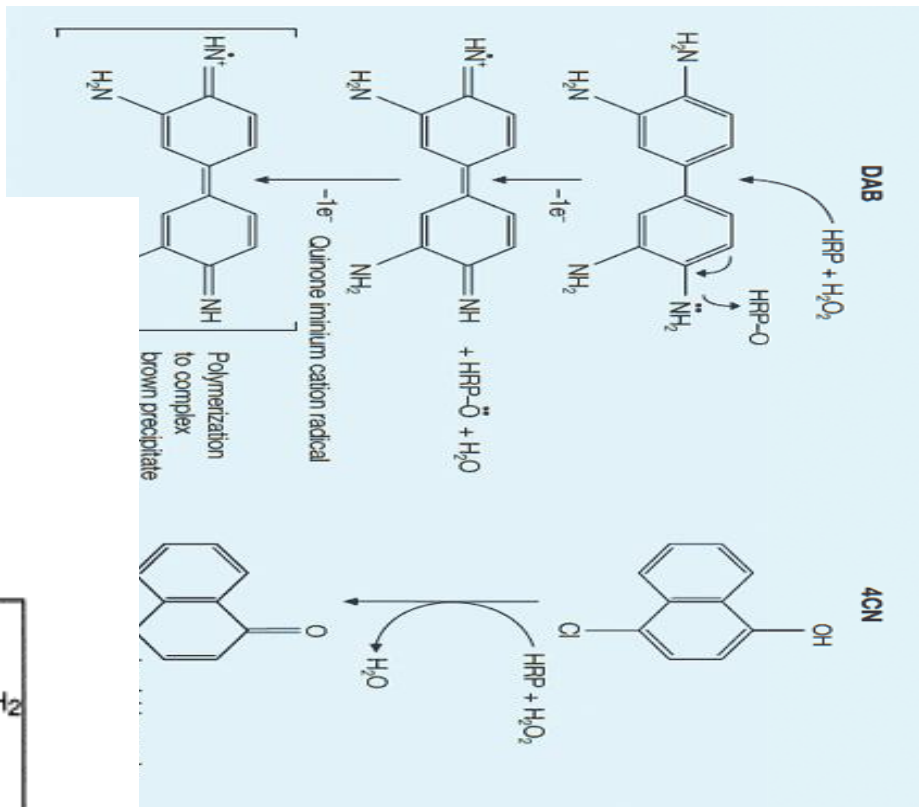
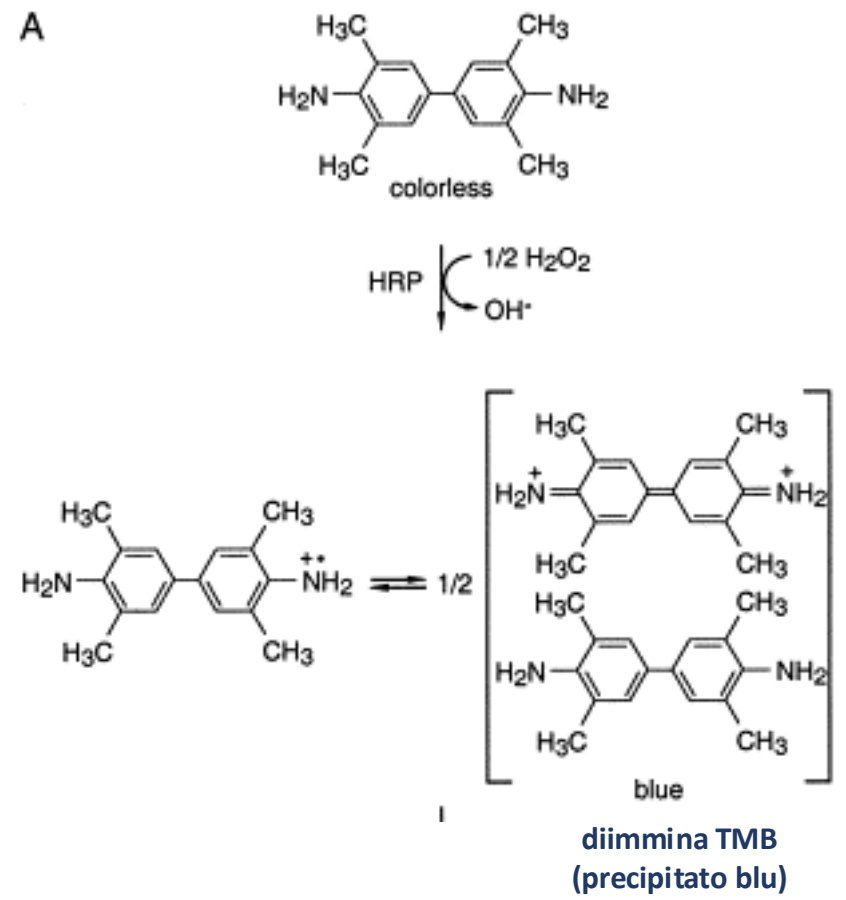
### **Substrati cromogeni per AP:**

la combinazione di 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP®) e nitroblu tetrazolio (NBT)

