

TissueAlity-Kit[®]

Prostate Cancer Kit



1. Beschreibung

Das Prostate Cancer Kit enthält alle notwendigen Reagenzien für die Durchführung einer mehrfachen Fluoreszenzfärbung von kanzerogener Prostata. Gefärbt werden die basalen Epithelzellen, (Färbung Cytokeratin 13, 15 und 16) sowie die sekretorischen Epithelzellen, (Färbung Cytoskelett) und Prostata Karzinom. Diese zelltypspezifischen Färbungen können durch Hinzufügen von beliebigen Markern, durch den Kunden, für weitere Auswertungen benutzt werden.

Bitte lesen Sie sich dieses Protokoll genau und vollständig durch, bevor Sie mit der Vorbereitung oder/und Durchführung des Experiments beginnen. Dies dient zur Sicherstellung von sicherer Handhabung und korrektem Prozessablauf.

2. Packungsinhalt

| Material | Container | Component | Konzentration | Lagerung | Stabilität |
|---|-------------|-------------|---------------|---------------------------------|---|
| Primär Antikörper - CK8.12 - M5 - AMACR | Container 1 | Component A | 5-fach | * 2-6°C Vor Licht schützen * | Bei ordnungsgemäßer Lagerung sind alle Komponenten dieses Kits für zumindest 6 Monate stabil. |
| Sekundär Antikörper (Isotype spezifisch) - Alexa Fluor 546 - Alexa Fluor 488 - Alexa Fluor 647 | | Component B | 5-fach | | |
| DAPI | | Component C | 5-fach | | |
| Inkubationsmedium (konz.) | | Component D | 12-fach | | |
| Glycin (10g) | Container 2 | Component E | 50-fach | | |
| Blocking Serum | | Component F | 5-fach | | |
| Antigen Aufbereitungs-Lösung | Container 3 | Component G | 250-fach | | |
| Eindeckmedium | | Component H | unverdünnt | | |
| Anzahl der Färbungen: Dieses Kit ist für 25 Slide Färbungen ausgelegt. (200µl pro slide) | | | | | |

Für die durchführung werden weiters benötigt:

3 (DREI) BEHÄLTER MIT XYLOL (250ML)
2 (ZWEI) BEHÄLTER MIT 96% ETHANOL (250ML)
1 (EIN) BEHÄLTER MIT 80% ETHANOL (250ML)
1 (EIN) BEHÄLTER MIT 70% ETHANOL (250ML)
EINFACH KONZENTRIERTE PHOSPHAT GEPUFFERTE SALZLÖSUNG (1X PBS)
FEUCHTEKAMMER
(WIR EMPFEHLEN DIE TISSUEGNOSTICS FEUCHTEKAMMER, SIEHE WWW.TISSUEGNOSTICS.COM)
1000 ML DEIONISIERTES WASSER (DH2O)

3. Vorbereitung der Materialien

3.1

Bereiten Sie 480 µl (mal Anzahl der Tests) einer 1X Stock Lösung von Komponente D vor, indem Sie 40 µl (mal Anzahl der Tests) von Komponente D mit 440 µl (mal Anzahl der Tests) PBS verdünnen. Die vorbereitete Lösung wird von nun an als Inkubationsmedium bezeichnet.

3.2

Verdünnen Sie 40 µl (mal Anzahl der Tests) von Komponente A durch Beimengung von 160 µl (mal Anzahl der Tests) des Inkubationsmedium im Verhältnis 1:5 (siehe 3.1).

3.3

Verdünnen Sie 40 µl (mal Anzahl der Tests) von Komponente B durch Beimengung von 160 µl (mal Anzahl der Tests) des Inkubationsmedium im Verhältnis 1:5 (siehe 3.1).

3.4

Verdünnen Sie 40 µl (mal Anzahl der Tests) von Komponente C durch Beimengung von 160 µl (mal Anzahl der Tests) des Inkubationsmedium im Verhältnis 1:5 (siehe 3.1).

3.5

Lösen Sie 5 g (mal Anzahl der Bäder) von Komponente E in 250 ml dH₂O (mal Anzahl der Bäder) auf. Diese Lösung wird von nun an als Blocking Puffer 1 bezeichnet.

3.6

Verdünnen Sie 40 µl von Komponente F (mal Anzahl der Tests) durch Beimengung von 160 µl PBS (mal Anzahl der Tests) im Verhältnis 1:5. Diese Lösung wird von nun an als Blocking Puffer 2 bezeichnet.

3.7

Verdünnen Sie 1 ml (mal Anzahl der Bäder) von Komponente G durch Beimengung von 249 ml (mal Anzahl der Bäder) dH₂O im Verhältnis 1:250. Mischen Sie gründlich. Stellen Sie den pH dieser Lösung auf 9.0 ein.

