

Gebrauchsanweisung

Instructions for use

HOPE FIXATION

**Hepes Glutamic Acid Buffer Mediated
Organic Solvent Protection Effect**

Deutsch / English

Stand: 06.01.04

TECHNISCHE ANLEITUNG ZUR HOPE-FIXIERUNG

Allgemeine Sicherheitshinweise:

Die HOPE-Technik wird zur Herstellung von Gewebeschnitten eingesetzt. Im Gegensatz zu anderen Fixierungstechniken werden beim HOPE-Verfahren Strukturproteine, Enzyme und Nukleinsäuren weitgehend in Ihrem nativen Zustand erhalten. Deshalb muss davon ausgegangen werden, dass HOPE-fixiertes Gewebe auch aktive Viren, Prionen, Mikroorganismen etc. enthalten kann. **HOPE-fixierte Gewebelöckchen, Paraffinschnitte usw. müssen folglich als potenziell infektiös betrachtet werden!** Dies gilt für jedes Präparat so lange, bis ein geeigneter Test das Gegenteil beweist. Daher sollten alle Bearbeitungsschritte nach Möglichkeit mit Handschuhen durchgeführt werden.

Die HOPE-Reagenzien enthalten NaN_3 (Natriumazid) in Konzentrationen von maximal 0,03 % (w/v). Erst ab einer Konzentration von 0,1 % ist NaN_3 als Gefahrstoff einzustufen, dennoch stellen wir Ihnen auf Anfrage gern ein Sicherheitsdatenblatt zur Verfügung.

1.) Gewebe-Fixierung und Herstellung von Paraffinlöckchen

- Gewebe sofort nach Entnahme vorzugsweise in einer sterilen Plastik-Petrischale kühl und trocken aufbewahren, dabei vor Austrocknung z.B. durch Parafilm schützen. **Auf keinen Fall physiologische Salzlösungen hinzufügen.** Sobald HOPE-Lösung I zur Verfügung steht, Gewebe in Stücke von maximal 8 x 8 mm Kantenlänge und höchstens 3 mm Dicke zuschneiden und in 5 ml-Einmalröhrchen (acetonefest!) mit Schraubverschluß, vorgefüllt mit eiskalter HOPE-Lösung I (0–4°C), einbringen.
Wichtig: Um Möglichkeiten zur Diffusion zu schaffen, möglichst angeschnittene Organe, bzw. Organscheiben verwenden, also keine gekapselten Organe. Falls tiefgefrorenes Gewebe Verwendung finden soll, so darf dieses **nicht** auftauen, bevor es in die HOPE-Lösung kommt. Allerdings ist bei vorher tiefgefrorenem Gewebe mit Qualitätseinbußen in der Morphologie zu rechnen.
- **Gewebe auf Eis im Kühlraum oder Kühlschrank bei 0–4°C in der HOPE-Lösung I für 1-3 Nächte (= 16-64 Stunden) inkubieren.** Während der Inkubation können Erythrozyten aus dem Material herausdiffundieren und einen rötlichen Bodensatz bilden, dies hat jedoch keinen Einfluß auf die Qualität der Fixierung. Die Farbe der HOPE-Lösung I sollte während der gesamten Fixierungsdauer etwa orangegelb sein, was auf einen stabilen pH-Wert hinweist. Bei der Bearbeitung besonders dicht gepackter Gewebe (z.B. Gehirn, Lymphknoten) hat sich deren Inkubation in HOPE I für mindestens 2 Nächte (ca. 40 Stunden) als vorteilhaft herausgestellt.

Achtung: Eine potentielle Infektiosität ist zu diesem Zeitpunkt nach wie vor gegeben, daher alle Bearbeitungsschritte nach Möglichkeit mit Handschuhen durchführen (s.o.).

