

İmmünofloresans Tekniği

I. Dokuların ve floresans maddelerin hazırlanması.

Dr. Y. Yücel Güngen*

İmmünolojide, serum ve diğer vücut sıvılarındaki antikorların veya doku, hücre ve mikroorganizmalardaki antijenlerin varlığının saptanmasında birçok metodlar kullanılmaktadır. Bunlardan biride, belirli bir madde ile işaretlenmiş antikor kullanılmasıdır. Antikoru işaretlenmesi, radioizotop maddelerle veya florokromlarla yapılabilir. Radioizotop maddeler, daha duyarlı olmaları nedeni ile kantitatif çalışmalarda, florokromlar ise antijen veya antikoru lokalizasyonunu saptamakta geçerlidirler. Son yıllarda işaretleme yöntemine dayanan enzim metodlarında geliştirilmiştir. Bunlardan en geçerli olanı, özel mikroskoplara gereksinme göstermeden izlenebilen enzim peroksidaz metodudur. Ayrıca bu metodla elektron mikroskop seviyesinde çalışılabilmektedir.²¹

Florokromlar: Radyasyon enerjisini emen ve bu enerjiyi değişik uyarılarla özel ışık şeklinde yayabilen maddelerdir. Bu maddelerin uyarı ile görülebilir, özel renkte ışık yaymalarına floresans denir. Florokromların diğer bir özelliğide, üzerlerinde kimyasal aktif grupların bulunması ve bu aktif grupların, proteinlerin serbest amino grupları ile bağlanabilmeleridir. Özellikle isosiyanat ve isotiyosiyanat türevleri, proteinlerle daha kuvvetli birleşim oluşturabilirler. Esasta bir protein olan antikor molekülüde florokromlarla uygun şartlarda ve ortamda karşı karşıya getirilip bağlanabilirse, bu antikor molekülü bağlanan florokrom aracılığı ile görülebilir duruma gelir.¹² İlk defa bu yöntem Coons tarafından 1941 de Beta-Antresen kullanılarak uygulanmış, daha sonra 1950 de aynı araştırmacı tarafından fluorescein ile geliştirilmiştir.^{7,8}

Bugün ise İmmünofloresans metodu, aynı temele dayanılarak klinik ve araştırmada pek çok yönlerde kullanılabilmektedir. Bunları şu şekilde sıralayabiliriz.¹⁰

- 1- Kandaki T ve B hücrelerinin tanımlanması
- 2- Serum otoantikorlarının gösterilmesi ve tanımlanması

* H. Ü. Tıp Fak. Patoloji Bilim Dalı Öğ. Görevlisi.

- 3- Dokularda immünoglobulinlerin gösterilmesi
- 4- Dokularda komplemanın gösterilmesi
- 5- Dokularda, dokuya özel antikorların gösterilmesi
- 6- Doku veya kültürde mikroorganizmaların çabuk ve kesin olarak tanımlanması

7- Özel bağlanma şekillerinde kromozomların tanımlanması

8- Neoplastik dokularda tümöre özgül antijenlerin tanımlanması

9- Çeşitli organlarda transplantasyon antijenlerinin tanımlanması

10- Hormon ve enzimlerin yerleşimlerinin saptanması

11- Serum protein ve antikorlarının miktarlarının ölçülmesi

İmmüno Floresans metodun iyi bir şekilde çalışabilmesi için dört ana bölümün tam olarak uygulanması gerekir.¹⁷

a) Dokuların ve hücrelerin uygun şekillerinin hazırlanması

b) Floresans maddelerin (Antikorların) hazırlanması ve immünolojik karakterlerinin saptanması

c) Boyama metodları

d) Floresans Mikroskop ve Mikrofotografi

Bu makalede bunlardan ilk iki bölümü anlatılacaktır.

