

CAPÍTULO 6

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

PROTOCOLO DE PROCESAMIENTO DE MUESTRAS DE CULTIVOS CELULARES [12, 14]

Día 1. Siembra celular

1. Sembrar una placa de 6 pocillos (*130184, Biolite*) por condición.

Día 2. Tratamiento y procesamiento de muestras

2. Realizar el tratamiento a los tiempos y concentraciones correspondientes.
3. Eliminar el medio.
4. Lavar con PBS y retirar.
5. Tripsinizar cada pocillo con 200 μ l/pocillo.
6. Recoger con un poco de medio las células adheridas a los 6 pocillos (*130184, Biolite*) de cada placa (condición) en tubos de centrifuga de 1,5 ml.
7. Poner las muestras en frío.
8. Centrifugar a 1.200 rpm, 5 min, 4 °C.
9. Retirar todo el sobrenadante.
10. Lavar con PBS el pellet con cuidado que no se despegue.
11. Añadir 300 μ l de glutaraldehído al 2,5% (*163853, Panreac*) cubriendo bien el pellet.
12. Reposar 2 horas en hielo o en la nevera.
13. Centrifugar 1.200 rpm, 5 min, 4 °C.
14. Retirar el sobrenadante con mucho cuidado.
15. Añadir 250-300 μ l de cacodilato a pH 7,4 (*Sodium Cacodylate 0,1 M, Alfa Aesar*), suavemente por la pared para que el pellet no se mueva y quede cubierto.

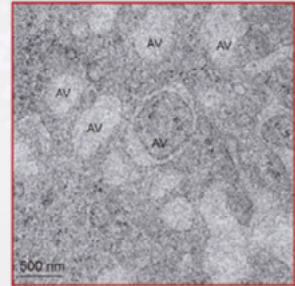
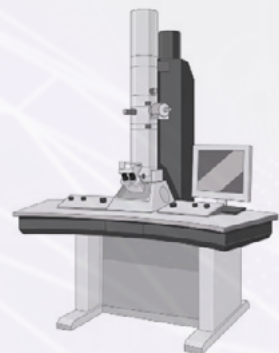


Imagen de MET [12]
Estructuras autofágicas



16. Dejar reposar 5 min en hielo.
17. Centrifugar a 1.200 rpm, 3-4 min 4 °C.
18. Retirar el sobrenadante (cacodilato).
19. Añadir 250-300 μ l de cacodilato 0,1 M a pH 7,4, suavemente por la pared para que el pellet no se mueva y quede cubierto.
20. Centrifugar a 1.200 rpm, 3-4 min 4 °C.
21. Quitamos sobrenadante con mucho cuidado.
22. Añadimos cacodilato hasta que se cubra el pellet completamente y metemos las muestras en la nevera hasta que se envíen.