- Am Morgen Röhrchen entleeren (Achtung: Gewebestück sollte im Röhrchen verbleiben). Eventuell Röhrchen mit der Öffnung nach unten auf Filterpapier stellen, um eine möglichst vollständige Entleerung zu gewährleisten. 5 ml einer vorbereiteten eiskalten Acetonlösung (Ansatz: 100 ml reines Aceton gemischt mit 100 µl von HOPE-Lösung II) in das Röhrchen füllen und sofort wieder in den Kühlschrank und/oder in ein Eisbad stellen. **Alternativ können die Gewebestücke auch direkt in eine Einmalkassette verbracht werden und die folgenden Schritte in Küvetten (z.B. nach Hellendahl) ausgeführt werden.**
- Falls weißliche Ausfällungen auftreten, sind diese als normal zu betrachten. **Zwei Stunden bei etwa 0-2°C einwirken lassen.** Wichtiger Hinweis: Die Qualität der Fixierung und die spätere Schneidbarkeit der Paraffinblöckchen hängen entscheidend mit davon ab, dass das zur Dehydrierung verwendete Aceton nicht wärmer als 2°C ist. Die einfachste Lösung, dies zu erreichen, ist, die gesamte Dehydrierung in Aceton auf Eis durchzuführen, was über die gesamte Zeitdauer von insgesamt 8 Stunden eine dauerhafte und gleichbleibende Temperatur um den Gefrierpunkt gewährleistet.
- Nach 2 Stunden Röhrchen (oder Küvetten) auf die gleiche Art wie vorher entleeren und diesmal nur mit reinem eiskalten Aceton auffüllen. **Wieder 2 Stunden einwirken lassen. Diesen Vorgang 2x mit einer Inkubationsdauer von jeweils 2 Stunden wiederholen.**
- Nach insgesamt 8-stündiger Dehydrierung (**auf keinen Fall länger !**) die Röhrchen oder Küvetten entleeren (Achtung: das Material ist immer noch potentiell infektiös) und unverzüglich (damit das Gewebe nicht austrocknet) vorgewärmtes Spezialparaffin dazugeben. Bei **exakten** 54 – 55°C in den Brutschrank stellen. Dabei darauf achten, dass Luftblasen möglichst entweichen.
- Am nächsten Morgen ist die Paraffinierung abgeschlossen. Falls bis zu diesem Zeitpunkt das Paraffin nicht vollständig in das Gewebe eingedrungen ist, ist dies auch durch eine längere Einwirkzeit nicht mehr zu verbessern. Gewebestücke in der üblichen Weise auf einer Wärmeplatte unter Zugabe von **frischem** Paraffin ausbetten, dabei Luftblasen vermeiden. Das gebrauchte Paraffin verwerfen. Sofort auf Eis abkühlen, wobei Rissbildungen im frischen Blöckchen häufiger als bei der üblichen Routineeinbettung auftreten können, da es sich um absolut reines Paraffin handelt.
- Fertige Blöckchen bis zum Schneiden **im Kühlschrank** aufbewahren.
- **Hinweis zum Transport von Gewebeproben für die HOPE-Fixierung:** Technische Protokolle für den Versand von Gewebematerial für die HOPE-Fixierung sind z.Z. noch in der Erprobung. Am besten ist immer die sofortige Einbringung des Gewebes in die kalte HOPE I-Lösung und die Lagerung des Gewebes für mindestens 16 Stunden in dieser Lösung. Wenn das Gewebe anschließend in der HOPE I-Lösung transportiert werden soll, ist eine Erwärmung auf Raumtemperatur für die Qualität der Präparate nach bisherigen Erfahrungen unkritisch.

2.) Herstellung von Schnitten nach der HOPE-Fixierung

Grundsätzlich sollte die Schneidetechnik mit HOPE-fixiertem Gewebe zuerst an weniger wichtigem Material geübt werden.

