

Histologische Arbeitsmethoden

1. Gewebe-Aufarbeitung
 - 1.1 Kryostat-Histologie
 - 1.2 Paraffin-Histologie
 - 1.2.1 Fixierung
 - 1.2.2 Formalin-Fixierung
 - 1.2.3 Paraformaldehyd-Fixierung
 - 1.2.4 Bouin-Hollande-Fixierung
 - 1.2.5 PLP-Fixierung
 - 1.2.6 Entkalkung
 - 1.2.7 EDTA-Entkalkung
 - 1.2.8 Trichloressigsäure-Entkalkung
 - 1.2.9 Einbettung
 - 1.2.10 Schnitte-Anfertigung
 - 1.3 Gefrier-Histologie

2. Sonstige Vorbereitungen
 - 2.1 Vorbehandlung der Objektträger

3. Routinefärbung
 - 3.1 HE-Färbung

4. Gegenfärbungen
 - 4.1 Hämatoxylinfärbung
 - 4.2 Kernechtrotfärbung

5. Immunhistologie
 - 5.1 Vorbereitung von Paraffinschnitten
 - 5.1.1 Mikrowellenbehandlung
 - 5.1.2 Trypsin-Verdau
 - 5.1.3 Proteinase K-Verdau

- 5.1.4 Pepsin-Verdau
- 5.1.5 Pronase E-Verdau
- 5.2 ABC-Methode
- 5.3 APAAP-Methode
- 5.4 Unspezifitäten und Kontrollen

- 6. in situ Hybridisierung
 - 6.1 DNA in situ Hybridisierung
 - 6.2 RNA in situ Hybridisierung
 - 6.3 Sonden

7. Abkürzungen

8. Puffer und Lösungen

- 9. Literatur
 - 9.1 Histologische Basis
 - 9.2 Immunhistologie
 - 9.3 in situ Hybridisierung

1. Gewebe-Aufarbeitung

Die zu untersuchenden Organe können auf verschiedene Weise für eine histologische Untersuchung vorbereitet werden. Man kann die Gewebe in flüssigem Stickstoff tiefgefrieren und danach am Kryostat bei ca. -20°C bis -30°C schneiden. Alternativ werden auch von zuvor in Formalin oder in anderen Substanzen fixierte Gewebe Gefrierschnitte an speziellen Gefriermikrotomen angefertigt. Überwiegend jedoch erfolgt eine Fixierung der Gewebe in Formalin. Die fixierten Stücke werden dann entwässert und in Paraffin oder seltener, für spezielle Fragestellungen in verschiedene Kunststoffe einbettet.

1.1 Kryostat-Histologie

Um Schnitte am Kryostat anfertigen zu können, müssen zuerst die Gewebe als kleine Blöcke mit wenigen mm Kantenlänge in flüssigem Stickstoff (-196°C) schockgefroren

werden. Die weitere Zwischenlagerung erfolgt meist bei -80°C . Eine Fixierung des Gewebeblockes vor dem Schneiden, wie bei der Paraffinhistologie erfolgt nicht. Direkt vor dem Schneiden werden die Gewebe auf einen Halter mit "Gewebeeinbettmedium für Gefrierschnitte" aufgebracht. Jetzt können mit dem Kryostat Schnitte, üblicherweise zwischen $3\ \mu\text{m}$ bis $15\ \mu\text{m}$ angefertigt werden. Die Schnitte werden auf Objektträger aufgezogen und getrocknet. Danach erst werden sie in Aceton oder Methanol für etwa 10 min fixiert. Man kann auch beide Fixiermittel im Verhältnis 1:1 mischen. Eine weitere Möglichkeit ist eine Fixierung in wässrigem Formalin oder Paraformaldehyd (jeweils 4% bis 10%). Falls die Schnitte nicht sofort weiter verarbeitet werden, erfolgt die weitere Lagerung der fixierten und trockenen Präparate gut verpackt bei -20°C . Kryostat-Schnitte werden als Schnellschnitte, als Fettfärbungen, in der Immunhistologie (IH) und in der in situ Hybridisierung (ISH) verwendet.

1.2 Paraffin-Histologie

Die Paraffin-Einbettung erfordert eine aufwendigere Bearbeitung der Organe als die Kryostat-Histologie. Jedoch ist die Strukturhaltung deutlich besser. Nachfolgend ist die übliche Vorgehensweise beschrieben, die mit der Fixierung und der eventuell notwendigen Entkalkung von Knochen oder Zähnen beginnt. Es folgt die Einbettung und schließlich das Anfertigen von Schnittpräparaten.

1.2.1 Fixierung

Damit Gewebe möglichst natürlich erhalten bleiben und sie in ihrer ursprünglichen Architektur beurteilt werden können, müssen Fixierungsmethoden angewendet werden. Einige übliche Fixative werden nachfolgend vorgestellt.

1.2.2 Formalin-Fixierung

Üblicherweise werden Gewebe oder auch Zellausstriche in wässrigen Formalinlösungen mit 4% oder 10% Formaldehydgehalt fixiert. Diese Form der Fixierung ist die gebräuchlichste Art der Gewebeerhaltung und wird für die Routine, die in situ Hybridisierung und die Immunhistologie angewandt. Gepuffertes Formalin ist dem ungepufferten vorzuziehen.

gepuffertes Formalin:

9,07 g KH_2PO_4

11,86 g Na_2HPO_4

in 860 ml aqua dest. lösen, und

140 ml Formalin (37% Stammlösung) hinzugeben und gut mischen
den pH bei 7,4 einstellen

Protokoll: Formalin-Fixierung

8-18 h Gewebe in der fertig angesetzten Formalinlösung
bei RT fixieren (Dauer je nach Größe des Gewebes)

2-6 h Spülen der Gewebe in Leitungswasser
danach aufsteigende Alkoholreihe:

45-60 min Isopropanol, 20%, in aqua dest.

45-60 min Isopropanol, 40%, in aqua dest.

45-60 min Isopropanol, 60%, in aqua dest.

45-60 min Isopropanol, 80%, in aqua dest.

45-60 min Isopropanol, 90%, in aqua dest.

45-60 min Isopropanol, 100%, Nr. 1

45-60 min Isopropanol, 100%, Nr. 2

8 bis 16 h Isopropanol, 100%, Nr. 3

1 Stunde Xylol, Nr. 1

1 Stunde Xylol, Nr. 2

1 Stunde Xylol, Nr. 3

4 h Paraffin, 55°-65°C, Nr. 1

8-16 h Paraffin, 55°-65°C, Nr. 2

4 h Paraffin, 55°-65°C, Nr. 3

danach in heißem Paraffin einblocken

1.2.3 Paraformaldehyd-Fixierung

Paraformaldehyd-Lösungen werden immer dann eingesetzt, wenn es notwendig ist, reines Formaldehyd zur Fixierung zu verwenden. Die gängigen Formalin-Stammlösungen sind zur Stabilisierung des Formaldehyds mit bis zu 10% Methanol versetzt. Dennoch bildet

sich im Laufe der Zeit aus dem Formaldehyd Ameisensäure. Muss man säurefreies und methanolfreies Formalin zur Fixierung verwenden, so wird Paraformaldehyd eingesetzt und direkt vor der Verwendung zubereitet.

Paraformaldehyd-Lösung:

4 g Paraformaldehyd-Pulver in
100 ml aqua dest. mischen (= 4%)

es entsteht eine milchig, weiße Flüssigkeit,
danach vorsichtige Zugabe von Natronlauge,
bis sich das Paraformaldehyd löst (bei pH = 7)
Lösung nur frisch verwenden

Die Fixierungsdauer und die weitere Verarbeitung der Gewebe entsprechen den Arbeitsschritten, wie nach Formalin-Fixierung (Kapitel 1.2.2).

1.2.4 Bouin-Hollande-Fixierung

Die Fixierung nach Bouin-Hollande führt zu einer optimalen Erhaltung der antigenen Strukturen, so dass diese Art der Fixierung insbesondere für die Immunhistologie geeignet ist. Dagegen wird durch die im Fixativ vorhandene Pikrinsäure die DNA angegriffen, was dieses Verfahren für die Hybridisierung eher ungeeignet erscheinen lässt. Ein Verdau der Schnitte mit Trypsin oder ähnlichem ist in der Regel nicht notwendig.

Bouin-Hollande-Fixativ:

5 g Kupfer(II)-Acetat Monohydrat (z.B. Fluka; 61148)
8 g Pikrinsäure (z.B. Fluka; 80450) in
200 ml aqua dest. lösen und filtrieren
20 ml einer 37%igen Formalin-Stammlösung
2 ml Eisessig dazugeben und gut mischen
(nur frisch angesetzt verwenden)

Die Gewebe werden 8 bis 24 Stunden in der Fixierlösung bei Raumtemperatur fixiert und danach mit Wasser oder 70%igem Ethanol für weitere 8 bis 24 Stunden gut ausgewaschen. Danach erfolgt die übliche Dehydratation der Gewebe in Alkohol (Isopropanol oder Ethanol) und Xylol sowie die Einbettung in Paraffin (siehe Kapitel 1.2.2).

1.2.5 PLP-Fixierung

Eine weitere Alternative, die eine gute antigene Erhaltung gewährleistet stellt die PLP-Fixierung (Paraformaldehyd-Lysin-Perjodat-Fixierung) dar. Auch hier ist eine enzymatische oder andere Vorbehandlung der Schnitte in der Regel nicht notwendig. Um Gewebe mit dem PLP-Fixativ konservieren zu können, müssen vorher einige Stammlösungen angesetzt werden.

