

Immunfluoreszenz von Zellen und Geweben

Gewebe:

Gewebe unmittelbar nach der Entnahme in kleineren Stückchen direkt in Isopentan (auf -80°C in Trockeneis vorgekühlt) einfrieren. Zur besseren Ausrichtung (z. B. Embryos) und bei empfindlichem Gewebe einen Tropfen TissueTek auf kleinen Streifen Parafilm platzieren und Gewebe darin einfrieren. Parafilm entfernen und in dicht schließendem (wegen Austrocknung) Gefäß bei -80°C einfrieren.

Zum Schneiden Gewebe immer bis zum Gebrauch auf Trockeneis halten. Einen Tropfen TissueTek auf Objekthalter (vorher auf 0°C erwärmen) geben und Gewebe in gewünschter Orientierung darin fixieren. Überschüssiges Tissue Tek mit Rasierklinge entfernen. Optimale Schneidetemperatur ermitteln (-16 bis -28°C). Schnittdicke 5 µm (Embryos 8-12 µm, für konfokale Aufnahmen 12µm). Schnitt mindestens 2 h trocknen lassen (oder ÜN).

Kulturzellen:

Plättchen (Durchmesser 13 mm, No. 1,5, VWR, Cat.No. 631-0150) mit Pinzette und Kanüle aus Zellkulturschalen herausnehmen, immer schön am Rand anfassen.

Einzel in Becherglas mit Zellkultur-PBS (Raumtemperatur, Invitrogen #14190-094) + 3 mM MgCl₂ (membranstabilisierend) eintauchen, auf Papier abtropfen lassen (aber nur ganz kurz! damit Zellen nicht antrocknen),

Plättchen mit Zellen nach vorne in Ständer, der im Fixativ steht, sortieren. Wichtig, daß alle Plättchen dabei die gleiche Orientierung haben, da die Zellen nach der Fixierung nur noch schlecht sichtbar sind!

Fixierung:

Wichtig: Methanol (p.A., TRM: Sigma #32,241) und Aceton (p.A., TRM: Sigma #179124-1l) bei -20°C in die Küvetten geben und vorkühlen!

Lösliche Antigene werden mit dieser Fixierung ausgewaschen und müssen mit Formalin fixiert werden.

Zellen und Gewebe werden gleich behandelt.

Methanol/Aceton-Fixierung:

Für **unlösliche** Antigene ist MeOH/Aceton die Fixierung der Wahl. Alternativ kann nur in MeOH fixiert werden. Typische Zeit: 5 Min., kann zwischen 3-10 Min. variiert werden.

Manche Antikörper reagieren nur auf unfixierten Schnitten.

Gewebeschnitte werden nur mit Aceton (10 Min., auf -20°C vorgekühlt, im Gefrierschrank lassen) fixiert. Ggf. etwas kürzere Zeit wählen. Trocknen lassen.

Zellen auf Plättchen werden bei einer Methanol/Aceton-Fixierung einzeln nach Entnahme und Eintauchen in Zellkultur-PBS (Raumtemperatur) + 3 mM MgCl₂ und kurzem Abtropfen (s.o.) in einen Ständer im Methanol (aus -20°C rausholen und während der Fixierzeit auf Eis, oder in Kühlakku stellen) einsortiert und dort für 5 (bzw. 3-7, wegen „Einsortierzeit“) inkubiert. Ständer auf Papier abtropfen lassen, Ständer 30 Sek. in Aceton -20°C; Plättchen 0,5-1 h auf Papier trocknen lassen, auch ü.N. möglich.

PFA-Fixierung:

Bei **löslichen** Antigenen müssen andere Bedingungen gewählt werden:

Entweder

- 4% Formalin in PBS aus 20% Stock, der mit PFA nach Vorschrift angesetzt, aliquotiert und bei -20°C eingefroren wurde, frisch im Abzug ansetzen (siehe „Herstellung 20% Formalin-Stocklösung“ am Ende des Protokolls)

oder

- frisches 4%-iges Formalin in PBS aus PFA im Abzug ansetzen.

In beiden Fällen wird das Formalin nach Gebrauch verworfen.

Das Präparat wird 10 (bzw. 10-15; wegen „Einsortierzeit“) Min. auf Eis (ggf. Raumtemperatur) fixiert. 3 x kurz mit 50 mM NH₄Cl (zum Abblocken des restlichen Formaldehyds) waschen. Schnitte können dann direkt verarbeitet werden, Zellen müssen noch nach 3 x 1 Min. Waschen in TBS mit Detergenz (0.1 % Triton X-100 in TBS, 2 min bei RT, oder andere Detergenzien wie Digitonin; Originalliteratur beachten!) solubilisiert werden. Variiert werden kann Konzentration und Länge der Detergenz-Extraktion. Zum Schluss noch mal 3 x 1 Min. mit TBS waschen.