- Bei ca. -20°C über einen Zeitraum von etwa 30 Minuten vorgekühlte Paraffinblöckchen mit HOPE-fixiertem Gewebe im Mikrotom einspannen, orientieren und anschneiden. Wenn die üblichen Vorbereitungen abgeschlossen sind, ist die Temperatur der Blöcke soweit heraufgegangen, dass das Schneiden ohne Splitterung der Gewebe möglich ist. Streckmedium ist Aqua dest von Raumtemperatur (Streckbad 1) und von ca. $35 - 39^{\circ}\text{C}$ (Streckbad 2). **Wichtig: Spätestens mit Beginn der Schneidetätigkeit zwei Küvetten mit reinem Isopropanol in einem Trockenbrutschrank auf etwa 60°C erwärmen.**
- Schnitte möglichst ohne Eintauchen zuerst auf die Oberfläche des Streckbads 1 legen. Die Schnitte können dort auch gesammelt werden. Dann mit einem gereinigten oder beschichteten Objektträger herausheben und **einzel**n im warmen Streckbad 2 ausziehen. **Achtung: Die Schnitte tendieren dazu, schnell auseinanderzugehen, da die Strukturen nicht wie beim Formalin miteinander vernetzt sind.** Sobald der Schnitt glatt auf dem Objektträger liegt, diesen auf Filterpapier nochmals **gut seitlich ablaufen** lassen, dabei eventuell den Objektträger mehrmals seitlich aufklopfen, um Wasserreste zwischen Schnitt und Glasobjektträger so weit als möglich zu entfernen, und sofort in einem Ständer platzieren, in dem die Objektträger schräg gestellt sind. Danach Schnitte im Trocken-Brutschrank bei 50°C circa $\frac{1}{2}$ Stunde trocknen lassen oder besser noch bei 37°C über Nacht. Die getrockneten Leerschnitte können ohne weiteres über einen längeren Zeitraum im Kühlschrank für weitere Untersuchungen gelagert werden. Die Blöcke werden bei 4°C gelagert.
- Zum Entparaffinieren die Objektträger in die erste Küvette mit Isopropanol (ca. 60°C) einstellen. Nach ca. 10 Minuten Objektträger herausnehmen, in der zweiten warmgestellten Küvette intensiv waschen und hochkant ablaufen und lufttrocknen lassen. Die Schnitte sind nun entparaffiniert und können auch in diesem Stadium im Kühlschrank aufbewahrt werden, neigen jedoch leichter dazu, Wasser zu ziehen.
- Zum Rehydrieren Schnitte für mindestens 10 min in **70%iges eisgekühltes Aceton** in den Kühlschrank stellen. Im folgenden Schritt Objektträger aus dem 70%igen Aceton nehmen, ca. 5 Sekunden auf Filterpapier leicht ablaufen lassen, dann noch **feucht** in einer Küvette mit Aqua dest waschen, in eine weitere Küvette mit Aqua dest transferieren und darin 10 min stehen lassen. Objektträger danach hochkant stellen, kurz ablaufen lassen, auf der Unterseite mit Filterpapier abwischen und auf eine 45°C warme Heizplatte legen, bis das gesamte Wasser verdunstet und der Schnitt angetrocknet ist (Dauer ca. 1 - 2 min).
- **Für eine HE-Färbung** die rehydrierten und angetrockneten Schnitte direkt in die Hämalaun-Lösung (z.B. nach Mayer) für 2 bis 4 min stellen. In der nächsten Küvette mit Aqua dest intensiv spülen und in eine weitere Küvette mit Aqua dest stellen. In dieser Kuvette dann unter fließendem Leitungswasser für ca. 1-2 min oder in Ammoniakwasser 1:500 mit nachfolgender

Waschung in Aqua dest bläuen lassen. **Wichtig: Säureeinwirkungen in jedem Falle vermeiden.** In der Eosin-Farblösung je nach Intensität zwischen 2 und 4 min färben. Danach 2x in Aqua dest. waschen, durch 2 Küvetten mit 70%igem Alkohol (z.B. Isopropanol) und 2 Küvetten mit absolutem Alkohol zügig durchziehen und zum Schluss 10 min in einer dritten Küvette mit absolutem Alkohol stehen lassen. Objektträger in einer Küvette mit Xylol oder Rotihistol spülen und in einer zweiten Küvette mit der gleichen Substanz 5 min stehen lassen, herausnehmen, kurz ablaufen lassen und noch feucht eindecken (z.B. mit Entellan/Merck).

