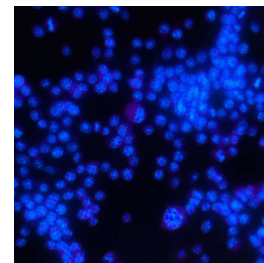


Jun 30, 2025

🌐 Inmuno directa η -caderina (eta caderina, e caderina) (AF488)

DOI

<https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.261gekp4yg47/v1>



Cristian Hernández¹

¹None



Cristian CRH Hernández

Tec de Monterrey

Create & collaborate more with a free account

Edit and publish protocols, collaborate in communities, share insights through comments, and track progress with run records.

Create free account

OPEN  ACCESS



DOI: <https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.261gekp4yg47/v1>

Protocol Citation: Cristian Hernández 2025. Inmuno directa η -caderina (eta caderina, e caderina) (AF488). protocols.io <https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.261gekp4yg47/v1>

License: This is an open access protocol distributed under the terms of the **Creative Commons Attribution License**, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited



Protocol status: Working

We use this protocol and it's working (:

Created: June 30, 2025

Last Modified: June 30, 2025

Protocol Integer ID: 221278

Keywords: IHC, immunohistochemistry, antigen, assay, protocol, AF488, fluorescence, microscopy, e-cadherin, cadherin conjugate antibody, bioprinted tissue, fluorescent microscope, engineered sample, antibody, proteins in cells alight green, assay, binding protein, trujillo lab, eta caderina, protein, cell

Abstract

Complete protocol for 3D bioprinted tissue engineered samples from Álvarez-Trujillo Lab using SC8426 E-cadherin conjugate antibody with AF488. Samples processed as this are to be seen on a fluorescent microscope. Binding proteins in cells alight green.

Direct immuno fluorescent assay E-cadherin (AF488) for 3D constructs

Attachments



[immunocytochemistry...](#)

247KB



[immunohistochemistry..](#)

1.5MB



[VL_H-1700_UserGuide....](#)

373KB

Image Attribution

Cristian Hernández

Guidelines

This is a non sterile protocol, but care must be taken as some of the reagents are toxic. If you're unfamiliar with the protocol you should proccess one sample at a time to avoid missing steps and ruining the assay.



Materials

- PBS o HBSS dependiendo de la aplicación
- Paraformaldehído 4 % preparado en PBS filtrado
- Tritón-X 0.1 % preparado en PBS
- (Opcional) Buffer de almacenamiento: Azida de sodio 0.1 % en PBS
- (Opcional) Citrato de sodio pH 6
- (Opcional) Buffer PIER: 1 mL CaCl_2 1 % + 1 mL Tripsina 0.5 % + 8 mL Agua destilada pH 7.8
- Albúmina sérica bovina (BSA) 10 % preparada en PBS
- Tween-20 0.1 % diluido en PBS
- Anticuerpo primario conjugado E-cadherina con AF488 (verde) SC8426
- Micropipeta 1000 μL
- Micropipeta 200 μL
- Micropipeta 20 μL
- Baño de agua
- Papel aluminio
- Refrigerador
- Microscopio óptico de fluorescencia
- Fasco para RPBI líquido
- Contenedor de PRBI sólido
- Amor

Protocol materials

⊗ HBSS Thermo Fisher Scientific

⊗ PBS (1X) Merck MilliporeSigma (Sigma-Aldrich)

⊗ Paraformaldeído PBS

⊗ Tritón-X PBS

⊗ Tween 20 PBS

⊗ Albúmina sérica bovina (BSA)

⊗ VECTASHIELD® Vibrance™ Antifade Mounting Medium H-1700 Vector Laboratories Catalog #H-1700-10

⊗ E-cadherin AF488 Santa Cruz Biotechnology Catalog #sc-8426

Safety warnings

- ❗ El paraformaldehído es toxico y emana vapores, evitar la exposición no controlada. El RPBI deberá ser diluido con cloro antes de desecharlo.