**Anticorpi marcati con cianine** (emissione in fluorescenza) anziché enzimi.

# Substrati cromogeni per HRP:

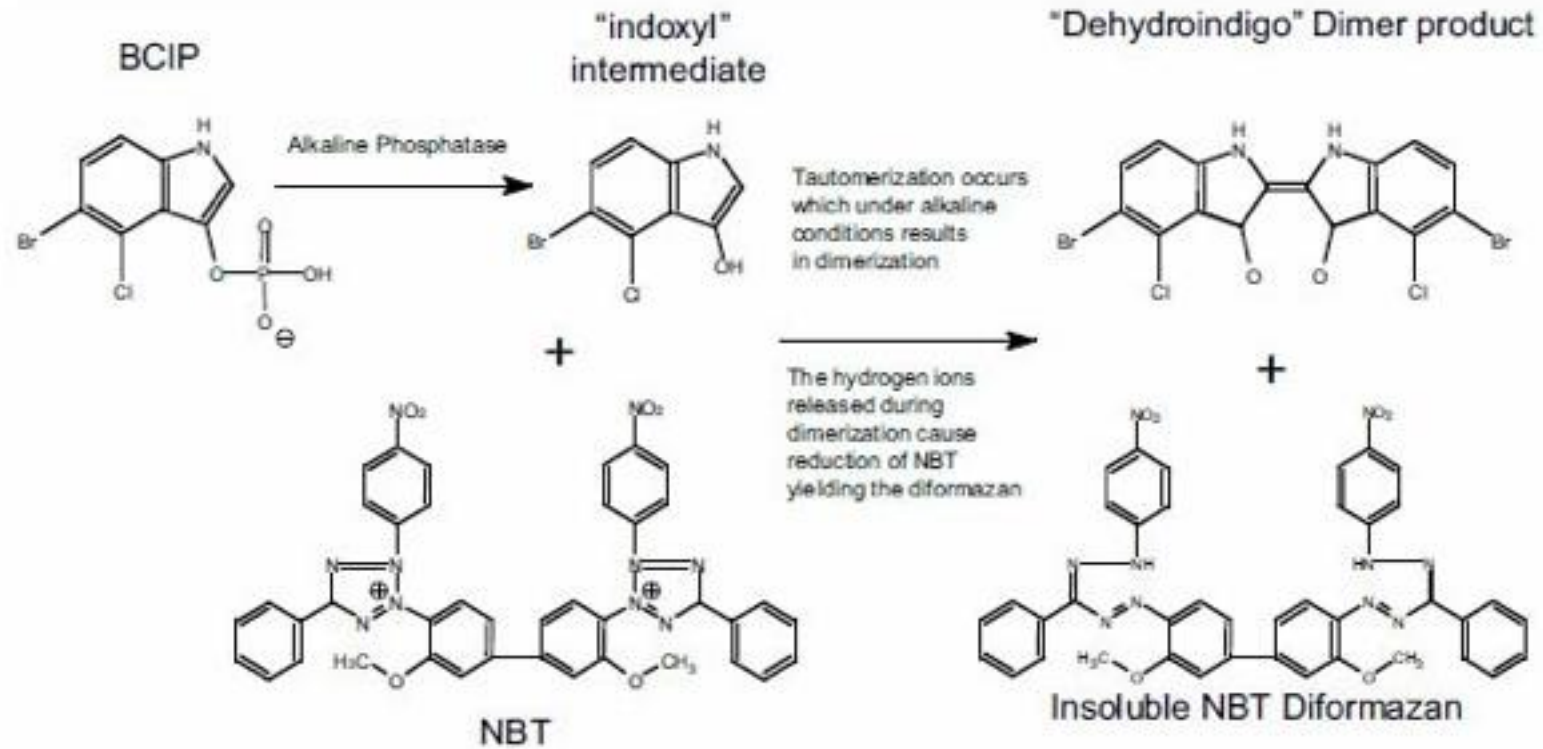
A



Precipitato marrone

4-cloro-1-naftone  
precipitato  
bluastro-viola

## Substrati cromogeni per AP:



Precipitato viola

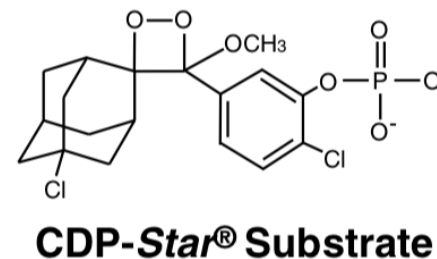
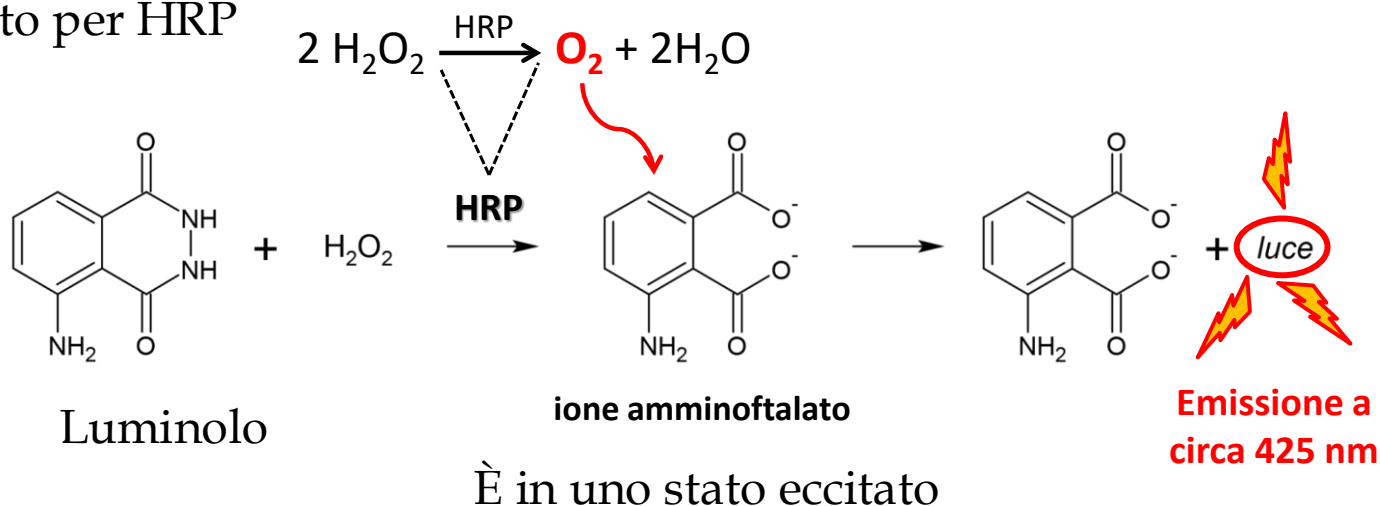
Precipitato blu

# Substrati chemiluminescenti

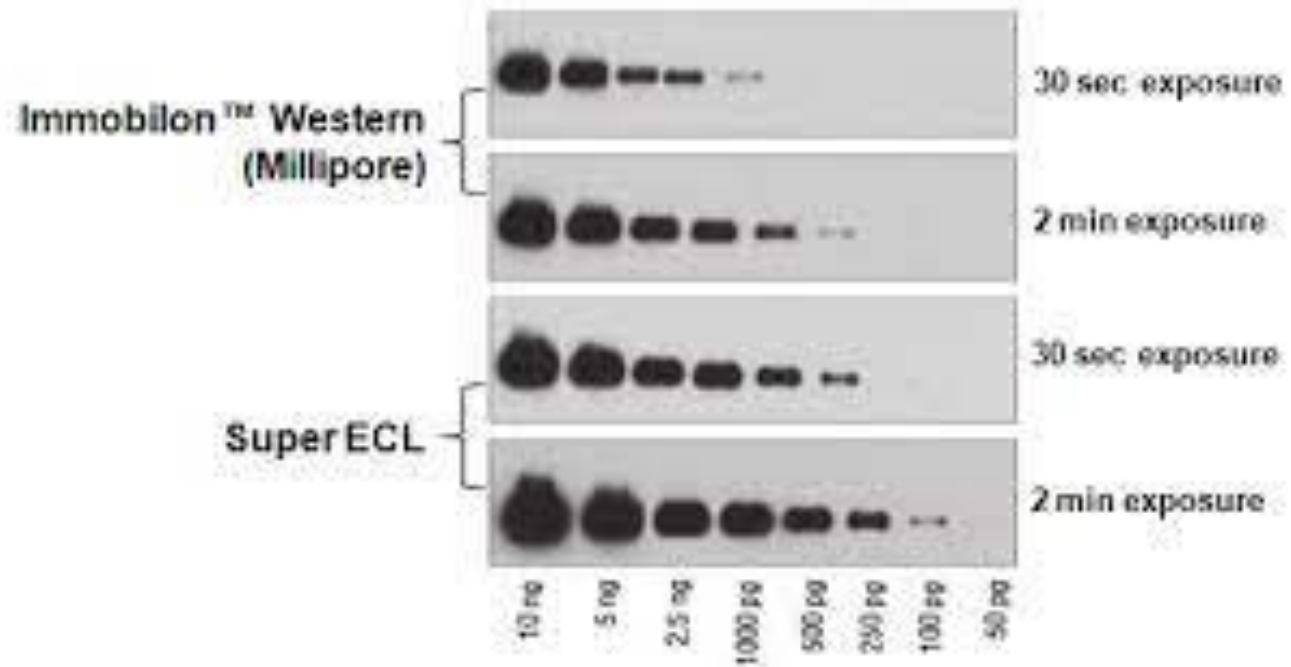
**HRP-luminolo:** In presenza di perossido, l'HRP ossida il luminolo in un prodotto eccitato chiamato 3-amminoftalato che emette luce a 425 nm. L'emissione continua fino a quando il 3-amminoftalato decade ed entra nello stato fondamentale. La luce emessa può essere catturata dalla camera CCD o dall'esposizione alla pellicola a raggi X.

**AP- Sistema CDP-Star®:** CDP-Star® (Disodio 2-cloro-5-(4-metossispiro{1,2-dioxetan-3,2'-(5'-cloro)tricyclo[3.3.1.1<sup>3,7</sup>]decan}-4-il)-1-fenil fosfato) è un substrato chemiluminescente di AP. CDP-Star® è defosforilato da AP per produrre anione fenolato dioxetano meta-stabile che emette luce a 466 nm. La luce emessa è stabile fino a 24 ore consentendo esposizioni multiple a pellicole radiografiche.

