



RNA-ISH Proteolysis System

80 Anwendungen, formamidfrei

Zur Bestimmung der proteolytischen
Vorbehandlungszeit von paraffineingebettetem Gewebe für die
RNA-*in situ* Hybridisierung

FOR RESEARCH USE ONLY

Produkt Nr.: [T-1007](#)

Herstellung: ZytoVision GmbH, Fischkai 1, D-27572 Bremerhaven

Telefon: +49 (0) 471-483 230 0, Telefax: +49 (0) 471-483 250 9

info@zytovision.com, <http://www.zytovision.com>

Inhalt

1.	Bestimmung der Anwendung.....	1
2.	Prinzip der Methode.....	1
3.	Sicherheitshinweise und Entsorgung.....	2
4.	Das RNA-ISH Proteolysis System	2
4.1	Lagerung und Haltbarkeit	2
4.2	Komponenten	3
4.3	Untersuchungsmaterial	3
4.4	Zusätzlich benötigtes Material	4
5.	Ausführung der RNA-ISH Proteolyse Reihe.....	4
5.1	Vorbereitende Schritte.....	4
5.2	Die proteolytische Zeitreihe	5
5.3	RNA-Hybridisierung.....	6
5.4	Detektion	6
6.	Interpretation der Ergebnisse.....	7
7.	Probleme und mögliche Ursachen	8

1. Bestimmung der Anwendung

Das **RNA-ISH Proteolysis** System ist zur experimentellen Bestimmung der notwendigen Proteolysezeit für die RNA *in situ* Hybridisierung paraffineingebetteter Gewebe- oder Zellproben bestimmt.

Dieses Produkt ist nur für Forschungszwecke und nicht für den Gebrauch in diagnostischen Anwendungen bestimmt.

2. Prinzip der Methode

Das Vorkommen von bestimmten Nukleinsäuresequenzen in Zellen oder Gewebe kann mit Hilfe von markierten Gensonden durch *in situ* Hybridisierung nachgewiesen werden. Die Hybridisierung führt zur Duplexbildung zwischen im Untersuchungsgegenstand vorliegenden Sequenzen und der entsprechenden Gensonde.

Das Ergebnis einer *in situ* Hybridisierung ist von dem vorliegenden Untersuchungsgegenstand, seiner Fixierung, der Schnittdicke des Präparates und der proteolytischen Vorbehandlung abhängig. Während die Fixierung und Paraffineinbettung relativ einfach zu standardisieren ist, ist die zur Erzielung optimaler Hybridisierungsergebnisse notwendige Proteolysezeit für jedes Gewebe einzeln zu bestimmen. Das **RNA-ISH Proteolysis** System erleichtert diese Bestimmung auf einfache Weise. Insbesondere mit *ZytoFast* Systemen der *ZytoVision* besteht eine hohe Kompatibilität, sodass die mit dem **RNA-ISH Proteolysis** System gewonnenen Ergebnisse direkt in die *ZytoFast* Anwendung übertragen werden können.

Als Testsonden enthält das **RNA-ISH Proteolysis** System für den RNA Nachweis geeignete biotinylierte Oligonukleotid-Sonden. Die Hybridisierung der Sonden mit im Untersuchungsgegenstand vorliegenden Sequenzen wird indirekt über einen gegen die Markierung gerichteten, enzymkonjugierten Antikörper nachgewiesen: die enzymatische Umsetzung eines chromogenen Substrates führt zur Bildung eines lichtmikroskopisch erkennbaren Farb-Präzipitats. Selbst

hergestellte Oligonukleotid-Sonden lassen sich selbstverständlich nach der Bestimmung der notwendigen Proteolyse-Zeit ebenfalls zuverlässig anwenden.

3. Sicherheitshinweise und Entsorgung

- ✓ Bedienungsanleitung vor Durchführung der Anwendung lesen!
- ✓ Reagenzien nach Ablauf des Haltbarkeitsdatums nicht mehr benutzen!
- ✓ Kreuzkontaminationen und mikrobakterielle Kontaminationen der Reagenzien vermeiden!
- ✓ Einige der System-Komponenten enthalten gesundheitsgefährdende Stoffe (Kathon, Farbsubstrat) in geringen Konzentrationen und Volumina. Der direkte Kontakt mit den Reagenzien muss vermieden werden. Entsprechende Schutzmaßnahmen sind zu treffen (Benutzung von Einmalhandschuhen, Schutzbrille und Laborbekleidung)!
- ✓ Bei Kontakt mit den Reagenzien müssen die betroffenen Stellen sofort mit viel Wasser abgespült werden!
- ✓ Niemals Lösungen mit dem Mund pipettieren!
- ✓ Die Entsorgung der Reagenzien unterliegt den örtlichen Regularien!

