

Immunológia alapjai gyakorlat - 2021. 11. oktatási hét

Direkt immunhisztokémia

A mai gyakorlaton az immunhisztokémiával ismerkedhetnek meg, melynek során egy direkt immunhisztokémiai festést fognak elvégezni. Mivel mérgező vegyszerekkel fognak dolgozni, kérjük, hogy viseljen laborköpenyt és gumikesztyűt.

A tárgylemezen egy egér lép metszet található. Az egér lép izolálását, fagyasztott metszését és acetonban történő fixálását a kollégák már elvégezték. A tárgylemezen a lép metszet egy víztaszító markerrel lett bekarikázva, hogy az immunreakcióban rátett folyadék szétfolyását megakadályozzuk.

1. Az első lépés az **endogén peroxidáz-gátlás** fenilhidrazinnal. Mivel a fenilhidrazin oldat mérgező, ezért csak gumikesztyűvel érintse meg. Húzzon egy pipetta hegyet a pipettára, és óvatosan pipettázzon 100µl oldatot cseppenként a bekarikázott metszetre. Az oldatot óvatosan cseppentse a metszetre! Ügyeljen rá, hogy a metszetet ne érintse meg a pipetta hegyével, mert könnyen megsérülhet. Minden lépéshez használjon új pipetta hegyet. Dobja a használt pipetta hegyeket a hulladéktartó edénybe. Az inkubációs idő 10 perc.
2. Az inkubációs idő letelte után öntse le a tárgylemezeztől a fenil-hidrazin oldatot. Fordítsa a tárgylemezt oldalra, és hagyja, hogy az oldat a petri csészébe folyjon. A folyadékot mindig törölje le a tárgylemez másik oldaláról, de vigyázzon, hogy ne törölje le a metszetet!
3. **Mosási lépés**: helyezze a tárgylemezt a PBS I. tartályba. 2 perc inkubációs idő következik.
4. Vegye ki a tárgylemezt a PBS-oldatból, majd ismételje meg a mosást a PBS II. tartályban. További 2 perc inkubálás következik.
5. A következő lépés a **blokkolás**. Ebben a lépésben a nem specifikus fehérje-kötőhelyeket blokkoljuk 5% BSA-PBS oldattal. Vegye ki a PBS oldatból a tárgylemezt, és óvatosan pipettázzon rá 100µl BSA-PBS oldatot. 10 perces inkubáció után öntse le a folyadékot a metszetről (ezután a lépés után nem jön mosás).
6. A következő lépésben a **T-sejtek jelölése** történik HRP-vel konjugált anti-Thy-1 (T-sejt marker) monoklonális antitesttel. Pipettázza rá a 100µl antitest oldatot a metszetre. 30 perces inkubáció.
7. A metszetet a fent ismertetett (3.-4. lépés) módon kétszer 2 percig **PBS-sel mossuk** (friss PBS-ben)
8. Az utolsó lépés a **kromogén és a szubsztrát hozzáadása**. Itassa le a PBS-t a metszetről. A kromogént (DAB: diamino-benzidin, TOXIKUS) 0,1 M (moláris) Na-acetát pufferben oldjuk hidrogén-peroxid (szubsztrát) jelenlétében. A szubsztrát jelenlétében az antitesttel konjugált HRPO a kromogént néhány perc alatt színes végtermékké alakítja.
9. A szövettani mintát **mikroszkóp alatt vizsgáljuk**.