



Immunologie: Paraffin Topics

Ein Handbuch für die Histologie

Inhalt

I.	Empfehlung zur Vorbehandlung von Paraffinschnitten	3
1.	Feuchte Hitze (Mikrowelle, Autoklav)	3
1.1.	In der Mikrowelle mit Citratpuffer	3
1.2.	Im Autoklav mit Citratpuffer	5
1.3.	In der Mikrowelle mit Harnstoff	5
2.	Enzymatische Vorbehandlungen	6
2.1.	Pepsin	6
2.2.	Pronase	6
2.3.	Trypsin	6
2.4.	Neuraminidase	6
2.5.	± Pepsin, Pronase, Trypsin oder Neuraminidase	6
3.	Sonstige Vorbehandlungen	6
3.1.	4N HCl	6
3.2.	Saponin (Detergenz)	6
II.	Vorschlag zur Gewebefixierung bei Paraffinschnitten	7
1.	Empfehlung zur Herstellung von 4% neutral gepuffertem Formalin	7
III.	Präparateherstellung	8
1.	Paraffinschnitte	8
1.1.	APAAP Methode	8
1.2.	Streptavidin-Biotin-Peroxidase Methode	8
2.	Gefrierschnitte	8
3.	Ausstriche und Cytospins	9
IV.	Protokolle zur Immunhistochemie	10
1.	APAAP Methode	10
1.1.	benötigte Reagenzien	10
1.2.	Arbeitslösungen APAAP Methode	11
1.3.	Arbeitsprotokoll APAAP Methode	12
2.	Streptavidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (Strept-ABC)-Methode	14
2.1.	Arbeitslösungen - Strept-ABC-Methode	14
2.2.	Arbeitsprotokoll - Strept-ABC-Methode	17
3.	LStrept-AB-Methode (LSAB Methode)	19
3.1.	NOVADetect StreptAB Kits	19
3.2.	Arbeitslösungen - Standard LStrept-AB-Methode	20
3.3.	Arbeitsprotokoll - Standard LStrept-AB-Methode	20
4.	NovaDetect Polymer Marker Kits	21
4.1.	Arbeitsmaterialien	21
4.2.	Arbeitsprotokoll Polymer Marker Kit	22
V.	Fehlerquellen	23
	Ergebnis: Keine Anfärbung	23
	Ergebnis: unspezifischer Hintergrund	23
	Weitere wichtige Hinweise	24

I. Empfehlung zur Vorbehandlung von Paraffinschnitten

1. Feuchte Hitze (Mikrowelle, Autoklav)

Als Alternative zur Mikrowellenvorbehandlung kann die Technik des feuchten Autoklavierens (Dampfdruckkochtopf) zur Antigen-Demaskierung angewendet werden. In vielen Fällen steht es dem Anwender frei, welche der beiden Techniken er verwendet. Bei manchen Antikörpern wurden jedoch mit dem feuchten Autoklavieren bessere Färbegergebnisse beschrieben.

1.1. In der Mikrowelle mit Citratpuffer

A. Vorbereitung

A1. Um ein Abschwimmen der entparaffinierten Gewebeschnitte während der Mikrowellenvorbehandlung zu vermeiden, ist die Verwendung von beschichteten Objektträgern sehr wichtig.

Folgende Objektträger werden empfohlen:

§ Super-FrostPlus Objektträger der Fa. Menzel (Tel.-Nr.: 0531-5900821). Diese Objektträger sind bereits beschichtet.

§ APES (3-Aminopropyltriethoxysilan)-beschichtete Objektträger: Objektträger 20 s in eine Mischung aus 1 ml APES und 50 ml Aceton stellen, anschließend je 2 x in Aceton und Aqua dest. Wasser spülen und bei Raumtemperatur trocknen lassen.

A2. Schnitte von 4-6 µm Dicke werden in einem Wasserbad (50°C) schwimmend auf die Objektträger aufgezogen. Vor der Färbeprozedur sollten die Präparate bei 37°C über Nacht oder bei Raumtemperatur 48 h trocknen.

A3. Das Paraffin der Gewebeschnitte wird in Xylol (2 x 10 min) entfernt und die Schnitte in der absteigenden Alkoholreihe (jeweils 5 min in 95%, 80% und 70% Alkohol) bis zum Aqua dest. hydratisiert.

B. Mikrowellenvorbehandlung:

B1. Schnitte in mikrowellengeeignete Plastik- oder Glasgefäße stellen, die mit 10 mM Citratpuffer, pH 6 gefüllt sind. Zusammensetzung: 9 ml Stammlösung A und 41 ml Stammlösung B zu 450 ml Aqua dest.

§ Stammlösung A: 0.1 M Zitronensäure
(21.01 g C₆H₈O₇ x H₂O) in 1 l Aqua dest., Merck # 244.

§ Stammlösung B: 0.1 M Natriumcitrat
(29.41 g C₆H₅O₇ x 2H₂O) in 1 l Aqua dest., Merck # 6448.

(Die Stammlösungen bei 2 - 8 °C im Kühlschrank aufbewahren)

B2. Gefäß(e) in das Mikrowellengerät stellen und Gerät einschalten.

B3. Präparate 15 - 20 min in Citratpuffer sprudelnd kochen. (Bei kleinen Gefäßen sollte man in 5min-Zeittakten kochen, um den Flüssigkeitsverlust durch Nachfüllen von Aqua dest. ausgleichen zu können). Es ist wichtig, dass die Schnitte während des Kochvorgangs nicht austrocknen.

B4. Schnitte ca. 20 - 30 min auf Raumtemperatur abkühlen lassen. Dies sollte bei Raumtemperatur erfolgen.

- B5. Schnitte 1 x in Aqua dest. und anschließend in Waschpuffer 3 x 5 min spülen (z.B. PBS oder TBS).
- B6. Fortfahren mit dem immunhistochemischen Nachweis. Anleitungen dazu sind in den Produktbeschreibungen zu den einzelnen Antikörpern und den Nachweiskits von dianova nachzulesen (vgl. auch VI.1 und VI.2).

C. Kritische Punkte, die zu beachten sind:

- C1. Schnitte können während der Mikrowellenvorbehandlung abschwimmen, wenn:
- § unbeschichtete Objektträger bzw. ungeeignete Beschichtung für Objektträger benutzt wurden (optimal: bereits beschichtete Objektträger- Super FrostPlus, vgl. 1.1. A),
 - § der Schnitt zu dick ist oder zu viel Fettgewebe enthält,
 - § der Schnitt nicht lang genug getrocknet wurde (optimal: über Nacht bei 37°C),
 - § das Gewebestück in ungeeignetem Fixierungsmittel behandelt wurde (s. Empfehlungen zur optimalen Gewebefixierung)
- C2. Gewebe sollte in 4 % gepuffertem Formalin zwischen 6 - 24 h fixiert werden (Fixierungszeit richtet sich nach der Größe des Gewebes). Eine Gewebefixierung in ungepuffertem Formalin oder eine Überfixierung kann sich auf die Kochzeit auswirken, so dass die Präparate im Bedarfsfall länger gekocht werden müssen.
- C3. Geeignete Mikrowellengefäße.
- § Große Glasschalen (Jenaer Glas) oder Kunststoffbehälter
 - § Vorteil: 15-20 minütiges Kochen, ohne Aqua dest. nachzufüllen,
 - § Nachteil: hoher Pufferverbrauch von ca. 0.5 bis 1 l, Achtung: das große Puffervolumen fängt erst nach 10 min an zu kochen.
 - § Kleine Färbeküvetten oder Färbetröge aus Kunststoff (z.B. von der Fa. Bender und Hobein)
 - § Vorteil: wenig Pufferverbrauch
- Nachteil: unter Umständen muss der Wasserverlust häufig mit Aqua dest. ausgeglichen werden (siehe auch Punkt D "Mikrowellenvorbehandlung in kleinen Gefäßen").

