


# ELEKTRON MİKROSKOPİK ÇALIŞMALARDA İMMUNOGOLD ETİKETLEME TEKNİKLERİ

Bükay Yenice Gürsu<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>*Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Merkezi Araştırma Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi (ARUM), Eskişehir, Türkiye*

*\*Corresponding Author:*  
E-mail: [bukayyenice@gmail.com](mailto:bukayyenice@gmail.com)

(Received 10<sup>th</sup> October 2024; accepted 03<sup>rd</sup> December 2024)

 <https://orcid.org/0000-0002-6822-3484>

**ÖZET.** Elektron mikroskopik çalışmalarda immün etiketleme teknikleri biyolojik moleküllerin doğal durumlarındaki lokalizasyonlarını olabildiğince koruyarak hata payını en aza indireyecek şekilde belirlemeye ve bunu görüntülemeye yarayan tekniklerdir. Temeli immün çalışmalardaki antijen-antikor ilişkisine dayanılarak geliştirilmiştir. İmmunogold etiketleme, protein çalışmaları ve hücrelerde indiktor yapıların varlığını saptamak için de çok güçlü bir tekniktir. Hücrelerin ultrayapısal olarak problemlendiği bir teknik olup kullanılan altın probun mükemmel elektron saçılma özelliği sayesinde elektron mikroskopik immün çalışmalar görüntüleme bakımından da önemli çalışmalardır. Bu derlemede rutin elektron mikroskopik çalışmalarda kullanılacak modifikasyonlarla immün etiketleme yöntemlerinden ve immün çalışmalara özel geliştirilmiş tekniklerden bahsedilecektir.

**Anahtar Kelime:** *Immunogold Etiketleme, Elektron Mikroskopi, Gömme Sonrası Etiketleme, Gömme Öncesi Etiketleme*

## IMMUNOGOLD LABELING TECHNIQUES IN ELECTRON MICROSCOPIC STUDIES

**ABSTRACT.** Immunolabeling techniques in electron microscopic studies are techniques that are used to determine and visualize biological molecules in a way that minimizes the margin of error while preserving their localization in their natural state as much as possible. It was developed based on the antigen-antibody relationship in immune studies. Immunogold labeling is also a very powerful technique for protein studies and for detecting the presence of indicator structures in cells. It is a technique that allows ultrastructural probing of cells and electron microscopic immune studies are also important studies in terms of imaging due to the excellent electron scattering property of the gold probe used. In this review, immunolabeling methods with modifications that can be used in routine electron microscopic studies and techniques developed specifically for immune studies will be discussed.

**Keywords:** *Immunogold Labeling, Electron Microscopy, Post-Embedding Labeling, Pre-Embedding Labeling*

## GİRİŞ

Elektron mikroskopik çalışmalarda immunogold (immün altın etiketleme) tekniği, bir numune içindeki spesifik antijenleri tespit etmek için altınla konjuge edilmiş antikorların kullanımını içerir. Bu teknik hücre biyolojisi, tıp ve patoloji gibi çeşitli alanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır. İmmünogold etiketleme, belirli proteinlerin veya yapıların ultrayapısal düzeyde lokalizasyonunu görselleştirmek için gömme öncesi ve gömme sonrası teknikler dahil olmak üzere farklı yöntemler kullanılarak gerçekleştirilebilir.

Ayrıca elektron mikroskopik örneklerin etiketlenmesi için kullanılacak biyolojik materyal için kryo immobilizasyon yöntemleri ya da kimyasal fiksasyon yöntemlerinden seçim ve planlama yapılmalıdır. Tüm basamaklar için en önemli aşama çalışmaya uygun numune ile işlemlere başlamaktır. Numune büyüklüğü, doku hasarları, hücre kültürlerine uygulanmış madde miktarı ile başlangıç konsantrasyonu gibi bir çok faktör elektron mikroskopundaki görüntüleme kalitesini etkileyecektir. İmmün etiketleme stratejilerine geçmeden önce kullanılan kimyasalları, araçları ve biyolojik materyallerin hazırlanma safhalarını belirtmek gereklidir [1].

### *İmmün etiketleme hazırlık*

Fiksasyon çalışmanın temel başlangıcıdır, hücrelerin ve dokuların doğru tekniklerle yapısal bütünlüğünü korumak ve böylece elektron mikroskopik olarak incelenebilmelerini sağlamaktır. Rutin elektron mikroskopik örnek hazırlama başlangıcında kimyasal fiksasyon kullanılır. Bu işlem sırasında, biyolojik örnek genellikle aldehitler ve osmiyum tetroksit ( $OsO_4$ ) kullanılarak kimyasal olarak fikse edilir. En çok kullanılan aldehitler formaldehit ve glutaraldehit ile hazırlanan fiksatiflerdir. Bu tür fiksasyon çapraz bağlanmaya neden olarak proteinlerin toplanmasına, yüksek oranda hidratlanmış glikanların çökmesine ve lipitlerin kaybına yol açar. İmmün etiketleme sırasında seçilen metoda bağlı olarak fiksatif ajanların daha ılımlı ve kombinasyonlarının kullanımı ile bu kayıpların azaltılması hedeflenir. İmmüno-EM (immün elektron mikroskopisi) çalışmalarında kullanılan (% 0.2-2) Glutaraldehit, (% 2-4) Formaldehit - Paraformaldehit ve %1 Akrolein gibi fiksatifler kullanım amacı doğrultusunda tekli ya da farklı kombinasyonlar şeklinde hazırlanırlar [2, 3, 4]. Fiksasyonun kalitesini pH, sıcaklık, ozmolarite ve süre gibi faktörler etkileyebilir. Fiksasyon sırasında pH fizyolojik bir aralıkta tutulmalıdır. Bunun için uygun tamponlar; fosfat tamponu, HEPES, PIPES veya PHEM tamponudur. Fiksasyon ilk olarak oda sıcaklığında başlamalı ve ardından numuneler  $4^{\circ}C$ 'de daha uzun süre saklanmalıdır. Fizyolojik ozmolarite fiksasyonda etkilidir kademeli artan bir konsantrasyonla geçiş yüksek ozmolarite sorununu çözebilir. Süre çalışılacak örneğe bağlı olarak ayarlanmalıdır. Uzun süreli fiksasyonun kesit ve görüntü kalitesini olumsuz yönde etkileyebilme durumu unutulmamalıdır.