Substrato per HRP



## Rilevamento in chemiluminescenza

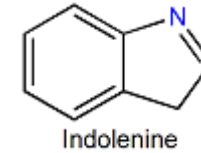


# Cianine

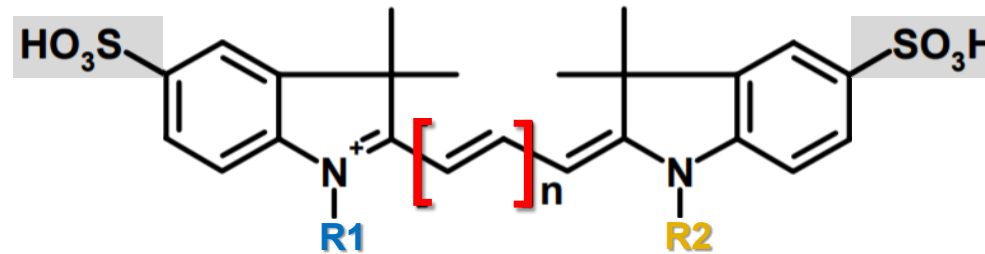
Cy = cyanine

3-5-7 = numero di **atomi di C** presenti tra due gruppi

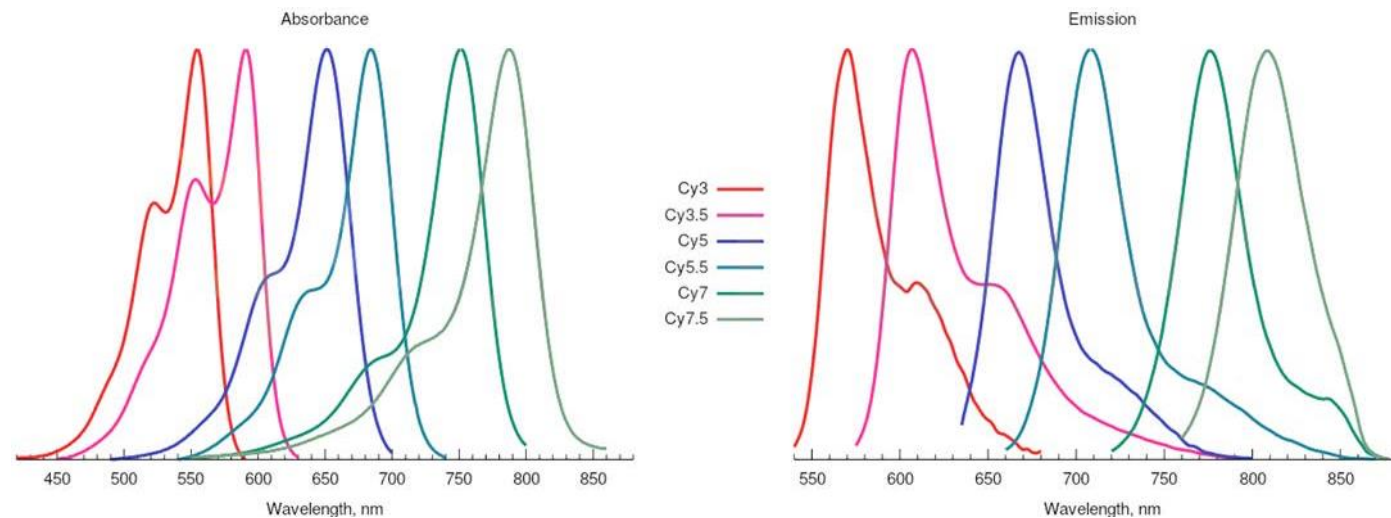
.5 = aggiunta di gruppi benzilici



## Struttura generale di una cianina



## Esempi di spettri di assorbimento/emissione

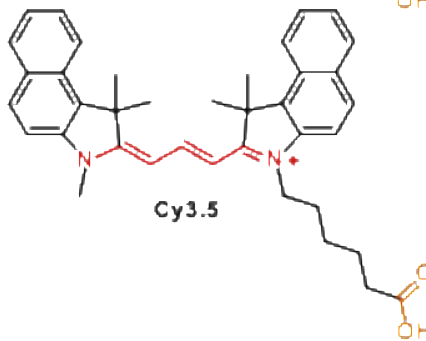
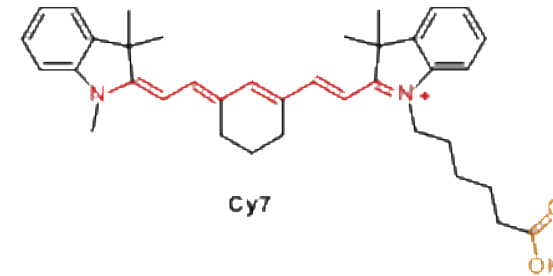
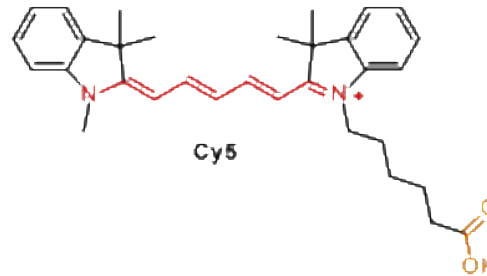
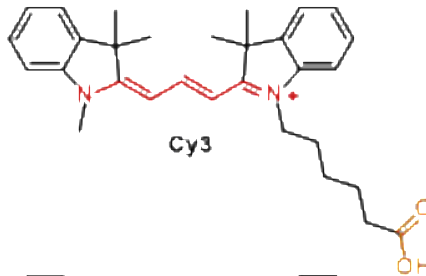
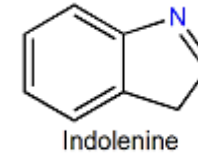


# Cianine

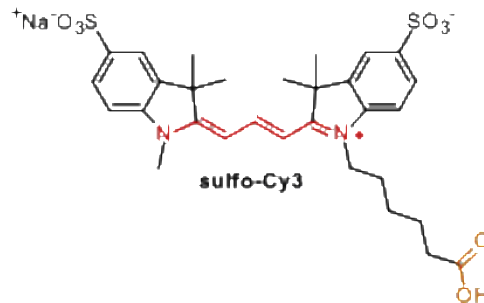
Cy = cyanine

3-5-7 = numero di **atomi di C** presenti tra due gruppi

.5 = aggiunta di gruppi benzilici



Derivati solfonati



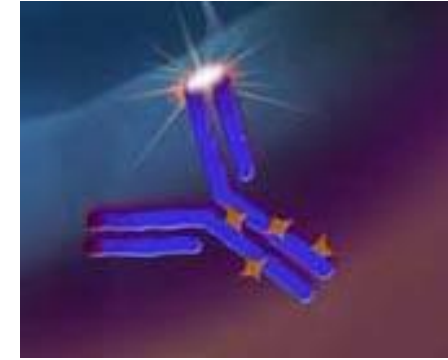
Altri tipi di molecole fluorescenti:

| Alexa Fluor dye | Emission color* |
|-----------------|-----------------|
| Alexa Fluor 350 | Blue            |
| Alexa Fluor 405 | Blue            |
| Alexa Fluor 430 | Green/Yellow    |
| Alexa Fluor 488 | Green           |
| Alexa Fluor 532 | Yellow          |
| Alexa Fluor 546 | Orange          |
| Alexa Fluor 555 | Orange          |

| Alexa Fluor dye | Emission color* |
|-----------------|-----------------|
| Alexa Fluor 568 | Orange/Red      |
| Alexa Fluor 594 | Red             |
| Alexa Fluor 610 | Red             |
| Alexa Fluor 633 | Far Red         |
| Alexa Fluor 635 | Far Red         |
| Alexa Fluor 647 | Near-IR***      |
| Alexa Fluor 660 | Near-IR***      |