C4. Mikrowellenvorbehandlung:

Objektträger nach der Entparaffinierung der Gewebeschnitte und Hydratisierung in der absteigenden Alkoholreihe in ein Gefäß mit auf Raumtemperatur erwärmten Citratpuffer stellen; Gefäß in die Mikrowelle stellen und Gerät einschalten. Die Gewebeschnitte sollten 15-20 min sprudelnd kochen.

Bei Verwendung eines großen Gefäßes mit ca. 500 ml Puffervolumen kann die angegebene Zeit durchgekocht werden. Bei geringem Probenaufkommen in kleinen Gefäßen, (Küvetten) empfiehlt es sich, weitere mit Wasser gefüllte Bechergläser zur Erhöhung der Luftfeuchtigkeit daneben zu stellen. So müssen die Küvetten meistens nur einmal während des Kochvorgangs mit Aqua dest. aufgefüllt werden. Es ist günstig, im 5-min-Zeittakt weiterzukochen, damit der Flüssigkeitsstand beobachtet und der Flüssigkeitsverlust ausgeglichen werden kann. Insgesamt sollten sich die Schnitte mindestens 3 x 5 min im sprudelnd kochenden Citratpuffer befinden. Leicht aufgelegte Deckel können den Flüssigkeitsverlust während des Kochens verringern.

Es ist darauf zu achten, dass die Behälter nicht höher als 1 cm unter den Gefäßrand mit Puffer gefüllt werden, um ein Überkochen zu vermeiden. Gefäß mit Puffer und Schnitten während der Vorbehandlung nicht abkühlen lassen! Erst nach dem Kochvorgang die Schnitte im heißen Puffer ca. 30 min auf Raumtemperatur abkühlen lassen.

- C5. Citratpuffer 10 mM sollte aus Natriumcitrat und Zitronensäure hergestellt werden (Zusammensetzung siehe B1).

Vorteil: kein Einstellen des pH-Wertes notwendig, das Abschwimmen der Schnitte wird reduziert, bessere Färbeergebnisse werden erzielt.

1.2. Im Autoklav mit Citratpuffer

Diese Methode beruht auf dem gleichen Prinzip wie die Vorbehandlung in der Mikrowelle. Hierzu werden die deparaffinierten Objektträger in Küvetten mit 10 mM Citratpuffer (pH 6) gestellt. Die Küvetten werden mit Alufolie abgedeckt und 5 oder 10 min in einem Autoklaven autoklaviert. Alternativ kann die Vorbehandlung auch in einem handelsüblichen Dampfdruckkochtopf erfolgen. Hierzu wird der Dampfdruckkochtopf mit 10 mM Citratpuffer, pH 6 (etwa 1-2 l) gefüllt und zum Kochen gebracht. Die deparaffinierten Objektträger werden in Färbegestellen in den kochenden Puffer gestellt, so dass sie mit Flüssigkeit bedeckt sind. Der Deckel wird geschlossen und unter Dampf 5 bis 10 min gekocht. Nach dem Autoklavieren oder Kochen werden die Präparate ca. 30 min auf Raumtemperatur abgekühlt und anschließend 1 x mit PBS oder TBS gewaschen.

Literatur:

1. Boon ME, Kok LP. Mikrowellen-Kochbuch der Pathologie. Die Kunst der mikroskopischen Darstellung. Coulomb Press Leyden 1987, ISBN 90-71421-12-0.
2. Shi S-R, Key ME, Kalra KL. Antigen retrieval in formalin-fixed paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. J. Histochem. Cytochem. 1991, Vol 39, 741-748.
3. Cattoretti G, Becker MHG, Key G, Duchrow M, Schlüter C, Galle J, et al. Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB-1 and MIB-3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. J. of Pathol. 1992, Vol 168, 357-367.
4. Cattoretti G, Pileri S, Parravicini C, Becker M et al. Antigen unmasking on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. J. of Pathol. 1993, Vol. 171, 83-98.
5. Munakata S, Hendricks JB. Effect of fixation time and microwave oven heating time on retrieval of the Ki-67 antigen from paraffin-embedded tissue. J. of Histochem. and Cytochem. 1993, in press.
6. Bankfalvi A, Riehemann K, Öfner D, Checci R, Morgan JM, Piffko J, Böcker W, Jasani B und Schmid KW. Feuchtes Autoklavieren. Pathologe 1994, Vol. 15, 345-349.

1.3. In der Mikrowelle mit Harnstoff

Behandlungen wie in der Mikrowelle mit Citratpuffer (siehe 1.1). Allerdings in 6 M Harnstoff (24,02 g Harnstoff in 100 ml PBS) anstatt in Citratpuffer. Beim Verdampfen des Puffers sollte Harnstoff/PBS nachgefüllt werden und nicht Wasser.

2. Enzymatische Vorbehandlungen

Enzymatische Vorbehandlungen werden im Anschluss an die Deparaffinierung bzw. nach der Blockierung der endogenen Peroxidase mit H₂O₂ (s. V.1.5) durchgeführt. Falls nicht anders angegeben, werden die Gewebeschnitte nach der Enzymbehandlung 3 x mit Waschpuffer (PBS oder TBS) gewaschen. Anschließend wird die immunhistochemische Färbung durchgeführt. Folgende Enzymbehandlungen werden empfohlen:

2.1. Pepsin

Behandlung der Schnitte mit 0,1% Pepsin (Calbiochem #516360) in 0,01 N HCl, pH 2,3 10-20 min bei Raumtemperatur. Anschließend 3 x waschen in Aqua dest. und in PBS überführen.

2.2. Pronase

Behandlung der Schnitte mit 0,0025% Pronase (Calbiochem #53702) in Tris-Puffer pH 7,6 4-6 min bei Raumtemperatur. Andau durch Inkubation mit 0,2% Glyzin in PBS (5 min) beenden. Behandlung der Schnitte mit 0,1% Trypsin (Calbiochem #6502) in PBS 5-15 min bei Raumtemperatur. Andau durch 5-minütige Inkubation mit 0,1 µg/ml Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor (Calbiochem #65035) in PBS beenden.

2.3. Trypsin

Behandlung der Schnitte mit 0,1% Trypsin (Calbiochem #6502) in PBS 5-15 min bei Raumtemperatur. Andau durch 5-minütige Inkubation mit 0,1 µg/ml Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor (Calbiochem #65035) in PBS beenden.

