

Imunofluorescenční značení intracelulárních antigenů v buněčné kultuře pomocí protilátek konjugovaných s eFluor[®] nanokrystaly

Úvod

Tento protokol je optimalizován pro imunofluorescenční studie intracelulárních antigenů v buněčné kultuře pomocí protilátek, které jsou konjugovány s eFluor[®] 605NC nebo 650NC – použitím kitů:

- eFluor[®] 605 nanokrystalový konjugační kit (amino skupina), kat. č. **88-7071**
- eFluor[®] 650 nanokrystalový konjugační kit (amino skupina), kat. č. **88-7072**

- eFluor[®] 605 nanokrystalový konjugační kit (thiolová skupina), kat. č. **88-7141**
- eFluor[®] 650 nanokrystalový konjugační kit (thiolová skupina), kat. č. **88-7142**

Poznámka

Inkoust PAP Penu může interferovat se signálem eFluor[®] nanokrystalu, a proto není doporučeno společné použití.

MATERIÁL

- 1X TBS; ředění ze zásobního 20X TBS promývacího pufru pro IHC (kat. č. **00-4954**)
- 1X PBS, pH 7.4
- Blokační činidlo: IHC/ICC blokační pufr s nízkým obsahem proteinů (kat. č. **00-4953**) nebo IHC/ICC blokační pufr s vysokým obsahem proteinů (kat. č. **00-4952**)
- protilátka konjugovaná s eFluor[®] nanokrystaly
- *Fluoromount G* vazebné médium (kat. č. **00-4958**)
- zvlhčená nádobka (do které se budou umísťovat sklíčka s komůrkami během inkubace)
- parafilm
- krycí sklíčka (22 x 50 mm)
- lak na nehty

Přístroje:

- mikroskop (vybavený příslušnými filtry)

PROTOKOL

1. Buňky v požadované hustotě (tak, aby byly schopny se přichytit) umístíte na sklíčko (např. 30 000 buněk/komůrka v 8-komůrkovém sklíčku). Buňky jsou obvykle na sklíčko pasážovány 1 den před značením, aby dosáhly 60-80% pokrytí dna.
2. Pro fixaci vzorku, inkubujte sklíčko se 4% formaldehydem 15 minut při pokojové teplotě nebo se 100% methanolem 10 minut v -20°C.
Poznámka: Inkubační doby závisí na sledovaném antigenu a musí být stanoveny pro konkrétní buňky a cílové antigeny. Uvedené inkubační doby a metody jsou jen orientační údaje pro pozdější optimalizaci.
3. Opatrně 3x promyjte sklíčka použitím 1X PBS (5 minut/promytí) – pro aplikaci roztoku do komůrky a následné odsátí ven z komůrky použijte kapátko.
Poznámka 1: Je důležité, aby buňky v tomto kroku nevyschly. Případné vyschnutí by mohlo vést ke zvýšenému pozadí při značení a následné nesprávné interpretaci výsledků.
Poznámka 2: Je doporučeno nepromývat více než 2 komůrky najednou, aby se tak snížila možnost vysychání buněk. Promývací roztok aplikujte opatrně, aby nedocházelo k odtržení buněk.
4. Formaldehydem fixované buňky, intracelulární a jaderné antigeny zpřístupníte po permeabilizaci – použitím 1% Triton X-100 ředěného v 1X PBS, 30 minut při 37°C a následně 10 minut při pokojové teplotě. Abyste předešli odpařování a případnému vysychání buněk během inkubace, zakryjte komůrky parafilmem. Pro buňky fixované methanolem v kroku 2. obvykle není permeabilizace nutná.
Poznámka: Pro optimální permeabilizaci, závisí inkubační doby na sledovaném antigenu a musí být stanoveny pro konkrétní buňky a cílové antigeny. Uvedené inkubační doby a metody jsou jen orientační údaje pro pozdější optimalizaci.
5. Opatrně 3x promyjte buňky použitím 1X PBS (5 minut/promytí) – viz krok 3.
6. Pro zablokování, aplikujte na buňky IHC/ICC blokační pufr (s nízkým nebo vysokým obsahem proteinů), 1-2 hodiny v pokojové teplotě ve zvlhčené nádobce. Použijte přibližně 100 ul / komůrku v 8-komůrkovém sklíčku (množství pufry můžete dle potřeby zvýšit či snížit tak, aby byly komůrky zaplněny).
Poznámka: Nejčastěji se doporučuje použití IHC/ICC blokačního pufry s nízkým obsahem proteinů (kat. č. 00-4953). Pro buňky nebo protilátky s vysokým podílem nespecifického značení a pro jaderné antigeny je doporučen IHC/ICC blokační pufr s vysokým obsahem proteinů (kat. č. 00-4952).
7. Naředěte protilátku konjugovanou s eFluor[®] nanokrystaly stejným blokačním pufrem, který jste použili v kroku 6. a zakryjte před světlem. Obvykle je doporučené výchozí ředění pro protilátky konjugované s eFluor nanokrystaly v rozpětí 1-40 nM.

8. Naředěnou protilátku aplikujte na buňky a zakryjte parafilmem, viz krok 4. Pro dosažení nejlepších výsledků, inkubujte ve zvlhčené nádobce přes noc, při 4°C.
Chraňte před světlem.
Poznámka: Protilátky, které reagují se silně exprimovaným antigenem, mohou mít kratší inkubační dobu (1-2 hodiny při pokojové teplotě). Optimální inkubační doba závisí na konkrétní protilátce a cílové tkáni/antigenu.
9. Opatrně 3x promyjte buňky použitím 1X PBS (5 minut/promytí) – viz krok 3. a chraňte před světlem. Pro maximální intenzitu signálu doporučujeme používat pro protilátku konjugovanou s eFluor[®] nanokrystaly promývací a inkubační pufr s obsahem TBS.
10. Odstraňte promývací roztok ze sklíčka a aplikujte 2-3 kapky Fluoromount G vazebného média (kat. č. 00-4958), zakryjte krycím sklíčkem. Utěsněte krycí sklíčko bezbarvým lakem na nehty a nechte 20 minut zaschnout, ve tmě.
11. Pro dosažení nejlepších výsledků ihned mikroskopujte. Preparáty mohou být skladovány při 4°C, ve tmě.