İmmüno-EM çalışmalarında kullanılabilen rutin hazırlıklara alternatif bir çok farklı yöntemler de kullanılmaktadır. Kimyasal fiksasyona en büyük ve etkili alternatif kriyo (dondurarak) fiziksel fiksasyondur. Daldırma Dondurma (Plunge Freezing-PF), hücresel makromoleküllerden ve komplekslerden  $10\ \mu m$  kalınlığa kadar tüm hücrelere kadar geniş bir kalınlık aralığı için tercih edilen yöntemdir. Yüksek Basınçlı Dondurma (High Pressure Freezing)  $10\ \mu m$ 'den daha kalın numuneler, PF ile buz kristalleşmesi olmadan uygun vitrifikasyonu sağlamak için çok kalındır ve kriyo-EM'de doğrudan görüntülenemez. Buz kristallerinin nükleasyonu sıcaklığa ve basınca bağlıdır ve bu etki Yüksek Basınçlı Dondurmada (HPF) kullanılır. Yüksek basınç, kristal büyümesini ve buzun çekirdeklenme oranını önemli ölçüde azaltır. Sonuç olarak,  $\sim 250\ \mu m$ 'ye kadar olan

numuneler, yüksek basınç (yani 2048 bar) uygulanarak ve hızlı soğutma yapılarak camsı olarak dondurulabilir. Kendiliğinden Basınçlı Hızlı Dondurma (Self-Pressurised Rapid Freezing - SPRF) yönteminde malzeme, her iki ucundan kapatılmış standart bakır HPF kılcallarına yüklenir ve sıvı nitrojen, sıvı propan veya sıvı etana daldırılır. Bu sabit hacimli işlemin özü, dondurma işlemi sırasında kapalı bir kılcalda suyun hacmi arttığında basıncın artmasıdır. Suyun sabit hacimde farklı kristal buz formlarına dönüşümü, güçlü bir basınç artışına neden olur ve kriyo-EM ve elektron kırınımı ile belirlenen numunenin amorfizasyonunu teşvik eder. SPRF yöntemi ile vitrifiye edilen numunelerin derinliği ve kalitesi, HPF ile hazırlanan numunelere benzerdir, ancak SPRF ile vitrifikasyon sırasında orijinal su kütlesinin yaklaşık %50'si kristalin buza dönüşür, bu nedenle numunenin sadece bir kısmı oluşan buz tarafından hasar görür. Bahsedilen bu vitrifikasyon yöntemleri ile sadece saflaştırılmış izole edilmiş organeller, makromoleküler kompleksler, virüsler, küçük prokaryotik hücreler ve ökaryotik hücrelerin daha ince kısımları (0,5 µm'ye kadar) gibi ince vitrifiye edilmiş numuneler doğrudan kriyo-elektron mikroskopu altında görüntülenebilir. Daha kalın vitrifiye edilmiş numuneler, görüntüleme öncesinde görselleştirilebilecek kadar ince kesitler haline getirilmelidir. Bunun için kriyo koşulları altında kesit alınması gereklidir. Vitröz malzeme, Kriyo elektron mikroskopik vitröz kesit (CEMOVIS) prosedürü ile bir kriyo-ultramikrotom ile numuneler kesilebilir yada odaklanmış iyon ışını (FIB) yöntemleriyle kesitler alınabilir. Vitröz halde hazırlanan numunelerde en büyük sorun zayıf kontrasttır. Hücresel bileşenlerin benzer yoğunlukta olması ve dağılımlarının tek düze olması düşük kontrasta sebep olmaktadır. Bununla beraber camsı malzeme elektronlara karşı dayanıksızdır kesitlerin görüntülenme sırasında hareket etmesine sebep olur. Camsı olarak dondurulmuş numunelerin temel dezavantajı, çalışması için ortam koşulları gerektirdiğinden kesitte immünogold etiketlemenin işe yaramamasıdır. Bu nedenle, Tokuyasu tekniği ve dondurarak değiştirme (freeze substitution- FS) ve ardından gömme işlemleri, vitrifiye edilmiş numuneye tamamlayıcı tekniklerdir FS yöntemi, dondurarak ikame, dehidratasyon ve kimyasal fiksasyonun ardından reçinelere gömülmesinden oluşur [5]. İlk adımda, kriyo-immobilizasyondan sonra bir numune aseton, metanol veya etanol gibi organik çözücülerle dehidratlanır. Bu adım tipik olarak -78°C ila -90°C arasındaki sıcaklık aralığında gerçekleşir. İkinci adımda, biyolojik materyal, ilk adımdakiyle aynı sıcaklıkta seçilen organik çözücülerde reaktif olmayan fiksatiflerle yavaşça infiltre edilebilir. Sıcaklık yükseltilir yükseltilmez, fiksatifler -90°C ila -30°C arasında yerinde reaksiyona girmeye başlar. Fiksatif çözeltilerin ana bileşenleri, aseton veya alkollerde karışık konfigürasyonlarda aldehitler, OsO<sub>4</sub> ve uranil asetatıdır. Reçine kesitler geliştirilmiş kontrastıyla hücre ultra yapısının mükemmel bir genel görünümünü elde etmeyi sağlar. Kriyo-EM görüntülerinden elde edilen bilgiler, reçine kesitlerinden elde edilen görüntüleri tamamlayabilir [6,7,8]. Ayrıca reçine, vitröz kesitlerle karşılaştırıldığında daha büyük örnek alanlarının analizini mümkün kılar, elektron ışınında daha kararludur ve elde edilmesi daha kolaydır. Reçine kesitleri altın nanopartiküllerle sonradan etiketlemeye de izin verir. Tokuyasu tekniği protokolüne göre biyolojik materyal düşük konsantrasyonlarda aldehitlerle kimyasal olarak sabitlenir, sakarozda kriyo-korunur, sıvı nitrojende dondurulur ve kuru bir bıçakla kriyo-ultramikrotomda düşük sıcaklıkta (yaklaşık -100°C) kesilir. Kriyo-kesitler bıçak kenarından alınır, çözülür ve mikroskop slaytlarına veya formvar karbon kaplı gridlere aktarılır [9]. İnce kesitler doğrudan elektron mikroskopunda gözlemlenebilir, immün etiketlenebilir (çoğunlukla antikorlarla) ya da in situ hibridizasyonla mRNA lokalizasyonu için kullanılabilir [10, 11].

İmmün çalışmalarda tercih edilecek hazırlık yöntemine göre prosedür kesit alma basamaklarını içeriyorsa kriyo ya da oda sıcaklığına göre destek ya da gömme materyali seçilmelidir. Kriyo çalışmalarda %2 düşük erime noktalı agaroz (reçine gömme) veya %12 jelatin (Tokuyasu tekniği) destek materyali tercih edilebilir. Reçine gömme için çok çeşitli reçineler mevcuttur. Epon, Spurr gibi epoksi reçineler, düşük sıcaklıklı Lowicryl gibi metakrilatlar veya London Resins gibi akrilik reçineler gömme ortamı olarak başarıyla kullanılır. Epon gibi epoksi reçineler, membran reseptörleri gibi büyük proteinlerin antijenliğini azalttığı bilinmektedir ancak küçük moleküller için iyi çalışırlar ve ultra yapısal koruma için harikadır [12, 13]. Gömme işlemi içeren çalışmalar rutin belli basamaklar içerir. Fiksasyonu gerçekleştirmiş numuneler için birinci basamak dehidrasyondur. Örnekten suyu uzaklaştırmak kademeli bir dizi aseton veya etanol serileri (%30, %50, %70, %90, %100) kullanılır. Daha sonra reçinenin bir çözücü ile numune infiltrasyonu için kademeli olarak yer değiştirilir. Gömme materyali içinde doku ya da hücreler konumlandırıldıktan sonra seçilen gömme materyaline bağlı olarak UV, ısı veya kimyasal olarak polimerleşme uygulanarak son sertliğine ulaşması için kesit için bloklar oluşturulur. İmmün etiketlemelerde kesitler nikel ya da altın gridler üzerine toplanır. Nikel gridler manyetik olmaları sebebiyle kullanım sırasında zorluklar çıkarabilse de inert olması, immün veya enzim reaksiyonlarında toksik olmamaları sebebiyle tercih edilirler [14].

