

Kombination von Methoden

Kombination von Trypsin-Vorbehandlung und Erhitzen im Mikrowellengerät

Einleitung:

Bestimmte Epitope werden besser demaskiert, wenn man das Erhitzen der Gewebeschnitte und eine proteolytische Andauung mit Trypsin kombiniert. Zu ihnen gehören die Immunglobulin-Leichtketten und hochmolekulare Cytokeratine.

Benötigtes Material:

Trypsin-Vorbehandlung

- Proteolytische Vorbehandlung mit **Trypsin**
 - Trypsin (Dako Code-Nr. S2012)
 - 0.05 M Tris/HCl, 0.15 M NaCl, pH 7.8
 - 0.1% CaCl₂, pH 7.8

Für die Mikrowellenbehandlung:

- *Target Retrieval*-Puffer, siehe hierzu Kapitel über die empfohlenen *Target Retrieval*-Puffer
- 750-800 Watt Haushalts-Mikrowellengerät mit Drehteller
- Kunststoffküvette für die Mikrowelle (DAKO Code-Nr. S2030) oder Coplin-Färbetröge aus hitzebeständigem Plastik
- Objektträgerhalter für die Mikrowelle aus hitzebeständigem Plastik (DAKO Code-Nr. S2029)

Zur Vorbereitung der Schnitte

Zur besseren Haftung der Gewebeschnitte müssen silanisierte Objektträger (DAKO Code-Nr. S2024 oder S3003) oder mit anderen geeigneten Haftmitteln beschichtete Objektträger verwendet werden.

Protokoll:

Schnitte entparaffinieren und rehydrieren.

Erhitzen im Mikrowellengerät

Das Erhitzen im Mikrowellengerät erfolgt wie im Dokument „Erhitzen im Mikrowellengerät“ beschrieben, mit der Ausnahme, dass ein Coplin-Färbetrog aus Plastik benötigt wird.

1. Objektträger in einen Coplin-Färbetrog aus Plastik mit 50 ml *Target Retrieval*-Puffer stellen. Mit Parafilm oder Frischhaltefolie bedecken und 5 Minuten erhitzen.
2. Nach dem Erhitzen die Objektträger sofort abkühlen, indem man den heißen *Target Retrieval*-Puffer mit kaltem Leitungswasser ausspült. Objektträger anschließend in destilliertes Wasser stellen, das zuvor auf 37°C vorgewärmt wurde.

Trypsinieren

1. Gewebeschnitte 30 Sekunden bei 37°C mit Trypsin-Gebrauchslösung bedecken. Trypsin wird in 0.1%iger CaCl₂-Lösung in 0.05 M Tris/HCl, 0.15 M NaCl, pH 7.8 angesetzt (Dako Code-Nr. S2012).
2. Mit destilliertem Wasser spülen
3. Endogene Peroxidase blockieren (für Immunperoxidase-Methoden), und Schnitte in destilliertes Wasser stellen.
4. Mit der gewählten immunhistochemischen Färbetechnik fortfahren.

Kombination von Proteinase K-Vorbehandlung und Erhitzen im Mikrowellengerät

Einleitung:

Bestimmte Epitope sind besser zugänglich, wenn man die Vorbehandlung mit einem proteolytischen Enzym (Proteinase K) und Mikrowellen-Methode kombiniert. Wenn nach einer wirkungsvolleren Methode der Antigenmaskierung gesucht wird, sollte diese Kombination von Methoden angewendet werden.

Benötigtes Material:

Proteinase K, konzentriert (Dako Code-Nr. S3004), 1/500 verdünnt in 0.05 M Tris/HCl, pH 7.5 bis 7.7
oder

Proteinase K, gebrauchsfertig (Dako Code-Nr. S3020), 1/10 weiterverdünnt in 0.05 M Tris/HCl, pH 7.5 bis 7.7

Materialien zur Antigendemaskierung (wie zuvor beschrieben)

Zur Vorbereitung der Schnitte

Zur besseren Haftung der Gewebeschnitte müssen silanisierte Objektträger (DAKO Code-Nr. S2024 oder S3003) oder mit anderen geeigneten Haftmitteln beschichtete Objektträger verwendet werden.

Protokoll:

Proteinase K

1. Schnitte entparaffinieren und rehydrieren.
2. Schnitte mit Proteinase K in einer Endkonzentration von ca. 40 µg/ml (siehe unter „Benötigtes Material“) bedecken und 5-10 Minuten inkubieren.
3. Mit destilliertem Wasser spülen.

Erhitzen im Mikrowellengerät

4. Inkubationskammer mit 200 ml *Target Retrieval*-Puffer füllen, und Objektträgerhalter aus Plastik (Dako Code-Nr. S2029) hineinstellen. Kammer locker mit einem Deckel schließen, um die Verdunstung möglichst gering zu halten.
5. Kammer in die Mitte des Mikrowellengerätes stellen. Schnitte 2 x 5 Minuten erhitzen. Zwischen den beiden Behandlungsschritten die Kammer mit 50 ml destilliertem Wasser auffüllen. Während des Heizvorgangs dürfen die Gewebeschnitte unter keinem Umständen austrocknen.
6. Nach dem zweiten Behandlungsschritt die Kammer aus dem Mikrowellengerät nehmen, und die Schnitte 15-20 Minuten im *Target Retrieval*-Puffer bei RT abkühlen lassen.
7. Mit destilliertem Wasser spülen.
8. Endogene Peroxidase blockieren (für Immunperoxidase-Methoden), und Schnitte in destilliertes Wasser stellen.
9. Mit der gewählten immunhistochemischen Färbetechnik fortfahren.