- **Hinweise zur Immunhistochemie:** Auf einen Serum-Block kann in der Regel verzichtet werden. Wichtig: Die Blockierung der endogenen Peroxidase-Aktivität auf keinen Fall in einer methanolischen Lösung mit Wasserstoffperoxid durchführen, da dies Antigenstrukturen (Epitope) zerstören kann. Nur in Pufferlösungen (PBS) oder in Aqua dest mit Peroxid (ca. 0,5%ig) blocken. Antikörper und Enzym-Konjugate möglichst **nur in PBS oder TBS** lösen. Antikörper-Verdünnungen analog wie bei Gefrierschnitten anwenden.
- **Hinweise zur in situ-Hybridisierung:** Auf SDS oder Dextransulfat im Hybridisierungsmix möglichst verzichten. Enzymatische Andauung ist in der Regel nicht notwendig.

3.) Immunhistochemie (IHC) an HOPE-fixierten Schnitten

Im folgenden werden beispielhaft zwei Methoden beschrieben. Selbstverständlich sind grundsätzlich alle IHC-Systeme, die an formalinfixierten- oder Kryoschnitten funktionieren, auch bei HOPE-fixierten Schnitten anwendbar, bergen jedoch verschiedene Vor- und Nachteile:

METHODE 1:

- Entparaffinierte und rehydratisierte Gewebeschnitte (Herstellung siehe Kapitel 2) in eine Küvette mit 0,5 % Wasserstoffperoxid, gelöst in DPBS (= PBS nach Dulbecco ohne Calcium und Magnesium) zur Blockierung der endogenen Peroxidase für eine ½ Stunde stellen. **Hinweis: Die Anwendung des Peroxidase-Detektionssystems empfiehlt sich, da bei HOPE-fixierten Schnitten die endogene Alkalische Phosphatase auch mit Levamisol häufig nur inkomplett geblockt werden kann.** Danach Schnitte in einer Küvette mit Aqua dest gründlich waschen und sofort in eine weitere, mit DPBS gefüllte Küvette überführen.
- Schnitte aus dem DPBS herausnehmen, kurz schräg ablaufen lassen und sowohl unterseitig, als auch um den Schnitt herum mit Filterpapier abwischen (Achtung: Schnitte während der gesamten Dauer der immunhistochemischen Inkubation niemals austrocknen lassen). Schnitt mit dem ersten, nur in reinem DPBS ohne Zusatz von Serum, Albuminen etc. gelösten Antikörper (**Primärantikörper**) überschichten. Verdünnungsfaktoren sind in etwa die gleichen wie bei Kryoschnitten. Ein Serum-Blocking ist in der Regel nicht erforderlich, muss aber selbst ausgetestet werden. Im folgenden wird der Ablauf der Immunhistochemie an einem aus der Maus gewonnenen Primärantikörper beschrieben.

- Nach einer ca. **1-stündigen Inkubation bei Raumtemperatur** (längere Inkubationszeiten waren bei HOPE-fixierten Schnitten bisher nie erforderlich) die Schnitte zuerst mit DPBS aus der Spritzflasche abspülen, in einer Küvette mit DPBS kurz waschen und direkt in eine zweite Küvette mit DPBS für ca. 2 Minuten stellen.
- Schnitte wie oben beschrieben aus dem DPBS herausnehmen und abwischen und mit einem **Digoxigenin-konjugierten**, gegen Maus gerichteten **Sekundärantikörper**, verdünnt in DPBS, überschichten. (Hinweis: Wenn keine Biotin-Blockung erfolgt, die bei HOPE-Schnitten sinnvoll ist, empfiehlt sich die Anwendung des Digoxigenin/Antidigoxigenin-Systems statt des Biotin/Avidin-Systems). Inkubationsdauer mit dem Sekundärantikörper ebenfalls ca. 1 Stunde bei Raumtemperatur.
- Wieder Schnitte wie oben beschrieben waschen und mit einem in DPBS verdünnten **Tertiärantikörper** (z.B. Antidigoxigenin konjugiert mit Peroxidase) überschichten. Inkubation ca. **1 Stunde bei Raumtemperatur**.
- Schnitte waschen und mit **Substrat/Chromogen** überschichten (z.B. mit AEC oder DAB). Inkubationsdauer ca. 10 – 20 Minuten. Danach Schnitte mit Aqua dest aus der Spritzflasche waschen, mit Hämalan kurz gegenfärben und in einem synthetischen wässrigen Medium (z.B. in Aquatex von Merck 1.08562.) eindecken. In Glyceringelatine löst sich teilweise die Blaufärbung der Kerne wieder auf, so dass diese weniger empfehlenswert zum Eindecken ist.

