

Protocolos Standard

Estos protocolos son orientativos. Dependiendo del tipo de muestra o técnica microscópica a emplear, puede ser necesario realizar modificaciones. Por favor, contacta con el personal del Servicio para obtener protocolos más detallados orientados al tipo de muestras que se desee observar.

Preparación de muestras para microscopía electrónica de barrido

- Fijar con 2% glutaraldehido en tampón Sörenson 0.1 M a pH=7.4, 1 h a T^a ambiente.
- Lavar 3x 10 min con Tampón Sörenson + Sacarosa isomolar con el fijador
- Postfijar con 1% OsO₄ en Sörenson, 1 h en oscuridad a 4 °C
- Lavar 3x con Sörenson, 10 min
- Deshidratar en serie creciente de EtOH (30%, 50, 70, 90, 96, 100 y 2 veces 100 absoluto), 10 min en cada.
- Desecado al punto crítico. Como alternativa, se puede lavar 3x en hexamethyldisilazane 10 min y dejar secar (evitar que la muestra se quede adherida al sustrato durante el secado).
- Colocar las muestras sobre soportes de microscopio electrónico de barrido utilizando cemento conductor.
- Recubrimiento metálico con oro en atmósfera de Argón.
- Visualizar y fotografiar en un microscopio electrónico de barrido.

Preparación de muestras para microscopía electrónica de transmisión

- Fijar con 2% glutaraldehido en tampón Sörenson 0.1 M a pH=7.4, 1-4 h a T^a ambiente (el tiempo depende del tamaño de la muestra). Las muestras deben ser pequeñas (de 1mm de lado para tejidos, etc). Si son células en cultivo que crecen adheridas, es necesario hacer una fijación previa con glutaraldehido, levantar la monocapa con un *cell scraper*, centrifugar para conseguir un pellet y, a continuación, fijarlo completamente. También pueden encapsularse en agar para evitar que se desmenuze el pellet durante todos los lavados. Los tiempos de lavado se pueden modificar dependiendo del tamaño y densidad de la muestra a procesar.
- Lavar 3x 10 min con Tampón Sörenson + Sacarosa isomolar con el fijador (normalmente entre 4-8% sacarosa)
- Postfijar con 1% OsO₄ en Sörenson, 1 h en oscuridad a 4 °C
- Lavar 3x con Sörenson 10 min (ya no hace falta sacarosa)
- Deshidratar en serie creciente de EtOH (30%, 50, 70, 90, 96, 100 y 2 veces en 100 absoluto), 15 min en cada. También puede utilizarse una serie de acetonas, salvo que se vaya a incluir en resina LR white (para inmunos) en lugar de EPON. Normalmente utilizamos resina epoxi EPON Polarbed 812.
- Lavar con óxido de propileno (100%) [2 x 10 minutos] [Reactivo intermedio, ya que la resina no es soluble en etanol]. No usar recipientes de plástico tipo policarbonato.

- Óxido de propileno - Resina Epoxi 2:1 [60 minutos]
- Óxido de propileno - Resina Epoxi 1:1 [60 minutos]
- Óxido de propileno - Resina Epoxi 1:2 [60 minutos]
- Resina Epoxi (100%) [overnight] Dejarlo con el tapón abierto toda la noche para que se evaporen los posibles restos de propileno. Cambiar resina.
- Cambiar la muestra a los bloques (beem capsules) y orientar bien para cortar con el ultramicrotomo. Poner en Resina Epoxi nueva y polimerizar en estufa a 55°C durante 48h.
- Ultramicrotomía: Piramidado inicial, cortes semifinos, tinción de semifinos con Azul de Toluidina, observación al microscopio óptico, elección de la zona deseada, retallado y cortes ultrafinos, contrastar rejillas con citrato de plomo y acetato de uranilo y observar al microscopio electrónico de transmisión.

Inmunofluorescencia. Ejemplo con cortes de criostato o con células en cultivo.

- Para criostato. Incluir la muestra en OCT o similar.
- Cortar con criostato secciones del grosor deseado.
- Adherir a portas con poli-lisina. Lavar con PBS 3x, 5 min.

Ejemplo: partiendo de células creciendo sobre cubreobjetos de vidrio: fijar la muestra con diferentes fijadores, dependiendo de la muestra y los anticuerpos a utilizar.

- Fijar con 3% formaldehído en PBS, 10 min, lavar 3x con PBS, permeabilizar 5 min. con 0.2% Tx-100 en PBS, lavar con PBS.
- Fijar y permeabilizar directamente con metanol a -20°C durante 5 min. Lavar 3x con PBS a 4°C.
- Bloquear uniones inespecíficas con suero bovino fetal al 10% en PBS durante 0.5-1 h a temperatura ambiente en el interior de una cámara húmeda.
- Incubar con el anticuerpo primario (diluir en 5% suero bovino fetal en PBS) correspondiente durante 1 hora a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C.
- Lavar con PBS 3x
- Incubar con anticuerpo secundario diluido a la concentración adecuada en PBS-5% suero. 1 h a T^a ambiente. Si hay precipitados, centrifugar antes de usar.
- Lavar con PBS (3x, 5 min.) y montar en portas con medio de montaje para fluorescencia (por ejemplo, Fluoromount G). En el anteúltimo lavado se puede marcar el DNA utilizando Hoechst 33342 o DAPI a 0.5 ug/ml. Sellar con laca de uñas.
- Visualizar al microscopio de fluorescencia o al microscopio confocal.