PLP-Stammlösungen:

PLP-A 18,26 g L-Lysin Monohydrochlorid (0,2 M),
z.B. Sigma; L 6027 in 500 ml aqua dest. Lösen
(Lagerung im Kühlschrank)

PLP-B 7,1 g Na₂HPO₄ (0,1 M) in 500 ml aqua dest. Lösen
(Lagerung im Kühlschrank)

PLP-C 5 g aD+Glucose, z. B. von Roth;
in 100 ml aqua dest. bei 60°C lösen
dazu 8 g Paraformaldehyd und 2-4 Tropfen
1 molare NaOH bis der Ansatz klar erscheint
(Lagerung <1 Wo im Kühlschrank)

PLP-D Es hat sich bewährt, das Natriumperjodat, z.B. Sigma; S 1878
in einzelne 0,855 g Portionen abzuwiegen

Kurz vor Gebrauch:

100 ml PLP-A (Endkonz. des Lysins: etwa 0,1 M) und

- 100 ml PLP-B mischen und auf pH 7,4 einstellen
- 0,855 g Natriumperjodat (Endkonz. 0,02 M) lösen und
- 6,452 ml PLP-C einrühren (Endkonzentration des Paraformaldehyds: 0,25%)

Es sollten relativ kleine Gewebestücke geschnitten und für 4 bis 12 Stunden im Kühlschrank fixiert werden. Die weiteren Schritte sind wie folgt:

Weiteres Vorgehen nach PLP-Fixierung:

- 30 min Auswaschen der Gewebe in PBS, Nr. 1
- 30 min Auswaschen der Gewebe in PBS, Nr. 2
- 30 min Auswaschen der Gewebe in PBS, Nr. 3

- 30 min inkubieren in 70% Isopropanol
- 30 min inkubieren in 90% Isopropanol
- 30 min inkubieren in 100% Isopropanol, Nr. 1
- 30 min inkubieren in 100% Isopropanol, Nr. 2
- 30 min inkubieren in 100% Isopropanol, Nr. 3

- 20 min inkubieren in Xylol, Nr. 1
- 20 min inkubieren in Xylol, Nr. 2
- 20 min inkubieren in Xylol, Nr. 3

- 3 h inkubieren in heißem Paraffin, Nr. 1
- 3 h inkubieren in heißem Paraffin, Nr. 2
- 3 h inkubieren in heißem Paraffin, Nr. 3

schließlich einblocken in Paraffin (Paraffintemperatur: 55°-65°C)

1.2.6 Entkalkung

Knochenhaltige Gewebeteile müssen in der Regel vor dem Schneiden entkalkt werden. Hierzu steht eine Reihe von Substanzen zur Verfügung, von denen zwei vorgestellt werden.

1.2.7 EDTA-Entkalkung

Die EDTA-Entkalkung ist relativ gewebeschonend. Die Strukturen sind nach der Behandlung gut beurteilbar. In situ Hybridisierungen oder auch eine Immunhistologie sind prinzipiell möglich. Größere Gewebe benötigen allerdings längere Entkalkungszeiten. Zähne brauchen bis zu 4 Wochen, bis sie problemlos schneidbar sind. Es können 10%ige bis 25%ige Lösungen eingesetzt werden.

EDTA-Entkalkung (20%ig):

200 g	Na-EDTA
800 ml	aqua dest.
	unter ständigem rühren erhitzen und
ca. 50 ml	NaOH (40%) zugeben, bis der pH = 7.4
ad 1 l	auffüllen mit aqua dest.

Kleine Knochen (Dicke: wenige mm) benötigen etwa 1-3 Tage für eine vollständige Entkalkung. Die Lösung sollte man nicht mehrmals benutzen. Nach dem Entkalken müssen die Gewebe in Leitungswasser gespült, in Alkohol dehydriert und über Xylol in Paraffin eingebettet werden (siehe Kapitel 1.2.2).

1.2.8 Trichloressigsäure-Entkalkung

Die Trichloressigsäure-Entkalkung ist etwas aggressiver als die vorher genannte Methode. Die Gewebe schrumpfen und die Anfärbbarkeit der Zellen und Zellkerne ist vermindert, was zu einer Erhöhung der Färbezeiten führt. Die Trichloressigsäure löst Nukleinsäure aus dem Schnitt heraus. Somit ist diese Art der Entkalkung nicht die Methode der Wahl für die in situ Hybridisierung. Immunhistochemische Untersuchungen sind jedoch prinzipiell möglich.

Trichloressigsäure-Entkalkung (5%):

50 g Trichloressigsäure, z.B. von Roth
40 ml Formalin (4%)
ad 1 l aqua dest.
 (Lagerung bei Raumtemperatur)

Nach der Entkalkung sollten die Gewebe sofort in hochprozentigem Alkohol (z.B. 96% Ethanol) gespült werden um Schrumpfungsartefakte zu minimieren. Das Wässern der Gewebe und die aufsteigende Alkoholreihe entfallen, bis auf die 100%-Stufen. Nach Inkubation in Xylol kann dann in Paraffin eingebettet werden (siehe Kapitel 1.2.2). Kleine Knochen (Dicke: wenige mm) benötigen, wie auch nach einer EDTA Behandlung etwa 1-2 Tage für eine vollständige Entkalkung. Die Lösung sollte man auch hier nicht mehrmals benutzen.

1.2.9 Einbettung

Die fixierten und gegebenenfalls entkalkten Gewebe müssen, bevor man von ihnen nur wenige µm-Dicke Schnitte anfertigen kann eingebettet werden. Dies erfolgt in der Regel in Paraffin. Die Einbett-Temperaturen können je nach verwendetem Paraffin zwischen 50°C und 70°C schwanken. Auch Kunststoff-Einbettungsmethoden sind für spezielle Fragestellungen möglich, jedoch in ihrer Handhabung äußerst kompliziert. Bevor jedoch die Gewebe in das Paraffin gelegt werden können, müssen Schritte der Entwässerung durchgeführt werden. Hierfür wird zuerst das Fixierungsmittel, meist in Wasser ausgewaschen. Danach erfolgt die eigentliche Entwässerung mit einer in der Konzentration aufsteigenden Alkoholreihe, z.B. Isopropanol 20%, 40%, 60%, 80%, 90%, 100%. Es folgt eine Inkubation in einem Intermediärmedium, z.B. Xylol, danach das Einbringen der Gewebe in das heiße Paraffin. Aus dem heißen Paraffin werden die Gewebe in Blöckchen eingegossen und sind nach dem Erkalten fertig zum schneiden (siehe Kapitel 1.2.2).

1.2.10 Schnitte-Anfertigung

Zum Anfertigen von Schnitten wird ein Mikrotom benutzt. Hiermit ist es möglich bis zu 0,5 µm dicke Scheiben eines eingebetteten Gewebes anzufertigen. Üblicherweise beträgt die Schneiddicke etwa 2 µm bis 6 µm. Hierzu werden die Paraffin-Blöckchen zuerst auf -20°C gekühlt. Nach mindestens 2 Stunden Lagerung bei -20°C können dann mit dem Mikrotom Schnitte angefertigt werden. Die erhaltenen Schnitte werden zuerst auf einem Kaltwasserbad (ca. 20°C) aufgefangen und dann auf einem Heißwasserbad (ca. 45°C) gestreckt um glatt auf einen Objektträger aufgezo-gen werden zu können. Die aufgezo-genen Schnitte müssen jetzt noch über Nacht bei etwa 37°C bis 45°C getrocknet werden und können schließlich am nächsten Morgen für histologische Untersuchungen verwendet werden.

1.3 Gefrier-Histologie

Nach dem Fixieren von Geweben, z.B. in Formalin (4%) können diese auch, alternativ zur Einbettung in Paraffin in flüssigem Stickstoff schockgefroren und sofort mit einem Gefrier-mikrotom geschnitten werden. Wegen relativ schlechter Gewebeerhaltung wird diese Methode nur selten angewandt. Eine Anwendung stellt unter anderem die Färbung von Fetten dar.

2. Sonstige Vorbereitungen

Eine wichtige Voraussetzung für die Anwendung der in diesem Skript angesprochenen Techniken ist die Vorbehandlung der Objektträger. Sie ist insbesondere für die Behandlung in der Mikrowelle oder für die in situ Hybridisierung unumgänglich.

2.1 Vorbehandlung der Objektträger

Die Objektträger sollten so vorbereitet sein, dass ein starkes Haften des Schnittes an den Objektträger gewährleistet ist. Eine gebräuchliche Methode für die Erhöhung der Haftung stellt die Silanisierung der Objektträger dar. Hierzu werden die Objektträger zuerst in Chloroform und Alkohol entfettet und gereinigt und danach in einer Silanlösung silanisiert.

Silanisierung von Objektträgern:

10 min Chloroform (100%)

10 min	Isopropanol (100%)
10 min	3-Aminopropyltriethoxysilan (APES) in Aceton (5 ml APES in 250 ml Aceton; = 2%ig), APES, z.B. von Sigma Nr. A 3648
10 min	spülen in Aceton Nr. 1
10 min	spülen in Aceton Nr. 2
10 min	spülen in aqua dest. Nr. 1
10 min	spülen in aqua dest. Nr. 2
10 min	spülen in aqua dest. Nr. 3
18-24 h	trocknen im Brutschrank bei 37°C bis 45°C

3. Routine-Färbung

Um die Architektur des Gewebes und pathologische Veränderungen beurteilen zu können, helfen verschiedene Färbemethoden. Es gibt Färbungen, die speziell geeignet sind, z.B. Fasern darzustellen, andere wiederum sind für die Darstellung von Knochen oder Knochenmarkzellen vorteilhaft. Die üblicherweise in der Routine eines histologischen Labors durchgeführte Färbung ist die HE-Färbung.

3.1 HE-Färbung

Die HE-Färbung (Hämatoxylin-Eosin-Färbung) stellt die Routine-Färbung der Wahl dar. Mit ihr gelingt eine gute Darstellung des Gewebes, wobei Zellkerne blau-violett und Zytoplasma rosa erscheinen. Interzelluläre Substanzen färben sich ebenfalls an, so erscheinen, z.B. Knorpel in violett oder Fasern in rosa.

