

Der **ADHÄSIONSOBJEKTTRÄGER** nach DR. BROSS

Anleitung für die

Immunperoxidase (PAP) - Objektträger - Methode und
die Alkalische-Phosphatase-anti-Alkalische-Phosphatase (APAAP) - Methode



Inhaltsverzeichnis

	Seite	
Eigenschaften des Adhäsionsobjektträgers	1	
Vorteile des Adhäsionsobjektträgers	1	
Anwendungsmöglichkeiten	2	
Vorbereitung des Adhäsionsobjektträgers	2	
PAP-Objektträgertest	3	
I. Zellisolierung, Latexphagozytose	4	
II. Zellverankerung auf den Reaktionsfeldern	5	
III. Fixierung	5	
IV. Präinkubation	6	
V. Inkubation mit Antiseren	6	
VI. Inkubation mit Diaminobenzidin	7	
VII. Nachfixierung mit Osmium	7	
VIII. Eindecken des Objektträgers	7	
IX. Kontrollen	8	
X. Mikroskopische Auswertung	8	
Zellaufbereitung aus verschiedenen Körperflüssigkeiten	9	
Fehlerquellen	12	
 Anhang		
1. Material und Ausstattung	A.1	
2. Lösungen	A.2	
3. Tabelle der handelsüblichen Primärantikörper	A.4	
4. Zentrifugationsnomogramm	A.10	
5. Basisprogramme für die klinische Diagnostik	A.11	
6. Literaturhinweise	A.15	
7. Anleitung für den PAP-Objektträgertest unter Verwendung des Universal-DAKO Maus-PAP-Kit™ K550	A.17	
8. Anleitung für den APAAP-Objektträgertest unter Verwendung des Universal-DAKO-APAAP-Kit™ K670	A.23	

Eigenschaften des Adhäsionsobjektträgers

Der Adhäsionsobjektträger nach Dr. Bross eröffnet neue Möglichkeiten, Untersuchungen an Einzelzellen durchzuführen.

Auf 12 abgegrenzten Reaktionsfeldern werden lebende Zellen an einer speziell präparierten Glasoberfläche dauerhaft verankert. Die fest haftenden Zellen können mit verschiedenen Methoden weiter untersucht werden.

Der Adhäsionsobjektträger (Abb. 1) besitzt 2 Funktionseinheiten:

- a) die Reaktionsfelder (RF)
auf deren Glasoberfläche die Zellen verankert werden.
- b) die hydrophobe Beschichtung
der übrigen Glasoberfläche, welche die Reaktionsfelder begrenzt und mühelos eine separate Bearbeitung von 12 gut voneinander getrennten Feldern ermöglicht

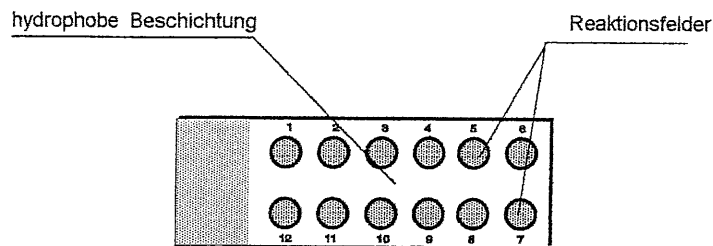


Abb 1: Funktionseinheiten des Adhäsionsobjektträgers

Vorteile des Adhäsionsobjektträgers

Im Vergleich zu Methoden, die Zellen in Suspensionen, Ausstrichen oder nach Zytozentrifugation verwenden, ist der Adhäsionsobjektträger nach Dr. Bross :

1. **platzsparend**
Auf einem Objektträger können 12 Untersuchungen separat auf den abgegrenzten Reaktionsfeldern durchgeführt werden.
2. **materialsparend**
Für Untersuchungen auf dem Reaktionsfeld wird eine geringe Zellzahl benötigt. Dementsprechend gering ist die Menge der benötigten Reagenzien (maximal 20 µl).
3. **zeitsparend**
Inkubationen und Waschungen erfolgen auf dem Objektträger. Dadurch entfallen zeitaufwendige Zentrifugationen und Zellverluste werden vermieden.
4. **vielseitig einsetzbar**
Die verankerten Zellen können, je nach Untersuchungsziel, auf verschiedene Weise weiter verarbeitet werden:
 - a) direkt als lebende Zellen
 - b) fixiert, z.B. mit Glutaraldehyd für die Untersuchung von Oberflächenstrukturen und Antigenen
 - c) getrocknet und fixiert für intrazellulären Antigennachweis
Zellmorphologie, Immunzytochemie

Die Verwendung von Adhäsionsobjektträgern ist somit rationell und kostensparend.

Anwendungsmöglichkeiten des Adhäsionsobjektträgers

Mit Hilfe dieses Objektträgers können verschiedene **Techniken** durchgeführt werden:

- a) Immunperoxidase - P A P - Test
- b) Immunfluoreszenz-Methode oder andere vergleichbare Zelloberflächenmarkierungen
- c) Anfärben der Zellen nach Pappenheim (Morphologie)
- d) Intrazellulärer Antigen-Nachweis
- e) Immunzytochemische Untersuchungen

Für c), d), e) werden die Reaktionsfelder nach Anheftung der Zellen unter dem **kalten** Föhn trockengesaugt, um sie rasch zu trocknen!

Trocknungsmedium: NKH - 0,2% BSA (9) oder Plasmasteril (Hydroxyäthylstärke)

In dieser Anleitung wird auf den Nachweis von Zelloberflächenantigenen eingegangen und der Immunperoxidase (PAP)-Objektträgergestest beschrieben.

Der Nachweis von Zell-Oberflächenantigenen ist bei folgenden **Diagnosen** angezeigt:

- a) Immundefekten (T4/T8 Quotient)
- b) Non-Hodgkin-Lymphomen (Monoklonalität, Zuordnung zu B- oder T-Zelllinien)
- c) akute und chronische Leukämien
- d) Autoimmunerkrankungen
- e) Morbus Hodgkin
- f) Carcinomen

Das einfache Prinzip des Objektträgers erleichtert das Aufbringen und Typisieren von **Zellen aus den verschiedenen Körperflüssigkeiten:**

- a) peripherem Blut
- b) Knochenmark
- c) Liquor
- d) Lymphknotenaspirat
- e) Lymphknoten- oder Tumorbiopsie
- f) Ergüssen - wie Pleura, Ascites, Pericard
- g) Bronchoalveolären Lavagen
- h) Kulturzellen

Die Vorbereitung des Adhäsionsobjektträgers

Die grüne Farbe der Reaktionsfelder (RF) wird zuerst unter Leitungswasser gelöst und abgespült und dann mit isotonischem Puffer (NKH) **rückstandsfrei**.

Auf den RF verbleibt ein unsichtbarer Film, dessen positive Ladung eine elektrostatische Haftung der negativ geladenen Zellen bewirkt. Aus diesem Grund dürfen die RF weder mit der Pipettenspitze verkratzt werden noch darf man sie austrocknen lassen.

Um ein Austrocknen der zwölf RF zu vermeiden, arbeitet man in der **feuchten Kammer**.

Die elektrostatische Haftung der Zellen auf dem Objektträger ist so stabil, daß man die RF ohne Gefahr eines Zellverlustes in der Küvette oder vorsichtig mit der Spritzflasche waschen kann.

Eine sichtbare Zellhaftung ist gewährleistet:

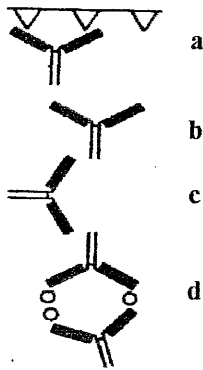
- wenn die Zellen **vital**, also nicht geschädigt sind,
- wenn die Auftragung der gewaschenen Zellen in **proteinfreiem** physiologischem Puffer erfolgt.

Die hydrophobe Beschichtung des Adhäsionsobjektträgers rund um die Reaktionsfelder verhindert eine Vermischung der Lösungen zwischen den einzelnen Reaktionsfeldern, obwohl der Objektträger nach fast jedem Arbeitsschritt auf dem Vortex-Mixer oder SUPERIOR-Mikro-Mischer geschüttelt wird.

Der P A P - Objektträger - Test

Peroxidase - Antiperoxidase - Methode, nach Sternberger

Der P A P - Test ermöglicht den Nachweis von Zelloberflächenantigenen zur Identifizierung und Charakterisierung von Zellen.



1. Zellisolierung
2. Zellverankerung auf den Reaktionsfeldern
3. Fixierung
4. Präinkubation
5. Inkubation mit Antiseren
 - a. monoklonaler Antikörper (Maus)
 - b. Kaninchen anti Maus Immunglobulin
 - c. Schwein anti Kaninchen Immunglobulin
 - d. Peroxidase-Antiperoxidase (PAP) (vom Kaninchen)
6. Färbung mit Diaminobenzidin (DAB)
7. Fixierung mit OsO_4
8. Eindeckung
9. Lichtmikroskopische Auswertung

Alle Arbeitsschritte werden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Um Temperaturschocks zu vermeiden, werden vor Arbeitsbeginn alle gekühlten Lösungen auf Raumtemperatur erwärmt.

Die Objektträger werden in einer feuchten Kammer aufbewahrt.

I. Zellisolierung

Zellisolierung aus dem peripheren Blut.

Benötigt werden:

- 10 ml EDTA Blut,
- Leukozytenzahl,
- Differentialblutbild.

A. Direkte Ficoll-Hypaque-Methode für die T4/T8 Bestimmung

In 10 ml Zentrifugenröhrchen werden

- 1) 3 ml Blut mit
3 ml NKH-Puffer (1) verdünnt und mit
3 ml Ficoll-Hypaque unterschichtet. (Abb. 3)

- 2) Zentrifugation: **ohne Bremse**

	2 Min. - 400 g
hochschalten	5 Min. - 1.500 g

- 3) Abpipettieren der **Interphase** (Abb.2) (mononukleäre Zellen) in 2 ml - Eppendorf-Gefäße

- 4) 1 x waschen mit NKH - 0,2 % BSA (9)
Zentrifugation 2 Min. - 400 g
(Latexphagozytose, siehe nächste Seite)

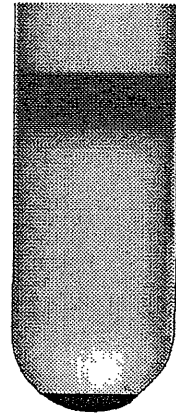


Abb. 2: Interphase nach Ficoll-Hypaque Dichtezentrifugation im 10 ml Zentrifugenröhrchen

B. Zellpräparation für Lymphome und Leukosen

- 1) Das EDTA-Blut absetzen lassen.
- 2) Überstehendes Plasma mit Leukozyten und Thrombozyten abheben und zentrifugieren: 2 Min. - 400 g.
- 3) Ausstrich des Zellkonzentrats (Morphologie)
- 4) 1 x waschen mit NKH - 0,2% BSA (9) in 2 ml Eppendorfröhrchen
Zentrifugation 2 Min. - 400 g

Ficoll-Hypaque-Zentrifugation

- 5) 1 ml Zellsuspension in NKH - 0,2% BSA (Abb. 3)
1 ml Ficoll unterschichten (Spritze)
- 6) Zentrifugation: **ohne Bremse**
2 Min.- 400 g
hochschalten 5 Min.- 1.500 g
- 7) Abpipettieren der **Interphase** (mononukleäre Zellen) in 2 ml - Eppendorf-Gefäße.
- 8) 1 x waschen mit NKH-0,2% BSA (9)
- 9) 1 x waschen mit NKH-Puffer
(bzw. Latexphagozytose, siehe nächste Seite)

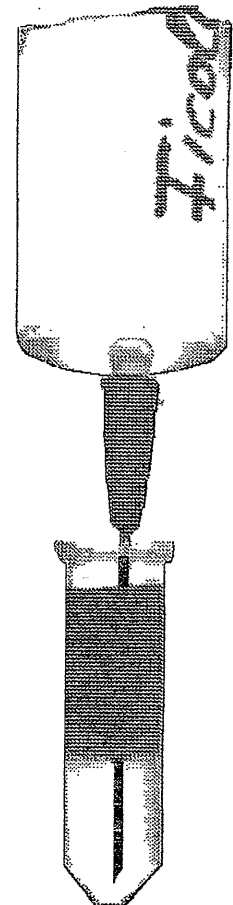


Abb. 3: Ficollunterschichtung 2 ml Eppendorfröhrchen

Latex Phagozytose

Sie dient zur Identifizierung von Monozyten, sie ist hilfreich für die Auswertung bei höherem Monozytenanteil.

