

## Standard IHC Protokoll

### Atlas Antibodies Standard-Protokoll für die Immunhistochemie (IHC)



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% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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-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**

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 Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-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.