

**ESERCITAZIONE: IMMUNOFLUORESCENZA****MATERIALE:**

PBS

Paraformaldeide 3%

Triton X-100 0.1%

Soluzione di anticorpo primario anti-HA TAG (monoclonale prodotto in topo)

Soluzione di anticorpo secondario anti-mouse-FITC (coniugato con fluoresceina – fluorescenza verde)

DAPI (colorante nucleare– intercalante del DNA con fluorescenza blu)

Agente montante: PROLONG (da abbinare ad un collante);

Vetrini portaoggetto

Camerette per immunofluorescenza

Pinzette e aghi

Pipette Pasteur di plastica

**PROCEDIMENTO (si effettua INTERAMENTE sul banco)**

- 1. LAVARE LE CELLULE.** Rimuovere il terreno, **effettuare 2 lavaggi delicati con PBS**, rimuovere  $\frac{3}{4}$  del PBS. Segnare il fondo di 2 pozzetti della piastra multipozzetto. Utilizzando un ago e le pinzette (o le dita), trasferire il vetrino in un pozzetto. **ATTENZIONE:** le cellule devono rimanere a **FACCIA IN SU!!!**
- 2. FISSAZIONE.** Le cellule sul vetrino saranno fissate mediante incubazione con **paraformaldeide 4%** per 20 minuti. Questo passaggio sarà effettuato dal docente sotto cappa chimica. Eseguire 2 lavaggi con PBS per rimuovere la paraformaldeide in eccesso. Rimuovere **tutto** il PBS.
- 3. PERMEABILIZZARE le membrane cellulari.** Aggiungere 2 ml di **Triton X 100 0.1%**. Incubare per **5 minuti**. **Effettuare 2 lavaggi** con 2 ml di **PBS** ciascuno. Rimuovere **tutto** il PBS.
- 4. Incubare con l'anticorpo primario (anti-HA).** Trasferire 50 $\mu$ l di soluzione di anticorpo primario nella cameretta umida e poggiarvi sopra il vetrino. **ATTENZIONE:** le cellule devono essere a contatto con l'anticorpo (quindi girare il vetrino a **FACCIA IN GIU'!!!**) Chiudere la cameretta e incubare 30 minuti.

5. Trasferire nella piastra multipozzetto (cellule a faccia in su) ed **effettuare 2 lavaggi** con 2 ml di **PBS** ciascuno.
6. **Incubare con l'anticorpo secondario (anti-mouse-FITC)**. Rimuovere bene il PBS. Trasferire 50µl di soluzione di anticorpo secondario nella cameretta umida e poggiarvi sopra il vetrino. Chiudere la cameretta e incubare 15 minuti.
7. Effettuare **2 lavaggi** con 2 ml di **PBS** ciascuno come al punto 5.
8. **Controcolorare i nuclei con DAPI**. Rimuovere il PBS. **Aggiungere 2 ml** di soluzione di **DAPI**. Incubare per **5 minuti**. **Effettuare 3 lavaggi** con 2 ml di **PBS** ciascuno, e infine 1 lavaggio con 2 ml di **acqua**. Rimuovere  $\frac{3}{4}$  dell'acqua.
9. **MONTARE IL VETRINO**. Con un ago e le pinzette (o le dita), sollevare il vetrino e spostarlo in un pozzetto asciutto, appoggiandolo verticalmente al bordo del pozzetto. **NB: le cellule guardano verso il centro del pozzetto, non verso il bordo!!!** Lasciar asciugare (almeno 5 minuti). Pulire con alcol un **vetrino portaoggetto**, scriverci la sigla del gruppo /il nome dello studente, la linea cellulare ed il DNA trasfettato, quindi porvi 1 goccia di **Prolong**. **Appoggiare il vetrino con le cellule a contatto con il Prolong (girare il vetrino a faccia in giù)**. Schiacciare piano con un puntale giallo per eliminare le bolle e lasciar asciugare, quindi sigillare i vertici del vetrino con lo smalto. I vetrini andranno successivamente osservati al microscopio a epifluorescenza.