4. Das RNA-ISH Proteolysis System

4.1 Lagerung und Haltbarkeit

Die Bestandteile des RNA-ISH Proteolysis Systems müssen bei 2°C- 8°C dunkel gelagert werden.

Einige Komponenten sind mit Kathon stabilisiert. Unter den angegebenen Lagerungsbedingungen sind die Komponenten des RNA-ISH Proteolysis Systems bis zu dem auf der Verpackung angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil.

4.2 Komponenten

Das RNA-ISH Proteolysis System besteht aus folgenden Komponenten:

Code	Komponente	Menge	Gefäß
1	Pepsin Solution	16 ml	Tropfflasche, weißer Verschluss
2a	(+) Control Probe (RNA)	0,8 ml	Reaktionsgefäß, blauer Deckel
2b	(-) Control Probe (RNA)	0,8 ml	Reaktionsgefäß, weißer Deckel
3	AP-anti-Biotin	16 ml	Tropfflasche, gelber Verschluss
4	AP-Substrate	16 ml	Tropfflasche, blauer Verschluss
5	20x Wash Buffer	3x 50 ml	Schraubdeckelflasche
	Bedienungsanleitung	1	

Die Komponenten 1,3,und 4 sind ausreichend für ca. 80 Anwendungen. Die Komponenten 2a, 2b, sind ausreichend für je ca. 40 Anwendungen. Die Komponente 5 ist ausreichend für 25 Küvetten á 80 ml.

4.3 Untersuchungsmaterial

Das ZytoVision RNA-ISH Proteolysis System ist auf formalinfixierte, paraffineingebettete Gewebe- und Zellproben optimiert. Unterschiedlich fixiertes- oder eingebettetes Untersuchungsmaterial (z.B. Kryostatschnitte) kann die Anpassung des Durchführungs-Protokolls durch den Anwender erfordern. Eine notwendige Anpassung wird von unseren Experten gerne unterstützt.

Wir empfehlen folgende Gewebeaufbereitung:

- ✓ Fixierung in 10% neutralgepuffertem Formalin für 24 h bei RT

Um eine optimale und gleichmäßige Fixierung und Paraffin-Einbettung zu erzielen, sollte die Probengröße nicht mehr als 0,5 cm³ betragen.

- ✓ Standardmäßige Prozessierung und Paraffin-Einbettung

Benutzen Sie qualitativ hochwertiges Paraffin. Die Infiltration und Einbettung sollte bei Temperaturen unter 65°C stattfinden.

- ✓ Mikrotomschnitte von 2-4 µm-Schnittdicke anfertigen

Ziehen Sie die Schnitte auf Silane-beschichtete Objektträger oder Adhäsions-Objektträger (z.B. HistoBond®), 2-16 h bei 50°C-60°C fixieren.

4.4 Zusätzlich benötigtes Material

Folgende Reagenzien und Materialien sind nicht im System enthalten:

- *Paraffineingebettete Gewebe-/Zellprobe*
- *Mikrotom*
- *Wasserbad*
- *Silane-beschichtete Objektträger oder geeignete Adhäsions-Objektträger*
- *Hybridisierungsöfen oder Wärmeplatte*
- *Waschküvetten, 50-80 ml*
- *Feuchte Kammer*
- *Pipette (20 µl)*
- *Klebspistole mit Heißkleber oder Alternative*
- *Skalpell*
- *Ethanol 100%*
- *Xylol 100% oder geeignete Entparaffinierungs-Reagenzien*
- *Destilliertes oder deionisiertes Wasser*
- *Gegenfärbelösung*
- *wässriges Eindeckmedium*
- *Deckgläser (18 x 18 mm)*
- *Lichtmikroskop*

5. Ausführung der RNA-ISH Proteolyse Reihe

Die gesamte Durchführung muss RNase frei erfolgen!

5.1 Vorbereitende Schritte

Herstellung 1x Wash Buffer : 1 Teil 20x Wash Buffer (**5**) mit 19 Teilen deionisiertem oder destilliertem Wasser verdünnen. Verdünnter 1x Wash Buffer ist bei 4°C eine Woche haltbar.

Sonden-Lösungen (2a, b): Vor Gebrauch auf Hybridisierungstemperatur vorwärmen. Es kann in der Kälte zu Präzipitatbildung kommen. Die Präzipitate lösen sich schon bei leichtem Erwärmen. Vor der Anwendung schütteln bzw. vortexen.

