

Praktikum 7.:

Direkte Immunhistochemie - T-Zell Markierung in Mausmilz mit anti-Thy-1 antikörper

Arbeitsschritte des Praktikums:

Während des Praktikums führen Sie eine immunhistochemische Färbung durch. Tragen Sie einen Mantel und Gummihandschuhe, da Sie mit giftigen Chemikalien arbeiten. Dieses Dokument fasst die Schritte des Praktikums zusammen.

1. Auf dem Objektträger befindet sich ein Schnitt einer Mausmilz. Isolierung, Gewebsschnitt und Fixierung der Mausmilz wurden bereits von unseren Kollegen durchgeführt.
2. Der erste Schritt ist die **endogene Peroxidasehemmung** mit Phenylhydrazin (**Reagenzglas 1**). Phenylhydrazin ist in PBS gelöst. Da Phenylhydrazin giftig ist, berühren Sie es nur mit Gummihandschuhen. Setzen Sie eine Pipettenspitze auf die Pipette und pipettieren Sie die Lösung vorsichtig. **Die Lösungen sollten tropfenweise zum eingekreisten Schnitt hinzugefügt werden.** Lassen Sie 100 µl Lösung mit der Pipette sehr vorsichtig auf den Schnitt tropfen. Da das Präparat leicht beschädigt werden kann, darf die Pipettenspitze den Schnitt dabei nicht berühren. Verwenden Sie für jeden Schritt eine neue Pipettenspitze. Werfen Sie gebrauchte Pipettenspitzen in das Glas ab. **Die Inkubationszeit beträgt 10 Minuten.**
3. Gießen Sie die Phenylhydrazinlösung vom Objektträger. Drehen Sie diesen dazu zur Seite und lassen Sie die Lösung in die Petrischale fließen. Wischen Sie die Flüssigkeit immer mit einem Papiertuch von der anderen Seite des Objektträgers ab. Achten Sie darauf, den Schnitt nicht versehentlich von dem Objektträger zu entfernen.
4. **Waschen:** Stecken Sie den Objektträger mit dem Schnitt in den „PBS-Behälter 1“ ein. Eine **Inkubationszeit von 2 Minuten** folgt. Nehmen Sie den Objektträger aus der PBS-Lösung. Gießen Sie das PBS wie zuvor von dem Objektträger. Wiederholen Sie den Waschvorgang (PBS-Behälter 2) wie zuvor. **Weitere 2 Minuten Inkubation** folgen.
5. Der nächste Schritt ist die **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 (**Reagenzglas 2**) vorsichtig auf das Präparat. Es folgt eine **10-minütige Inkubation**.
6. Im nächsten Schritt werden T-Zellen mit 100 µl **monoklonalem Anti-Thy-1-Antikörper (Reagenzglas 3)** markiert. Thy-1 ist ein T-Zell-Marker. Der Thy-1-spezifische Antikörper ist mit HRP konjugiert. Eine Inkubationszeit von 30 Minuten folgt.
7. **Waschen:** Der Objektträger wird auf bekannte Weise (siehe 4.) dreimal 2 Minuten lang in PBS gewaschen (in PBS-Behälter 2).
8. Der letzte Schritt ist die **Zugabe von Chromogen und Substrat**. Gießen Sie PBS von dem Objektträger. 100 µl Chromogen (DAB: Diamino-benzidine, GIFTIG) in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid (Substrat), gelöst in 0,1 M (molare) Tris-HCl-Puffer hinzufügen. In Anwesenheit des Substrats wandelt die antikörper-konjugierte HRP das Chromogen in ein farbiges Endprodukt um.
9. Das histologische Präparat wird im Mikroskop untersucht.