

Opinnäytetyö (AMK)  
Bioanalytiikan koulutusohjelma  
Patologia  
2012

Antonella Florio

# GPR30-RESEPTORIN PAIKANTAMINEN HIIREN LISÄKIVEKSESSÄ

– Immunohistokemia



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU  
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

OPINNÄYTETYÖ (AMK) | TIIVISTELMÄ

TURUN AMMATTIKORKEAKOULU

Bioanalytiikan koulutusohjelma | Patologia

Toukokuu 2012 | 69 + 15

Mika Venojärvi, Petra Sipilä

Antonella Florio

## GPR30-RESEPTORIN PAIKANTAMINEN HIIREN LISÄKIVEKSESSÄ -Immunohistokemia

Miesten hedelmällisyys länsimaissa laskee jatkuvasti ja useissa tapauksissa hedelmättömyys on lisäkivesperäistä. Lisäkiveksen toiminnan parempi ymmärtäminen ja siittiöiden kypsymiseen vaikuttavien tekijöiden selvittäminen lisää tietämystä lisäkivesperäisen hedelmättömyyden syistä ja turhia hedelmöityshoitoja voitaisiin välttää. Toisaalta taas ei-toivottujen raskauksien määrä koko maapallon väestön keskuudessa on huima ja väestön liikakasvu on ongelma etenkin kehitysmaissa. Laajempi tietämys lisäkiveksen toiminnan säätelystä antaisi myös mahdollisuuksia miehen ei-hormonaalisen ehkäisymenetelmän kehittämiseksi.

Lisäkiveksessä tapahtuvaan siittiöiden kypsymiseen vaikuttavat useat eri tekijät. Oletettavasti yksi näistä tekijöistä ovat siittiöt itse. Niiden uskotaan aktivoivan tiettyjen reseptoreiden kautta kulkevia signalointireittejä ja sitä kautta vaikuttavan kypsymiseen tarvittavien proteiinien erittämiseen lisäkivestiehyen lumeniin. Tässä opinnäytetyössä tavoitteena oli paikantaa potentiaalisista reseptoreista yksi, G-proteiinikytkentäinen estrogeenireseptori 30 (GPR30). Osallistua siittiöiden kypsymiseen, sen tuli sijaita vain lisäkivestiehyen alkuosan initial segmentissä epiteelisolujen pinnalla.

GPR30-reseptorin paikantaminen tapahtui immunohistokemiallisten fluoresenssivärjäysten ja peroksidaasientsyymivärjäysten avulla. Värjäykset suoritettiin koe-eläinhiiristä preparoiduilla lisäkivesnäytteillä, joista oli valmistettu histologisia jää- ja parafiinileikkeitä.

GPR30-reseptori saatiin paikannettua lisäkivestiehyen epiteelisolujen stereocilioihin, mutta tuloksen varmistamiseksi tehtyä kaksoisvärjäystä ei saatu toimimaan. Värjäystulosten perusteella GPR30-reseptorin sijainti stereocilioissa mahdollistaisi vuorovaikutuksen siittiöiden kanssa. Koska reseptori kuitenkin sijaitsee kaikissa lisäkivessegmenteissä, se jätetään jatkotutkimusten ulkopuolelle. Tämä ei silti täysin poissulje kyseisen reseptorin mahdollisuutta osallistua siittiöiden kypsymiseen.

ASIASANAT:

Immunohistokemia, antigeenit, vasta-aineet, lisäkivekset, reseptorit

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Degree programme in Biomedical Laboratory Science | Pathology

May 2012 | 69 + 15

Mika Venojärvi, Petra Sipilä

Antonella Florio

# LOCALIZATION OF GPR30-RECEPTOR IN MOUSE EPIDIDYMIS

## -Immunohistochemistry

The fertility of men is continuously decreasing in industrialized countries and in many of the cases infertility is epididymal of origin. Better understanding of the epididymal function and investigation of the factors that affect the maturation of the spermatozoa would increase the knowledge of the causes of the epididymal infertility and unnecessary infertility treatments could be avoidable. On the other hand the number of unwanted pregnancies among the world's population is high and the overpopulation is a problem especially in developing countries. More information about the regulation of epididymal function would also produce new possibilities for developing a non-hormonal contraceptive for men.

Maturation of the spermatozoa in epididymis is affected by many different factors. Assumably one of the factors is the spermatozoa themselves. They are thought to activate signaling pathways passing through specific receptors and regulate the secretion of the proteins needed in their maturation in the lumen. The aim of this thesis was the localization of one of these potential receptors, the G protein-coupled estrogen receptor 30 (GPR30). It was to be located only in the initial segment and on the luminal side of the epididymal duct.

The localization of the GPR30 was conducted with immunohistochemical fluorescent and peroxidase-enzyme staining. Stainings were performed with histological paraffin and ice sections prepared from the epididymides of mice.

The GPR30-receptor was located on the stereocilia of the epithelium of the epididymal duct, but the double staining for confirming the staining result was not successful. Based on the staining results, the location of the GPR30-receptor in the stereocilia would enable interaction with spermatozoa. Since the receptor is located in all epididymal segments, it is excluded from further studies. However, this does not explicitly exclude the receptor from being a contributing factor in the maturation of the spermatozoa.

### KEYWORDS:

Immunohistochemistry, antigens, antibodies, epididymis, receptors

# SISÄLTÖ

<b>1 JOHDANTO</b>	<b>8</b>
<b>2 GPR30-RESEPTORIN PAIKANTAMINEN LISÄKIVEKSESSÄ IMMUNOHISTOKEMIAN AVULLA</b>	<b>10</b>
2.1 Lisäkiveksen rakenne	10
2.2 Lisäkiveksen toiminta	12
2.2.1 Lisäkivesepiteelin solutyypit ja niiden tehtävät	13
2.2.2 Veri-lisäkives este	15
2.3 Lisäkiveksen toiminnan säätely	15
2.4 GPR30-reseptori ja sen paikantaminen	16
2.5 Immunohistokemia	18
2.5.1 Antigeenit ja vasta-aineet	18
2.5.1.1 Polyklonaaliset vasta-aineet	20
2.5.1.2 Monoklonaaliset vasta-aineet	20
2.5.2 Vasta-aineiden laimentaminen	21
2.5.3 Merkkiaineet	22
2.5.4 Näytteiden fiksointi	23
2.5.5 Antigeeniepitooppien paljastaminen	25
2.5.5.1 Entsymaattiset menetelmät	26
2.5.5.2 Korkean lämpötilan menetelmät	26
2.5.6 Immunohistokemialliset värjäysmenetelmät	27
2.5.6.1 Suora menetelmä	27
2.5.6.2 Epäsuora menetelmä	28
2.5.6.3 Kaksoisvärjäykset	28
2.5.6.4 Immunoentsyymimenetelmät	29
2.5.6.5 Avidiini-biotiinimenetelmät	30
2.5.6.6 Polymeeritekniikka	30
2.5.6.7 Ei-immunologiset menetelmät	31
2.5.7 Taustavärjäytyminen	31
2.5.7.1 Spesifinen tausta	32
2.5.7.2 Epäspesifinen tausta	32
2.5.7.3 Endogeeninen entsyymi- ja biotiiniaktiivisuus	33

2.5.7.4 Autofluoresenssi	34
2.5.8 Immunohistokemiassa käytetyt kontrollit	34
2.5.9 Värjäystulosten tulkinta	35
<b>3 OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS, TAVOITTEET JA TUTKIMUSTEHTÄVÄT</b>	<b>37</b>
<b>4 OPINNÄYTETYÖN KÄYTÄNNÖN TOTEUTUS</b>	<b>38</b>
4.1 Opinnäytetyön metodologiset lähtökohdat	38
4.2 Eettisten näkökohtien tarkastelu	39
4.3 Tutkimuksen kokeellinen osuus	41
4.3.1 Kudosten preparointi ja prosessointi	41
4.3.2 GPR30-vasta-ainevärjäykset	43
4.3.3 Stereocilia-värjäykset	44
4.3.4 Primaaricilia-värjäykset	45
4.3.5 Kaksoisvärjäykset	46
<b>5 TUTKIMUKSEN TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU</b>	<b>48</b>
<b>6 POHDINNAT</b>	<b>59</b>
6.1 Tutkimustulosten pohdinta	59
6.2 Tutkimuksen yleinen pohdinta	63
6.3 Tutkimuksen luotettavuus	64
6.4 Jatkotutkimusaiheet	65
<b>LÄHTEET</b>	<b>66</b>

## **LIITTEET**

- Liite 1. Immunofluorescence Staining Protocol for Frozen Sections
- Liite 2. Immunofluorescence Staining Protocol for Paraffin Sections
- Liite 3. PLP (with 4% PFA) Fixative
- Liite 4. G Protein-Coupled Estrogen Receptor (GPR30)
- Liite 5. Phalloidin, Product Information
- Liite 6. Anti-Acetylated Tubulin, Product Information
- Liite 7. Dako EnVision+ System- HRP Anti-mouse
- Liite 8. Dako Liquid DAB+ Substrate Chromogen System

## KUVAT

Kuva 1. Lisäkives, pikkukuvassa suurennettuna yksi lisäkivestubulus.	11
Kuva 2. Vasta-ainemolekyylin perusrakenne.	19
Kuva 3. GPR30-värjäys, Alexa 488, fiksatiivi 4% PFA (pH 7,4)	49
Kuva 4. GPR30-värjäys, kontrollileike	49
Kuva 5. GPR30-värjäys, Alexa 594, fiksatiivi PLP	50
Kuva 6. GPR30-värjäys, kontrollileike	50
Kuva 7. GPR30-värjäys, Alexa 488, parafiinileike, TE-puskuri	51
Kuva 8. GPR30-värjäys, parafiinileike, kontrolli	51
Kuva 9. Stereociliat, TRITC, fiksatiivi 4% PFA (pH 7,4)	52
Kuva 10. Yhden tubuluksen stereociliat, suurennos kuvasta 7.	52
Kuva 11. Stereocilia-värjäyksen kontrollileike	53
Kuva 12. Primaariciliat, Alexa 488, fiksatiivi 4% PFA (pH 7,4)	53
Kuva 13. Primaariciliat, pienempi suurennos kuvasta 10	54
Kuva 14. Primaaricilia-värjäyksen kontrollileike	54
Kuva 15. Primaaricilioiden peroksidaasivärjäys, sitraattipuskuri	55
Kuva 16. Primaaricilioiden peroksidaasivärjäyksen kontrollileike	55
Kuva 17. Primaari- ja stereocilioiden kaksoisvärjäys, Alexa 488 ja TRITC	56
Kuva 18. Kaksoisvärjäyksen primaariciliat, Alexa 488 -kuvakerros	57
Kuva 19. Cilioiden kaksoisvärjäyksen kontrollileike, Alexa 488 -kuvakerros	57
Kuva 20. GPR30-falloidiini kaksoisvärjäys, sitraattipuskuri	58
Kuva 21. GPR30-falloidiini-värjäyksen kontrollileike	58

## KÄYTETYT LYHENTEET

BSA	Bovine Serum Albumin, naudan seerumista eristetty albumiini
DAB	3,3'-diaminobentsidiinitetrahydrokloridi. Yleisin peroksidaasi-vetyperoksidireaktioissa käytetty kromogeeni, jonka lopputuotteena syntyy tummanruskea sakka
DAPI	4'6-diamidino-2-fenyyli-indoli, yleisesti käytetty fluoresoiva tumaväriaine, joka lähettää sinistä valoa
GPR30	G Protein-Coupled Receptor 1 Rabbit anti-Human Polyclonal Antibody, MBL International Corporation, USA. G-proteiinikytkentäinen estrogeenireseptori
HRP	Horseradish Peroxidase, piparjuuren peroksidaasientsyymi
NGS	Normal Goat Serum, vuohen normaaliseerumi
PBS	Phosphate Buffered Saline, fosfaattipuskuroitu natriumkloridiliuos
PFA	Paraformaldehydi, formaldehydin polymeroitumistuote, käytetään fiksatiivina
PLP	Paraformaldehydi-lysiini-perjodaatti, käytetään fiksatiivina
TE-puskuri	10mM TRIS-HCl (pH 8) + 1mM EDTA
TRITC	Tetrametyylirodamiini-isotiosyanaatti, yleisesti käytetty fluoresoiva merkkiaine, joka lähettää oranssia valoa

# 1 JOHDANTO

Tämän tutkimuksen tavoitteena on selvittää siittiöiden kypsymiseen mahdollisesti vaikuttavan estrogeenireseptorin (GPR30) sijainti hiiren lisäkivestiehyen epiteelissä. Olettamuksena on, että siittiöt itse säätelisivät kypsymistään aktivoimalla tämän reseptorin kautta kulkevia signalointireittejä. Tutkimus on osa Turun yliopiston Tautimallinnuskeskuksen fysiologian laitoksen tutkijaryhmän laajempaa tutkimusprojektia, jossa pyritään selvittämään lisäkiveksen toiminnan säätelyä siittiöiden kypsymisprosessissa ja sen vaikutusta miesten hedelmällisyyteen.

Lisäkiveksessä tapahtuva siittiöiden kypsymisen säätely on tutkimuskohteena kiinnostava ja merkityksellinen, koska miesten hedelmällisyys laskee länsimaissa jatkuvasti. Jopa 40% hedelmättömistä miehistä kärsii idiopaattisesta eli selittämättömästä hedelmättömyydestä, mikä useissa tapauksissa viittaa häiriintyneeseen lisäkiveksen toimintaan. Lisäkiveksen normaalin toiminnan ymmärtäminen lisääisi tietämystä lisäkivesperäisen hedelmättömyyden syistä. Turhia hedelmöityshoitoja vältettäisiin tunnistamalla siittiöiden pintaproteiineja, joita voitaisiin käyttää merkkiaineina hedelmättömien miesten diagnostiikassa. (Cornwall & von Horsten 2007; Cornwall 2009; Sipilä 2011.)

Lisäkiveksen toiminnan ymmärtämisen tärkeys perustuu myös mahdollisuuteen kehittää miehelle ei-hormonaalinen ehkäisy menetelmä. Tällä hetkellä miehen ainoita ehkäisy menetelmiä ovat kondomi ja sterilisaatio. Arviolta puolet maailman väestön raskauksista on ei-toivottuja ja varsinkin kehitysmaissa väestön liikakasvu on ongelma. Hormonaalisia ehkäisy menetelmiä miehille on ollut kehitteillä, mutta niillä on ollut runsaasti rajoitteita ja haittavaikutuksia. Kohdistamalla vaikutus spesifisesti tiettyyn molekyyliin lisäkiveksessä, kivesten hormonitoiminta ja siittiöiden tuotanto säilyisivät normaaleina, mutta siittiöt olisivat kyvyttömiä hedelmöittämään munasolun. Lisäksi vaikutus olisi nopea ja



helposti kumottavissa. (Page ym. 2008; Cornwall 2009; Ruttimann 2011; Sipilä 2011.)