Doku ve Hücrelerin Hazırlanması

Antijen, hücre içinde (Derinde veya yüzeye yakın), hücre yüzeyinde ve hücre dışında bulunabilir. Doku ve hücrelerin hazırlanmasında bu duruma göre yapılmalıdır. Antijen hücre içinde ise, antikorun bu antijene erişip, onunla birleşebilmesi sağlanmalıdır. Dokularda bunun için kriostat kesitleri yeterlidir. Hücre süspansiyonlarında, hücre zarı özel yöntemlerle açılmalıdır. Hücre dışı antijenler, kriostat kesitleri ile elde edilebilir. Hücre yüzey antijenleri, oldukça dar bir alanda bulunurlar ve hücreye sağlam tutunmuş olmayabilirler. Bu nedenle kesitlerde ve yaymalarda tam olarak tanımlanamazlar. B Lenfosit yüzey immüno globulinlerinde olduğu gibi böyle durumlarda, canlı hücre süspansiyonları kullanılmalıdır.

İmmüno globulinler, genellikle tespit solusyolarında harabolduklarından, tesbit edilmemiş doku kullanılması tercih edilir. Fakat çözülebilen (Soluble) antijen içeren doku veya hücrelerde antijeni tutmak zor oluyorsa bazı tespit metodları uygulanabilir.²⁰

DOKULARIN HAZIRLANMASI

1- Normal Dokular

Serum antikorlarının gösterilmesi ve tanımlanması için, antijen kaynağı olarak kullanılırlar. Dokular taze olarak alınmalı ve hızlı dondurma metodu ile dondurulmalıdır. Bunun için çeşitli metodlar uygulanabilir.

a) *Karbondioksit (CO₂) + Alkol metodu*: Geniş ağızlı bir termosta, alkol (aseton olabilir), kuru buz (veya CO₂ karı) karışımı hazırlanarak -70°C'ye ayarlanır. Soğuğa dayanıklı bir tüp içine yerleştirilen 0,5 cm kalınlıktaki doku tüp ile birlikte bu karışım içine daldırılır. Alkol tüp içine girmemelidir. Dondurulan doku, aliminyum ile sarılarak, polietilen bir torbaya alınarak -70°C'de saklanır. Dokunun saklanabilme süresi, saklandığı ısı ile ters orantılıdır.

b) *Likit Nitrojen (N₂) + İzopentan metodu*: Doğrudan nitrojene dokuyu daldırmak, nitrojenin düzensiz soğutma özelliği ve içindeki karbarkıklar nedeni ile uygun değildir. Nitrojen ile soğutulmuş izo-pentan kullanılması tercih edilir. Soğuğa dayanıklı cam bir kaptaki izo-pentan, nitrojene alttan değdirilerek soğutulur. İzopentanın donmasına izin verilmemelidir. -160°C civarında olan soğuk izo-pentan içine gömme materyali ile bloklanmış doku daldırılır. Sertleşen blok aynı şekilde saklanabilir. Gömme materyali olarak "Gum Tragaghand" veya "Tissue-Tex OCT Compaund" kullanılabilir. Bu metod, özellikle iğne biyopsileri gibi kesilmesi çok güç küçük dokular için kullanışlıdır. Soğutulmuş izo-pentan aynı zamanda, doku kültürü ve hücre yaymalarında da kullanılabilir.

c) *Karbondioksit (CO₂) metodu*: Daha büyük ve gömme materyali içinde birarada tutulması güç olan birden fazla dokuyu dondurmak için kullanılır. Dokular, serum fizyolojik ile ıslatılmış birkaç kat filtre kağıdı üzerine yerleştirilerek blok halinde karbondioksit karı içine gömülür veya karbondioksit tüpü ucuna takılan özel aygıtlarla dondurulabilir. Dokunun saklanması aynı şekilde olabilir.