### **İmmün etiketleme**

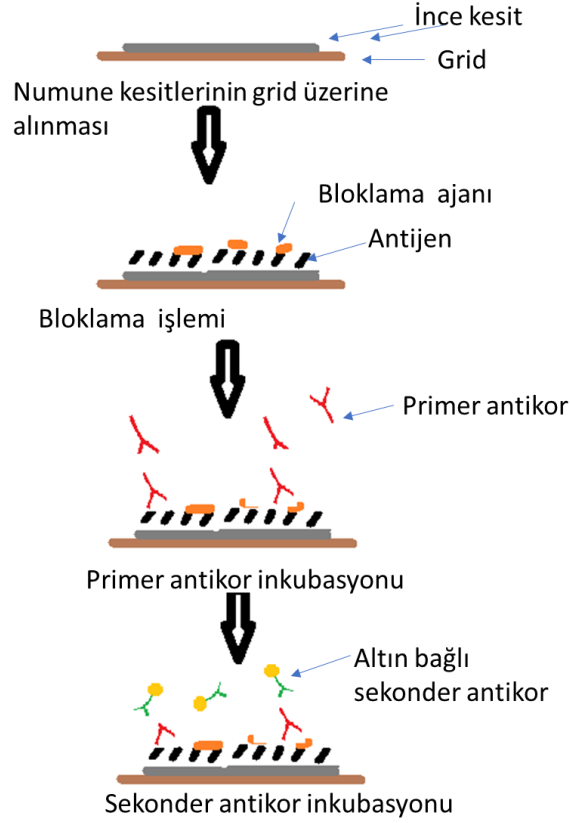
Antijen antikör çalışmalarda immün deneylerde öncelik hedef antijen saflaştırılması ve ardından farklı türden bir hayvana enjekte edilerek immün yanıt oluşumu teşvik etmek ardından istenilen antikörlerin toplanmasıdır. Antikör antijen etkileşimi oldukça spesifiktir ve doğru bağlanma gösterir. Antikörler mevcut olduğunda, uygun bir işaretleyiciye bağlanmaları koşuluyla dokular, hücreler ve (ultra ince) kesitler üzerindeki antijenleri görselleştirmek için kullanılabilirler. Antikörleri elektron mikroskopunda görebilmek için elektronca yoğun, moleküler ağırlığı fazla bir işaretleyici gereklidir. İlk denemelerde elektronca yoğun osmium tetroksit sonrası fiksasyonu sonrası gerçekleştirilmiştir. Ancak işaretleyicinin/proben doku elemanlarının koyuluğu ve kontrastı arasında görüntülenmesini zorlaştırması ve miktar tayinin zor olması bu yöntemin handikabıdır. Fiksasyon yöntemleri doğru seçilerek ve uygun bir işaretleyici belirlendiği takdirde immün etiketleme elektron mikroskobu için de kolay uygulanabilir bir yöntemdir. Faulk ve Taylor, altın parçacığını elektron mikroskobu için bir işaretleyici olarak kullanmışlardır [14]. Altın parçacıkları farklı boyutlarda yapılabilir ve çok çeşitli biyolojik aktif moleküllerle birleştirilebilir: enzimler, antikörler, toksinler, lektinler, protein A gibi bir çok konjugat oluşturulabilir. Probu antikörlerin kullanmasından beri immüno-altın etiketleme, transmisyon veya taramalı elektron mikroskopunda molekülleri görselleştirmek için en yaygın kullanılan tekniktir. Antikörlerin elde edilmesi, bulunabilirliği ve raf ömrü gibi bir çok sınırlayıcı etmeni vardır. Bundan dolayı birincil antikörler çoğunlukla elektron yoğun bir işaretleyiciye bağlanmaz. Bunun yerine, birincil antikör, altına bağlanan başka bir IgG veya altına bağlanan Protein A- Protein G aracılığıyla görselleştirilir. Protein A, *Staphylococcus aureus*'un hücre duvarından türetilmiş, IgG'nin Fc kısmına bağlanan, konjuge edildiğinde, immüno-metrik analizler, western blotlar ve immüno-sitokimya için evrensel bir etiket olarak kullanılabilir bir moleküldür. (Şekil 1.) [16].

İmmüno-elektron mikroskobu için çok küçük prob, elektronca yoğun bir işaretleyici idealdir. Daha küçük parçacıklara dayalı konjugatlar, daha büyük parçacık tabanlı

konjugatlardan daha verimlidir. İskelet kaslarında WGA-bağlanma proteini için 1.5 nm lik altın parçacıklar kullanılırken, kalpte atrial bir peptid için 40 nm lik altın parçacıkları ile görüntüleme gerçekleştirilmiştir [17]. Çok küçük prob kullanımında görselleştirme zorluğu varsa gümüş iyileştirme yapılabilir. Çok hassas numunelerin SEM ile görüntülenmesinde daha büyük parçacıklı proplar tercih edilebilir. Bu gümüş gibi ultra yapısal iyileştirme reaktifleri kullanımını önleyebilir. Dokular içinde altının tespiti için yöntemler Danscher [18] tarafından tanıtılmış ve daha sonra immün altının gösterilmesi için uyarlanmıştır. Danscher gümüş zenginleştirme solüsyonunun, önceden gömülmüş immünotokimiyada ultra küçük altın parçacıkları için etkili olduğu gösterilmiştir. Ancak, hücrelerin ultra yapısal görüntüleme bu prosedürün ardından tehlikeye girmiştir. Orijinal Danscher solüsyonu asidikti (pH 3,5). Solüsyonun asiditesinin, gümüş zenginleştirmeye tabi tutulan örneklerdeki zayıf ultra yapısal ayrıntının nedenlerinden biri olduğu düşünülmüştür. Sonraki çalışmalar, farklı indirgeyici ajanlarla kontrol edilebilir gümüş zenginleştirmeye izin verirken reaksiyonu daha yüksek pH'ta tamponlamaya odaklanmıştır. Günümüzde kullanılan gümüş zenginleştirme solüsyonunun son pH'ı 6,0'dır ve indirgeyici madde olarak n-propilgallat içerir ve gömme öncesi immünotokimyasında kullanımı sonrasında hücrel morfoloji iyi gözlemlenir [19].