Tässä opinnäytetyössä on tarkoituksena preparoida villityypin hiirten lisäkiveksiä ja valmistaa niistä histologisia leikepreparaatteja. Preparaatit värjätään immunohistokemiallisin menetelmin ja tuloksia tarkastellaan mikroskopoimalla. Tavoitteena on selvittää, sijaitseeko tutkimuksen kohteena oleva reseptori tietyssä lisäkivessegmentissä sekä sellaisessa kohdassa lisäkivestiehyen epiteeliä, että se voisi osallistua siittiöiden kypsymisen säätelyyn.

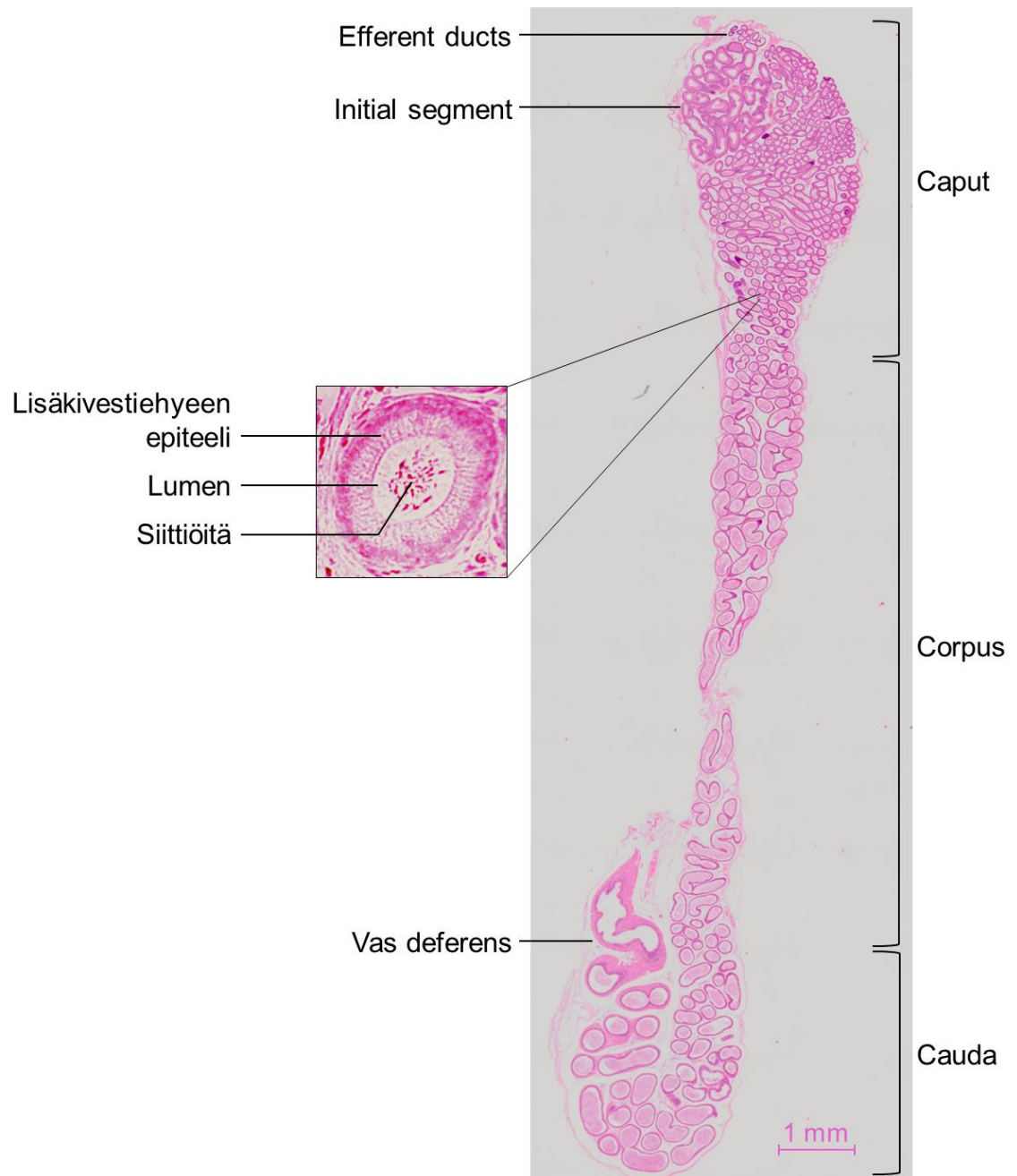
## 2 GPR30-RESEPTORIN PAIKANTAMINEN LISÄKIVEKSESSÄ IMMUNOHISTOKEMIAN AVULLA

### 2.1 Lisäkiveksen rakenne

Kiveksen verkosta lähtevät vievät tiehyet (efferent ducts) yhtyvät yhdeksi voimakkaasti kiertyneeksi, mutkittlevaksi lisäkivestiehyeksi (epididymal duct), joka muodostaa kiveksen pinnalla posterolateraalaisesti sijaitsevan pitkänomaisen lisäkiveksen (Kuva 1). Lisäkivestiehyen pituus on lajista riippuen 1-80 metriä. Hiirellä se on noin metrin pituinen ja ihmisellä 3-6 metriä pitkä. Lisäkivestiehyt jatkuu siemenjohtimena eturauhaseen. Useimmilla lajeilla lisäkives jaetaan karkeasti ottaen neljään osaan, jotka ovat initial segment, caput (pää), corpus (runko-osa) ja cauda (häntäosa). Ihmisellä varsinaista initial segmenttiä ei ole erotettavissa caput-alueen alkuosassa, mutta epiteelisolukko on vastaavanlaista. Jokainen neljästä lisäkiveksen osasta voidaan jakaa edelleen pienempiin segmentteihin, joita erottavat sidekudoksen muodostamat väliseinät. Nämä segmentit ilmentävät eri geenejä ja niillä on erilaisia toiminnallisia ominaisuuksia. (Robaire ym. 2006; Avenel ym. 2011; Jequier 2011; Knoblauch & True 2012.)

Lisäkivestiehyt on ontto putki, jonka keskustaa (lumen) ympäröi valekerrostunut lieriöepiteeli. Suurin osa epiteelin soluista on pitkiä pylväsmäisiä principal-soluja, joiden korkeus kuitenkin vaihtelee eri segmenteissä. Muita solutyyppejä ovat tyvisolut (basal cells), apikaalisolut (apical cells), narrow-solut, clear-solut ja halo-solut, joita esiintyy vaihtelevasti lisäkivestiehyen eri segmenteissä. Epiteelisolujen pintaa verhoavat pitkät stereociliat. Stereociliat eivät kuitenkaan ole todellisia cilioita, koska niiltä puuttuu aksoneema, eivätkä ne näin ollen pysty liikkumaan (Jequier 2011). Ne muistuttavatkin enemmän hyvin pitkiä mikrovilluksia ja vastaavat nesteiden absorboimisesta lumenissa. Lisäkivestiehyt on caput-osassa läpimitaltaan pieni ja epiteelisolukko on paksua, kun taas häntäosassa epiteeli on ohutta ja tiehyt läpimitaltaan suuri.

Lisäkivestiehyen alkuosan lumenissa ei yleensä ole siittiöitä, koska tiehyen voimakas supistelu kuljettaa ne eteenpäin. Cauda-osassa lumen sen sijaan on täynnä kypsiä siittiöitä. Lisäkivestiehyen ympärillä on sileää lihaskudosta ja sidekudosta. Lihaskudoskerros paksunee cauda-osaa kohti mentäessä. (Robaire ym. 2006; Avenel 2011; Jequier 2011; Knoblauch & True 2012.)



Kuva 1. Lisäkives, pikkukuvassa suurennettuna yksi lisäkivestubulus. (HE-värijäys, Antonella Florio 2012)

## 2.2 Lisäkiveksen toiminta

Lisäkiveksen tärkeimmät tehtävät ovat siittiöiden kuljetus, kypsyttäminen ja varastointi. Kun siittiöt saapuvat kiveksen verkosta efferent ducteja pitkin lisäkiveksen alkuosaan, niiden liikkumiskyky on puutteellinen, eivätkä ne kykene hedelmöittämään munasolua. Efferent ductissa on primaaricilioita, joiden oletetaan osallistuvan siittiöiden kuljettamiseen kohti lisäkivestä. Lisäkiveksessä sileän lihaskudoksen supistelu sekä luminaalimesteen virtaus kuljettavat siittiöitä eteenpäin. (Robaire ym. 2006; Cornwall & von Horsten 2007.) Kulkiessaan lisäkivestiehyen caput- ja corpus-alueiden läpi, siittiöissä tapahtuu useita rakenteellisia, biokemiallisia sekä fysiologisia muutoksia, jolloin ne kypsyvät hedelmöittämiskykyisiksi ja saavat oikeanlaisen liikkumiskykynsä. Siittiöiden akrosomissa tapahtuu uudelleenmuovautumista, siittiön solukalvon proteiini- ja lipidirakenteissa tapahtuu muutoksia ja siittiöiden pinnalle eritetään mm. proteiinirakenteita, joiden avulla ne pystyvät kiinnittymään munasoluun. Myös tuman kromatiinirakenteessa ja siittiön hännän organelleissa tapahtuu muutoksia. Aikaa tähän kuluu kaikkiaan noin kymmenisen päivää. Kypsät siittiöt varastoituvat lisäkiveksen cauda-osaan, jossa ne säilyvät hedelmöittämiskykyisinä 3-30 päivää, joillakin lajeilla pidempäänkin. Siittiöiden varastoinnin lisäksi cauda-osassa tapahtuu siittiöiden laaduntarkkailua. Viallisten tai puutteellisten siittiöiden pintaan kiinnittyy lisäkivestiehyessä ubikitiinia, joka toimii cauda-osassa signaalina fagosytoosille. (Robaire & Viger 1995; Gupta 2005; Robaire ym. 2006; Cornwall & von Horsten 2007; Cornwall 2009.)

Siittiöiden kypsyminen lisäkiveksessä on erittäin hienostunut ja monimutkainen prosessi, joka edellyttää vuorovaikutusta siittiöiden ja lisäkivesepiteelin erittämien proteiinien välillä. Epiteelissä on useita eri solutyyppejä, joiden morfologia sekä toiminta eroavat toisistaan. Jotkut soluista esiintyvät koko lisäkivestiehyen alueella, toiset vain tietyissä segmenteissä. (Robaire ym. 2006; Cornwall & von Horsten 2007; Cornwall 2009.)

### 2.2.1 Lisäkivesepiteelin solutyypit ja niiden tehtävät

Kaikkien nisäkkäiden lisäkiveksessä pääasiallisena solutyypinä on pylväsmäiset principal-solut, joita esiintyy koko lisäkivestiehyen alueella. Niillä on erittäin kehittynyt erityis- ja endosytoosijärjestelmä, joten ne vastaavat käytännössä lähes kaikkien lumeniin eritettävien proteiinien synteestistä ja niillä on aktiivinen rooli myös proteiinien endosytoinnissa. Principal-solujen pinnalla erityisen runsaana esiintyvien primaaricilioiden avulla ne absorboivat nesteitä lumenista. Lisäksi ne vastaavat monenlaisten pienten orgaanisten molekyylien kuljetuksesta ja erityksestä. Solujen toiminta vaihtelee huomattavasti eri segmenttien välillä. Myös niiden koko vaihtelee oleellisesti lisäkiveksen eri osissa. Lisäkivestiehyen alkuosassa principal-solut ovat korkeita ja pylväsmäisiä, mutta häntäosaan mentäessä ne muuttuvat mataliksi ja kuutiomaisiksi. (Robaire & Viger 1995; Robaire ym. 2006; Avenel ym. 2011.)

Tyvisolut (basal cells) ovat matalia puolipallon muotoisia soluja, jotka ovat kiinni tyvikalvossa. Ne ovat yhteydessä lumeniin vain kapeiden ulokkeiden avulla, jotka työntyvät muiden solujen väleistä. Tyvisolujen uskotaan osallistuvan principal-solujen kautta välittyvien sekä verestä tulevien molekyylien endosytoosiin ja olevan merkittävässä roolissa detoksifikaatiossa. Lisäksi niiden uskotaan säätelevän principal-solujen toimintaa veden ja elektrolyyttien kuljetuksen osalta. Tyvisoluja esiintyy koko lisäkivestiehyen alueella. (Robaire & Viger 1995; Robaire ym. 2006; Cornwall 2009; Avenel ym. 2011.)

Pitkiä kapeita narrow-soluja tavataan vain initial segmentin ja caputin alkuosan (intermediate zone) alueella, samoin kuin apikaalisoluja (apical cells). Apikaalisolut sijaitsevat epiteelin pinnalla, eivätkä ole yhteydessä tyvikalvoon. Molemmat solutyypit osallistuvat H<sup>+</sup>-ionien erittämiseen lumeniin ja näin ollen säätelevät lumenin nesteen happamuutta. Ne myös endosytoivat lumenista peräisin olevaa materiaalia ja ekspressoivat erilaisia proteiineja. Narrow-solujen ja apikaalisolujen proteiinien eritystoiminta eroaa huomattavasti toisistaan sekä principal-solujen eritystoiminnasta. (Robaire ym. 2006; Cornwall 2009; Avenel ym. 2011.)

Clear-solut ovat principal-solujen joukossa sijaitsevia suuria endosyyttisiä soluja, joita esiintyy capus-corpus-cauda –alueella, mutta ei initial segmentissä. Clear-solut sisältävät runsaasti vesikkeleitä, endosomeja ja lysosomeja ja niiden endosyyttinen aktiivisuus on tehokkaampaa, kuin millään muulla epiteelisolulla. Se on voimakkainta erityisesti caudan alueella. Clear-solut endosytoivat useita erilaisia lumeniin eritettyjä proteiineja sekä oletettavasti siittiöiden sytoplasmisia pisaroita. Myös clear-solut erittävät H<sup>+</sup> -ioneja ja osallistuvat näin luminaalinnesteen happamuuden säätelyyn. (Robaire & Viger 1995; Robaire ym. 2006; Cornwall 2009.)

Halo-solut ovat pieniä soluja, joilla on kapea sytoplasma ja ne sijaitsevat epiteelin tyvessä koko lisäkiveksen alueella. Ne ovat osa immuunisysteemiä ja niitä on karakterisoitu lymfosyyttien ja monosyyttien kaltaisiksi soluiksi. Ne ovat lisäkiveksen ensisijaisia immunologisia soluja. (Robaire & Viger 1995; Robaire ym. 2006; Cornwall 2009.)

