

Imunofluorescenční značení zmražených tkáňových řezů pomocí protilátek konjugovaných s eFluor[®] nanokrystaly

Úvod

Tento protokol je optimalizován pro imunofluorescenční studie zmražených tkáňových řezů 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)
- Aceton, (reagent grade)
- 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 (velikost odpovídající velikosti tkáňových řezů)
- lak na nehty

Přístroje:

- mikroskop (vybavený příslušnými filtry)

PROTOKOL

1. Připravte si zmražené řezy a umístěte na sklíčka typu „superfrost plus“. Vysušte sklíčko s řezy, 10 minut na vzduchu.
2. Pro zafixování vzorků, ponořte sklíčko do skleněné nádoby obsahující aceton a inkubujte 10 minut.
3. Odstraňte aceton a okamžitě zavodněte tkáň 1X PBS 10 minut, při pokojové teplotě.
Poznámka: Je důležité, aby buňky v tomto kroku nevyschly. Případné vyschnutí by mohlo vést ke zvýšenému pozadí při značení a následné nesprávné interpretaci výsledků.
4. Pro zablokování nespecifických vazebných míst aplikujte na tkáňové řezy blokační pufr (s nízkým nebo vysokým obsahem proteinů), 1 hodinu při pokojové teplotě. Použijte přibližně 100 µl na tkáň o velikosti 1.5 cm x 1.5 cm (množství pufru úměrně zvýšíme dle velikosti tkáně). Abyste omezili odpařování blokačního pufru a rovnoměrně rozlili roztok na tkáň, použijte pinzetu a opatrně zakryjte tkáňový řez parafilmem. Vystříhnete parafilm tak, aby jeho velikost odpovídala velikosti tkáně. Není nutné napínat parafilm nebo zakrývat okraje sklíčka.
Poznámka: Blokační pufr: Při použití protilátek konjugovaných s eFluor[®] nanokrystaly doporučujeme použít vhodný blokační pufr. Nejčastěji se doporučuje použití IHC/ICC blokačního pufru s nízkým obsahem proteinů (kat. č. 00-4953). Pro tkáň/protilátky s vysokým podílem nespecifického značení, pro jaderné antigeny a FFPE preparáty je doporučen IHC/ICC blokační pufr s vysokým obsahem proteinů (kat. č. 00-4952).
5. Pinzetou opatrně odstraňte parafilm z tkáňového řezu a ponořte sklíčko do skleněné nádoby obsahující TBS. Opatrně omyjte sklíčka v TBS, 5 minut/promytí na míchačce nastavené na nízké otáčky (45 rpm). Vyměňte roztok 2x – celkem tedy 3 promývací cykly, při pokojové teplotě.
Poznámka: Pro dosažení maximální intenzity signálu (při použití protilátek konjugovaných s eFluor[®] nanokrystaly) doporučujeme pro promytí a inkubaci použít pufr s TBS základem.
6. Naředte protilátky konjugované s eFluor[®] nanokrystaly blokačním pufrům a **zakryjte před světlem**. Kvůli různé specifitě a afinitě jednotlivých protilátek je nutné vytitrovat optimální koncentraci. Obvykle je doporučena jako výchozí koncentrace eFluor nanokrystalového konjugátu v rozpětí 1-40 nM.

7. Naředěnou protilátku aplikujte na tkáň 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.

8. Opatrně promyjte tkáň 3x v 1X PBS (5 minut/promytí), jak je popsáno v kroku 5.
Chraňte před světlem.
9. Aplikujte 2-3 kapky Fluoromount G vazebného médium (kat. č. 00-4958), zakryjte krycím sklíčkem. Utěsněte krycí sklíčko bezbarvým lakem na nehty a nechte 20 minut zaschnout, ve tmě.
10. Pro dosažení nejlepších výsledků ihned mikroskopujte. Preparáty mohou být skladovány při 4°C, ve tmě.