



*Práce byla financována projektem IVA č. 2018FVL/1230/06
„Pokročilé metody ve veterinární patologii“
řešeném na Ústavu patologické morfologie a parazitologie*

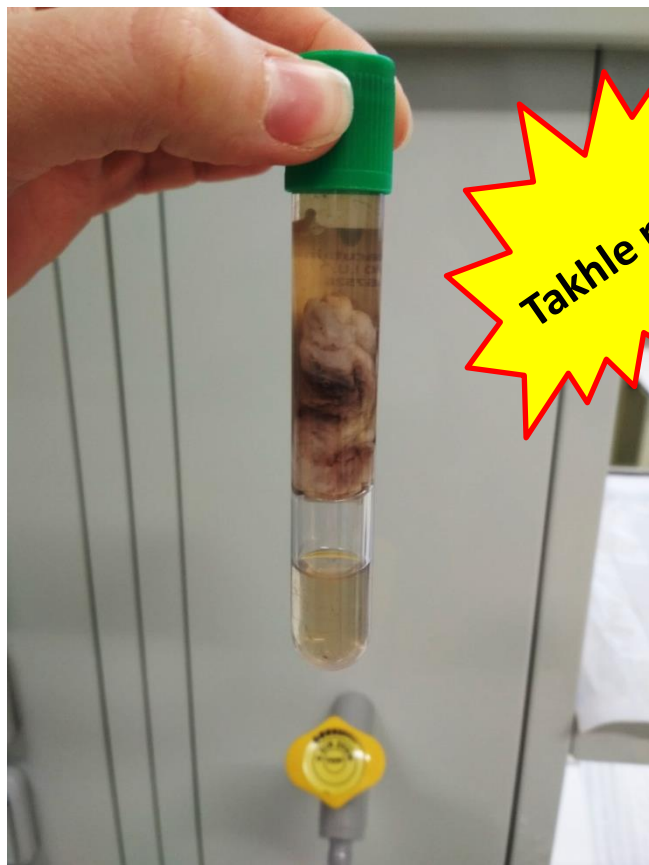


Imunohistochemie ve veterinární patologii

Obrazový manuál pro studenty
Patologické morfologie VFU Brno

Příprava a fixace tkáně

- Tkáň musí být správně fixována! (antigeny se ničí vlivem autolýzy a při použití nesprávného fixačního roztoku)



Takhle ne!



Takhle ano

- 4-10% pufrovaný formaldehyd
- Dostatečné množství roztoku
- Velké biopsie nakrojit

Histologické zpracování tkáně

- Stejně jako pro přípravu klasických preparátů barvených hematoxylinem a eozinem
- Je nutné použít speciálně upravená skla s adherentním povrchem
- Mezi jednotlivými kroky je nutné preparáty promývat v pufrovaném roztoku (fosfátový pufr - PBS)



Odmaskování epitopů

- Enzymatické (trypsin, proteináza K...)
- V kyselém pH (pH 6 - citrátový pufr)
- V zásaditém pH (pH 9 – komerčně vyráběné roztoky)

Enzymatické odmaskování probíhá při teplotě 37°C.

Odmaskování v kyselém i zásaditém pH probíhá při vysoké teplotě (96°C) po dobu cca 20 minut. Vysoký tlak v tzv. „rýžovaru“ zajistí lepší výsledek.



Inkubace v primární protilátce

- Po různě dlouhou dobu v závislosti na použité protilátce (většinou 60 minut)
- Koncentrace protilátky se liší (1:50 – 1:1500)



Odparafinovaná tkáň je citlivá na vyschnutí, proto pracujeme v tzv. „vlhké komůrce“.

Pozor: Před aplikací vlastní primární protilátky je třeba blokovat endogenní peroxidázu, která je normálně obsažena ve tkáních pomocí 3% peroxidu vodíku po dobu 10 minut.

Inkubace v sekundární protilátce



Pozor: je vždy nutné použít Sekundární protilátku, která odpovídá druhu zvířete, ze kterého byla získána primární protilátka (např. myš – myš; králík – králík)

Inkubujeme po dobu 30 až 45 minut

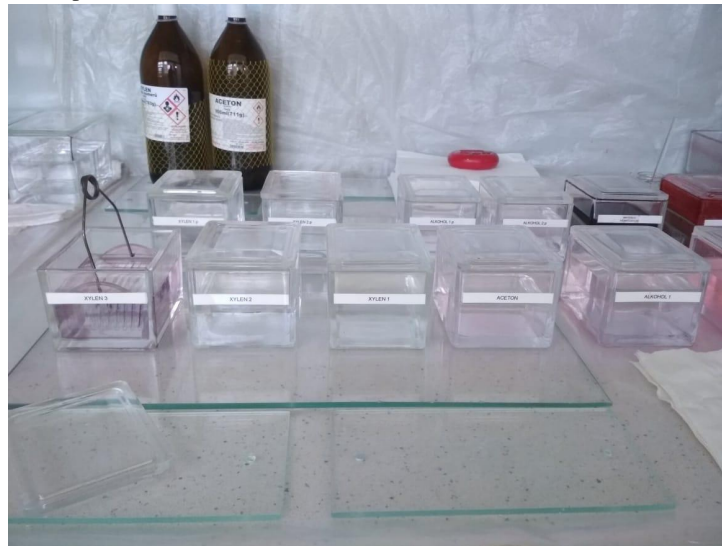
Demaskování komplexu antigen-protilátka

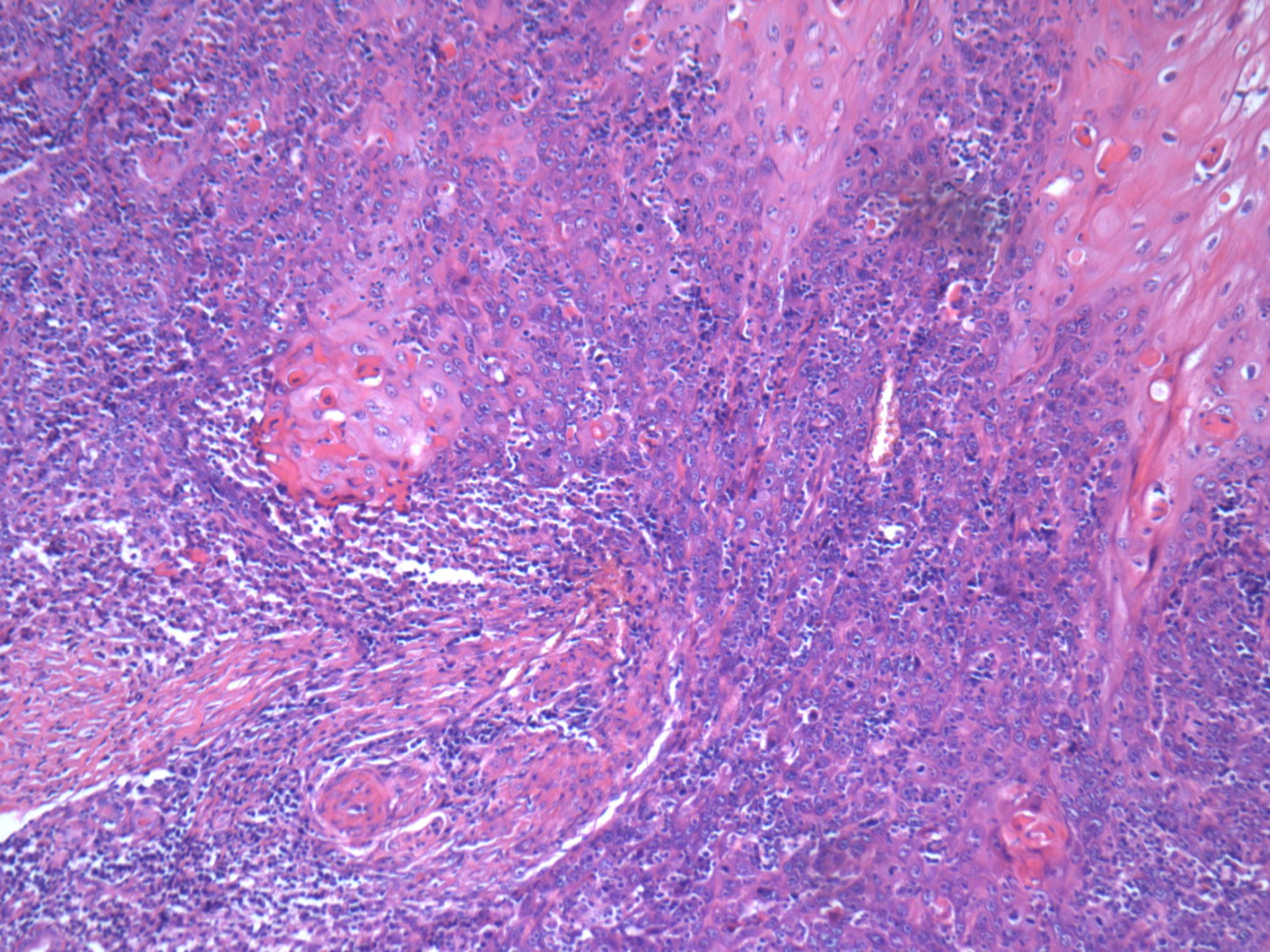
- Inkubujeme po dobu cca 5 minut – podle síly reakce. Je třeba se vyvarovat příliš dlouhému působení, kdy může dojít k nespecifické reakci (obarvení „pozadí“).
- Vzniká barevná chemická sloučenina hnědé (diaminobenzidin – **DAB**) nebo červené (aminoethylkarbazol – **AEC**) barvy.