2- Patolojik Dokular

Antijenin özelliğine ve durumuna göre, patolojik dokuların hazırlanması farklı yöntemlerle yapılmalıdır.²⁵ Antijen: Çözülmeyen (İnsoluble) ve dayanıklı, çözülebilen (Soluble) fakat membranlar içinde sınırlandırılmış, veya hücre içinde veya dışında ve çözülebilen (Soluble) bir antijen olabilir.

a) *Çözülmeyen ve kolay bozulmayan, sabit antijenler*: Dokuların büyüklüğüne göre, karbondioksit veya soğutulmuş izo-pentan ile dondurup, hiç tespit edilmeden kriostat kesitlerinin kullanılması en uygun yöntemdir.^{17,25,24}

b) *Çözülebilir fakat membran ile sınırlandırılmış antijenler*: Bu durumda (Pankreas zimogen granülleri içindeki ribonukleas veya lizozomal membran antijenleri), yalnızca membranı koagüle etmek antijeni orada tutmak için yeterlidir.¹⁹ Doku, karbondioksit + alkol ile tespit edilir, kriostatta kesilip kurutulduktan sonra 30° % 95 etanol veya fosfat tamponu (PBS) ile hazırlanmış % 10 formalin içinde 15' tekrar tespit edilir. Boyanmadan önce iyice yıkanır.

c) *Çözülebilir antijenler*: Dokular kesilip hücre açıldığında, tespit edilmemiş antijeni yerinde tutmak mümkün olmayabilir. Bu durumda, yani hücre daha önce tesbit edilmediyse, kesitlerde tesbit yetersiz kalabilir. Çünkü, antijenin çözülme hızı, tespit yolma hızından fazladır. Bu antijeni, hücre kesilmeden yerinde tespit etmek gerekir. Doku alkollerden geçirildikten sonra parafin veya selloidine gömülebilir.²³ Ancak antijenin bu yöntemi kullanabilmek için tespiti ve gömme materyaline dayanıklı olması lazımdır. Bu nedenle tespit solusyonunun antijenin determinantlarını bozmayan ve çöktürmeyi sağlam tutacak özelliklere sahip olması gerekir.^{25,9} Antijenik etkiye tesiri çok az olduğu için etanol, metanol, aseton ve iso-propanol tercih edilen tespit solusyonlarıdır. Bazı protein yapısındaki antijenler için, paraformaldehitten taze olarak hazırlanmış % 2 glutraldehit, polisakkarit yapısında ve küçük moleküllü protein antijenler için ise (Hipofiz hormonları ve lizozomlar) daha yüksek yoğunluktaki aldehitler kullanılabilir. Pankreatik enzimler, dioksan + % 3 formaldehit eşit oranda karışımına oldukça dirençlidir.

HÜCRELERİN HAZIRLANMASI

Hücrelerin hazırlanması süspansiyon halinde veya yaymalarda çeşitli metodlarla yapılabilir.^{20,11,13,4} Canlı hücre süspansiyonlarında yalnız membran yüzey antijenleri incelenebilirler. Çünkü antikolar canlı hücre içine pasif geçme (Penetrasyon) yapamazlar. Ancak pino-sitozis ile girebilirler ki, canlı hücrede pinositozis söz konusu olamaz. Test uygulanması sürecinde hücre ölürse, antikor hücre içine girerek non-spesifik boyanmaya sebep olur. Bu nedendir ki, canlı hücre ile çalışılırken tesbit solusyonu kullanılamaz. Canlı olmayan hücrelerin yaymalardan yıkanma esnasında dökülmesini önlemek için, % 0,1 Jelatin veya serum albumin kullanılır.