Für weitere Einzelheiten und Variationen siehe "Lane, Antibodies" sowie jeweilige Originalarbeiten. Bei Abweichungen vom Standardprotokoll genau Vorschrift aus dem jeweiligen Protokoll befolgen.

Vorbehandlung von Objektträgern und Deckgläschen:

Objektträger mit EtOH säubern.

Für bessere Haftung des Gewebes entweder Superfrost - Objektträger (Mikrowellenbehandlung) benutzen oder normale Objektträger mit Bindsilan/ Pritt (s. Protokoll) beschichten.

Deckgläschen: Nach Protokoll (siehe „Vorbereitung von Deckgläschen“ und am Ende des Protokolls) waschen, bei 180 °C in Glasschale oder Becherglas sterilisieren, ggf. beschichten.

Vorbemerkung (Zellen und Gewebe):

Bei der Verwendung von Antikörpern aus Maus auf Mausgewebe unbedingt Subklassenspezifische Sekundärantikörper verwenden, um Kreuzreaktion gering zu halten. Bei Mehrfachdetektion müssen die Sekundärantikörper aus der gleichen Spezies stammen, um Kreuzreaktionen auszuschließen, unbedingt noch Gegenkontrollen einbeziehen. Bei Gewebe zusätzlich Normalserum (5 % Endkonzentration) aus der gleichen Spezies zum Gemisch der Primär- und Sekundärantikörper geben. Bei Mehrfachdetektion außerdem darauf achten, daß Sekundärantikörper gegen andere Spezies präadsorbiert sind. Die Cy2 und Cy3, bzw. DL-markierten Fluorochrome sind am stabilsten, gefolgt von Alexa 488 (grün), Alexa 555, Alexa 594 und Texas Red sind weniger stabil, gefolgt von Rhodamin-X (rot) und Rhodamin. DTAF (grün) ist stabiler als FITC.

Vorbemerkung zu 2nd-Antikörpern:

Subklassenspezifische Sekundärantikörper nur verwenden, wenn z.B. Maus-monoklonale Antikörper auf Maus-Gewebe verwendet werden. Bei Verwendung von Zellen auf Plättchen ist dies nicht notwendig, hier Gesamt-IgG-Sekundärantikörper verwenden.

Durchführung:

Schnitte auf Objektträgern werden mit einem Fettstift (Dako) eng umrandet falls nötig (Waschpuffer mit Triton) und ansonsten gleich wie Zellen auf Deckgläschen behandelt.

Whatmanpapier in Plasteschale geben, feuchte Kammer erzeugen; vor dem Anfeuchten mit Bleistift entsprechende Positionen der Plättchen numerieren (Zuordnung von Ergebnissen...).

Alle Primär- und Sekundär-Antikörper vor Gebrauch 10 min (4°C) bei 14.000 rpm. zentrifugieren.

Antikörper immer auf Eis, Lösungen erst kurz vor Gebrauch herstellen, Stocks so kurz wie möglich aus 4°C herausnehmen!!

Optional: Vor der Antikörperbehandlung gegebenenfalls 10-15 min in 1x TBS pH 7,5 + 1% BSA blocken.

Alle Antikörper in 1x TBS pH 7,5 + 1% BSA (Albumin-FraktionV pH 7,0; AppliChem #A1391,0100) verdünnen

Pro Plättchen je 30 µl Primär- und 40 µl Sekundär-Antikörper ansetzen.

Bei Doppelfluoreszenzen können jeweils Primär- bzw. Sekundär-Antikörper gemischt werden, (Volumen bleibt 30 bzw. 40 µl, auf entsprechende Spezies-Reaktivität der verwendeten Antikörper achten!).

Getrocknete Plättchen (bei Methanol/Aceton-Fixierung) bzw. feuchte Plättchen (bei PFA-Fixierung; hier in 3-4er Gruppen, um Austrocknen zu vermeiden) in feuchte Kammer legen. Wenn die Plättchen angefeuchtet werden (PFA-Fixierung oder Blockieren), sollte man darauf achten, dass der Hauptteil der Flüssigkeit wieder abgetupft wurde, um eine eventuelle Verdünnung des Antikörpers zu verhindern.

30 µl Primär-Antikörper mittig darauf pipettieren, seitlich mit der Pipettenspitze verteilen, dabei Zellen nicht beschädigen, 1 h bei Raumtemperatur inkubieren, bzw. je nach Antikörper 4°C ü.N..

