

Immunos " Aggrecan"

mardi 9 décembre 2014

Introduction et but

Mise au point et test du nouveau anticorps "Aggrecan" sur différents supports déjà fait les jours précédents

Matériel:

9 déc. 2014/10 déc 2014

- Pellet AF Moco 12a, P4 3sem milieu différencié et standard
- Pellet FE002 cart,P5 3sem milieu différencié et standard
- Membrane chondrogide AF Moco 12a, P4 3sem milieu différencié et standard
- Membrane chondrogide FE002 cart,P4 2sem milieu différencié et standard
- Membrane seedhome FE002 cart,P4 2sem milieu différencié et standard
- Mouse Monoclonal Anti Human Aggrecan clone 969D4D11 [0.5mg/0.5ml] (AHP0022, Invitrogen).
- ImmEdge Pen VC-H-4000-1 Vector (H-4000-1, Enzo)
- Hyaluronidase (H3506-100MG, Sigma)
- ImmPRESS™ Anti-Mouse Ig Reagent, Peroxidase conjugated Vector (MP-7402-L050, Enzo)
- ImmPACT™ DAB Peroxidase substrate Vector (SK-4105, Enzo)
- BLOXALL™ Endogenous Peroxidase and Alkaline Phosphatase Bloking Solution (SP-6000, Enzo)
- Horse Normal Serum 2.5% Vector (S-2012, Enzo)
- Triton X-100 (A1388.0500, Applichem)
- Phosphate Buffered Saline (PBS)

SOP: https://slims-lbo.epfl.ch/lbo/serverattachment?attm_pk=104

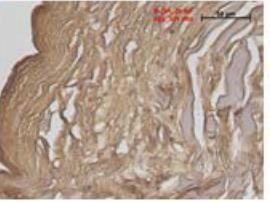
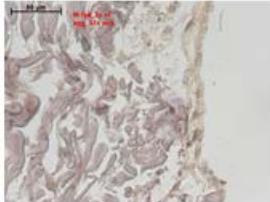
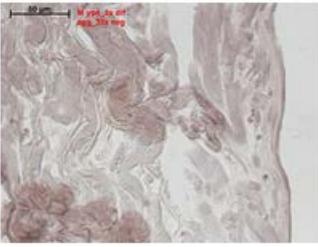
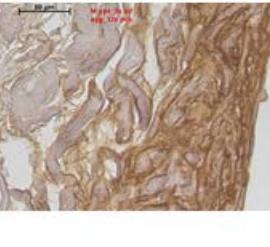
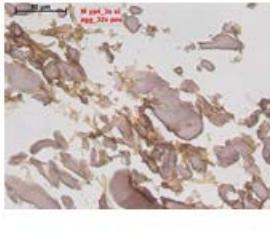
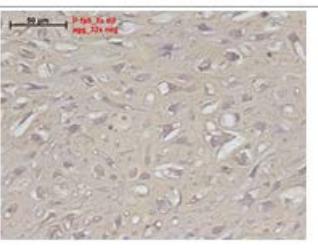
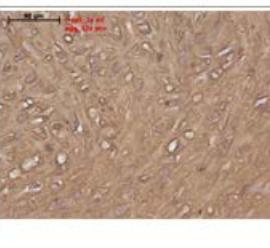
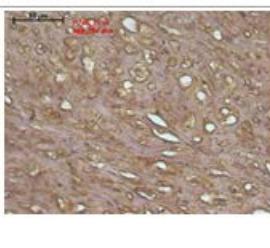
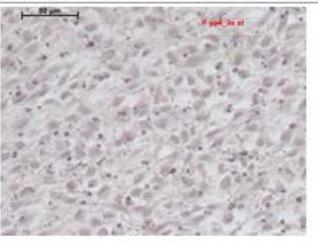
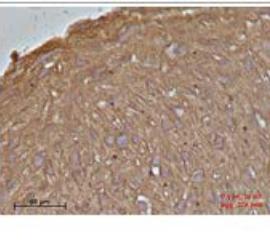
Protocole:

- Préparer la solution enzymatique:
- Hyaluronidase (2 mg/mL in buffer, Sigma)
 - Buffer contains 0.05M Tris-HCl, 0.1% CaCl₂ and 0.15M NaCl in DI H₂O.
1. Rehydrater les lames, étape faite avec la machine en HCF
 2. Laver 5 min dans du PBS avec 0.02% Triton
 3. Entourer les coupes avec le ImmEdge pen
 4. Traiter les lames 30 min à 37° avec la solution de hyaluronidase
 5. Laver 5min dans du PBS avec 0.02% Triton
 6. Bloquer les peroxydases endogènes avec BLOXALL 10 min à RT
 7. Laver 5 min dans du PBS + 0.02% Triton
 8. Bloquer les sites non spécifiques env 1h à RT
 - ✓ 3ml solution de bloquage
 - 0.5ml PBS
 - 2.5ml HNS
 - 150ul FBS
 - 30ul 10% 0.1% triton

NE PAS LAVER

1. 1er Ac dilution 1/100 [1 ug] overnight à 4° dans une chambre humide
 - ✓ 3ml de buffer
 - 1ml de PBS
 - 2ml NHS
 - 150ul FBS
 - 30ul 10% 0.1% triton
2. Laver 5min dans du PBS +0.02% Triton
3. 2ème Ac mettre quelques gttes de ImmPRESS sur chaque coupes env 1-2h à RT
4. Laver 5min PBS
5. Révéler avec ImmPACT env 2 min
 - 1gkte solution
 - 1ml de diluant
6. Laver dans de l'eau distillée
7. Contrecolorer avec Hématoxylin de Mayer pd 10min
8. Déhydrater et mettre une lamelle avec Eukitt

Résultats:

nég	Dif	No dif	
			M chondroguide F p4 2s
			M chondroguide Yp4 3s
			P Fp5 3s
			P Yp4 3s

Remarques et conclusion:

- L'anticorps fonctionne correctement
- Il est claire que si l'on mets des cellules dans la matrice chondroguide il faut les mettre dans le bon sens (ATTENTION ces matrices ont un côté poreux).
- La formation d'agrecan se fait vraiment lorsque les cellules sont en 3D comme le démontre les pellets .
- Il n'y a pas d'agrecan si l'on mets les cellules même fœtales dans des matrices sans qu'elles aient une stimulation (différenciation)