2.4. Neuraminidase

Behandlung der Schnitte mit 0,02 U/ml Neuraminidase (Calbiochem #480715) in PBS 60 min bei Raumtemperatur. Anschließend 3 x mit PBS waschen.

2.5. ± Pepsin, Pronase, Trypsin oder Neuraminidase

Die Vorbehandlung mit Pepsin etc. kann die Färbeintensität erhöhen, ist jedoch nicht unbedingt erforderlich.

3. Sonstige Vorbehandlungen

3.1. 4N HCl

Behandlung der Schnitte in 4N HCl 10 min bei 37°C. Anschließend 3 x mit Aqua dest. waschen.

3.2. Saponin (Detergenz)

Behandlung der Schnitte mit 0,05% Saponin (Calbiochem #558255) in Aqua dest. 30 min bei Raumtemperatur. Anschließend 3 x mit PBS waschen.

II. Vorschlag zur Gewebefixierung bei Paraffinschnitten

Der immunhistochemische Nachweis von zellulären Strukturen gewinnt in der Tumordiagnostik zunehmend an Bedeutung. Voraussetzung für **optimale Färbeergebnisse am Paraffinschnitt** und damit zuverlässige Analysen ist eine optimale Gewebefixierung.

Formalin ist heute das meist verwendete Fixierungsmittel. Die konzentrierte Lösung ist etwa 35%ig. Unter Einwirkung von Licht oder während des Fixierungsprozesses oxidiert Formalin, selbst in der dunklen Flasche, zu Ameisensäure, dadurch sinkt der pH-Wert. Für immunhistochemische Zwecke ist die Verwendung von säurefreien Formalinlösungen unerlässlich. Der saure pH-Wert kann neutralisiert werden, indem die konzentrierte Formalinlösung nicht in Aqua dest., sondern mit geeigneten Pufferlösungen (s.u.) verdünnt wird. Diese Pufferlösung kann im Labor in lichtgeschützten Flaschen bei Raumtemperatur oder bei 4°C für 3-4 Wochen auf Vorrat zur Verfügung stehen. Sobald die Lösung einen sauren pH-Wert aufweist, empfiehlt es sich, sie entsprechend den Sicherheitsvorschriften zu verwerfen.

Es hat sich gezeigt, dass eine **4%ige gepufferte Formalinlösung** innerhalb von 6-8 h 4 mm tief in das Organewebe eindringt. Die Fixierung von Gewebestücken (4-5 mm) ist daher über Nacht, spätestens aber nach 24 h abgeschlossen.

1. Empfehlung zur Herstellung von 4% neutral gepuffertem Formalin

Protokoll für 1 Liter 4% gepuffertes Formalin:

Methode I:

100 ml Formalin (etwa 37%ig) zu 900 ml Aqua dest. gießen, in dem zuvor 4 g Natriumdihydrogenphosphat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$) und 6,5 g Dinatriumhydrogenphosphat, wasserfrei (Na_2HPO_4) gelöst wurden. Die Gesamtlösung soll pH 6,8-7,2 aufweisen.

Methode II:

Die ca. 37%ig konzentrierte Formalinlösung wird mit PBS-Puffer (s.u.) auf 4% verdünnt. Dazu werden 100 ml 37% Formalin + 900 ml PBS-Puffer gemischt. Die Gesamtlösung soll pH 6,8-7,2 aufweisen.

PBS-Puffer:

8 g NaCl

1,3 g Na_2HPO_4

4 g NaH_2PO_4

pH 7,4 mit 1N HCl einstellen, auf 1 l mit Aqua bidest. auffüllen

Alternativ kann der fertige PBS-Puffer mit bereits eingestelltem pH-Wert als Pulver bei der Fa. Sigma (#P3813) bestellt werden.

III. Präparateherstellung

1. Paraffinschnitte

Saubere, fettfreie Objektträger verwenden. Bei Verwendung des Mikrowellenprotokolls zur Demaskierung von Antigenen müssen die Objektträger wie dort beschrieben mit APES (3-Aminopropyltriethoxysilan) behandelt oder vorbeschichtete Objektträger (s. 1.1. A) eingesetzt werden.

1. Schnitte im Wasserbad (50°C) aufziehen und über Nacht bei 37°C trocknen lassen.
2. Schnitte entparaffinieren in Xylol mit 2 x 10 min.
3. Schnitte in absteigender Alkoholreihe bis zum Wasser hydratisieren. 5 min 95% Ethanol ~ 5 min 80% Ethanol ~ 5 min 70% Ethanol ~ 2-3 min Leitungswasser

Ab diesem Punkt dürfen die Schnitte nicht mehr austrocknen!

1.1. APAAP Methode

1. Wenn notwendig, Schnitte mit Enzymen, Saponin, SDS, TUF oder feuchter Hitze vorbehandeln, um Antigene zu demaskieren.
2. Schnitte 1 min in Tris-Puffer waschen.

Fortfahren mit dem APAAP-Arbeitsprotokoll

1.2. Streptavidin-Biotin-Peroxidase Methode

1. Zur Blockierung der endogenen Peroxidaseaktivität Schnitte 20-30 min in frisch 0,3% (v/v) H₂O₂ in Methanol (**frisch angesetzt**) inkubieren. Anschließend 1 x 2 min mit PBS waschen.
2. Wenn notwendig, Schnitte mit Enzymen, Saponin, SDS oder feuchter Hitze vorbehandeln, um Antigene zu demaskieren.

Fortfahren mit dem Streptavidin-Biotin-Peroxidase-Arbeitsprotokoll

2. Gefrierschnitte

1. Schnitte auf saubere, fettfreie Objektträger aufziehen und wie gewohnt fixieren.
 - § 10 min in eisgekühltem Aceton. Anschließend lufttrocknen.
 - § 5-10 min in Aceton/Methanol (1:2). Anschließend lufttrocknen.
2. Vor Beginn der immunhistochemischen Färbung sollten die Schnitte 1 x 5 min mit Tris-Puffer (APAAP-Methode) oder mit PBS (Streptavidin-Biotin-Peroxidase-Methode) gewaschen werden

Ab diesem Punkt dürfen die Schnitte nicht mehr austrocknen!

Fortfahren mit dem APAAP-Arbeitsprotokoll oder dem Streptavidin-Biotin-Peroxidase-Arbeitsprotokoll.

3. Ausstriche und Cytospins

1. Auf Objektträger bei Raumtemperatur antrocknen lassen, Fixierung entweder:
 - § 10 min in eisgekühltem Aceton. Anschließend lufttrocknen.
 - § 5-10 min in Aceton/Methanol (1:2). Anschließend lufttrocknen.
 - § 10 min mit 1% Formalin in PBS.
2. Vor Beginn der immunhistochemischen Färbung sollten die Schnitte 1 x 5 min mit Tris-Puffer (APAAP-Methode) oder mit PBS (Streptavidin-Biotin-Peroxidase-Methode) gewaschen werden.

Ab diesem Punkt dürfen die Schnitte nicht mehr austrocknen!

Fortfahren mit dem APAAP-Arbeitsprotokoll oder dem Streptavidin-Biotin-Peroxidase-Arbeitsprotokoll.