Lisäkiveksen caput-osa on metabolisesti aktiivisin ja se erittää 70-80% kaikista proteiineista. Lisäkivesepiteelin solujen toiminta on erittäin segmenttispesifistä ja näin ollen vierekkäisetkin solut voivat ilmentää hyvin erilaisia geenejä tuottaen eri proteiineja. Solujen segmenttispesifinen toiminta yhdessä sidekudoksen muodostamien väliseinämien kanssa saa aikaan uniikkeja mikroympäristöjä, jotka luovat luminaalinnesteessä eteenpäin liikkuville siittiöille jatkuvasti muuntuvat olosuhteet. Lisäkiveksen lumenissa kulkeva neste onkin koostumukseltaan monimuotoisempi kuin minkään eksokriinisen rauhasen erittämä neste. Se sisältää proteiinien lisäksi mm. muita suuria makromolekyylejä, pieniä orgaanisia molekyylejä sekä ioneja. Myös luminaalinnesteen konsentraatio vaihtelee eri alueilla erityis- ja absorptio toiminnan tuloksena. Esimerkiksi siittiöiden saapuessa kiveksestä lisäkiveksen alkuosaan, suurin osa niitä kuljettaneesta nesteestä absorboidaan takaisin epiteelisolujen stereocilioiden avulla. Näin ollen sekä siittiöiden että muiden partikkelien konsentraatio kasvaa ja samalla jäljellä olevan luminaalinnesteen liike hidastuu. (Robaire & Viger 1995; Robaire ym. 2006; Cornwall & von Horsten 2007; Cornwall 2009; Avenel ym. 2011.)

### 2.2.2 Veri-lisäkives este

Lisäkivestiehyen luminaalinesteen koostumus eroaa selkeästi veri-plasmasta ja on siihen verrattuna hyperosmoottinen. Lisäkivesepiteelin principal-solujen välillä olevat tiukat liitokset muodostavat lumenin puoleisella pinnalla kehän, jota kutsutaan veri-lisäkives esteeksi. Se pitää luminaaliympäristön ja veri-plasman toisistaan erillään ja samalla se toimii immunoprotektiivisena tekijänä, joka on välttämätön siittiöiden kypsymiselle. Lisäksi veri-lisäkives este ylläpitää erikoistunutta luminaaliympäristöä rajoittamalla monien ionien ja makromolekyylien pääsyä lisäkivesepiteelin läpi. Veri-lisäkives esteen tehtävänä on suojella monille häiriötekijöille herkkiä siittiöitä ja huolehtia siitä, että ne ovat sopivassa ympäristössä kaikissa kypsymisvaiheissaan. (Robaire ym. 2006; Cornwall 2009.)

### 2.3 Lisäkiveksen toiminnan säätely

Tärkeimpiä lisäkiveksen toimintaa sääteleviä tekijöitä ovat androgeenit ja estrogeenit. Kiveksestä peräisin olevien androgeenien välttämättömyys lisäkiveksen rakenteelle ja toiminnalle on tiedetty jo vuosikymmenien ajan. Erityisesti dihydrotestosteronilla (DHT) on tärkeä rooli siittiöiden kypsymisessä ja selviytymisessä lisäkiveksessä. Tutkimuksissa, joissa lisäkives poistettiin tai androgeenien pääsy lisäkivekseen estettiin muulla tavoin, siittiöt menettivät liikkumiskykynsä sekä hedelmöittämiskykynsä ja kuolivat. Myös lisäkivesepiteelin rakenteessa ja toiminnassa tapahtui siittiöiden kypsymiselle epäsuotuisia muutoksia androgeenien vaikutuksen puuttuessa. (Robaire & Viger 1995; Robaire ym. 2006; Cornwall 2009; Avenel ym. 2011.)

Nykyään tiedetään, että lisäkiveksen toiminta on riippuvainen myös estrogeeneista. Näin on erityisesti initial segment-osassa. Estrogeenit säätelevät useiden eri geenien ilmenemistä lisäkivesepiteelin pinnalla olevien reseptorien kautta. Niiden tiedetään vaikuttavan myös lisäkivestiehyen supisteluun aktivoimalla signaalintireittejä, jotka vaikuttavat sileään

lihaskudokseen. Etenkin efferent ducteissa estrogeeneilla on merkittävä vaikutus luminaalinnesteen oikeanlaisen koostumuksen ylläpitämiseen sekä nesteen absorbointiin. Lisäkiveksessä estrogeenit vaikuttavat luminaalinnesteen osmolaliteetin ja oikean pH:n ylläpitämiseen. (Cornwall 2009; Avenel ym. 2011; Hess ym. 2011.)

Hormonien lisäksi lisäkiveksen toimintaan vaikuttavat kivesperäiset ja lisäkivesperäiset tekijät, sillä niiden puuttuessa initial segmentin epiteelisolujen morfologiassa ja geenien ekspressoitumisessa tapahtuu muutoksia, vaikka testosteronia olisikin saatavilla. Ilman kivesperäisiä tekijöitä useat initial segmentin solut kuolevat 24 tunnin kuluessa. Lisäkivesperäisiä tekijöitä ovat mm. luminaalinneste ja luminaaliympäristö itsessään. Luminaalinnesteen lisäkivestä säätelevät komponentit ovat suurelta osin vielä tuntemattomia, mutta ainakin proteiinien ja lipidien tiedetään olevan tärkeitä lisäkiveksen toiminnalle ja lisäkivesepiteelin ylläpitämiselle ja näin ollen siittiöiden kypsymiselle. (Robaire ym. 2006; Cornwall & von Horsten 2007; Cornwall 2009.)

Yhtenä ilmeisenä lisäkiveksen toimintaan vaikuttavana tekijänä pidetään itse siittiöitä tai niihin kiinnittyneitä tekijöitä. Monien lisäkives-spesifisten geenien ilmeneminen alkaa silloin, kun siittiöt saapuvat lisäkiveksen initial segmenttiin. Toisaalta taas tiettyjen geenien ilmenemistä ei tapahdu lainkaan, kun siittiöt on poistettu siemennesteestä. Siittiöt sisältävät aromataasi-entsyymiä, joka muuttaa androgeenejä estrogeeneiksi. (Robaire ym. 2006; Cornwall 2009; Avenel 2011; Sipilä 2012.) Sipilän tutkimusryhmän hypoteesin mukaan siittiöiden saapuaessa lisäkivekseen, luminaalinnesteen estrogeenipitoisuus nousee. Tämä aktivoi lisäkivesepiteelissä sijaitsevien estrogeenireseptorien kautta kulkevia signaalintireittejä ja sitä kautta vaikuttaa siittiöiden kypsymiselle tärkeiden geenien ilmenemiseen.

## 2.4 GPR30-reseptori ja sen paikantaminen

G Protein-Coupled Reseptor 30 (GPR30) kuuluu G-proteiinikytkentäisten reseptorien perheeseen, joka käsittää useita satoja reseptoreita. Ne ovat



solukalvon läpäiseviä reseptoreita, jotka ovat solun sisäpuolella kytköksissä G-proteiiniin ja niiden ligandia sitova osa on solun ulkopuolella. G-proteiini välittää vasteen epäsuorasti entsyymien tai ionikanavan kautta toisilähtämolekyyleille, jotka säätelevät proteiinikinaasien välityksellä kohdeproteiinien fosforylaatiota. Fosforyloitunut proteiini taas aiheuttaa muutoksen solun toiminnassa. Vaste tulee stimulaation jälkeen yleensä muutamassa sekunnissa. (Prossnitz ym. 2007; Koulutus- ja kehittämisspalvelu Aducate 2009; Prossnitz & Maggiolini 2009.)

Sittemmin GPR30:n on osoitettu olevan estrogeenireseptori. Tämän vuoksi siitä käytetään myös nimitystä GPER (G Protein-Coupled Estrogen Reseptor). Sitä tavataan monissa kudoksissa ja se välittää useiden eri estrogeenien signalointireittejä. GPR30 kuitenkin eroaa klassisista estrogeenireseptoreista merkittävästi. Se sijaitsee solukalvolla ja sen välittämä vaste tulee nopeasti non-transkriptiovälitteisiä reittejä pitkin. Klassiset estrogeenireseptorit taas sijaitsevat tumassa ja niiden vaste tulee hitaasti geenitranskription kautta. Tosin GPR30:n tiedetään toimivan myös transkriptiovälitteisesti ja eri signalointireittien toiminta voi olla osittain päällekkäistä tai ne voivat toimia vuorovaikutteisesti. GPR30:n toiminta on kuitenkin vielä melko tuntematonta. (Prossnitz ym. 2008; Prossnitz & Maggiolini 2009; Maggiolini & Picard 2010; Hess ym. 2011.)

GPR30:n tiedetään sijaitsevan lisäkivestiehyen epiteelissä ja sen oletetaan osallistuvan siittiöiden kypsymiseen (Hess ym. 2011; Sipilä 2011). Sen uskotaan välittävän itse siittiöiden tai niiden pinnalla olevien tekijöiden vaikutuksesta aktivoituvia signalointireittejä. GPR30:n tarkka paikantaminen on tärkeää, koska halutaan tutkia vain tietyssä lisäkiveksen osassa (initial segmentissä) tapahtuvia reaktioita. Tiedetään, että siittiöt itse säätelevät geenien ilmenemistä vain initial segmentissä, eivätkä muissa lisäkiveksen osissa. Lähetti-RNA analyysien perusteella on ensin selvitetty, mitkä reseptorit sijaitsevat ylipäättään lisäkiveksessä (satoja reseptoreita) ja mitkä reseptorit eivät enää ilmene, kun siittiöt puuttuvat luminaalinsteestä (kymmeniä reseptoreita). Näitä tietoja yhdistelemällä sekä etsimällä tietoa potentiaalisista reseptoreista, jää noin kymmenen reseptorin joukko, joiden sijainti

lisäkiveksessä voidaan selvittää immunohistokemiallisten värjäysten avulla. GPR30 on yksi tällaisista reseptoreista. Sen on sijaittava lisäkivesepiteelin pinnalla lumenissa, jotta siittiöt olisivat suorassa vuorovaikutuksessa sen kanssa. Lisäksi sen pitää löytyä ainoastaan initial segmentistä. (Sipilä 2011.) Reseptorit, jotka ilmenevät kaikissa lisäkiveksen segmenteissä, jätetään tässä vaiheessa jatkotutkimusten ulkopuolelle.

## 2.5 Immunohistokemia

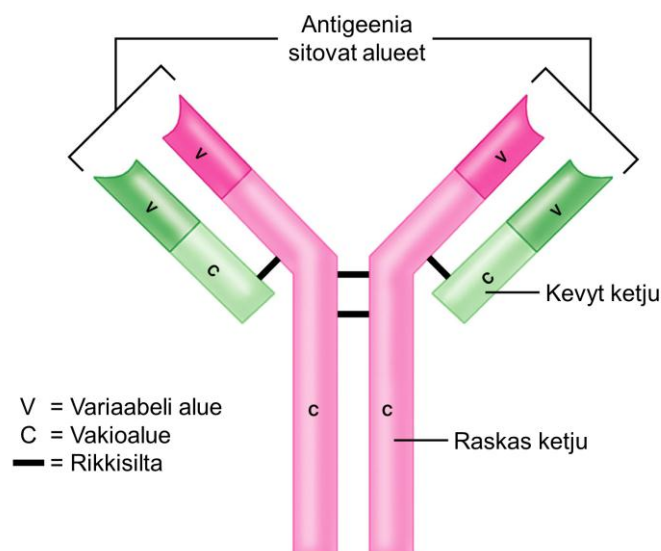
Immunohistokemialla tarkoitetaan antigeenien osoittamista kudoksetilasta niille spesifisten vasta-aineiden avulla. Menetelmä perustuu herkkään immunologiseen reaktioon antigeenin ja vasta-aineen välillä. Sitoutumisreaktio saadaan mikroskoopissa näkyväksi konjugoimalla jokin merkkiaine eli leima suoraan primaarivasta-aineeseen tai erilaisiin vasta-ainekomplekseihin. Immunohistokemiallisilla värjäyksillä on merkittävä asema histopatologisessa kasvaindiagnoosissa sekä biolääketieteellisessä tutkimustyössä. (Naukarinen & Boguslawsky 1998; Hayat 2002; Buchwalow 2010.)

### 2.5.1 Antigeenit ja vasta-aineet

Antigeeniksi kutsutaan mitä tahansa molekyyliä, joka saa aikaan immuunivasteen ja vasta-aineiden muodostumisen. Kudoksetilasta ovat esimerkiksi proteiinit, hiilihydraatit, rasvat ja nukleiinihapot. Antigeenien vasta-aineita sitovia kohtia sanotaan epitopeiksi. Sitoutumiskohdan yhteensopivuus määrää reaktion spesifisyyden sekä sitoutumisvoimakkuuden eli affiniteetin. Antigeenin ja vasta-aineen pitävät yhdessä vetysidokset, elektrostaattiset voimat ja van der Waalsin voimat. (Rantala & Laasonen 2000; Jackson & Blythe 2008.)

Vasta-aineet ovat B-lymfosyyteiksi muuntuneiden plasmakivien tuottamia seerumin glykoproteiineja, joita kutsutaan immunoglobuliineiksi. Immunoglobuliinit jaetaan viiteen luokkaan, jotka ovat IgA, IgD, IgE, IgG ja IgM.

Suurin osa immunoglobuliineista on luokkaa IgG ja se onkin immunohistokemiassa yleisimmin käytetty. Joskus käytetään myös IgM-luokan vasta-aineita. IgG molekyyli koostuu kahdesta identtisestä kevyt- ja raskasketjusta (Kuva 2.). Nämä neljä polypeptidiketjua ovat asettuneet Y-kirjaimen muotoon ja kiinnittyvät toisiinsa disulfididisosten eli rikkisiltojen avulla. Y:n sakaroiden kärjissä sijaitsevat kevyt- ja raskasketjujen antigeenia sitovat aminoterminaaliosat eli Fab-osat (Fragment, antigen binding). Näiden variaabeleiden alueiden erilaiseen aminohappojärjestykseen perustuu vasta-aineen spesifisyys tiettyä antigeeniepitooppia kohtaan. Vasta-ainemolekyylin häntäosa eli karboksiterminaaliosa on kaikilla saman luokan immunoglobuliineilla samanlainen. Tätä vakioaluetta (Fc) kutsutaan myös kristallisoitavaksi osaksi (Fragment, crystallizable), johon yleensä konjugoidaan jokin merkkiaine. Epäsuorassa menetelmässä Fc-osaan kiinnittyy toinen vasta-aine tai vasta-ainekompleksi. IgM on pentameeri, joka koostuu viidestä IgG:n kaltaisesta molekyylistä, jotka ovat kiinnittyneet Fc-osastaan viisikulmion muotoiseen ketjuun. IgM-molekyylissä vasta-aineen valenssi eli identtisten antigeenia sitovien kohtien lukumäärä on näin ollen kymmenen, kun taas IgG-molekyylissä se on kaksi. (Kiernan 1999; Hayat 2002; Jackson & Blythe 2008; Buchwalow 2010; Naukkarinen 2011a.)