Vorinkubation der Latex beads:

- 1) 1 ml Kulturmedium (RPMI oder MEM)
50 µl 22% BSA
5 µl Latex beads
Inkubation 15 Min. im 37°C Wasserbad
- 2) Latexsuspension auf das Zellsediment geben, gut mischen, bei 37°C 30 Min. inkubieren.

3 x waschen mit NKH-Puffer wie Punkt I,4

II. Zellverankerung auf den RF des Objektträgers

- 1) Zellen in NKH-Puffer aufnehmen: in ca. 0,5 ml bei normaler Leukozytenzahl und normalem Lymphozytenanteil im peripheren Blut oder:
Einstellen der Zellzahl auf $5 \times 10^3/\mu\text{l}$ nach Zellzählung in einer Neubauer-Kammer
- 2) Aufbringen der Zellen, 10 µl auf jedes Reaktionsfeld des vorbereiteten Objektträgers.
- 3) Kontrolle der Zelldichte unter dem Mikroskop
(wenn vorhanden Umkehrmikroskop) (Abb. 4)
- 4) Vorsichtiges Abwaschen der nichthaftenden Zellen mit NKH-Puffer nach ca. 5 Min.
mit der Spritzflasche
- 5) Abklopfen des überflüssigen Puffers.

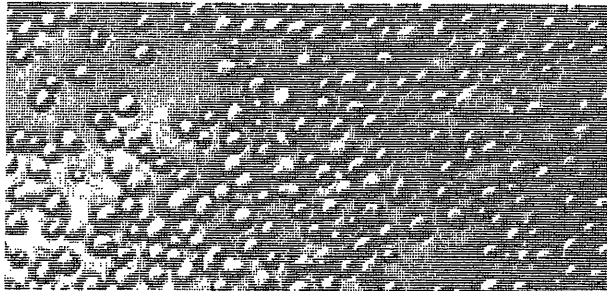


Abb. 4: Zellen im Inversionsmikroskop gesehen

III. Fixierung

Durch die Fixierung wird erreicht:

- a) gute Konservierung der Zelloberflächenstruktur
 - b) verbesserte Haftung der Zellen
 - c) Blockierung von Fc-Rezeptoren der Zellmembran
 - d) Haltbarkeit über mehrere Tage bei 4°C in einer feuchten Kammer.
- 1) Auftropfen der Fixierlösung 1 (6) auf jedes RF
Inkubation: 5 Min.
 - 2) Abspritzen der Fixierlösung 1 mit NKH-Puffer (Spritzflasche)
 - 3) Abklopfen wie unter II, 5)

IV. Präinkubation

Zur Blockierung unspezifischer Proteinbindungen an der Glasoberfläche und an den Zellen.

- 1) Auftropfen des NAG-Mediums (2) (Abb. 5)
- 2) Schütteln auf dem Vortexmixer, ca. 15 Sek. (Abb. 6)
- 3) Inkubation mindestens 15-30 Min. auf Taumelgerät oder im Kühlschrank über Nacht

V. Inkubation mit Antiseren

Schritt 1: Monoklonaler Antikörper (Moab)

Der Hersteller empfiehlt die Konzentration des Moabs oder sie wird durch Austestung (verschiedene Verdünnungen) ermittelt. Man verdünnt die Seren in NAG-Medium (2) und bewahrt sie in Mikrodel Tropffläschchen bei 4°C auf (ca. 4 Wochen haltbar).

- 1) Absaugen und auftropfen auf jedes RF (Abb. 7)
- 2) Schütteln, bis zu 30 Min. inkubieren auf dem Taumelgerät
- 3) Abspülen mit NKH-Puffer (Spritzflasche)
- 4) in 2 Küvetten mit NKH-Puffer den Objektträger ca. 10 x eintauchen
- 5) Abklopfen wie unter II, 5.

Schritt 2: Kaninchen anti Mausimmunglobulin (KaM)

mindestens 1 Nacht vor dem Test bei 4°C absorbieren:
Stammlösung 1:50 (17a) (bis 4 Wochen haltbar bei 4°C),
Testverdünnung 1:500 in NAG

- 1) KaM auftropfen
- 2) Schütteln, Inkubation 5 Min. - Taumler
- 3) Abspülen, s.o.

Schritt 3: Schwein anti Kaninchenimmunglobulin (SaK)

mindestens 1 Nacht vor dem Test absorbieren:
Stammlösung (17b) (ca. 1 Woche haltbar bei 4°C),
Testverdünnung 1:20 in NAG

- 1) SaK auftropfen
- 2) Schütteln, Inkubation 5 Min. - Taumler
- 3) Abspülen, s.o.

Schritt 4: Peroxidase-Antiperoxidase (PAP)

täglich frisch ansetzen (17c), Testverdünnung 1:20 in NAG

- 1) PAP auftropfen
- 2) Schütteln, Inkubation 5 Min. - Taumler
- 3) Abspülen, s.o.

Hier kann Schritt 3 und 4 wiederholt werden,
falls eineverstarkte Reaktion erwünscht ist.

Die Seren KaM, SaK, PaP sollten vor Gebrauch scharf abzentrifugiert werden.
Die Inkubation mit Moab kann auch über Nacht bei 4°C erfolgen.

VI. Inkubation mit 3'3-Diaminobenzidinhydrochlorid (DAB)

DAB vor Gebrauch scharf abzentrifugieren.
Die Gebrauchslösung ist im Dunkeln bei 4°C nur 1 Tag haltbar.

- 1) Auftropfen der DAB-Gebrauchslösung (16b)
- 2) Schütteln, Inkubation 10 Min., unter dem Abzug!
- 3) Abspülen s.o.
- 4) Waschen in einer Küvette mit Puffer, 5 Min. (Abb. 8)

VII. Nachfixierung mit Osmium (OsO₄)

- 1) Auftropfen von 10 µl OsO₄ pro RF (Fixierlösung 2) (8) unter dem Abzug
- 2) Inkubation auf Eis, 10 Min. oder länger.
- 3) Abspülen mit aqua dest.
- 4) Abklopfen

Wegen der starken Schwarzungeigenschaft von Osmium und seiner Verdampfung muß OsO₄ in dicht verschlossenen Fläschchen dunkel bei 4°C aufbewahrt werden. Für den Gebrauch sind Einmalpipetten zu verwenden.

VIII. Eindecken der Objektträger

- 1) 10 µl Eindecklösung auf jedes RF geben.
- 2) Den Objektträger mit einem Deckglas (60x24 mm) abdecken
- 3) Die Luftblasen unter dem Deckglas mit einer Pipettenspitze herausdrücken (Abb. 9)
Ein Verschieben des Deckglases ist zu vermeiden.
- 4) Das Deckglas mit einem Papierhandtuch andrücken und die uberschussige Eindecklösung mit Wasser entfernen

IX. Kontrollen

Zur Überprüfung des Reaktionsablaufes werden negative und positive Kontrollen durchgeführt:

- 1) Negative Kontrolle: Der Schritt 1 (Inkubation mit Moab) entfällt. Stattdessen wird begonnen mit Inkubationsschritt 2 (KaM)
- 2) Positive Kontrolle: Anti-HLA

X. Mikroskopische Auswertung

1) Beurteilung der Reaktionsstärke

Die Beurteilung der Reaktion erfolgt bei 400 oder 1000facher Vergrößerung mit Oelimmersion

Eine positive Reaktion ist klar erkennbar an einer granulären, braun-schwarzen Anfärbung der Zellmembran, bei starker Reaktion imponiert sie ringförmig.

Die Reaktionsstärke kann durch Symbole dokumentiert werden:

-	negativ
(+)	schwach, aber eindeutig positiv, granulär
+	stark positiv, ringförmig
++	sehr stark positiv, Ring, dunkle Zellen

Da die Zellen ihre dreidimensionale Struktur erhalten haben, entsteht für den Betrachter zu Beginn ein ungewohntes Bild einzelner Zellen, mit dem er sich jedoch rasch vertraut machen kann. Die dreidimensionale Form mit der Beurteilungsmöglichkeit der Membranstruktur, insbesondere bei positiver Anfärbung, erleichtert und ermöglicht die Identifizierung einzelner Zellen ohne Gegenfärbung (die zwar möglich, aber nicht notwendig ist).

2) Kriterien zur Identifizierung einzelner Blutzellen

Lymphozyten:

T-Lymphozyten sind meist kompakt mit geringer Ausbreitungstendenz auf der Glasoberfläche. Ihre Oberfläche ist von feinen, dichten, regelmäßigen Spiculae besetzt.

B-Lymphozyten sind in ihrer Form variabler, sie breiten sich meist mehr auf der Glasoberfläche aus, die haarförmigen Membranausläufer sind etwas länger und unregelmäßiger.

Monozyten:

Ihre Identifizierung ist zur Abgrenzung von Lymphozyten bei vielen Fragestellungen wichtig. Sie besitzen endogene Peroxidaseaktivität, die durch die DAB-Reaktion als intrazelluläre Granulierung hervortritt.

Monozyten breiten sich meist stark auf der Glasoberfläche aus. Die Membranausläufer sind deutlich plumper, länger und unregelmäßiger als die der Lymphozyten. Ihre Eigenschaft, Latexpartikel zu phagozytieren, kann man als zusätzliche Identifizierungshilfe einsetzen.

Granulozyten:

Sie imponieren durch ihre starke endogene Peroxidaseaktivität, breiten sich rasch auf der Glasoberfläche aus.

Thrombozyten:

Sie sind durch ihre kleine Größe erkennbar. Sie haben ebenfalls eine starke Ausbreitungstendenz, ihr Anteil an der Zellpräparation sollte deshalb möglichst niedrig sein, da sie sonst das Feld überziehen.

Erythrozyten:

Sie sind leicht erkennbar durch ihre Pseudoperoxidasereaktion. Sie sind homogen dunkelbraun.

