



Medizinische Universität Graz

Enzymatische Andauung für die in situ Hybridisierung



UNI GRAZ
PATHOLOGIE

Elisabeth Grygar
Institut für Pathologie
Medizinische Universität Graz



Medizinische Universität Graz

Fixierung

Formaldehyd Fixierung

- Formaldehyd ist das Aldehyd der Ameisensäure
- Formaldehyd ist ein unter Normalbedingungen gasförmiger Stoff, der nur zu ca. 35-40% in Wasser gelöst werden kann.

$$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}-\text{C}-\text{H} \\ \text{Formaldehyd} \end{array} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \begin{array}{c} \text{HO} \quad \text{OH} \\ | \quad | \\ \text{H}-\text{C}-\text{H} \end{array}$$

- Diese 35-40%ige Formaldehydlösung wird dann als Formol/Formalin (100%) bezeichnet.
- Nur unter Idealbedingungen wird eine 40%ige Lösung erreicht.

Fixierung



Medizinische Universität Graz

Formaldehyd Fixierung

- Neben der Proteinvernetzung tritt bei der Formaldehydfixierung auch eine Komplexierung der Proteine mit Ca^{2+} Ionen und anderen divalenten Metall Kationen auf.
- Diese Komplexbildung scheint bei einigen Epitopen eine Maskierung zu bewirken.
- Bei der Formaldehyd Fixierung werden Epitope i.a. nicht zerstört, sondern nur maskiert!

Fixierung



Medizinische Universität Graz

Formaldehyd Fixierung

- Die Peptide werden mit sich selbst (intern) vernetzt.
Der Antikörper kann nicht mehr an sein Epitop binden.
- Die Peptide werden nicht intern vernetzt, sondern mit benachbarten Makromolekülen.
Der Antikörper kann nicht mehr an sein Epitop binden.
- Die Fixierung vernetzt die Peptide nicht oder nicht im Bereich des Epitops.
Der Antikörper kann weiterhin binden.

Bei 1 und 2 kann die Immunreaktivität durch thermische oder proteolytische Vorbehandlung des Gewebes wieder hergestellt werden, bei 3 ist keine Vorbehandlung nötig

Vorbereitung



Medizinische Universität Graz

Vorbereitung

- | PIER: | HIER: |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> • Pronase • Proteinase K • Trypsin • Pepsin • Protease XXIV • Protease XXV • Ficin • FastEnzyme • Neuraminidase | <ul style="list-style-type: none"> Citratpuffer pH 6,0 EDTA Puffer pH 8,0 Tris-EDTA Puffer pH 9,0 Citrat-EDTA pH 6,2 TBS pH 9,0 Tris-HCl Puffer pH 10,0 Harnstoff pH 1,0 Ameisensäure pH 2,0 Citraconisches Anhydrid pH 7,4 |

PIER



Medizinische Universität Graz

Was passiert bei der enzymatischen Vorbereitung

- Aufspaltung der Vernetzungen zwischen den Proteinen durch proteolytische Enzyme oder Enzymkombinationen.
- Die Qualität der Demaskierung ist bei den verschiedenen Enzymen sehr unterschiedlich.
- Die Qualität ist abhängig von der Zeit, Temperatur, pH-Wert, Gewebe und der Fixierung.

Tipps und Tricks



Medizinische Universität Graz

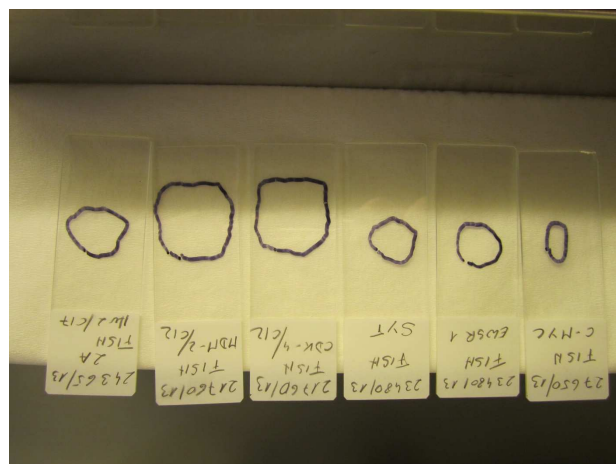
Enzymatische Andauung für die in situ Hybridisierung im Hybrite



Tipps und Tricks



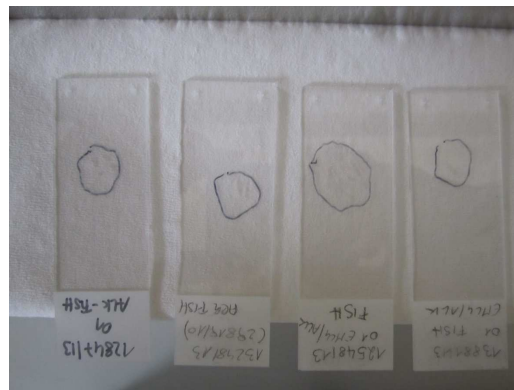
Medizinische Universität Graz



Tipps und Tricks



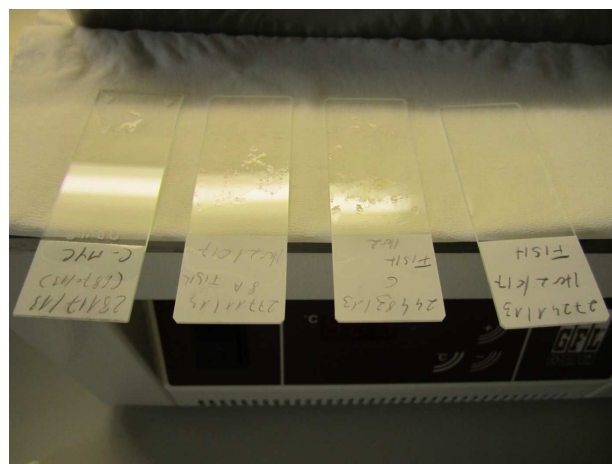
Medizinische Universität Graz



Tipps und Tricks



Medizinische Universität Graz



Tipps und Tricks



Medizinische Universität Graz



Tipps und Tricks



Medizinische Universität Graz



Tipps und Tricks



Medizinische Universität Graz



Tipps und Tricks



Medizinische Universität Graz

Vorteile

- Kein Wasserbad vorwärmen
- Temperaturkontrolle nicht notwendig
- Keine Temperaturschwankungen
- Keine Verdünnung des Enzyms
- Geringe Enzymmenge notwendig
- Immer die exakt gleichen Bedingungen

Tipps und Tricks



Medizinische Universität Graz



Sehr schönes Ergebnis!!!