Hücrelerle çalışma pekçok nedenlerle yapılabilir. Bu gün en çok geçerli ve pratik değeri olanlar: Lenfosit yüzey antijenlerinin gösterilmesi ve standardize edilmiş virüs materyali ile serumda anti-virus antikorlarının araştırılmasıdır.¹⁷ Virüse uygun doku kültürü, yuvarlak lamelde üretilerek standart virüslerle infekte edilir. Belirli üreme periodu sonunda sitopatolojik belirtiler başlamadan lamel alınarak yıkanır. Aseton ile -60°C de tesbit edilerek kurutulur. Bu preparatlar, aktivasyonunu kaybetmeden oda sıcaklığında bir yıl saklanabilir. İlk olarak gebeletin serumunda Anti-rubella antikorlarının araştırılması için kullanılan bu metod çeşitli virüs-hücre kombinasyonları aracılığı ile değişik amaçlarda uygulanabilir.

Poliomiyelitis(I-II-III)	için MRC-5 Fibroblast, Maymun Böbreği Hep-2 Cells
Rubella	için LLC-MK II Cells
Measles	için MRC-5 Fibroblast
SV 40	için BSC-I ve MRC-5 Fibroblast Hep-2 Cells

FLORESANS MADDELERİN HAZIRLANMASI VE İMMÜNOLOJİK KARAKTERLERİ

Floresans maddeler, aranılan antijene karşı hazırlanmış antikorlar ile bağlanırlar. Bu antikorlar, antijene karşı hazırlanmış özel antikorlar olabileceği gibi, antijen ile kompleks yapabilen serum antikorlarına karşı hazırlanmış, gamma globulinlerde olabilir. Doğrudan antijene, veya serum antikorlarına karşı hazırlanan anti-serum konjugesi (Florokrom ile bağlanmış anti-serum) iki temel özelliğe sahip olmalıdır. Birincisi istenilen özellikte ve kuvvetli antikor aktivitesi bulunmalı, ikinci olarakta florokromla bağlanabilme kapasitesi yüksek ve spesifik olmasına rağmen istenmeyen floresansın az olması gerekir. Bu bakımdan, anti-serumun seçilmesi önemlidir. Anti-serum, iyi presipitin cevabı veren, tavşan, koyun, keçi gibi hayvanlardan hazırlanmalıdır.^{17,26} Ayrıca anti-serumun kuvveti en az kapiller tüp presipitin testi veya çift diffüzyon agar testi ile kontrol edilmeli, buna ilâveten immunoelektroforez ile spesifitesi ölçülmelidir.²⁶ Kullanılacak florokromunda, proteinlerle iyi bağlanabilmesi ve yaydığı ışık ile kolayca tanımlanabilmesi gerekir.

1- Bağlanma (Konjugasyon)

a) *Globulinlerin Hazırlanması*: Serum proteinleri, total olarak florokromlarla çok kolay bağlanabilirler, Ancak İmmünglobulinlerin bağlanabilme kapasitesi, albumin, alfa ve beta globulinlerden daha yavaş ve azdır.^{25,29} İmmüfloresans metodda kullanılacak antikor ise non-

antikor proteinlerden arınmış, yüksek kalite ve saflıkta bulunmalıdır. Albumin, alfa ve beta globulinler, elektrostatik bağlanma kapasitelerinin fazlalığı nedeni ile diğer doku proteinleriyle (negatif şarj yaparak) bağlanmaya sebep olurlar. Bu durumda çok yüksek yoğunlukta non-spesifik boyanmaya yol açar. Antijene karşı serumda bulunan antikorun, içinde bulunduğu globulin fraksionu mutlaka diğerlerinden ayrılmalıdır. Çoğunluklada bu antikor, İmmünglobulinlerin G bölümü içindedir. Fakat antikor aktivitesi diğer bir bölümde ise, o bölümünde ayrılması mümkündür.