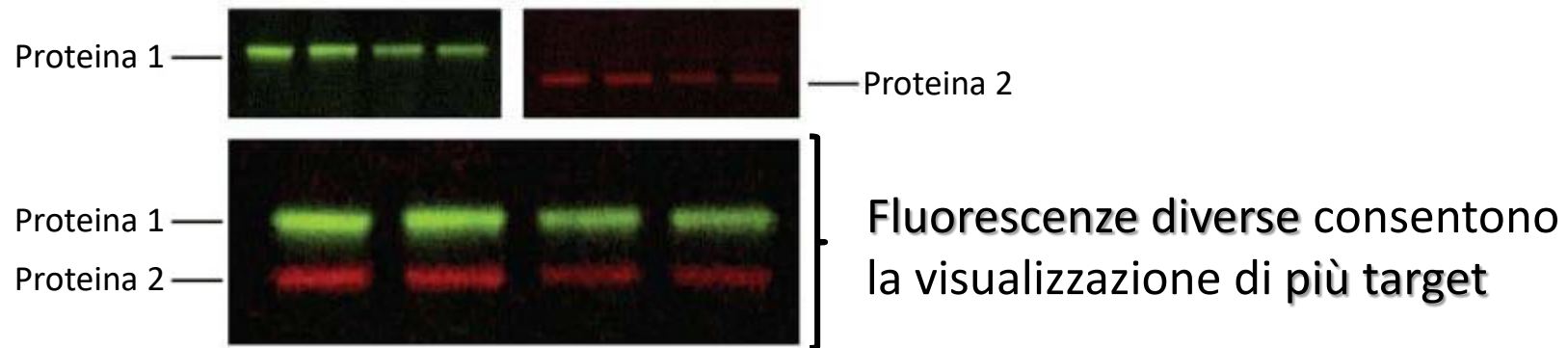
# Anticorpi marcati con cianine

- Adatti al Western Blot.
- Sistema **stabile** per **settimane**.
- **Risparmio** di tempo e denaro.
- Si ottengono **immagini digitalizzate**.



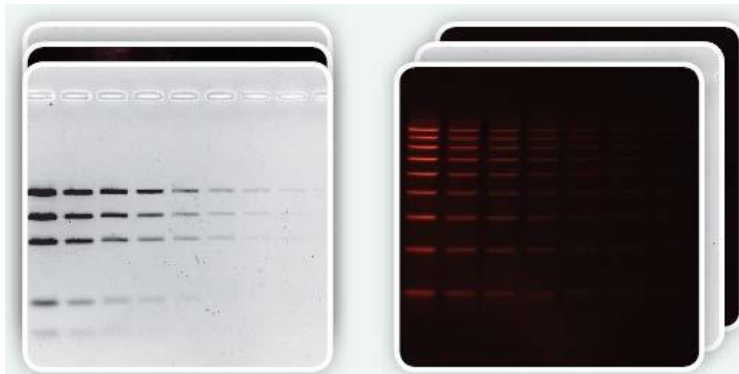
e.....

- No incubazione con substrati o esposizione di lastre
- **Rilevazione** di **target multipli** nello stesso Western Blotting



# Sistemi per Imaging

Opportune combinazioni di  
**lampade e filtri** permettono di  
lavorare nell'**UV**,  
**Visibile**,  
e **IR**.



Intercalanti DNA

## Applications

Chemiluminescence

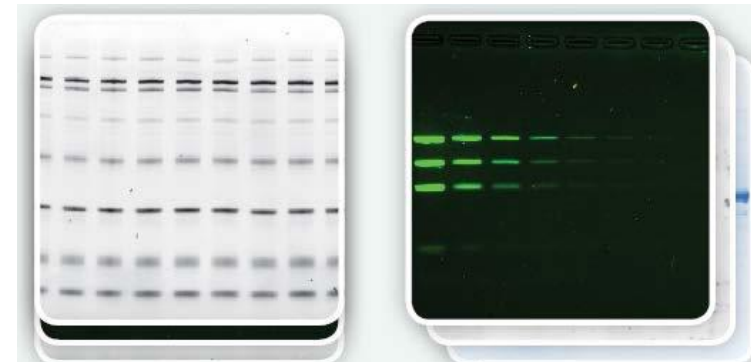
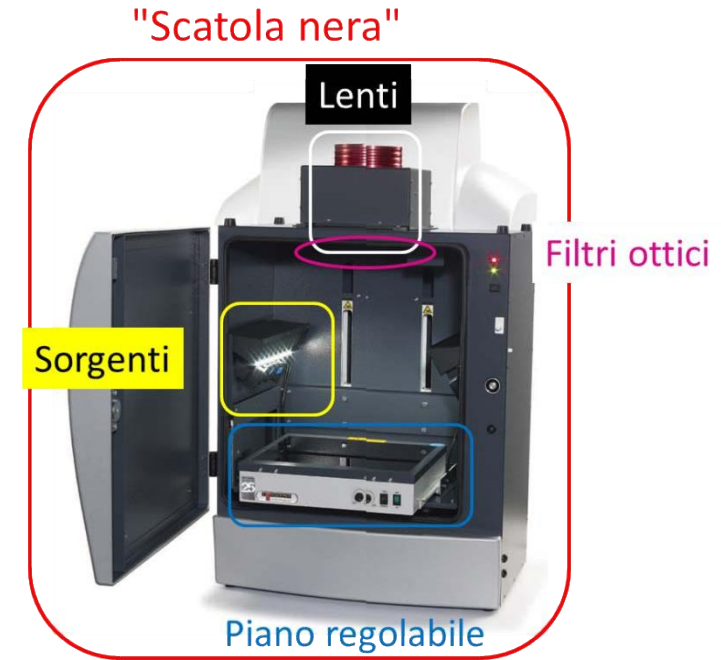
Fluorescence\*