Before start

Este es un protocolo largo, hay que asegurarse de que se cuenta con el suficiente tiempo y todos los reactivos estén preparados desde el principio. Aplicar demasiado calor a alguno de los pasos que así lo requieran va a arruinar la muestra. El paraformaldehído es tóxico y debe manejarse con precaución.

Las tinciones de proteínas de adhesión no se permeabilizan.

El nombre del antígeno es η -caderina, letra griega eta, no confundir con la n-caderina, letra latina n. La mayoría de la gente lo llama "e-caderina", pero si quieres farolear "eta caderina" suena muy padre.



Checklist de reactivos y material

- 1  PBS (1X) Merck MilliporeSigma (Sigma-Aldrich)  HBSS Thermo Fisher Scientific
- 2  Paraformaldeído PBS (4 % preparado en PBS filtrado)
- 3  Tritón-X PBS (0.1 % preparado en PBS)
- 4 (Opcional) Buffer de almacenamiento:
Azida de sodio 0.1 % en PBS
- 5 (Opcional) Citrato de sodio  .
- 6 (Opcional) Buffer PIER:
1 mL CaCl_2 1 %
1 mL Tripsina 0.5 %
8 mL Agua destilada pH 7.8
- 7  Albúmina sérica bovina (BSA) 10 % preparada en PBS.

Note

No agitar excesivamente al preparar. (Por las burbujas this is, it's not like its gonna degrade, just lose quality in it)

- 8  Tween 20 PBS (0.1 % diluido en PBS)
- 9 Anticuerpo primario conjugado E-cadherin con AF488 (verde) SC8426
 E-cadherin AF488 Santa Cruz Biotechnology Catalog #sc-8426
- 10
 - Micropipeta 1000 μL
 - Micropipeta 200 μL



- Micropipeta 20 μL
- Baño de agua
- Papel aluminio
- Refrigerador
- Microscopio óptico de fluorescencia
- Fasco para RPBI líquido
- Contenedor de PRBI sólido
- Amor

11 Determinar el caso a seguir en la inmuno dependiendo de la muestra.



STEP CASE

Tinción a fibra 23 steps

Cuando la inmuno debe ser realizada en fibras tridimensionales de máximo 1 mm de grosor (K4E3L)

Preparación de la muestra

14m

12 De ser posible, mover la muestra a un recipiente libre de material biológico.

6m

Note

Utilizar una punta de micropipeta (sobretudo las de 200 μL y 10 μL) hará que las fibras se partan. Es recomendable usar una o múltiples cucharas o espátulas anguladas o una punta de micropipeta de succión.

13 Lavar 3 veces la muestra con *Hanks* ( HBSS Thermo Fisher Scientific) a temperatura ambiente, en intervalos de  00:05:00 . **Sin aspirar la fibra.**

5m

14 De ser posible, alejar la fibra de las orillas del recipiente.

2m

Note

No es imperante realizar este paso, puesto que la refracción de la fluorescencia no se ve afectada al ser luz reflejada desde el fondo del microscopio, **sin embargo, no será posible obtener imágenes consistentes en Campo Claro.**

15 Retirar la solución de lavado restante. **Sin aspirar la fibra.**
Evitar que la fibra se deshidrate.

1m



Fijado

37m 30s

- 16 **Manejar el paraformaldehído (PFA) con cuidado.**



Safety information

Emite vapores tóxicos e irritantes de la vía aérea. Desechar los guantes posterior a su manipulación.

- 17 Colocar una cantidad de  Paraformaldeído PBS a temperatura ambiente buena para **cubrir y sumergir completamente** la muestra.

30s



Note

Menos PFA puede ocasionar hipofijación y más células sueltas circulares al final.

- 18 Fijar durante mínimo  00:20:00 a temperatura ambiente en un entorno sin humedad protegido de la luz.

20m



- 19 Lavar 3 veces la muestra con PBS (1x) a temperatura ambiente, en intervalos de 3 minutos.