IV. Protokolle zur Immunhistochemie

1. APAAP Methode

In der APAAP-Methode fungiert ein fertig löslicher Immunkomplex bestehend aus Maus anti-Alkalische Phosphatase Antikörpern mit Alkalische Phosphatase Molekülen als Nachweisreagenz. Zusätzlich zu ihrer hohen Sensitivität bietet die APAAP-Methode folgende Vorteile:

- § Durch Anwendung des Enzyms Alkalische Phosphatase werden Störungen durch die in Zellen häufig vorhandene Aktivität endogener Peroxidasen vermieden.
- § Wenn die Färbung mit der Standard APAAP-Methode schwach ausfällt, kann die Reaktion einfach durch eine weitere Inkubationsrunde mit Brückenantikörper und APAAP-Komplex ohne nennenswerten Anstieg des Hintergrunds verstärkt werden.

1.1. benötigte Reagenzien

Brückenantikörper

Katalog-Nummer	Bezeichnung	ME	Preis/Euro*
315-005-045	IgG, Gesamtmolekül, Kaninchen α -Maus, IgG (H+L), polyklonal	1,5 mg	112,00
211-005-109	IgG, Gesamtmolekül, Maus α -Kaninchen, IgG (H+L), polyklonal	1,5 mg	116,00

* zzgl. MwSt.

Empfohlene Arbeitsverdünnung: 1 :50 - 1 :200

APAAP-Komplex

Katalog-Nummer	Bezeichnung	ME	Preis/Euro*
201-005-134	APAAP-Komplex, Alkalische Phosphatase, Maus α - Alk. Phos.	1,0 ml	217,00

* zzgl. MwSt.

Empfohlene Arbeitsverdünnung: 1-2 μ g/ml

Lagerung: Bei 4 - 8°C im Kühlschrank 6 Monate ab Lieferdatum haltbar. Antikörper-Enzym-Komplexlösung nicht aliquotieren oder einfrieren.

Anwendung: Immunenzymatischer Nachweis von Primärantikörpern aus Maus im Zellausstrich, Zytospinpräparat sowie im routinemäßig fixierten Gefrier- und Paraffinschnitt. Soll das System für Primärantikörper, die nicht aus der Maus stammen verwendet werden, wird zwischen dem anti-Maus Brückenantikörper und dem Primärantikörper ein zusätzlicher Brückenantikörper erforderlich.

Blockierungsseren

Katalog-Nummer	Bezeichnung	ME	Preis/Euro*
011-000-120	Kaninchen Normalserum	5 ml	36,00
009-000-121	Human Normalserum	10 ml	54,00

Empfohlene Arbeitsverdünnung: 1 :20 - 1 :100 in Tris-Puffer

Für Reagentien zur **Gegenfärbung** und für **Mountingmedien** beachten Sie bitte auch die Angaben in Abschnitt IV.2.

1.2. Arbeitslösungen APAAP Methode

Als Grundlage aller Arbeitslösungen dient Tris-Puffer, wenn nicht anders beschrieben.

Tris-Puffer

1,8 g Tris-Base (Sigma #T 1503)
13,7 g Tris-HCl (Sigma #T 3253)
17,5 g NaCl (Serva #A 30183)

pH 7,4 mit 1N HCl einstellen, auf 2 l mit Aqua bidest auffüllen

A Lösung A1 (44 ml Tris-Substrat Puffer):

4,9 g Tris-Base (Sigma #T 1503)
1,5 g Tris-HCl (Sigma #T 3253)
8,7 g NaCl (Serva #A 30183)

pH 8,7 mit 1N HCl einstellen, auf 1 l mit Aqua bidest. auffüllen
(Lagerung bei 4°C möglich)

Lösung A2 (15,5 ml AMPD- Levamisol Lösung):

25 mg Levamisol (Sigma #L9756)
0,2 M AMPD-Lösung lösen (Lagerung bei 4°C möglich)
(21 g AMPD (Serva #A13039) in 1 l Aqua bidest.)

B Lösung B:

375 µl N,N-Dimethylformamid (Sigma #D 4254)
31 mg Naphthol-As-Bi-Phosphat (Fluka #70482)

C Lösung C1 (320 µl 4%-ige Na-Nitrit Lösung):

12,8 mg Na-Nitrit (Fluka #71759)
320 µl Aqua bidest.
(unbedingt frisch ansetzen)

Lösung C2 (125 µl 5%-ige Neufuchsin Stammlösung):

5 g Neufuchsin (Aldrich #22931-8)
100 ml 2N HCl
Lagerung bei 4°C möglich (in dunkler Flasche)

Herstellung der- Neufuchsin Substratlösung:

1. Einzellösungen in Reihenfolge A, B, C ansetzen.
2. Lösung C zu Lösung A zugeben, mischen
3. Lösung B hinzufügen, mischen
4. pH-Wert 8,7 einstellen, 2 min reagieren lassen, filtrieren.

1.3. Arbeitsprotokoll APAAP Methode

Alle folgenden Inkubationsschritte sollten in einer feuchten Kammer durchgeführt werden. Vor Zusatz der einzelnen Antikörper müssen Pufferreste mit Zellstoff oder über eine Wasserstrahlpumpe vorsichtig von den Präparaten abgesaugt werden. Die Verdünnungen werden, soweit nicht anders beschrieben, in Tris-Puffer vorgenommen.

A. APAAP Methode für monoklonale Primärantikörper aus Maus

1. Inkubation der Schnitte mit jeweils 100 µl Kaninchenserum (Verdünnung 1:20-1:100, dianova #011-000-120) 10 min bei Raumtemperatur, um eine unspezifische Bindung der Antikörper zu vermeiden.
2. Schnitte 1 x 1 min mit Tris-Puffer bei Raumtemperatur waschen.
3. Inkubation mit jeweils 100 µl Primärantikörper (Verdünnung in Tris-Puffer oder RPMI-Medium entsprechend Produktzertifikat) 30 min bei Raumtemperatur. Bei schwachen Antigenen kann eine Inkubationszeit von 2-4 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C erforderlich sein.
4. Schnitte 2 x 1 min mit Tris-Puffer waschen.
5. Inkubation mit jeweils 100 µl Dualsystem-Brückenantikörper (Verdünnung 1:50-1:200) 30 min bei Raumtemperatur.
6. Schnitte 2 x 1 min mit Tris-Puffer waschen.
7. Inkubation mit Dualsystem-APAAP-Komplex (Verdünnung 1:50-1:100) 30 min bei Raumtemperatur.
8. Schritte 4-7 eventuell wiederholen (mit je 15 min Inkubationszeit zur Steigerung der Sensitivität).
9. Unter Leitungswasser 5 min spülen.
10. In Neufuchsin-Substratlösung 30 min bewegen (Schüttler).
11. Unter Leitungswasser 3 min spülen.
12. Gegenfärbung z.B: Hämalan (DLN-15900) nach Mayer (1-3 min).
13. 5 min Bläuen unter Leitungswasser.
14. Eindecken in wäßriges Einbettungsmedium z. B. Kaisers Glyceringelatine.

