

GEBRAUCHSANWEISUNG für Digoxigenin-markierte Sonden

GRUNDLAGEN DER METHODE

Die chromogene in situ Hybridisierung (CISH) wird eingesetzt, um das Vorhandensein einer bestimmten DNA- oder RNA-Sequenz festzustellen oder die Expression eines Gens zu untersuchen. Gleichzeitig kann die Gewebemorphologie mittels Hellfeldmikroskopie beurteilt werden.

Die markierte Sonde einer bekannten Sequenz hybridisiert mit der Ziel-DNA oder -RNA in dem zu untersuchenden Gewebe. Diese Bindung wird durch einen immunhistochemischen Prozess detektiert. Histosonden sind gegen die mRNA gerichtet und dienen der Detektion exprimierter Gene.

VORBEREITUNGEN:

Die Sonde wird lyophilisiert zur Verfügung gestellt. Sie hat eine hohe Viskosität aufgrund der darin enthaltenen Dextrane. Deshalb empfehlen wir, die Sonde vor Beginn der Entparaffinisierung mit 65 µl Aqua dest. zu rekonstituieren.

In einigen Fällen kann das Gewebe große Mengen an Eosinophilen enthalten, deren DNA mit Histosonda unspezifisch reagieren kann. Dies kann verhindert werden, indem die Gewebe in PBS zum Kochen gebracht werden. Tauchen Sie die Schnitte unmittelbar nach der Entparaffinisierung, und vor der Proteinase Behandlung in ein Gefäß mit 200 ml PBS. Stellen Sie das Gefäß in eine Mikrowelle bei mittlerer Stärke. Sobald die Flüssigkeit gleichmäßig zu Kochen beginnt, schalten Sie die Mikrowelle aus, geben Sie die Schnitte in PBS mit Raumtemperatur, und fahren Sie mit der Technik wie gewöhnlich fort. Es ist möglich, dass die Erhitzung in der Mikrowelle die Gewebe empfindlicher für die Proteinase K Reaktion macht. Wenn Sie die Schnitte in der Mikrowelle erhitzt haben, empfehlen wir die Proteinase K nur 5 Minuten zu benutzen.

HYBRIDISIERUNGSPROZESS

ENTPARAFFINIERUNG

Stellen Sie die Schnitte mit Paraffinsektionen für 10 Minuten auf eine Heizplatte bei 65 °C.

Xylol: 5'

Xylol: 5'

reiner Alkohol (Ethanol oder Isopropanol): 10 dips.

reiner Alkohol (Ethanol oder Isopropanol): 10 dips.

96% Ethanol: 10 dips.

96% Ethanol: 10 dips.

96% Ethanol: 10 dips.

Methanol/ 3% Wasserstoffperoxid (90 ml Methanol + 10 ml 3% Wasserstoffperoxid) um die endogene Peroxidase zu blockieren: 3'

Die Schnitte im Gefäß unter fließendem Leitungswasser spülen.

Geben Sie die Schnitte für 5 Minuten in einen Behälter mit PBS 1X.

ENTPROTEINIERUNG

Säubern Sie die Schnitte entlang der Ränder des Gewebes mit Papier, ohne dass diese austrocknen. Geben Sie einige Tropfen Proteinase K verdünnt in PBS 1X (pH 7,4), mit einer Konzentration von 30 µg Proteinase K/ml in PBS. (Zwei bis drei Tropfen sind normalerweise ausreichend um das Gewebe zu bedecken). 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur. Spülen Sie die Schnitte nach Ablauf der Zeit in einem Gefäß unter fließendem Leitungswasser. Tauchen Sie die Schnitte für mindestens 3 Minuten in ein anderes Gefäß mit PBS.

INKUBATION DER SONDE

Den Schnitt entlang der Geweberänder trocken tupfen ohne dass diese austrocknen. Geben Sie mit einer Mikropipette 65 µl der Sonde dazu, wobei möglichst das gesamte Gewebe bedeckt wird. Es ist nicht notwendig, das Präparat zu bedecken.

Inkubation in einer Feuchten Kammer für eine Stunde bei 62 °C.

SPÜLEN DER SONDE

Wenn die Inkubation beendet ist, spülen Sie die Sektion mit PBS-Spritzern. Danach geben Sie die Schnitte in ein Gefäß mit PBS und schütteln Sie es periodisch mindestens 3 Minuten.

SONDENENTWICKLUNG

Anti-Digoxigenin-Primärantikörper: 30 Minuten. (Der Benutzer kann unter verschiedenen Marken auswählen und die für sein Labor geeignete Antikörperkonzentration wählen).

Die Schnitte 1 Minute mit reichlich PBS spülen.

Sekundäre Antikörper: 30 Minuten (Der Benutzer kann unter verschiedenen Produkten auswählen. Sehr gute Ergebnissen wurden mit Polymeren erzielt, die Anti-Mäuse/ Kaninchen-Antikörper enthalten).

Die Schnitte 1 Minute mit reichlich PBS spülen.

Diaminobenzidin (Folgen Sie den Anweisungen des ausgewählten Produkts).

GEGENFÄRBUNG MIT HÄMATOXYLIN

Kurzes Eintauchen Harris Hämatoxylin und rasch unter reichlich fließendem Wasser spülen.

EINDECKEN DES PRÄPARATS:

Folgen Sie den normalen Laborprozeduren.

VERFÜGBARE HISTOSONDEN

EBER/Digoxigenine Histosonda	CEM-0001-20
α -Hemoglobina/Digoxigenine Histosonda	CEM-0002-20
Serum albumin/Digoxigenine Histosonda	CEM-0003-20
Kappa light chain/Digoxigenine Histosonda	CEM-0004-20
Lambda Light Chain/Digoxigenine Histosonda	CEM-0005-20
Alpha Heavy Chain Histosonda/Digoxigenine	CEM-0006-20
Delta Heavy Chain Histosonda/Digoxigenine	CEM-0007-20
Epsilon Heavy Chain Histosonda/Digoxigenine	CEM-0008-20
Gamma Heavy Chain Histosonda/Digoxigenine.	CEM-0009-20
Mu Heavy Chain Histosonda/Digoxigenine	CEM-0010-20