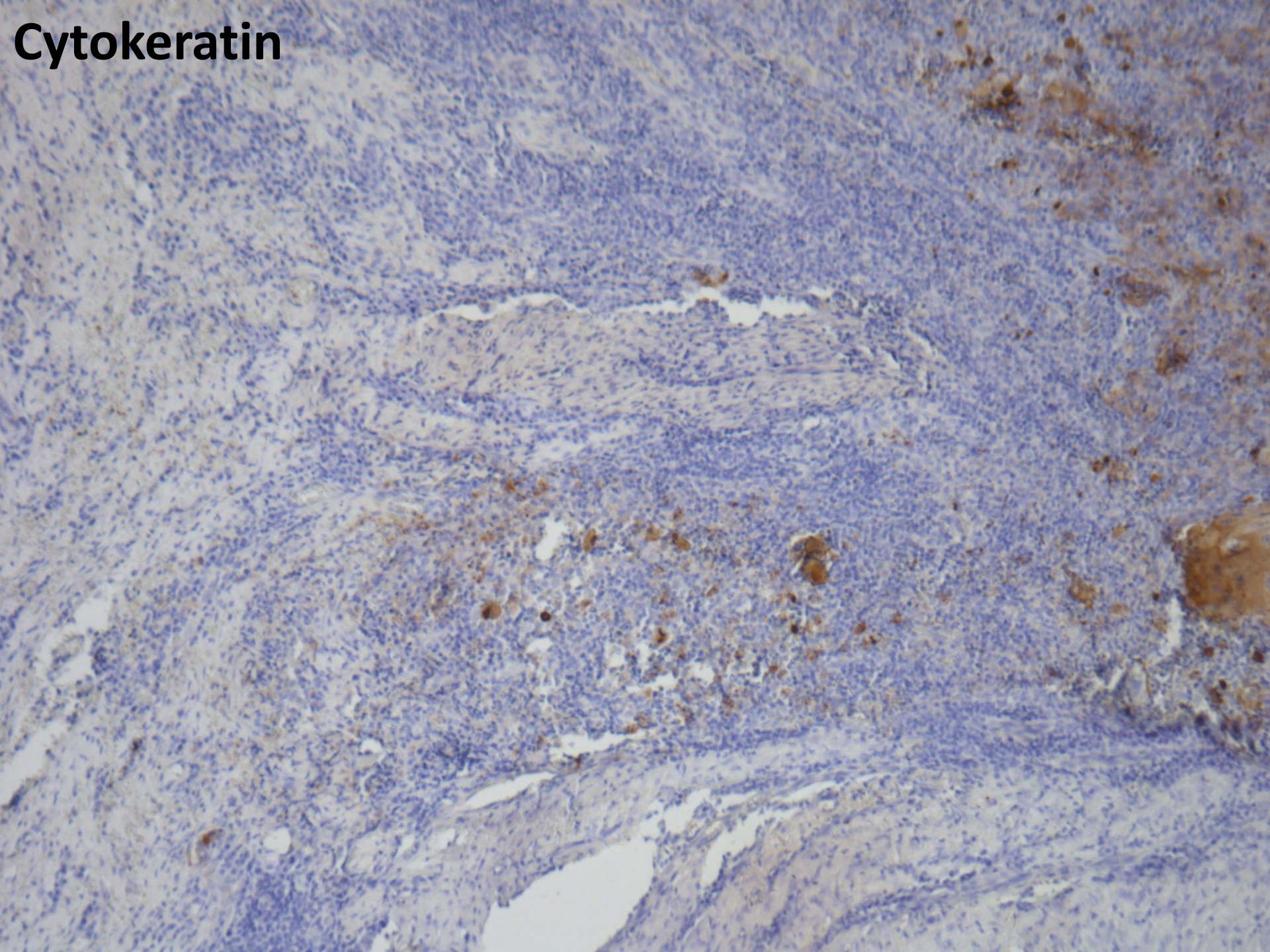
Dobarvení jader hematoxylinem, odvodnění, projasnění a montování preparátu

- Pro zvýšení přehlednosti preparátu většinou dobarvujeme jádra hematoxylinem po dobu cca 1 minuty.
- Následuje odvodnění a projasnění tkáně v alkoholech a xylenech.