4. Gegenfärbungen

Nachdem spezifische Untersuchungsmethoden Proteine oder Nukleinsäure in-situ markiert haben, ist es häufig sinnvoll die nicht spezifisch gefärbten Anteile des Gewebes in einer anderen Farbe gegenzufärben. So ist bei einer roten oder braunen spezifischen Anfärbung der blaue Farbstoff Hämatoxylin als unspezifische Hintergrundfärbung geeignet. Ist das spezifische Produkt schwarz oder blau, so stellt der rote Farbstoff Kernechtrot eine geeignete Farbe zum gegenfärben dar.

4.1 Hämatoxylinfärbung

Der blaue Farbstoff Hämatoxylin oder das Derivat Hämalan sind geeignete Farbstoffe, um nicht spezifisch angefärbte Gewebeteile blau gegenzufärben. Insbesondere Kerne werden gefärbt, andere Strukturen dagegen nur in geringerem Umfang. Die Färbedauer sollte nur wenige Sekunden in der unverdünnten Lösung (z.B. Hämalan nach Mayer) betragen.

4.2 Kernechtrotfärbung

Eine Alternative zum Hämatoxylin stellt der rote Farbstoff Kernechtrot dar. Er ist angesetzt nicht sehr lange haltbar (1-2 Monate) und muss daher häufiger erneuert werden.

5 g Aluminiumsulfat in 100 ml aqua dest. lösen

danach 0,1 g Kernechtrot dazugeben, lösen lassen, danach filtrieren

Die Schnitte für etwa 2 bis 10 min (je nach Alter der Lösung) in der Färbelösung bei Raumtemperatur inkubieren

5. Immunhistologie

Mit Hilfe der Methode der Immunhistologie gelingt der Nachweis von Antigenen im Schnitt. Hierzu werden Antikörper eingesetzt, die spezifisch gegen das gesuchte Antigen gerichtet sein müssen und dadurch an diesen Strukturen im Schnitt haften. Es gibt zahlreiche Methoden. Bei der direkten Methode ist der Primärantikörper mit einem Marker konjugiert, z.B. mit einem Enzym oder einem fluoreszierenden Farbstoff. Diese Methode ist nicht sehr sensitiv und kann nur dort eingesetzt werden, wo das gesuchte Antigen in großer Menge vorhanden ist. Bei der indirekten Methode erfolgt der Nachweis mit einem weiteren Antikörper, dem so genannten Sekundärantikörper. Dieser bindet an den ersten und ist selbst mit einem Marker versehen. Die letzte Methode ist etwa sensitiver als die vorgenannte und erlaubt es darüber hinaus für verschiedene Primärantikörper immer den gleichen markierten Sekundärantikörper zu verwenden. Bei der APAAP (alkalische Phosphatase anti-alkalische Phosphatase)-Methode werden nacheinander 3 Antikörper verwendet. Der erste bindet an das gesuchte Antigen, der zweite Antikörper bindet an den

ersten Antikörper, der dritte Antikörper wiederum sollte an den zweiten Antikörper binden und muss daher aus der gleichen Tierart wie der Primärantikörper stammen. Hierbei übt der zweite Antikörper quasi eine Brückenfunktion zwischen den beiden anderen Antikörpern aus. Aus diesem Grunde wird er auch als Brückenantikörper bezeichnet. Der letzte Antikörper ist gegen die alkalische Phosphatase gerichtet und bereits mit dem Enzym markiert. Dieses als APAAP-Komplex bezeichnete Reagenz kann bereits fertig markiert gekauft werden. Bei der PAP (Peroxidase anti-Peroxidase)-Methode, die der APAAP-Technik sehr ähnlich ist, wird quasi als dritter Antikörper ein Komplex aus dem Enzym Peroxidase und Antikörper gegen Peroxidase verwendet. Eine neuere Methode stellt die Dako Envision™ Technik dar. Hier ist der Zweitantikörper mit einem Dextrankomplex konjugiert, der wiederum Träger zahlreicher Peroxidase- oder Alkalischer Phosphatase-Moleküle ist. Diese Methode ist einfach durchzuführen und sehr sensitiv. Die am häufigsten benutzte Methode jedoch ist noch immer die ABC-Methode. Hier bindet ein mit Biotin gekoppelter Zweitantikörper an den Primärantikörper. Als weiterer Schritt folgt eine Inkubation mit dem so genannten Avidin-Biotin-Peroxidase-Complex (ABC). Der Nachweis bei allen Methoden, die mit Peroxidase (POD) oder Alkalische Phosphatase (AP) arbeiten, wird dadurch geführt, dass man ein farbloses Substrat des jeweiligen Enzyms auf den Schnitt aufbringt. Dieses Substrat wird durch das Enzym zu einem farbigen Niederschlag umgebaut und färbt schließlich die Strukturen an, an die der Primär-Antikörper ursprünglich gebunden hat. Insbesondere Formalin-fixierte und Paraffin-eingebettete Gewebe müssen häufig speziell vorbehandelt werden, damit der Nachweis gelingt. Alternative Fixierungsmethoden, die diese Vorbehandlungen umgehen können, sind im Kapitel 1.2.4 und 1.2.5 beschrieben.

5.1 Vorbereitung von Paraffinschnitten

Werden Formalin-fixierte Paraffinschnitte in der Immunhistologie eingesetzt, so ist oftmals eine enzymatische Vorbehandlung notwendig. Hierbei werden die Formalin-bedingten Eiweißvernetzungen, die einige Antigene quasi demaskieren können und somit einer immunhistologischen Untersuchung unzugänglich machen aufgebrochen. Viele Antigene sind jedoch auch trotz Formalin-bedingter Proteinvernetzung mit oder ohne Andauung nachweisbar. Einige Antigene werden sogar durch eine enzymatische Vorbehandlung zerstört und sind dann nicht mehr nachweisbar. Die Zeitdauer des enzymatischen

Verdau wird durch die Wahl der ursprünglich gewählten Fixierungs- und Einbettbedingungen bestimmt (z.B. Stärke und Dauer der Fixierung, Paraffintemperatur). Eine Ergänzung und Alternative zum enzymatischen Verdau stellt die Mikrowellenbehandlung der Schnitte dar.

5.1.1 Mikrowellenbehandlung

Zur Detektion einiger Antigene muss der Formalin-fixierte Paraffinschnitt durch Mikrowellenbehandlung oder durch Autoklavieren in einem Autoklaven oder Dampfdruckkochtopf vorbehandelt werden. Es wird vermutet, dass durch diese Behandlung demaskierte, also in ihrer räumlichen Struktur durch die Fixierung veränderte Proteine im Schnitt quasi wieder "renaturiert" werden. Die Schnitte werden hierfür in ein offenes, mikrowellene geeignetes, hitzestabiles Gefäß gestellt, das z.B. mit Citratpuffer (10 mM, pH 6,0) gefüllt ist.

Citrat-Puffer

2,94 g Tri-Na-Citrat-Dihydrat (10 mM)
ad 1 l aqua dest.;
 pH = 6,0 einstellen

Für etwa 5 min wird dann der Ansatz bei einer stärkeren Einstellung zum Kochen gebracht. Sprudelt die Lösung, muss das Mikrowellengerät auf eine geringere Leistung eingestellt werden. Die Schnitte dürfen während dieser Behandlung nicht austrocknen. Im allgemeinen werden 1 bis 4 Zyklen zu je 5 min durchgeführt, wobei zwischen den Zyklen die Ansätze einige Minuten ruhen sollten. Am Ende der Prozedur sollten die Objektträger in der Lösung verbleiben und für etwa 30 min bei RT abkühlen.

5.1.2 Trypsin-Verdau

Die Verwendung von Trypsin für die Andauung des Schnittes hat sich insbesondere für die Immunhistologie bewährt. Im Einsatz für die Immunhistologie kann für alle Organe eine empirisch festgelegte Inkubationszeit bei 37°C eingehalten werden. Bei der in situ Hybridisierung jedoch muss für jedes Organ die Dauer der Trypsin-Behandlung individuell ermittelt werden.

Trypsin-Lösung:

8 g	NaCl
0,2 g	KCl
0,2 g	KH ₂ PO ₄
1,15 g	Na ₂ HPO ₄
1,25 g	EDTA
ad 1 l	aqua dest. pH = 7,4 einstellen autoklavieren, danach
1,25 g	Trypsin einrühren, Lagerung bei 8°C

Protokoll: Trypsin-Verdau

Durchführung des Verdau in einer Küvette bei 37°C
das Trypsin sollte vor Benutzung bereits etwa 15 min vorgewärmt sein

Schnittpräparate in der ISH:

Organe zw. 15-30 min, je nach Einbettmethode und Schnittdicke

Schnittpräparate in der IH:

alle Organe 15 min

5.1.3 Proteinase K-Verdau

Alternativ zum Trypsin kann auch die Proteinase K verwendet werden. Sie wird bevorzugt in der in situ Hybridisierung eingesetzt.

Proteinase K-Stammlösung:

25 mg	Proteinase K (z.B. von Sigma P 0390) in
6667 µl	aqua dest. lösen (ergibt: 75 µg / 20 µl)

diese in 20 µl Portionen bei -20°C einfrieren

Protokoll: Proteinase K-Verdau

Ein Proteinase K-Aliquot mit 1,5 ml aqua dest. oder
Prot. K-Puffer (10 mM NaCl, 50 mM Tris (pH=7,4),
10 mM EDTA) auffüllen, (Endkonzentration: 50 µg / 1 ml)

Proteinase K Verdau in einer feuchten Kammer bei 50°C für ca. 18 min, verschiedene
Gewebe können unterschiedliche Zeiten benötigen

5.1.4 Pepsin-Verdau

Das Trypsin und die Proteinase K stellen die gebräuchlichsten Verfahren zur Andauung
eines histologischen Präparates dar. Falls sich jedoch beide Substanzen bei einer
speziellen Fragestellung als ungeeignet erweisen sollten, liegen noch weitere Alternativen
bereit, wie z.B. der Pepsin-Verdau.