Tote Zellen:

Ihre Erkennung ist wichtig, um eine Verwechslung mit positiv reagierenden Zellen zu vermeiden. Durch die Penetration von Antikörpern färben sie sich diffus braun ohne die typische Membranfärbung. Eine Identifizierung kann auch durch den Trypanblautest erfolgen.

3) Prozentuale Auszählung positiver Zellen

z.B. für den T4/T8 Quotienten

T4 und T8 - Antikörperreaktion: es werden 100 (bzw. 200) Lymphozyten ausgezählt und der Anteil positiver Zellen differenziert (relativer Prozentanteil).

Aus der Leukozytenzahl und dem Prozentanteil der Lymphozyten im Differentialblutbild errechnet man die absoluten Zahlen für T4 und T8 Lymphozyten.

Normalwerte: T4: etwa 1000 Lymphozyten pro μl T8: etwa 600 Lymphozyten pro μl

Zellaufbereitung aus verschiedenen Körperflüssigkeiten

“buffy coat” Methode

10 ml EDTA-Blut werden in einem 10 ml Zentrifugenröhrchen 5 Min. mit 400 g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die buffy coat, die Zellschicht über den Erythrozyten, wird vorsichtig abgehoben (ca. 0,5 ml) und in ein 2 ml Eppendorfröhrchen überführt. Die Zellsuspension wird 3 x mit NKH-0,2% BSA (9) gewaschen und bei 400 g 3 Min. zentrifugiert.

1 ml Zellsuspension in NKH-0,2% BSA (9) wird mit
1 ml Ficoll-Hypaque unterschichtet

Zentrifugation: siehe PAP-Test, Seite 4

Die Zellen der Interphase werden gesammelt und gewaschen:

1. Waschung: 400 g, 3 Min. mit NKH-0,2% BSA (9)
2. Waschung: 400 g, 3 Min. mit NKH-0,2% BSA (9)
3. Waschung: 400 g, 3 Min. mit NKH-Puffer (1)

Suspension der Zellen in NKH-Puffer (1)

Einstellung der Zellkonzentration auf ca. 5000 pro μl .

Präparation von Zellen aus Knochenmark

1 ml Knochenmarksblut wird in eine 20 ml Spritze mit 1 ml NKH-0,1% EDTA (10) aspiriert und sofort durchmischt. Die weitere Präparation erfolgt wie bei Blutzellen:

Zugabe von NKH-0,1% EDTA (10) ad 10 ml

Zentrifugation: 400 g, 5 Min., Raumtemperatur

Waschung mit 10 ml NKH-0,2% BSA (9)

Ficoll-Hypaque Zentrifugation: 3 ml suspendierte Knochenmarkszellen werden mit
3 ml Ficoll-Hypaque unterschichtet.

Zentrifugation: siehe PAP-Test, Seite 4

Die Zellen der Interphase werden gesammelt und in 2 ml Eppendorfröhrchen mit NKH-Puffer gewaschen.

Zellpräparation von Liquor

Liquor bei 150 g, 5 Min. bei Raumtemperatur zentrifugieren.
Überstand möglichst vollständig abheben.
Zellen in NKH-Puffer (1) suspendieren.
Zellkonzentration einstellen, meist genügen wenige hundert Zellen pro RF.
Bei hohem Eiweißgehalt des Liquors ist eine Waschung der Zellen mit NKH-Puffer (1) zu empfehlen.

Zellpräparation von Lymphknotenaspiraten

Die Aspiration erfolgt mit Hilfe einer Saugpistole, in die eine 20 ml Spritze eingelegt ist.
Die Spritze wird mit 2 ml NKH-0,2% BSA - 0,1% EDTA (15) gefüllt. Mit einer 1er Nadel wird der Lymphknoten anpunktiert; unter Sog wird die Nadel mehrfach in verschiedene Richtungen durch den Lymphknoten gestochen und danach entfernt.

Die Flüssigkeit mit den aspirierten Zellen in der Spritze wird in ein 2 ml Eppendorfröhrchen überführt.

Zentrifugation: 400 g, 3 Min. Raumtemperatur
Waschung: Zellsediment in 2 ml NKH-0,2% BSA (9) suspendieren
Zentrifugation: 400 g, 3 Min.
Ficoll-Hypaque Zentrifugation:
1 ml Zellsuspension in NKH-0,2% BSA (9) werden mit
1 ml Ficoll-Hypaque unterschichtet

Zentrifugation: siehe PAP-Test, Seite 4)

Zellpräparation aus Lymphknoten- oder Tumorbiopsien

Das Biopsiegewebe wird in einer Petrischale mit Medium NKH-0,2% BSA (9) mit einer feinen Schere in möglichst kleine Stückchen zerkleinert und mit einer Plastikpipette mehrfach suspendiert.
Nach Absetzen der groben Partikel wird die Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen überführt und wie bei der "Zellpräparation von Lymphknotenaspiraten" weiter verarbeitet.

Zur Beachtung:

Die Zellen werden gleich nach der letzten Waschung aufgetragen. Tote Zellen in der Suspension müssen entfernt werden, da ihre Zerfallsprodukte die Zellanheftung blockieren.
Tote Zellen werden durch Ficoll-Hypaque-Zentrifugation eliminiert.
Tumorzellen haften oft weniger stark an den Reaktionsfeldern. Nach Zellanheftung sollte deshalb jede mechanische Beeinträchtigung (z.B. durch Waschen) vermieden werden.
Die Zellen werden deshalb nach der Anheftung ohne Waschung fixiert, die Flüssigkeit auf den Reaktionsfeldern wird zuvor vorsichtig abgeklopft. Durch die Fixierung ist die Adhäsion der Zellen deutlich verstärkt.

Zellpräparation aus Ergüssen

Pleuraerguß, Pericarderguß, Ascites, Gelenkergüsse etc. Die Ergußflüssigkeit wird in EDTA-Zentrifugenröhrchen gesammelt. Je nach Zellgehalt und Anzahl der Untersuchungen werden 10-40 ml benötigt.

Zentrifugation der Ergußflüssigkeit bei 400 g, 5 Min.

Überstand abheben, Zellsediment in Überstandsflüssigkeit (Volumen 1 plus 1) suspendieren und Ausstriche für die Zytologie anfertigen.

Waschung: Zellen in 2 ml NKH-0,2% BSA (9) suspendieren und bei 400 g, 5 Min. zentrifugieren.
Waschung 1 x wiederholen.

Ficoll-Hypaque Zentrifugation:
1 ml Zellsuspension (9) werden mit 1 ml Ficoll-Hypaque unterschichtet

Zentrifugation: siehe PAP-Test, Seite 4

Zellen der Interphase werden gesammelt und in 2 ml Eppendorfröhrchen gewaschen.

Zellpräparation aus bronchoalveolärer Lavage (BAL)

Die bronchoalveoläre Lavage wird mit 0,9% NaCl durchgeführt.

Die gewonnene Flüssigkeit wird auf Eis gestellt (ma. 1 h) und so schnell wie möglich weiterverarbeitet:

1. Die BAL-Flüssigkeit wird durch Gaze filtriert
2. Zentrifugation: 400 g, 5 Minuten
3. Waschen der Zellen mit NKH-0,2% BSA-0,1% EDTA Zentrifugation: 400 g, 3 Minuten
4. Wiederholung der Zellwaschung
5. Suspension der Zellen in NKH-Puffer, Einstellung der Zellkonzentration auf ca. 2000 pro μl .

Zellpräparation von Zellkulturen

Kulturzellen 3x mit NKH-Puffer (1) waschen.

Zur Entfernung toter Zellen ist eine Ficoll-Hypaque-Zentrifugation zu empfehlen. Mit Hilfe des Trypanblau-Tests kann festgestellt werden, ob die toten Zellen beseitigt sind.

Der Trypanblau-Test ist wie folgt durchzuführen:

50 μl suspendierte Zellen in NKH

10 μl Trypanblau (14)

Zellsuspension in Neubauer Zählkammer geben. Tote Zellen färben sich blau an.

Bei einigen Kulturzellen ist die Zellhaftung am Adhäsionsobjektträger abgeschwächt.

Nach der Zellanheftung sollte deshalb jede mechanische Beeinträchtigung (z.B. durch Waschen) vermieden werden.

Die Zellen werden deshalb nach der Anheftung, nach vorsichtiger Entfernung der Flüssigkeit auf den Reaktionsfeldern fixiert. Durch die Fixierung ist dann die Adhäsion deutlich verstärkt.

Fehlerquellen

Zellen haften nicht an den RF

Eine ungenügende Zellhaftung und Verlust von Zellen kann durch verschiedene Faktoren bedingt sein.

1. Die blaue Farbe auf den RF wurde nicht ausreichend entfernt:
Mit Wasser vollständig abspülen und mit NKH-Puffer nachspülen.
RF nicht austrocknen lassen.
2. Mechanische Beschädigung der Beschichtung auf den RF:
Eine mechanische Beeinträchtigung der RF, z.B. durch Pipettenspitze oder Abwischen, ist zu vermeiden. Sie verhindert eine Zellanheftung.
3. Die Zellsuspension war nicht vollständig proteinfrei.
Durch lösliche Proteine wird die Beschichtung der RF neutralisiert. Deshalb sind die Zellen gründlich in NKH-Puffer ohne Proteinzugabe zu waschen.
Tote Zellen, die Proteine freigeben, müssen entfernt werden (z.B. durch Ficoll-Hypaque Zentrifugation).
Zellen sollten sofort nach der Isolierung und Waschung aufgetragen werden.
4. Die Zellen sind beschädigt
Zellschädigung kann bedingt sein durch
längere Lagerung, unphysiologischen Puffer, Temperaturschock durch kalte Medien.
Beschädigte Zellen haften schlecht.
Bei ihrer Zerstörung können sie Substanzen freisetzen, die die Anheftung der anderen Zellen verhindern.
Einzelne Zellarten sind sehr empfindlich, wie aus einem Zellverband isolierte Tumorzellen oder manche Kulturzellen.
Tote Zellen sind zu entfernen (z.B. Ficoll-Hypaque Zentrifugation).
5. Zellarten, die schwächer haften
Manche Kulturzellen und Tumorzellen haften schlechter an den RF, wohl aufgrund veränderter Membraneigenschaften. Nach der Zellsedimentation wird die Fixierlösung ohne Waschung zugegeben. Die Fixierung verstärkt die Haftung.

Starke Ausbreitung von Zellen

Monozyten, Thrombozyten, Granulozyten und Haarzellen breiten sich meist rasch auf der Glasfläche aus. Um dies zu vermeiden, wird gleich nach der Sedimentation der Zellen fixiert.

Zahlreiche Thrombozyten

Thrombozyten breiten sich rasch auf der Glasoberfläche aus und erschweren dann die Beurteilung anderer Zellen. Thrombozyten werden deshalb bei der Zellisolierung durch wiederholte Waschungen bei niedriger g-Zahl entfernt.