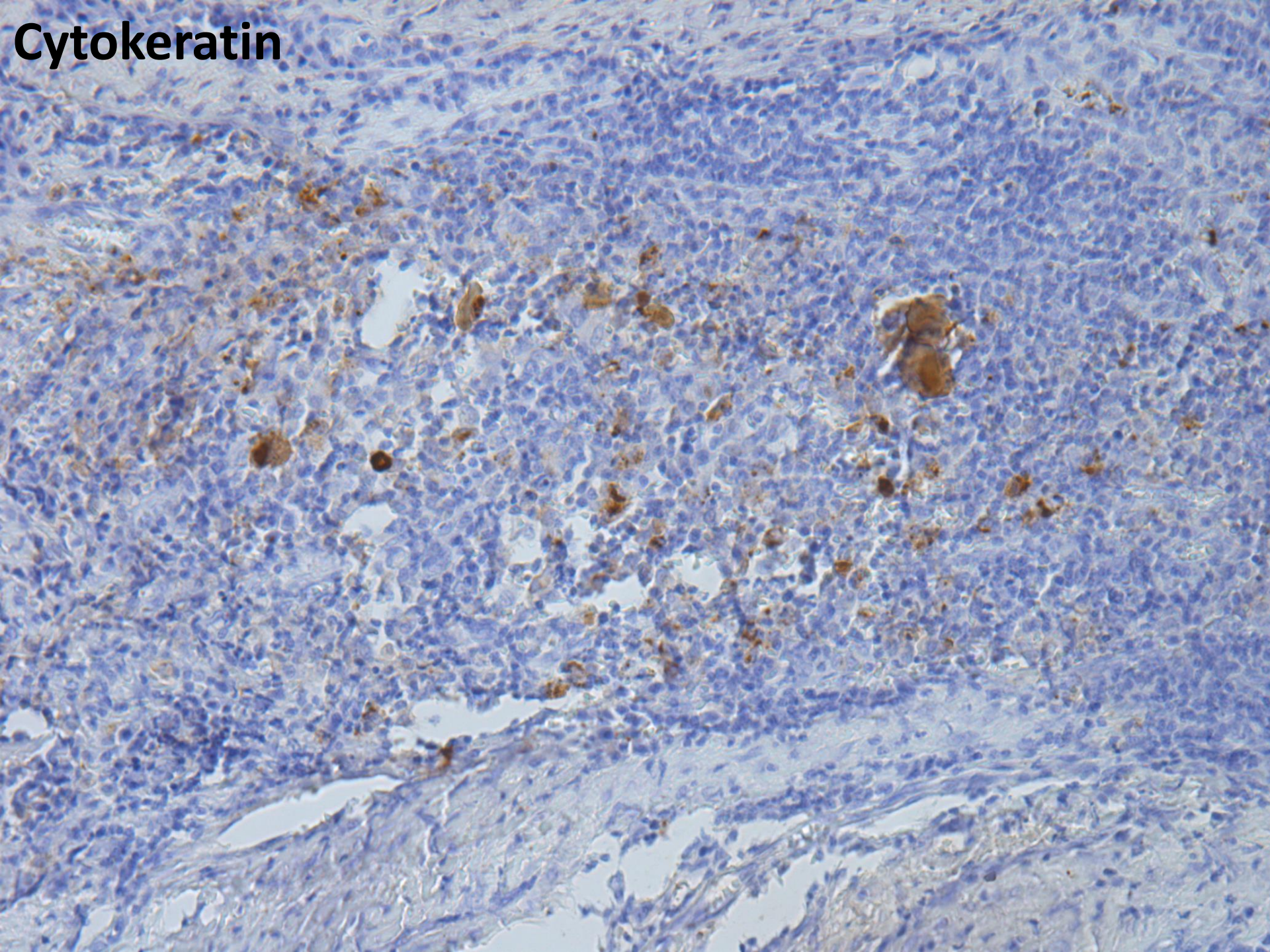




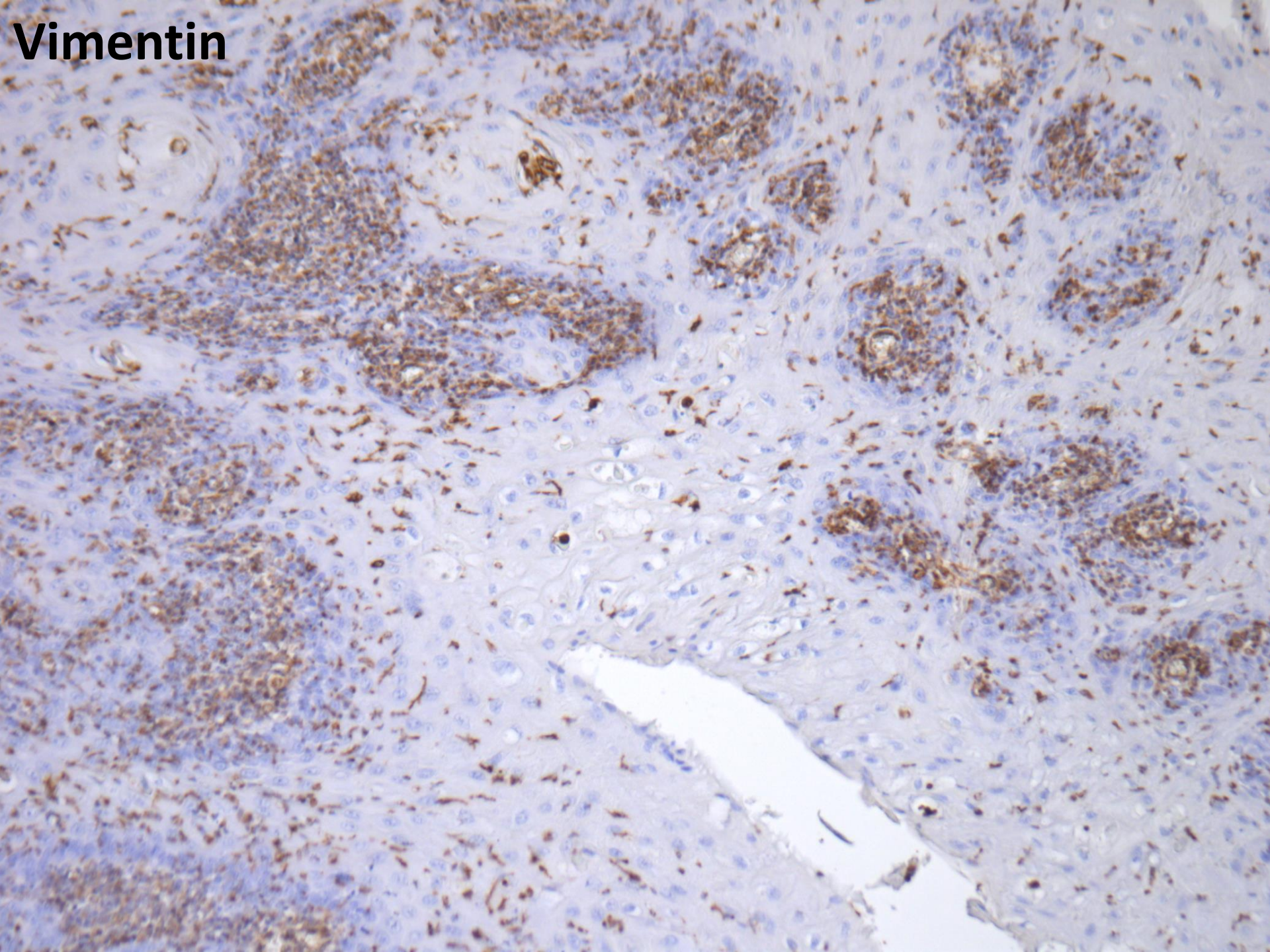
Cytokeratin

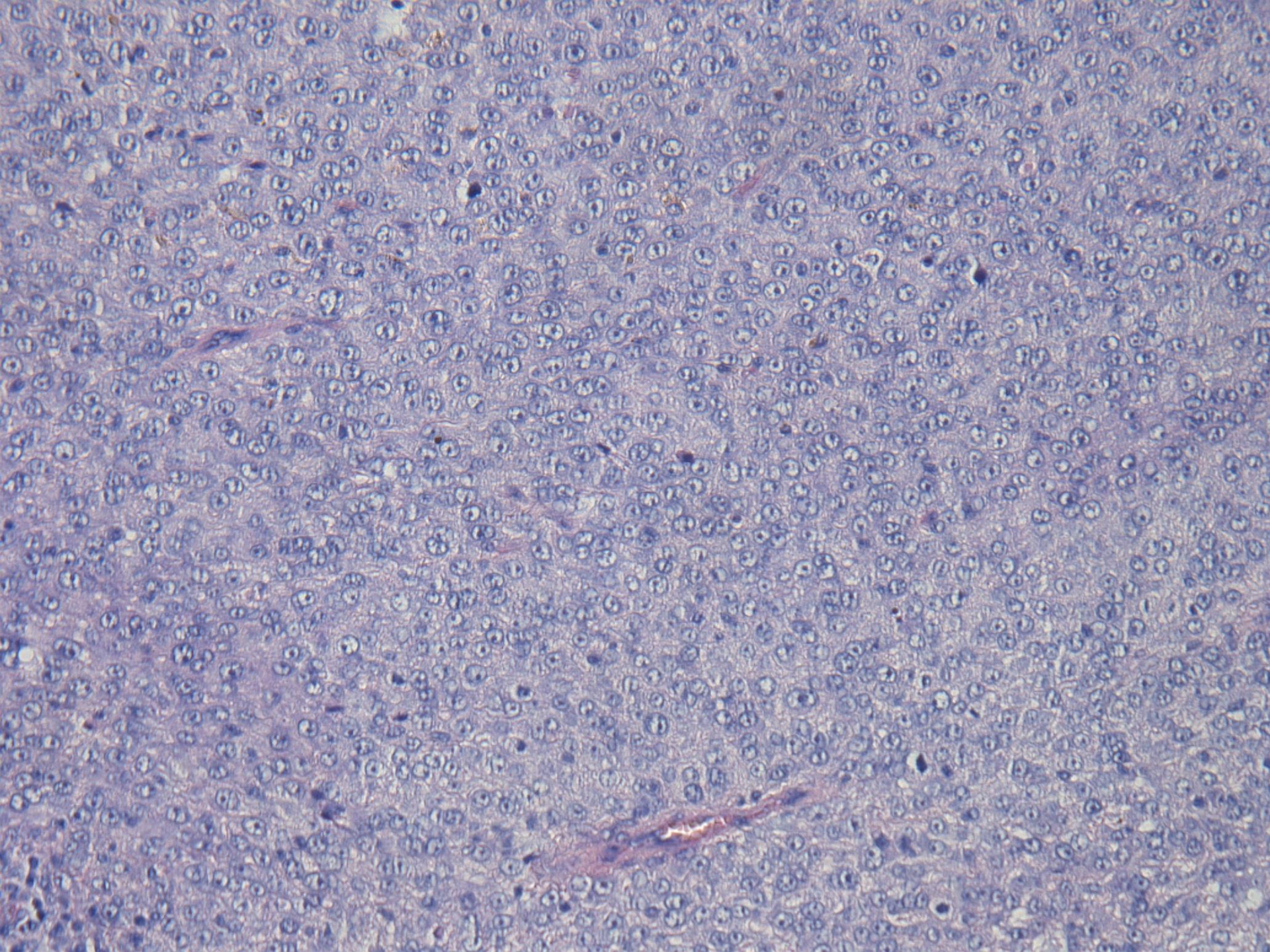