İmmünglobulinlerin ayrılması çeşitli metodlarla yapılabilirse, pratik olarak laboratuvarında önce nötral tuzlarla çöktürmek, sonrada kromatografik süzme ile fraksionlarına ayırmak en uygun yoldur. Çöktürmede, Amonyum Sülfat değişik yoğunluklarda kullanılarak oldukça saf bir globulin elde etmek mümkündür.^{17,30} Çok daha saf globulin isteniyorsa, daha uzun süren fakat hassas metodlar kullanılmalıdır.¹ Ayrılmış olan globulin daha sonra DEAE Sellulose veya DEAE Sefadex A 50 (Med. Gr.) ile fraksionlarına ayrılır.²⁷

PBS ile eşitlendirilerek kolona yerleştirilen globulinlerin genellikle yavaş süzme derecesindeki ultrafiltrasyonları, istenilen saflığı verir. Burada dikkat edilecek nokta, anti-serum için kullanılan hayvanın, IgG fraksiyonunun özelliğidir. Florokromlarla optimal bağlanma gücü en fazla olan ve kuvvetli presipitasyon potansiyeline sahip bulunan IgG fraksiyonları, hayvanların cinsine göre değişebilir. Meselâ: koyunlarda yavaş ve hızlı IgG ler, pasif hemaglutinasyon ile eşit titrasyon verdiği halde, presipitasyon aktivitesi yalnız hızlı fraksionda görülebilir.²⁷ İmmünofloresans için, boyanmanın kuvvetli olması presipitasyon aktivasyonu ile orantılıdır. Koyunların tersine bu presipitasyon, tavşan ve beygirlerde, yavaş IgG fraksiyonlarındandır.¹⁷

b) Bağlanma reaksiyonları: Floresans yayımının fazla olması, parlak yeşil rengi ile otofloresanstan kolay ayrılabilmesi ve isotiosianat derivelerinin proteinlerle kolayca bağlanabilmesi nedenleri ile, günümüzde tercih edilen ve en çok kullanılan florokrom, Florescein isothiocyante'tır (FITC). Kırmızı rengi ile iyi kontras veren rodamin, çift boyama tekniklerinde, kullanılan ikinci florokromdur. En uygun derivativesi, TetramethylRhodamine Isothiocyante (İzomer-R)tır.

Fluorescein (FITC)

FITC + protein bağlanması, iki şekilde yapılabilir.

FITC sudaki solusyonu: Boya moleküllerinin her bir protein molekülüne bağlanma oranı (F:P) ortamın ısı ve reaksiyon zamanı ile ilgilidir. +4°C de 18 saatte tamamlanan bağlanma, oda sıcaklığında 1-2

saatte elde edilebilir.¹⁸ Yüksek oranda F:P elde etmek için, karışıma konulan florokrom ile proteininde fazla olması gerekir.²⁷ FITC solusyonu, 1mg/ml olmak üzere 0,15M Sodyum fosfat monobazik ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) $\text{PH}=9$ ile taze olarak hazırlanır Globulin üzerine, her 100 mg protein için 1 ml FITC solusyonu eklenir. Bağlamanın olabilmesi için, globulindeki protein yoğunluğu en az 25 mg/ml bulunmalıdır. İşlem süresince karışımın PH sı, 0,1M $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ile 9,5 da sabit tutulmalıdır. Ortalamda kalan fazla FITC, Sefadeks G-25 ile kolay ayrılır.²⁷

Kristal FITC: 10 mg/ml protein içeren % 10 Salin Karbonat tamponu hazırlanır. (5,8 ml, % 5,3 lük Na_2CO_3 + 10 ml, % 4,2 lik NaHCO_3 $\text{PH} = 9,5$). Sonra, 20-40 mg/mg olacak şekilde FITC (Kristal) eklenir. 1-2 saat kadar rotator ile oda sıcaklığında, yavaş bir şekilde karıştırılır.²⁷

Rodamin (İzomer-R):