Pepsin-Stammlösung:

25 g Pepsin (z.B. von Sigma P 7000) in
125 ml aqua dest. lösen

in 1 ml Portionen aliquotieren (Endkonzentration: 0,2 g / ml) Lagerung bei -20°C

Protokoll: Pepsin-Verdau

1750 µl HCl conc. (25%) Endkonz.: 0,2 M
ad 60 ml aqua dest., danach Zugabe von
150 µl Pepsin-Stammlösung (Endkonzentration: 0,5 mg / ml)
Schnitte für etwa 15-25 min in die 37°C warme Lösung

5.1.5 Pronase E-Verdau

Eine weitere, mögliche Alternative zu den bisher genannten Enzymen und Prozeduren
stellt der Pronase E Verdau dar.

Pronase E-Puffer

1,1 g CaCl₂ (Endkonz.: 10 mM)
100 ml 1 M TrisHCl, pH 7,5 (Endkonz.: 100 mM)
900 ml aqua dest.
ergibt: 1 Liter Pronase E-Puffer

Pronase E-Ansatz

50 mg Pronase E: Protease Typ XIV (Sigma, Nr. P 5147) abwiegen
und in 50 ml Pronase E-Puffer lösen (Magnetrührer),
dies entspricht einer 0,1%-Lösung

die Schnitte für 8 min bei Raumtemperatur in der frisch angesetzten Lösung inkubieren

5.2 ABC-Methode

Die ABC-Methode stellt die gebräuchlichste Methode zum in situ Nachweis von Antigenen dar (siehe auch Kapitel 4). Der Name leitet sich vom Avidin-Biotin-Peroxidase-Complex ab, der als ein wichtiger Schritt in dieser Untersuchung für die hohe Sensitivität verantwortlich ist. Als Substrate steht insbesondere das 3'3'-Diaminobenzidin (DAB) zur Verfügung, was zu einer Braunfärbung des gesuchten Antigens führt. Nach hinzufügen verschiedener Metallionen können blaue oder schwarze Präzipitate entstehen, z.B. bewirkt Nickel eine Schwarzfärbung des gesuchten Antigens. Das DAB ist Alkohol- und Xylol-stabil, so daß Xylol-haltige Eindeckmittel verwendet werden können.

Bilder 1 und 2: Beispiele für eine immunhistochemische Darstellung von viralem Protein in einem murinen Leberpräparat mit der ABC-Methode. Zur Färbung wurde DAB (Bild 1; spezifisches Signal braun) oder DAB in Kombination mit Ammonium-Nickel-Sulfat (Bild 2; spezifisches Signal schwarz) verwendet. das hier nachgewiesene virale Protein ist im Kern der infizierten Leberzelle konzentriert. Insbesondere der Kerneinschlusskörper färbt sich intensiv an. Gegengefärbt wurde mit dem Farbstoff Hämatoxylin, der das Zytoplasma aller Zellen schwach und die Kerne der nicht infizierten Zellen etwas kontrastreicher blau anfärbt. Die Infektion beginnt herdförmig und breitet sich quasi konzentrisch um diese primären Infektionsherde im Organ aus.

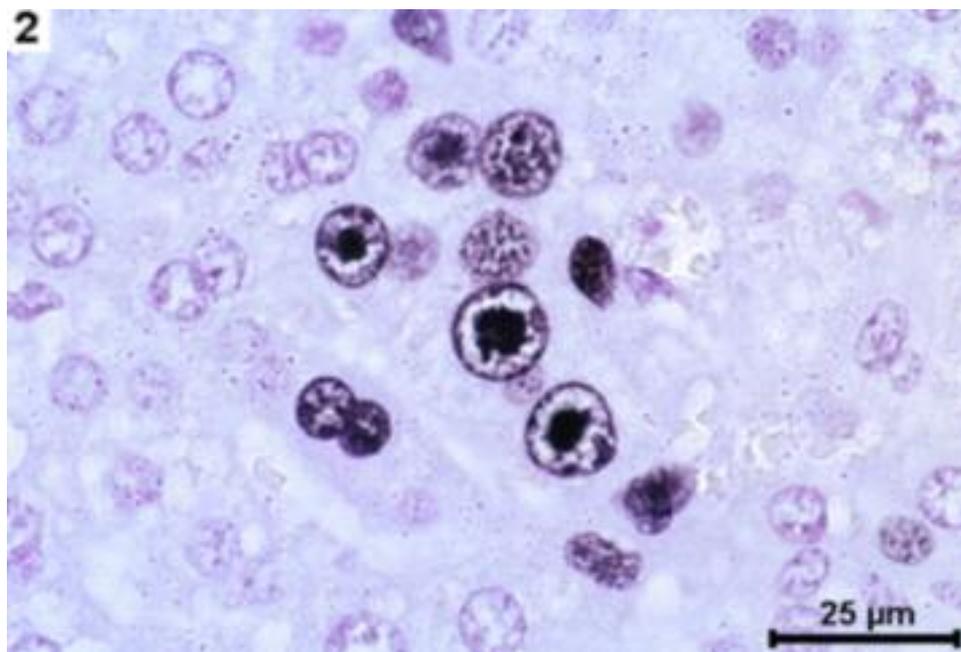
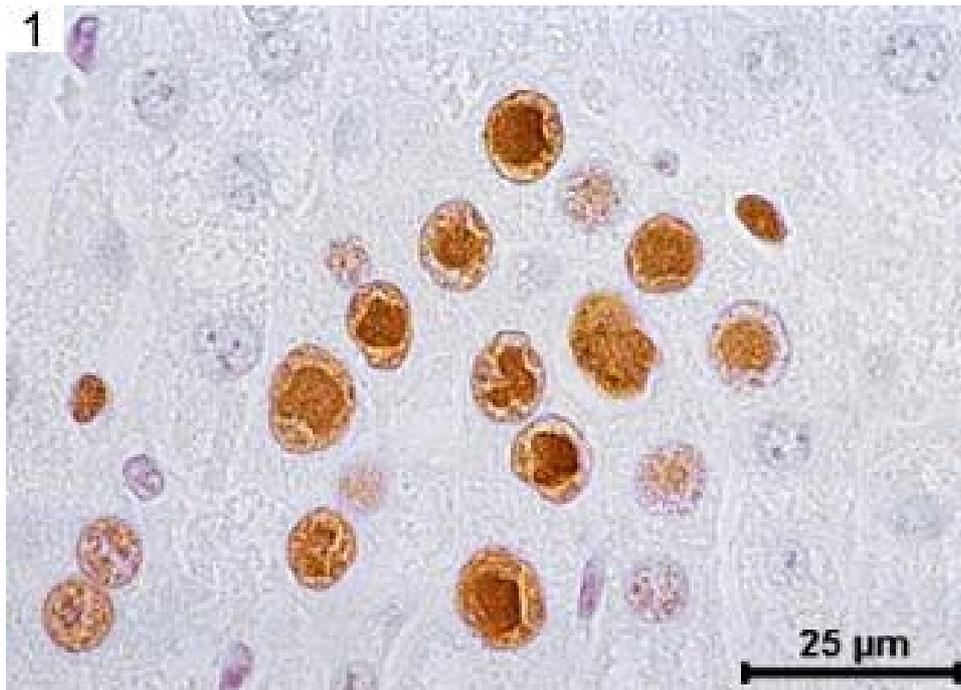
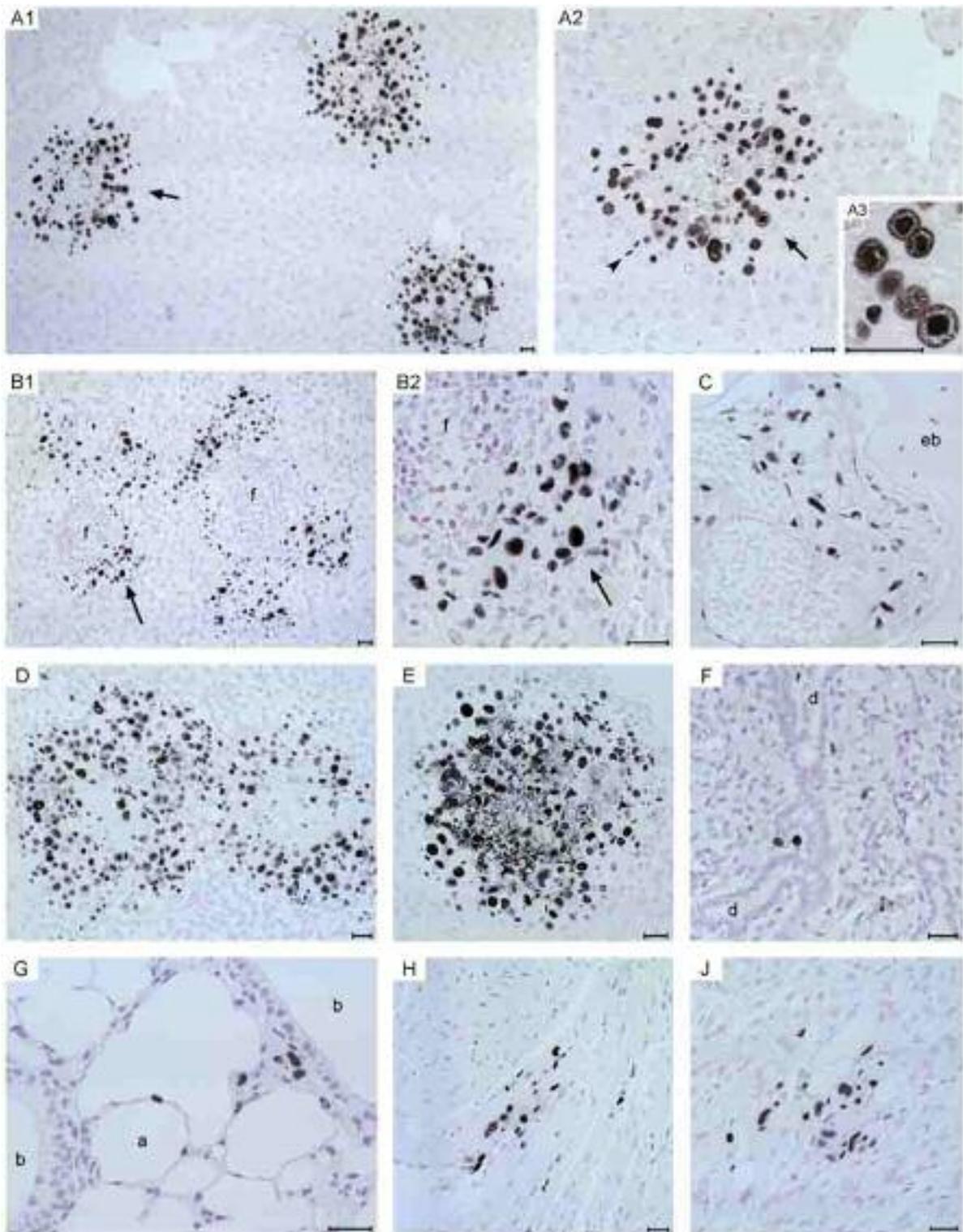


