

- lavaggi in H<sub>2</sub>O corrente.

#### 8. Contrasto nucleare

- contrasto nucleare con ematossilina (10'')
- viraggio delle sezioni in acqua corrente

#### 9. Disidratazione e montaggio

- disidratazione in alcool a concentrazioni crescenti e montaggio del coprioggetto.

### Doppia colorazione.

1. Dopo aver sviluppato la reazione con il primo anticorpo primario scelto, lavare i vetrini in TBS+TRITON 3x5'.
2. Seguire il protocollo dell'ABC perossidasi fino all'incubazione con antisiero primario (punto 4, compreso).
3. Lavaggi con TBS+TRITON 3x5'
4. **Incubazione con antisiero secondario** secondo lo schema:
  - Goat anti Mouse diluizione finale 1/25 in TBS per 30' a temperatura ambiente
  - Swine anti Rabbit coniugato con Fosfatasi Alcalina diluizione finale 1/50 in TBS per 1 ora a temperatura ambiente
5. **Incubazione con il complesso APAAP** (solo se il primario è in Mouse) alla diluizione d'uso di 1/50 per 30' a temperatura ambiente
6. Lavaggi in TBS 3x5'
7. Preparare la soluzione di sviluppo per la Fosfatasi alcalina come segue:
  - Soluzione madre: in una beuta ricoperta con alluminio, mescolare:
    - 2mg di Naftolo AS-TR Fosfato
    - 40µl di Dimetil-Formamide
    - 8 ml di TRIS/HCl pH=9,2
  - Soluzione A: in una eppendorf ricoperta con alluminio mescolare:
    - 4 mg di New Fuchsin
    - 100 µl di HCl 2M
  - Soluzione B: in una eppendorf ricoperta con alluminio mescolare:
    - 4 mg di NaNO<sub>2</sub>
    - 100 µl di H<sub>2</sub>O

In una eppendorf ricoperta con alluminio mescolare:

50 µl di soluzione A con 50 µl di soluzione B

Lasciare riposare per 1'

Aggiungere 100 µl della miscela A+B ottenuta alla soluzione madre controllando che la soluzione finale sia limpida.

8. Mettere qualche goccia della soluzione di sviluppo della fosfatasi alcalina sulla fetta ed attendere, al riparo dalla luce, qualche secondo. Controllare la reazione al microscopio. Bloccare la reazione con acqua distillata.
9. Contrastare con Ematossilina
10. Disidratare in scala alcolica a gradazione crescente
11. Montare il coprioggetto.

## Tecniche di microscopia elettronica.

### Fissazione dei campioni.

I campioni vengono fissati con due diversi liquidi di Karnovsky a seconda della successiva processazione. In particolare si utilizza:

- KARNOVSKY 2% (concentraz. finale GL 2 %):

92 cc PF 2 % +

8 cc GL 25 %

Per campioni che verranno inclusi in resina epossidica e processati per lo studio morfologico.

- KARNOVSKY 0.5 % (concentraz. finale GL 0.5%):

98 cc PF 2 % +

2 cc GL 25 %

Per campioni che verranno inclusi in resina idrofila e processati per lo studio immunocitochimico.

I frammenti di tessuto da analizzare devono essere ridotti ad uno spessore massimo di 1 mm, vengono quindi posti in liquido di Karnovsky per 2-3 ore a 4° C e poi sciacquati in tampone cacodilato 0.05 M.

### Inclusione in resina epossidica (EPON-ARALDITE) per lo studio morfologico.

- **Fissazione** in Karnovsky 2 % per 2 ore a 4° C;
- **Sciacqui** in tampone Cacodilato 0.05 M pH 7.3;
- **Post-fissazione:**
  - in OsO<sub>4</sub> 1 % per 1 ora;
  - oppure, **per preparati recuperati da formalina**, in Ferrocianuro di K 1.5 % in OsO<sub>4</sub> per 1 ora, e dopo alcuni sciacqui, in Ferricianuro di K 1.5 % in OsO<sub>4</sub> per 1 ora;
- **Sciacqui** in tampone Cacodilato (3 cambi di 10 min.);

- **Disidratazione in:**
  - etanolo 30 % per 15 min.
  - etanolo 50 % per 15 min.
  - etanolo 75 % per 15 min.
  - etanolo 95 % per 30 min.
  - etanolo assoluto per 90 min. (3 cambi di 30 min.)
- Ossido di Propilene puro per 20 min. (2 cambi di 10 min.);
- Miscela 1:1 Ossido di Propilene: resina per 90 min.;
- Resina pura, per tutta la notte;
- **Inclusione** in capsule, polimerizzazione a 60° C per 48 ore.