Bu maddede; amorf toz ve saf kristal olarak iki şekilde olur. Buna göre, Fluorescein (FITC) ile aynı şekilde, iki ayrı metodla bağlanma yapılır. Tek fark, daha düşük protein yoğunluğunda daha iyi sonuç vermesidir. 4 mg/ml protein yoğunluğundaki globulin solusyonu, bağlanma için yeterli olup, her 1 mg proteine karşılık 30 mg amorf toz veya 12,5 mg kristal İzomer-R hesaplanır.² Reaksiyonun zamanı: Amorf toz için, 0°C lik buzlu su banyosunda 1 saat, Saf kristal şekli içinse + 4°C de 3,5 saattir. Amorf toz suda eriyebildiğinden, konjugenin temizlenmesi kromatografi ile kolayca yapılabilir. Saf kristal şekli suda erimez. Bu nedenle asetondaki solusyonu kullanılır. Amorf toz şeklinde olduğu gibi yabancı protein bağlanması yüklenmediğinden, konjugenin temizlenmesinde kromatografiye ihtiyaç yoktur.

2- Konjugenin temizlenmesi

Yukarıda tariflendiği gibi hazırlanan konjuge anti-serum, henüz kullanılmaya hazır değildir. Bağlanmamış serbest veya aşırı bağlanmış boyaların (Florokromun), nonspesifik boyanmaya neden olmaması için, ortamdan temizlenmesi gerekir. Temizlemede, DEAE Cellulose, Sefadeks (G25,G50) ile ultrafiltrasyon^{17,27,22} veya absorpsion¹⁵ metodları kullanılabilir.

3- Konjugenin değerlendirilmesi

Konjuge, kullanacak kişi tarafından veya ticari satılan şeklindedir hazırlanmış olsa kullanılacak metoda göre uygunluğu mutlaka saptanmalı ve değerlendirilmesi yapılmalıdır.⁶ Bu değerlendirme iki bölüm halinde yapılmalıdır.

a) Konjugenin Fiziko-Kimyasal Özellikleri saptanmalıdır.

– İmmünelektroforez ile, konjugenin içinde bulunan spesifik antikor miktarı ve cinsi bulunmalıdır.³

– Florokrom: Protein (F:P) oranı saptanmalıdır. Florometrik olarak hem florokromun hem de proteinin optik dansitesi bilindiğine göre elektrospektroskopik metod kullanılabilir. F:P oranı 1,5 dan düşük bulunursa, zayıf bağlanma, 1,5 dan yüksek olursa aşırı bağlanma kabul edilir. Bu durumlarda yetersiz veya aşırı boyanmalar görülür.^{5,14}

– Temizlenmemiş serbest florokromun ve bağlanmamış istenmeyen proteinlerin, konjugeden temizlenmesi lâzımdır.¹⁵

b) Konjugenin çalışabilirlik (Performance) incelenmesi yapılır.

Hazırlanan veya satın alınan konjugenin, optimal çalışabildiği sulandırılma seviyesi bulunmalıdır. Serum paraproteinleri, standart immünokimyasal metodlarla saptanmış myelomalı vakalardan hazırlanan kemik iliği preparatları kullanılarak, ilik hücrelerinin floresan boyaması ile, anti-immünglobulin spesifikitesi yapılır.²⁸ Burada dikkat edilecek nokta, preparatların tek bir immünglobulin fraksionunda değil, değişik fraksionlarda ve çeşitli titrasyonlarda yapılmasıdır. Ayrıca indirekt metod için çalışabilirlik incelenmesi, Anti-Nükleer Antikor (ANA) titrasyonu bilinen ve DEAE Cellulose metodu ile ayrılmış değişik immünglobulinlerde, bulunan Sistemik Lupus (SLE) serumları veya Heterofil antikor içeren Enfeksiöz Mononükleoz (EM) serumlarında yapılır.¹⁶ Konjugenin direkt boyamalarda, boyayabilme hassaslığı, indirekt boyayabilme hassaslığından 5-10 kez daha zayıftır. Diğer bir değişle, indirekt boyamada konjugenin optimal sulandırılma noktası 1/50 ise, bu konjugenin direkt boyayabilme kapasitesi ancak 1/5 veya 1/10 dur.⁶

c) Konjugenin tesir kuvveti bulunmalıdır.