Bild 3: Beispiel für eine immunhistochemische Darstellung von viralem Protein in verschiedenen murinen Organen, ebenfalls mit der ABC-Methode. Die Färbung wurde hier wiederum durch Zugabe von Ammonium-Nickel-Sulfat zum DAB verstärkt, das spezifische Produkt erscheint nun schwarz. Gegengefärbt wurde mit dem blauen Farbstoff Hämatoxylin. Die Tafel wurde der Publikation „In vivo replication of recombinant

murine cytomegalovirus driven by the paralogous major immediate-early promoter-enhancer of human cytomegalovirus“ von Grzimek, N.K.A., Podlech, J., Steffens, H.-P., Holtappels, R., Schmalz, S., Reddehase, M.J.; aus dem Journal of Virology 73: 5043-5055 (1999) entnommen. A1-A3 zeigen die Leber, B1 und B2 die Milz, C das Knochenmark, D das Nebennierenmark, E die Nebennierenrinde, F die submandibuläre Speicheldrüse, G die Lunge, H das Herz und J die Mucosa des Magens. Die Pfeile zeigen auf infizierte Zellen. Die Balken in allen Bildern repräsentieren 25 µm.

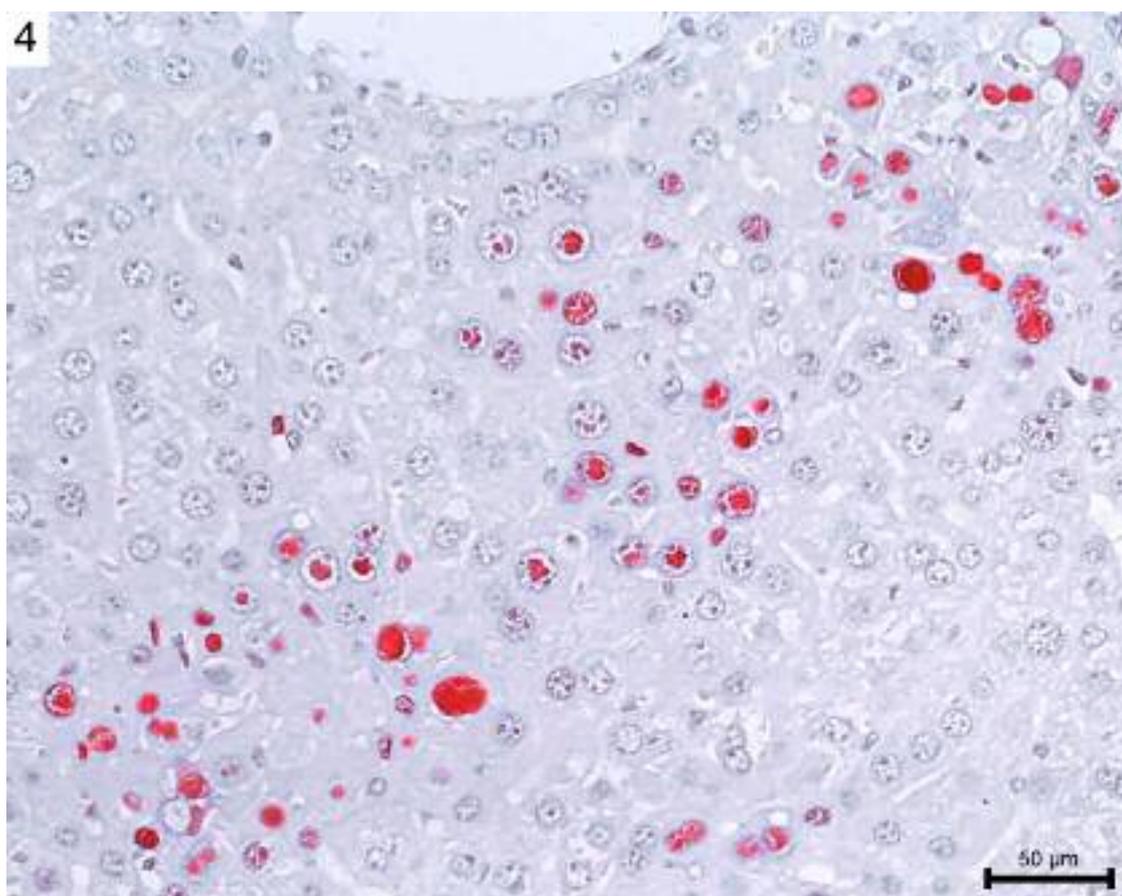


Copyright © American Society for Microbiology, Journal of Virology, Vol. 73, 5043-5055, 1999

5.3 APAAP-Methode

Als eine Alternative zur ABC-Methode steht die APAAP-Technik zur Verfügung. Sie wird gerne in Kombination mit der ABC-Methode in einer Doppelfärbung angewendet. Sie ist etwas weniger sensitiv, erlaubt aber eine intensive rote Anfärbung (Neufuchsin) des gesuchten Antigens. Das rote Reaktionsprodukt ist jedoch nicht vollständig Alkohol und Xylol-stabil. Es sollte daher für die gefärbten Präparate ein Glycerin-haltiges Eindeckmittel verwendet werden. Alternativ zum roten Reaktionsprodukt kann auch ein Substrat (NBT / BCIP) gewählt werden mit dunkelblauem Produkt.

Bild 4: Beispiele für eine immunhistochemische Darstellung von viralem Protein in einem Leberpräparat mit der APAAP-Methode. Zur Färbung wurde Neufuchsin verwendet. Es entsteht ein leuchtend rotes Signal in den Kernen der infizierten Zellen, insbesondere im Einschlusskörper. Die Gegenfärbung wurde mit dem blauen Farbstoff Hämatoxylin durchgeführt.



5.4 Unspezifitäten und Kontrollen

Unspezifische Anfärbungen des Gewebeschnittes können durch eine Reihe von Fehlern an allen möglichen Stellen im Protokoll hervorgerufen werden. So kann ein überlanger Verdauungs- oder Demaskierungsschritt, die mangelnde Blockierung der endogenen Peroxidase oder eine mangelhafte Entparaffinierung zu unspezifischen Anfärbungen führen. Die häufigste Art der unspezifischen Anfärbung jedoch wird durch eine nicht gewollte Bindung eines eingesetzten Antikörpers an Strukturen im Gewebe hervorgerufen. Um die Spezifität der immunhistologischen Färbung zu kontrollieren müssen daher verschiedene Kontrollen durchgeführt werden. Um eine eventuelle Bindung des nach dem Primärantikörper nach geschalteten Nachweissystems zu untersuchen, sollte die gesamte Untersuchung ohne den Primärantikörper durchgeführt werden. Bindet also einer der nachfolgenden Komponenten an Strukturen im Gewebe (in der Regel ist es der Zweitantikörper oder der Brückenantikörper), ohne dass der spezifische Antikörper eingesetzt wurde, so liegt eine unspezifische Bindung vor. Unspezifische Bindungen von Primär oder Sekundär-Antikörpern können mitunter durch eine Inkubation des Schnittes in Trichloressigsäure (Protokoll siehe Kapitel 1.2.8) für 30 min unterdrückt werden. Eine weitere Möglichkeit ist die Vorinkubation der Schnitte in so genannte Normalseren.

Kann man durch seine immunhistochemische Untersuchung eine vermeintlich positive Anfärbung hervorrufen, die nicht durch den Zweitantikörper oder eine andere Komponente des Nachweissystems erklärbar ist, so sollte man die Spezifität des Primärantikörpers belegen. Hierzu kann man den Primärantikörper (insbesondere bei polyklonalen Antikörpern) mit dem Zielantigen prä-absorbieren, das heißt, zum Primärantikörper wird das gesuchte Antigen im Überschuss zugegeben. Der so neutralisierte Antikörper sollte nun im Gewebeschnitt nicht mehr in der Lage sein, an das im Gewebe befindliche Antigen zu binden. Tritt die vermeintlich spezifische Anfärbung jetzt dennoch unverändert auf, so ist eine unspezifische Anfärbung zu vermuten. Eine weitere Kontrolle ist die so genannte Isotypkontrolle, die nur bei monoklonalen primären Antikörpern durchgeführt werden kann. Hier wird der spezifische Antikörper durch einen, nicht spezifischen, gleichen Antikörper (z.B. IgG2a der Maus) ersetzt. Es sollte nun auch hier keine spezifische Anfärbung mehr erfolgen.

