

Versuch im Rahmen des Praktikums „Biophysikalische Chemie – Spektroskopische Methoden“ für Studierende der Fachrichtung Molekularbiologie/Biochemie (5. und 6. Semester)

Dr. Walter Richter/Dr. Martin Westermann, FSU

Thema: Immunogoldmarkierung an Gefrierbruchreplika

Grundlage der Methode ist die **Gefrierbruch-Transmissionselektronenmikroskopie** (Freeze-fracture transmission electron microscopy – FFTEM, „Gefrierätzung“):

Die nativen biologischen Proben werden durch Einfrieren physikalisch fixiert (**Lebensnaher Zustand**) und in einer *Gefrierbruchanlage* bei sehr tiefen Temperaturen aufgebrochen. Die *Gefrierbruch*-Flächen werden mit Pt und C bedampft, um die Bruchstrukturen mit Hilfe eines Oberflächenabdruckes zu konservieren (**Replikation**). Nach der Pt-C-Bedampfung kann die Probe aufgetaut werden. Anhaftende Präparatereste werden vom Abdruck (**Replika**) mit Hilfe von Chemikalien entfernt (**Reinigung**). Die Replika wird im Transmissionselektronenmikroskop abgebildet und spiegelt die Proben(z.B. Zell-)morphologie wider.

Für die **Immunogoldmarkierung** darf die Replika nur unvollständig gereinigt werden. Bei Verwendung von Na-Dodecylsulfat (Sodium dodecyl sulfate – SDS) zur Reinigung verbleiben Zielmoleküle (Lipide, Proteine etc.) an der Replika und können mit geeigneten Antikörpern immunmarkiert werden. Ein **1. Antikörper** (AK) wird gegen das Zielmolekül (Rezeptor) gerichtet, ein **2. Antikörper**, der mit einer Gold-Partikel (>1nm) gekoppelt ist (**Au-gekoppelter Antikörper**), in einem zweiten Schritt gegen den 1.AK. Der Rezeptor-Antikörper-Komplex wird chemisch mit Glutardialdehyd (GA) stabilisiert (vernetzt), die Replika mit Aqua bidest. gewaschen und mikroskopiert. Die Goldpartikel sind im Elektronenmikroskop gut sichtbar, ihre Lokalisation liefert detaillierte Rückschlüsse über die Verteilung des Rezeptors in der Probe. Doppelmarkierungen sind möglich.