Keine Reaktion nach Testverlauf

1. Reihenfolge des Sandwichantikörpers war falsch.
2. Antikörper bzw. ein Sandwichantikörper wurde vergessen.
3. H₂O₂ Zugabe zum DAB-Substrat wurde vergessen
4. Antikörper bzw. Sandwichantikörper war zu alt (meist PAP)
DAB-Probe: 0,5 ml DAB-H₂O₂ Lösung
+ 10 µl PAP
= schwarzbraune Färbung nach wenigen Sekunden

Reaktion ist nur fleckenförmig abgelaufen

Die Durchmischung bei den einzelnen Inkubationen war unzureichend:
Nach dem Auftragen der Antiseren gründlich ca. 15 Sekunden durchmischen mit einem Vortex- oder SUPERIOR-Mikro-Mischer.

Zellen erscheinen diffus bräunlich

Die Zellmembran wurde beschädigt und ermöglicht das Eindringen von Antiseren.
Schädigung der Zellmembran kann erfolgen durch:

- a) Temperaturschock
- b) unphysiologischen pH oder Ionenstärke
- c) Trocknung der Zellen
- d) Toxische Verunreinigungen von Antiseren oder Puffer

Unspezifische Anfärbungen (Background)

- a) Glasoberfläche

Immunglobuline binden unspezifisch an Glas, verstärkt durch die spezielle Beschichtung.
Diese Bindung läßt sich durch neutrale Proteine verhindern, wie Gelatine und Albumin.

- b) Backgroundreaktion an Zellen:

Sie werden in erster Linie durch unspezifische Kreuzreaktionen der Sandwichantiseren bedingt;
dies läßt sich durch deren Absorption vermeiden.
Unerwünschte Bindung über Fc-Rezeptoren wird durch die Glutaraldehydfixierung verhindert.

ANHANG

1. MATERIAL UND AUSSTATTUNG

Adhäsionsobjektträger

Deckgläser (60 x 24 mm)

farbloser Nagellack

feuchte Kammer

Eppendorfpipetten und Tips

Multidispenser (10 µl pro Schub)

Wasserbad 37°C

Färbeküvetten

Tropffläschchen (Microdel bottle, Dynatech M 48 R)

Wasserstrahlpumpe

Laborzentrifuge mit swing out rotor

leistungsfähiges Lichtmikroskop (Objektive: 10x, 40x Plan Oel oder 60x Plan Oel, 100x Plan Oel) evtl. invertiertes Mikroskop

Kühlschrank

Tiefkühlschrank -20°C, evtl. -80°C

Zentrifugenröhrchen: 10 ml, 2 ml

Vortex Mixer oder SUPERIOR-Mikro-Mischer

Taumelschüttler REAX III

Stoppuhr

2. LÖSUNGEN

Die Lösungen sind nur begrenzt haltbar. Es sollten nur die Mengen angesetzt werden, die für die Tests gebraucht werden

- | | | | |
|--------------------------------------|---|---|--|
| (1) NKH-Puffer | 8,0 g
0,4 g
2,0 ml
ad 1000,0 ml | NaCl (Merck 6404)
KCL (Merck 4936)
Hepespuffer 1 M, ph 7,4
aqua bidest | frisch ansetzen! |
| (2) NAG-Medium | 50,0 ml
0,5 ml
2,0 ml
2,0 ml
0,5 ml | NKH
NaN ₃ 10% (Merck 822335) in aqua bidest
Hepes 1 M, pH 8,0
Gelatine 5%, vorgewärmt
Rinderserumalbumin 22% (Behring) | 1-2 Wochen haltbar |
| (3) Hepes 1 M | 23,83 g
ca. 80,0 ml
ad 100,0 ml | Hepes (Merck 10 110)
aqua bidest
pH 7,4 bzw. 8,0 mit NaOH - Plätzchen einstellen
aqua bidest, filtrieren mit Sartorius SM 56 (Vorfilter zur Filtration von Serum) und in kleinen Fraktionen bei -20°C einfrieren! | |
| (4) Gelatine 5 % | 5,0 g
80,0 ml
1,0 ml
ad 100,0 ml
1,0 ml | Gelatine (Merck 4070) in
aqua bidest bei ca. 50°C lösen
pH mit 1 N NaOH auf pH 7,4 einstellen
NaN ₃ 10 % (in H ₂ O)
mit aqua bidest in
in kleinen Fraktionen im Kühlschrank bei +4°C aufbewahren
und vor Gebrauch erwärmen! | mehrere Monate haltbar. |
| (5) PBS | | PBS siehe S. A22 | |
| (6) Fixierlösung 1 | 1,0 ml
0,2 ml
2,5 ml
ad 100,0 ml | Hepes 1 M, pH 8,0
Glutaraldehyd 25 % (Merck 12179)
Glucoselösung 40 %
PBS | im Kühlschrank aufbewahrt 1 Monat haltbar. |
| (7) Eindecklösung | a) 80,0 ml
15,0 ml
5,0 ml

b) | Glycerin (Merck 4095)
Phosphatpuffer 0,1 M, pH 7,4
Glutaraldehyd 25 % (Merck)

Glycergel (Dakopatts C 563), vor Gebrauch erwärmen | oder |
| 8) OsO ₄ - Fixierlösung 2 | 50,0 ml
1,0 g OsO ₄ | PBS
(Sigma Nr. 0-5500) ist dicht verschlossen in dunkler
Glas- (oder PTFE-) Flasche bei +4°C aufbewahrt Monate haltbar. | |
| 9) NKH-0,2 % BSA | 99,0 ml
1,0 ml | NKH
Serumalbumin vom Rind 22 % (Behring ORHN 44/45) | |
| 10) NKH-0,1 % EDTA | 99,0 ml
0,1 g EDTA | NKH
(Merck 8418)
ph 7,4 mit NaOH einstellen | frisch ansetzen! |
| (11) MEM (10x) | | Gibco 042-1435 | |

- (12) MEM Gebrauchslösung
 5,0 ml MEM (10x)
 2,0 ml Hepes 1 M pH 8,0 (3)
 ad 50,0 ml aqua bidest
 frisch ansetzen!
- (13) Latex Stammlösung
 Sigma LB-8
- (14) Trypanblau
 Gibco 630-5250
- (15) NKH-0,2% BSA-0,1% EDTA
 98,5 ml NKH
 1,0 ml BSA, Serum Albumin vom Rind 22 % (Behring)
 0,1 g EDTA (Merck 8418)
 frisch ansetzen!
- (16) Peroxydase-Substratlösung (DAB)
- a. Stammlösung 40,0 mg DAB Sigma D-5637
 2,5 ml Hepes pH 8,0
 1,0 ml Gelatine 5 % (4)
 ad 50,0 ml NKH
 in 5 ml Portionen einfrieren bei -20°C ca. 2 Monate haltbar.
- b. Gebrauchslösung 5 ml Stammlösung
 5 µl H₂O₂, 30 % (Merck 7210)
Vor Gebrauch 10' scharf abzentrifugieren
 ist bei +4°C im Dunkeln 1 Tag haltbar.
 Pufferlösungen in geeigneten Mengen fraktioniert bei -20°C aufbewahren
- (17) Sandwich-Antiseren
- a. KaM
 (Stammlösung 1:50):
 40 µl KaM, Dakopatts Z 259
 100 µl AB Serum Behring RVD 14
 2000 µl NAG
 ca. 2 Wochen haltbar.
- Gebrauchslsg. 1:500:
 200 µl Stammlösung
 2000 µl NAG
Vor Gebrauch scharf abzentrifugieren.
 evtl. kleinere Mengen ansetzen, da nur 1 Woche haltbar!
- b. SaK
 (Stammlösung)
 100 µl Schwein anti Kaninchenimmunglobulin,
 SaK, Dakopatts Z 196
 200 µl AB Serum Behring
mindestens 1 Tag bei 4° C vorinkubieren ca. 4 Wochen haltbar.
- Gebrauchslösung:
 300 µl Stammlösung
 2000 µl NAG (2)
Vor Gebrauch scharf abzentrifugieren. ca. 1 Woche haltbar.
- c. PAP
 50 µl PAP, Dakopatts Z 113
 1000 µl NAG (2) **täglich frisch ansetzen**
- (18) AB-Serum
 Behring RVD 14
- (19) BSA
 Serumalbumin vom Rind 22%
 Behring ORHN 44/45

3. Tabelle der handelsüblichen Primärantikörper

Ortho Diagnostic Systems GmbH, 69151 Neckargmünd, Karl-Landsteiner-Str. 5

		Best. Nr.
OKT 3	Identifizierung von humanen peripheren T-Lymphozyten	960 811
OKT 4	Identifizierung der Helfer/Inducer-Subpopulationen humaner T-Lymphozyten	960 821
OKT 6	Identifizierung von "gewöhnlichen" humanen Thymozyten	960 831
OKT 8	Identifizierung der Suppressor-bzw. zytotoxischen Subpopulationen humaner T-Lymphozyten	960 841
OKT 9	Identifizierung von aktivierten und / oder proliferierenden Zellen ; erkennt den Transferrin-Rezeptor	960 842
OKT 10	Identifizierung von Vorläuferzellen und aktivierten Lymphozyten	960 843
OKT 11	Identifizierung von humanen peripheren T-Lymphozyten; identifiziert den E-Rosetten-Rezeptor oder ein damit eng verbundenes Antigen	960 844
OKT 16	Identifizierung von humanen Null-Zellen und unreifen T-Zellen	960 950
OKT 17	Identifizierung von humanen aktivierten Helfer T-Lymphozyten	960 952
OKT 26a	Identifizierung von humanen Zellen mit Interleukin-2-Rezeptoren	960 954
OKM 1	Identifizierung von humanen Monozyten, Null-Zellen und Granulozyten	960 861
OKM 5	Identifizierung von humanen Monozyten und Thrombozyten	960 865
OKB 2	Identifizierung von B-Zellen, Granulozyten, Prä-B- und B-Zell-Leukämie und cAlla-positiven Zellen	960 981
OKB 7	Identifizierung von B-Zellen	960 985
OKI a1	Identifizierung von B-Lymphozyten, aktivierten T-Lymphozyten und einigen Monozyten	960 851
OKDR	Identifizierung von B-Zellen, aktivierten T-Lymphozyten und Monozyten	960 992
OKB-cAlla	Identifizierung von cAlla (common Acute Lymphocytic Leukemia antigen)	960 990
OK-CLL	Identifizierung von peripheren T-Zellen, T-Zell-Leukämien und B-Zell-chronischen lymphatischen Leukämien	960 996
OK-NK	Identifizierung von humanen Killer/Natural Killer Zellen	960 870

Biotest AG, 63303 Dreieich, Landsteinerstraße 5

		Best. Nr.
Clonab T CD6	Pan T, reife T-Zellen	812 130
Clonab T4 CD4	T-Helfer, T-Inducerzellen	812 140
Clonab T8 CD8	T-Suppressor, T-Zytotox. Zellen	812 180
Clonab IL-2R CD25	Interleukin-2 Rezeptor, Tac	812 190
Clonab DR/DP	B-Zellen, aktivierte T-Zellen	812 120
Clonab DQ	B-Zellen, aktivierte T-Zellen	812 125