6. in situ Hybridisierung

Die in situ Hybridisierung ist zum Nachweis von RNA oder DNA in Gewebeschnitten sowohl am Kryostatschnitt wie auch am Formalin-fixierten Paraffinschnitt geeignet. Allerdings muss die gesuchte Nukleinsäure in einer ausreichenden Kopienzahl vorliegen. Fixierungslösungen, die Pikrinsäure enthalten, sind nicht geeignet, weil Pikrinsäure Nukleinsäure zerstört und damit den Nachweis erheblich stören kann. So stellt die Bouin-Hollande-Fixierung hier nicht die Methode der Wahl dar. Es existieren in situ Hybridisierungs-Protokolle, in denen radioaktiv markierte Sonden (^{32}P , ^{33}P oder ^{35}S mit deutlichen Kontaminationsproblemen) eingesetzt werden. Diese haben den Vorteil einer höheren Sensitivität gegenüber den alternativen Techniken. Jedoch ist die hierfür notwendige, lange Expositionszeit der Schnitte (mehrere Tage bis zu mehreren Wochen) ein schwerwiegender Nachteil. Im Folgenden werden daher nur Methoden beschrieben, die auf nicht-radioaktive Markierungen beruhen. Insbesondere die Marker Digoxigenin und Biotin haben eine weite Verbreitung gefunden. Es wird geschätzt, dass 100 Digoxigeninmoleküle in situ ausreichend sind, um die Basis für ein mikroskopisch sichtbares Signal zu legen (z.B. mit Antikörper gegen Digoxigenin, AP konjugiert). Wird eine lange Sonde verwendet, so sollen mit diesem System bis hinunter zu 10 Kopien pro Zelle sichtbar gemacht werden können. Je länger eine Sonde ist, desto mehr Digoxigenin-Moleküle enthält sie. So würde z.B. eine 100 bp Sonde in etwa 4, oder eine 1000 bp Sonde in etwa 40 Digoxigenin-Moleküle enthalten.

6.1 DNA in situ Hybridisierung

Die Gewebeschnitte werden nach Vorbehandlung mit einer, zur gesuchten Sequenz komplementären Nukleinsäure inkubiert. Dieses, als Sonde bezeichnetes Nukleinsäure-Fragment muss mit einer Markierung (z.B. Fluorescein, Biotin oder Digoxigenin) versehen sein. Neben DNA-Sonden können auch RNA-Sonden erfolgreich eingesetzt werden, da Heterodimere zwischen RNA und DNA entstehen können. Der Gewebeschnitt wird dann für die DNA in situ Hybridisierung einer Behandlung ausgesetzt, die in der Lage ist die Doppelstränge aufzubrechen (z.B. Hitzedenaturierung bei über 90°C). Hiermit wird eine Spaltung der DNA-Doppelstränge sowohl der DNA des Gewebeschnittes, als auch der DNA-Sonde bewirkt. Ohne diesen Denaturierungsschritt können nur Hybridisierungen zwischen einsträngigen RNA-Sonden und komplementären einsträngigen RNA-Zielsequenzen entstehen, was dann einer RNA in situ Hybridisierung entspräche. RNA-

Moleküle zeigen häufig intramolekulare Tertiärstrukturen, die nur durch diese Hitzebehandlung gelöst werden können, so dass eine Hitzedenaturierung auch für RNA-Sonden sinnvoll sein kann. Eine nachfolgende Inkubation bei einer deutlich tieferen Temperatur (20°C bis 50°C) erlaubt den getrennten homologen Strängen wieder zu hybridisieren, also sich wieder zu einem Doppelstrang zusammen zu legen (Berechnung der Hybridisierungstemperatur, siehe Kapitel 5.3). Hierbei kommt es auch zu den gewünschten Heterodimeren zwischen Sonden-DNA und gesuchter Ziel-DNA. Die Markierung an der Sonden-DNA ist damit im Gewebeschnitt durch diese Heterodimerisierung verankert. Geeignete Detektionssysteme, wie z.B. ein Fluoreszenz-Mikroskop falls man eine Fluoreszein-markierte Sonde verwendet hat, zeigen die positiven Zellen.

Bild 5: DNA-ISH mit einer Digoxigenin-markierten DNA-Sonde in einem murinen Leberschnitt. Die infizierten Leberzellen zeigen ein deutliches leuchtend rotes Signal ausschließlich im Kerneinschlusskörper. Zum Nachweis wurde ein mit Alkalischer Phosphatase konjugierter anti-Digoxigenin Antikörper und Neufuchsin als Substrat verwendet.

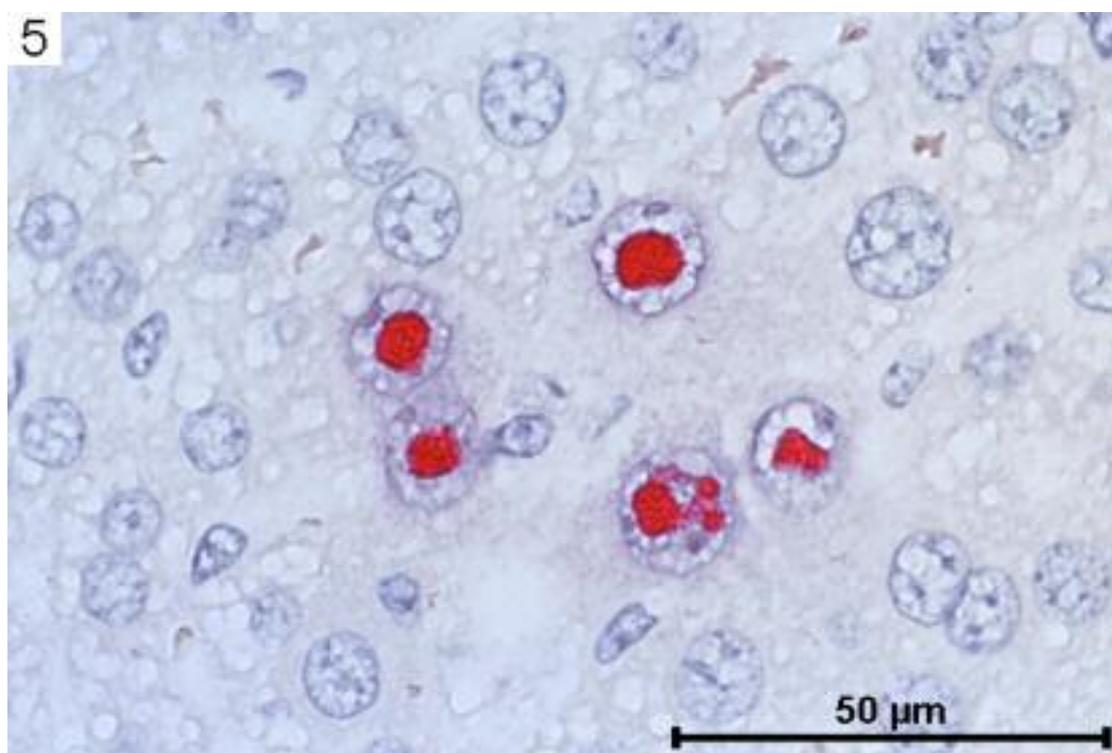


Bild 6: Doppel-DNA-ISH. Die Aufnahmen zeigen Serienschnitte eines mit 2 Zytomegalie-Viren infizierten Lebergewebes. Die virale DNA eines Virus wurde hier mit einer Digoxigenin-markierten DNA-Sonde, mit Peroxidase-konjugierten anti-Digoxigenin-Antikörpern und Nickel-DAB als Substrat (schwarzes Signal); die andere virale DNA mit einer Fluoreszein-markierten DNA-Sonde, mit Alkalischer Phosphatase-konjugierten anti-Fluoreszein-Antikörpern und Neufuchsin als Substrat (rote Färbung) nachgewiesen. Teilbild A zeigt den Einsatz nur einer der beiden Sonden. Es färben sich nur die nukleären Einschlusskörperchen der mit diesem Virus infizierten Zellen an. Teilbild B zeigt den Einsatz der anderen Sonde. Hier färben sich nur die Kerneinschlüsse der durch das andere Virus infizierten Zellen an. Es gibt keine Zellen, die mit beiden Viren infiziert sind. Teilbild C zeigt den Einsatz beider Sonden zusammen in einem Hybridisierungsansatz. Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Die Pfeile zeigen auf infizierte Zellkerne. Der Balken repräsentiert 50 µm.

