

Standard IHC Protokoll

Atlas Antibodies Standard-Immunhistochemie-Protokoll



Beschrieben ist das immunhistochemische Standardprotokoll von Atlas Antibodies, das für Triple-A-Polyklonale und PreciA-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 unter Verwendung eines Druckkessels (Enttarnungskammer, Biocare Medical, Walnut Creek, CA, USA) als Wärmequelle. HIER wird durchgeführt, indem die in den Entnahmepuffer eingetauchten TMA-Objektträger 4 Minuten lang bei 125°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 45 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-Informationseite 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, Fremont, CA, USA) für 10 Minuten bei Raumtemperatur.

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

HIER in Rückholpuffer pH 9 wird als Standard-HIER durchgeführt, mit der Ausnahme, dass Rückholpuffer mit pH 9 (Lab Vision, Fremont, CA, USA) anstelle von Rückholpuffer mit pH 6 verwendet wird.

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. Mit Deckglas abdecken.

* Bei polyklonalen Antikörpern die Schritte 6 und 7 außer Acht lassen.

** Die Schritte 14 -16 werden mit einem Histofärbungsgerät (Leica Autostainer XL) durchgeführt.

Reagenzien

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

Waschpuffer (10x Konzentrat). Arbeitslösung enthält ursprünglich 0,05% (v/v) Tween 20. Extra Tween 20 wird bis zu einer Endkonzentration von 0,20% zugegeben.

Retrieval-Lösung: Zitratpuffer®, pH 6.

Antikörper-Verdünnungsmittel.

UltraVision LP HRP-Polymer®, Primärer Antikörper

Enhancer (nur für monoklonale Antikörper), Ultra V Block und DAB Quanto Chromogen- und Substratsystem®. Darüber hinaus werden Mayer's Hämatoxylin und Xylol (Histolab, Göteborg, Schweden) verwendet.