Dako Diagnostika GmbH, 22047 Hamburg, Am Stadtrand 52

		Best. Nr.
DAKO-C3bR	CD35	M 710
<p>Mit diesem Antikörper werden B-Zellenfollikel in Kryostatschnitten menschlichen Lymphoid-Gewebes angefärbt. Am stärksten färben sich dendritische Retikulumzellen an, aber auch Zellen der lymphoiden Mantelzone färben sich an, wenn auch schwächer. DAKO-C3bR färbt C3b-Rezeptoren der Epithelzellen der Nierenglomeruli stark an; Makrophagen und Histiozyten dagegen färben sich unterschiedlich an. Die Anfärbungen von Paraffinschnitten sind schwächer als von Kryostatschnitten. Ca. 15-20% der mononukleären Zellen des peripheren Blutsystems, das sind Monozyten und B-Zellen, werden von DAKO-C3bR angefärbt.</p>		
DAKO-C3bi-R	CD11b	M 741
<p>Der Antikörper reagiert spezifisch mit einem Leukozyten-Oberflächenrezeptor für das C3bi Komplement-Fragment (er gehört dem Cluster CD 11b an). DAKO-C3bi-R ist gut geeignet, Granulozyten und Makrophagen in Kryostatschnitten oder Zellausstrichen anzufärben. Er färbt Granulozyten, 80% der Monozyten sowie eine Subpopulation von "Null-Zell"-peripheren Lymphozyten (CD2⁺, CD3⁻) an, die die meisten zirkulierenden natürlichen Killerzellen enthält. Auch werden von ihm Makrophagen in den meisten Gewebsarten angefärbt. Der Antikörper reagiert mit neoplastischen Zellen bei myelomonozytischen und monozytischen Leukämien und weniger oft bei akuten myeloischen Leukämien. DAKO-C3bi-R kann dazu verwendet werden, die Exprimierung des C3bi-Rezeptors auf normalen und malignen Zellen der myelomonozytischen Reihe aufzudecken. Für Paraffinschnitte nicht geeignet.</p>		
DAKO-CALLA	CD10	M 727
<p>DAKO-CALLA färbt neoplastische Zellen der "common" lymphoblastischen Leukämien (CALL) bzw. des Non-T Non-B lymphoblastischen Lymphoms an. Zusammen mit den monoklonalen Antikörpern DAKO-pan-B und DAKO-T2 lassen sich mit Hilfe von DAKO-CALLA die meisten akuten Leukämien zuverlässig klassifizieren. DAKO-CALLA ist nur an Kryostatschnitten oder Zellausstrichen anwendbar. Er gehört zum Cluster CD10.</p>		
DAKO-M1	CD15	M 733
<p>DAKO-M1 reagiert mit einem als X Hapten oder CD15 bezeichneten Antigen; es befindet sich auf reifen Granulozyten und auf Hodgkin-sowie Sternberg-Reed-Zellen. In den meisten Fällen von M. Hodgkin läßt sich die Diagnose mit diesem Antiserum bestätigen. Im Gegensatz zu DAKO-RSC1 (Code-Nr. M 723) reagiert DAKO-M1 an formalinfixierten Paraffinschnitten.</p>		
DAKO-IL2-R	CD25	M 731
<p>Mit DAKO-IL2-R lassen sich aktivierte Lymphoidzellen in normalem und pathologisch verändertem Lymphoidgewebe nachweisen. Der Anteil der mit diesem Antikörper angefärbten Lymphoidzellen in den T- und hellen Zonen der Keimzentren ist variabel. In den Keimzentren befindliche Makrophagen färben sich schwach, die in den Sinus gelegenen dagegen stärker an.</p>		

- Best. Nr.**
- DAKO-RSC1** CD30 M 723
 DAKO-RSC1 erlaubt die Identifikation von Reed-Sternberg-Zellen und mononukleären Hodgkin-Zellen; gerade letztere sind mit konventionellen Färbemethoden u. U. schwer nachweisbar. Dieser Antikörper ermöglicht auch eine neue Lymphomkategorie, die sich von aktivierten Lymphozyten ableitet, zu definieren und von anderen Lymphomen und von den echten histiozytischen Tumoren abzugrenzen. DAKO-RSC1 ist nur an Kryostatschnitten anwendbar.
- DAKO-T6** CD1 M 721
 DAKO-T6 ist ein Marker für Langerhans-Zellen in normalem, dysplastischem und neoplastischem Epithel. Er kann bei der Unterscheidung zwischen anaplastischen Karzinomen und großzelligen Non-Hodgkin-Lymphomen hilfreich sein. Der Antikörper ist nur an Kryostatschnitten anwendbar. DAKO-T6 gehört zum Cluster CD1.
- DAKO-HLA-ABC** M 736
 DAKO-HLA-ABC richtet sich gegen ein monomorphes Epitop auf den 45 kD- Polypeptid-Produkten der HLA-A-B- und C-Loci. Der Antikörper erweist sich als hilfreich bei der Erforschung unterschiedlicher HLA-ABC-Exprimierungen bei verschiedenen Erkrankungen.
- DAKO-HLA-DR** M 704
 Dieser Antikörper dient dazu, HLA-DR auf einer Vielzahl menschlicher Zellen nachzuweisen (z.B. B-Lymphozyten, Makrophagen, leukämischen Myeloblasten, Langerhans-Zellen, dendritischen Zellen etc.). Auf Kryostatschnitten erhält man wesentlich stärkere Anfärbungen als auf Paraffinschnitten. Benutzt man jedoch Bouin's als Fixierungsmittel, werden oft auch auf Paraffinschnitten befriedigende Anfärbungen erreicht.
- DAKO-IgD** M 703
 Mit diesem Antikörper wird Oberflächen-IgD auf Lymphoid-Zellen in Kryostatschnitten angefärbt.
- DAKO-IgM** M 702
 Mit diesem Antikörper wird Oberflächen-IgM auf B-Zellen in Kryostatschnitten und intrazytoplasmatisches IgM in Paraffinschnitten angefärbt.
- DAKO-Kappa** M 730
 Mit DAKO-Kappa werden B-Zellen-Follikel des menschlichen Lymphoidgewebes auf Kryostatschnitten angefärbt. Auf Paraffinschnitten erhält man eine starke Anfärbung Kappa-positiver Plasmazellen und solcher Zellen, die exogene Immunglobuline absorbiert haben (z.B. Sternberg-Reed-Zellen).
- DAKO-Lambda** M 614
 Mit Anti-Lambda werden B-Zellenfollikel des menschlichen Lymphoidgewebes in Kryostatschnitten angefärbt. Bei paraffineingebetteten Proben erhält man eine starke Anfärbung Lambda-positiver Plasmazellen und solcher Zellen, die exogene Immunglobuline absorbiert haben (z. B. Sternberg-Reed-Zellen).
- DAKO-DRC1** M 709
 Dendritische Retikulumzellen bilden innerhalb von B-Zellenfollikeln ein Netzwerk. Die Anfärbung von Kryostatschnitten mit DAKO-DRC1 erlaubt es, Follikelstrukturen zu identifizieren, selbst wenn diese Follikel durch pathologische Prozesse teilweise zerstört sind.
- DAKO-EMA** M 613
 Anti-EMA färbt normales und neoplastisches Epithel sowohl in Kryostatschnitten als auch in paraffineingebetteten Proben an. Der Antikörper weist anaplastische Tumoren epithelialen Ursprungs nach, und zusammen mit dem DAKO-LC-Antikörper kann objektiv zwischen Lymphomen und Karzinomen unterschieden werden.
- DAKO-LC** CD45 M 701
 Mit Hilfe dieses Antikörpers können Tumoren der lymphatischen und myeloischen Reihe von nichthämopoetischen Neoplasmen (z.B. Karzinomen) unterschieden werden, wozu entweder Kryostat- oder Paraffinschnitte geeignet sind.
- DAKO-Macrophage** M 718
 DAKO-Macrophage färbt Humanmakrophagen auf Kryostatschnitten an. Dieser Antikörper ist gut geeignet, mononukleäre Phagozytenzellpopulationen zu identifizieren, den Makrophagenursprung von Riesenzellen zu demonstrieren und den Umfang der Makrophageninfiltration in Tumoren abzuschätzen.

Best. Nr.

DAKO-MPO

M 748

Bei der Myeloperoxidase (MPO) handelt es sich um ein Hämenzym, das sich in den Primärgranula von neutrophilen Granulozyten befindet; es spielt eine wichtige Rolle bei der sauerstoffabhängigen mikrobioziden Aktivität und gilt als nützlicher Marker für die myeloische Differenzierung. Dieses Enzym wird während des promyelozytischen Differenzierungsstadiums neutrophiler Granulozyten synthetisiert.

DAKO-MPO reagiert mit neutrophilen Granulozyten und Monozyten auf Peripherblutausstrichen, während sich eosinophile Granulozyten und Lymphozyten nicht anfärben. Auch auf Knochenmarksausstrichen färben sich die Granulozyten an.

DAKO-MPO erweist sich als wertvoll bei der Analyse von Blut- und Knochenmarksausstrichen akuter Leukämiefälle, da er in der Mehrzahl der Fälle akuter myeloischer Leukämien die Myeloperoxidase aufdeckt. Im Gegensatz dazu bleibt er bei Fällen nichtmyeloischer Leukämien (z.B. akute lymphoblastische Leukämie) immer unreaktiv. Für Paraffinschnitte nicht geeignet.

T Cell (T12), CD6 (DAKO-CD6)

M 739

DAKO-CD6 reagiert stark mit der Mehrzahl von T-Zellen des peripheren Lymphoidgewebes. Der Antikörper ist zusammen mit anderen monoklonalen Antikörpern von DAKO-PATTS gegen Lymphoidgewebsantigene zur Immunphänotypisierung der Non-Hodgkin-Lymphome von Nutzen. Er reagiert mit dem als CD6 bezeichneten Antigen. Für Paraffinschnitte ist er nicht geeignet.

Neutrophil Elastase (DAKO-Elastase)

M 752

DAKO-Elastase reagiert mit menschlicher neutrophiler Elastase, einer neutralen Protease, die hauptsächlich in Primärgranula (Azurgranula) menschlicher neutrophiler Granulozyten anzutreffen ist. Der Antikörper ist für Hämatologen durch den Nachweis dieses Enzyms bei myeloischen Leukämien wichtig. Da bei einigen akuten myeloischen Leukämien die Elastase nicht vorhanden ist, empfiehlt sich die gleichzeitige Anwendung des Antikörpers gegen Myeloperoxidase (DAKO-MPO) oder einer cytochemischen Enzymreaktion. Er ist für Paraffinschnitte geeignet.

Ki-1 Antigen, CD30 (DAKO-Ber-H2)

M 751

DAKO-Ber-H2 erkennt eine Gruppe großzelliger Lymphome, die als Ki-1-Lymphome bezeichnet werden und von aktivierten Lymphoidzellen abzuleiten sind. Damit können sie von histiozytischen Malignitäten, von Lymphomen, die von ruhenden und Vorläufer-Lymphoidzellen ausgehen und von anaplastischen Karzinomen abgegrenzt werden. Der Antikörper ist auch geeignet, Reed-Sternberg- und mononukleäre Hodgkin-Zellen aufzudecken. DAKO-Ber-H2 wie auch der monoklonale Antikörper DAKO-RSC1 (anti-Reed-Sternberg-cell, Ki-1) reagieren mit dem als CD30 bezeichneten Antigen. DAKO-Ber-H2 färbt jedoch formalinfixierte Gewebe an, während DAKO-RSC1 nur für Kryostatschnitte verwendbar ist.