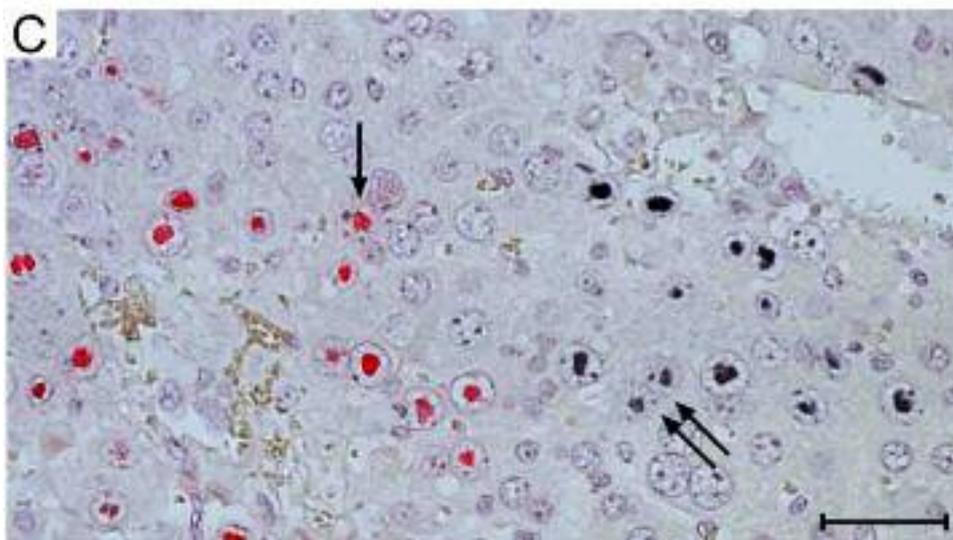
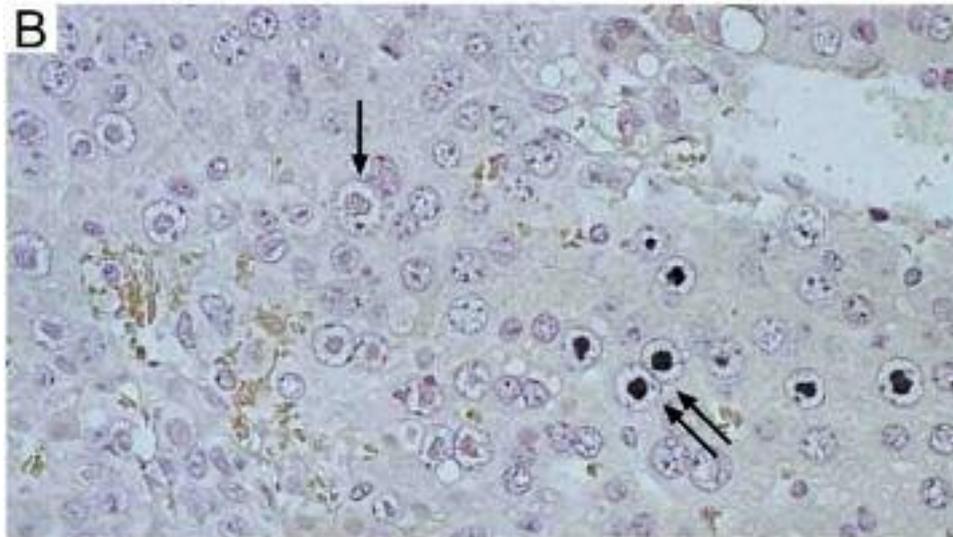
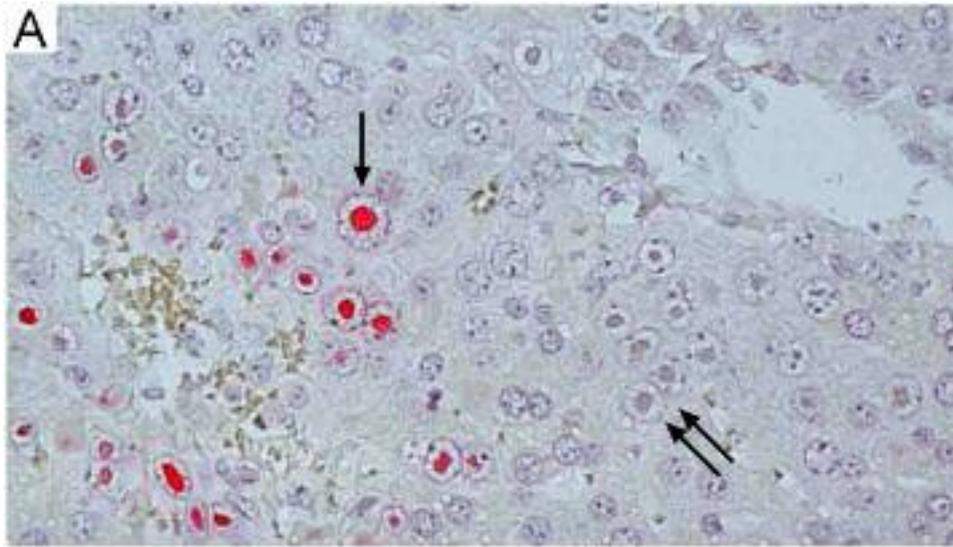
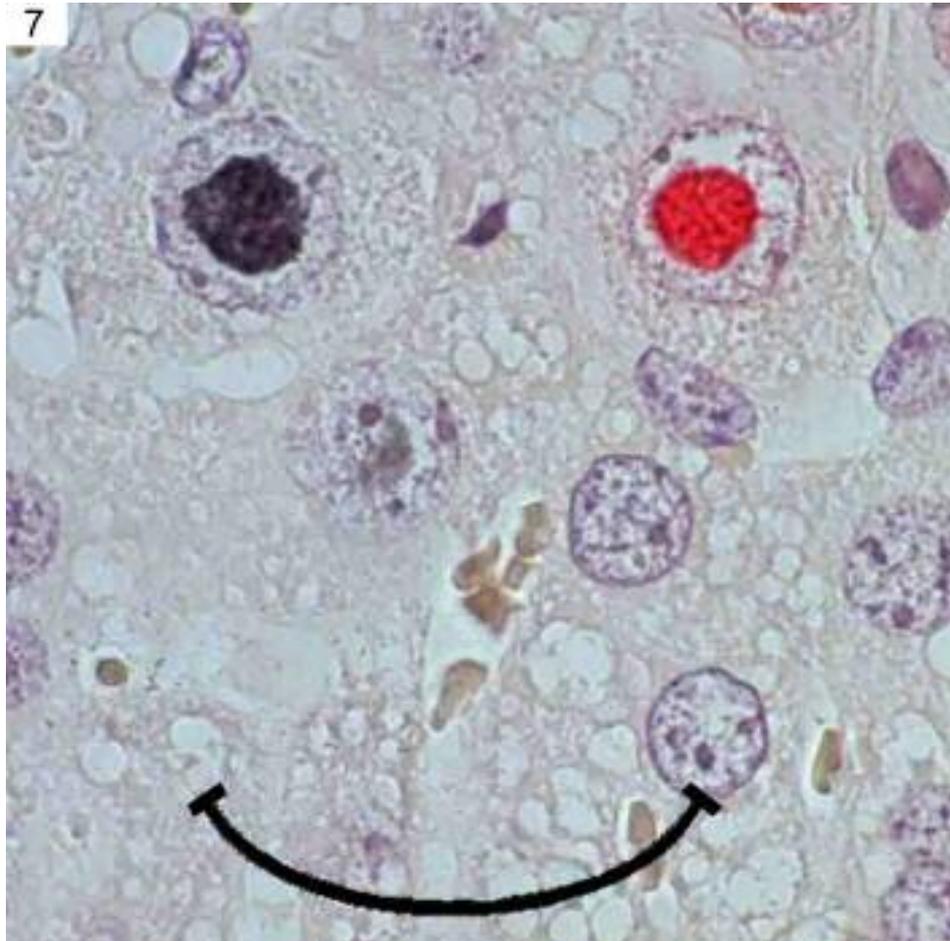


Bild 7: Doppel-DNA-ISH. Die Detailaufnahme zeigt zwei räumlich sehr nahe Leberzellen, die mit zwei verschiedenen Zytomegalie-Viren infiziert wurden. Virale DNA eines Virus wurde auch hier mit der Digoxigenin-markierten DNA-Sonde nachgewiesen, die andere virale DNA mit einer Fluoreszein-markierten DNA-Sonde, wie im Bild 6. Der Balken repräsentiert 50 μm .



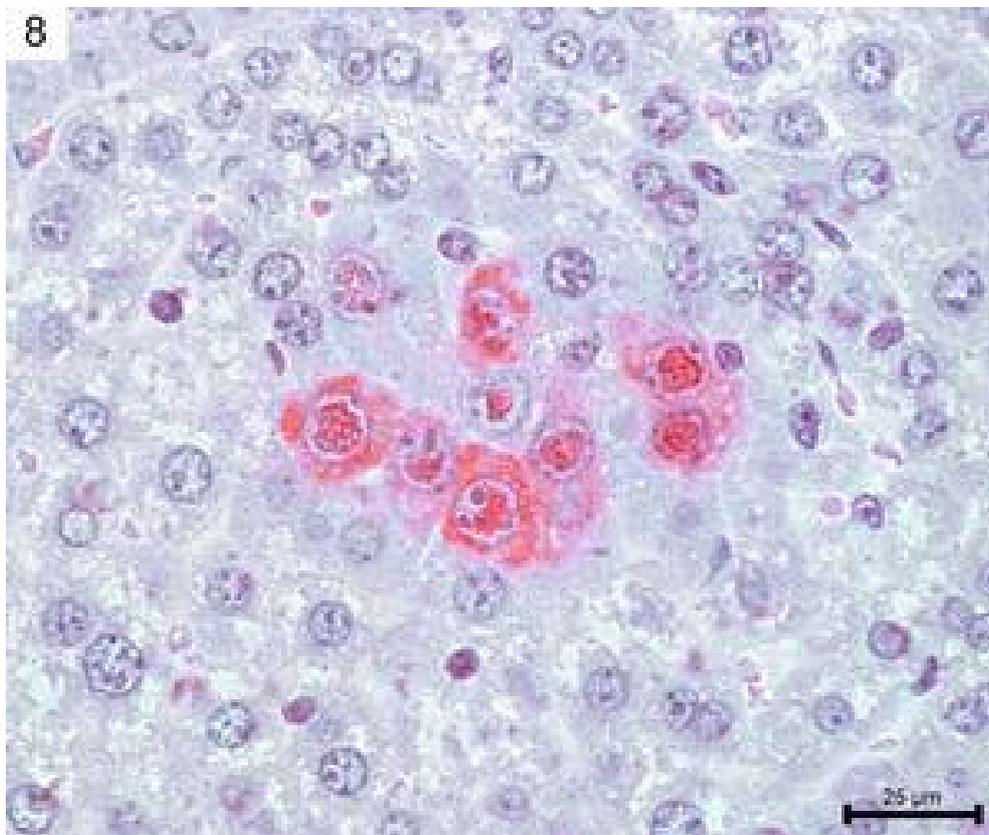
Copyright © Nature Publishing Group, Nature Reviews Immunology, Vol. 2, 831-844, 2002

6.2 RNA in situ Hybridisierung

Auch der Nachweis von RNA in situ ist möglich, jedoch mit deutlich größeren Schwierigkeiten verbunden. Die Instabilität der RNA im Gewebe scheint hierbei das größte Problem zu sein. Die Kryostat-Histologie oder die Formalin-Fixierung und Paraffin-Einbettung sind auch hier die üblichen Gewebepreparationsverfahren. Die Vorgehensweise ist der DNA in situ Hybridisierung sehr ähnlich, jedoch bedarf es üblicherweise keinem Hitzeschritt bei 90°C bis 95°C, weil die Sonden-RNA und die Ziel-RNA im Gewebe überwiegend bereits einzelsträngig vorliegen. Es kann sein, dass starke intramolekulare

Sekundärstrukturen der RNA gelöst werden müssen, um die Bindung der komplementären Sonden-RNA an die Ziel-RNA im Gewebe zu ermöglichen. Dies kann gegebenenfalls doch eine Inkubation bei einer höheren Temperatur erforderlich machen.