12m

- 20 **(Opcional)** Si la tinción no se hace inmediatamente se puede almacenar de 1 a 2 semanas a 4° humectando el constructo con el *buffer* de almacenamiento.

5m



- 21 El siguiente paso es el bloqueo, sin permeabilizar.

Note

Las tinciones de proteínas de adhesión NO SE PERMEABILIZAN. La acción surfactante de las soluciones deshace la membrana.

Bloqueo

1h 31m 30s



22 Colocar una cantidad de  Albúmina sérica bovina (BSA) a  37 °C buena para  30s
cubrir y sumergir completamente la muestra.

23 Incubar durante mínimo  01:30:00 a temperatura ambiente  1h 30m



24 Lavar la muestra con PBS (1x) a temperatura ambiente, para remover el exceso de BSA.  1m
Sin aspirar la muestra.



25 Utilizar la dilución estándar de Cristian para anticuerpo primario (pAb) de 1:150 para diluir en  Tween 20 PBS  1m



Note

No realizar más de 1 mL de solución de anticuerpo a la vez puesto que solo dura 1 semana fuera de su vial original

STEP CASE

Tinción de mismo día 9 steps

Cuando la tinción se va a observar en el microscopio durante el mismo día que se tiñó

26 Añadir o distribuir toda la dilución de pAb en la muestra  30s

Note

Para placas de 6 pozos o petris de 35 mm (las bebés)  300 µL son suficientes para impregnar todo el fondo, pero  500 µL son recomendados para una fibra estándar de 1 mm



27 Incubar durante mínimo  03:00:00 a temperatura ambiente completamente cubierto de la luz.  3h



- 28 Lavar 3 veces la muestra con PBS (1x) a temperatura ambiente, en intervalos de 3 minutos. **Sin aspirar** la muestra.

12m

Note

Al ser agentes surfactantes (jabón) el triton y el tween generan espuma. El lavado deberá remover la espuma

- 29 Preparar la muestra para el microscopio.

Note

Si se planea tomar campo claro es recomendable dejar la fibra hidratada, no nadando.

Microscopio

19m

- 30 Colocar el soporte adecuado para el contenedor donde se realizó la tinción y fijarlo a la platina.

3m

- 31 Seleccionar el canal AF488 y el objetivo 2.5x

1m

**Note**

La fluorescencia generalmente es débil en el objetivo 2.5x, pero se utiliza para escoger la dirección general de la señal puesto que hacer barridos de búsqueda es mucho más laborioso utilizando el objetivo 10x

- 32 Realizar la adquisición de la muestra. ⌚ 00:15:00 por muestra

15m

Note

Si bien el *ApoTome* no puede proveer la definición esperada en *Optical Sectioning*, configurarlo a *Conventional Fluorescence* contribuye a la mejora notable de la calidad de imagen a costa de un tiempo de adquisición de más del triple.



Note

Para guardar una imagen de *ApoTome* primero se tiene que generar como imagen dentro de las opciones del *ApoTome* en la cinta inferior derecha. El nuevo archivo debe contener el sufijo "ApoTome" (ej. Snap-XXXX-ApoTome).

Note

Favorecer intensidades del led bajas y tiempos de exposición altos para evitar el velado de la muestra

Note

Dar prioridad a tomar imágenes de fluorescencia sobre las de *brightfield*

Note

El *ApoTome* no puede tomar imágenes de campo claro

Almacenamiento/Desecho

- 33 Las muestras teñidas pueden ser montadas con agente fijador de fluoróforo



VECTASHIELD® Vibrance™ Antifade Mounting Medium H-1700 **Vector**
Laboratories Catalog #H-1700-10

para almacenar durante semanas a temperatura ambiente.

- 34 Si las muestras no serán usadas pueden ser descartadas en RPBI

Protocol references

<https://www.scbt.com/p/e-cadherin-antibody-g-10>