B. APAAP Methode für polyklonale Primärantikörper aus Kaninchen

1. Inkubation der Schnitte mit jeweils 100 µl Humanserum (Verdünnung 1:20-1:100, dianova #009-000-121) 10 min bei Raumtemperatur, um eine unspezifische Bindung der Antikörper zu vermeiden.
2. Schnitte 1 x 1 min mit Tris-Puffer bei Raumtemperatur waschen.
3. Inkubation mit jeweils 100 µl Primärantikörper (Verdünnung in Tris-Puffer oder RPMI-Medium entsprechend Produktzertifikat) 30 min bei Raumtemperatur. Bei schwachen Antigenen kann eine Inkubationszeit von 2-4 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C erforderlich sein.
4. Schnitte 2 x 1 min mit Tris-Puffer waschen.
5. Inkubation mit 100 µl Maus-anti-Kaninchen IgG-Antikörper (Verdünnung 1:50-1:200, dianova #211-005-109) 30 min bei Raumtemperatur.
6. Schnitte 2 x 1 min mit Tris-Puffer waschen.
7. Inkubation mit jeweils 100 µl Dualsystem-Brückenantikörper (Verdünnung 1:50-1:200) 30 min bei Raumtemperatur.
8. Schnitte 2 x 1 min mit Tris-Puffer waschen.
9. Inkubation mit Dualsystem-APAAP-Komplex (Verdünnung 1:50-1:100) 30 min bei Raumtemperatur.
10. Schritte 6-9 eventuell wiederholen (mit je 15 min Inkubationszeit zur Steigerung der Sensitivität).
11. Unter Leitungswasser 5 min spülen.
12. in Neufuchsin-Substratlösung 30 min bewegen (Schüttler).

2. Streptavidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (Strept-ABC)-Methode

In dieser Amplifizierungsmethode folgt dem Primärantikörper ein biotinylierter Sekundärantikörper. Ein fertiger Komplex aus Streptavidin und biotinylierter Peroxidase bildet die dritte Schicht. Dabei werden die zwei Reaktionspartner in diesem Komplex zu solchen Teilen gemischt, dass einige Biotin-Bindungsstellen am Streptavidin frei bleiben, damit diese mit dem Biotin des Sekundärantikörpers reagieren können. Auf diese Weise kann eine sehr große Menge Peroxidase an den Primärantikörper gebunden werden. Heute wird die Strept-ABC-Methode jedoch vielfach durch die LStrept-AB-Methode ersetzt (s. Kapitel IV.3), wegen einer höheren Stabilität der Reagenzien, einfacheren Anwendung, geringeren Hintergrundfärbung und höheren Sensitivität.

2.1. Arbeitslösungen - Strept-ABC-Methode

Als Grundlage aller Arbeitslösungen dient PBS. Die Arbeitslösungen sollten innerhalb von 24 h nach dem Ansetzen verbraucht werden.

PBS (Phosphat gepufferte Kochsalzlösung):

8 g NaCl

1,3 g Na₂HPO₄

4 g NaH₂PO₄

pH 7,4 mit 1N HCl einstellen, auf 1 l mit Aqua bidest. auffüllen, Lagerung bei 4°C.

Alternativ kann der fertige PBS-Puffer mit bereits eingestelltem pH-Wert als Pulver bei der Fa. Sigma (#P3813) bestellt werden.

PBS-BSA: PBS mit 1% (w/v) Rinderserum-Albumin.

Katalog-Nummer	Bezeichnung	ME	Preis/Euro*
001-000-161	Rinderserum-Albumin (ChromPure) negativ getestet für bovines IgG und Protease	10 g	90,00

* zzgl. MwSt.

PBS-Triton: PBS mit 1% (v/v) Triton-X 100 in PBS

Normalserum-Blockierungslösung: 5 – 10% Normalserum in PBS – Normalserum aus derselben Spezies wie der Sekundärantikörper. Zugabe von 50 - 100 µl Normalserum pro 0,95 – 0,90 ml PBS. Pro Schnitt sollten jeweils 100 µl der Verdünnung eingesetzt werden.

Katalog-Nummer	Bezeichnung	ME	Preis/Euro*
005-000-121	Normalserum, Ziege, unkonj.	10 ml	54,00

* zzgl. MwSt.

Peroxidase-Blockierungslösung:

§ Für Paraffinschnitte

3,0% H₂O₂ in PBS:

2 ml 30% H₂O₂

18 ml PBS

Gut mischen, bis zu 3 Monate bei 4°C lagern.

Schnitte nach Primärantikörperinkubation 10 min inkubieren.

§ Für Gefrierschnitte

0,3% H₂O₂ in Methanol:

0,2 ml 30% H₂O₂

18 ml Methanol

Gut mischen, bei 4°C lagern.

Schnitte nach Primärantikörperinkubation 20 - 30 min inkubieren.

Biotinylierter Zweitantikörper: Biotin-Konjugat Ziege anti-Maus oder Ziege anti-Kaninchen, Verdünnung 1 : 500 – 1 : 5000 in PBS (ca. 100µl/Schnitt)

Katalog-Nummer	Bezeichnung	ME	Preis/Euro*
115-065-146	IgG, Gesamtmolekül, Ziege anti-Maus IgG (H+L), polyklonal, Biotin, MinX Hu, Bo, Ho, Rb, Sw	1,5 ml	172,00
115-065-144	IgG, Gesamtmolekül, Ziege anti-Kaninchen IgG (H+L), polyklonal, Biotin, MinX Hu, Ms, Rt	1,5 ml	172,00

* zzgl. MwSt.

Streptavidin-Biotin-Peroxidase-Komplex:

12,5 µg/ml* Streptavidin + 2,5 µg/ml* biotinylierte Peroxidase

Zur Präformierung des Komplexes Komponenten vor dem Auftragen auf den Schnitt mischen und 1 h bei Raumtemperatur zusammen vorinkubieren. Pro Schnitt sollten 100 µl des Streptavidin-Biotin-Peroxidase-Komplexes eingesetzt werden.

Beachten: Komplex und Komponenten für jede Anwendung frisch ansetzen.

* das optimale Mischungsverhältnis dieser Komponenten ist Lot-abhängig aber entscheidend für eine quantitative Bindung des Komplexes an den biotinylierten Sekundärantikörper (s. oben). Deshalb sollte die richtige Konzentration der Komponenten in einem Vorversuch individuell bestimmt werden.

Katalog-Nummer	Bezeichnung	ME	Preis/Euro*
016-000-084	Streptavidin, unkonj.	1,0 mg	72,00
016-000-113	Streptavidin, unkonj.	5,0 mg	253,00
023-060-021	Biotin-SP, HRPO	5,0 mg	109,00

* zzgl. MwSt.

Negativ Kontrollantikörper: Isotyp entsprechend dem des Maus oder Kaninchen Primärantikörpers; mit PBS-BSA verdünnen. 100 µl der Verdünnung sollten pro Schnitt eingesetzt werden.