Cytokeratin

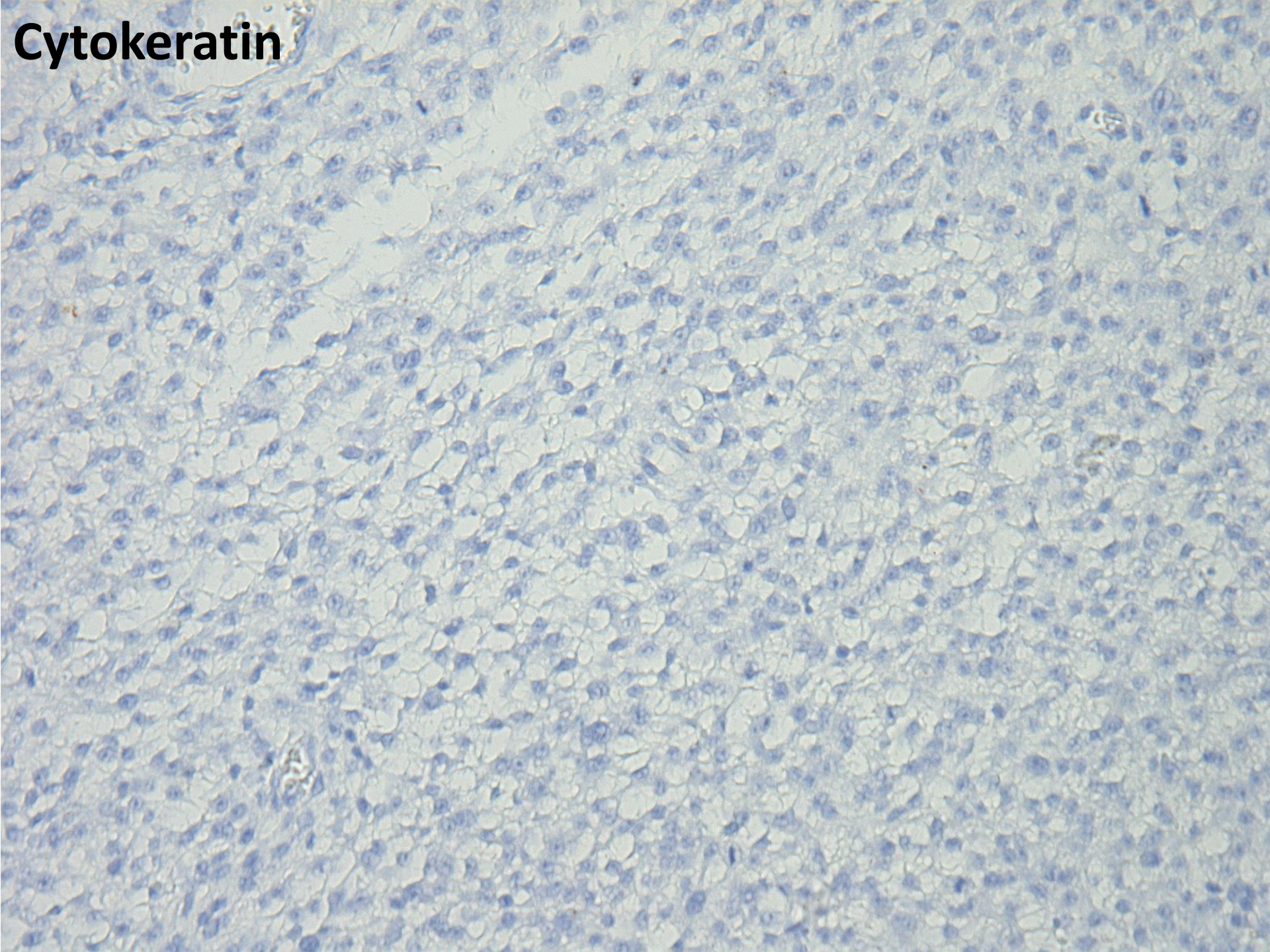


Vimentin

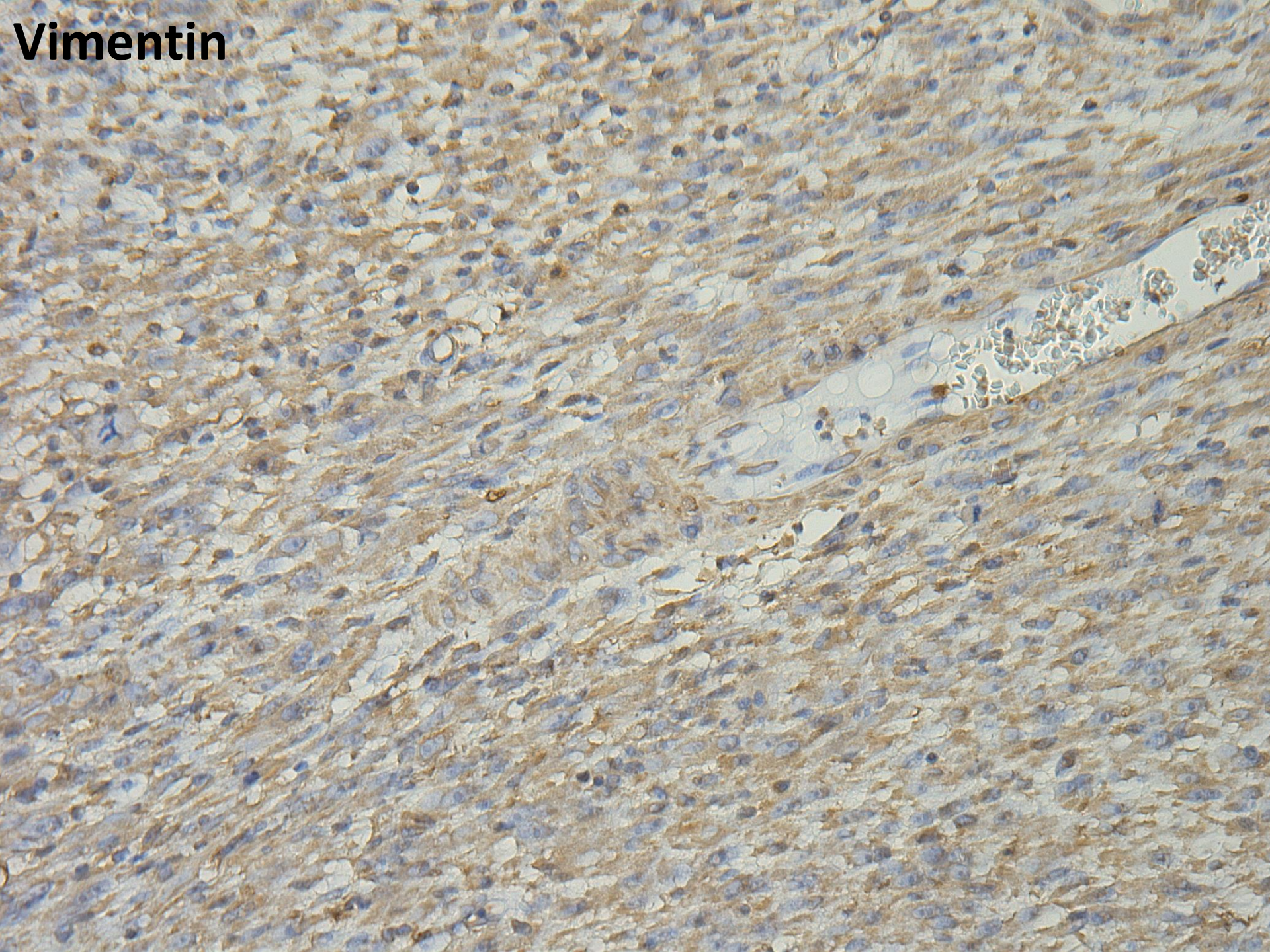