Kuva 2. Vasta-ainemolekyylin perusrakenne.  
(Pearson Benjamin Cummings 2005)

### 2.5.1.1 Polyklonaaliset vasta-aineet

Polyklonaalisia vasta-aineita valmistetaan immunisoimalla isäntäeläin spesifisellä antigeenilla. Yleisimmin käytetty eläin on kani, mutta myös vuoha, marsua, sikaa ja hevosta käytetään. Puhdistettua immunogeenistä antigeenia injisoidaan eläimeen, jolloin siinä syntyy antigeenille humoraalinen immuunivaste. Plasmasoluiksi muuntuneet B-lymfosyytit alkavat tuottaa vasta-ainetta antigeenia vastaan. Eri B-solukloonien tuottamat vasta-aineet eroavat toisistaan Fab-alueen osalta, joten polyklonaalinen vasta-aine on heterogeeninen seos immunoglobuliineja, jotka sitoutuvat saman antigeenin eri epitoppeihin. Myös affiniteetissa antigeeniepitoppeja kohtaan on eroja. Koe-eläimen seerumista eristetty vasta-aine puhdistetaan huolellisesti muista proteiineista ja mahdollisista vasta-aineista. Puhdistus tapahtuu yleensä erilaisten absorptio- ja kromatografiamenetelmien avulla. (Naukkarinen & Boguslawsky 1998; Hayat 2002; Jackson & Blythe 2008; Boenisch 2009a.)

### 2.5.1.2 Monoklonaaliset vasta-aineet

Monoklonaalisia vasta-aineita valmistetaan hybridoomatekniikalla. Immunisoidun eläimen (yleensä hiiren) pernasta eristetyt plasmasolut yhdistetään neoplastisiin myeloomasoluihin, joilla on kyky jakautua loputtomasti. Syntyneistä hybrideistä valitaan viljeltäväksi sellainen, joka tuottaa haluttua vasta-ainetta. Hybridisolulinja voi tuottaa spesifistä, vain yhteen antigeeniepitoppiin sitoutuvaa vasta-ainetta in vitro -olosuhteissa teoriassa rajattomasti. Monoklonaalista vasta-ainetta voidaan tuottaa myös elävässä eläimessä, mutta se ei ole epä-eettisyytensä vuoksi kovin yleinen menetelmä. Hybridisoluja injisoidaan eläimeen ja aiheutetaan myelooma-tuumori, jonka erittämä vasta-ainerikas ascites-neste valutetaan talteen. (Hayat 2002; Jackson & Blythe 2008; Boenisch 2009a; Buchwalow 2010.)

Hybridoomatekniikan kehittäminen monoklonaalisten vasta-aineiden tuottamiseksi oli valtava edistysaskel bio- ja lääketieteellisessä tutkimuksessa

sekä tautidiagnostiikassa. Synteettisten peptidien avulla on mahdollista valmistaa monoklonaalista vasta-ainetta periaatteessa mitä tahansa antigeeniepitooppia kohtaan, jos tämän aminohappojärjestys tunnetaan. Näin tuotetuilla vasta-aineilla on parempi spesifisyys ja affiniteetti ja ne vähentävät taustaa. (Hayat 2002; Buchwalow 2010.)

Monoklonaalisten vasta-aineiden laajan kirjon sekä tasalaatuisuuden lisäksi niiden etuna on spesifisyys tiettyä antigeeniepitooppia kohtaan, mutta samasta syystä värjäyksen lopputulos on usein niukka. Polyklonaalinen vasta-aine tunnistaa useampia epitooppeja samasta antigeenista, joten se on käyttökelpoinen etenkin silloin, kun osa antigeeniepitoopeista on menetetty näytteen prosessoinnin yhteydessä. Polyklonaalinen vasta-aine on kuitenkin hieman epäspesifi, eikä sillä päästä värjäyksissä yhden molekyylin tarkkuuteen, kuten monoklonaalisilla vasta-aineilla. Epäspesifisyys myös lisää ristireagoinnin mahdollisuutta muiden proteiinien kanssa. (Naukkarinen & Boguslawsky 1998; Hayat 2002; Boenisch 2009a.)

## 2.5.2 Vasta-aineiden laimentaminen

Vasta-aineen oikea pitoisuus eli tiitteri määritellään immunohistokemiassa siten, että se on suurin mahdollinen laimennos, joka antaa maksimaalisen spesifisen värjäystuloksen ja mahdollisimman vähän taustaa. Vasta-ainevalmistajat myyvät valmiiksi laimennettuja ready-to-use -vasta-aineita sekä vasta-ainekonsentraatteja, joissa on ilmoitettu pitoisuus sekä annettu laimennossuositukset ja inkubaatioaika. Jos valmistaja suosittelee laimennosta 1:50 ja tunnin inkubaatioaikaa, laimennossarjan voi aloittaa laimennoksilla 1:10, 1:50 ja 1:100. Inkuboitessa näytettä yön yli, laimennokset voivat olla suuremmat, esimerkiksi 1:50, 1:250 ja 1:500. Ellei laimennossuosituksista, inkubaatioajasta tai esikäsitteystä ole tietoa saatavilla, on paras aloittaa valitsemalla kiinteä inkubaatioaika ja kokeilemalla pienillä määrillä eri laimennoksia. Kaikki laimennokset on lisäksi testattava eri

esikäsitteilymenetelmin sekä ilman esikäsitteilyä. (Naukkarinen & Boguslawsky 1998; Jackson & Blythe 2008; Boenisch 2009c.)

Laimennossarjojen tekeminen koskee yleensä vain primaarivasta-aineita, jolloin sekundaari- ja tertiaarivasta-aineiden laimennokset pidetään samoina. Vasta-aineet laimennetaan puskuriin (PBS, BSA), joka estää vasta-aineen polymerisoitumista sekä koeputken seinään kiinnittymistä. Jos primaarivasta-ainetta käytetään hyvin pieniä määriä suurina laimennoksina, on parasta tehdä välilaimennos, jonka voi tarvittaessa pakastaa. Myös vasta-ainekonsentraatit säilytetään pakastettuina. Laimennetut vasta-aineet ja vasta-ainekonjugaatit säilytetään jääkaappilämpötilassa, koska ne kärsivät toistuvasta jäädyttämisestä ja sulattamisesta. (Naukkarinen & Boguslawsky 1998; Jackson & Blythe 2008; Boenisch 2009c.)

### 2.5.3 Merkkiaineet

Merkkiaineet ovat vasta-aineisiin tai vasta-ainekomplekseihin konjugoitavia yhdisteitä, joiden avulla pystytään visualisoimaan tutkimuksen kohteena oleva antigeeni. Merkkiaineen on pysyttävä kiinni vasta-aineessa, eikä sen konjugointi saa alentaa vasta-aineen sitoutumisaktiiviteettia. Myös pieni molekyylikoko on eduksi, jolloin merkkiaine ei vaikeuta vasta-aineen penetraatiota leikkeeseen. Eniten käytettyjä merkkiaineita immunohistokemiassa ovat fluorokromit ja entsyymit. Kultapartikkeleita käytetään nykyisin lähinnä elektronimikroskopiassa. (Buchwalow 2010; Naukkarinen 2011b.)

Fluorokromit ovat fluoresoivia väriaineita, joiden käyttö perustuu niiden kykyyn absorboida korkeaenergistä lyhytaaltoista valoa ja emittoida se matalaenergisenä valona, jolla on pidempi aallonpituus. Fluorokromit näkyvät fluoresenssimikroskoopissa, jossa on eri aallonpituuksille säädettävät suodattimet. Yleisimmin käytettyjä fluorokromeja ovat vihreää valoa emittoiva fluoreseiini-isotiosyanaatti (FITC) ja oranssia valoa emittoiva tetrametyylirodamiini-isotiosyanaatti (TRITC). Fluorokromeille on tyypillistä, että mikroskopoitaessa ne menettävät vähitellen fluoresoivan ominaisuutensa.

Ilmiötä kutsutaan valovalkaisuksi (photobleaching). Sen tarkkaa mekanismia ei tunneta, mutta sen uskotaan johtuvan fluoresenssin sivuvaikutuksena syntyvän reaktiivisen hapen fluorokromia tuhoavasta vaikutuksesta. Fluoresenssin häviämistä voidaan hidastaa mahdollisimman lyhytkestoisella eksitaatiovaloaltistuksella ja haalistumista estävien kaupallisten peitinaineiden avulla sekä säilyttämällä näytteitä pimeässä ja viileässä. (Brandtzaeg ym. 1997; Robinson ym. 2009; Buchwalow 2010; Naukkarinen 2011b.)

Entsyimin käyttäminen merkkiaineena perustuu sen reaktioon substraattinsa ja sopivan väriaineen eli kromogeenin kanssa. Vasta-aineen sitoutumispaikalle syntyy värillinen saostuma, joka näkyy tavallisessa valomikroskoopissa. Yleisin merkkientsyymi on piparjuuren peroksidaasi (HRP), jonka substraattina käytetään vetyperoksidia. Kromogeeneista käytetyin on ruskean sakan muodostava 3,3'-diaminobentsiinitetrahydrokloridi (DAB). Myös punaisen värin antavaa 3-amino-9-etyylikarbatsolia käytetään paljon. Toinen yleinen merkkientsyymi on alkalinen fosfataasi. Se on hyödyllinen varsinkin sellaisten näytteiden kohdalla, joissa on paljon kudoksen omaa, endogeenista peroksidaasiaktiivisuutta, joka haittaa tulosten tulkintaa. Alkalisen fosfataasin substraattina käytetään yleisimmin fosfaattisuoloja ja kromogeenina punaisen tai sinisen sakan antavia väriaineita. Jotkut kromogeenit liukenevat alkoholiin ja ksyleeniin, joten niiden kanssa on käytettävä vesipohjaisia liuoksia ja peitinaineita. Vähemmän käytettyjä merkkientsyymejä ovat *Aspergillus niger* -homeesta eristetty glukoosioksidaasi sekä *Escherichia coli* -bakteerista eristetty  $\beta$ -galaktosidaasi. Merkkientsyymi voidaan liittää vasta-aineeseen joko suoraan tai entsyymi-vasta-ainekompleksien tai avidiini-biotiinikompleksien avulla. (Rantala & Laasonen 2000; Jackson & Blythe 2008; Boenisch 2009b; Buchwalow 2010; Naukkarinen 2011b.)

#### 2.5.4 Näytteiden fiksointi

Fiksoinnin tarkoituksena on pitää antigeeniepitoopit kudoksessa paikallaan ja muuttumattomina näytteen jatkokäsittelyn sekä värjäyksen ajan. Lisäksi sen

tarkoituksena on estää kudoksen autolyysi ja bakteerien hajottava vaikutus. Ideaalinen fiksatiivi säilyttäisi kudasmorfologian ja antigeenisyyden ja estäisi antigeenin diffuntoitumisen kudoksessa. Se ei kutistaisi tai turvottaisi kudosta, eikä estäisi vasta-aineiden pääsyä antigeenien luo. Tähän mennessä ei ole pystytty kehittämään sellaista fiksatiivia, joka täyttäisi kaikki nämä vaatimukset ja olisi ihanteellinen kaikille antigeeneille. Sen vuoksi fiksointi on aina jonkinlainen kompromissi kudasmorfologian ja antigeenien säilymisen välillä ja se riippuu myös tutkittavasta kudoksesta ja antigeenista. (Rantala & Laasonen 2000; Grizzle ym. 2008; Farmilo & Stead 2009; Buchwalow 2010.)

Yleisimmin käytetty fiksatiivi on 10%:nen fosfaattipuskuroitu formaldehydi (formaliini), mutta lähes yhtä yleinen on 4%:nen paraformaldehydi, joka on antigeeniystävällisempi, mutta säilyttää silti kudasmorfologian. Formaldehydit ovat halpoja fiksatiiveja ja ne säilyttävät kudasmorfologian hyvin. Lisäksi niiden käytöstä immunohistokemiassa on pitkä kokemus. Aldehydifiksatiivien teho perustuu niiden kykyyn muodostaa ristsidoksia proteiinien aminohappojen välille, mutta samalla se vaikeuttaa vasta-aineiden kulkeutumista antigeeniepitooppien luo. Sidokset ovat kuitenkin palautuvia, joten epitoopit ovat paljastettavissa. Glutaraldehydi fiksoi tehokkaasti ja säilyttää morfologian erinomaisesti, mutta sen voimakkaat ristsidokset proteiinien välillä ovat yleensä palautumattomia, joten se ei sovi useimmille antigeeneille. Aldehydifiksatiivit aiheuttavat värjäyksissä usein taustaa. (Kiernan 1999; Hayat 2002; Grizzle ym. 2008; Laasonen 2011.)

Kudosten kiinnittämiseen voidaan käyttää myös koaguloivia fiksatiiveja, jotka eivät muodosta ristsidoksia. Ne ovat hellävaraisia antigeeneille, mutta säilyttävät morfologian huonosti. Tällaisia ovat alkoholifiksatiivit sekä asetoni, jota käytetään paljon jääleikkeillä. Pikriinihappoa sisältävä Bouinin fiksatiivi on nopea ja säilyttää hyvin morfologian, mutta se ei sovi kaikille antigeeneille, eikä toimi esimerkiksi IgG:n kanssa. Lisäksi se värjää näytteet keltaisiksi, joten ne on pestävä huolellisesti fiksoinnin jälkeen. (Rantala & Laasonen 2000; Hayat 2002; Farmilo & Stead 2009; Buchwalow 2010.)



Fiksaatioaika riippuu näytteen koosta, käytetystä fiksaatiivista sekä lämpötilasta. Suuri kudospala vaatii luonnollisesti pidemmän fiksointiajan kuin pieni. Formaliinifiksaatiota voidaan nopeuttaa mikroaaltouunikäsittelyllä. Myös fiksaatiivin pH on tärkeä kudoksen kiinnittämiseen vaikuttava tekijä. Formaliinifiksaatiivi ei saa olla hapant, koska se aiheuttaa voimakasta ristikudosten muodostumista. (Hayat 2002; Grizzle ym. 2008; Laasonen 2011.)

Jääleikeblokit tehdään usein tuoreesta, fiksoimattomasta näytteestä, mutta myös fiksoitu kudospala voidaan jäädyttää. Parafiinileikkeiden osalta kudosten käsittely jatkuu kuljetuksella ja valulla parafiiniblokkeihin, ennen kuin ne ovat valmiit leikkaamista varten.