4. Färbung

4.1 Deparaffinierung

4.1.1

Erwärmen Sie die Objektträger mit dem Gewebe (von nun an als „Slides“ bezeichnet) 30 Minuten lang auf 50°C.

4.1.2

Waschen Sie die Slides 3 x 3 Minuten bei Raumtemperatur in Xylol. Benutzen Sie für diesen Schritt 3 getrennte Behälter mit Xylol.

4.1.3

Waschen Sie die Slides 2 x 3 Minuten in 96% Ethanol in 2 separaten Behältern.

4.1.4

Waschen Sie die Slides 3 Minuten in 80% Ethanol.

4.1.5

Waschen Sie die Slides 3 Minuten in 70% Ethanol.

4.1.6

Lassen Sie die Slides 30 Minuten in PBS stehen.

4.2 Aufbereitung Antigen

4.2.1

Stellen Sie die Slides in 250ml Komponente G-Lösung (siehe 3.7). Erhitzen Sie die Slides in Komponente G im Autoklaven für 1 Minute auf 121°C:

4.2.2

Lassen Sie die Komponente G-Lösung mit den Slides 30 Minuten auf Raumtemperatur abkühlen.

4.2.3

Waschen Sie die Slides 10 Minuten in PBS.

4.3 Blocken

4.3.1

Waschen Sie die Slides in Blocking Puffer 1 für 10 Minuten (siehe 3.5). (250ml Blocking Puffer 1 sind für ein Bad berechnet)

4.3.2

Waschen Sie die Slides 10 Minuten in PBS.

4.3.3

Umranden Sie das Gewebe auf den Slides mit einem Paraffinstift. (z.B.: Dako-Pen)

4.3.4

Von nun an arbeiten Sie bitte in einer Feuchtekammer!

Pipettieren Sie 200µl Blocking Puffer 2 (siehe 3.6) auf jedes Gewebestück auf den Slides. Inkubieren Sie 30 Minuten bei Raumtemperatur.

4.4 Antikörper Inkubation

4.4.1

Säubern Sie die Slides schonend von der Blocking Lösung. (z.B.: durch Abkippen)

4.4.2

Pipettieren Sie 200µl der unter Punkt 3.2 erstellten Lösung auf jedes Slide. Lassen Sie 1 Stunde inkubieren.

Alle nachfolgenden Wasch- und Inkubationsschritte müssen zum Schutz der Fluorochrome vor Ausbleichung unter Lichtschutz (Abdeckung) durchgeführt werden!

4.4.3

Waschen Sie die Slides 2 x 3 Minuten mit PBS.

4.4.4

Pipettieren Sie 200µl der unter Punkt 3.3 erstellten Lösung auf jedes Slide. Lassen Sie 30 Minuten inkubieren.

4.4.5

Waschen Sie die Slides 2 x 3 Minuten in PBS.

4.4.6

Pipettieren Sie 200µl der unter Punkt 3.4 erstellten Lösung auf jedes Slide. Lassen Sie 5 Minuten inkubieren.

4.4.7

Waschen Sie die Slides 2 x 3 Minuten in PBS.

4.4.8

Decken Sie die Slides mit Deckgläsern unter Verwendung von Komponente H (Eindeckmedium) ein. Ein Tropfen sollte genügen. (Das mitgelieferte Eindeckmedium wurde für 25 Slides berechnet)

4.4.9

Lagern Sie die Slides mit dem Gewebe bei 4°C unter Lichtschutz.

5. Zusätzliche Informationen

1. Dieses Kit ist ausschließlich zur Verwendung durch sehr gut ausgebildetes Laborpersonal bestimmt.
2. Einige der Komponenten in diesem Kit enthalten gefährliche und/oder giftige Stoffe. Bitte lassen Sie bei der Benutzung dieses Kits äußerste Vorsicht walten und benutzen Sie die korrekte Laborbekleidung. (z.B.: Handschuhe)
3. Die angegebenen Verdünnungen sind für den unverzüglichen Verbrauch des gesamten Kits gedacht und berechnet. Bei geringerem Bedarf können geringere Mengen jeder Komponente verdünnt und verwendet werden. Die Stocklösungen bleiben unverdünnt länger stabil. Komponente E und Komponente G sind für Gewebsbäder ausgelegt und reichen für 2 Bäder.
4. Komponente A, B und C sind licht- und temperaturempfindlich. Bitte diese Komponenten bei 4°C lichtgeschützt lagern, um die Stabilität und Färbequalität des Kits zu erhalten.