

EM (Immuno) für retina nd Hum Gewebe

- Gewebe vorfixieren (bei uns 2% PFA über Nacht)
- Gewebe in N₂ gefrieren in OST oder AGAR
- Schnitte herstellen (80µm) bei mikrotome oder bei vibratome (Anja Bräuer) und in mit doppeltem Parafilm beschichtete Multiwellplatte geben
- Freeze and thaw 20min/20min in 30%iger Sucrose bei -80 oder -20°C
- 3 x in PB (phosphate buffer) waschen
- Blockieren in 10% NGS/PB/Na-Azid 0.02% über Nacht 4°C: NGS normal goat serum. Na_Azid-gegen bakterium wachstum
- **prim. AK (Anti body):** in PB + Na-Azid 4°C 5-7 Tage, Schiessen mit Decken
- waschen 3 x 30 min in PB (6x15min)
- **sek. AK** (ohne Na-Azid) 1:250 **biotinyl.** 3 Tage 4°C
- waschen 3 x 30 min in PB (6x15min)
- ABC Vectastain Lsg kit part A 1:60 in PB 5h RT: immer mit Decken
- ABC Vectashield Lsg kit part B 1:60 über Nacht 4°C
- 3x15 min waschen in PB
- DAB 0.1% in PB auf die Schnitte für 20min, dann abziehen (soak out): DAB Diaminobenzidine
- DAB + H₂O₂ (20µl/ml) 5-10 min unter visueller Kontrolle: become brown-check under microscope, but should not all be brown. *H₂O₂ reagiert mit biotin.*
- 3x10 min waschen in PB
- 1 h **EM-Fix:** 1% PFA, 2.5% Glutaraldehyd, 3% Sucrose: this is an extra fix stepextra
- Hybridisierungssofen auf 60°C vorheizen
- 3x15 min waschen in PB → **in kleine Schraubdeckelgläschen überführen**
- **Intensivierung (immer mit Handschue):** (Lsg erst kurz vorher ansetzen) → 10 min 60°C
- für 50ml: 0,1g Silbernitrat (0,2%) in 10ml Bidest (MiliQ) einrühren,
1,3g Hexamethylentetramine (2.6%) und 0,1 Borax (0.2%) in 40ml
Tropfenweise Silbernitrat in 40ml einlösen, so it is not cloudy
- kurz in Bidest spülen
- 0,05% Goldchlorid in Bidest (Stocklsg 0.5% liegt vor) 5min (kann trüb werden)
- kurz in Bidest spülen
- 5 min 2,5% Natriumthiosulfat (1,25g/50ml Bidest) → 1-2ml pro Gewebestück

→ klärt das Gewebe und entfernt Schlieren

- kurz in Bidest spülen

- 1h RT 1% Osmiumtetroxid in Bidest (für ausgewählte Stücke) **mit gestopften Spitzen (not a pipet): All becomes black**

- waschen in Bidest → kann bei 4°C gelagert werden (can make a pause 😊)

- dehydrieren: 50, 70, 80, 90, 100, 100 Aceton/Wasser jeweils 10 Minuten

- Harz-Aceton 1:2 1h RT: Harz is rasin, 100-150µl to cover the sample

- Harz-Aceton 1:1 2h RT

- Harz über Nacht bei leichter Rotation RT wen möglich

- In Kapseln aushärten lassen 60°C 48h