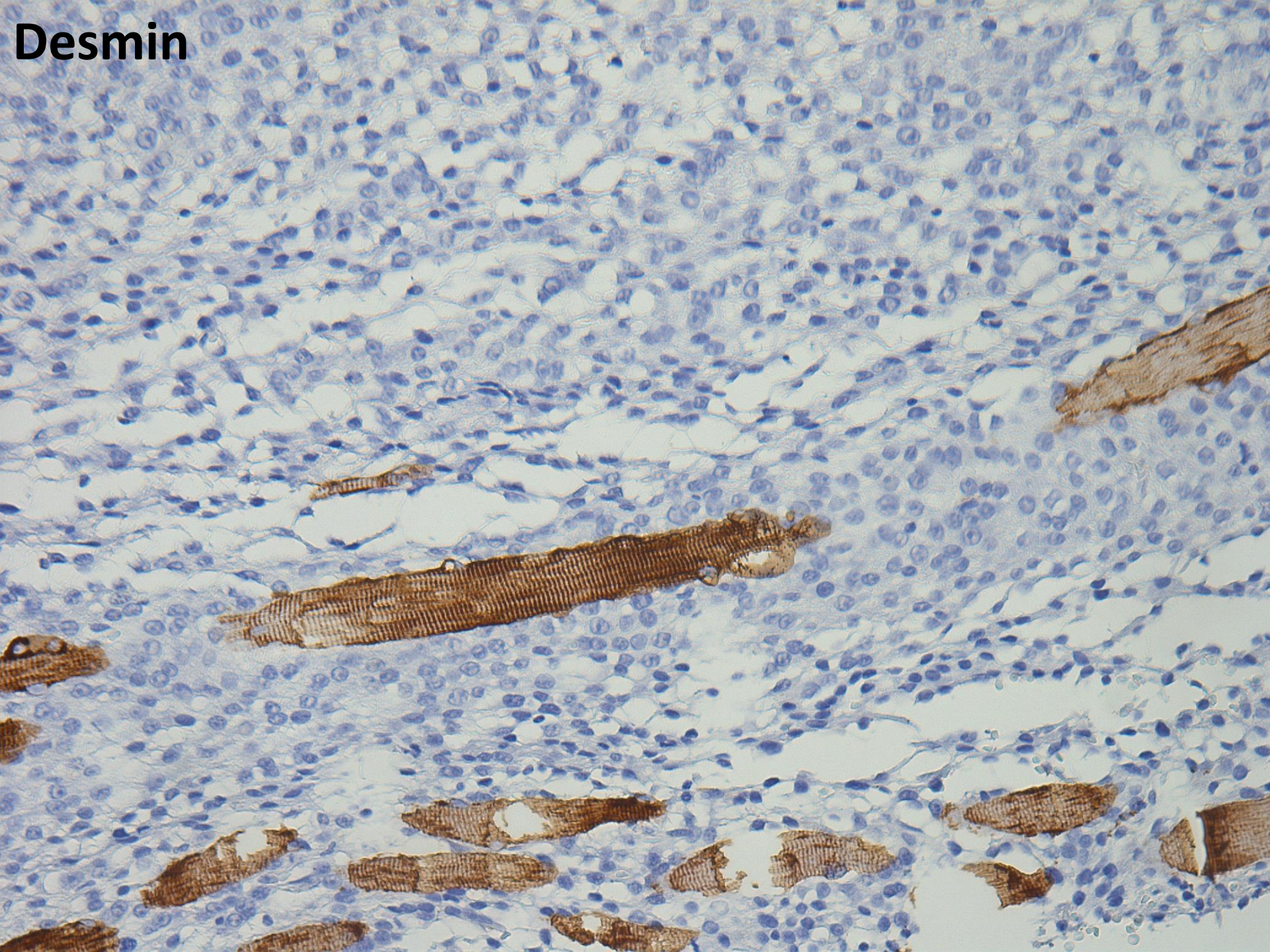
Cytokeratin

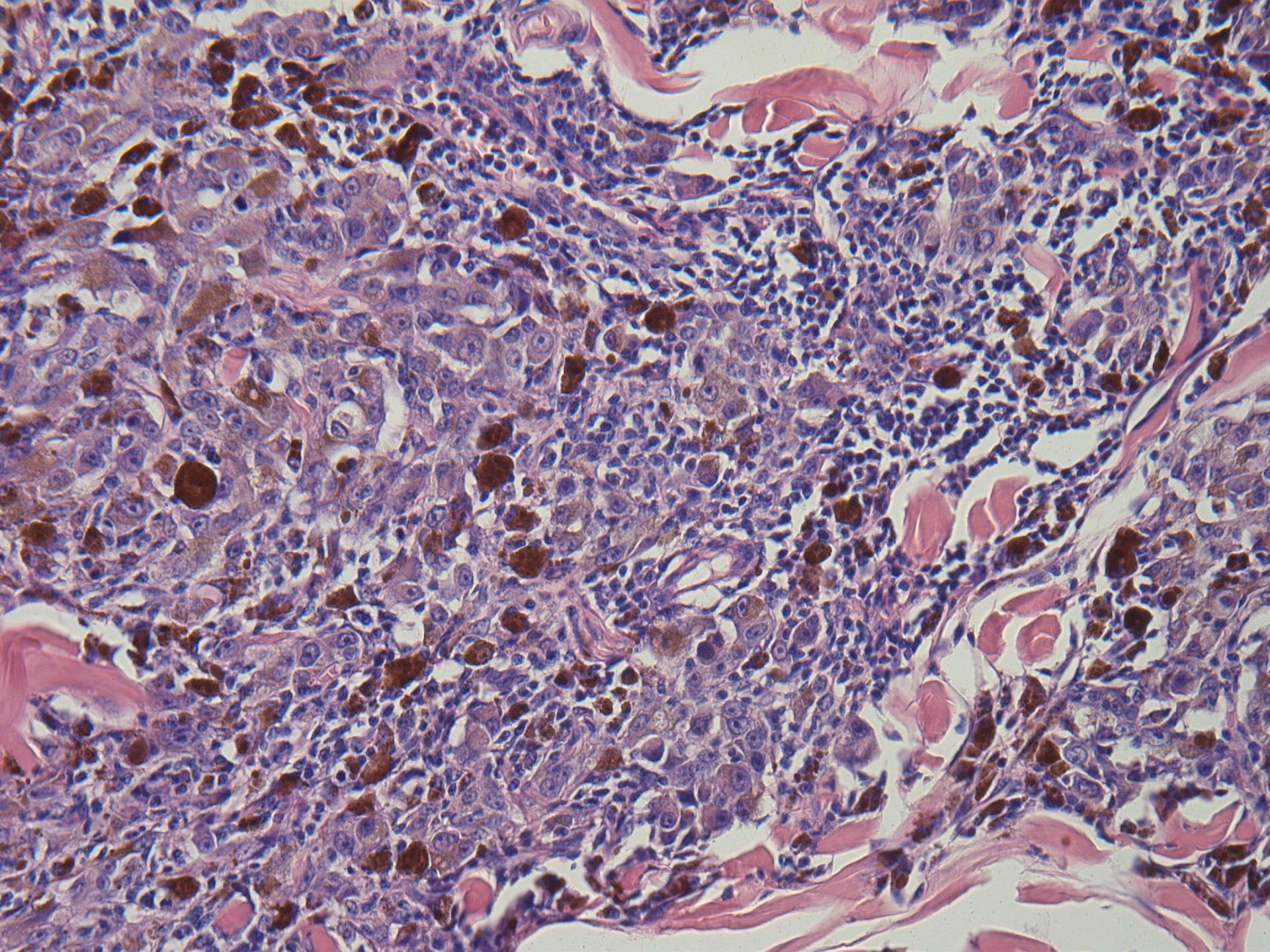


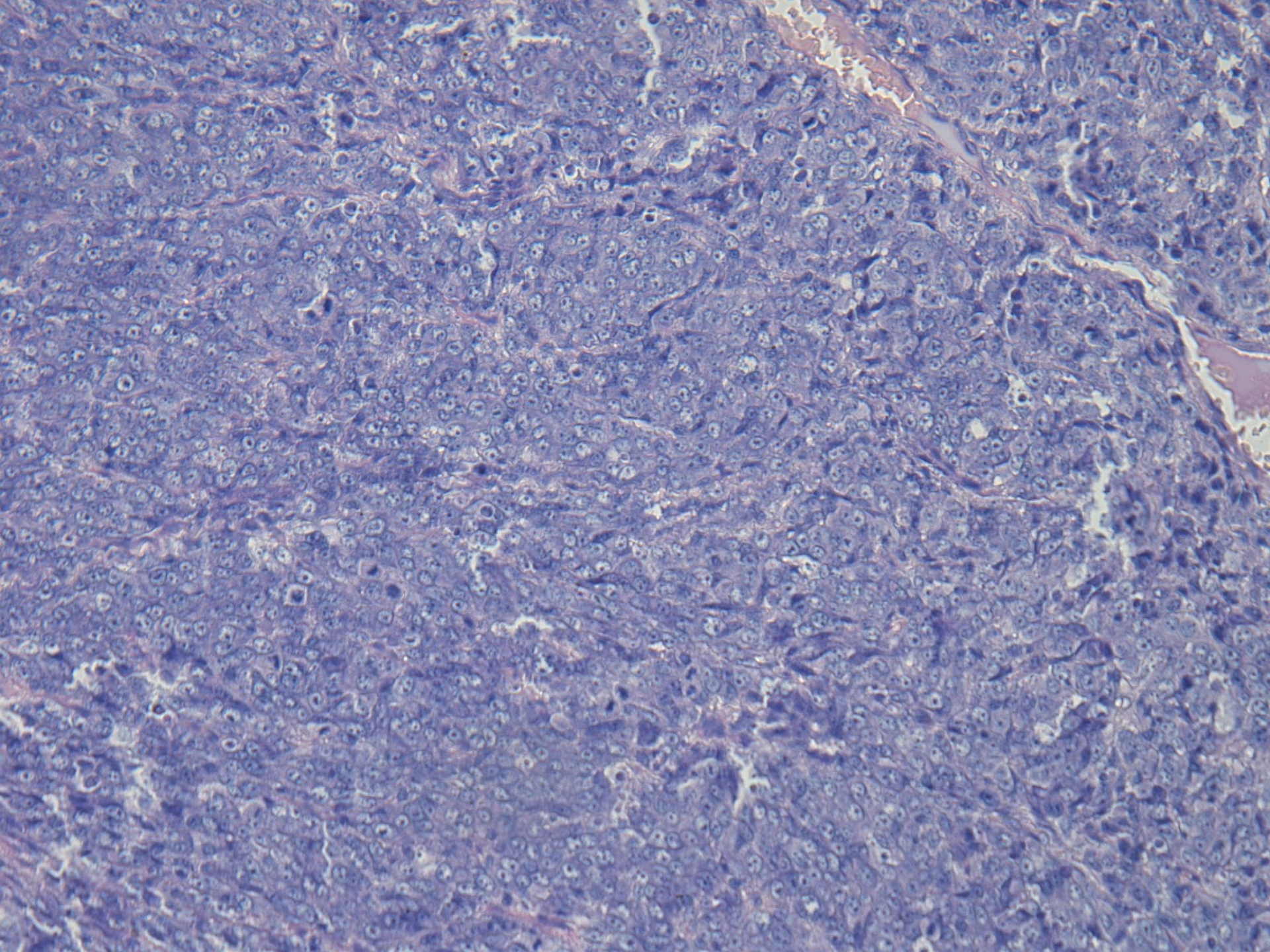