Homepage	Produkte à Katalog-Recherche à Systematische Suche
www.dianova.de	Isotypkontrollen, ChromPure-Ig & Konjugate

Substratlösung: (Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid, DAB): 5 mg DAB auf 100 ml PBS. Zugabe von 0,1 ml 0,3% H₂O₂ (Substratlösung direkt vor Gebrauch frisch ansetzen)

oder:

Katalog-Nummer	Bezeichnung	ME	Preis/Euro*
DLN-13313	NOVADetect AEC-Substrat Kit, AEC-Chromogen, AEC-Substrat	60 ml	60,00
DLN-13314	NOVADetect AEC-Substrat Kit, AEC-Chromogen, AEC-Substrat	125 ml	96,00
DLN-15909	NOVADetect gebrauchsfertige 1 Komponente AEC-Subst.-Chromogen	60 ml	156,00
DLN-15910	NOVADetect gebrauchsfertige 1 Komponente AEC-Subst.-Chromogen	125 ml	292,00
DLN-13315	NOVADetect DAB-Substrat Kit, DAB-Chromogen, DAB-Substrat	60 ml	63,00
DLN-13316	NOVADetect DAB-Substrat Kit, DAB-Chromogen, DAB-Substrat	125 ml	102,00

* zzgl. MwSt.

WARNUNG: Es besteht der Verdacht, dass DAB ein Carcinogen ist.
Vorsichtig handhaben und gemäß den Regulierungsvorschriften entsorgen.

Hämatoxylinlösung: gebrauchsfertig

Katalog-Nummer	Bezeichnung	ME	Preis/Euro*
DLN-15900	NOVADetect Hämatoxylin, Reagenz zur Kerngegenfärbung	125 ml	21,00

* zzgl. MwSt.

Mountingmedium: NOVAMount zur dauerhaften Konservierung immunhistochemischer Schnitte, einfach auftragen und trocknen lassen. Bildet eine stabile, ebene Schicht mit hoher optischer Klarheit (auch für organisch lösliche Chromogene geeignet).

Katalog-Nummer	Bezeichnung	ME	Preis/Euro*
DLN-15998	NOVAMount (60 ml)	60 ml	40,00
DLN-15906	NOVAMount (125 ml)	125 ml	65,00

* zzgl. MwSt.

2.2. Arbeitsprotokoll - Strept-ABC-Methode für Primärantikörper aus Maus oder Kaninchen

Alle Inkubationsschritte sollten in einer feuchten Kammer durchgeführt werden. Vor Zusatz der einzelnen Antikörper müssen Pufferreste mit Zellstoff oder über eine Wasserstrahlpumpe vorsichtig von den Präparaten abgesaugt werden. Die Verdünnungen werden, sofern nicht anders beschrieben, in PBS-Puffer vorgenommen.

1. Rehydratisierte, vorbehandelte Paraffinschnitte oder Gefrierschnitte 2 x 2 min mit PBS waschen.
2. Inkubation der Schnitte mit jeweils 100 µl der Normalserum-Blockierungslösung 20 min bei Raumtemperatur, um eine unspezifische Bindung der Antikörper zu vermeiden.

Beachten: da dieses Protokoll auf einem Streptavidin-Biotin-Detektionssystem beruht, könnte bei Geweben mit einem hohen Gehalt endogenen Biotins (z.B. Leber, Nierenzellen, Organe mit Fettsynthese u.a.) ein zusätzlicher Streptavidin/Biotin Blockierungsschritt erforderlich sein:

(optionaler Schritt) Avidin/Biotin-Block:

- a.) Avidin 0.001% in PBS
- b.) Biotin 0.001% in PBS

(Blockierungslösungen bei 4°C lagern)

Schnitte jeweils für 10 - 15 min in a.) und b.) inkubieren, zwischen den Schritten mit PBS waschen

Der Avidin/Biotin Blockierungsschritt sollte nach dem Normalserum-Block und vor der Inkubation mit Primärantikörper durchgeführt werden.

3. Inkubation mit jeweils 100 µl der Primärantikörper-Verdünnung:
 - § in PBS-BSA 60 min bei Raumtemperatur oder
 - § über Nacht bei 4°C.

Beachten: Schnitte zwischen Normalserum-Blockierung (2.) und Primärantikörper-Inkubation (3.) nicht waschen.

4. Schnitte 3 x 5 min in PBS waschen.
5. Falls noch nicht durchgeführt, Blockierung endogener Peroxidase mit Peroxidase-Blockierungslösung bei Raumtemperatur.
6. Schnitte 3 x 5 min in PBS waschen.
7. Inkubation mit je 100 µl der Arbeitsverdünnung des biotinylierten Zweitantikörpers in PBS 30 min bei Raumtemperatur.

8. Schnitte 3 x 5 min in PBS waschen.
9. Inkubation mit jeweils 100 µl der Arbeitsverdünnung des präformierten Streptavidin-Biotin-Peroxidase-Komplexes 30 min bei Raumtemperatur.

Beachten: der Komplex muss für jede Anwendung frisch angesetzt werden und benötigt 1 h zur Präformierung (s. Abschnitt Arbeitslösungen).

10. Schnitte 3 x 5 min in PBS waschen.
 11. Einmaliges Waschen der Schnitte in PBS mit 1% (v/v) Triton X-100 30 s.
 12. Schnitte 3-7 min in der Substrat-Lösung (z.B. DAB) inkubieren.
 13. Schnitte 3 x mit Aqua dest. waschen.
 14. Gegenfärbung mit Hämatoxylinlösung (5 bis 10 min).
 15. Schnitte mit Aqua dest. waschen.
 16. Dehydrieren der Schnitte in 95% Ethanol, 1 x 1 min.
 17. Dehydrieren der Schnitte in 100% Ethanol, 2 x 3 min.
 18. Klären der Schnitte in Xylol, 2 x 5 min.
 19. Abdecken des Gewebes mit Mountingmedium und Deckglas.
- Eine positive Reaktion ist an einer bräunlichen Färbung im Bereich des Antigens zu erkennen.

3. LStrept-AB-Methode (LSAB Methode)

Wie bei der zuvor beschriebenen A.B.C.-Methode bedient man sich ebenfalls der Affinität von Streptavidin zu Biotin und arbeitet mit den selben biotinylierten Sekundärantikörpern. Anstelle des Streptavidin-Enzym-Komplexes kommen aber Streptavidin-Enzymkonjugate zum Einsatz. Die Biotinbrücken wie bei der A.B.C.-Methode entfallen. Diese Konjugate sind erheblich kleiner als der A.B.C.-Komplex und führen deshalb nicht so schnell zu räumlichen Behinderungen. Außerdem sind alle 4 Bindungsstellen des Streptavidins für eine Interaktion mit dem biotinylierten Sekundärantikörper frei. Die LStrept-AB-Methode wird wegen der höheren Stabilität und Sensitivität des Streptavidin-Konjugats der Strept-ABC-Methode häufig vorgezogen.

3.1. NOVADetect StreptAB Kits

NOVADetect StreptAB-Systeme sind ein sensitives Standard-Nachweissystem für die Darstellung von Antigenen in routinemäßig fixierten Gefrier- und Paraffinschnitten sowie Zytopräparaten. Die Kitreagenzien bilden ein Streptavidin-Biotin-markiertes immunenzymatisches Antigen-Nachweissystem. Diese Technik beinhaltet die sequentielle Inkubation von Proben mit einem unkonjugierten primären Antikörper, der spezifisch für das Zielantigen ist, einem biotinylierten sekundären Antikörper, der mit dem primären Antikörper reagiert, dem enzymmarkierten Streptavidin und dem Chromogen-Substrat. Die Kits sind gebrauchsfertig, es müssen keine zusätzlichen Lösungen angesetzt werden, und die Inkubationszeiten sind wesentlich kürzer als bei ABC-Nachweismethoden.