Nonspesifik boyanma problemlerinin çoğu, konjugenin PBS ile sulandırılması (Dilasyonları) ile ortadan kaldırılabilir. Kuvvetli ve iyi bir konjugenin, minimal dilusyonda nonspesifik boyama özelliğini kaybetmesi, buna karşılık yüksek dilasyonlarda spesifik boyama kapasitesini taşıması beklenir. Bunun için standart birimleri verilen ANA serumları ile (Dünya Sağlık Örgütü-WHO- ANA-IOO IU Sera) blok titrasyonu yapılır.^{17,25}

Bütün bu işlemler tam olarak uygulandıktan sonra, hazırlanmış olan dokular ve konjuge artık kullanılmaya hazırdır.

Özet

İmmunofloresans tekniğini klinik ve araştırmada kullanıldığı yerler ve uygulamada yapılması gereken yöntemler anlatıldı. Bu bölümde bu yöntemlerden, normal ve patolojik dokuların hazırlanmasında dokunun cinsine, antijenin çözülebilirlik karakterine göre dondurma ve tesbit metodlarından uygun olanları belirtildi.

Canlı ve cansız hücrelerin kullanıldığı metodlar, uygun globulinlerin hazırlanması, FITC ve Rodaminin proteinlerle bağlanması, bağlanan proteinin temizlenmesi ve çalışabilirlik değerlendirilmesinin yapıldığı uygun metodlar pratik olarak anlatılmaya çalışıldı.

Summary

Methods and applications of the immunofluorescence techniques in research and clinical fields have been discussed. In this section, preparation of normal and abnormal tissues were described. Choice of methods for freezing and fixation depending on the type of tissue and the solubility of the antigen were also given. Other special techniques such as methods utilizing viable and dead cells, binding of FITC and rhodamine to proteins, purification, testing and quality control of the bound protein were briefly described.

KAYNAKLAR

1. Akiyoshi, K. Jr.: Fluorescent Antibody Techniques and their Applications, Univ. Tokyo Press (Tokyo), Univ. Park Press (Baltimore and Manchester), 1969, s: 22.
2. Amante, L., Ancona, A., and Forni, L.: The conjugation of immunoglobulins with tetramethylrhodamine isothiocyanate. A comparison between the amorphous and the crystalline fluorochrome. J. Immunol. Methods. **1**: 289, 1972.
3. Beutner, E. H., Wick, G., Sepulveda, M., and Morin, K.: Standardization in Immunofluorescence: Ed. by E. J. Holborow, Blackwell Scientific Pub. (Oxford, Edinburgh), 1970, s: 165.
4. Beutner, E. H.: Defined Immunofluorescent staining: Ann. N. Y. Acad. Sci. **177**, 1971.
5. Brighton, W. D., and Johnson, E. A.: Defined immunofluorescent staining. Ed. by E. H. Beutner. Ann. N. Y. Acad. Sci. **177**: 501, 1971.
6. Characterization of antisera as reagent: Recommendations made by the MRC Working Party on the clinical use of immunological reagents. Immunology. **20**: 3, 1971.
7. Coons, A. H., Creech, H. L., and Jones, R. H.: Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. Prog. Soc. Exp. Biol. (N. Y.) **47**: 200, 1941.
8. Coons, A. H., and Kaplan, M. H.: Localization of antigen in tissue cells II. Improvements in a method for the detection of antigens by means of fluorescent antibody. J. Exp. Med. **91**: 1, 1950.