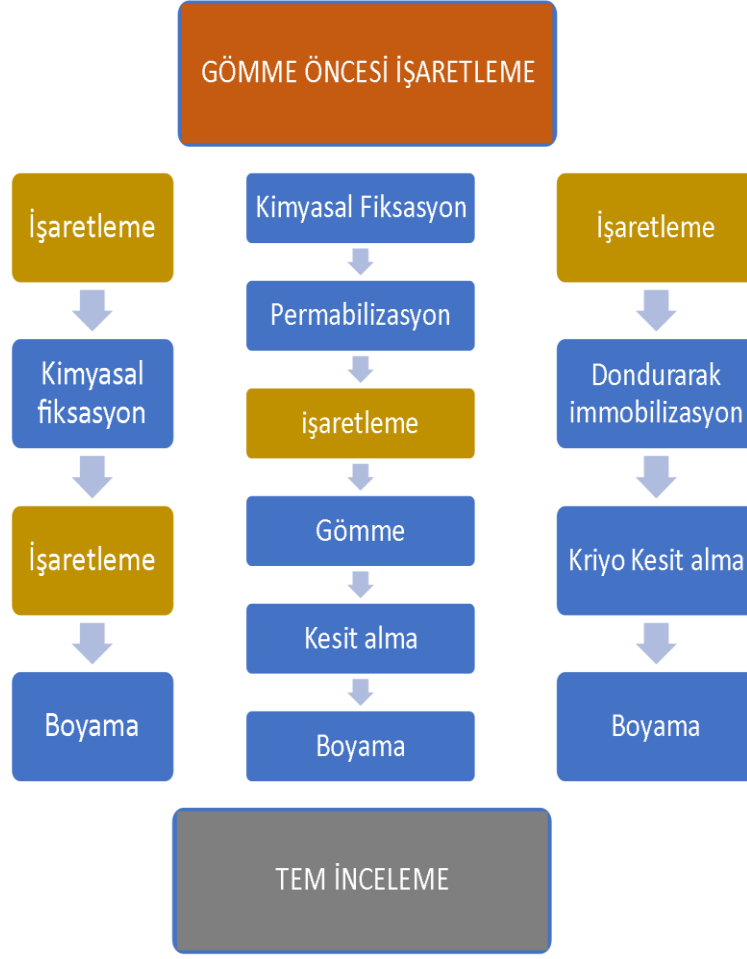
Elektron mikroskobu için en iyi görünür işaretleyiciler, IgG'lere bağlı altın parçacıkları, Protein A gibi bakteriyel proteinler, lektinler vb.'dir. Bunlar çok çeşitli boyutlarda (0,8 – 40 nm) üretilir ve ikili, üçlü ve hatta dördü etiketlemeye izin verir. IgG-altın yerine Protein A Altını (PAG) tercih edilebilir. Protein A daha az arka plan gürültüsü verir, çok tekrarlanabilir sonuçlar verir ve daha kesindir [12, 20].

Buraya kadar immunogold etiketleme öncesi doku ve hücrelerin hazırlanışı ve bu sırada kullanılabilecek kimyasallar, immün etiketleme için gerekli antikorların eldesi ve altın propların seçimi ve konjugat oluşumunun çalışmanın önemli hazırlık aşamaları gerektirdiğinin üzerinde durulmuştur. Başarılı bir immünotokimya elde edilmeden önce karşılanması gereken belirli koşullar vardır. Bunlar şunları içerir: İmmünoaktivitenin korunması, antijenlerin orijinal yerlerinde tutulması, morfolojik ayrıntıların bozulmaması (özellikle ultra yapısal düzeyde), Örneğin farklı lokasyonlarında antijen moleküllerine karşı antikorların eşit olarak ulaşmasının sağlanması ve korunması ve aynı numunede farklı antijenlerin birden fazla etiketlenmesinin gerçekleştirilebilmesi [21]. Antijen-antikor reaksiyonu, beyaz kan hücreleri tarafından üretilen antikorlar ve antijenler arasındaki önemli bir biyokimyasal etkileşimdir. Vücudun karmaşık yabancı varlıklardan korunduğu temel bir reaksiyondur. Antikor, antijene epitop adı verilen belirli bir bölge aracılığıyla bağlanır. İmmunogold etiketleme, bu antikor-antijen reaksiyonuna dayanır. İki tür antikor vardır: monoklonal ve poliklonal antikor. Monoklonal antikorlar, plazma hücrelerinin hücrel reaksiyonundan türetilirken, poliklonal antikorlar antijen uyarımının tekrarlanmasından türetilir. İmmunogold etiketleme, altın konjuge sekonder antikorların bir mikroçevrede spesifik primer antikorlarla bağlandığı indirek bir görüntüleme olarak algılanabilir.



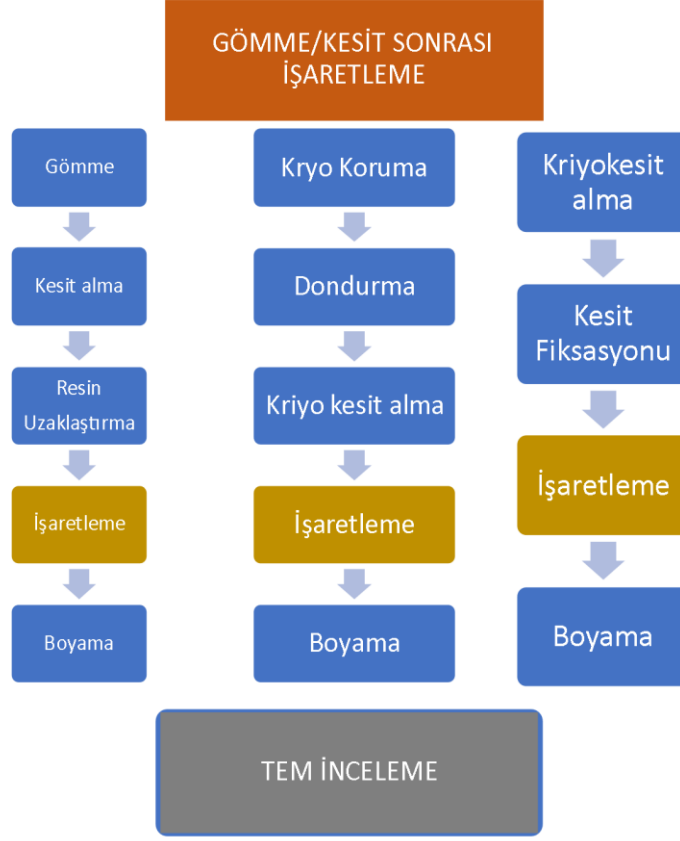
**Şekil 1.** Grid üzerine alınan örneklerin primer ve sekonder antikor inkübasyonunu ile immünogold etiketleme süreci

Temel olarak immün etiketleme çalışmalarında gömme öncesi (preembedding) ve sonrası (postembedding) şeklinde iki yaklaşım vardır. Bir başka alternatif ise grid üzerinde çalışılmış örneklerin direk immüno-elektron mikroskopudur. Bu aslında en hızlı yöntemdir. Örnekler gridlere yapıştırılır veya gridler üzerinde kültüre alınır (hafifçe sabitlenir) ve doğrudan etiketlenir. Bu prosedürde kesecik/virüs/bakteri/hücrenin tamamı daha sonra elektron mikroskopunda görüntülenmek üzere grid üzerinde bulunur. Bu nedenle yalnızca oldukça ince, elektron yoğunluğu olmayan örnekler 60-200 KV elektron mikroskoplarında kullanılabilir. Etiketleme herhangi bir geçirgenleştirme maddesi olmadan gerçekleştirildiğinde büyük olasılıkla bir numunenin yalnızca dış yüzeyi etiketlenecektir. Bu teknik virüsler, izole kesecikler ve kan trombositleri gibi düz hücrelerin plazma zarı üzerindeki antijenleri görselleştirmek için kullanılabilir. Bir numunenin ultra yapılarının immüno-etiketlemesi, kimyasallar ve deterjanlarla işlendiğinde mümkündür. Bu ajanlar, çevredeki zarlarda ve sitoplazmanın (bir kısmında) küçük gözenekler oluşturarak antijenlerin erişilebilir olmasını sağlar. Ancak hücrenin içeriği genellikle bu tür prosedürlerden zarar görür: Antikorların ulaşması için kullanılan ajanlar ile muamele aynı zamanda hücre içi bileşenlerin ekstraksiyonu anlamına da gelir [22, 23].