Colorimetry/densitometry

Gel documentation



Blue Coomassie

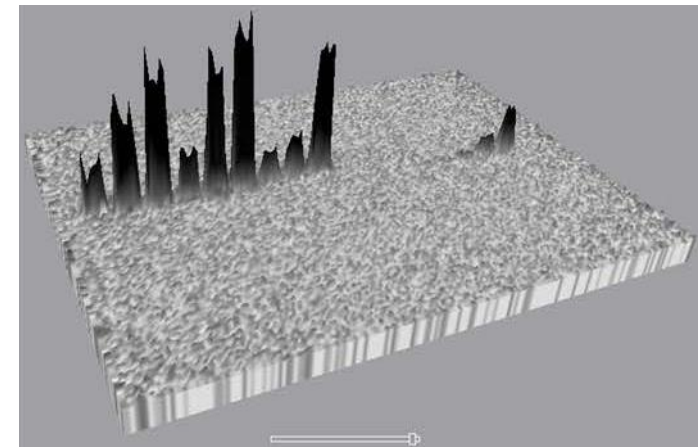
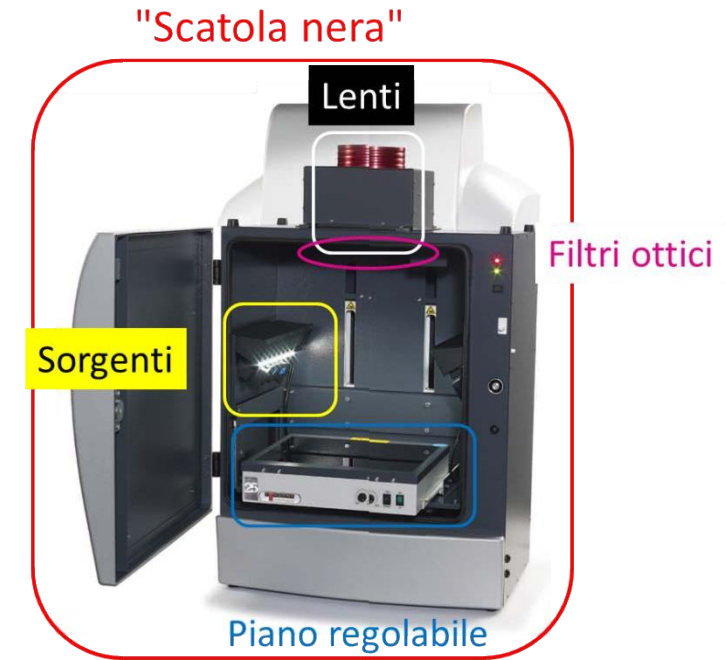
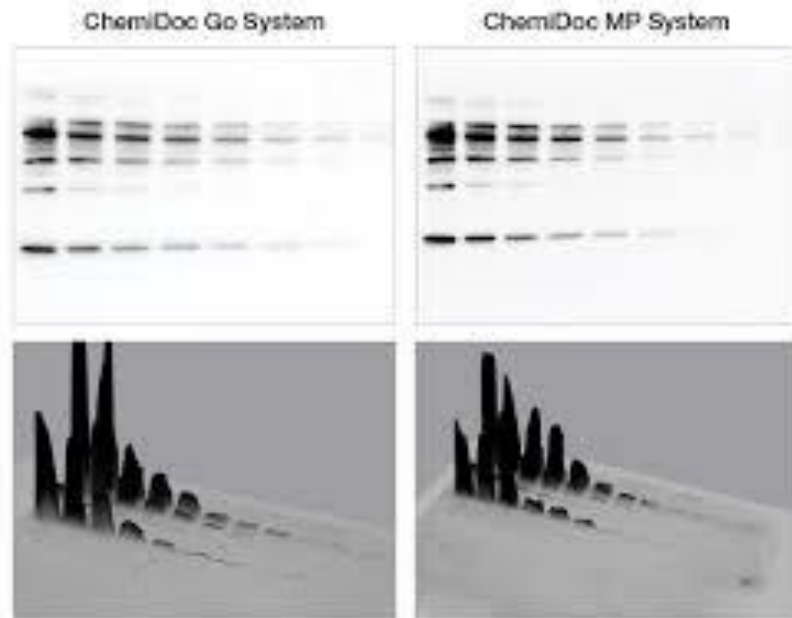


Stain-free

Ab fluorescenti

# Sistemi per Imaging

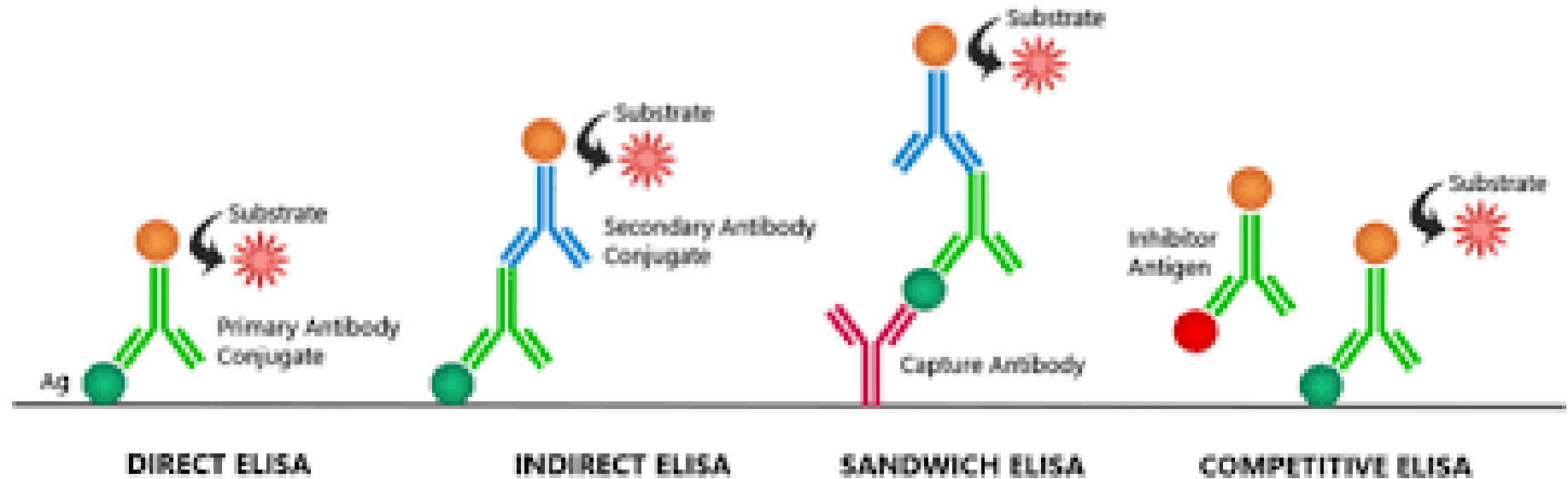
Opportune combinazioni di  
**lampade e filtri** permettono di  
lavorare nell'**UV**,  
**Visibile**,  
e **IR**.



# ELISA

(Enzyme-linked immunosorbant assay)

- ELISA Diretto
- ELISA Indiretto
- ELISA Competitivo
- ELISA a Sandwich



Gli enzimi più comunemente usati sono la perossidasi di rafano, **HRP**, o la fosfatasi alcalina, **AP**.

- I substrati enzimatici dovrebbero essere idealmente stabili, non tossici e poco costosi: substrati non colorati sono convertiti in prodotti colorati (OPD, arancio e TMB, blu).

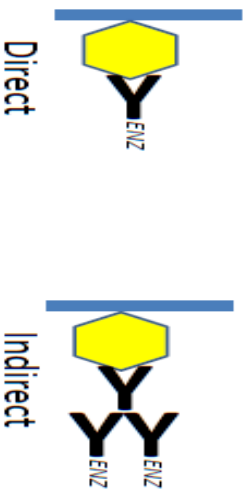
## APPLICAZIONI del SAGGIO ELISA

ricerca di proteine nel plasma, a concentrazioni così basse da non poter essere rilevate ad es. con metodi nefelometrici (basati sulla torbidità):

1. Titolazione della concentrazione anticorpale
2. Screening degli anticorpi monoclonali
3. Test per la rilevazione di anticorpi contro specifici virus (HIV, West Nile Virus, virus epatite..)
4. Test di gravidanza
5. Dosaggio o evidenziazione di potenziali allergeni nell'industria alimentare (latte, nocciole, noci, mandorle, uova)
6. Dosaggio del ferro nel siero, ricerca di ormoni come l'insulina

## TIP I ELISA:

- ❖ DIRETTO (Anticorpo primario marcato)
- ❖ INDIRETTO (Anticorpo secondario marcato)
- ❖ COMPETITIVO DIRETTO
- ❖ COMPETITIVO INDIRETTO
- ❖ DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich) DIRETTO
- ❖ DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich) INDIRETTO



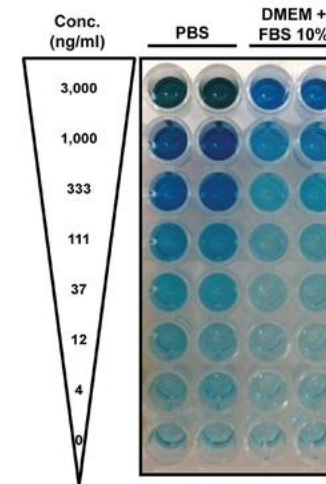
# L'ELISA PUO' ESSERE UNA TECNICA QUANTITATIVA

ELISA: An example of an assay using a 96-well plate.