METHODE 2 (Kurzprotokoll):

Diese Methode basiert auf der Streptavidin-Biotin-Technik und entspricht den Standard-Verfahren in der Routine-Immunhistochemie am formalinfixierten Gewebeschnitt. Sie wurde bisher an wenigen Gewebetypen getestet, in diesen Fällen aber mit sehr guten Resultaten.

Wie bei der vorherigen Methode angedeutet, kann der Einsatz von Streptavidin-Biotin-Systemen bei HOPE-fixiertem Gewebe zu unerwünschten Hintergrundreaktionen führen. Bei inakzeptabel hohem Background sollten geeignete Blockierungsschritte oder biotinfreie Nachweismethoden eingesetzt werden.

- Entparaffinierte und rehydratisierte Gewebeschnitte (Herstellung siehe Kapitel 2) zur **Blockierung der endogenen Peroxidase** für 10 min. in einer Küvette mit 0,3 % Wasserstoffperoxid (in Aqua dest) inkubieren. Danach Schnitte mit PBS gründlich waschen. (Achtung: Die Schnitte dürfen während der gesamten Dauer der immunhistochemischen Färbung niemals austrocknen!).
- Schnitte aus dem PBS herausnehmen und wie in der Immunhistochemie üblich einen **Serum-Block** für 10 min. zur Reduktion von Hintergrundfärbung durchführen. Anschließend nicht waschen, sondern das Serum nur ablaufen lassen.
- Mit dem **Primärantikörper** überschichten. Der Primärantikörper wird nur in PBS ohne Serumzusätze usw. gelöst. Im Vergleich zum formalinfixierten Schnitt wird der Antikörper 3fach höher verdünnt. Inkubation für 60 min. bei Raumtemperatur.

- Schnitte mit PBS waschen und mit einem **biotinylierten Sekundärantikörper** (z.B. PolyLink-Sekundärantikörper von DCS, gegen Maus-, Kaninchen- und Ratten-Primärantikörper) beschichten. Der Sekundärantikörper wird wiederum 3fach höher verdünnt als bei formalinfixierten Gewebeschnitten. Inkubation für 30 min. bei Raumtemperatur.
- Schnitte mit PBS waschen und mit einem **Peroxidase-Label** (z.B. Streptavidin-Peroxidase-Konjugat von DCS) beschichten. Das Peroxidase-Label wird wiederum 3fach höher verdünnt als bei formalinfixierten Gewebeschnitten. Inkubation für 30 min. bei Raumtemperatur.
- Schnitte waschen und mit **Substrat/Chromogen** überschichten (z.B. mit gebrauchsfertigem **AEC oder DAB** von DCS). Inkubationsdauer ca. 10 min. Danach Schnitte mit Aqua dest waschen, mit Hämalaun kurz gegenfärben und in einem synthetischen wässrigen Medium (z.B. in Aquatex von Merck 1.08562.) eindecken. In Glyceringelatine löst sich teilweise die Blaufärbung der Kerne wieder auf, so dass diese weniger empfehlenswert zum Eindecken ist.

Achtung:

Bitte beachten Sie beim Umgang mit HOPE-fixiertem Gewebe dessen potenzielle Infektiosität! Sie sollten zu Ihrer eigenen Sicherheit davon ausgehen, dass HOPE-fixierte Gewebe aktive Viren, Mikroorganismen etc. enthalten können. Führen Sie daher alle Bearbeitungsschritte mit Handschuhen durch!