#### Resina:

- Araldite (FLUKA) 2.5 cc
- Epon 812 (SERVA) 3.1 cc
- DDSA (SERVA) 7.5 cc
- 
- DMP/30 (SERVA) 0.2 cc

### Inclusione in resina idrofilia (London White) per lo studio immunocitochimico.

- **Fissazione** in Karnovsky 0.5 % per 2 ore a 4° C;
- **Sciacqui** in tampone Cacodilato 0.05M ph 7.3;
- **Disidratazione in:**- alcool 25 % per 30 min. (2 cambi di 15 min.)
- alcool 50 % per 30 min. (2 cambi di 15 min.)
- alcool 75 % per 60 min. (2 cambi di 30 min.)
- Miscela 1:2 alcool 75 % / resina per 120 min.. **IMPORTANTE:** Aggiungere l'alcool lentamente, goccia a goccia alla resina agitando sull'agitatore vigorosamente per creare una soluzione omogenea;
- Resina pura a temperatura ambiente per 60 min.;
- Resina pura a 4° C per tutta la notte;
- Resina pura a temperatura ambiente per 60 min.;
- **Inclusione** in capsule di gelatina con il coperchio;
- **Polimerizzazione** a 50° C per 48 ore.

## Tecnica immunocitochimica.

1. Se il preparato è osmicato, rimuovere l' $\text{OsO}_4$  con una soluzione soprasatura di Na-metaperiodato (Merck) per 30 min.
  2. Fare 2 sciacqui in acqua ed 1 sciacquo in TBS 0.05 M pH 7.3 filtrato.
  3. Porre il preparato su una goccia di ovoalbumina 1 % in TBS, per 5 min.
  4. Dopo aver rimosso l'eccesso di ovoalbumina, passarlo sulla goccia di antisiero 1° ed incubare per 1 notte a 4° C.
  5. Fare 3 sciacqui in TBS filtrato.
  6. Incubare con antisiero 2° marcato con oro per 1 ora a  $T_{amb.}$
  7. Fare 2 sciacqui in TBS filtrato ed 1 in acqua bidistillata.
  8. **Colorazione:**
    - Acetato di Uranile (sol. soprasatura)
      - per 10 min. (resine Epossidiche)
      - per 5 min. (resine idrofiliche).
    - Citrato di Piombo (sec. Reynolds) per 5 min..
- Nel caso in cui fosse necessario un **pre-trattamento con tripsina** procedere come segue:
    - Pre-riscaldare la stufa (37°C)
    - Sciogliere 5 mg di tripsina in 100 cc di TBS filtrato.
    - Filtrare in tubetti da coltura.
    - Depositare la tripsina così ottenuta in petri di ceramica.
    - Depositare i retini da trattare in modo tale che galleggino con le fette rivolte verso il basso.
    - Deposare il tutto in stufa per 20 minuti.
    - Terminato il tempo di incubazione eseguire 3 sciacqui con TBS filtrato.
    - Proseguire dal punto 3.
  - Nel caso in cui fosse necessario un **pre-trattamento con microonde** procedere come segue:
    - Preparare una vaschetta pulita con circa 50 ml di tampone citrato pH6
    - Immergere il retino nella vaschetta e posizionarla nel forno a microonde
    - Programmare il microonde con potenza 70%, tempo 10'
    - Aggiungere tampone ogni 3-4 minuti per evitare che il livello di tampone si riduca troppo
    - Alla fine del trattamento lasciare raffreddare il tampone immergendo la vaschetta in acqua fredda per 20'
    - Fare 3 sciacqui in TBS
    - Proseguire dal punto 3.