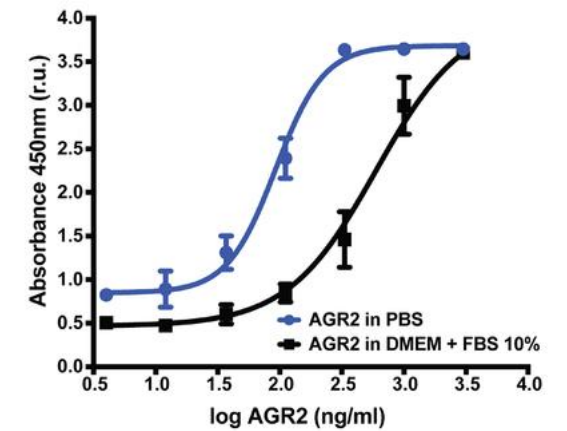


The yellow color indicates that the target protein is present. The higher degree of the color, the higher concentration of the target protein.

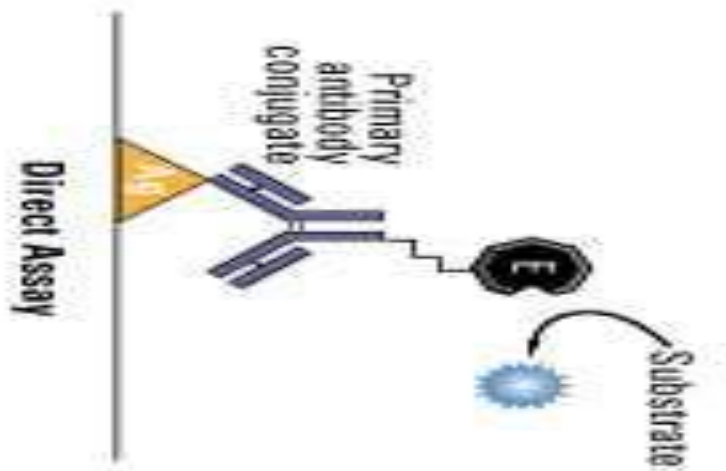
A



B

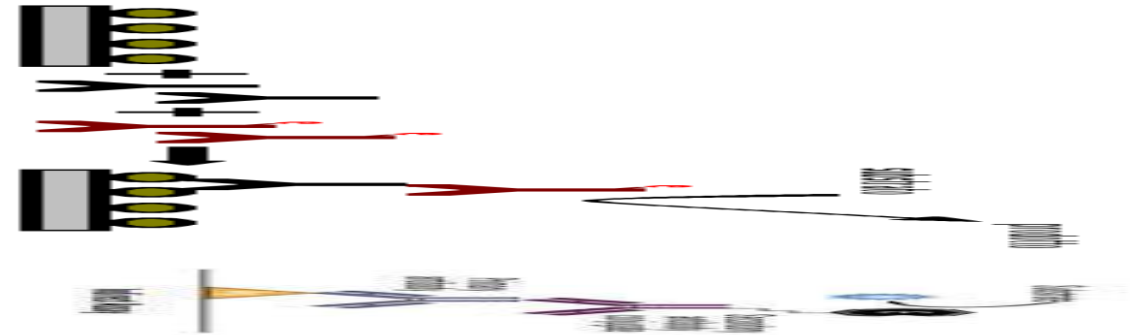


## ELISA DIRETTO



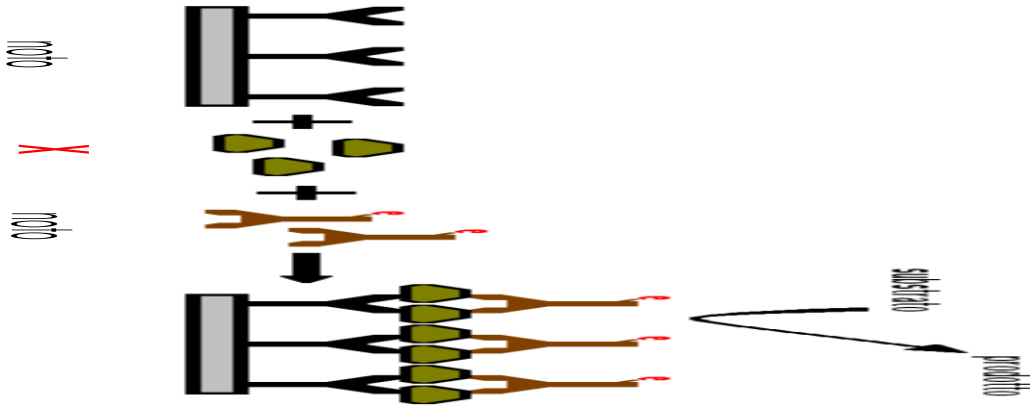
consente di titolare un antigene, è un anticorpo primario che deve essere coniugato con un enzima indicatore

## ELISA INDIRETTO



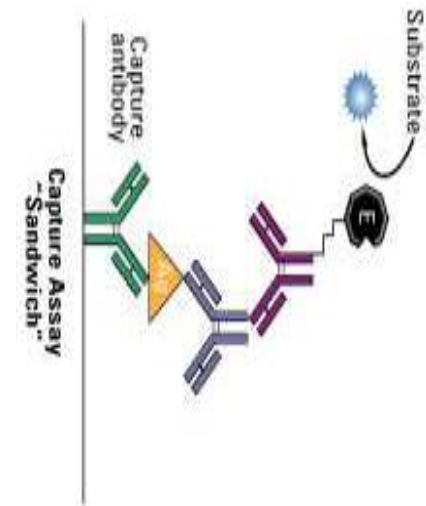
serve per titolare un anticorpo, anziché un antigene. E' l'anticorpo secondario ad essere coniugato all'enzima