**Şekil 2.** Gömme öncesi etiketleme stratejileri

Önceki teknikle yakından ilgili olan, gömme öncesi immüno-elektron mikroskopudur. Numuneler temel olarak bir reçineye gömülmeden ve kesitlere ayrılmadan önce immüno-etiketlenir. Bu, yüzey antijenlerinin dağılımı incelendiğinde çok yararlı bir tekniktir. Bir numunenin (hücre) iç kısmına erişmek için, etiketleme prosedüründen önce plazma zarının zedelenmesi gerekir. Bu, oldukça hafif işlemler olan, ancak morfolojiyi önemli ölçüde etkileyecek olan deterjanlar veya tekrarlanan dondurma-çözdürme yoluyla başarılabilir. Hücreler ayrıca bir ozmotik şokla veya desteklerinden kazıma gibi mekanik kuvvetlerle de açılabilir. Bu kadar sert bir muameleden sonra bile birçok organel hala sağlamdır ancak sitoplazma artık mevcut değildir. Etiketleme sırasında sitoplazmanın yokluğu, membranla ilişkili moleküllerden sitoplazmik kuyrukların antijenik belirleyicilerinin kullanılabilirliğini artırır. (Şekil 2).



**Şekil 3.** Gömme sonrası etiketleme stratejileri

Gömme sonrası immün etiketleme son yaklaşımdır. Bu yöntemin immünohistokimyası, etiketli yapılara yüksek düzeyde çözünürlük veren partikül problemler kullanır. Kolloidal altın, ultra yapısal düzeyde çoğu gömme sonrası prosedüründe tercih edilen prob olmuştur. Bu yaklaşımın dezavantajı, enzim- antikor çalışmalarında ve kriyo işlemsiz rutin gömme yapılmış dokularda duyarlılıkta bir kayıp olmasıdır. Ultra yapısal düzeyde gömme sonrası kesit alarak immün işaretleme, kriyo korunmuş dokunun ve resin gömülü örneklerin ultra ince kriyo kesitleri üzerinde gerçekleştirilebilir (Şekil 3). Kriyo yaklaşımların bir avantajı, hücre içi antijenlerin kesitlerdeki gibi geçirgenleştirilmelerine gerek kalmadan antijen antikor ile muamele edilebilmesidir. Gömme sonrası işlemlerde numuneler gömülü olduğu ya da dondurulduğu matriksten kesitlerin alınması ve kesit üzerine etiketleme yapılması şeklinde planlanır.  $\pm 70$  nm kalınlığında çoğu organel kesilerek açık durumda olacak ve iç kısımları immün etiketleme için antikorlar ile muamele edilir hale gelecektir. Numunelerin hazırlık şekli etiketleme verimliliğini belirler. Sabitleme, mevcut antijenik belirleyicilerin sayısını etkileyecektir ve gömme prosedüründe kullanılan kimyasallar, bazı epitoplara maskeleyebilir ve hatta yok edebilir. İmmün reaksiyonu kesitin tam yüzeyinde gerçekleşir ve epitoplara mevcudiyeti her gömme yöntemi için oldukça farklıdır. Bir epoksi reçineye gömülen numunelerden alınan kesitler oldukça pürüzsüz bir yüzeye ve çok düşük penetrasyona sahiptir, bu da çok fazla epitopun bulunmadığı anlamına gelir. Hidrofobik metakrilatların (Lowicryl HM20, LR altın) yüzeyi, daha iyi yüzey kabartması ile epoksi reçinelerinkine benzer ve son olarak



daha hidrofilik metakrilatlar (Lowicryl K4M, LR beyaz) immun reaktiflerine daha iyi maruz kalmayı sağlar [24].

Antijenik belirleyiciler organik çözücülere veya gömme ortamına maruz kalmadığından, en iyi etiketleme verimliliği, çözülmüş dondurulmuş bölümlerle elde edilir. Üstelik yüzeyleri pürüzlüdür ve antikolar kesite nüfuz edebilir (organellerin matris yoğunluğuna bağlı olarak). Ancak, boyutları ve 8 yükü nedeniyle 5 ila 20 nm arasında değişen altın parçacıklarının nüfuzu düşük olduğundan kesitlerin yüzeyi çoğunlukla etkili bir şekilde etiketlenecektir. Bu sorun, 0,8 nm arasında değişen ultra küçük altın parçacıkları kullanılarak kısmen çözülebilir. Penetrasyonun iyileştirilmesi için 2 nm'ye kadar. Küçük boyutlarından dolayı bu parçacıklar electron mikroskopunda neredeyse hiç görülmez ve gümüş veya altın iyileştirme reaktifleri ile boyutlarının artırılması gerekir.

İmmunogold etiketlemede görüntüdeki arka plan netliği için önemli bir adım olan bloklama solüsyonu, birincil antikor inkübasyonundan önce uygulanır. Bloklama solüsyonu, antikor bağlanması için epitopu değiştirmeden dokular ve hücre yüzeylerindeki spesifik olmayan reaktif bölgeleri kapatır. Birincil veya ikincil antikoların doku bileşenlerine veya reçine materyaline olan spesifik olmayan çekimini azaltır. Spesifik olmayan reaksiyonlar veya arka plan, hem numunenin hem de antikoların genel fiziksel kimyasal özellikleri nedeniyle oluşur

Arka plan sorununun çözümü antikoları uygun konsantrasyona kadar seyreltmek ve spesifik antikora bağlanmayan ancak numunedeki moleküllere bağlanan moleküllerle olası spesifik olmayan bağlanma bölgelerini bloke etmektir. Spesifik olmayan bağlanmanın doğasına bağlı olarak bir bloke edici ajan seçilmelidir. Antijenler çok bol olduğunda, doğru antikor konsantrasyonunun kullanılıp kullanılmadığı genellikle oldukça açıktır. Ancak durum böyle olmadığında, etiketlemenin spesifik olup olmadığı konusunda istatistikler net bir cevap verecektir [25].

Bir çok etkileşimler nedeniyle yanlış eşleşme sonucu istenmeyen bölgeler de immün reaktiflere bağlanacaktır. Bu sorun genellikle bu bağlanma yerlerinin proteinlerle kaplanmasıyla çözülebilir (Glisin ve BSA kullanımı). Glisin, immün reaktifleri bağlayarak bir arka plan kaynağı oluşturabilen kimyasal fiksatifteki serbest aldehit gruplarını etkili bir şekilde devre dışı bırakır. BSA, arka planı azaltmak ve olası spesifik olmayan bağlanma bölgelerini engellemek için kullanılır. Çeşitli bloke edici çözümler mevcuttur: Bazı jelatinler, albuminler, yağsız süt tozları veya ticari olarak hazır satılan % 0,1-1 asetillenmiş BSA (örn. BSA-C, Aurion, NL). Farklı bloklama ajanlarını ve kombinasyonlarını denemek görüntü kalitesini arttırmak için mümkündür. Görüntüdeki prob yoğunluğu da önemlidir. Bildirilen en yüksek etiketleme verimliliği yaklaşık % 10'dur, ancak sıklıkla % 1'den azdır. Etiketleme verimliliği, etiketleme prosedürüne önemli ölçüde bağlıdır.