Platelet Glycoprotein IIIa (DAKO-GpIIIa)

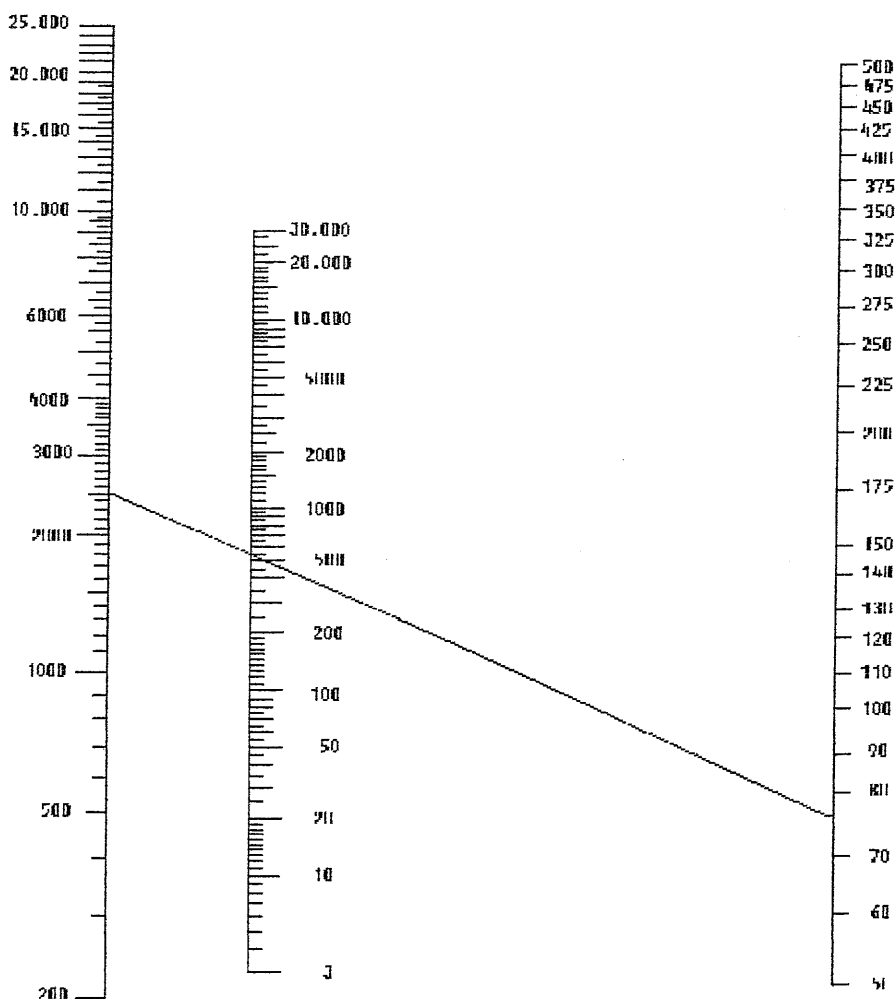
M 752

DAKO-GpIIIa deckt sowohl Thrombozyten auf Blut- und Knochenmarksausstrichen als auch Megakaryozyten auf Kryostatschnitten und Zellausstrichen auf. Der Antikörper kann auch mit dem GpIII-Molekül auf paraffineingebettetem Gewebe und von Thrombozytenmembranextrakten im Western Blot reagieren. Er erweist sich als nützlich bei der Diagnose von megakaryoblastischen Leukämien.

Becton Dickinson, Postfach 10 16 29, 69126 Heidelberg

			Best. Nr.
Anti-Leu-1	CD5	pan T-Lymphozyten	6300
Anti-Leu-2a	CD 8	Suppressor/Zytotoxische T-Lymphozyten (Maus IgG ₁ Isotyp)	6310
Anti-Leu-2b	CD 8	Suppressor/Zytotoxische T-Lymphozyten (Maus IgG _{2a} Isotyp)	7350
Anti-Leu-3a	CD 4	Helfer/Inducer T-Lymphozyten	6320
Multi-Clone™	CD 4	Helfer/Inducer T-Lymphozyten	7410
Anti-Leu-4	CD 3	pan T-Lymphozyten (mitogen)	7340
Anti-Leu-5b	CD 2	pan T-Lymphozyten, E-Rosetten Rezeptor	7590
Anti-Leu-6	CD 1	Thymozyten	7430
Anti-Leu-8		T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, Neutrophile, Monozyten	7440
Anti-Leu-9	CD 7	pan T-Lymphozyten, NK-Zellen	7480
Anti-Leu-15/CR ₃	CD11	T-Suppressor-Lymphozyten, NK-Zellen, Monozyten, Granulozyten (C3bi Rezeptor)	7550
Anti-Leu-18		Suppressor/Inducer, T-Lymphozyten, B-Lymphozyten NK-Zellen (2H4-Äquivalent)	7720
Anti-Leu-7		T-Lymphozyten-, NK-Zellen-Untergruppen	7390
Anti-Leu-11b	CD16	NK-Zellen	7530
Anti-Leu-19		NK-Zellen, Untergruppen von zytotoxischen T-Lymphozyten	7740
Anti-Leu-12	CD19	pan B-Lymphozyten	7540
Anti-Leu-16	CD20	pan B-Lymphozyten (B1-Äquivalent)	7670
Anti-Leu-M1	CD15	Monozyten/Granulozyten	7420
Anti-Leu-M2		Monozyten-Untergruppe, Thrombozyten	7400
Anti-Leu-M3		Monozyten/Makrophagen	7490
Anti-Leu-M5		Monozyten/Makrophagen, histiozytäre Lymphome, Haarzell- und akute myeloische Leukämien	7630

4. Zentrifugen-Nomogramm



Zentrifugationsgeschwindigkeit in Umdrehungen/min

Relative Zentrifugalkraft (x g)

Radius in mm vom Zentrifugenzentrum bis Röhrchenende im Ausschwingrotor.

Nomogramm zur Berechnung der Zentrifugationsgeschwindigkeit. Zur Berechnung der Drehzahl/min den Radius in mm von der Zentrifugenspindel (Zentrum) zum Röhrchenabstand in Ausschwingrotor messen. Im Nomogramm den Zentrifugenabstand (rechte Abb.) mit dem bekannten Punkt der relativen Zentrifugationskraft (x g) (mittlere Abb.) verbinden bis zum Schnittpunkt Zentrifugationsgeschwindigkeit (linke Abb.)

5. Basisprogramme für die klinische Diagnostik

mit kommerziell erhältlichen monoklonalen Antikörpern

Indikationen bei klinischen Verdachtsdiagnosen:

1. Immundefekte
2. Akute Leukämien:
 - akute lymphatische Leukämie
 - akute myeloische Leukämie
 - chronische myeloische Leukämie - Blastenschub
3. Maligne Lymphome:
 - B-Non-Hodgkin Lymphome
 - T-Non-Hodgkin Lymphome
 - Morbus Hodgkin
4. Maligne Ergüsse

Kontrollen für alle Tests:

1. Positive Kontrolle: anti HLA - AB
2. Negative Kontrolle: Kaninchen anti Maus Immunglobulin
(Reaktionsbeginn mit dem 1. Sandwichantikörper)

Antiseren zur Identifizierung nicht relevanter Zellen:

3. Anti-Monozyten (z.B. Leu M3)
4. Anti-Granulozyten (z.B. DAKO M1)

Die im folgenden Test in Klammer angeführten Antiseren waren in unserem Labor für den Immunperoxidase-Objekträger test sehr gut geeignet.

1. Immundefekte:

Untersuchungsmaterial: Blut

1. CD3	(DAKO-T3, OKT3)
2. CD4	(DAKO-T4, Leu-3a)
3. CD8	(DAKO-T8, OKT8)
4. CD20	(B1)
5. HLA-DR	(Clonab DR/DP)

2. Akute Leukämien:

Untersuchungsmaterial: Blut, Knochenmark, Liquor

1. CD19	(Coulter, B4)	(Pae) - B - ALL
2. CD20	(Coulter, B1)	
3. CD10	(DAKO - CALLA)	
4. CD24	(Hybritech, BA-1)	
5. IgM	(DAKO, Miles)	
6. HLA-DR	(Clonab, DAKO)	
7. CD7	(DAKO-T2, Leu-9)	(Pae) - T - ALL
8. CD2	(DAKO-T11, OKT11)	
9. CD5	(DAKO-T1, Leu-1)	
10. CD1	(OKT6, DAKO-T6)	
11. CD3	(DAKO-T3, OKT3)	
12. CD4	(DAKO-T4, OKT4a)	
13. CD8	(DAKO-T8, OKT8)	
14. CD13	(Coulter, My7)	AML
15. CD14	(Coulter, My4)	AMOL
16. CD15	(DAKO-M1, Leu-M1, Behring, BMA-210)	
17. Glycophorin	(Dianova)	Erythroleukämie Megakaryozytäre Leukämie
18. Gp IIIa	(DAKO)	

3. **Maligne Lymphome**

Untersuchungsmaterial: Blut, Knochenmark, Lymphknoten-Aspiration,
-Zellsuspension, Liquor

1.	CD19	(Coulter B4, DAKO - CD19)	B-Zell Lymphome
2.	CD20	(Coulter B1)	
3.	CD10	(DAKO - CALLA)	
4.	CD24	(Hybritech BA-1)	
5.	CD5	(DAKO-T1, Leu-1)	
6.	Kappa	(DAKO, Biotest)	
7.	Lambda	(DAKO, Biotest)	
8.	IgM	(Miles, DAKO)	
9.	IgD	(DAKO)	
10.	HLA-DR	(Clonab DR/DP)	
11.	CD7	(DAKO-T2, Leu-9)	T-Zell Lymphome
12.	CD2	(DAKO-T11, OKT11)	
13.	CD5	(DAKO-T1, Leu-1)	
14.	CD1	(OKT6)	
15.	CD3	(DAKO-T3, OKT3)	
16.	CD4	(DAKO-T4, OKT4a)	
17.	CD8	(DAKO-T8, OKT8)	
18.	LeuM5	(B/D)	Haarzellen u.a.
19.	Interleukin-2- -Rezeptor	(DAKO, Biotest)	"
20.	OKT10	(Ortho)	Plasmazellen u.a.
21.	CD30	(DAKO-RSC1)	Hodgkinzellen u.a.
22.	CD15	(Leu-M1, DAKO-M1)	"
23.	CD45	(DAKO-LC)	Hämatopoetische Zellen

4. **Maligne Ergüsse**

Untersuchungsmaterial: Pleuraerguß, Pericarderguß, Ascites

1.	CEA	(Hybritech)
2.	EMA	(DAKO)
3.	HEA-125	(Progen Biotechnik)
4.	BMA-120	(Behring)
5.	CD45	(DAKO, B/D)
6.	HLA-AB	(DAKO)

Formularvorschlag zum Diagnoseprotokoll:

