

## **Imunofluorescenční značení formalínem fixovaných parafínových tkáňových řezů pomocí protilátek konjugovaných s eFluor<sup>®</sup> nanokrystaly**

### **Úvod**

Tento protokol je optimalizován pro imunofluorescenční studie zmražených tkáňových řezů pomocí protilátek, které jsou konjugovány s eFluor<sup>®</sup> 605NC nebo 650NC – použitím kitů:

- eFluor<sup>®</sup> 605 nanokrystalový konjugační kit (amino skupina), kat. č. **88-7071**
- eFluor<sup>®</sup> 650 nanokrystalový konjugační kit (amino skupina), kat. č. **88-7072**
  
- eFluor<sup>®</sup> 605 nanokrystalový konjugační kit (thiolová skupina), kat. č. **88-7141**
- eFluor<sup>®</sup> 650 nanokrystalový konjugační kit (thiolová skupina), kat. č. **88-7142**

### **Poznámka**

*Inkoust PAP Penu může interferovat se signálem eFluor<sup>®</sup> nanokrystalu, a proto není doporučeno společné použití.*

### **MATERIÁL**

- 1X TBS; ředění ze zásobního 20X TBS promývacího pufru pro IHC (kat. č. 00-4954)
- 1X PBS, pH 7.4
- Čistící a zavodňovací reagenty: histoclear II nebo xylen, etanol (100%, 90% a 70%)
- Reagenty pro zpřístupnění antigenu: proteináza K (20 ug/ml v TE pufru, pH 8.0), trypsin (0.05% s 0.1% CaCl, pH 7.8), IHC roztok pro zpřístupnění antigenu – nízké pH (kat. č. 00-4955) nebo IHC roztok pro zpřístupnění antigenu – vysoké pH (kat. č. 00-4956)
- Blokační činidlo: IHC/ICC blokační pufr s nízkým obsahem proteinů (kat. č. 00-4953) nebo IHC/ICC blokační pufr s vysokým obsahem proteinů (kat. č. 00-4952)
- protilátka konjugovaná s eFluor<sup>®</sup> nanokrystaly
- Fluoromount G vazebné médium (kat. č. 00-4958)
- zvlhčená nádobka (do které se budou umísťovat sklíčka s komůrkami během inkubace)
- parafilm
- krycí sklíčka (velikost odpovídající velikosti tkáňových řezů)
- lak na nehty

### **Přístroje:**

- mikroskop (vybavený příslušnými filtry pro fluorofory)

## PROTOKOL

1. Připravte si parafínové řezy, na sklíčka typu „superfrost plus“ (tloušťka řezů se může lišit v závislosti na sledovaném antigenu, nicméně obecně 4-10  $\mu\text{m}$ ).
2. Zahřívejte sklíčko s řezem 20 minut při 50-60°C v suché troubě pro lepší přilnutí tkáně a pro změknutí parafínu (aby nedošlo k poškození cílového antigenu, teplota by neměla přesáhnout 60°C).
3. Odstraňte parafín a zavodněte tkáň při dodržení následné promývací/inkubační sestupné řady:
  - Histo-clear II (nebo Xylen) 3 x 5 minut
  - 100% etanol 2 x 5 minut
  - 90% etanol 1 x 5 minut
  - 70% etanol 1 x 5 minut
  - ddH<sub>2</sub>O 1 x 5 minut

**Poznámka 1:** Během promývacích kroků se ujistěte, že roztoky jsou dobře promíchané a že se na tkáňových řezech netvoří bubliny. Později je možné namáčet sklíčko pomocí držáku v každém roztoku, opakovaně několikrát za sebou. Od tohoto kroku je důležité, aby tkáň nevyschla – vyschnutí by mohlo vést ke zvýšenému backgroundu při značení a následné nesprávné interpretaci výsledků.

**Poznámka 2:** V případě detekce antigenu s epitopem, který je citlivý na zesíťování během fixace, je třeba zpřístupnit antigen zahříváním s puřem s nízkým či vysokým pH a nebo proteinovým natrávením. Výběr správné metody pro zpřístupnění antigenu závisí na druhu antigenu a je třeba ji optimalizovat. Doporučujeme začít bez zpřístupňování antigenu (přejděte ke kroku 7.) a potom dle potřeby použijte vhodnou metodu (krok 4., 5. nebo 6.) pro snadnější detekci antigenu.

### **Metoda 1 pro zpřístupnění antigenu (v případě potřeby):**

4. Zahřátím indukované zpřístupnění epitopu (HIER), nízké pH.

Ponořte sklíčka do nadbytku předeřátého IHC roztoku pro zpřístupnění antigenu – nízké pH (kat. č. 00-4955) a zahřívejte v mikrovlnné troubě do bodu varu. Vařte 15 minut; udržujte kontinuální var. Po převaření, nechte vychladit (asi 20 minut) na pokojovou teplotu, v roztoku pro zpřístupnění antigenu. Roztok pro zpřístupnění antigenu může být zahříván ve vodní lázni, nicméně optimální teplotu a čas je třeba stanovit (optimalizovat) dle cílového antigenu.