## METODO SANDWICH-ELISA (DAS) DIRETTO

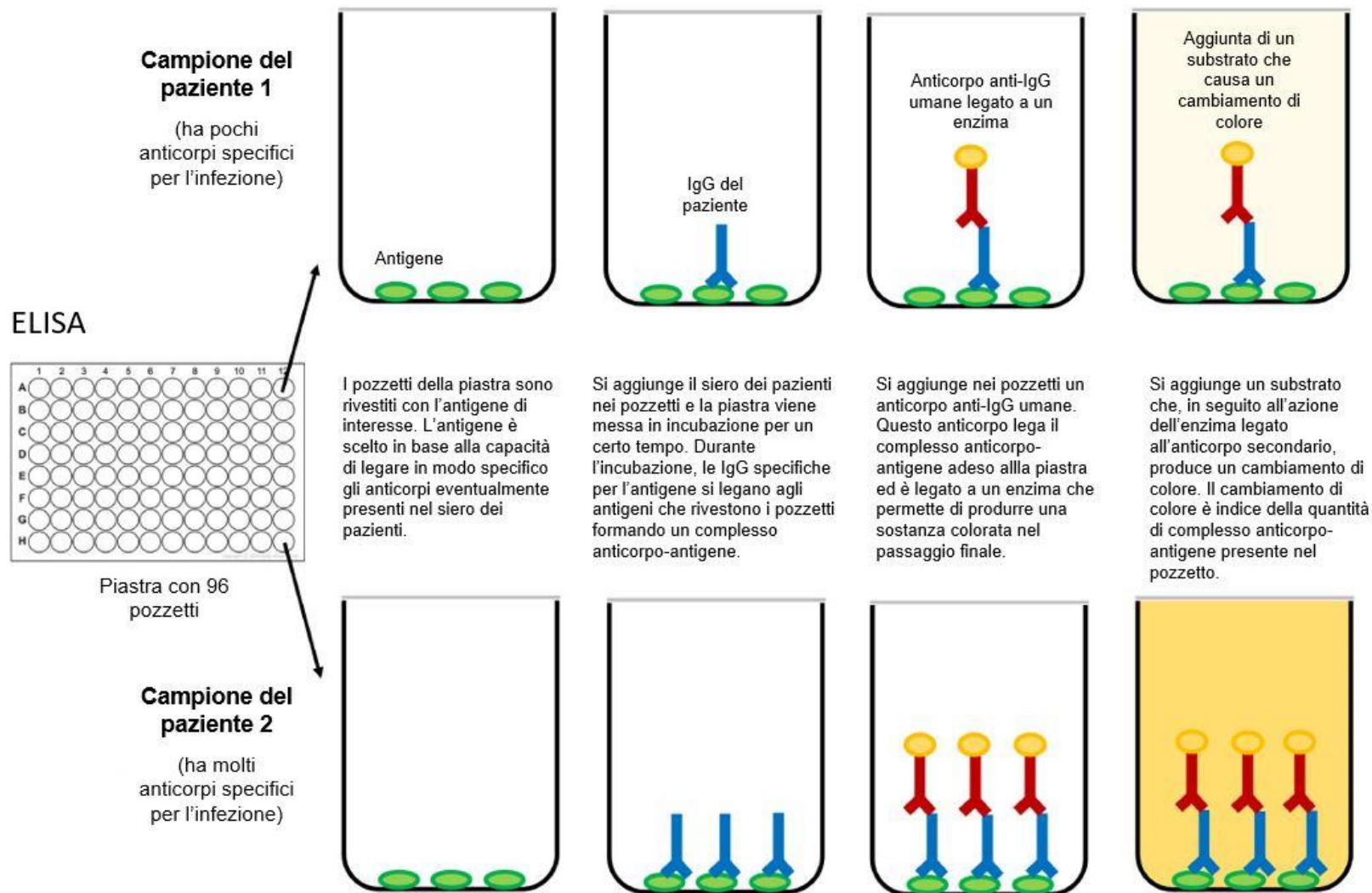


Questa metodica può essere utilizzata esclusivamente quando l'analita possiede almeno due epitopi. La misura del prodotto della reazione enzimatica risulterà direttamente proporzionale alla concentrazione dell'antigene (analita) da stimare.

## METODO SANDWICH-ELISA (DAS) INDIRETTO



In questo metodo, è un anticorpo secondario che deve essere coniugato con un enzima indicatore



Quello illustrato qui sopra è il metodo ELISA indiretto. Altri metodi sono quelli diretto, competitivo e sandwich. Anche se sono progettati in modo diverso, tutti questi metodi usano il cambiamento di colore o l'emissione di fluorescenza per valutare in modo qualitativo o quantitativo gli anticorpi specifici per un antigene o un composto di interesse presenti in un campione di siero.

<https://www.jove.com/v/5061/the-elisa-method?language=Italian>

<https://www.jove.com/t/10496>

# **IMMUNOISTICHIMICA (IHC) e Immunofluorescenza (IF)**

**Tecnica usata per mostrare la presenza di antigeni (per lo più proteine) nella loro esatta localizzazione in sezioni istologiche di tessuti**

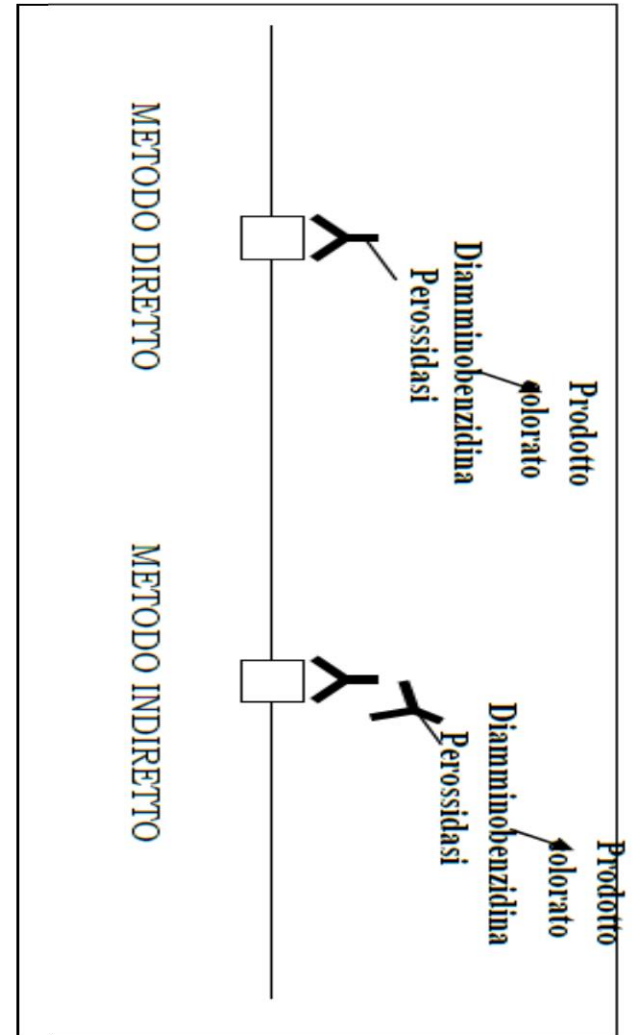
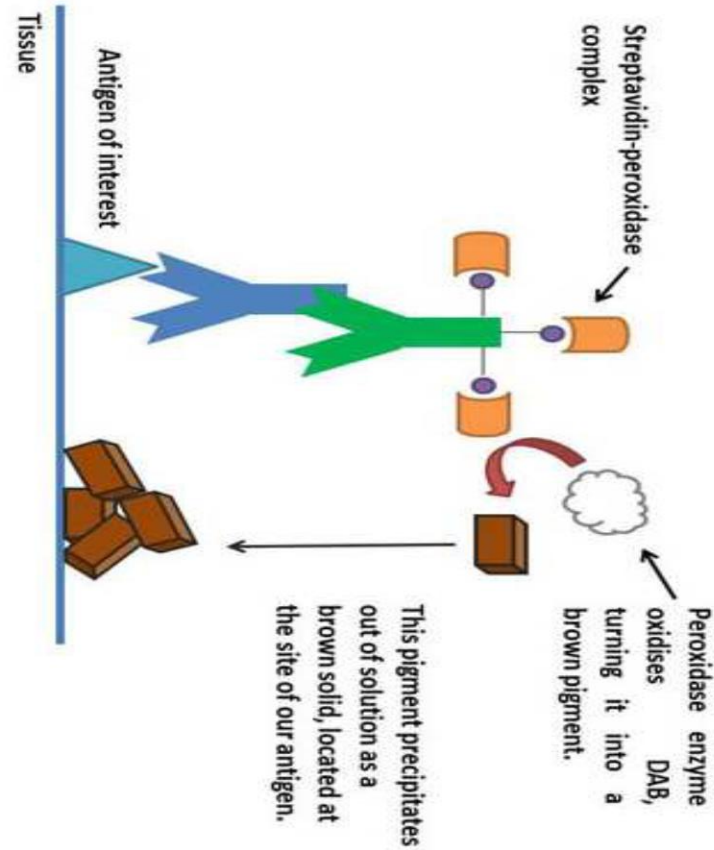
preservandone struttura ed integrità, usando una specifica reazione antigene-anticorpo, ed in cui l'anticorpo è marcato da molte e differenti specie chimiche (essenzialmente enzimi, come HRP o AP, capaci di catalizzare una reazione chimica) o da fluorofori (FITC);