Vimentin



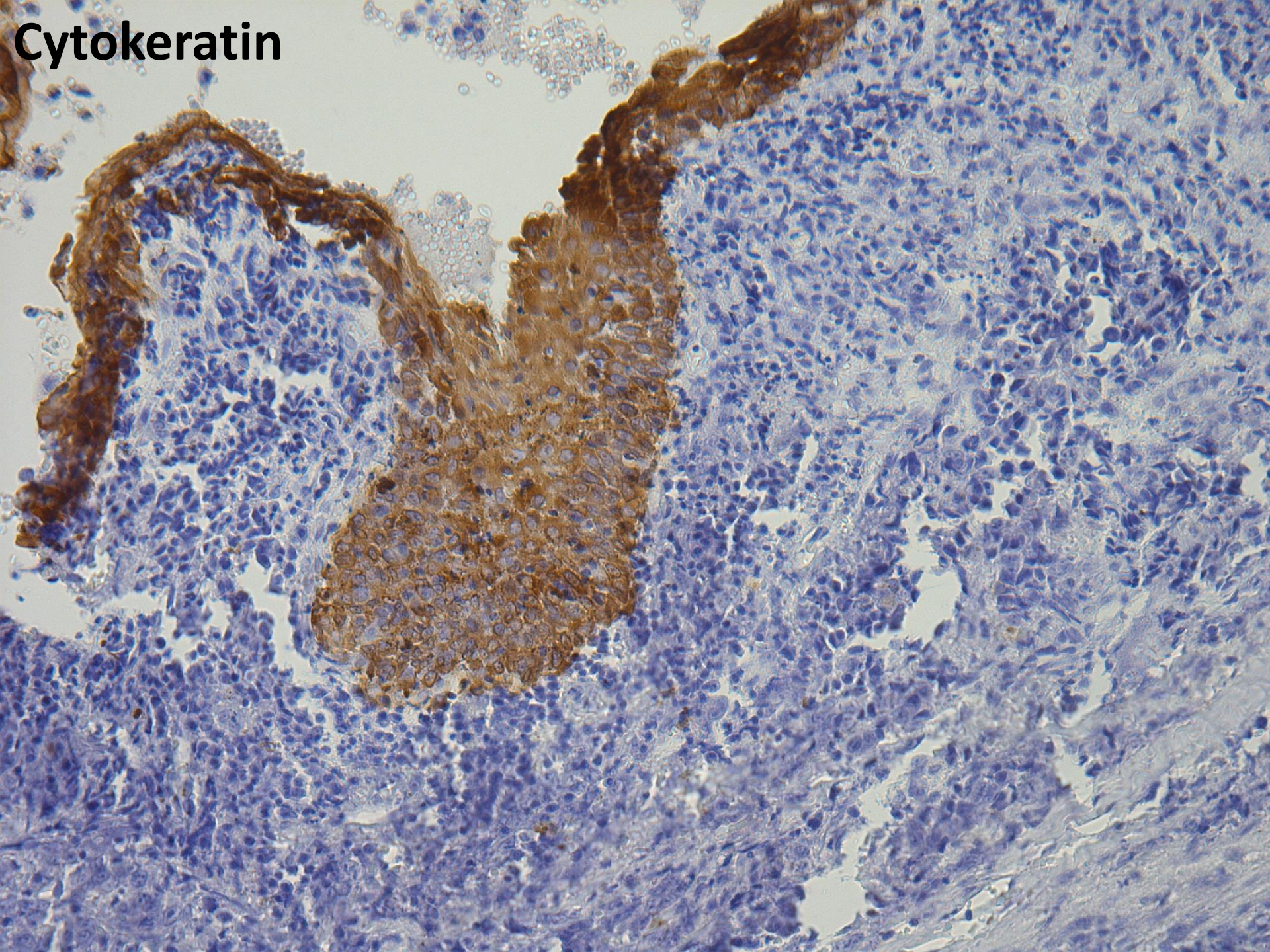
Desmin



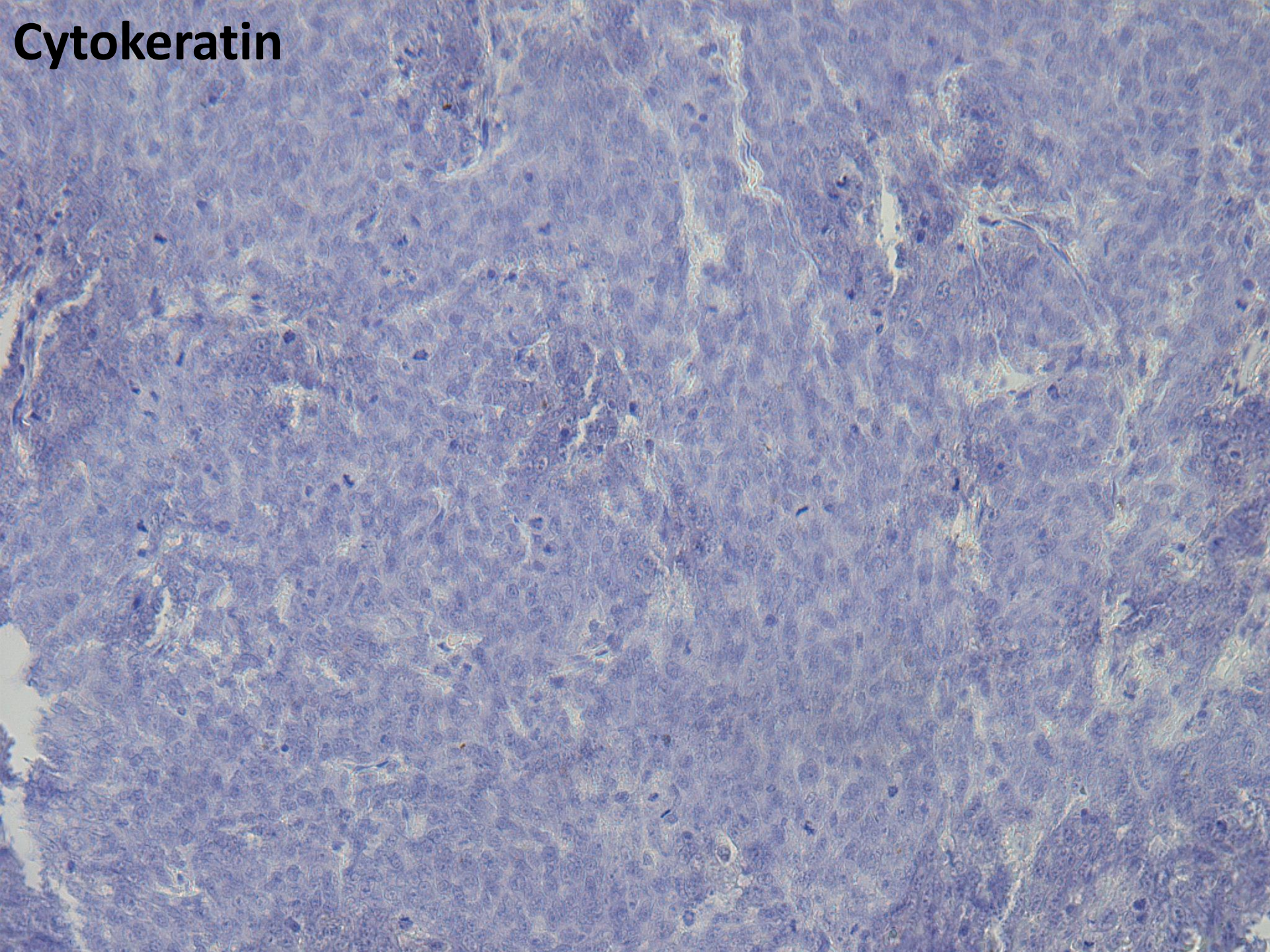




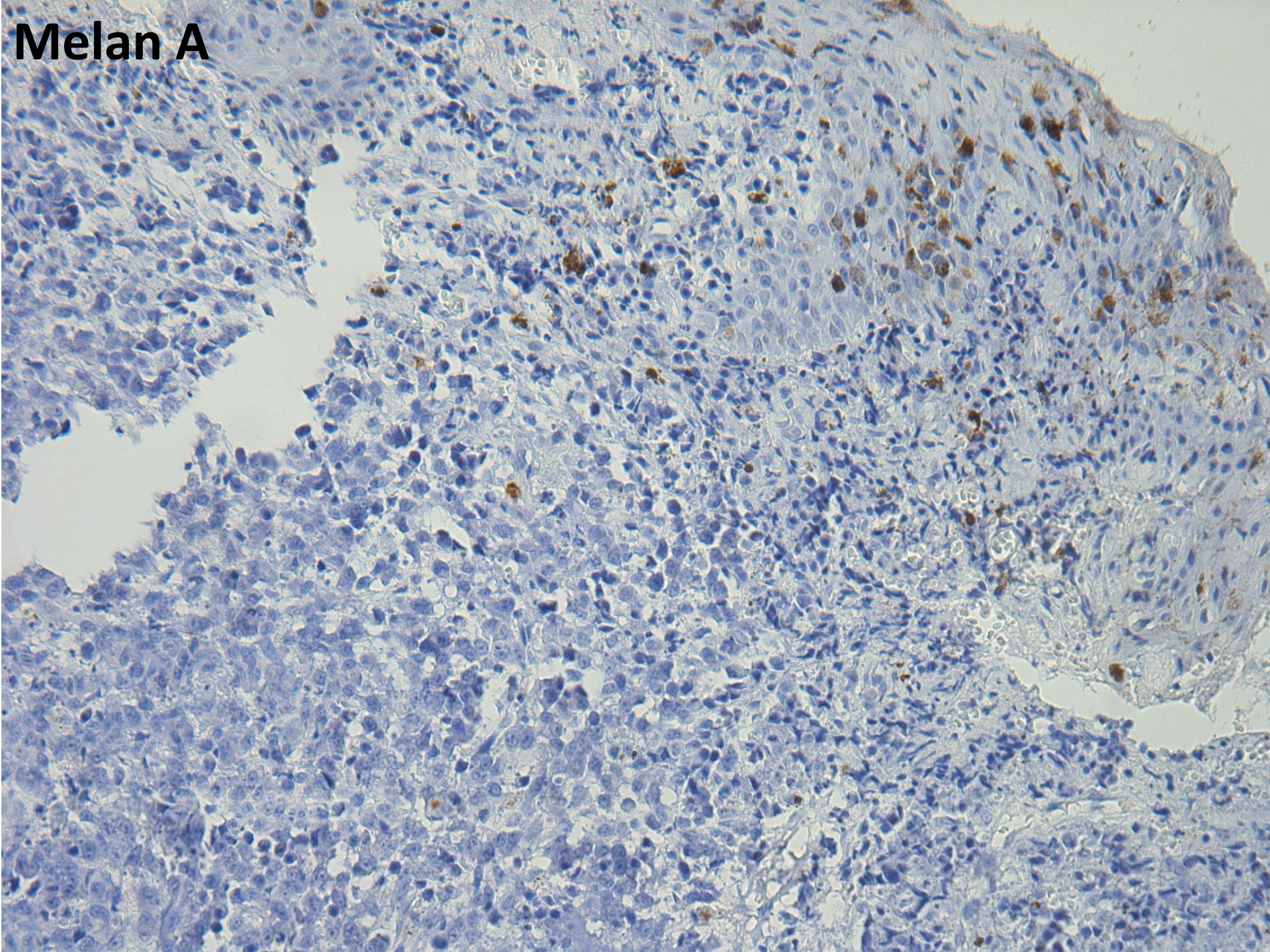