Her immunreaksiyonu sonrası gridlerin durulanması gerekir. Yıkama işlemi kalan aktiviteyi ortadan kaldırmak için önemlidir bu işlem için genellikle BSA/PBS yada PBS kullanılır. Antikor reaktifleri kullanırken kullandığımız pensetler de mutlaka temizlenmeli ve yıkanmalıdır. Boyama aşamalarına geçmeden önce de bidistile su ile durulamak ta elektron yoğunluğunu ve kirliliği azaltacaktır [26, 27].

İmmüno etiketleme, doğruluğu kontroller ile kanıtlandığında anlamlıdır. Antikoron tanınması gereken molekülle reaksiyona girip girmediği, ve ayrıca ortamdaki diğer moleküllerle çapraz reaksiyona girip girmediği de ortaya konmalıdır. Tüm immüno kimyasal prosedürlerde birincil husus uygun kontrol deneyleridir. Bu, sahte

immünlokalizasyonun önlenmesi ve tanımlanması için önemlidir, böylece yalnızca gerçek antijen dağılımı ortaya çıkar. Örneklerle uygulanabilen kontrol deneyleri aralığı şunları içerir: Birincil antikorun olmadığı, birincil antikorun olduğu, birincil antikorun hedef antijenle onaylanması, antijenin çıkarılması ve pozitif kontrollerin kullanılması gibi reaksiyonlar aynı çalışma için kurulmalıdır [28].

Kontroller her zaman örneklerdeki belirli etiketlemenin bütünlüğünü doğrulamak için kullanılır. Kontrol, örneklerin kontaminasyonunun giderilmesinde veya immunogold etiketleme prosedürünün herhangi bir bölümündeki bireysel bir reaktifin zayıf performansında önemli bir rol oynadığı için dikkatlice seçilmelidir. Normalde kullanılan kontrol türleri şunlardır: Pozitif kontrol; Yanlış negatif önlemek ve etiketleme prosedürünün etkinliğini test etmek için aynı immunogold etiketleme tekniğiyle test edilen bilinen pozitif bir örnektir. Negatif kontrol; Birincil antikor adımının atlandığı ve yalnızca ikincil antikorla inkübe edilmesi sağlanan örnektir. Bu, ikincil antikor etiketleme kapasitesini belirlemek içindir [29].

### ***Gömme Öncesi Etiketleme***

Bu işlem gömme sonrası prosedürlere kıyasla daha uzun inkübasyon ve yıkama adımları gerekir. Aldehit fiksasyon örnekleri 15-30 dakika boyunca PBS tamponunda %0,1 NaBH<sub>4</sub> ya da uygun inaktive edici ajanlarla ile inkübe edildikten sonra mevcut kalan aldehit gruplarını inaktivasyonu sağlanır. Genellikle bu kimyasallar 3x10 dakika boyunca PBS ile yıkanır. Doku kesitleri veya kompakt malzeme ile çalışırken, antijenlere erişim sağlamak için deterjanla ön işlem gerekir. Uygulamada 30 dakika boyunca PBS'de % 0,05 Triton-X-100 ile geçirgenleştirilebilir. Örnekleri 30 dakikadan 1 saate kadar blokaj solüsyonuna aktarılır. Örnekler 2 x 10 dakika inkübasyon solüsyonuyla yıkanır. Tercihen saflaştırılmış, 1-5 µg/ml spesifik birincil antikorun seyreltmesiyle veya en az 1 saat inkübasyon solüsyonunda hazırlanmış yüksek titreli bir antiserumun yüksek seyreltmesiyle inkübe edilir. Antikor konsantrasyonu ve inkübasyon süresi, birincil antikorun spesifik özelliklerine göre uyarlanabilir. Antijenlere tam penetrasyonu garantilemek için genellikle daha uzun inkübasyon süreleri gerekir. Bu durumlarda prosedür 4°C'de gerçekleştirilmelidir. Örnekler 6 x 10 dakika inkübasyon solüsyonuyla yıkanır. Örnekler uygun altın konjugat reaktifinin alikotlarına aktarılır, 30 dakika ila 2 saat boyunca inkübasyon solüsyonunda 1/50-1/200 oranında seyreltilir. Her yeni lokalizasyon çalışması için bir dizi seyreltme ve inkübasyon süresinin test edilmesi önerilir. Yine, antijenlere tam penetrasyonu garantilemek için genellikle daha uzun inkübasyon süreleri gerekir. Bu durumlarda prosedür 4°C'de gerçekleştirilmelidir. Örnekler 6 x 10 dakika boyunca inkübasyon solüsyonuyla yıkanır. Her biri 10 dakika olmak üzere iki kez PBS ile yıkanır, 15 dakika boyunca PBS'de %2 glutaraldehitte işlem sonrası fiksasyon yapılabilir ve son olarak 4 x 10 dakika boyunca distile suyla yıkanır [30, 31, 32].

### ***Gömme Sonrası Etiketleme***

Gömme sonrası etiketleme tekniği, gömme öncesi tekniğe kıyasla daha yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. Gömme sonrası için, örnekler önce fiksasyona tabi tutulur, gömülür ve immuno etiketlemeye tabi tutulmadan önce kesilir. Bu teknik için genellikle birincil antikorun etiketlenmediği ve altının ikincil bir antikora konjuge edildiği dolaylı etiketleme yöntemi tercih edilir. Aldehit fiksasyonundan sonra kalan aldehit gruplarını etkisizleştirmek için gridler 10-20 dakika boyunca PBS tamponunda 0,05 M Glisin

üzerinde inkübe edilir. Daha sonra blokaj solüsyonunun damlalarına 15 dakika boyunca aktarılır. Gridler 2 x 5 dakika boyunca inkübasyon solüsyonunun damlaları üzerinde yıkanır. Gridler, saflaştırılmış, 1-5 µg/ml spesifik birincil antikorun seyreltilmiş damlalarına veya 30 dakika ila 1 saat boyunca inkübasyon solüsyonunda hazırlanmış bir antiserumun yüksek seyreltisine aktarılır. Antikor konsantrasyonu ve inkübasyon süresi, birincil antikorun spesifik özelliklerine göre uyarlanabilir. Daha uzun inkübasyon süreleri gerekiyorsa (örneğin düşük titreli antikor solüsyonlarıyla) prosedür 4°C'de bir gece boyunca gerçekleştirilmelidir. Gridler, 6 x 5 dakika boyunca inkübasyon solüsyonu damlaları üzerinde yıkanır. Gridler, 30 dakika ila 2 saat boyunca inkübasyon solüsyonunda 1/20-1/40 oranında seyreltilmiş uygun altın konjugat reaktifinin damlalarına aktarılır. Her yeni lokalizasyon çalışması için bir dizi seyreltme ve inkübasyon süresinin test edilmesi önerilir. Gridler, 6 x 5 dakika boyunca inkübasyon solüsyonu damlaları üzerinde yıkanır. Daha sonra PBS'de iki kez 5'er dakika yıkanır, PBS'de %2'lik glutaraldehit içinde 5 dakika postfiksasyona tabi tutulabilir ve son olarak distile su ile yıkanır ve standart prosedürlere göre kontrastlanır [33, 34, 35].