### 2.5.5 Antigeeniepitooppien paljastaminen

Monet eri vaiheet kudosten käsittelyssä, kuten fiksointi, prosessointi ja valu, vaikuttavat haitallisesti antigeeniepitooppiin ja niitä ympäröiviin rakenteisiin hankaloittaen vasta-aineen pääsyä kudokseen ja sitoutumista antigeeniin. Eniten haittaa aiheutuu leikkeissä, jotka fiksoidaan formaliinilla ja valetaan parafiiniin. Formaliini muodostaa ristikudoksia, jotka muuttavat proteiinien kolmiulotteista rakennetta ja kätkevät samalla antigeeniepitooppeja taakseen. Myös epitooppien rakenteissa saattaa tapahtua muutoksia. Suurin osa fiksaation aiheuttamista muutoksista on kuitenkin palautuvia, joten peittyneet antigeenit on mahdollista saada esiin ja niiden immunoreaktiivisuus palauttaa. Tähän tarkoitukseen on kehitetty erilaisia antigeenien paljastusmenetelmiä, joilla on tärkeä rooli värjäyksen onnistumisessa. Ne voidaan jakaa entsyymaattisiin ja korkeaan lämpötilaan perustuviin menetelmiin. Joillekin antigeeneille sopii parhaiten näiden menetelmien yhdistelmät. Kaikille antigeeneille yhteistä menetelmää ei ole olemassa, joten menetelmän valinta perustuu suurilta osin testaamiseen sekä käytettävän vasta-aineen valmistajan suosituksiin. Osa antigeeneista on osoitettavissa ilman esikäsittelyä, koska kaikkiin antigeeneihin fiksaatio ei vaikuta samalla tavoin. Kaikki fiksaatiivit eivät

myöskään muodosta haitallisia ristsidoksia. (Rantala & Laasonen 2000; Hayat 2002; Jackson & Blythe 2008; Buchwalow 2010.)

#### 2.5.5.1 Entsymaattiset menetelmät

Entsyymikäsittelyihin käytetään proteolyyttisiä entsyymejä, jotka pilkkovat fiksaatiivin aiheuttamia ristsidoksia paljastaen peittyneitä antigeeniepitooppeja. Samalla ne helpottavat vasta-aineiden pääsyä antigeenien luo. Yleisimmin käytettyjä entsyymejä ovat trypsiini, pepsini, proteinaasi K ja pronaasi. Entsymaattinen käsittely lisää huomattavasti värjäyksen intensiteettiä, mutta se on erittäin vaikeasti standardoitavissa monen siihen vaikuttavan tekijän vuoksi. Tärkein ja kriittisin tekijä entsyymikäsittelyssä on inkubaatioaika. Se on suhteessa näytteen fiksaatioaikaan eli mitä kauemmin näytettä on fiksoitu, sitä pidemmän proteolyyttisen käsittelyn se vaatii. Liian pitkä inkubaatioaika kuitenkin tuhoaa kudoksen morfologiaa ja antigeenin immunoreaktiivisuutta, koska entsyymi pilkkoo myös tutkittavaa antigeenia. Lisäksi se aiheuttaa taustaa ja saattaa irrottaa leikettä lasilta. Muita tärkeitä tekijöitä ovat entsyymiliuoksen pH, konsentraatio sekä lämpötila. Entsyymikäsittely riippuu myös paljastettavasta antigeenista, johon eri entsyymeillä on erilainen vaikutus. Joillekin antigeeneille entsyymikäsittely ei sovi lainkaan. (Brandtzaeg ym. 1997; Hayat 2002; Jackson & Blythe 2008; Laasonen 2011.)

#### 2.5.5.2 Korkean lämpötilan menetelmät

Korkeaan lämpötilaan perustuvia antigeenin paljastusmenetelmiä ovat mikroaaltouunikäsittely, painekattilakäsittely sekä autoklavointi. Tärkeimmät tulokseen vaikuttavat tekijät ovat kumentamisaika sekä puskuriliuoksen pH. Suurin osa antigeeneista saadaan esille neutraaleissa olosuhteissa, jotkut taas vaativat happaman ja toiset alkalisen puskuriliuoksen. Yleisimmin käytettyjä puskureita, jotka sopivat useimmille antigeeneille, ovat sitraattipuskuri (pH 6) sekä TE-puskuri (pH 7-9). Puskuriliuoksessa olevat näytteet kuumennetaan kiehumispisteeseen tietyksi ajaksi, jonka jälkeen niiden annetaan rauhassa

jäähtyä ennen pesuja. Käsittelyajan pituus riippuu lämpötilasta. Osa antigeeneista vaatii korkeamman, osa alhaisemman lämpötilan. Liian pitkä kuumentaminen irrottaa leikettä lasilta ja denaturoi proteiineja. (Brandtzaeg ym. 1997; Hayat 2002; Jackson & Blythe 2008; Laasonen 2011.)

Suosituin korkeaan lämpötilaan perustuva menetelmä on mikroaaltouunikäsittely, koska se on edullinen ja yksinkertainen ja sopii monille antigeeneille. Mikroaaltouunikäsittelyssä lämpövaikutuksen lisäksi antigeenien paljastumiseen vaikuttaa todennäköisesti myös elektromagneettinen säteily. Kaikille antigeeneille mikroaaltouunikäsittely ei kuitenkaan sovi, toisille se taas on ainoa sopiva menetelmä. Eri lämpökäsittelyjen tehokkuudessa ei ole suurta eroa, mutta painekattilakäsittely ja autoklavointi ovat hellempiä kudokselle, koska niissä ei tapahdu puskurin kuplimista. Joillekin antigeeneille toimii parhaiten yhdistelmä, jossa lämpökäsittelyn jälkeen tehdään lyhyt proteolyyttinen entsyymikäsittely. Vasta-aineiden kulkeutumista antigeeniepitooppien luo voidaan helpottaa myös lisäämällä puskuriliuoksiin pintajännitystä alentavaa ainetta. (Hayat 2002; Jackson & Blythe 2008; Buchwalow 2010; Laasonen 2011.)

## 2.5.6 Immunohistokemialliset värjäysmenetelmät

Immunohistokemiassa on useita erilaisia värjäysmenetelmiä, joita voidaan käyttää kudasantigeenien värjäämisessä ja paikantamisessa. Sopivan menetelmän valinta riippuu mm. tutkittavasta näytetyypistä, näytteen prosessointitavasta sekä vaaditusta herkkydestä ja spesifisyydestä värjäystuloksissa. (Jackson & Blythe 2008.)

### 2.5.6.1 Suora menetelmä

Suora menetelmä on helpoin ja yksinkertaisin tapa antigeenien osoittamiseksi. Merkkiaine (fluorokromi tai entsyymi) on konjugoitu suoraan antigeenispesifiseen primaarivasta-aineeseen, joten tarvitaan vain yksi vasta-

aineinkubaatio. Menetelmä on nopea ja spesifinen, mutta varsin epäherkkä. Epäherkkydestä johtuvan värjäystuloksen niukkuuden vuoksi suoran menetelmän käyttö on vähäistä. Konjugoitujen primaarivasta-aineiden käyttö on myös epäkäytännöllistä ja kallista, eikä tiettyjä valmiiksi leimattuja vasta-aineita välttämättä ole kaupallisesti saatavilla. Suoraa värjäysmenetelmää käytetään lähinnä jääleikkeiden immunofluoresenssitutkimuksissa. Se on käyttökelpoinen menetelmä silloin, jos antigeenia on tutkittavassa kudoksessa runsaasti. Suoraa menetelmää tarvitaan myös kaksoisvärjäyksissä, joissa molemmat primaarivasta-aineet on tuotettu samassa eläimessä. (Rantala & Laasonen 2000; Jackson & Blythe 2008; Robinson ym. 2009; Buchwalow 2010.)

#### 2.5.6.2 Epäsuora menetelmä

Epäsuorassa menetelmässä kudokset inkuboidaan ensin leimaamattomassa antigeenispesifisessä primaarivasta-aineessa ja sen jälkeen leimatussa sekundaarivasta-aineessa. Primaari- ja sekundaarivasta-aine on tuotettu eri eläimessä, joten primaarivasta-aine toimii sekundaarivasta-aineen spesifisenä antigeeninä. Useita sekundaarivasta-ainemolekyylejä voi sitoutua primaarivasta-aineen Fc-osan epitoppeihin, joten epäsuora menetelmä on huomattavasti herkempi kuin suora menetelmä. Se on myös edullinen ja suhteellisen nopea. Epäsuora värjäysmenetelmä onkin yleisimmin käytössä ja tarpeellinen etenkin silloin, kun antigeenia on vähän tai primaarivasta-aine on monoklonaalinen. Lisäksi menetelmän etuna on, että useita erilaisia leimaamattomia primaarivasta-aineita voidaan käyttää yhden leimatun sekundaarivasta-aineen kanssa, jolloin on enemmän valinnanvaraa eri värjäysten suhteen. (Naukkarinen & Boguslawsky 1998; Rantala & Laasonen 2000; Jackson & Blythe 2008; Robinson ym. 2009; Buchwalow 2010.)

#### 2.5.6.3 Kaksoisvärjäykset

Immunohistokemiallisessa kaksoisvärjäyksessä on tarkoitus saada esiin kaksi eri antigeenia samasta leikkeestä. Menetelmää käytetään bio- ja

lääketieteellisessä tutkimustyössä sekä tautidiagnostiikassa. Sen avulla voidaan esimerkiksi osoittaa kahden antigeenin sijainti suhteessa toisiinsa jopa saman solun sisällä. Kaksoisvärjäyksessä on tärkeää, että merkkiaineiden värit erottuvat selkeästi toisistaan ja niiden intensiteetti on yhtä voimakas. Kahden eri värjäyksen reagenssit eivät myöskään saa ristireagoida keskenään. Yleisimmin käytetty merkkiaineyhdistelmä immunofluoresenssivärjäyksissä on FITC ja TRITC. Värjäykset voidaan tehdä samanaikaisesti, jos primaarivasta-aineet ovat peräisin eri eläimestä tai jos toinen vasta-aine on polyklonaalinen ja toinen monoklonaalinen. Kun värjäykset tehdään peräkkäin, vältetään ristireagoinnilta, mutta puskuripesut on tehtävä joka vaiheen jälkeen perusteellisesti. Kaksoisvärjäyksissä voidaan käyttää suoraa tai epäsuoraa menetelmää. Immunohistokemiassa suosittu tapa on yhdistää nämä kaksi menetelmää tekemällä ensin suora ja sitten epäsuora värjäys. Kaksoisvärjäys voidaan tehdä käyttäen fluorokromeja, entsyymimerkkiaineita tai molempia. Kummankin värjäyksen toimivuus pitää testata erikseen ennen kaksoisvärjäystä. (Naukkarinen & Boguslawsky 1998; Jackson & Blythe 2008; Christensen & Winther 2009; Buchwalow 2010.)

#### 2.5.6.4 Immunoentsyymimenetelmät

Suorassa immunoentsyymimenetelmässä merkkientsyymi on liitetty primaarivasta-aineeseen ja epäsuorassa sekundaarivasta-aineeseen. Substraatin ja kromogeenin lisäys saa aikaan reaktion, jonka lopputuloksena on näkyvä sakka. Entsyymi-antientsyymimenetelmissä, joita kutsutaan myös leimaamattoman vasta-aineen menetelmiksi, käytetään yleensä peroksidaasi-antiperoksidaasikompleksia (PAP) tai alkalinen fosfataasi-antialkalinen fosfataasi-kompleksia (PAAP). Leimaamaton sekundaarivasta-aine eli linkkivasta-aine liittyy entsyymi-antientsyymikompleksin antigeeniin sitoutuneeseen, leimaamattomaan primaarivasta-aineeseen. Merkkientsyymi osoitetaan lopuksi substraatin ja kromogeenin avulla entsyymikompleksista. Näitä menetelmiä käytetään nykyisin enää harvoin. (Naukkarinen & Boguslawsky 1998; Hayat 2002; Jackson & Blythe 2008; Buchwalow 2010.)

#### 2.5.6.5 Avidiini-biotiinimenetelmät

Avidiini-biotiinimenetelmällä voidaan tehostaa värjäystulosta niin immunofluoresenssimenetelmissä, kuin immunoentsyymimenetelmissäkin. Tämä perustuu munanvalkuaisen proteiinin, avidiinin, sekä *Streptomyces avidinii* -bakteerista eristetyn streptavidiinin suureen affiniteettiin biotiinia kohtaan. Avidiini pystyy teoriassa sitomaan neljä biotiinimolekyyliä, vaikka käytännössä näin ei useinkaan tapahdu. Suuri määrä biotiinimolekyyliä on helposti konjugoitavissa vasta-aineisiin ja entsyymeihin. Avidiini-biotiinimenetelmistä yleisimmin käytössä ovat leimattu avidiini-biotiinimenetelmä (LAB) sekä avidiini-biotiinikompleksimenetelmä (ABC). LAB:ssa merkkiaine on konjugoitu avidiiniin, ABC:ssa avidiini, biotiini ja merkkiaine muodostavat kompleksin, jossa entsyymi on kiinnittyneenä biotiiniin ja biotiini avidiiniin. Molemmissa menetelmissä avidiini sitoutuu biotinyloituun sekundaarivasta-aineeseen. Nelivaiheisissa värjäyksissä leikkeitä inkuboidaan ensin primaarivasta-aineessa, sitten biotinyloidussa sekundaarivasta-aineessa ja sen jälkeen entsyymillä leimatussa avidiinissa (LAB) tai avidiini-biotiini-entsyymikompleksissa (ABC). Viimeisessä vaiheessa tehdään entsyymien osoitusreaktio substraatin ja kromogeenin avulla. (Rantala & Laasonen 2000; Hayat 2002; Key 2009; Buchwalow 2010.)

#### 2.5.6.6 Polymeeritekniikka

Polymeeritekniikassa hyödynnetään yleensä epäsuoraa menetelmää. Siinä polymeerirunkoon on konjugoitu sekundaarivasta-aineita sekä useita kymmeniä merkkientsyymejä. Spesifinen primaarivasta-aine kiinnittyy ensin antigeeniin, jonka jälkeen sekundaarivasta-aine kiinnittyy primaarivasta-aineeseen liittäen siihen myös polymeerin. Viimeisessä vaiheessa tehdään entsyymien osoitusreaktio. Menetelmä on herkkä ja melko nopea, eikä sitä häiritse endogeeninen biotiini. Haittapuolena on polymeerin pituus, joka vaikeuttaa sen tunkeutumista kudoksiin. Sen vuoksi tarvitaan rajummat esikäsitteilyt, jotka taas ovat haitallisia leikkeen morfologialle. Nykyisin on saatavilla myös pienempiä

polymeerimolekyylejä, joiden kanssa tällaista ongelmaa ei ole. (Key 2009; Buchwalow 2010; Naukkarinen 2011c.)