Cytokeratin



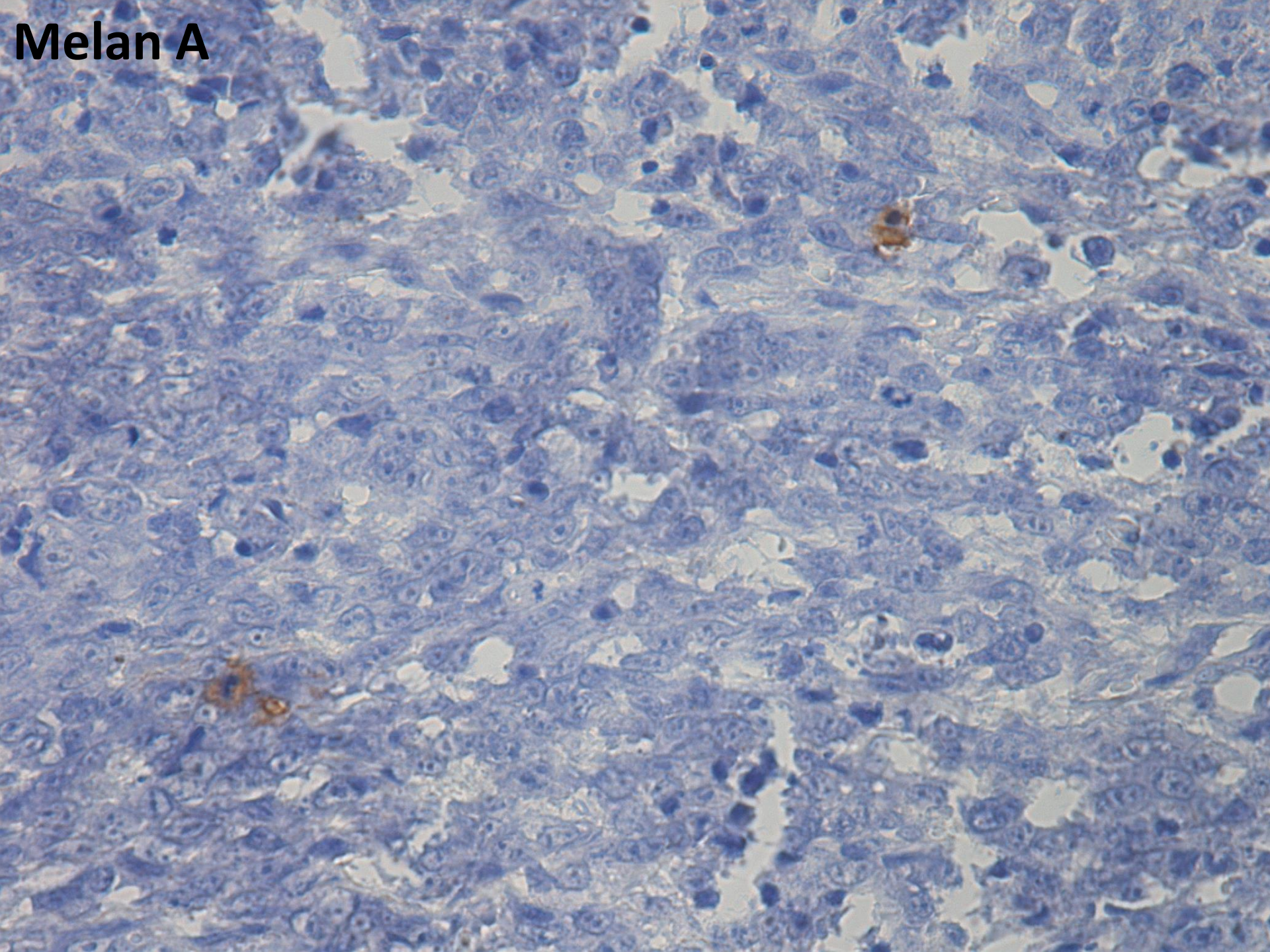
Cytokeratin

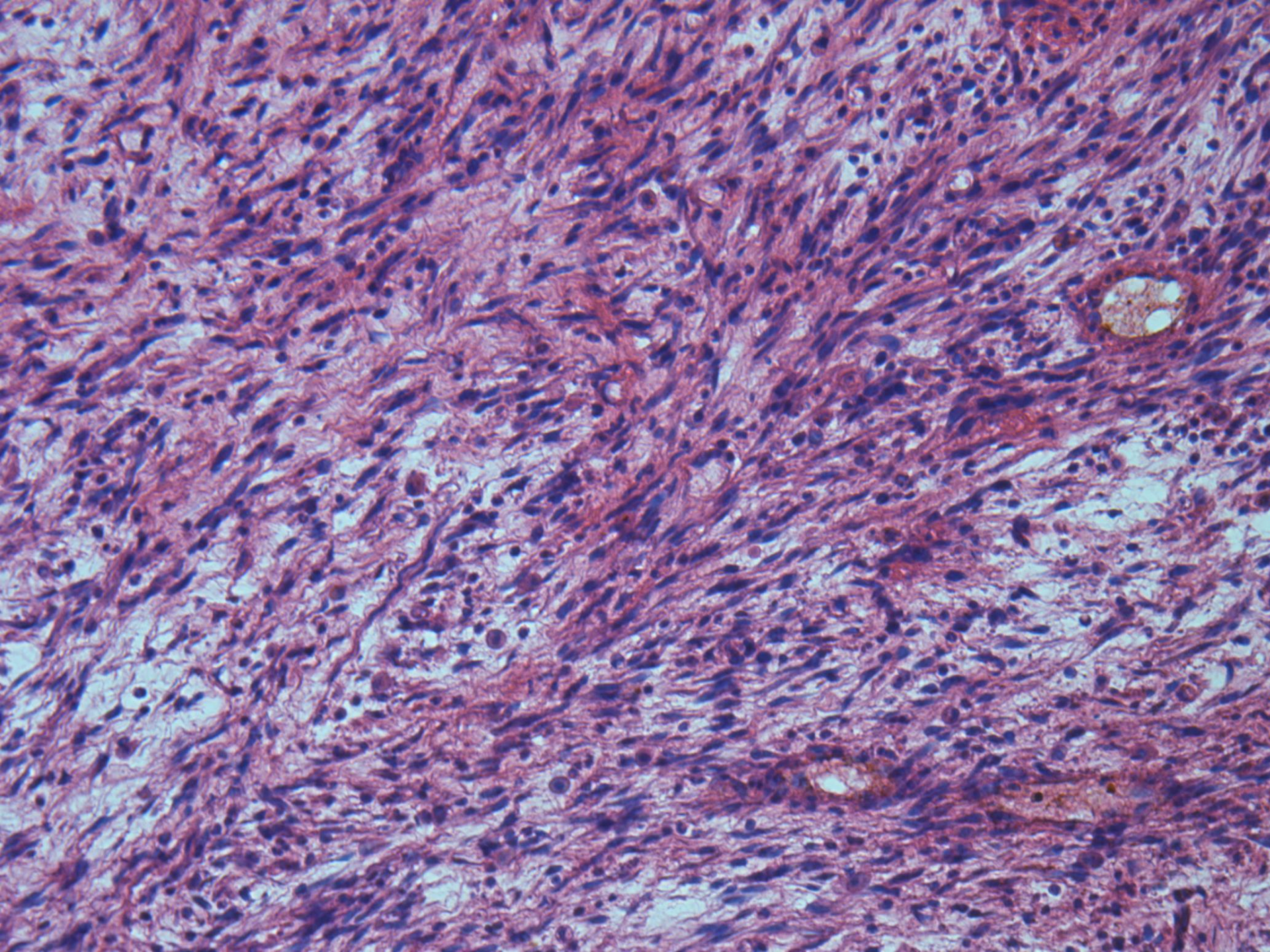


Melan A