İmmün etiketleme prosedürü sırasında damlaların üzerindeki gridler yüzdürülerek, kesitler damlaya bakacak şekilde bir dizi farklı damla üzerinde inkübe edilir. İmmün reaktifler genellikle %1 BSA/PBS (blokaj çözültisi) içinde seyreltilir, ancak diğer bloke edici proteinler veya tamponlar da kullanılabilir. Uzun inkübasyon süreleri kullanıldığında kurumayı önlemek için nem tuzakları içinde inkübasyon sağlanmalıdır. Genel olarak, inkübasyon süreleri kısa ve oda sıcaklığında çalışmaya izin veren yüksek afiniteli antikorlar kullanılır. Uzun inkübasyon gerektiren reaksiyonlarda spesifik olmayan bağlanmanın sorun yaratmasını önlemek için antikorların yaklaşık on kat daha seyreltilmesi gerekebilir.

### ***Çift etiketleme***

İkincil antikor altın konjugatları kullanılarak yapılan çift işaretleme için, iki farklı hayvan türünde üretilen iki birincil antikor karıştırılır ve aynı anda uygulanır. Yıkama adımından sonra, iki farklı boyuttaki karşılık gelen altın konjugatlı reaktiflerin bir karışımı kullanılır. Protein A veya protein G altın konjugatları kullanılarak yapılan çift işaretleme için her etiketleme ayrı ayrı yapılır. İlk altın reaktif inkübasyonundan sonra 20-100 µg/ml konsantrasyonda serbest protein-A veya protein-G ile 10-20 dakika inkübasyon uygulanır ve diğer işaretleme adı olduğu gibi yıkama ve gerekli görülürse post fiksasyona tabi tutulabilir.

Bir immün tespit deneyinin başarısı bir yandan kullanılan reaktiflerin reaktivitesine ve kalitesine, diğer yandan antijenin tanınabilme derecesine bağlıdır. Negatif sonuçlar, hiç veya düşük reaktiviteye sahip reaktiflerin kullanılması ve antijenlerin yokluğu, değiştirilmesi veya maskelenmesi (fiksasyon ve numune işleme yoluyla) nedeniyle oluşabilir. Aynı birincil antikorla farklı bir reaktif seti aynı şekilde hazırlanan numunelerde iyi sonuçlar verdiğinde, negatif sonuçların nedeninin antijen seviyesinde değil, reaktif setinde olduğu açıktır. Öte yandan, reaktifler farklı bir birincil antikorla (aynı hayvan türünden) iyi sonuçlar verdiğinde, sorunun antijen koruma seviyesinde veya birincil antikor aktivitesi seviyesinde olduğu açıktır. Bu tür karşılaştırmalı veriler mevcut olmadığında, negatif sonuçların nedeni belirsizdir [36].

Protokolde geriye doğru çalışarak sorunu saptamak kolaydır. Örneğin, ImmunoGold Gümüş Boyama'da test etmek için ilk adım kullanılan gümüş geliştirme reaktifleri

olacaktır. Bu adım uygun şekilde çalışırsa, bir sonraki adım immünogold reaktifinin birincil antikor için reaktivitesini test etmek vb. olacaktır.

Tespit deneyleri ve numune hazırlama teknikleri zaman alıcı olduğundan, bir immünogold deneyindeki ilgili adımları test etmek için basit ve hızlı bir yöntem yardımcı olacaktır, nokta-nokta testi bu gereklilikleri karşılar.

Nokta-nokta testi, sorun gidermeyi immünogold deneyinin tanımlanmış bir kısmına odaklamayı mümkün kılan bir model sistemdir. Güçlü protein bağlama kapasitesine sahip bir nitroselüloz membran şeridi, immünoinkübasyon protokolündeki sonraki adımın reaktivitesini kontrol etmek için gereken bileşenlerden birinin bağlanması için bir destek olarak kullanılır. Örneğin,

(i) Gümüş geliştirme reaktiflerini test etmek için, immünogold reaktifi membran şeridine uygulanır. Nitroselüloz membran daha sonra gümüş geliştirme reaktifleri ile inkübe edilir,

(ii) İmmunogold reaktifinin reaktivitesini test etmek için, birincil antikorun bir seyreltme serisi bir nitroselüloz şeride uygulanır ve immunogold reaktifi ile inkübasyon takip eder.

Nokta-nokta testinden elde edilen sonuçlar, test edilen reaktifin kalitesi ve reaktivitesi hakkında doğrudan bilgi verir. İnkübasyon protokolünde adım adım geriye doğru bir yaklaşım, negatif sonuçların nedenini açıklayacaktır [36, 37, 38].

## SONUÇ

İmmünogold etiketleme, yapılması nispeten kolay bir tekniktir ve ultra yapı ve antijenlerin gerçek zamanlı izlenmesi için uygundur. Hücresel mikroçevredeki hedef belirteçlerin değerlendirilmesini iyileştirebilir ve iyi bir teknik içi karşılaştırma ve yeniden değerlendirme sağlayarak daha ileri histokimyasal analiz için önemli bilgiler sağlar. 1980'lerin başından bu yana, vitrifiye edilmiş film haline getirilmiş süspanse örneklerin doğal hallerine yakın halde görüntülenmesi mümkündür ancak hücreler ve dokular gibi daha büyük nesnelere genellikle yeterince ince bir filme sıkıştırılamaz. Vitröz kesitlerin kriyo-elektron mikroskobu bu duruma bir çözüm getirmiştir. Büyük bir biyolojik materyal parçasının vitrifikasyonunu ve bunun vitrifiye edilmiş durumda gözlemlenen ultra ince kesitlere kesilmesi işlemlerini içerir. Genel olarak bu yöntem ile görüntüler önceki görüntülerden çok farklı ve daha detaylı olarak görülmektedir. Vitröz kesitlerin kriyo-elektron mikroskobu, 3 boyutlu yapılandırma için bilgisayarlı elektron tomografisi ile birleştirildiğinde tam potansiyelini ortaya koyacaktır [7]. Günümüzde gelişen korelatif mikroskobik yaklaşımlar sayesinde de görüntüleme imkanlarının iyileştirilmesi ile etiketleme çalışmalarının değeri daha da ortaya konulacaktır.

## TEŞEKKÜR

Derlemede yer alan şekil 2 ve 3, Dr. Nalan Liv (UMC Utrecht) kişisel izni ile ders notlarından türetilmiştir, teşekkürler.

