

Immunofluorescenza

Reagenti necessari: PBS
FBS
Paraformaldeide
Triton X-100
Anticorpi primari
Anticorpi secondari Fluorescenti

Supporti necessari: μ -slide VI^{0.4} (ibidi)

VIDEO tutorial: http://ibidi.com/movies/MV_018_Immunofl_SlideVI.html

Background:

La determinazione del quantitativo e della localizzazione delle proteine intracellulare può essere effettuata tramite una tecnica microscopica nota come immunofluorescenza. Questa metodica è possibile grazie alla presenza in commercio di anticorpi secondari marcati con molecole fluorescenti e perciò in grado di emettere luce se eccitate con raggi di opportuna lunghezza d'onda.

Il protocollo qui descritto prevede di piastrare le cellule su un supporto di crescita che sia idoneo alla successiva visualizzazione in microscopia a fluorescenza anche con obiettivi ad immersione, tipo μ -slide ibidi (www.ibidi.com).

NOTA: utilizzo di questi supporti (μ -slide VI^{0.4}) è raccomandato per la riduzione drastica dei volumi (e dunque dei COSTI) di tutti i reagenti: dagli anticorpi primario e secondario ai chemicals usati per trattare le cellule, ai transfettanti, alle eventuali sequenze di RNAi.

1°: Piastrare

- Contare le cellule e diluirle alla concentrazione di $5-7 \times 10^5$ c/ml in terreno in coltura.
- Piastrare $30 \mu\text{l}$ di sospensione cellulare nel micro-canale della μ -slide VI0.4 con l'aiuto di una micropipetta, avendo cura di rivolgere il puntale verso l'interno del canale.
- Mettere le cellule in incubatore e attendere fino a che le cellule non saranno adese.
- Riempire ciascun reservoir laterale con $60 \mu\text{l}$ di terreno. Incubare e trattare come desiderato.

2°: Fissare e permeabilizzare

- Eliminare il terreno dalle μ -slide con una micropipetta: per prelevare il terreno dei soli reservoir rivolgere il puntale verso l'esterno della slide, per prelevarlo dal canale invece rivolgerlo verso l'interno del canale.
- Dopo aver piastrato le cellule ed averle opportunamente trattate, eliminare il terreno e lavare le cellule con PBS (T_{amb}).
- Successivamente, fissare le cellule con una soluzione di paraformaldeide al 4% ($30 \mu\text{l}$) per 10 minuti e poi risciacquare con PBS. **NON SUPERARE I 10 MINUTI**
- Ricoprire le cellule con una soluzione di PBS/Triton X-100 0,4% per 10min ($30 \mu\text{l}$), in modo da permeabilizzare la membrana cellulare e poi lavare per 3volte con PBS. **NON SUPERARE I 10 MINUTI**

Immunofluorescenza

3°: Marcare

- a) Incubare le cellule così fissate e permeabilizzate con 30 μ l di una soluzione di PBS/FBS 10% per 30' (BLOCKING).
- b) Intanto preparare la soluzione di anticorpo primario in Blocking (1:50-1:100, secondo datasheet dell'anticorpo).
- c) Rimuovere la Blocking e incubare con 30 μ l di anticorpo primario per 30'-1h a Tamb (oppure overnight a 4°C).
- d) Intanto preparare la soluzione di anticorpo secondario in Blocking (1:1000, o secondo datasheet)
- e) Rimuovere il primario; lavare 3 volte con PBS; incubare con 30 μ l di anticorpo secondario per 30'-1h.

NOTA: Nel caso si una doppia marcatura, i due anticorpi primari (ovviamente di origine diversa, p.es. uno ottenuto in mouse e altro in rabbit) possono essere mescolati insieme in un'unica soluzione e incubati per il medesimo tempo indicato. Analogamente i due secondari.

- f) L'ultimo passaggio prevede l'aggiunta un marcatore del DNA, tipo Hoechst, 1:1000 in PBS/FBS 10% per 10min, (30 μ l). A seguire 1 lavaggio con PBS.

4°: Osservare

- a) Nel caso di utilizzo di obbiettivi ad immersione o di sistemi che prevedano l'utilizzo di vetrini copri oggetto, riempire il canale con 30ul di una soluzione PBS/Glicerolo 1:1 o, meglio, un apposito mounting medium dotato anti-fade per permettere il passaggio corretto della luce (ibidi Mounting Medium 15 ml cod. 50001)

ESEMPI:

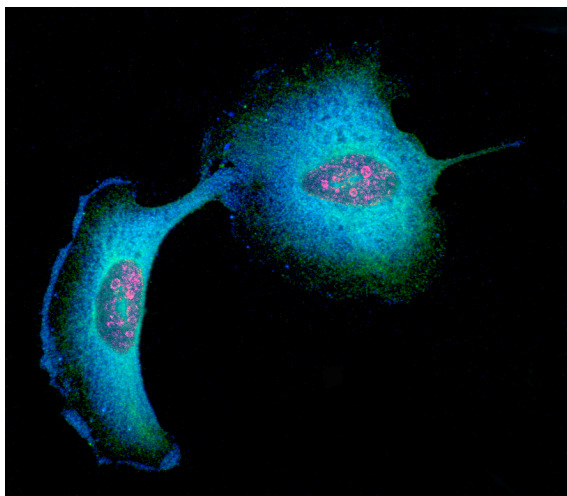


Image Description:

Human hepatic stellate (LX2) cells were cultured in an ibidi μ -Slide and stained with antibodies against smooth muscle actin (blue) and protein-bound glutathione (green). Nuclei were counterstained with DRAQ5 (magenta).

Z-reconstruction of serial single optical sections was performed on an Olympus FV1000 confocal microscope with a 60x (N.A.1.35) oil objective. Information: The image is Proprietary of "Ospedale Pediatrico Bambin Gesù" – Rome - Research Unit: Dr. Stefania Petri.