BIOZOL

Diagnostica Vertrieb GmbH, Oehleckerring 11-13

22419 Hamburg, Germany

Telephone: +49 (0)89 3799666-6 | **Fax:** +49 (0)89 3799666-99

E-Mail: info@biozol.de

Immunhistochemie (IHC)

Atlas Antibodies Standard IHC-Protokoll

Beschrieben ist das immunhistochemische Standardprotokoll von Atlas Antibodies, das für Triple-A-Polyklonale und PrecisA-Monoklonale optimiert ist.

Entparaffinierung

Paraffinschnitte von 4 µm Dicke werden über Nacht bei 50°C inkubiert. Vor der Immunfärbung werden Entparaffinierung und Hydratisierung in Xylol und abgestuftem Ethanol zu destilliertem Wasser durchgeführt und während der Hydratisierung eine 5-minütige Blockierung für endogene Peroxidase in 0,3% H2O2 in 95%igem Ethanol.

Antigen-Entnahme

1. Standard-Antigenentnahmeverfahren

Die Standardantigen-Entnahmemethode ist die hitzeinduzierte Epitop-Entnahme (*Heat Induced Epitope Retrieval*, HIER) in Entnahmepuffer pH 6,1 unter Verwendung eines Druckkessels

(Enttarnungskammer, Biocare Medical, Walnut Creek, CA, USA) als Wärmequelle. HIER wird durchgeführt, indem die in den Entnahmepuffer eingetauchten TMA-Objektträger 20 Minuten lang bei 110°C im Druckkessel erhitzt werden. Nach Beendigung des Kochens verbleiben die Objektträger im Druckkessel und können auf 90°C abkühlen. Die gesamte Verarbeitungszeit beträgt etwa 60 Minuten.
HINWEIS: Die angegebenen Arbeitsverdünnungen der Primärantikörper sind nur als Richtwert zu betrachten. Die optimalen Verdünnungen müssen vom Anwender bestimmt werden.

2. Alternative Methoden zur Antigengewinnung

Für ausgewählte Antikörper können alternative Entnahmepuffer und/oder enzymatische Antigenentnahme verwendet werden, wie im Produktdatenblatt und auf der Antikörper/Antigen-Informationsseite des Humanprotein-Atlas angegeben.

Verfahren zur enzymatischen Antigengewinnung

Die enzymatische Entnahme erfolgt mit dem Immunfärbungsgerät unter Inkubation von TMA-Objektträgern in Proteinase K (Lab Vision, Freemont, CA, USA) für 10 Minuten bei Raumtemperatur.

Wärmeinduzierte Epitop-Rückgewinnung (HIER) in Retrieval-Puffer pH 9

Die HIER wird in Target Retrieval Lösung pH 9 unter Verwendung der Decloaking Chamber NxGen wie oben beschrieben.

Immunhistochemisches Färbeprogramm

Färbeprogramm Autostainer 480

(ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA)

Alle Inkubationen werden bei Raumtemperatur durchgeführt.
Alle Reagenzien werden mit einem Volumen von 300 µl pro Objektträger aufgetragen.

1. Spülen in Waschpuffer.*
2. Inkubation mit Ultra V Block für 5 min.
3. Spülen in Waschpuffer (x2).
4. Inkubation mit Primärantikörper für 30 min.
5. Spülen in Waschpuffer (x3).

6. Inkubation mit primärem Antikörper Enhancer für 20 min.**
7. Spülen in Waschpuffer (x2).
8. Inkubation mit markiertem Polymer für 30 Min.
9. Spülen in Waschpuffer (x2).
10. Entwickeln in DAB-Lösung für 5 min.
11. Spülen in destilliertem Wasser.
12. Gegenfärbung in Hämatoxylin für 5 min.***
13. Spülen in Leitungswasser für 5 Min.
14. Spülen in Li2CO3-Wasser, 1:5 verdünnt aus gesättigter Lösung für 1 Min.
15. 5 Min. lang in Leitungswasser spülen.
16. Dehydrierung in abgestuftem Ethanol und Xylol.
17. Mounting in Pertex.
18. Mit Deckglas abdecken.

* Die Schritte 1 bis 11 werden im Autostainer 480S (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) durchgeführt.

** Bei polyklonalen Antikörpern die Schritte 6 und 7 auslassen.

** Die Schritte 12 -18 werden im vollautomatischen integrierten Färbegerät Leica ST5010-CV5030 (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland)

Reagenzien

Für die Immunhistochemie sind die folgenden Reagenzien im Handel bei Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA, erhältlich:

- Waschpuffer (10x-Konzentrat). Die Arbeitslösung enthält ursprünglich 0,05 % (v/v) Tween 20. Zusätzliches Tween 20 wird bis zu einer Endkonzentration von 0,20 % hinzugefügt.
- Antikörper-Verdünnungsmittel
- UltraVision LP HRP-Polymer®.
- Primärantikörper-Verstärker (nur für monoklonale Antikörper)
- Ultra V Block
- DAB Quanto Detection System (einschließlich Chromogen und Substrat)

Für den Epitop-Retrieval sind die folgenden Puffer im Handel erhältlich: Dako, Agilent, Santa Clara, CA, USA:

- Target Retrieval Solution, Citrat pH 6,1 (10x)
- Target-Retrieval-Lösung, pH 9 (10x)

Darüber hinaus werden Mayer's Hämatoxylin und Xylol (Histolab, Göteborg, Schweden) verwendet.