### **Metoda 2 pro zpřístupnění antigenu (v případě potřeby):**

#### 5. Zahřátím indukované zpřístupnění epitopu (HIER), vysoké pH.

Ponořte sklíčka do nadbytku přehřátého IHC roztoku pro zpřístupnění antigenu – vysoké pH (kat. č. 00-4956) a zahřívajte ve vodní lázni, 20 minut při 98°C. Nechte vychladit (asi 20 minut) na pokojovou teplotu, v roztoku pro zpřístupnění antigenu. Přejděte ke kroku 7.

*Poznámka: Inkubační doba by měl být optimalizována pro cílový antigen – je tedy možné, že inkubační doba bude kratší či delší než udaných 20 minut, v závislosti na antigenu.*

### **Metoda 3 pro zpřístupnění antigenu (v případě potřeby):**

#### 6. Proteinové natrávení.

Ponořte sklíčka do 0,1% proteinázy K nebo trypsinu ředěného v 1X PBS, 10-20 minut při 37°C. Přejděte ke kroku 7.

*Poznámka: Inkubační doba by měl být optimalizována pro cílový antigen – je tedy možné, že inkubační doba bude kratší či delší než udaných 10-20 minut, v závislosti na antigenu.*

7. Omyjte sklíčka jemným pohybem v 1X PBS, 5 minut/promytí pomocí skleněné nádoby a míchačky nastavené na nízké otáčky (45 rpm). Vyměňte roztok 2x – celkem tedy 3 promývací cykly, při pokojové teplotě.

8. Pro zablokování nespecifických vazebných míst aplikujte na tkáňové řezy blokační pufr, 1 hodinu při pokojové teplotě. Použijte přibližně 100 µl na tkáň o velikosti 1,5 cm x 1,5 cm (množství pufru úměrně zvýšíme dle velikosti tkáně). Abyste omezili odpařování blokačního pufru a rovnoměrně rozlili roztok na tkáň, použijte pinzetu a opatrně zakryjte tkáňový řez parafilmem (vystříhnete parafilm tak, aby jeho velikost odpovídala velikosti tkáně). Není nutné napínat parafilm nebo zakrývat okraje sklíčka. Parafilm by měl být jen v lehkém kontaktu s blokačním pufrům a nedotýkat se tkáně přímo. Ujistěte se, že se pod vrstvou parafilmu netvoří bubliny – jemně nadzvedněte okraje parafilmu pinzetou tak, aby zmizely bubliny. Opět, abyste omezili odpařování, inkubujte sklíčka ve zvlhčené nádobce.

*Poznámka 1: Blokační pufr: Při použití protilátek konjugovaných s eFluor<sup>®</sup> nanokrystaly doporučujeme použít vhodný blokační pufr. Nejčastěji se doporučuje použití IHC/ICC blokačního pufru s nízkým obsahem proteinů (kat. č. 00-4953). Pro tkáň/protilátky s vysokým podílem nespecifického značení, pro jaderné antigeny a FFPE tkáň je doporučen IHC/ICC blokační pufr s vysokým obsahem proteinů (kat. č. 00-4952).*

*Poznámka 2: Inkoust PAP Penů může interferovat se signálem eFluor<sup>®</sup> nanokrystalu, a proto není doporučeno společné použití.*

9. Pinzetou opatrně odstraňte parafilm z tkáňového řezu a ponořte sklíčko do skleněné nádoby obsahující TBS. Opatrně omyjte sklíčka v TBS, 5 minut/promytí na míchačce nastavené na nízké otáčky (45 rpm). Vyměňte roztok 2x – celkem tedy 3 promývací cykly, při pokojové teplotě.  
***Poznámka:** Pro dosažení maximální intenzity signálu (při použití protilátek konjugovaných s eFluor<sup>®</sup> nanokrystaly) doporučujeme pro promytí a inkubaci použít pufr s TBS základem.*
10. Naředěte protilátku konjugovanou s eFluor<sup>®</sup> nanokrystaly blokačním pufrém a **zakryjte před světlem**. Kvůli odlišné specifitě a afinitě jednotlivých protilátek je nutné vytitrovat optimální koncentraci. Obvykle je doporučena jako výchozí koncentrace eFluor nanokrystalového konjugátu v rozpětí 1-40 nM.
11. Naředěnou protilátku aplikujte na tkáň a zakryjte parafilmem, viz krok 8. Pro dosažení nejlepších výsledků, inkubujte ve zvlhčené nádobce přes noc, při 4°C. **Chraňte před světlem**.  
***Poznámka:** Protilátky, které reagují se silně exprimovaným antigenem, mohou mít kratší inkubační dobu (1-2 hodiny při pokojové teplotě). Optimální inkubační doba závisí na konkrétní protilátce a cílové tkáni.*
12. Opatrně promyjte tkáň 3x v 1X PBS (5 minut/promytí), jak je popsáno v kroku 9. **Chraňte před světlem**.
13. Odstraňte promývací roztok ze sklíčka a aplikujte 2-3 kapky Fluoromount G vazebného média (kat. č. 00-4958), zakryjte krycím sklíčkem. Utěsněte krycí sklíčko bezbarvým lakem na nehty a nechte 20 minut zaschnout, ve tmě.
14. Pro dosažení nejlepších výsledků ihned mikroskopujte. Preparáty mohou být skladovány při 4°C, ve tmě.