Für alle Kits bietet dianova eine große Auswahl speziell für die Histologie optimierter Primärantikörper und Negativkontrollen an. Darüber hinaus läßt sich jedes StreptAB-System durch individuelle Auswahl eines Sekundärantikörpers unseres Herstellers Jackson ImmunoResearch auf spezielle Erfordernisse des Anwenders wie besondere Gewebe, Zellen oder Doppelmarkierungen mit Primärantikörpern, die nicht aus Maus oder Kaninchen stammen, anpassen. Alle Kit-Bestandteile sind auf Wunsch einzeln erhältlich.

- TESTPRINZIP -

Das NOVADetect StreptAB Nachweissystem weist einen spezifischen Antikörper nach, der an ein Antigen in den Gewebeschnitten gebunden ist. Der spezifische Antikörper wird durch einen Biotin-konjugierten sekundären Antikörper lokalisiert. Auf diesen Schritt folgt die Hinzugabe eines Streptavidin-Enzym-Konjugats, welches das kovalent gekoppelte Biotin am sekundären Antikörper bindet. Der spezifische Antikörper, der sekundäre Antikörper und der Streptavidin-Enzym-Komplex werden dann mit einem geeigneten Substrat/Chromogen dargestellt.

Folgende Kits sind mit Primärantikörpern aus Kaninchen **und** Maus verwendbar:

Katalog-Nummer	Bezeichnung	Substrat	Tests	Preis/Euro*
DLN-13153	NOVADetect HRPO/AEC Standard StreptAB	AEC	<300	213,00
DLN-13154	NOVADetect HRPO/DAB Standard StreptAB	DAB	<300	213,00
DLN-13155	NOVADetect Alk.Phos./BCIP/NBT Standard StreptAB	BCIP/NBT	<300	219,00
DLN-13156	NOVADetect Alk.Phos./FastRed Standard StreptAB	FastRed	<300	219,00

* zzgl. MwSt.

Alle <300 Test Kits enthalten: Peroxidase-Block (nur in HRPO-Kits enthalten), Protein-Block, biotinylierten Sekundärantikörper, enzymkonjugiertes Streptavidin und Chromogen-Substrat. Die Kits sind auch in den Packungsgrößen <1200 und <2500 lieferbar (ohne Substratlösungen).

Informationen über monospezifische Kits gegen Maus oder Kaninchen, sowie auf schnelle immunhistologische Färbung optimierte **Quick Kits** und spezielle für **Primärantikörper aus Maus auf murinem Gewebe** optimierten Kits, finden Sie auf unserer Web-Site oder fragen Sie uns direkt.

3.2. Arbeitslösungen - Standard LStrept-AB-Methode

Wie in Abschnitt 2 (Strept-ABC-Methode). Anstelle des Streptavidin-Biotin-Peroxidase-Komplex wird verwendet:

Streptavidin-Peroxidase-Lösung:

1 – 2 µg/ml Peroxidase-konjugiertes Streptavidin in PBS-BSA. Pro Schnitt sollten 100 µl der Streptavidin-Peroxidase-Lösung eingesetzt werden.

Katalog-Nummer	Bezeichnung	ME	Preis/Euro*
016-030-084	Streptavidin, HRPO	1,0 mg	136,00

* zzgl. MwSt.

3.3. Arbeitsprotokoll - Standard LStrept-AB-Methode

Wie in den anderen beschriebenen Methoden gilt auch hier, alle Inkubationsschritte in einer feuchten Kammer durchzuführen, Pufferreste vor dem Auftragen der Antikörper sorgfältig zu entfernen und Verdünnungen, soweit nicht anders beschrieben, in PBS durchzuführen.

Außer Schritt 9. sind alle Inkubationsschritte analog zu den in Kapitel 2.2 (Strept-ABC-Methode) beschrieben:

9. Inkubation mit jeweils 100 µl der Arbeitsverdünnung des Peroxidase-konjugierten Streptavidins 30 min bei Raumtemperatur.

4. NOVADetect Polymer Marker Kits

NOVADetect LP (Labeled Polymer) steht für die modernste Technologie in der Polymermarkierung. Es hat sich gezeigt, dass der Polymernachweis von NOVADetect eine erhöhte Sensitivität und einen vereinfachten Nachweis liefert. Das Polymersystem besteht aus kleinen Polymeruntereinheiten, um die molekularen Beeinträchtigungen, die mit großen Polymeren häufig vorkommen, zu minimieren und dadurch die Markierung des Zielproteins zu verstärken. Verminderte sterische Konflikte bei der Polymer-Bindung führen zu einer konsistenteren Färbung und besseren Signalverstärkung (Shan-Rong Shi et al., Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology. 1999, 7, 201-208). Schließlich gibt dies dem Anwender eine höhere Sensitivität und Antikörperwirksamkeit (K. Petrosyan et al., J. Histotechnology. 2002, 25, 247-250). Mit NOVADetect LP wird weniger Antikörper verbraucht und werden bessere Signal-zu-Hintergrund-Verhältnisse erzielt. Da NOVADetect LP außerdem biotinfrei ist, fällt die bei traditionellen Biotin-Nachweissystemen mögliche Hintergrundfärbung weg.

- TESTPRINZIP -

Das NOVADetect Nachweissystem weist einen spezifischen Maus-IgG- oder Kaninchen-IgG-Antikörper nach, der an ein Antigen in den Gewebeschnitten gebunden ist. Der spezifische Antikörper wird durch einen universellen sekundären Antikörper lokalisiert, der an ein enzymmarkiertes Polymer konjugiert ist, das Maus- und Kaninchen-Immunglobuline erkennt. Der Polymerkomplex wird dann mit einem geeigneten Substrat/Chromogen dargestellt.

Folgende Kits sind mit Primärantikörpern aus Kaninchen und Maus verwendbar:

Katalog-Nummer	Bezeichnung	Substrat	Tests	Preis/Euro*
DLN-15921	NOVADetect HRPO/AEC LP Kit	AEC	<300	254,00
DLN-15922	NOVADetect HRPO/DAB LP Kit	DAB	<300	254,00
DLN-15918	NOVADetect Alk. Phos./Fast Red LP Kit	FastRed	<300	254,00

* zzgl. MwSt.