Name:	Datum:	U-Nr.:					
geb.:		Diff.Nr.:					
Station:		-80°C:					
Diagnose:		trocknen:					
Material:		Kühlschrank:					
buffy coat:		Leuko:					
HES:		Lympho:					
Vorwaschen:		Mono:					
Ficoll:		Blasten:					
Latex:							
Antiserum	% +	Lymph	Mono	Gran	Blast		
1.							
2.							
3.							
4.							
5.							
6.							
7.							
8.							
9.							
10.							
11.							
12.							
Morph.:							
Reakt.St.:	Diff:						
Backgr.:	Beurteilung:						
Folgerung:							

5. LITERATURVERZEICHNIS

1. Bross KJ, Pangalis GA, Staatz C
Demonstration of cell surface antigens and their antibodies by the peroxidase-antiperoxidase method
Transplantation 25: 331-334 (1978)
2. Bross KJ, Schmidt GM, Blume KG, Spruce WE, Farbstein MJ
Confirmation of bone marrow engraftment by demonstration of blood group antigens on red blood cell
gosts
Transplantation 28: 257-259 (1979)
3. Fauser AA, Neumann HA, Bross KJ, Kanz L, Löhr GW
Cytotoxic T-cell clones derived from pluripotent stem cells (CFU-GEMM) of patients with Hodgkin's
lymphoma
Blood 60: 1317-1320 (1982)
4. Costabel U, Bross KJ, Matthys H
Sonderdruck aus Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin 88. Band:
422-426 (1982)
Lymphozytensubpopulationen in der bronchoalveolären Lavage bei Sarkoidose
J.F. Bergmann Verlag, München 1982
5. Morich FJ, Momburg F, Moldenhauer G, Hartmann KU, Bross KJ
Immunperoxidase slide assay (IPSA) - A new screening method for Hybridoma supernatants directed
against cell surface antigens compared to other binding assays
Immunbiologie 164: 192-202 (1983)
6. Costabel U, Bross KJ, Matthys H
Pulmonary sarcoidosis: Assessment of disease activity by lung lymphocyte subpopulations
Klin. Wochenschr. 61: 349-356 (1983)
7. Costabel U, Bross KJ, Fischer J, Guzman J, Matthys H
Die Bedeutung der Helfer-T-Lymphozyten in der bronchoalveolären Lavage für die Aktivitätsbeurteilung
der pulmonalen Sarkoidose
Prax. Klin. Pneumol. 37: 574-577 (1983)
8. Andreesen R, Osterholz J, Löhr GW, Bross KJ
A Hodgkin cell-specific antigen is expressed on a subset of auto- and alloactivated T (helper) Lymphoblasts
Blood 63: 1299-1302 (1984)
9. Schneider H, Jobke A, Bross KJ, Künzer W
Combined autoimmune neutro- and thrombocytopenia
Eur. J. Pediatr. 142: 216-219 (1984)
10. Costabel U, Bross KJ, Marxen J, Matthys H
T-lymphocytosis in bronchoalveolar lavage fluid of hypersensitivity pneumonitis. Changes in profile of T-cell
subsets during the course of disease.
CHEST 85: 514-518 (1984)
11. Andreesen R, Osterholz J, Bodemann H, Bross KJ, Costabel U
Expression of transferrin receptors and intracellular ferritin during terminal differentiation of human
monocytes
Blut 49: 195-202 (1984)
12. Costabel U, Bross KJ, Rühle KH, Löhr GW, Matthys H
Ia-like antigens on T-cells and their subpopulations in pulmonary sarcoidosis and in
hypersensitivity pneumonitis. Analysis of bronchoalveolar and blood lymphocytes
Am. Rev. Respir. Dis. 131: 337-342 (1985)

13. Costabel U, Huck E, Bross KJ, Rühle KH, Matthys H
Verschiebungen der Lymphozytensubpopulationen in der bronchoalveolären Lavage (BAL) bei
Pneumokoniosen
Verh. d. Dtsch. Ges. f. Innere Medizin, 1124-1129 (1984)
14. Schneider H, Vogt A, Bross KJ
Identification of proliferating lymphocyte subpopulations in microcultures by surface marker and
autoradiography
Immunological Communications 13: 553-561 (1984)
15. Kranz BR, Thiel E, Bross KJ, Thierfelder S
Immunzytochemische Liquorzellenuntersuchung auf Poly-L-Lysin-beschichteten Objektträgern:
In: Aktuelle Aspekte der Tumormimmunologie, ed. Urbanitz, Haubeck Springer-Verlag: Berlin,
Heidelberg 1985)
16. Frickhofen N, Bross KJ, Heit W, Heimpel H
Modified immunocytochemical slide technique for demonstrating surface antigens on viable cells
J. Clin. Pathol. 38: 671-676 (1985)
17. Costabel U, Bross KJ, Matthys H
Bronchoalveoläre Lavage: Klinische Bedeutung zytologischer und immunozytologischer Befunde
Prax. Klin. Pneumol. 39: 343-355 (1985)

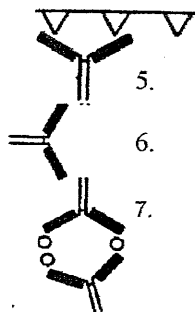
Der **ADHÄSIONSOBJEKTTRÄGER** nach DR. BROSS

Anleitung für die

Immunperoxidase (PAP) - Objektträger - Methode

unter Verwendung des Universal-DAKO Maus-PAP-Kit[™] K550

Der P A P - Objektträger- Test unter Benutzung des DAKO PAP-Kit für immunzytochemische Färbung



1. Zellisolierung
2. Zellverankerung auf den Reaktionsfeldern
3. Fixierung
4. Präinkubation
5. Inkubation mit Primärantikörper
(monoklonaler Antikörper)
6. Inkubation mit Kaninchen anti Maus Immunglobulin
7. Inkubation mit Peroxidase-Antiperoxidase (PAP)
8. Substratinkubation
9. Eindeckung des Objektträgers
10. Mikroskopische Auswertung

DAKO PAP-Kit[™] System 40 K550 Mouse und
zusätzlich benötigte Reagenzien und Lösungen, siehe Seite A.21f

Fehlerquellen, siehe Seite 12f

**Alle Arbeitsschritte werden bei Raumtemperatur durchgeführt.
Um Temperaturschocks zu vermeiden, werden vor Arbeitsbeginn alle gekühlten Lösungen auf Raumtemperatur erwärmt.
Die Objektträger werden in einer feuchten Kammer aufbewahrt.**

1. Zellisolierung

Die zu untersuchenden Zellen werden nach üblichen Methoden präpariert. Wichtig ist, daß die Zellen vor der Auftragung auf den Objektträger in **proteinfreiem** Puffer suspendiert werden und **vital** sind.

Hier wird die Isolierung von mononukleären Zellen aus peripherem Blut beschrieben:

- 1) In einem 10 ml Zentrifugenröhrchen werden
3 ml EDTA-Blut mit
3 ml Puffer (PBS) verdünnt und mit
3 ml Ficoll-Hypaque unterschichtet.
- 2) Zentrifugation: **ohne Bremse**
400 g - 2 Min.
1500 g - 5 Min.
- 3) Abpipettieren der **Interphase**, überführen in 2 ml Eppendorfröhrchen
- 4) Waschen mit PBS
Zentrifugation: 400 g, 2 Min.
- 5) **Latexphagozytose** (zur Identifizierung von Monozyten) fakultativ:
1 ml minimal essential medium (MEM)
50 µl Kälberserumalbumin (BSA), 22% (Behring)
5 µl Latexpartikel (Sigma LB-6)
Inkubation für 15 Min., 37°C, Wasserbad
Latexsuspension auf Zellsediment geben, gut mischen 30 Min. bei 37°C inkubieren.
- 6) Zellen mit PBS 3 x waschen:
Zentrifugation: 400 g, 2 Min.
- 7) Zellen in PBS suspendieren.
Zellzahl auf ca. 5000 pro µl einstellen.

2. Verankerung der Zellen auf dem Adhäsionsobjektträger

- 1) Vorbereitung des Objektträgers:
Die grüne Farbe auf den Reaktionsfeldern wird gründlich mit Leitungswasser und danach mit Pufferlösung (PBS) abgespült. Die Objektträger werden in einer feuchten Kammer aufbewahrt. Eine Austrocknung der Reaktionsfelder ist zu vermeiden.
- 2) Zellauftragung:
10 µl der in PBS suspendierten Zellen werden pro RF aufgetragen.
- 3) Zellsedimentation:
Inkubation des Objektträgers in der feuchten Kammer für ca. 5-10 Min. bis die Zellen sedimentiert sind und an der Glasoberfläche haften.
Kontrolle der Zelldichte unter dem Mikroskop (wenn möglich Umkehrmikroskop)
- 4) Vorsichtiges Abwaschen der Reaktionsfelder mit Puffer (PBS) mit der Spritzflasche oder im Färbetrog. Abklöpfen des überschüssigen Puffers.

3. Fixierung

- 1) Je RF 1 Tropfen Fixierlösung auftropfen
- 2) Inkubation für 5 Min. (in feuchter Kammer)
- 3) Abspülen der Fixierlösung mit PBS-Puffer
- 4) Abklopfen des überschüssigen Puffers

4. Präinkubation

Zur Blockierung unspezifischer Proteinbindungen an der Glasoberfläche und an den Zellen.

- 1) Auftropfen des PAG-Mediums (4) (Abb. 5)
- 2) Schütteln auf dem Vortexmixer, ca. 15 Sek. (Abb. 6)
- 3) Inkubation mindestens 15-30 Min. auf Taumelgerät oder im Kühlschrank über Nacht

5. Inkubation mit Primärantikörper

- 1) Puffer vom Objektträger abklopfen
- 2) Auf jedes Reaktionsfeld wird je ein Primärantikörper (monoklonaler Antikörper von der Maus) in geeigneter Verdünnung aufgetropft
- 3) Gut schütteln: Objektträger für ca. 15 Sek. gegen Vortexmixer halten
Beachten Sie, daß sich die Lösungen auf den einzelnen Reaktionsfeldern nicht vermischen
- 4) 20 Min. (oder länger, z.B. über Nacht bei 4°C) bei Raumtemperatur inkubieren
- 5) Vorsichtig jedes einzelne Reaktionsfeld mit PBS (Spritzflasche) abspülen

6. Inkubation mit Brückenantikörpern

- 1) Puffer vom Objektträger abklopfen
- 2) Gelbes Reagenz aus Flasche 4 (Kaninchen anti Maus Immunglobulin) auf die Reaktionsfelder tropfen.
- 3) Gut schütteln: Objektträger für 15 Sek gegen Vortexmixer halten
- 4) 20 Min. bei Raumtemperatur inkubieren
- 5) Sorgfältig mit PBS (Spritzflasche) abspülen

7. Inkubation mit Peroxidase - Antiperoxidase

- 1) Puffer vom Objektträger abklopfen
- 2) Rotes Reagenz aus Flasche 5 (Peroxidase - Antiperoxidase, PAP) auf RF tropfen
- 3) Gut schütteln: Objektträger für 15 Sek. gegen Vortexmixer halten
- 4) 20 Min. bei Raumtemperatur inkubieren
- 5) Sorgfältig mit PBS (Spritzflasche) abspülen

8. Substratinkubation

- 1) Substratherstellung (während der PAP-Inkubation)
 - a. Reagenz aus Flasche 7 (Substrat-Puffer) in das beiliegende graduierte Teströhrchen geben: die jeweils benötigte Menge hängt von der Testanzahl ab. 2 ml reichen für 6 Objektträger.
 - b. Für jeweils 2 ml Puffer 1 Tropfen Reagenz aus Flasche 6 (AEC) hinzufügen.
Sofort gut mischen
 - c. Für jeweils 2 ml 1 Tropfen Reagenz aus Flasche 8 (Wasserstoffperoxyd) hinzufügen.
Sofort gut mischen. Beiliegende Filtersäule in das Röhrchen mit dem Substrat pressen
- 2) Puffer vom Objektträger abklopfen
- 3) 1 Tropfen Substrat auf jedes Reaktionsfeld geben, schütteln
- 4) 10-15 Min. inkubieren
- 5) Vorsichtig mit Aqua dest abspülen

Anmerkung:

Das angesetzte Substrat ist nur für 2 h haltbar. Das Teströhrchen, die Tropfpipette und die Filtersäule sind nach Gebrauch mit Aqua bidest zu reinigen.