HOPE Fixation – Technical Protocol

For your own safety:

The HOPE technique is used for the preparation of paraffin embedded tissue sections. In contrast to other fixation methods HOPE does not completely denature structural proteins, enzymes, and nucleic acids. They remain in a nearly native state. This means that HOPE-fixed tissue can also include active virus, prions, microorganisms etc. **HOPE-fixed tissue blocks, paraffin sections etc. therefore must be considered as potentially infectious** unless other suitable tests have proven the opposite. **Always wear gloves!**

HOPE reagents contain up to 0,03 % NaN_3 (sodium azide). Sodium azide is not classified as a hazardous chemical at the concentration of these products. However, toxicity information about sodium azide at the products' concentration has not been thoroughly investigated. For further information, a Material Safety Data Sheet for sodium azide in pure form is available upon request.

1.) Tissue Fixation and Preparation of Paraffin Blocks

- Take tissue in OR and transfer directly into sterile plastic petri dish and cool on wet ice. Take care that the tissue does not dry out. Seal the dish with Parafilm if necessary. **DO NOT transfer into physiological salt solution.** As soon as HOPE I solution is available, cut tissue into pieces of max. 8 mm x 8 mm x 3 mm and transfer into disposable 5 ml tubes (must withstand acetone!) with ice-cold (0-4°C) HOPE I solution.
Important: To ensure good diffusion and penetration of the tissue, only use cut/sectioned organs and organ parts, respectively, i.e. do NOT use encapsulated tissues! If using frozen tissue, do **NOT** thaw prior to transfer into HOPE I solution. Be aware of the possibility of lesser-quality morphology, if working with frozen tissue.
- **Store tissue in HOPE I solution at 0-4°C for 1 – 3 nights (i.e. 16 – 64 hours).** During this incubation, erythrocytes might diffuse out of the tissue and form a reddish pellet in the tube. However, this does not affect the quality of the fixation. The color of HOPE I solution should stay orange-yellow throughout the fixation representing a stable pH.
For processing of tissue samples with high cell density (like brain or lymph nodes) incubation in HOPE I solution for at least 2 nights (about 40 hours) should be preferred.
NOTE: Samples are still potentially infectious – always wear gloves!

- In the morning, empty tube carefully (tissue has to stay inside the tube!). If necessary, place tube upside down on tissue to empty completely. **Add 5 ml pre-mixed ice-cold acetone solution (100 ml acetone + 100 μ l HOPE II solution) to tissue in tube and transfer immediately back into fridge or ice bath.** Ignore possibly visible white precipitate. **Incubate at 0 – 2°C for 2 hours.**

NOTE: The quality of the fixation and the performance during cutting of the paraffin-embedded HOPE-fixed tissue is critically dependent on the acetone not being warmer than 2°C. To ensure this, please, perform the dehydration with acetone in an ice bath and ensure it remains around freezing temperature throughout the incubation time of 8 hours total.

- After 2 hours, empty tube again (compare above) and **re-fill with ice-cold pure acetone. Incubate for 2 hours. Repeat twice** (each incubation: 2 hours).
- After 8 hours of dehydration (**Do not dehydrate longer than for 8 hours total**), empty acetone out of tube (**Careful:** Tissue is still potentially infectious!) and immediately **add 5 ml pre-warmed low-melting paraffin**. Make sure tissue does not dry out in between steps. Try to get rid of all air bubbles. **Incubate overnight at exactly 54 – 55°C**.
- Paraffinizing of tissue is complete the next morning. Incomplete penetration of tissue at this point cannot be helped by longer incubation. Reembed tissue as usual using **fresh** paraffin. Avoid any air bubbles. Basically proceed as with formalin-fixed tissue. Chill blocks immediately on ice.
NOTE: Cracks in the paraffin blocks occur more often than with regular paraffin due to the absolutely pure paraffin used here.
Dispose used paraffin and 5 ml tubes.
- Store blocks **in fridge** until sectioning.
- **Remarks for transportation of tissue samples for HOPE fixation:** Technical Protocols for transport of tissue material for HOPE fixation are still under development. The best way should be to transfer the tissue immediately into cold HOPE I solution and incubate for at least 16 hours. If, during the subsequent transport, the tissue stored in HOPE I becomes slightly warmer, no negative impact on morphology was observed up to now.

