

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑΣ**  
Κ. Φασσέας

Εντοπισμός λιγνίνης με το σύμπλοκο λακκάσης – κολλοειδούς χρυσού. (Gershkova *et al.* 2000)

Παραγωγή συμπλόκου ενζύμου-χρυσού (Benhamou and Lanfontaine, 1995)

1. 100μg λακκάσης (από *Rhus vernicifera*, Sigma), αναμιγνύεται με 10ml κολλοειδούς χρυσού (conjugated polygold 15nm, Polysciences Inc.) σε pH 4.0.
2. Σταθεροποίηση του διαλύματος με την πρόσθεση 1ml 1% (v/v) PEG 20000.
3. Διαμοιρασμός του διαλύματος σε Eppendorf 1.5ml.
4. Φυγοκέντριση στα 3000g (13000 rpm) για 60 min.
5. Το υπερκείμενο πετάγεται και το ίζημα επανεναιωρείται σε 0.5 ml φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα (PBS) pH 6.0 στο οποίο έχει προστεθεί 0.2 mg.μl<sup>-1</sup> PEG 20000.
6. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C για αρκετές μέρες.

Μέθοδος.

1. Οι υπέρλεπτες τομές τοποθετούνται grids με μεμβράνη πυροξυλίνης.
2. Τα grids με τις τομές επιπλέονται σε σταγόνες 50μl PBS-PEG pH 6 σε τρυβλία επιστρωμένα με σιλικόνη για 5 – 10 min.
3. Τα grids με τις τομές επιπλέονται σε σταγόνες 50μl του συμπλόκου ενζύμου-χρυσού σε τρυβλία επιστρωμένα με σιλικόνη για 30 – 60 min.
4. Πλύσιμο των τομών με φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα pH 7.2.
5. Πλύσιμο των τομών με αποσταγμένο νερό.
6. Διπλή χρώση με οξικό ουρανύλιο (40 min) και κιτρικό μόλυβδο (15min).