4.1. Arbeitsmaterialien

am Beispiel des NOVADetect Nachweissystem Anti-Polyvalent, HRP/DAB (DLN-15922)

Spezifität: Anti-Maus-IgG (H+L), Anti-Kaninchen-IgG (H+L)

Enzym: Peroxidase

Chromogen/Substrat: Diaminobenzidin (DAB)

Enthaltene Reagenzien:

- § Wasserstoffperoxidblock
- § Primärer Antikörperverstärker
- § DAB-Substrat
- § NOVADetect-Block
- § HRP-Polymer
- § DAB-Chromogen

4.2. Arbeitsprotokoll Polymer Marker Kit

am Beispiel des NOVADetect Nachweissystem Anti-Polyvalent, HRP/DAB (DLN-15922)

1. Den Gewebeschnitt entparaffinieren und rehydrieren.
2. 2 Mal in Puffer waschen.
3. Falls erforderlich, das Gewebe in einem Verdauungsenzym inkubieren (oder adäquate Vorbehandlung).
4. 4 Mal in Puffer waschen.
5. Zur Reduzierung der unspezifischen Hintergrundfärbung infolge endogener Peroxidase den Objektträger 10-15 Minuten lang im Wasserstoffperoxidblock inkubieren.
6. 4 Mal in Puffer waschen.
7. Den NovaDetect-Block anwenden und 5 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubieren, um die unspezifische Hintergrundfärbung zu blockieren. Hinweis: 10 Minuten dürfen nicht überschritten werden, sonst kann es zu einer Reduktion der gewünschten Färbung kommen.
8. Spülen (optional).
9. Den primären Antikörper anwenden und nach dem Herstellerprotokoll inkubieren.
10. 4 Mal in Puffer waschen.
11. Den Erstantikörper-Verstärker anwenden und 20 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubieren
12. 4 Mal in Puffer waschen.
13. Das HRP Polymer anwenden und 30 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubieren.
Das HRP Polymer ist Lichtsensitiv! Vor Licht schützen und in dunklen Gefäßen lagern
14. 4 Mal in Puffer spülen.
15. 1-2 Tropfen (40-100 µl) DAB-Chromogen zu 1 ml DAB-Substrat hinzugeben, durch Wirbeln mischen und auf das Gewebe geben. Je nach der gewünschten Färbungsintensität, 5-15 Minuten lang inkubieren.

WARNUNG: Es besteht der Verdacht, dass DAB ein Carcinogen ist.

Vorsichtig handhaben und gemäß den Regulierungsvorschriften entsorgen.

16. 4 Mal in Aqua dest. Spülen
17. eventuell Gegenfärben und Abdecken des Gewebes mit Mountingmedium und Deckglas.

V. Fehlerquellen

Ergebnis: Keine Anfärbung

- § Um kontrollieren zu können, ob die immunhistochemische Färbung erfolgreich war oder ob das Ausbleiben einer positiven Reaktion auf die Abwesenheit des Antigens zurückzuführen ist, ist es notwendig, bei jeder Färbeserie eine Positivkontrolle mitlaufen zu lassen.
- § In Frage kommen Gewebe, von denen bekannt ist, dass Sie das Antigen exprimieren. Sollte dies nicht möglich sein, empfiehlt es sich, einen weiteren Primärantikörper zu verwenden, von dem bekannt ist, dass das Antigen im Schnittpräparat vorhanden ist (z.B. dianova #T-1302, anti-pan Zytokeratin Antikörper zur Darstellung von Bindegewebsstrukturen).
- § Sollten die Positivkontrollen in Ordnung sein, der interessierende Primärantikörper aber keine Reaktion zeigen, kann dies folgende Gründe haben:
- § Viele Proteine werden zwar in einem Gewebe exprimiert, allerdings nicht in allen Fällen. So wird z.B. das c-neu/erbB2 Protein in 30% aller Mamma-Karzinome exprimiert. Um tatsächlich ein positives Ergebnis zu erhalten, müssen somit eine ganze Reihe von verschiedenen Tumoren analysiert werden.
- § Antigene (in der Regel Proteine) unterscheiden sich in ihrer Empfindlichkeit gegenüber den verwendeten Fixierungsagenzien insbesondere Formalin. Eine Fixierung in ungepufferten Formalin über mehrere Tage stellt eine ausgesprochen harte Behandlung für Proteine dar. Viele Proteine sind anschließend für Antikörper nicht mehr zugänglich (maskiert) bzw. irreversibel denaturiert, so dass eine Antikörperreaktion nicht mehr möglich ist. Häufig können die von den Antikörpern erkannten Epitope durch eine Vorbehandlung der Gewebeschnitte mit Detergenz, Enzymen, TUF oder einer Vorbehandlung mit feuchter Hitze wieder für Antikörper zugänglich gemacht werden. Einige Proteine wie z.B. das ras Protein werden allerdings durch eine routinemäßige Formalinfixierung in ungepuffertem Formalin sehr oft irreversibel geschädigt. Um falsch negative Resultate zu vermeiden, empfiehlt sich eine Fixierung in gepuffertem Formalin (4-10% Formalin in PBS) bei 4°C über Nacht bis maximal 24 h.

Ergebnis: unspezifischer Hintergrund

- § Um die Ursache einer unspezifischen Hintergrundreaktion zu ergründen, sollten folgende Kontrollen bei jeder Färbeserie durchgeführt werden:
 1. Inkubation eines Schnittes mit dem Negativ-Kontrollantikörper (1:100 in PBS-BSA verdünnt).
 2. Inkubation eines Schnittes mit dem Detektionssystem ohne Primärantikörper
- § Sollten die Kontrollen 1 und 2 ebenfalls eine Hintergrundreaktion zeigen, reagiert eine der Komponenten des Detektionssystem unspezifisch. Sind die Kontrollen in Ordnung, ist die unspezifische Reaktion auf den Primärantikörper zurückzuführen.
- § Als Abhilfe empfiehlt es sich, die Konzentration des zur Verhinderung unspezifischer Bindung verwendeten Blocking-Reagenzes auf 10% (v/v) in PBS zu erhöhen. Zusätzliches Blocking-Serum ist bei dianova GmbH erhältlich (Pferde-Normal-Serum #008-000-001). Eine zu geringe Verdünnung des Primärantikörpers kann ebenfalls zu unspezifischen Reaktionen führen. Es ist ratsam, bei neuen Primärantikörpern eine Verdünnungsreihe zu erstellen, um die optimale Verdünnung zu ermitteln.

Weitere wichtige Hinweise:

- § Ein weiterer Hauptgrund für unspezifische Reaktionen ist eine zu lange Inkubationszeit in der Substratlösung.
- § Für Paraffinschnitte ist eine Blockierung der endogenen Peroxidaseaktivität, wie im Protokoll unter V.1.5. beschrieben, essentiell. Manche Gewebe, wie z.B. Leber, enthalten sehr große Mengen endogener Peroxidase, die auch durch eine H₂O₂ Behandlung nicht vollständig blockierbar sind. Für solche Fälle ist es günstiger, auf ein auf Alkalischer Phosphatase basierendes Detektionssystem zu wechseln. Monoklonale Antikörper aus der Maus sollten nicht auf Mausgeweben eingesetzt werden, da dies zu unspezifischen Reaktionen führen kann. Die Schnitte dürfen während der gesamten Färbeprozedur nicht austrocknen. Eintrocknete Antikörper lassen sich auch durch gründliches Spülen in der Regel nicht mehr abwaschen. Daher sollten alle Inkubationsschritte in einer feuchten Kammer durchgeführt werden.
- § Nach der Inkubation mit dem Blocking-Reagenz (Pferde-Normal Serum) müssen die Schnitte auf alle Fälle, wie im Protokoll beschrieben, gründlich gewaschen werden, da überschüssiges Normal-Serum zu unspezifischen Reaktionen führen kann.