ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑΣ

Ανοσοσήμανση με κολλοειδή χρυσό (Immunogold labelling).
Κ. Φασσέας.

Τα μυστικά της επιτυχίας!

- Η όλη διαδικασία γίνεται σε θερμοκρασία δωματίου.
- Όλες οι επωάσεις γίνονται σε γυάλινα τρυβλία με τη βάση τους επιστρωμένη με σιλικόνη (Silastic 3110 RTV, Dow Corning) ή με PARAFILM.
- Αποφεύγουμε να βρέχεται η άλλη πλευρά του grid.
- Μετά από κάθε στάδιο απορροφάμε το υγρό που απομένει πάνω στα grids, ακουμπώντας τα σε ένα μικρό κομμάτι διηθητικό χαρτί, χωρίς να τα σταγνώνουμε.
- Ετοιμάζουμε πάντα αρκετά grids (τουλάχιστο 5) από κάθε παρασκεύασμα. Κατά τη διαδικασία υπάρχουν συνήθως απώλειες!
- Απομακρύνουμε του καντέμηδες από το χώρο του Εργαστηρίου.

Πρωτόκολλο για IGL.

1. Τοποθετούμε τις λεπτές τομές σε grids Ni καλυμμένα με μεμβράνη Formvar ή Pyroxylene.
2. Επίπλευση των grids σε σταγόνες 2% Decon 75 για 1h.
3. Καλό ξέπλυμα με νερό.
4. Επώαση σε σταγόνες 20-30μl θερμικά απενεργοποιημένο ορό κατσίκας[1] (heat inactivated goat serum) 1/30 v/v σε 0.05M TBS που περιέχει 0.5% BSA. Για τις σταγόνες χρησιμοποιούμε προ-ρυθμισμένη μικροπιπέτα. Το στάδιο αυτό παραλείπεται όταν γίνεται σήμανση με PAG (Protein A/Gold).
5. Επώαση για 30min - 18h σε σταγόνες 20-30μl πρωτογενούς αντισώματος διαλυμένο σε ρυθμιστικό διάλυμα για IGL. Όταν ο χρόνος επώασης είναι μεγάλος π.χ. περισσότερο από 1-2h μέσα στο τρυβλίο τοποθετείται λίγο βαμβάκι εμποτισμένο με νερό για να μη στεγνώσει το παρασκεύασμα.
6. Ξέπλυμα 3 X 10min σε TBS. Περίπου 450μl ρυθμιστικό διάλυμα IGL τοποθετείται με προ-ρυθμισμένη μικροπιπέτα σε πλάκες μιροτιτλοδότησης (96-well plates της CORNING), που δεν έχει πλυθεί με απορρυπαντικό, έτσι που η επιφάνεια του ρυθμιστικού να σχηματίζει μηνίσκο. Κατά τη διάρκεια των εκπλύσεων χτυπάμε πολύ ελαφρά με το χέρι την πλάκα για να διευκολύνεται η έκπλυση.
7. Επώαση για 1-18h σε σύμπλοκο κολλοειδούς χρυσού. Συνιστάται GARG (goat-antirabbit-gold) ή PAG (protein A gold) όταν το πρωτογενές αντίσωμα είναι από κουνέλι και σε GAMG (goat-antimouse-gold) ή PAG (protein A gold), όταν το πρωτογενές αντίσωμα είναι από ποντίκι. Η επώαση γίνεται σε σταγόνες 20-30μm συμπλόκου διαλυμένου 1/10 – 1/100 σε IGL ρυθμιστικό διάλυμα. Για τις σταγόνες χρησιμοποιούμε προ-ρυθμισμένη μικροπιπέτα.
8. Ξέπλυμα 1 X 10min σε IGL ρυθμιστικό διάλυμα.
9. Ξέπλυμα 1X 10min σε ρυθμιστικό διάλυμα Sörensen.
10. Ξέπλυμα 1X 10min σε αποσταγμένο νερό. Στέγνωμα.
11. Διπλή χρώση με οξικό ουρανύλιο και κιτρικό μόλυβδο.

[1] Κανονικός ορός κατσίκας θερμαίνεται στους 56°C για 30min.

Ρυθμιστικό διάλυμα για τη μέθοδο IGL.

100ml 0.07M Sörensen pH 6.5
1% BSA
1% Tween 20
0.02% NaN_3

Φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα 0.1M (Sörensen).

Διάλυμα stock A: $Na_2HPO_4*2H_2O$ 35.61 g/l
Διάλυμα stock B: $NaH_2PO_4*H_2O$ 27.60 g/l

Τα διαλύματα A και B μπορούν να διατηρηθούν στο ψυγείο για μερικές εβδομάδες. Πριν από τη χρήση για να φτιάξουμε ρυθμιστικό διάλυμα με pH=7.2 ανακατεύουμε 36.0 ml από το A και 14.0 ml από το B και συμπληρώνουμε μέχρι τα 100 ml με αποσταγμένο νερό. Για διαφορετικές συγκεντρώσεις αραιώνουμε το διάλυμα κατάλληλα.