2.) Sectioning of HOPE-Fixed Paraffin-Embedded Tissue

Please, give yourself time to get a little practice cutting HOPE-fixed tissue training with less important material!

- Store paraffin blocks at about –20°C for 30 min and fix on microtome as usual. After all other usual preparations are finished, the temperature of the blocks will have risen so that sectioning is possible without cracking the tissue. Prepare two different water baths and set #1 at RT, #2 at 35 - 39°C. Before you start sectioning prepare two cuvettes with pure isopropanol and keep in a 60°C incubator.
- Transfer sections onto the surface of water bath #1 (RT) without dipping it into the water. You can collect your sections here. Fish sections with clean slide and, one by one, stretch them out on the surface of water bath #2 (35 - 39°C). Make sure sections do not dissolve. As soon

as section is stretched out and wrinkle-free on slide, take out of water bath, drip-dry carefully on tissue and place on drying rack. Dry sections in dry incubator at 50°C for about 30 minutes or (preferably) at 37°C overnight.

- Dried sections can be stored in the fridge without problems for a long period of time. Blocks should be stored at 4 °C.
- For deparaffinization, place slides into first cuvette with 60°C isopropanol. Incubate for 10 minutes. Transfer to second cuvette with 60°C isopropanol and wash thoroughly. Drip-dry slide on tissue and air-dry. Slides are now deparaffinized and can be stored in the fridge, if desired, but be aware of the risk of the tissue picking up moisture there.
- Rehydrate tissue by incubating it in 70% ice-cold acetone for a minimum of 10 minutes in the fridge. Take slides out of the acetone, drip-dry on tissue (5 seconds) and transfer the **still moist** slide into a cuvette with aqua dest. Wash thoroughly. Transfer to a second batch of aqua dest. and incubate for 10 minutes. Briefly drip-dry slides and transfer onto a hot plate set to 45°C until complete evaporation of the water. Tissue should be dried onto the slide at this point (takes about 1-2 minutes on the hot plate).
- To stain with H & E, transfer re-hydrated section to hematoxylin for 2–4 minutes. Wash rigorously in a cuvette with aqua dest and transfer to a second cuvette with aqua dest. Perform bluing reaction under running tap water (1–2 minutes). Important: Avoid any influence of acids!
Incubate in eosin for 2–4 minutes depending on the intensity desired. Wash twice in aqua dest and dehydrate rapidly dipping the slide into the following solutions:
2x 70% Isopropanol
2x Isopropanol abs. Incubate for another 10 minutes in a third cuvette with absolute Isopropanol. Briefly wash in xylene or Rotihistol, then transfer into a second batch of xylene or Rotihistol and incubate for 5 minutes.
- Take out, drip-dry and coverslip.
- **Notes re. IHC:** In general, blocking with serum is not necessary. **NEVER** block endogenous peroxidase in MetOH solution with H₂O₂, since this is highly likely to destroy antigen structures (epitopes). Instead, simply block using buffer solutions or water with 0.3 – 0,5% peroxide. Dissolve antibodies and enzyme conjugates in **PBS or TBS only**. Use same dilution as in frozen tissue.
- **Notes re. ISH:** If at all possible, avoid SDS and dextran sulfate in hybridization mix. Enzymatic digestion is hardly ever necessary.

3.) Immunohistochemistry (IHC) on HOPE-Fixed Tissue Sections

This chapter describes two methods for IHC on HOPE-fixed tissue sections. In general all IHC systems suitable for formalin-fixed and frozen sections will also work on HOPE-fixed material, but there are several advantages and drawbacks from one system to the other.