9. Eindeckung des Objektträgers

- 1) Aqua bidest vom Objektträger abklopfen
- 2) Auf jedes Reaktionsfeld 1 Tropfen Glycergel (vorgewärmt) auftropfen
- 3) Deckglas (60 x 24 mm) auflegen und sorgfältig mit einer Plastikpipettenspitze andrücken. Überschüssiges Gel mit Saugpapier und Wasser entfernen. Deckglases nicht verschieben!

10. Mikroskopische Auswertung siehe Seite 8f

LÖSUNGEN

- (1) DAKO PAP Kit System 40 Dakopatts K 550 Mouse (siehe A.23)
- (2) PBS (phosphate buffered saline)
kann an Stelle von NKH-Puffer verwendet werden
- PBS (10x), ohne Calcium u. Magnesium
Gibco, Cat. No. 042-04200 H oder
Sigma, Cat. No. 1000-3
Vor Gebrauch mit H₂O bid. verdünnen
- (3) PBS - 0,2 % BSA
- | | | |
|--------|--|------------------|
| 9,9 ml | PBS (1x) | |
| 0,1 ml | Rinderserumalbumin 22%
(Behring ORHN 44/45) | frisch ansetzen! |
- (4) PAG-Medium (anstelle des NAG-Medium, Seite A.2 (2))
- | | | |
|---------|--|-------------------------------|
| 47,0 ml | PBS (1x) | |
| 2,0 ml | Gelatine 5% (Lösung 4) | |
| 0,5 ml | Rinderserumalbumin 22% | |
| 0,5 ml | NaN ₃ 10% in H ₂ O bidest. | ca. 2 Wochen bei 4°C haltbar. |
- (5) Fixierlösung I
- | | | |
|-------------|---------------------------------|-----------------------|
| 1 ml | Hepes 1 M, pH 8,0 | |
| 0,2 ml | Glutaraldehyd 25% (Merck 12179) | |
| 2,5 ml | Glucoselösung 40% | |
| ad 100,0 ml | PBS, im Kühlschrank aufbewahren | ca. 2 Wochen haltbar. |
- (6) Für Latexphagozytose
- | | | |
|-------|--|--|
| 1 ml | MEM 10 x (Minimum Essential Medium mit 25 mM Hepes-
puffer, 1:10 mit H ₂ O bidest verdünnt, Gibco, 042-1435) | |
| 50 µl | BSA (Rinderserumalbumin 22%) | |
| 5 µl | Latex Stammlösung (Sigma LB-8) | |
- kann in 1 ml Fraktionen bei - 20°C eingefroren werden.

DAKO PAP Kit_™ System 40 K550 Mouse

Inhalt:

Nr.	Bezeichnung	Menge	Farbcode
1.	H ₂ O ₂ (3%) (wird nicht verwendet)	15 ml	grau
2.	Kaninchenserum	15 ml	violett
3.	leer		
4.	Brückenantikörper (KaM)	15 ml	gelb
5.	Peroxidase - Antiperoxidase (PAP)	15 ml	rot
6.	Substrat (AEC) Aminoäthylcarbazol	1 ml	violett
7.	Azetatpuffer	2 x 15 ml	violett
8.	H ₂ O ₂ (0,3%)	1 ml	violett

Außerdem notwendig:

1. Primäre Antikörper (monoklonale)
2. Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)
3. 15 ml Eindecklösung (Glycergel, DAKO Code-Nr. C 563)
4. 15 ml Fixierlösung (Glutaraldehyd 0,05%)
5. Deckgläser (60 x 24 mm)
6. Adhäsionsobjektträger

Die Reagenzien reichen für mindestens **50 Objektträger = 600 Teste**.

Das Substrat reicht für **15 Ansätze** (15 x 2 ml); pro Ansatz 5 Objektträger.

Der Kit ist einige Monate haltbar.

Reagenzien:

1. Dako PAP Kit System 40, K 550 mouse
2. Primäre, monoklonale Antikörper
3. Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) (Gibco Cat. No. 042-04200 H)
4. Glycergel (Dako, Code-Nr. 563)
5. Fixiermedium (0,05% Glutaraldehyd)

Fehlerquellen

siehe Seite 12f

Material und Ausstattung

siehe Seite A.1

Anleitung für die APAAP - Objektträger - Methode unter Verwendung des APAAP-Kit™ K670

1. Zellisolierung und

2. Verankerung der Zellen auf dem Adhäsionsobjektträger

erfolgen wie auf Seite A.19 beschrieben.

3. Fixierung

- 1) Je RF 1 Tropfen Fixierlösung auftropfen
- 2) Inkubation für 5 Min. (in feuchter Kammer, bei Raumtemperatur)
- 3) Abspülen der Fixierlösung mit TBS- oder PBS
(beide Puffer können für folgende Schritte alternativ verwendet werden.)

4. Inkubation mit Primärantikörper

- 1) Puffer vom Objektträger abklopfen
- 2) Auf jedes Reaktionsfeld wird je ein Tropfen Primärantikörper (monoklonaler Antikörper von der Maus) in geeigneter Verdünnung aufgetropft
- 3) Gut schütteln: Objektträger für ca. 15 Sek. gegen Vortexmixer halten
Beachten Sie, daß sich die Lösungen auf den einzelnen Reaktionsfeldern nicht vermischen
- 4) 30 Min. bei Raumtemperatur inkubieren
- 5) Vorsichtig jedes einzelne Reaktionsfeld mit PBS (Spritzflasche) abspülen
und ca. 1 Min. in Küvette mit PBS schaukeln.

5. Inkubation mit Brückenantikörpern

- 1) Puffer vom Objektträger abklopfen
- 2) Auf jedes Reaktionsfeld 1 Tropfen Kaninchen-Anti-Maus-Brückenantiserum, in geeigneter Verdünnung, tropfen (z.B. DAKO Code Nr Z259, verdünnt 1:25 mit TBS).
- 3) 30 Min. bei Raumtemperatur in feuchter Kammer auf Schaukelapparat inkubieren.
- 4) Sorgfältig jedes einzelne Reaktionsfeld mit PBS (Spritzflasche) abspülen
1 Min. in Küvette waschen.

6. Inkubation mit APAAP-Komplex

- 1) Puffer vom Objektträger abklopfen
- 2) Auf jedes Reaktionsfeld je 1 Tropfen APAAP-Komplexlösung (z.B. DAKO Code Nr D651, 1:50 verdünnt in TBS) auftropfen.
- 3) 30 Min. bei Raumtemperatur in feuchter Kammer auf Schaukelapparat inkubieren
- 4) Vorsichtig jedes einzelne Reaktionsfeld mit PBS (Spritzflasche) abspülen.
1 Min. in Küvette waschen.

Arbeitsgang 5 und 6 sollte zur Erhöhung der Farbintensität ein- oder zweimal wiederholt werden.
Die Inkubationen können auf 10 Min. verkürzt werden.

7. Inkubation mit alkalischen Phosphatase-Substrat

- 1) Puffer vom Objektträger abklopfen
- 2) Auf jedes Reaktionsfeld 1 Tropfen der alkalischen Phosphatase-Substratlösung *
(frisch angesetzt, Herstellung siehe unten) auftropfen
- 3) 20 Min. bei Raumtemperatur inkubieren
- 4) Vorsichtig jedes einzelne Reaktionsfeld mit PBS abspülen (Spritzflasche)

Für die intracelluläre Bestimmung muß zwischen den verschiedenen Inkubationen 4., 5., 6. und 7. ca. 5 Min. in der Küvette auf dem Schaukelapparat gewaschen werden.

8. Gegenfärbung mit Hämalaun (nicht unbedingt erforderlich)

- 1) Puffer vom Objektträger abklopfen
- 2) Auf jedes Reaktionsfeld 1 Tropfen Mayers Hämalaunlösung (Merck) auftropfen
- 3) 10 Min. bei Raumtemperatur inkubieren
- 4) Vorsichtig jedes einzelne Reaktionsfeld mit PBS abspülen (Spritzflasche)
Falls erforderlich den Objektträger 5 Min. in Küvette mit PBS nachwässern

9. Eindeckung des Objektträgers

- 1) Puffer vom Objektträger abklopfen
- 2) Auf jedes Reaktionsfeld 1 Tropfen Eindecklösung Glycergel (leicht vorgewärmt) auftropfen
- 3) Deckglas (60 x 24 mm) auflegen und sorgfältig mit einer Plastikpipettenspitze fest andrücken.
Überschüssiges Gel mit Saugpapier und Wasser entfernen. Deckglas nicht verschieben!

10. Mikroskopische Auswertung siehe Seite 8f

Material

Substratherstellung für die APAAP-Methode (Fast-Red-Methode):		
Naphthol AS-MX Phosphat	2mg	Naphthol AS-MX Phosphat in DMF in einem Glasgefäß lösen, dann mit Tris-Puffer auf 10ml auffüllen und anschließend 10µl Levamisole (um die endogene alkalische Phosphatase zu blockieren) hinzufügen.
(Sigma-Nr N4875)		
Dimethylformamid (DMF)	0,2ml	Unmittelbar vor Gebrauch Fast-Red Salz in der Substratlösung auflösen und diese Lösung über einen Filter direkt auf die Objektträger auftropfen
0,1 M Tris-Puffer pH 8,2	9,8ml	
1 M Levamisole	10µl	
Fast-Red TR Salz	10mg	
(Sigma-Nr. F1500)		

Puffer TBS, Tris-gepufferte physiologische Kochsalzlösung (Saline)

Stammlösung: 0,5 M Tris HCl pH 7,6

Arbeitslösung: Stammlösung 1:10 mit 0,15 M Kochsalzlösung verdünnen

*

Empfehlung zu 7. 2)

Zur Arbeitserleichterung ist das **APAAP-Kit Nr K670** der Fa. **DAKOPATTS** zu empfehlen. Es enthält:

Kaninchen-anti-Maus Antikörper

APAAP-Komplex

Naphthol-Substrat und Fast-Red Chromogen-Levamisol (in Tablettenform).

Eine Tablette wird in 2ml Substratpuffer aufgelöst und sofort auf die Reaktionsfelder getropft.