

Proteolytische Vorbehandlung

Trypsin/Pronase/Proteinase K/Pepsin

Einleitung:

Viele Untersuchungen haben gezeigt, dass die immunhistochemische Reaktivität bestimmter Antigene verbessert wird, wenn formalinfixierte Paraffinschnitte zunächst mit Trypsin vorbehandelt werden [1, 2]. Heute findet eine größere Palette proteolytischer Enzyme Einsatz in der Immunhistochemie (siehe unter „Benötigtes Material“). Viele Labors führen bei einigen Cytokeratinen, Immunglobulinen und einer Vielzahl anderer Marker eine proteolytische Andauung, z. B. mit Trypsin, durch. Die veröffentlichten Verfahren proteolytischer Vorbehandlung (Dauer, Konzentration, etc.) sind von Labor zu Labor oft unterschiedlich. Dies spiegelt die Unterschiede bei der Gewebefixierung und bei den jeweils untersuchten Antigenen wider. Daher sollte jedes Labor die proteolytische Vorbehandlung von Gewebeschnitten entsprechend seiner jeweiligen Fixierungsmethode optimieren.

Benötigtes Material:

- a) 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
- b) Proteolytische Vorbehandlung mit **Pronase**
 - Pronase (Dako Code-Nr. S2013)
 - 0.05 M Tris/HCl, 0.1 M NaCl, pH 7.2 (TBS)
- c) Proteolytische Vorbehandlung mit **Proteinase K** (konzentriert)
 - Proteinase K (Dako Code -Nr. S3004)
 - 0.05 M Tris/HCl, pH 7.5 bis 7.7
- d) Proteolytische Vorbehandlung mit **Proteinase K** (gebrauchsfertig)
 - Proteinase K, gebrauchsfertig (Dako Code-Nr. S3020)
- e) Proteolytische Vorbehandlung mit **Pepsin**
 - Pepsin (Dako Code-Nr. S3002)
 - 0.2 M HCl
- f) feuchte Kammer
- g) Brutschrank oder Heizplatte mit Thermostat
- h) Haftmittel sind in der Regel nicht notwendig.

Protokoll:

Schnitte entparaffinieren und rehydrieren.

Proteolytische Vorbehandlung mit Trypsin

1. Gewebeschnitte 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. 20-40 Minuten bei RT oder 37°C in einer feuchten Kammer inkubieren. Die optimale Inkubationsdauer hängt von der Dauer der Formalinfixierung und dem nachzuweisenden Antigen ab. Als Leitfaden sei 0.1%iges (w/v) Trypsin für 30-40 Minuten bei RT empfohlen.
3. Reaktion durch Spülen mit destilliertem Wasser stoppen.
4. Endogene Peroxidase blockieren (für Immunperoxidase-Methoden), und Schnitte in destilliertes Wasser legen.
5. Mit der gewählten immunhistochemischen Färbetechnik fortfahren.

Proteolytische Vorbehandlung mit Pronase

1. Gewebeschnitte mit Pronase-Gebrauchslösung bedecken. Pronase wird in 0.05 M Tris/HCl, 0.15 M NaCl, pH 7.2 angesetzt (Dako Code-Nr. S2013).
2. 5-10 Minuten bei RT oder 37°C in einer feuchten Kammer inkubieren. Die optimale Inkubationsdauer hängt von der Art und Dauer der Fixierung sowie dem nachzuweisenden Antigen ab. Als Leitfaden sei 0.01%ige (w/v) Pronase für 5-10 Minuten bei RT empfohlen.
3. Reaktion durch Spülen mit destilliertem Wasser stoppen.
4. Endogene Peroxidase blockieren (für Immunperoxidase-Methoden), und Schnitte in destilliertes Wasser legen.
5. Mit der gewählten immunhistochemischen Färbetechnik fortfahren.

Proteolytische Vorbehandlung mit Proteinase K (konzentriert)

1. Gewebeschnitte mit Proteinase K-Gebrauchslösung bedecken. Proteinase K wird in 0.05 M Tris/HCl, pH 7.5 bis 7.7 angesetzt (Dako Code-Nr. S3004).
2. Die für eine optimale Andauung von formalinfixiertem Gewebe benötigte Inkubationszeit hängt von der Dauer der Fixierung ab. Grundsätzlich reicht eine 6minütige Andauung mit 250-500 µg/ml Proteinase K bei RT aus. Wenn nötig kann die Inkubationszeit auf bis zu 15 Minuten verlängert werden.
3. Reaktion durch Spülen mit destilliertem Wasser stoppen.
4. Endogene Peroxidase blockieren (für Immunperoxidase-Methoden), und Schnitte in destilliertes Wasser legen.
5. Mit der gewählten immunhistochemischen Färbetechnik fortfahren.

Proteolytische Vorbehandlung mit Proteinase K (gebrauchsfertig)

1. Gewebeschnitte mit Proteinase K, gebrauchsfertig (Dako Code-Nr. S3020) bedecken.
2. Die für eine optimale Andauung von formalinfixiertem Gewebe benötigte Inkubationszeit hängt von der Dauer der Fixierung ab. Grundsätzlich reicht eine 6minütige Andauung bei RT aus. Wenn nötig kann die Inkubationszeit auf bis zu 15 Minuten verlängert werden.
3. Reaktion durch Spülen mit destilliertem Wasser stoppen.
4. Endogene Peroxidase blockieren (für Immunperoxidase-Methoden), und Schnitte in destilliertes Wasser legen.
5. Mit der gewählten immunhistochemischen Färbetechnik fortfahren.

Proteolytische Vorbehandlung mit Pepsin

1. Gewebeschnitte mit Pepsin-Gebrauchslösung bedecken. Pepsin wird in 0.05 bis 0.2 M HCl angesetzt (Dako Code-Nr. S3002).
2. Die für eine optimale Andauung von formalinfixiertem Gewebe benötigte Inkubationszeit hängt von der Dauer der Fixierung ab. Die vorbereitete Pepsin-Gebrauchslösung auf 37°C vorwärmen. Grundsätzlich reicht eine 10minütige Andauung mit 4 mg/ml Pepsin bei 37°C aus. Wenn nötig kann die Inkubationszeit auf bis zu 30 Minuten verlängert werden.
3. Reaktion durch Spülen mit destilliertem Wasser stoppen.
4. Endogene Peroxidase blockieren (für Immunperoxidase-Methoden), und Schnitte in destilliertes Wasser legen.
5. Mit der gewählten immunhistochemischen Färbetechnik fortfahren.

Anmerkung:

Werden Gewebeschnitte zu lange oder bei zu hoher Proteasekonzentration angedaut, kann dies zur Schädigung der Gewebemorphologie und zum Ablösen der Schnitte vom Objektträger führen.

Literatur:

- [1] Larsson L-I. Tissue preparation methods for light microscopic immunohistochemistry. *Appl Immunohistochem* 1993; 1:2-16.
- [2] Huang SN, Minassian H, More JD. Application of immunofluorescent staining on paraffin sections improved by trypsin digestion. *Lab Invest* 1976; 35:383-90.