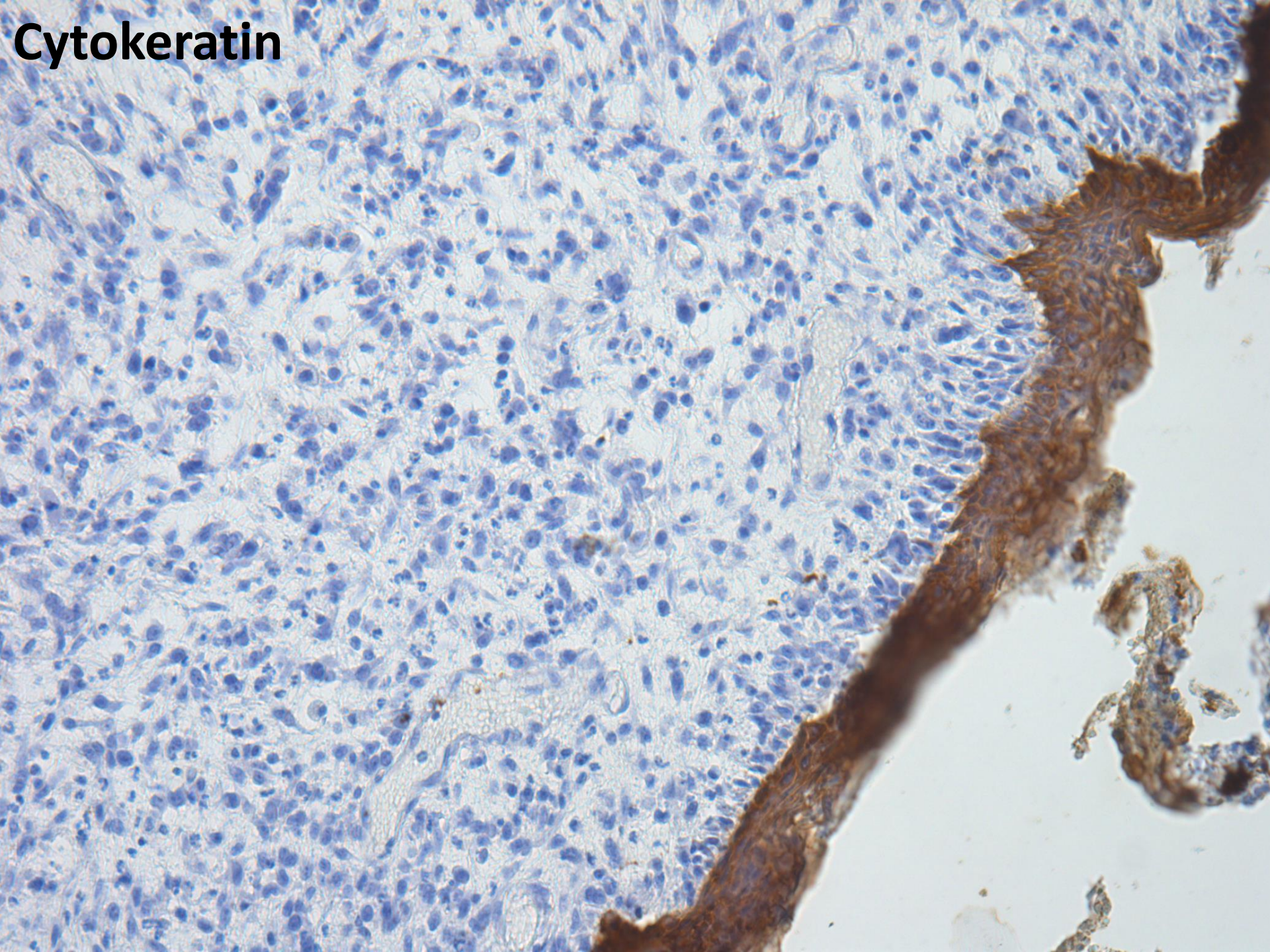


Melan A

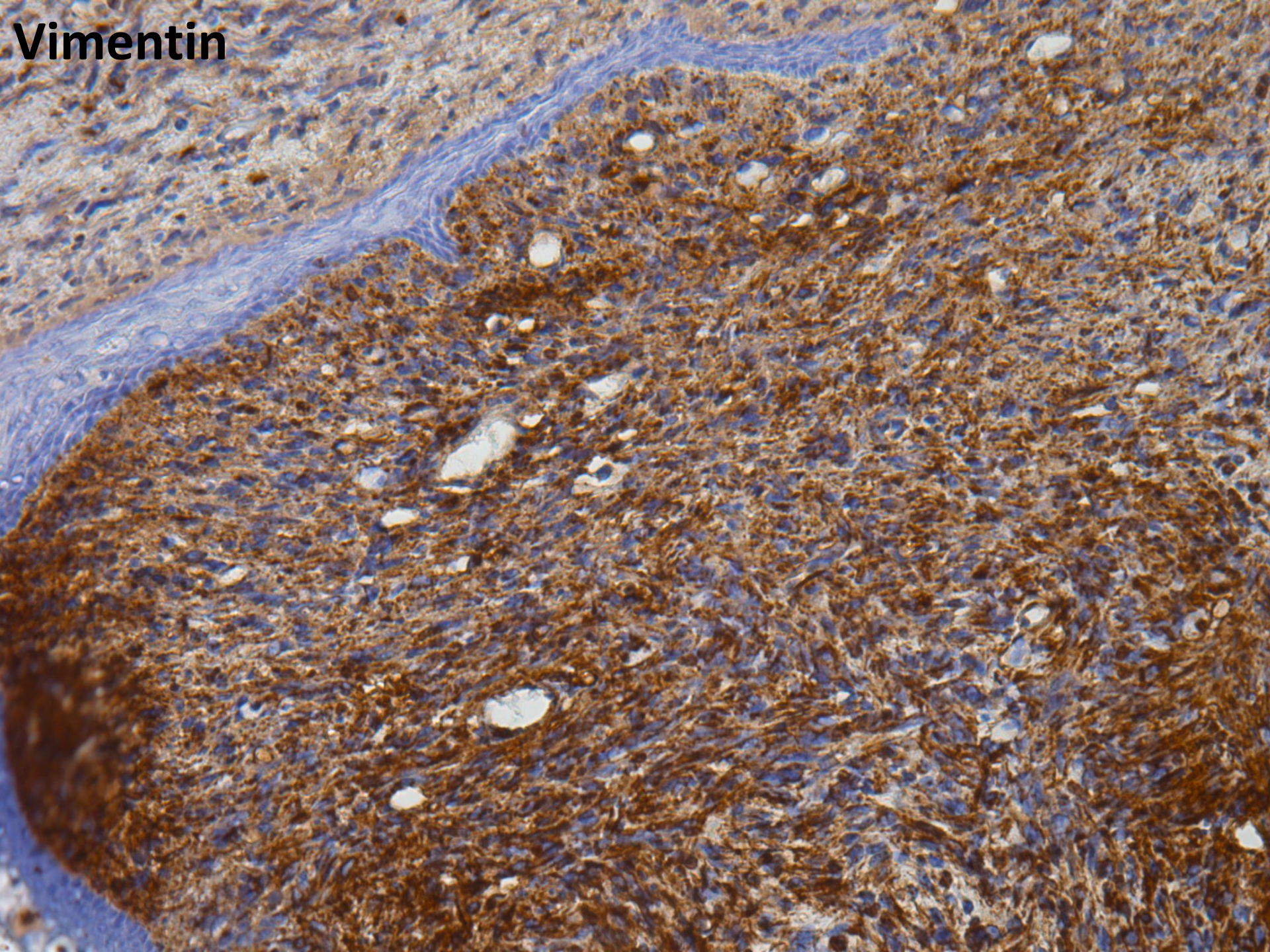




Cytokeratin



Vimentin



Desmin