PROTOCOL 1:

- Place deparaffinized and rehydrated tissue sections (preparation in chapter 2) in a cuvette with 0,5 % H₂O₂ in DPBS (= PBS according to Dulbecco without Ca²⁺ and Mg²⁺) for 30 minutes to block endogenous peroxidase. **Re.: peroxidase-based detection systems are recommended, since endogenous alkaline phosphatase activity in Hope-fixed tissues will very often not be quenched completely even when using levamisole.** After H₂O₂ block wash slides in a cuvette with aqua dest and transfer immediately into a new cuvette with DPBS.
- Take slides out of DPBS, dip dry briefly and remove excess liquid on the backside of the slide as well as around the section with tissue. (Do not allow sections to dry out during the whole staining procedure!) Apply **primary antibody** diluted in DPBS without serum, albumins etc. Dilution of the primary antibody is about the same as for frozen sections. In general, protein block with sera is not necessary but should be tested by each lab. Below we describe an IHC protocol using a mouse primary antibody.
- After **60 minutes** incubation with the primary antibody at room temperature (longer incubation times never improved the results on HOPE-fixed tissue) rinse slides with DPBS, wash briefly in a cuvette with DPBS and incubate in a second cuvette with DPBS for about 2 minutes.
- Take slides out of DPBS, remove excess liquid (see above) and cover sections with a **digoxigenin-conjugated anti-mouse secondary antibody** diluted in DPBS and incubate for 60 minutes at room temperature. (Re: This protocol uses an digoxigenin/anti-digoxigenin system. If you want to work with biotin/streptavidin on HOPE-fixed material, we recommend to test a biotin block). Incubate secondary antibody for 60 minutes at room temperature.
- Wash slides as described above and apply a **tertiary antibody** (e.g. anti-digoxigenin peroxidase-conjugate) diluted in DPBS. Incubate for 60 minutes at room temperature.
- Wash slides and apply **substrate/chromogen** (e.g. AEC or DAB) for approx. 10 – 20 minutes. Rinse slides with aqua dest, counterstain and coverslip with synthetic aqueous mounting medium (e.g. *Aquatex*, Merck # 1.08562). Counterstain of nuclei seems to be less stable in glycerol gelatine, therefore synthetic mounting media should be preferred.

PROTOCOL 2 (short protocol):

This method is based on the streptavidin/biotin technique and corresponds to the standard detection principle in routine IHC on formalin-fixed tissue sections. The method has been tested with excellent results, although the number of different tissue types tested up to now is small.

As mentioned in protocol 1, use of streptavidin/biotin systems on HOPE-fixed tissue can sometimes result in a higher background staining. If the level of background is unacceptable suitable blocking steps or biotin-free detection systems should be preferred.

- To **block endogenous peroxidase**, incubate deparaffinized and rehydrated tissue sections (preparation see chapter 2) for 10 minutes in a cuvette with 0,3 % H₂O₂ (in aqua dest). Wash slides with PBS. (Note: Do not allow sections to dry out during the whole staining procedure!).
- Take slides out of PBS and perform a **serum block** for 10 minutes to reduce background staining. Drain slides, do not wash.
- Apply **primary antibody** for 60 minutes at room temperature. The primary antibody should be diluted in PBS without serum, albumin etc.. Dilution should be approx. 3-fold compared to formalin-fixed sections.
- Wash slides in PBS and incubate with **biotinylated secondary antibody** (diluted in PBS, e.g. DCS PolyLink secondary antibody, anti-mouse, anti-rabbit, anti-rat) for 30 minutes at room temperature. Dilution of the secondary should be approx. 3-fold compared to formalin-fixed tissue sections.
- Wash slides in PBS and apply **peroxidase label** (diluted in PBS, e.g. DCS streptavidin peroxidase conjugate) for 30 min at room temperature. Dilution of the peroxidase label should be approx. 3-fold compared to formalin-fixed tissue sections.
- Wash slides in PBS and cover with **substrate/chromogen** (e.g. DCS **AEC-1-step-solution** or **DAB-1-step-solution**). Incubate for appx. 10 minutes at room temperature. Wash slides with aqua dest, counterstain and coverslip with synthetic aqueous mounting medium (e.g. *Aquatex*, Merck # 1.08562). Counterstain of nuclei seems to be less stable in glycerol gelatine, therefore synthetic mounting media should be preferred.

Attention!

Please keep in mind that HOPE-fixed tissue samples are potentially infectious! HOPE-fixed tissue can include active virus, microorganisms etc. For your own safety always wear gloves!