Detektions- und Waschreagenzien (3, 4, 5): Vor Gebrauch auf Raumtemperatur bringen. Vor der Anwendung schütteln bzw. vortexen.

Untersuchungsmaterial: Entparaffinieren (Erwärmen der Paraffinschnitte, 10 min bei 70°C, 2x 10 min in 100% Xylol, 1x 5 min in 100% Ethanol). Anschließend die Schnitte trocknen lassen.

Wir empfehlen für die Bestimmung der optimalen Proteolysezeit 20 Objektträger mit dem Untersuchungsmaterial bereitzustellen.

5.2 Die proteolytische Zeitreihe

Zur Bestimmung der optimalen Proteolyse-Zeit empfehlen wir in einem ersten Test sowohl positiv als auch negativ Sonden zu folgenden Pepsin-Inkubationszeiten zu hybridisieren:

Nummer	Zellmaterial	Gewebematerial
1,2	0 s	0 s
3,4	30 s	1 min
5,6	1 min	2 min
7,8	2 min	5 min
9,10	3 min	10 min
11,12	5 min	15 min
13,14	10 min	20 min
15,16	15 min	30 min
17,18	20 min	45 min
19,20	30 min	60 min

Dabei sind die ungerade nummerierten Objektträger für die (+) Control Probe (RNA) und die gerade nummerierten Objektträger für die (-) Control Probe (RNA) vorgesehen.

1. 4-5 Tropfen Pepsin Solution (**1**) pro Präparat aufträufeln und bei 37°C inkubieren (z.B. auf einer Heizplatte)

Wir empfehlen mit der längsten Inkubationszeit zu beginnen und die weiteren Inkubationen zeitlich abgestimmt zu starten. Dies erlaubt ein simultanes Stoppen der Reaktion für alle Ansätze und eine gleichzeitige Weiterbehandlung aller Präparate (z.B. T=0 min: Nummer 19,20 ansetzen; T=15 min: Nummer 17,18 ansetzen usw.).

Achten Sie darauf, dass die feuchte Kammer vorgewärmt ist und die Belüftungszeit minimiert wird.

In seltenen Fällen, kann es vorkommen, dass sehr kurze Proteolysezeiten für ein ein-deutiges Hybridisierungssignal notwendig sind. Erkennbar wird dies

durch den Verlust der Gewebsintegrität bzw. der gewebstypischen Morphologie nach dem proteolytischen Verdau des Untersuchungsmaterials. In diesen Fällen empfehlen wir eine vier- bis fünffache Verdünnung der Pepsinlösung mit 0,1 M HCl.

- 2.** Abstoppen der Pepsin-Behandlung: 10 s in 100% Ethanol

Ein Überschuss Ethanol z. B. durch Abstoppen in einer Küvette hilft die Proteolysezeit exakt zu steuern.

Anschließend die Schnitte an der Luft antrocknen lassen.

5.3 RNA-Hybridisierung

- 1.** Auf einen Objektträger für jeden Proteolyse-Zeitpunkt 20 µl (+) **Control Probe (RNA) (2a)** auf das Untersuchungsmaterial pipettieren

- 2.** Auf den zweiten Objektträgers des jeweiligen Proteolyse-Zeitpunktes 20 µl (-) **Control Probe (RNA) (2b)** auf das Untersuchungsmaterial pipettieren

Die Gewebe-/Zellschnitte dürfen während der gesamten Hybridisierungs- und Detektionsschritte nicht austrocknen.

- 3.** Die Schnitte mit einem Deckglas luftblasenfrei abdecken und versiegeln (z.B. Deckglasränder mit Fixogum oder einer Schicht Heißkleber mit Hilfe einer Klebepistole abdichten)

- 4.** Hybridisierung: 1 h bei 55°C (z. B. in einem Hybridisierungssofen oder auf einer Wärmeplatte)

- 5.** Die Deckgläser mit einem Skalpell vorsichtig entfernen

Lässt sich nur die Versiegelung entfernen und die Deckgläser bleiben auf dem Objektträger zurück, können diese beim ersten nachfolgenden Waschschrift im 1x Wash Buffer abgeschwemmt werden. In diesem Fall sollte der erste Waschschrift auf 10 min verlängert werden.

- 6.** Mit 1x Wash Buffer (aus **5** hergestellt) 1x 5min bei 55°C und 2x 5min bei RT waschen

Anschließend die Schnitte an der Luft antrocknen lassen.