**KAYNAKLAR**

- [1] Dumancic, E., Vojta, L., and Fulgosi, H. (2023): Beginners guide to sample preparation techniques for transmission electron microscopy. *Periodicum biologorum*, 125(1-2), 123-131.
- [2] Karnovsky, M.J. (1967): The ultrastructural basis of capillary permeability studied with peroxidase as a tracer. *J Cell Biol.* 35(1):213-236.
- [3] Fox, C.H., Johnson, F.B., Whiting, J., Roller, P.P. (1985): Formaldehyde fixation. *J Histochem Cytochem.* 33(8):845-853.
- [4] Hussain, S., Fredriksen, I., Ringsevjen, H., Kavalali, E. T., and Davanger, S. (2019): Antibodies raised against aldehyde-fixed antigens improve sensitivity for postembedding electron microscopy. *Journal of Neuroscience Methods*, 317: 1-10.
- [5] Mielanczyk, L., Matysiak, N., Michalski, M., Buldak, R., & Wojnicz, R. (2014). Closer to the native state. Critical evaluation of cryo-techniques for Transmission Electron Microscopy: preparation of biological samples. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 52(1): 1-17.
- [6] Griffiths, G., McDowall, A., Back, R., Dubochet, J. (1984): On the preparation of cryosections for immunocytochemistry. *Journal of ultrastructure research* 89(1):65-78.
- [7] Al-Amoudi, A., Chang, J.J, Leforestier, A., (2004): Cryo-electron microscopy of vitreous sections. *EMBO J.* 23(18):3583-3588.
- [8] Liou, W., Geuze, H.J., Slot, J.W. (1996): Improving structural integrity of cryosections for immunogold labeling. *Histochemistry and cell biology*,1996;106(1):41-58.
- [9] Griffiths, G., Slot, J.W., Webster, P. Kiyoteru, (2015). Tokuyasu: a pioneer of cryo-ultramicrotomy. *J Microsc.* 260(3):235-237.
- [10] Sibon, O. C., Cremers, F. F., Humbel, B. M., Boonstra, J., and Verkleij, A. J. (1995): Localization of nuclear RNA by pre-and post-embedding in situ hybridization using different gold probes. *The Histochemical Journal*, 27, 35-45
- [11] Tokuyasu, K.T. (1976): Membranes as observed in frozen sections. *Journal of Ultrastructure Research*, 55(2):281-287.
- [12] Bendayan, M. (2000): A review of the potential and versatility of colloidal gold cytochemical labeling for molecular morphology. *Biotechnic and Histochemistry*, 75(5): 203-242.
- [13] Brorson, S.H. (1998): Antigen detection on resin sections and methods for improving the immunogold labeling by manipulating the resin. *Histol. Histopathol.* 13: 275–281.
- [14] Griffith, J.M., Posthuma, G. (2002): A reliable and convenient method to store ultrathin thawed cryosections prior to immunolabeling. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 50(1):57-62.
- [15] Faulk WP, Taylor GM. (1971). An immunocolloid method for the electron microscope. *Immunochemistry* 8(11):1081-1083.
- [16] Das, Murtey, M. (2016): Immunogold Techniques in Electron Microscopy. In: Janecek M, Kral R, editors. *Modern Electron Microscopy in Physical and Life Sciences*. Rijeka: IntechOpen; 2016.
- [17] Robinson, J. M., Takizawa, T., Vandr , D. D., and Burry, R. W. (1998): Ultrasmall immunogold particles: important probes for immunocytochemistry. *Microscopy research and technique*, 42(1): 13-23
- [18] Danscher, G. (1981): Localization of gold in biological tissue: a photochemical method for light and electronmicroscopy. *Histochemistry*, 71(1): 81-88.
- [19] Burry, R. W. (2024): Pre-Embedding Immunocytochemistry. *Immunogold-Silver Staining: Principles, Methods, and Applications*, 217.
- [20] Lai, C., Zeng, G., Huang, D., Feng, C., Hu, S., Su, F., Zhao, M., Huang, C., Wei, Z. (2010): Detection based on immunogold labeling technique and its expected application in composting. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 38(6): 909-914.

- [21] Hawes, D., SHI, S. R., Dabbs, D. J., Taylor, C. R., Fand Cote, R. J. (2009): Immunohistochemistry. *Modern surgical pathology*, 48.
- [22] Newman, G.R., Hobot, J.A. (1993): *Resin Microscopy and On-Section Immuno-Cytochemistry*. Berlin: Springer-Verlag
- [23] Posthuma, G., Slot, J.W., Geuze, H.J. (1987): Usefulness of the immunogold technique in quantitation of a soluble protein in ultra-thin sections. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 35(4):405-410
- [24] Karreman, M.A., Van Donselaar, E.G., Gerritsen, H.C., Verrips, C.T., Verkleij, A.J. (2011): a high-speed fixation method for immuno-electron microscopy. *Traffic*. 12(7):806-814.
- [25] Mayhew, T.M., Lucocq, J.M. (2008): Developments in cell biology for quantitative immunoelectron microscopy based on thin sections: a review. *Histochemistry and Cell Biology* 30(2):299-313.
- [26] Norris, R., Baena, V., and amp; Terasaki, M. (2017): Localization of phosphorylatedconnexin 43 by serial section immunogold electron microscopy. *Journal of Cell Science* 130(7): 1333-1340
- [27] Mayhew, T.M. (2005): How to count your gold: a tutorial on TEM immunogold label quantification. *Microsc Anal.* (19):9-12.
- [28] Stirling, J. W. (1993): Controls for immunogold labeling. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 41(12): 1869-1870.
- [29] Murtey, M. D. (2016): Immunogold techniques in electron microscopy. *Modern electron microscopy in physical and life sciences*, 2: 64.
- [30] Yi, H., Leunissen, J., Shi, G., Gutekunst, C., Hersch, S. (2001): A novel procedure for pre-embedding double immunogold-silver labeling at the ultrastructural level. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 49(3), 279-283.49(3):279-284.
- [31] Kanemaru, T., Kondo, T., Nakamura, K. I., Morimoto, H., Nishi, K., and Isobe, S. I. (2021): A simple preparation method for CLEM using pre-embedding immunohistochemistry with a novel fluorescent probe and stable embedding resin. *Microscopy*, 70(4): 368-374.
- [32] Polishchuk E V, Polishchuk RS. (2018): Pre-embedding labeling for subcellular detection of molecules with electron microscopy. *Tissue and Cell* 57: 103-110
- [33] Merighi, A. (1992): "Chapter 3—Post-embedding electron microscopic immunocytochemistry," in *Electron Microscopic Immunocytochemistry—Principles and Practice*, eds J. M. Polak and J. V. Priestley (London: Oxford University Press), 51–87
- [34] Petralia, R. and Wang, Y. (2021): Review of post-embedding immunogold methods for the study of neuronal structures. *Frontiers in Neuroanatomy*, 15.
- [35] Oorschot, V., de Wit, H., Annaert, W.G., Klumperman, J.(2002): A novel flat-embedding method to prepare ultrathin cryosections from cultured cells in their in situ orientation. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 50(8):1067-1080.
- [36] Van de Plas, P.F. (2006): The Dot-Spot Test. A simple method to monitor immunoreagent activity and influence of fixation on antigen recognition. *AURION Technical Support: Newsletter*, 4: 2006-2.
- [37] Geuze, H. J., Slot, J. W., van der Ley, P. A., & Scheffer, R. C. (1981): Use of colloidal gold particles in double-labeling immunoelectron microscopy of ultrathin frozen tissue sections. *The Journal of cell biology* 89(3):653-665.
- [38] Van der Beek, J., de Heus, C., Liv, N., and Klumperman, J. (2021): Quantitative correlative microscopy reveals the ultrastructural distribution of endogenous endosomal proteins. *Journal of Cell Biology*, 221(1): e202106044.