#### 2.5.6.7 Ei-immunologiset menetelmät

Molekyylien välinen sitoutuminen toisiinsa ei rajoitu ainoastaan antigeenien ja vasta-aineiden välisiin reaktioihin. Immunologisten menetelmien lisäksi värjäyksissä voidaan käyttää hyväksi esimerkiksi proteiinien ja sokereiden välistä luonnollista affiniteettia. Tällaisia menetelmiä kutustaan ei-immunologisiksi värjäysmenetelmiksi. *Amanita phalloides* -sienestä saatava toksini, falloidiini, sitoutuu spesifisesti aktiiniin, joka on solun tukirangalle sekä liikkumiselle tärkeä säikeinen proteiini. Myös solujen pinnalla olevat mikrovillukset muodostuvat aktiinisäikeistä. Lektiinit ovat kasveista ja eläimistä eristettäviä proteiineja, jotka sitovat kudosten sokereita. Lektiinejä voidaan leimata ja käyttää vasta-aineiden tavoin. Lisäksi niitä voidaan käyttää antigeenina vasta-aineiden muodostuksessa. Sidekudoksen proteoglykaanit ja glykoproteiinit sitoutuvat spesifisesti hyaluronihappoon, joka on lähes kaikissa kudoksissa esiintyvä polysakkaridi. Myös lääkeaineiden ja hormonien aktiivista sitoutumista tiettyihin kudosten reseptoreihin voidaan käyttää hyväksi ei-immunologisissa värjäysmenetelmissä. (Naukkarinen & Boguslawsky 1998; Kiernan 1999; Solunetti 2006; Jackson & Blythe 2008; Buchwalow 2010.)

#### 2.5.7 Taustavärjäytyminen

Taustavärjäytyminen on yksi yleisimmistä ongelmista immunohistokemiassa ja sitä aiheuttavat useat eri tekijät. Se voi olla ei-toivottua spesifistä tai epäspesifistä värjäytymistä. Spesifisellä taustavärjäytymisellä tarkoitetaan sitoutumisreaktioita, joissa on mukana tutkittava antigeeni, kun taas epäspesifisellä taustavärjäytymisellä tarkoitetaan sellaisia reaktioita, joissa vasta-aine sitoutuu muualle, kuin tutkittavaan antigeeniepitooppiin. Lisäksi taustavärjäytyminen voi olla kudoksen omasta entsyymiaktiivisuudesta sekä autofluoresenssista johtuvaa. (Hayat 2002; Wendelboe & Bisgaard 2009.)

### 2.5.7.1 Spesifinen tausta

Spesifistä taustavärjäytymistä voi aiheuttaa tutkittavan antigeenin diffundoituminen ympäröivään kudokseen, jolloin värjäytymistä tapahtuu siellä, missä ei pitäisi. Diffuntoitumista ehtii tapahtua kudoksessa, jos fiksaatio on hidas tai epätäydellinen. Sen vuoksi fiksoitavien näytteiden pitäisi olla mahdollisimman pieniä ja fiksointi suhteellisen nopea. Muita tekijöitä, jotka vaikuttavat antigeenien diffuntoitumiseen, ovat kudoksen kuivuminen tai puristuminen ennen värjäystä, autolyysi sekä nekroottiset alueet. Lisäksi spesifistä taustavärjäytymistä voi esiintyä soluissa, jotka ovat fagosytoineet antigeenia. (Hayat 2002; Wendelboe & Bisgaard 2009; Naukkarinen 2010.)

### 2.5.7.2 Epäspesifinen tausta

Yleinen taustaa aiheuttava tekijä on epäspesifinen proteiinien välinen sitoutuminen, joka on seurausta vasta-aineiden ja kudosten hydrofobisuudesta sekä elektrostaattisista voimista. Kudosten prosessointi ja fiksointi sekä vasta-aineiden säilytys ja puskuriliuoksen korkea pH lisäävät hydrofobisuutta entisestään. Suosituin tapa poistaa siitä johtuvaa epäspesifistä taustaa, on näytteen inkuboiminen ennen primaarivasta-ainetta normaaliseerumissa, joka on tuotettu samassa eläimessä kuin sekundaarivasta-aine. Myös BSA: ta (bovine serum albumin) ja kaseiinia käytetään samalla tavoin epäspesifisten sitoutumiskohtien blokkaukseen näytteessä. Niin ikään pintajännitystä alentavien aineiden (Triton X-100, Tween 20) lisääminen pesu- ja laimennospuskuriin on yleinen tapa vähentää epäspesifistä sitoutumista. (Kiernan 1999; Hayat 2002; Jackson & Blythe 2008; Wendelboe & Bisgaard 2009; Naukkarinen 2010.)

Epäspesifistä taustaa aiheuttaa myös vasta-aineiden ristiinreagoiminen. Vasta-aineen tuotantotavasta johtuen antiseerumi saattaa sisältää ns. luonnollisia vasta-aineita, jotka sitoutuvat tutkittavan antigeeniepitoopin sijaan johonkin toiseen epitooppiin. Tällaiset vasta-aineet ovat vaikeasti poistettavissa, mutta



yleensä niiden määrä on vähäinen, eivätkä ne ole kovin reaktiivisia. Alhainen primaarivasta-aineen pitoisuus ja inkubaatioajan lyhentäminen vähentävät niiden sitoutumista. Epäpuhtaiden polyklonaalisten vasta-aineiden aiheuttamien ristireaktioiden välttämiseksi immunisaatioon käytetyt antigeenit ja tuotetut vasta-aineet on puhdistettava huolellisesti. Ristiinreagointi on mahdollista myös antigeeniepitooppien rakenteiden muuttumisen seurauksena, mitä saattavat aiheuttaa fiksointi tai sen puutteellisuus, kudoksen prosessointi sekä esikäsitteilyt. Primaarivasta-aineen laimentaminen vähentää epäspesifistä taustaa, koska vasta-aineet yleensä tarttuvat ensin alkuperäiseen antigeeniepitooppiin. Jotkut mono- ja polyklonaaliset vasta-aineet sitoutuvat tutkittavan antigeenin lisäksi moniin kudoksen normaaleihin antigeeneihin, mikä myös aiheuttaa epäspesifistä taustavärjäytymistä. (Naukkarinen & Boguslawsky 1998; Hayat 2002; Jackson & Blythe 2008; Wendelboe & Bisgaard 2009.)

### 2.5.7.3 Endogeeninen entsyymi- ja biotiiniaktiivisuus

Useissa tutkittavissa kudoksissa saattaa olla endogeenisenä samaa entsyymiä, mitä käytetään värjäyksessä merkkientsyyminä. Reagoiessaan substraatin kanssa se aiheuttaa ei-toivottua taustavärjäytymistä. Tavallisimpia taustaa aiheuttavia endogeenisiä entsyymejä ovat peroksidaasi, jota esiintyy kaikissa hemoproteiineissa sekä alkalinen fosfataasi, joka on yleinen monissa kudoksissa (mm. munuainen, maksa, luukudos ja imukudos). Endogeeninen entsyymiaktiivisuus pystytään yleensä tuhoamaan ennen värjäystä. Peroksidaasiaktiivisuuden inaktivoimiseen käytetään vetyperoksidia ja alkalisen fosfataasin inaktivoimiseen levamisolia. Runsaasti endogeenista entsyymiä sisältävä näyte kannattaa värjätä menetelmällä, jossa merkkiaineena on jokin muu entsyymi. Endogeenisten entsyymien lisäksi taustaa aiheuttaa useissa kudoksissa endogeenisena esiintyvä biotiini, joka reagoi värjäyksessä käytettävän avidiinin kanssa. Endogeeninen biotiiniaktiivisuus pystytään yleensä tuhoamaan avidiini-biotiini-inkubaatioilla. (Hayat 2002; Jackson & Blythe 2008; Wendelboe & Bisgaard 2009; Buchwalow 2010.)

#### 2.5.7.4 Autofluoresenssi

Immunofluoresenssivärjäyksissä yleinen taustaa aiheuttava tekijä on autofluoresenssi. Jotkut näytteet fluoresoivat luonnostaan, kun niihin kohdistetaan tietyn aallonpituuden omaavaa valoa. Tällaisia ovat mm. erilaisia rauhaseritteitä, lipofuskiinia, elastiinia ja kollageenia sisältävät näytteet. Autofluoresenssi hankaloittaa fluorokromin aikaansaaman, spesifisen fluoresenssin erottamista näytteestä. Glutaraldehydifiksaatio lisää autofluoresenssia ja yleensäkin taustavärjäytymistä, joten se ei ole kovin suosittu fiksatiivi immunohistokemiassa. Autofluoresenssia voi yrittää vähentää natriumboorihydridillä tai glysiinillä, mutta ne ovat yleensä melko tehottomia. Parempi keino autofluoresenssin minimoimiseksi on oikeanlaisten suodattimien käyttö näytettä mikroskopoidessa. (Brandtzaeg ym. 1997; Naukkarinen & Boguslawsky 1998; Bancroft & Floyd 2008; Robinson ym. 2009; Buchwalow 2010.)

Muita taustavärjäytymistä aiheuttavia tekijöitä immunofluoresenssivärjäyksissä ovat liian suuri primaarivasta-aineen pitoisuus sekä riittämättömät puskuripesut. Myös parafiiniin prosessointi lisää yleensä taustaa, joten immunofluoresenssivärjäykset tehdään usein jääleikkeistä. (Naukkarinen & Boguslawsky 1998; Jackson & Blythe 2008; Buchwalow 2010.)

#### 2.5.8 Immunohistokemiassa käytetyt kontrollit

Monien immunohistokemiallisissa värjäyksissä esiintyvien epävarmuustekijöiden vuoksi värjäystulosten spesifisyys ja luotettavuus on varmistettava kontrollien avulla jokaisen värjäyserän yhteydessä. Kaksoisvärjäyksissä tarvitaan myös kahdet kontrollit. Kontrollit voidaan jakaa kudoskontrolleihin ja menetelmäkontrolleihin. Kudoskontrollit ovat tutkittavan antigeenin suhteen joko positiivisia tai negatiivisia. Kun antigeenin määrä on positiivisessa kontrollissa vähäinen, voidaan selvittää samalla myös värjäyksen herkkyys. Kudoskontrollit voivat olla myös sisäisiä kontrolleja, joiden

normaaleissa kudusrakenteissa esiintyy tutkittavaa antigeenia. Antigeenin on värjäydyttävä, jotta tulos olisi luotettava. Sisäiset kuduskontrollit, kuten positiiviset ja negatiivisetkin kontrollit käsitellään täysin identtisesti tutkittavan näytteen kanssa. (Rantala & Laasonen 2000; Aho 2008; Jackson & Blythe 2008; Rasmussen 2009.)

Menetelmäkонтроllit ovat tärkeitä immunohistokemiassa ja entsyymihistokemiassa. Niissä tyypillisesti jätetään jokin prosessin vaihe pois, jolloin tuloksen tulee olla negatiivinen. Rutiinityöskentelyssä primaarivasta-aine korvataan puskurilla tai non-immuuniseerumilla, jolloin saadaan selville muiden vaiheiden mahdollisesti aiheuttama värjäytyminen. Primaarivasta-aine voidaan korvata myös toisella spesifisellä vasta-aineella, jonka tulisi antaa negatiivinen tulos. Monoklonaalista antivimentiniä voidaan käyttää osoittamaan, että antigeeniepitoopit eivät ole tuhoutuneet formaliinifikoinnin ja kudoksen prosessoinnin aikana. (Rantala & Laasonen 2000; Aho 2008; Rasmussen 2009.)

### 2.5.9 Värjäystulosten tulkinta

Värjätyt lasit tulisi aina mikroskopoida yhdessä kontrollilasien kanssa. Värjäystulosten tulkinnassa pitää olla kriittinen ja kontrollileikkeet on tutkittava huolellisesti. Negatiivisessa menetelmäkонтроllissa taustavärjäytyminen näkyy hyvin, koska siitä puuttuu spesifinen primaarivasta-aine. Taustavärjäytymistä voidaan arvioida myös käytettäessä primaarivasta-ainetta, jonka tiedetään antavan negatiivinen tulos. Negatiiviseen värjäystulokseen ei voida koskaan täysin luottaa, koska antigeeniepitoopit ovat saattaneet tuhoutua jossain näytteen käsittelyvaiheessa. Kontrolloitua positiivista tulosta voidaan yleensä pitää luotettavana, joskin väärän positiivisten värjäytymisen mahdollisuus on silti olemassa. Hyvin onnistunut värjäys on tarkka, eli väri on paikantunut selkeärajaisesti oikeaan paikkaan. Lisäksi värjäysmenetelmän herkkyys on hyvä eli värin intensiteetti on riittävä. Taustavärjäytyminen on mahdollisimman

vähäistä ja negatiivinen menetelmäkontrolli on puhdas. (Naukkarinen & Boguslawsky 1998; Hladik & White 2008.)

### 3 OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS, TAVOITTEET JA TUTKIMUSTEHTÄVÄT

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena on optimoida ensin kaupalliselle GPR30-vasta-aineelle sellaiset värjäysolosuhteet, joissa se toimii ja sen jälkeen immunohistokemiallisten värjäysmenetelmien avulla paikantaa GPR30-estrogenireseptori hiiren lisäkiveksestä.

Tutkimuksen tavoitteena on selvittää, sijaitseeko GPR30-estrogenireseptori vain lisäkiveksen pään alkuosan segmentissä vai kaikkialla lisäkiveksessä. Ainoastaan lisäkiveksen pään alkuosan initial segmentissä ilmentyvien reseptorien oletetaan vaikuttavan siittiöiden kypsymisen säätelyyn ja näin ollen juuri ne ovat tärkeitä jatkotutkimusten kannalta. Lisäksi tavoitteena on selvittää, sijaitsevatko reseptorit lisäkivestubuluksissa sellaisissa kohdissa, että vuorovaikutus siittiöiden kanssa olisi mahdollinen. Laajempaa kokonaistutkimusta ajatellen tavoitteena on myös saada lisää tietoa siittiöiden kypsymisen säätelystä.

Opinnäytetyön tutkimustehtävät ovat

1. Optimoida toimivat immunohistokemialliset värjäysolosuhteet GPR30-vasta-aineelle kokeilemalla eri fiksointimenetelmiä, antigeenien paljastusmenetelmiä sekä vasta-aineiden laimennoksia jää- ja parafiinileikkeillä.
2. Suorittaa GPR30-vasta-ainevärjykset, ciliavärjykset sekä kaksoisvärjykset.
3. Paikantaa GPR30-reseptorin sijainti lisäkiveksessä segmentti- sekä tubulustasolla.