Plättchen mit Pinzette herausnehmen, in Becherglas mit TBS eintauchen, dann in Ständer der in Küvette mit TBS steht, einsortieren,

2 x 1 min in TBS waschen;

Währenddessen sek. Antikörper ansetzen, DAPI (Roth #6335.1, Stock: 1 mg/ml) 1/1000 direkt in sek. Antikörper geben.

Nach TBS-Waschschritt Plättchen auf Papier abtropfen lassen, wieder in feuchte Kammer legen (in Gruppen von 3-4 Plättchen entnehmen und weiter verarbeiten, um Austrocknen zu vermeiden),

40 µl Sekundär-Antikörper wie oben beschrieben auftragen, 30-45 min bei Raumtemperatur inkubieren. Wichtig: das Ganze abgedunkelt, um eventuelles Ausbleichen des gekoppelten Fluorophors zu vermeiden,

Plättchen wie oben beschrieben herausnehmen

2x 1 Min. mit TBS waschen,

1 x kurz in Küvette mit Millipore-Wasser waschen,

1 x kurz in Küvette mit abs. EtOH (technisch) waschen,

Plättchen etwa 1 h auf Papier trocknen, das Ganze abgedeckt, wichtig das Plättchen vollständig trocken sind.

Eindeckeln:

Standardeinbettung für Immunfluoreszenzpräparate:

Mit 2% N-Propylgallat (AppliChem A5338,0100) in 90% Glycerin + 20 mM Tris pH 8,0 („Herstellung des Eindeckmediums“ siehe am Ende des Protokolls); ca 4 µl des Eindeckmediums mittig auf die „Zellseite“ eines Plättchens geben, mit einem Objektträger von oben ansaugen und mit Nagellack umranden. Nach Trocknen des Nagellacks kann die Probe am Mikroskop angeschaut werden.

Präparate im Dunkeln aufbewahren und innerhalb von max. 2 Wochen fotografieren und auswerten.

Für Präparate, die noch ausbleichstabiler eingedeckelt werden sollen (für Konfokalmikroskopie oder bei ausbleichenden Fluorochromen), kann alternativ das sehr teure ProLong Gold (Invitrogen) benutzt werden. Handhabung wie von Invitrogen beschrieben (siehe „ProLong Gold Handhabung“).

Vorbereitung von Deckgläschen:

Deckgläschen: VWR #631-0150

10 Min. im Falkon auf dem Rollinkubator mit 100% technischem Aceton waschen;

1 Min. im Falkon auf dem Rollinkubator mit 100% technischem Ethanol waschen;

1 Min. im Falkon auf dem Rollinkubator mit 5% Ether in abs. technischem Ethanol waschen;

auf Fließpapier ausbreiten und trocknen lassen;

in Glaspetischale oder Becherglas 3h bei 180°C

4% PFA/PBS

PFA kann jedes Mal frisch angesetzt werden, oder nach dem Protokoll des Nelson Labs als 20%-ige Lösung angesetzt werden und dann weggefroren werden.

Ansetzen von 4% Formalin aus PFA:

- 4 g Paraformaldehyd (Merck K41530205 041 1.04005.1000)
- add ~85 ml H₂O (reinst)
- add 30-40 µl 0.5 M NaOH
- 56°C until solution is clear
- add 10 ml 10 x PBS
- check pH with pH indicator strips and adjust if necessary
- cool-down on ice before use

Protokoll aus dem Nelson lab (modifiziert):

Herstellung 20% Formalin- Stocklösung:

- 100 g Paraformaldehyde (Merck K41530205 041 1.04005.1000)
- 1.9 ml 10 N NaOH
- add 440 ml H₂O
- 56°C until solution is almost clear (Temperatur darf nicht über 56°C gehen, weil sonst Ameisensäure entsteht)
- add 50 ml 10xPBS
- Filter through Whatman filter paper
- adjust pH to 7.5 (must be between 7.2-7.5)
- H₂O up to 500 ml
- Stored as 20 ml aliquots at -20°C
- Before use dilute to 4% final in 1 x PBS
- adjust pH to 7.5 (must be between 7.2-7.5)

Herstellung des Eindeckmediums:

90% Glycerin

2% N-Propylgallat (AppliChem A5338,0100)

20 mM Tris pH 8,0

Alles gut mischen; 5 Sec. (nicht länger) in die Mikrowelle; weiter rühren lassen, bis sich alles gelöst hat; aliquotieren und bei 4°C im Dunkeln lagern.