Bild 8: Mit der RNA-ISH kann virale RNA in situ im Lebergewebe nachgewiesen werden. Die Digoxigenin-markierte RNA-Sonde wurde mit Alkalischer Phosphatase-konjugierte anti-Digoxigenin-Antikörper und dem Substrat Neufuchsin nachgewiesen. Das spezifische Produkt ist leuchtend rot. Es zeigt sich sowohl im Zytoplasma als auch im Kern der infizierten Zelle ein deutliches Signal. Gegenfärbung Hämatoxylin.



6.3 Sonden

Sowohl für die RNA- als auch für die DNA-in situ Hybridisierung können wahlweise DNA-Sonden oder RNA-Sonden verwendet werden. Man muss also nicht für eine DNA-in situ Hybridisierung eine DNA-Sonde verwenden, sondern kann auch eine geeignete RNA-Sonde konstruieren. Dies trifft ebenso für die RNA-in situ Hybridisierung zu, wo auch DNA-Sonden zum Einsatz kommen können, die dann vorher jedoch separat Hitze-denaturiert werden müssen. Sonden sind von sehr unterschiedlicher Größe. So können

mit DNA-Fragmenten von 20 Basen bis zu 100.000 Basenpaare, in Abhängigkeit von der Menge der gesuchten Ziel-Nukleinsäure im Schnitt, gute Ergebnisse erzielt werden. RNA-Sonden sollten zwischen 200 - 2000 Basen groß sein. Die gewählte Sonde muss markiert sein, um die erfolgreiche Hybridisierung im Mikroskop zu erkennen. Markierungen sind z.B. fluoreszierende Moleküle (Fluoreszein, Rhodamin, etc.), die nach Beleuchtung mit einem kurzwelligigen Licht (Quecksilberdampflampe) langwelliges Licht (Fluoreszenzlicht) emittieren. Dies kann mit einem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden. Weitere Markierungen sind Biotin oder Digoxigenin. Hier können in einem weiteren Schritt nach der Hybridisierung Antikörper, die gegen diese Marker gerichtet sind verwendet werden. Diese Antikörper sind dann selbst meist mit einem Enzym (Alkalische Phosphatase, Peroxidase) gekoppelt. Der Nachweis erfolgt dann wie bei der Immunhistologie, mittels eines löslichen, farblosen Substrates, welches durch die Aktivität des Enzyms zu einem farbigen Niederschlag reagiert. Die DNA-Sonde selbst kann am einfachsten durch eine PCR amplifiziert werden. Hat man geeignete Primer gewählt und die gesuchte Ziel-DNA isoliert und gereinigt vorliegen, kann man hiervon ausgehend in einem PCR-Ansatz sowohl die Sonde herstellen, als auch gleichzeitig die jeweilig gewünschte Markierung in die Sonde einbringen. Die in situ Hybridisierung besteht aus 2 Teilschritten. Der erste Schritt ist die Denaturierung bei einer sehr hohen Temperatur (z.B. 93°C). Diesen Schritt wird man für die verschiedensten Sonden, die man einsetzt relativ konstant halten. Der zweite Schritt, die Hybridisierung kann dagegen von Sonde zu Sonde etwas variieren. Man kann hierfür orientierend den Schmelzpunkt (T_m) von größeren DNA-Fragmenten (> 1000 bp) anhand einer Annäherung bestimmen und erhält somit einen Anhaltspunkt, bei welcher Temperatur der Hybridisierungsschritt durchgeführt werden sollte. Die angestrebte Hybridisierungstemperatur sollte etwa 25°C unter dieser berechneten Schmelztemperatur (T_m) liegen.

$$T_m = 0,41(\text{GC}\%) + 16,6\log M - 500/n - 0,61(\%\text{ Formamid}) + 81,5$$

entspricht dem %-Anteil

des Formamids im Puffer

n = entspricht der Anzahl
der Basenpaare der Sonde

M = entspricht der Molarität mono-
valenter Kationen im Puffer (Na⁺)

GC% = entspricht dem Anteil von
Guanosin und Cytosin in der Sonde

Als Beispiel für die Berechnung der Schmelztemperatur einer Sonde mit dieser Annäherung sei eine 1546 bp lange DNA-Sonde bestehend aus 47% Guanosin und Cytosin genannt, die in einem Hybridisierungspuffer aus 50% Formamid und 4 fach SSC und einer daraus berechneten Molarität des Na⁺ von 0,78 (20 fach SSC: entspricht 3,9 molar; $3,9/5 = 0,78$) aufgenommen wurde. Die Berechnung würde eine Schmelztemperatur von

$$\begin{aligned} T_m &= 19,27 - 1,79 - 0,323 - 30,5 + 81,5 \\ &= 68,2^\circ\text{C} \text{ ergeben.} \end{aligned}$$

Würde auf das Formamid verzichtet, betrüge $T_m = 98,6^\circ\text{C}$.

Eine einfachere Formel findet sich im Boehringer Mannheim Manual, Seite 29 (Referenz: Kapitel 9.3.2) für Na⁺ Konzentrationen über 0,4 molar.

7. Abkürzungen

ABC avidin-biotin-peroxidase-complex
(Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex)

AP	alkalische Phosphatase
BSA-TBS	1% bovines Serum Albumin in Tris-gepuffertes Kochsalzlösung
Bp	base pairs (Basenpaare)
DAB	3'3'-Diaminobenzidin
DNA	desoxyribo nucleic acid (Desoxyribo-Nukleinsäure)
EDTA	Ethylen Diamin Tetra Acetat
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
IH	Immunhistologie oder Immunhistochemie
ISH	in situ Hybridisierung
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphat gepufferte Kochsalzlösung)
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase Ketten Reaktion)
PLP	Paraformaldehyd-Lysin-Perjodat Fixativ
POD	Peroxidase
RT	Raumtemperatur
TBS	Tris buffered saline (Tris gepufferte Kochsalzlösung)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

8. Puffer und Lösungen

Die einzelnen Puffer und Lösungen, die benötigt werden, sind in den jeweiligen Kapiteln beschrieben. In diesem Kapitel sind Rezepte für die häufig benutzten, allgemeinen Laborpuffer zusammen getragen.

PBS (1 fach)	8 g	NaCl
	0,2 g	KCl
	1,3 g	Na ₂ HPO ₄
	0,2 g	KH ₂ PO ₄
	add 1 l	aqua dest.;
		pH = 7,4 einstellen
SSC (20 fach)	175,32 g	NaCl (3 M)
	88,23 g	Tri-Na-Citrat-di-Hydrat (0,3M)
	ad 1 l	aqua dest.;
		pH = 6,3 einstellen
TBS (1 fach)	12,1 g	Tris-HCl (0,1 M)
	8,8 g	NaCl (0,15 M)
	ad 1 l	aqua dest.;
		pH = 7,4 einstellen
BSA-TBS (10 fach)	10 g	Bovines Serum Albumin (BSA; Sigma Nr. A 7906)
	ad 100 ml	TBS, ergibt eine 10% Stammlösung (Lagerung bei -20°C)

Die Stammlösung kann mit TBS 1:10 weiter verdünnt werden. Hieraus resultiert dann die 1% Gebrauchslösung (Lagerung bei -20°C)

AP-Puffer (1 fach)	7,9 g	Tris-HCl (0,1 M)
	2,9 g	NaCl (0,1 M)
	5,1 g	MgCl ₂ (0,05 M)
	ad 500 ml	aqua dest.;
		pH = 9,5 einstellen
Citrat-Puffer	2,94 g	Tri-Na-Citrat-Dihydrat (10 mM)
	ad 1 l	aqua dest.;
		pH = 6,0 einstellen

9. Literatur

Nachfolgend ist eine Auswahl von Büchern und von Firmen-Broschüren zusammengestellt, die für die vorgestellten Methoden eine brauchbare Quelle weiterer Information darstellen.

9.1 Histologische Basis

1. Romeis, Mikroskopische Technik; Hrsg. P. Böck; Urban und Schwarzenberg; München, Wien, Baltimore; 17. Auflage; 1989 (ISBN: 3-541-11227-1)
2. Histologische Technik; Burck, H.-C.; Georg Thieme Verlag; Stuttgart, New York; 6. Auflage; 1988

9.2 Immunhistologie

1. Handbuch I der Immunperoxidase Färbemethoden; J.A. Bourne; Firma Dako Diagnostika GmbH; Hamburg; 1983 (Tel.: 040-696947-0)

2. Handbuch II immunchemischer Färbemethoden; Hrsg.: S.J.Naish; Firma Dako Diagnostika GmbH; Hamburg; 1989 (Tel.: 040-696947-0)

3. Paraffin Topics; Handbuch; Firma dianova; Februar 1997 (Tel.: 040-450670)

9.3 in situ Hybridisierung

1. In situ-Hybridisierung; A.R. Leitch; T. Schwarzacher; D. Jackson; I.J. Leitch; Spectrum Akademischer Verlag; Heidelberg; Focus-Reihe; Heidelberg; Berlin; Oxford; 1994 (ISBN 3-86025-225-9)

2. Nonradioactive in situ Hybridization - Application Manual; Boehringer Mannheim GmbH; Biochemica; 2. Auflage; 1996 (Tel.: 0621-7598545)

3. In situ Hybridization and Immunohistochemistry; Current protocols in molecular Biology; John Wiley & Sons, Inc.; Volume 2, Chapter 14

4. In situ Hybridization: A practical Approach; Hrsg.: D.G. Wilkinson; IRL Press; Oxford; U.K.; 1992

5. In situ Hybridization - Principles and Practise; Hrsg.: J.M. Polak; J.O' D. McGee; Oxford University Press; Oxford; New York; Tokyo; 1990