## 4 OPINNÄYTETYÖN KÄYTÄNNÖN TOTEUTUS

Tämän opinnäytetyön kokeelliset osuudet suoritettiin talvella 2011 Turun yliopiston fysiologian laitoksella ja osittain oikeuslääketieteen laitoksella. Opinnäytetyön aihe saatiin fysiologian laitoksella toimivalta Tautimallinnuskeskukselta ja se oli osa laajempaa tutkimusta. Opinnäytetyön ohjaajana toimi fysiologian laitokselta FT Petra Sipilä ja Turun ammattikorkeakoulusta lehtori, FT Mika Venojärvi. Tutkimukselle tehtiin toimeksianto Turun ammattikorkeakoulussa. Tutkimusaineistona käytettiin Turun yliopiston Tautimallinnuskeskuksen koe-eläinhiiristä preparoituja lisäkiveksiä. Hiiret lopetti ja preparoi opinnäytetyön ohjaaja FT Petra Sipilä yhdessä tutkimuksen tekijän kanssa. Lisäkivesnäytteistä valmistettiin jää- ja parafiinileikeblokkeja, joista leikattiin objektilaseille tarvittava määrä leikkeitä värjäyksiä varten. Tarkoituksena oli optimoida GPR30-vasta-aineelle toimivat värjäysolosuhteet ja paikantaa GPR30-kudosreseptori lisäkivestubuluksista immunohistokemiallisten värjäysten avulla.

### 4.1 Opinnäytetyön metodologiset lähtökohdat

Tämä opinnäytetyö on empiirinen tutkimus, joka noudattaa pääasiallisesti kokeellista tutkimusmetodiikkaa, mutta siinä on piirteitä myös kvalitatiivisista ja kvantitatiivisista menetelmistä. Empiirisen tutkimuksen keskeisessä asemassa ovat konkreettisen tutkimusaineiston keräämis- ja analyysimetodit. (ks. Tuomi & Sarajärvi 2006; Hirsjärvi ym. 2010.) Tässä tutkimuksessa aineistonkeruumenetelmänä on käytetty kokeellista tutkimusta, joka valitaan silloin, kun halutaan tutkia jonkin ilmiön vaikutusta toiseen. Kokeellinen tutkimus sisältää tavallisesti jonkin hypoteesin testaamisen ja se suoritetaan usein laboratorio-olosuhteissa. Tietystä populaatiosta valitut näytteet analysoidaan erilaisten koejärjestelyiden avulla harkitusti ja systemaattisesti olosuhteita (fiksointimenetelmät, esikäsittelyt, laimennokset, jää- ja parafiinileikkeet) muunnellen. Mahdollisimman luotettavien tutkimustulosten saamiseksi

kokeellisessa tutkimuksessa käytetään tavallisesti kontrollia, johon muita koetuloksia verrataan. Kokeellisessa tutkimuksessa käytetään sellaisia tieteellisiä instrumentteja, jotka ovat kaikkien tutkijoiden käytettävissä ja tutkimuksen kulku raportoidaan niin tarkasti, että sen toistaminen on mahdollista. (Järvinen & Järvinen 2004; Anttila 2006; Hirsjärvi ym. 2010.)

Tutkimustulosten tarkastelussa ja analysoinnissa on käytetty kvalitatiivista eli laadullista menetelmää, koska tulokset eivät ole numeerisesti mitattavia tai tilastoitavia. Tutkimuksen muita kvalitatiiviselle tutkimukselle ominaisia piirteitä ovat pieni otoskoko sekä tutkimuksen muotoutuminen ja joustava toteutus tutkimuksen edetessä. Kvantitatiivisen eli määrällisen tutkimukseen kuuluvia piirteitä ovat aiemmat teoriat ja johtopäätökset tutkimustuloksista, hypoteesien testaaminen sekä keskeisten käsitteiden määrittely. (Anttila 2006; Tuomi & Sarajärvi 2006; Vilkkä 2007; Hirsjärvi ym. 2010.)

#### 4.2 Eettisten näkökohtien tarkastelu

Tutkimusetiikalla tarkoitetaan yleisesti sovittuja pelisääntöjä suhteessa kollegoihin, tutkimuskohteeseen, rahoittajiin, toimeksiantajiin sekä suureen yleisöön. Tutkimusetiikka voidaan määritellä myös tutkijoiden ammattietiikaksi, johon kuuluvat eettiset periaatteet, normit, arvot ja hyveet, joita tutkijan tulisi noudattaa harjoittaessaan omaa ammattiaan. (Kuula 2006; Vilkkä 2009.) Eettisesti hyvä tutkimus edellyttää, että tutkimuksessa noudatetaan hyvää tieteellistä käytäntöä. Ohjeet hyvästä tieteellisestä käytännöstä ja sen loukkausten käsittelemisestä on laatinut tutkimushankkeiden asianmukaisuutta ja eettisyyttä valvomaan perustettu tutkimuseettinen neuvottelulautakunta. Lautakunnan mukaan vastuu hyvän tieteellisen käytännön noudattamisesta kuuluu koko tiedeyhteisölle, mutta jokainen tutkija kuitenkin vastaa itse käytännön noudattamisesta ja omassa tutkimuksessaan tekemistä valinnoista. (Kuula 2006; Mäkinen 2006; Hirsjärvi ym. 2010.)

Hyvään tieteelliseen käytäntöön kuuluu mm. kestävien, tiedeyhteisön hyväksymien tiedonhankinta- ja tutkimusmenetelmien noudattaminen sekä

muiden tutkijoiden töiden ja saavutusten sekä heidän julkaisemiensa tutkimustuloksien kunnioittaminen. Tämän tutkimuksen tiedonhankinta perustui oman alan tieteellisiin julkaisuihin ja muihin asianmukaisiin tietolähteisiin sekä riittäviin laboratoriokokeisiin ja niiden analysointiin. Toisten tutkijoiden saavutukset on otettu huomioon merkitsemällä tekstin lähdeviitteet huolellisesti ja oikein. (ks. Mäkinen 2006; Vilkka 2009; Tutkimuseettinen neuvottelulautakunta 2011.) Tutkimusaineistona ei käytetty ihmisperäisiä näytteitä tai potilasasiakirjoja, joten suostumus- ja tietosuojaeettisiä asioita ei tarvinnut pohtia.

Tässä tutkimuksessa käytettiin aineistona hiiristä preparoituja lisäkiveksiä. Turun yliopiston Koe-eläinkeskus on yliopiston palveluyksikkö, joka hankkii ja tuottaa eläimet biolääketieteelliseen tutkimukseen (Koe-eläinkeskus, Turun yliopisto 2009). Turun yliopiston Tautimallinnuskeskuksella on asianmukaiset luvat koe-eläinten käyttämiseen. Eläinkokeilla tarkoitetaan sellaisten kokeiden, testien tai tutkimusten suorittamista, joista eläimille voi aiheutua kipua, tuskaa, kärsimystä tai pysyvää haittaa. Eläinkokeeksi katsotaan myös esimerkiksi muuntogeenisen eläimen tai eläinkannan syntymiseen tähtäävät toimet. Sen sijaan eläinten lopettamista hyväksytyjä lopetusmenetelmiä käyttäen, esim. erilaisten kudoksenäytteiden saamiseksi, ei katsota eläinkokeeksi. (Laki koe-eläintoiminnasta 2006.) Näin ollen voidaan todeta, että tämän tutkimuksen tekemisessä ei suoritettu eläinkokeita. Tutkimusaineiston keräämiseen käytetyt hiiretkään eivät olleet koe-eläimiä sanan varsinaisessa merkityksessä, koska niille ei tehty kokeita, eivätkä ne olleet muuntogeenisiä, vaan normaaleja villityypin uroshiiriä. Sen vuoksi koe-eläin etiikan laajempi pohdinta tämän tutkimuksen osalta ei ole tarpeellista.

Tämän tutkimuksen tekemisessä on noudatettu hyvän tieteellisen käytännön tapaan rehellisyyttä, huolellisuutta ja tarkkuutta niin tutkimustyössä, kuin tulosten tallentamisessa, esittämisessä ja arvioinnissakin. Tutkimus on kokonaisuudessaan toteutettu ja raportoitu tieteelliselle tiedolle asetettujen vaatimusten edellyttämällä tavalla. (ks. Mäkinen 2006; Tutkimuseettinen neuvottelulautakunta 2011.)



Hyvän tieteellisen käytännön loukkauksia ovat piittaamattomuus ja vilppi. Piittaamattomuus hyvästä tieteellisestä käytännöstä voi ilmetä törkeinä laiminlyönteinä tutkimuksen suorittamisessa, puutteellisena viittauskäytäntönä ja tutkimustulosten huolimattomana ja harhaanjohtava raportointina. Vilpillä tarkoitetaan sepittämistä, väärrien tutkimustulosten levittämistä, anastamista ja plagiointia. Plagiointi on jonkun toisen julkituoman materiaalin esittämistä omanaan eli lainaamista ilman lähdeviitteitä. (Kuula 2006; Mäkinen 2006; Tutkimuseettinen neuvottelulautakunta 2011.) Tässä tutkimuksessa ei ole toimittu välinpitämättömästi tai vilpillisesti eikä tutkija ole esittänyt muiden tuotoksia ominaan.

### 4.3 Tutkimuksen kokeellinen osuus

#### 4.3.1 Kudosten preparointi ja prosessointi

Tämän opinnäytetyön immunohistokemiallisia värjäyksiä varten kerättiin lisäkiveksiä (n=14) yhteensä seitsemältä villityypin (kanta C57 Bl) uroshiireltä. Kolmesta lisäkiveksestä valmistettiin parafiiniblokkit ja loput 11 lisäkivestä käytettiin jääleikeblokkien valmistamiseen.

Lisäkivekset, joista tehtiin jääleikeblokit, preparoitiin PBS-puskuriin. Kudosten fiksoimiseen käytettiin kolmea erilaista menetelmää. Neljää lisäkivesnäytettä fiksoitiin kolme tuntia PLP:ssä (ks. Liite 3). Viittä muuta fiksoitiin 15 minuuttia 4%:ssa paraformaldehydissä (PFA). Näistä kolmen näytteen kohdalla käytettiin PFA:ta, jonka pH oli 7,4 ja kahden muun kohdalla PFA:ta, jonka pH oli säädetty 4:ään. Loput kaksi lisäkivestä jätettiin fiksoimatta ja jäädytettiin sellaisenaan.

Fiksoitujen sekä fiksoimattomien lisäkivesten jäädytys tapahtui samalla tavalla. Jokaista lisäkivesblokkia varten valmistettiin foliosta muotti, jonka pohjalle lisäkives aseteltiin. Muotti täytettiin Tissue-Tek OCT-mediumilla, jonka jälkeen se upotettiin isopentaaniin, jossa oli kuivajäätä. Jäädytetyt blokit säilytettiin pakkasessa -80°C:ssa siihen asti, kunnes niitä alettiin leikata. Laseja leikattiin

samalla kertaa useampaa viikon sisällä tehtävää värjäystä varten ja myös valmiiksi leikatut lasit säilytettiin  $-80^{\circ}\text{C}$ :ssa folioon käärittyinä värjäykseen asti.

Lisäkivekset, joista valmistettiin parafiiniblokit, preparoitiin suoraan fiksatiiviin. Fiksatiivina käytettiin 4%:ista PFA:ta (pH 7,4). Yön yli fiksoituneet lisäkivekset kasetoitiin, jota seurasi kudosten kuljetus. Kuljetus tehtiin Turun yliopiston oikeuslääketieteen laitoksen kuljetusautomaatilla (Pathcentre Tissue Processor, Shandon, USA).

Kuljetuksella tarkoitetaan käsittelyä, jossa kudoksessa olevan veden tilalle imeytetään parafiini. Kuljetus jakautuu kahteen osaan, dehydraatioon eli veden poistoon ja kirkastukseen, jota seuraa sulan parafiinin infiltraatio eli imeyttäminen kudokseen. Dehydointi tapahtuu nousevassa alkoholisarjassa, joka aloitetaan tavallisesti 50-70%:sesta etanolista. Absoluuttisen etanolin jälkeen kudoksesta kirkastetaan, jolloin alkoholi poistuu. Etanoli on poistettava, koska se ei ole liukoinen parafiinin kanssa. Kirkastuksessa käytetään yleensä ksyleeniä, joka tekee kudoksen läpikuultavaksi. Kirkastuksessa käytettävän aineen tulee olla liukoinen sekä dehydointi- että infiltraatioaineen kanssa. Kirkastuksen jälkeen kudokseen infiltroidaan samaa ainetta, jota käytetään myöhemmin valun yhteydessä. Kudosprosessoinnin tarkoituksena on kudoksen tukeminen kiinteällä tukiaineella, joka on riittävän kovaa tukemaan kudosta, mutta toisaalta riittävän pehmeää ohuiden kudosten leikkaamiseen. (Aho 1999; Spencer & Bancroft 2008.)

Kuljetusta seurasi lisäkivesten valu parafiiniin. Valu tehtiin Turun yliopiston oikeuslääketieteen laitoksen valukoneella (Tissue-Tek TEC 5, Sakura Finetek, USA). Valussa näyte siirrettiin kasetista sopivaan valumuottiin leikkauspinta alaspäin ja päälle valutettiin sulaa parafiinia. Tämä tapahtui valukoneen lämpölevyn päällä, jossa näytteen asentoa voitiin vielä korjailta. Putkimaisia rakenteita sisältävät lisäkivekset aseteltiin muotteihin pystyyn eli siten, että niistä saatiin leikattaessa poikkileikkaukset. Kasetti, johon oli kirjoitettu näytteen tiedot, valettiin kannaksi ja muotti siirrettiin kylmälevylle jähmettymään.

### 4.3.2 GPR30-vasta-ainevärjäykset

#### Jääleikkeet

GPR30-värjäystä varten leikattiin sekä jääleikkeitä että parafiinileikkeitä. Värjäys tehtiin ensin jääleikkeillä. Jääleikkeiden leikkaaminen tapahtui Turun yliopiston oikeuslääketieteen laitoksen Leica-kryostaatilla (CM 3050, Leica Microsystems GmbH, Saksa). Pakastetuista jääleikeblokeista leikattiin värjäystä varten yhteensä kahdeksan lasia. Kaksi 4%:lla PFA:lla (pH 7,4) ja kaksi 4%:lla PFA:lla (pH 4) fiksoidusta lisäkivesblokista, kaksi PLP-fiksoidusta blokista sekä kaksi fiksoimattomasta blokista. Kullekin lasille leikattiin neljä 12 µm:n paksuista leikettä. Leikkeet kiinnitettiin ilmakeuivaamalla.