5.4 Detektion

- 1.** 4-5 Tropfen AP-anti-Biotin (**3**) auf den Untersuchungsgegenstand träufeln

- 2.** 30 min bei 34°C-37°C in einer feuchten Kammer inkubieren
- 3.** 2x 2 min in 1x Wash Buffer (aus **5** hergestellt) und 1x 2 min in destilliertem oder deionisiertem Wasser waschen

Anschließend die Schnitte an der Luft antrocknen lassen.

- 4.** 4-5 Tropfen AP-Substrate (**4**) auf den Untersuchungsgegenstand träufeln
- 5.** 20-40 min bei 34°C-37°C in einer feuchten Kammer inkubieren

Die Beobachtung der Farbentwicklung in Zeitabständen von ca. 10 min unter dem Mikroskop wird empfohlen. Dabei muss vermieden werden, dass das Substrat zu lange dem Licht ausgesetzt ist. Die Farbreaktion sollte für alle Präparate gleich lang durchgeführt werden.

- 6.** 3x 2 min in destilliertem oder deionisiertem Wasser waschen

Anschließend die Schnitte an der Luft antrocknen lassen.

Eine Gegenfärbung des Untersuchungsgegenstandes ist hier durchführbar.

- 7.** Eindeckeln der Schnitte.

Das Farbpräzipitat ist in Alkohol unlöslich. Wir empfehlen das Eindeckeln der Schnitte in z.B. Glycerin oder in einem wässrigen Einbettmedium.

6. Interpretation der Ergebnisse

In der Regel sind verschiedene Färbeintensitäten zu den verschiedenen Proteolysezeiten zu beobachten. Ein Optimum für die Färbeintensität bei fehlender Hintergrundfärbung sollte klar erkennbar sein. Allerdings wird bei diesem Proteolysezeit-Optimum oft schon eine schwindende Gewebsintegrität beobachtet. In diesem Fall empfehlen wir in einer zweiten Testreihe Proteolysezeiten um das in dem ersten Test festgestellte Zeitoptimum herum zu testen. Hierbei können gewünschte Signalintensität, Gewebemorphologie und Hintergrundfärbung aufeinander abgestimmt werden. Im günstigsten Fall kann eine hohe Signalintensität und zufriedenstellende Gewebemorphologie bei gleichzeitig minimaler unspezifischer Färbung festgestellt werden.

7. Probleme und mögliche Ursachen

Jede Abweichung von den Vorgaben der Bedienungsanleitung kann zu einem fehlenden oder zu schwachen Färbeergebnis führen.

Problem	Mögliche Ursache	Maßnahmen
Schlieren auf dem OT nach Abstoppen der Pepsinbehandlung	Präzipitatbildung	Sofortiges Waschen der OT in destilliertem oder deionisiertem Wasser
schwaches oder kein Signal	sehr wenig oder keine Zielsequenzen vorhanden Fixierung der Zell-/Gewebeprobe nicht optimal	Optimierung der Fixierungszeit
	proteolytische Vorbehandlung nicht optimal	Optimierung der Inkubationszeit
	Hybridisierungstemperatur nicht korrekt	Temperatur überprüfen
	Inkubationszeit mit chromogenem Substrat zu kurz	Verlängerung der Inkubationszeit
ungleichmäßige, z.T. schwache Färbung	unvollständige Entparaffinierung	frische Lösungen verwenden Entparaffinierungszeiten überprüfen
hohe Hintergrundfärbung	endogenes Biotin	Vorbehandlung mit Biotin-Blockreagenzien
	Waschtemperatur nach der Hybridisierung zu niedrig	Temperatur überprüfen
	endogene alkalische Phosphatase	Zugabe von Levamisol zum AP-Substrat
	Substrat-Inkubationszeit zu lang	Verkürzung Inkubationszeit
	Dehydrierung der Schnitte zwischen den einzelnen Inkubationsschritten	Dehydrierung vermeiden
Schnitt löst sich vom Objektträger	proteolytische Vorbehandlung zu stark	Inkubationszeit verkürzen
	ungeeignete Objektträgerbeschichtung	geeignete Objektträger verwenden
Farbpräzipitate	Kristallines Farbsubstrat	Erwärmen der Substratlösung, Filtration

Stand Januar 2005 (1.0)

ZytoVision GmbH

Fischkai 1

D-27572 Bremerhaven

Telefon: +49 (0) 471-483 230 0

Telefax: +49 (0) 471-483 250 9

info@zytovision.com

<http://www.zytovision.com>