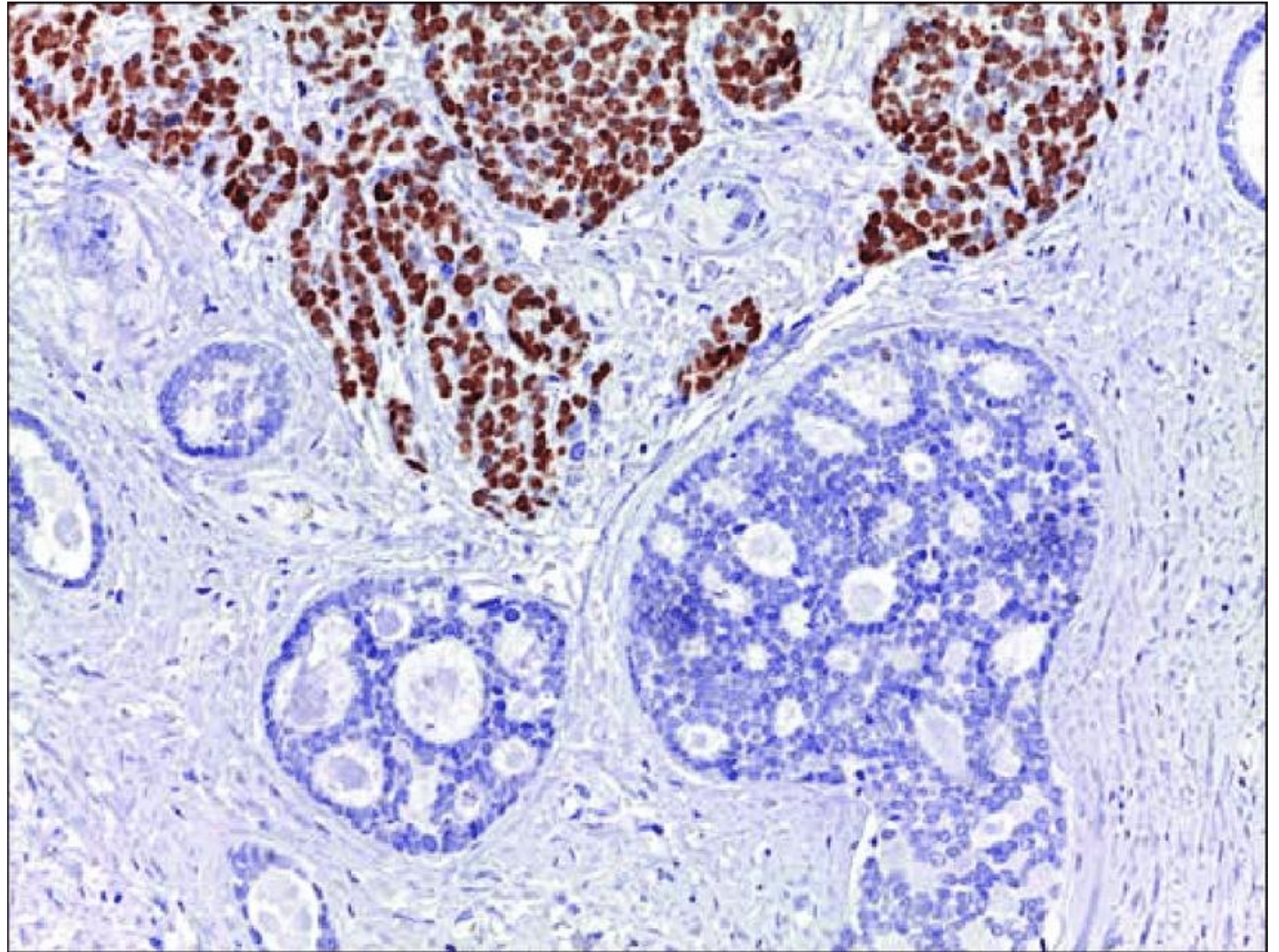
L'immunoistochimica prevede la combinazione dell'immunologia e della microscopia, in quanto il complesso antigene-anticorpo deve essere visibile al microscopio;

Usati anticorpi policlonali e monoclonali.

# APPLICAZIONI (IHC)

- Antigeni tissutali o di superficie cellulare per la diagnosi di patologie autoimmuni
- Markers tumorali
- Tipizzazione tumorale
- Marcatori di differenziamento
- Marcatori agenti infettivi (virus, batteri)





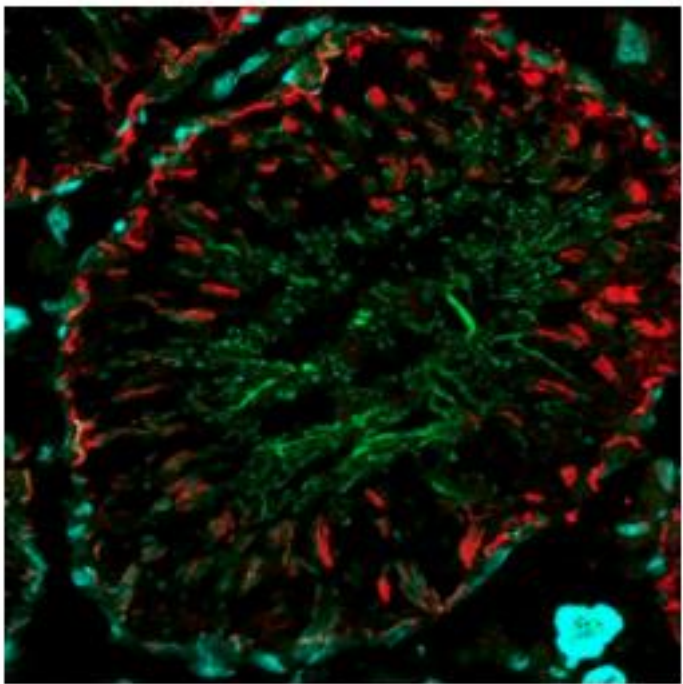
<https://www.researchgate.net/publication/317381124>

# IMMUNOFLUORESCENZA (IF)

Comparison of Immunofluorescence Methods



| Method        | Direct                                                                                                                                       | Indirect                                                                                                                                   | Combined                                                                                                                                                       |
|---------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Example       | Step 1: CF®488A mouse anti-A + CF®568 mouse anti-B                                                                                           | Step 1: Mouse anti-A + rabbit anti-B<br><br>Step 2: CF®488A goat anti-mouse + CF®568 goat anti-rabbit                                      | Step 1: Mouse anti-A + rabbit anti-B<br><br>Step 2: + CF®488A goat anti-mouse + CF®568 goat anti-rabbit<br><br>Step 3: CF®640R mouse anti-C                    |
| Advantages    | <ul style="list-style-type: none"><li>• Rapid single-step staining</li><li>• Can use multiple antibodies from same host</li></ul>            | <ul style="list-style-type: none"><li>• Secondary amplifies signal</li><li>• A few labeled secondaries can detect many primaries</li></ul> | <ul style="list-style-type: none"><li>• Amplify signal for weaker targets with secondaries</li><li>• Stain with multiple primaries from same species</li></ul> |
| Disadvantages | <ul style="list-style-type: none"><li>• No signal amplification from secondary</li><li>• Each primary must be labeled individually</li></ul> | <ul style="list-style-type: none"><li>• Two-step staining</li><li>• Requires antibodies from different hosts</li></ul>                     | <ul style="list-style-type: none"><li>• Multi-step staining</li></ul>                                                                                          |



Combined direct and indirect immunofluorescence staining of rat testis with mouse anti-tubulin and CF®488A goat anti-mouse (min x rat) (microtubules, green), followed by CF®555 Mix-n-Stain labeled mouse anti-ZO1 (tight junctions, red) and CF®640R phalloidin (actin filaments, cyan).