9. Engelhardt, N. V., Gousser, A. I., Shipora, L. J., and Abeler, G. I.: Immuno-fluorescent study of alpha-fetoprotein in liver and liver tumours. I. Technique of afp localization in tissue sections. *Int. J. Cancer*, **7**: 198, 1971.
10. Fudenberg, H. H., Stites, D. P., Coldwell, J. L., and Wells, J. V.: *Basic and Clinical Immunology*. I. ed. Lange Company. 1976 s. 303-308.
11. Goldman, M.: *Fluorescent antibody methods*: Academic Press (New York, London) 1968.
12. Gordon, B. L.: *Essential of Immunology*: F. A. Davis Comp. (Philadelphia), 2nd Ed. 1974, s. 64.
13. Holborow, E. J.: *Standardization in Immunofluorescence*: Blachwell Sciantific. (Oxford, Edinburgh), 1970.
14. Jobbagy, A., and Jobbagy, G. M.: Clinical characterization of fluorescein thio-carbomyl-insulin conjugates. *J. Immunol. Methods*. **2**: 371, 382, 1973.
15. Johnson, G. D.: Simplified procedure for removing non-specific staining components from fluorescein-labelled conjugates. *Nature (London)*. **19**: 70, 1961.
16. Johnson, G. D., and Holborow, E. J.: Immunofluorescent test for infectious mononucleosis. *Nature. (London)*. **198**: 1316, 1963.
17. Johnson, G. D., and Holborow, E. J.: Immunofluorescence Chapter 18 *Handbook of Experimental Immunology*. D. M. Weir Blackwel Scientific 1973, s. 18, 1-20.
18. McKinney R. M., Spillane, J. T., and Pearce, G. W.: Factors affecting the rate of reaction of fluorescein isothiocyanate with serum proteins. *J. Immunol.* **93**: 232, 1964.
19. Morikawa, S., Yamamura, M., Harada, T., and Hamashima, Y.: Studies on cross-reactivity of antiribonuclease antisera with heterologous mammalian ribonucleotides. *J. Histochem. Cytochem.*, **16**: 410, 1968.
20. Nairn, R. C.: *Fluorescent Protein Tracing* 3rd ed. Edinburgh and London Livingston. 1969, s.
21. Nakane, P. K., and Pierce, G. B.: Enzyme-Labelled antibodies preparation and application for the localization of antigens. *J. Histochem. Cytochem.* **14**: 929, 1966.
22. Riggs J. L., Loh, P. C., and Eveland, W. C.: A simple fractionation method for preparation of fluorescein-Labelled gamma globulin. *Prog. Soc. exp. Biol. (N. Y.)*. **110**: 833, 1960.
23. Sainte-Maria, G.: A paraffin-embedding technique for studies employing Immuno-fluorescence. *J. Histochem. Cytochem.* **10**: 250, 1962.
24. Scott, D. G.: Immunohistochemical studies of connective tissue: The use of contrasting fluorescent protein tracers in the comparison of two antisera. *Immunology*, **3**: 226, 1960
25. Sternberg, L. A.: *Immunofluorescence*, Chapter 2: *Immuno Cytochemistry*, Prentice-Hall Inc. (N. J.) 1974, s 18-55.
26. Swift, H. F., Wilson, A. T., and Lancefield, R. C.: Typing group a Haemolytic streptococci by M-precipiton reactions in capillary pipettes. *J. exp. Med.* **78**: 127, 1943.
27. The, T. H. and Feltkamp T. E. V.: Conjugation of fluorescein isothiocyanate to antibodies. I. Experiments on the conditions of conjugation *Immunology*. **18**: 865, 1970.

28. Van Furth, R., Schmit, H. R. E., and Hijmans, W.: The formation of immunoglobulins by human tissue in Vitro. I. The methods and their specificity. *Immunology*. **II**: 1, 1966.
29. White, R. G.: Standardization in Immunofluorescence: Ed. by E. J. Holborow Blackwell Sciantific (Oxford, Edinburgh) 1970, s: 49.
30. Wofson, W. Q., Cohn, C., Calvary, E., and Ichiba, F.: Studies in serum proteins. V. A. rapid procedure for the estimation of total protein true albumine, total globulin, alpha globulin, beta)globulin and gamma globulin in 1.0 ml of serum. *Amer. J. Clin. Path.* **18**: 723, 1948.