

Praktikum 1. (Woche 5)

Direkte Immunhistochemie

Heute lernen wir über Immunhistochemie. Während des Praktikums führen Sie eine immunhistochemische Färbung durch. Tragen Sie einen Mantel und Gummihandschuhe, da Sie mit giftigen Chemikalien arbeiten. Auf dem Objektträger befindet sich ein Schnitt der Mausmilz. Isolierung, Gewebsschnitt und Fixierung der Mausmilz wurden bereits von Kollegen durchgeführt.

- 1. Die Hemmung der endogene Peroxidase mit Phenylhydrazin:** Da Phenylhydrazin giftig ist, berühren Sie es nur mit Gummihandschuhen. Ziehen Sie eine Pipettenspitze auf die Pipette und pipettieren Sie 100 µl der Lösung vorsichtig. Die Lösungen sollten tropfenweise zum eingekreisten Schnitt hinzugefügt werden. Lassen Sie die Lösung mit der Pipette sehr vorsichtig auf den Schnitt fallen. Berühren Sie den Schnitt nicht mit der Pipettenspitze, da er leicht beschädigt werden kann. Verwenden Sie für jeden Schritt eine neue Pipettenspitze. Werfen Sie gebrauchte Pipettenspitzen in das Glas. **Die Inkubationszeit beträgt 10 Minuten.**
- 2. Entfernung der Phenylhydrazinlösung:** Gießen Sie die Phenylhydrazinlösung vom Objektträger. Drehen Sie es zur Seite und lassen Sie es in die Petrischale fließen.
- 3. Waschschrift:** Legen Sie den Objektträger mit dem Schnitt in den PBS-Behälter. Eine Inkubationszeit von **2 Minuten** folgt. Nehmen Sie den Objektträger aus der PBS-Lösung. Gießen Sie das PBS wie zuvor aus dem Schnitt. **Wiederholen Sie die PBS-Wäsche wie zuvor. Weitere 2 Minuten Inkubation folgt.**
- 4. Blockierung:** In diesem Schritt werden unspezifische Proteinbindungsstellen mit 5% BSA-PBS-Lösung blockiert. Gießen Sie die PBS-Lösung aus dem Schnitt und pipettieren Sie **100 µl BSA-PBS-Lösung** vorsichtig darauf. Es folgt eine **10-minütige Inkubation**.
- 5. Markierung der T-Zellen:** T-Zellen werden mit monoklonalem Anti-Thy-1-Antikörper markiert. Thy-1 ist ein T-Zell-Marker. Der Thy-1-spezifische Antikörper ist mit HRP konjugiert. Pipettieren Sie **100 µl Antikörperlösung** auf den Schnitt. Eine **Inkubationszeit von 30 Minuten** folgt.
- 6. Waschschrift:** Der Schnitt wird auf bekannte Weise zweimal 2 Minuten lang mit PBS gewaschen.
- 7. Zugabe von Chromogen und Substrat:** Gießen Sie PBS aus dem Schnitt. Chromogen (AEC: Amino-Ethylcarbazol, GIFTIG) in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid (Substrat), gelöst in 0,1 M (molare) Na-Acetat-Puffer, hinzufügen. In Anwesenheit von Substrat wandelt Antikörper-konjugiertes HRPO Chromogen in ein farbiges Endprodukt um. Das histologische Präparat wird im Mikroskop untersucht.