GPR30-kudosreseptorin paikantamiseksi tehdyt immunohistokemialliset värjäykset jääleikkeillä toteutettiin liitteessä 1 olevan värjäysohjeen mukaisesti. Primaarivasta-aineena oli GPR30-vasta-aine (ks. Liite 4) (G Protein-Coupled Receptor 1 Rabbit anti-Human Polyclonal Antibody, MBL International Corporation, USA). Jokaisessa lasissa yksi neljästä leikkeestä oli negatiivinen kontrolli, johon pipetoitiin primaarivasta-aineen sijasta puskuria (PBS). Muissa leikkeissä primaarivasta-aineen laimennokset olivat 1:100, 1:200 ja 1:400.

Ensin värjättiin kaksi lasia, joissa oli 4%:lla PFA:lla (pH 7,4) fiksoidut kudosleikkeet. Molemmissa laseissa käytettiin Alexan sekundaarivasta-ainetta (Alexa fluor 488 goat anti-rabbit IgG, Molecular Probes, USA), jossa oli konjugoituna vihreä fluoresoiva merkkiaine. Seuraavaksi värjättiin muut kuusi lasia siten, että jokaisen lasiparin toisessa lasissa käytettiin vihreällä ja toisessa punaisella merkkiaineella (Alexa fluor 594 goat anti-rabbit IgG, Molecular Probes, USA) leimattua sekundaarivasta-ainetta. Molempien sekundaarivasta-aineiden laimennussuhde oli aina 1:1000. Tummat värjättiin DAPI:lla (Sigma-Aldrich, USA), jonka laimennos oli 1:10 000.

#### Parafiinileikkeet

Parafiinileikkeet leikattiin Turun yliopiston fysiologian laitoksen Leica-rotatiomikrotomilla (RM2125RT, Leica Microsystems, Saksa). Yhdestä

kudosblokista leikattiin kolme lasia ja kullekin lasille leikattiin neljä 4 µm:n paksuista leikettä. Leikkeet kiinnitettiin yön yli lämpökaapissa +37°C:ssa.

Ennen parafiinileikkeiden värjäystä, niille täytyi tehdä parafiinin poisto ja rehydraatio (ks. Liite 2, kohta 1). Parafiini poistettiin ksyleenillä ja rehydraatio eli veden imeyttäminen takaisin kudoksiin tehtiin laskevan alkoholisarjan avulla. Lisäksi kudosleikkeet esikäsiteltiin antigeenien paljastamiseksi. Kullekin kolmelle lasille käytettiin eri antigeenien paljastusmenetelmää, jotka olivat painekattilakäsittely sitraattipuskurissa, mikroaaltouunikäsittely TE-puskurissa sekä 15 minuutin proteinaasi K entsyymikäsittely.

Varsinainen värjäys tehtiin liitteessä 2 olevan värjäysohjeen mukaisesti. Jokaisessa lasissa yksi neljästä leikkeestä oli negatiivinen kontrolli. Muissa leikkeissä primaari- ja sekundaarivasta-aineiden laimennokset olivat samat kuin jääleikkeillä. Sekundaarivasta-aineessa (Alexa fluor 488) oli konjugoituna vihreä fluoresoiva merkkiaine.

#### 4.3.3 Stereocilia-värjäykset

Lisäkivestubulusten epiteelin stereocilioiden värjäyksessä käytettiin falloidiinia, joka on *Amanita phalloides* -sienestä eristetty toksini (ks. Liite 5). Stereocilioissa esiintyy F-aktiinia, johon falloidiini sitoutuu ja näin ollen värjää ciliat. Falloidiinivärjäystä varten leikattiin jääleikeblokeista neljä lasia, yksi fiksoimattomasta kudosblokista ja kolme eri tavoin fiksoiduista blokeista. Jokaiselle lasille leikattiin neljä leikettä, joista yksi oli negatiivinen kontrolli. Falloidiinivärjäyksessä käytettiin samaa värjäysohjetta, kuin GPR30-jääleikevärjäyksessä (Liite 1), mutta sekundaarivasta-aine jätettiin pois. Sitä ei tarvittu, koska falloidiinissa itsessään (Phalloidin from Amanita phalloides, TRITC labeled, Sigma-Aldrich, USA) oli fluoresoiva merkkiaine konjugoituna (suora menetelmä). Falloidiinin laimennokset olivat 1:100, 1:200 ja 1:400. Blokkauseerumina käytettiin vain 3%:sta BSA:ta.

#### 4.3.4 Primaaricilia-värjykset

Anti-asetyloitu tubuliini (ks. Liite 6) on monoklonaalinen vasta-aine, joka on tuotettu asetuloitua tubuliinia vastaan. Asetuloitu tubuliini on primaaricilioissa esiintyvä proteiini. Primaariciliat ovat yksittäisiä värekarvoja, joiden on osoitettu toimivan signaalin välittäjinä monissa kudoksissa (ks. Davenport & Yoder 2005; Singla & Reiter 2006).

Asetuloitun tubuliinin värjäämistä varten leikattiin kaksi jääleikelasia, joista toinen oli PLP-fiksoidusta blokista ja toinen 4%:lla PFA:lla (pH 7,4) fiksoidusta blokista. Anti-asetuloitu tubuliini ei ole niin herkkä fiksatiivin suhteen, joten sen voitiin olettaa toimivan valituilla blokeilla. Molemmille laseille leikattiin neljä leikettä ja kummassakin lasissa yksi leikkeistä oli negatiivinen kontrolli. Leikkeistä tehtiin hieman tavallista paksumpia (16  $\mu\text{m}$ ), koska tarkoituksena oli saada yksittäiset primaariciliat koko paksuudeltaan leikkeeseen. Primaarivasta-aineen (Monoclonal Anti-Acetylated Tubulin Clone 6-11B-1, Sigma-Aldrich, USA) laimennokset olivat 1:500, 1:1000 sekä 1:2000. Sekundaarivasta-aine oli Alexa fluor 488 goat anti-mouse, koska anti-asetuloitu tubuliini oli tuotettu hieressä. Sekundaarivasta-aineen laimennussuhde oli 1:1000. Värjätys tehtiin saman värjätysohjeen mukaisesti kuin muutkin jääleikkeiden värjätykset (Liite 1), mutta primaarivasta-ainetta ei laimennettu pelkkään PBS-puskuriin, vaan sille tehtiin oma tubuliiniliuos (1% BSA + 2% NGS + PBS). Blokkauseerumina käytettiin 5%:sta BSA:ta.

Fluoresenssivärjätksen lisäksi anti-asetuloitulla tubuliinilla tehtiin parafiiniblokista leikatuilla leikkeillä immunohistokemiallinen värjätys immunoperoksidaasimenetelmää käyttäen, jotta olisi varmistuttu värjätksen spesifisyydestä. Parafiiniblokista leikattiin kolme lasia, jokaiseen kolme leikettä. Jokaisessa lasissa yksi leikkeistä oli negatiivinen kontrolli. Leikkeiden paksuus oli 8  $\mu\text{m}$ . Antigeenien paljastamiseksi kudosleikkeille tehtiin samat esikäsittelyt kuin GPR30-värjätksen parafiinileikkeille. Myös itse värjätksessä käytettiin samaa värjätysohjetta (Liite 2). Anti-asetuloitun tubuliinin laimennokset olivat 1:500 ja 1:1000. Sekundaarivasta-aine (Dako EnVision+ System-HRP Labelled

Polymer Anti-mouse) (Liite 7) pipetoitiin lasille laimentamatta ja DAB-kromogeenin (Dako Liquid DAB+ Substrate Chromogen System, Dako California, USA) (Liite 8) laimennussuhde oli kitin ohjeiden mukaisesti 1:50.

#### 4.3.5 Kaksoisvärjäykset

##### Anti-asetyloitu tubuliini - falloidiini

Värjäys tehtiin jääleikkeistä saman värjäysohjeen (Liite 1) mukaisesti kuin aiemmatkin värjäykset. Kolmepäiväinen värjäys toteutettiin niin, että ensin näytteet värjättiin anti-asetyloidulla tubuliinilla tavalliseen tapaan ja kun sekundaarivasta-aine (Alexa fluor 488 anti-mouse) oli pesty pois, lisättiin falloidiini ja inkuboitiin yön yli. Värjäykseen käytettiin neljää lasia, joista kaksi oli 4%:lla PFA:lla (pH 7.4) fiksoidusta lisäkivesblokista ja toiset kaksi PLP-fiksoidusta blokista leikattuja. Leikkeitä oli kolme kappaletta per lasi ja yksi kolmesta leikkeestä oli aina kontrolli. Leikkeet olivat 16 µm:n paksuisia. Sekä anti-asetyloitu tubuliini että falloidiini laimennettiin 1:500 kaikissa lasissa. Anti-asetyloidun tubuliinin sekundaarivasta-aineen laimennos oli 1:1000.

##### GPR30 - falloidiini

Värjäys tehtiin parafiinileikkeistä, koska GPR30-vasta-aine toimi niillä, mutta ei jääleikkeillä. Falloidiinin taas oletettiin toimivan molemmilla. Värjäys toteutettiin kolmena peräkkäisenä päivänä, kuten anti-asetyloitu tubuliini - falloidiini - värjäys. Se tehtiin liitteen 2 värjäysohjeen mukaisesti. Antigeenien paljastamiseksi valittiin aiempien värjäysten perusteella painekattilakäsittely sitraattipuskurissa. Värjäyksessä käytettiin kahta lasia, joissa oli kummassakin kolme 4 µm:n paksuista leikettä. Molemmissa lasissa yksi leikkeistä oli negatiivinen kontrolli. GPR30-vasta-aineesta tehtiin laimennokset 1:100 ja 1:200 molemmille lasille. Sekundaarivasta-aine (Alexa fluor 488 anti-rabbit) laimennettiin 1:1000, kuten edellisissäkin värjäyksissä. Falloidiinista tehtiin toiselle lasille 1:250 laimennos ja toiselle 1:500.

Kaikki värjätyt lasit päällystettiin peitinlaseilla ja säilytettiin asianmukaisesti pimeässä ja viileässä ennen sekä jälkeen mikroskopoinnin.

## 5 TUTKIMUKSEN TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU

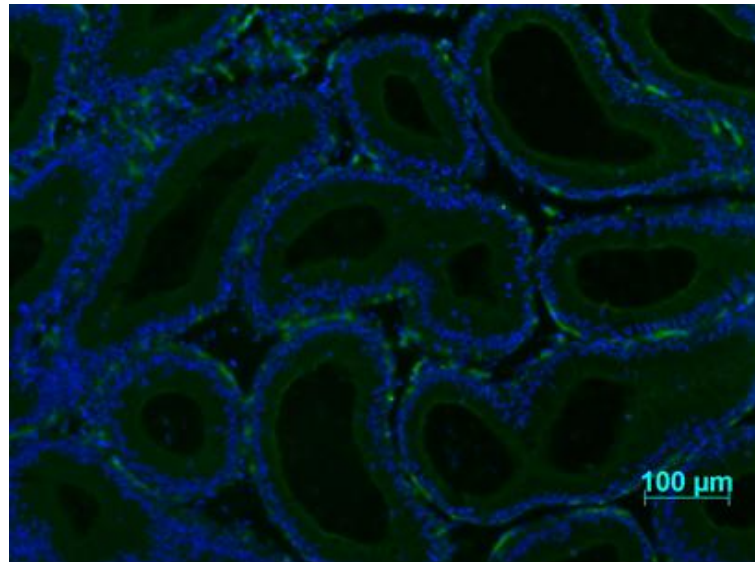
Tutkimuksen tarkoituksena oli osoittaa GPR30-kudosreseptori hiiren lisäkivestubuluksissa optimoimalla GPR30-vasta-aineelle sellaiset värjäysolosuhteet, joissa se toimii. Reseptorien oletettiin sijaitsevan lisäkivesepiteelin cilioiden kärjissä, joten tehtävänä oli värjätä myös ciliat. Kaksi eri ciliatyyppeä, stereociliat ja primaariciliat, paikannettiin värjäämällä ensin kummatkin erikseen ja sitten yhdessä kaksoisvärjäyksenä. Primaaricilioiden on näytetty monissa muissa yhteyksissä välittävän signalointiviestejä solun ulkopuolelta solun sisään, joten samankaltainen mekanismi voisi toimia myös lisäkiveksessä. Primaaricilioille tehtiin fluoresoivan värjäyksen lisäksi immunoperoksidaasivärjäys spesifisyyden varmistamiseksi. GPR30-reseptorien paikannuksen oikeellisuuden varmistamiseksi tehtiin vielä kaksoisvärjäys, jossa samasta leikkeestä värjättiin GPR30-reseptorit sekä ciliavärjäysten tulosten perusteella tubulusten lumenia verhoavat stereociliat.

Kaikki fluoresoivilla merkkiaineilla tehdyt värjäykset mikroskoipoitiin fluoresenssimikroskoopilla (Zeiss AxioImager M1) ja kuvattiin siihen liitettyllä kameralla (Zeiss AxioCam Mrm, Carl Zeiss, Saksa). Immunoperoksidaasivärjäykset mikroskoipoitiin valomikroskoopilla (Leica DMRBE) ja kuvattiin siihen liitettyllä kameralla (Leica DFC320, Saksa).

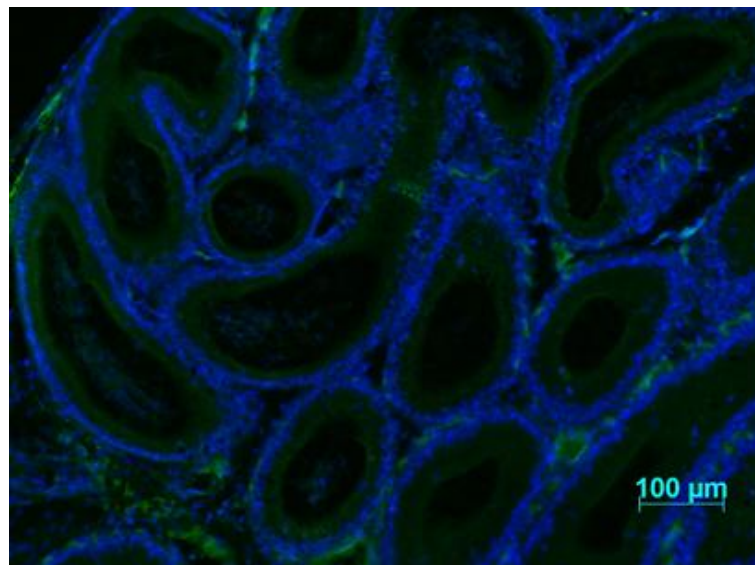
GPR30-vasta-ainevärjäykset tehtiin ensin jääleikkeillä, jotka oli leikattu eri tavoin fiksoiduista lisäkivesnäytteistä (4% PFA pH7,4 ja pH4, PLP) sekä fiksoimattomasta näytteestä. Mikään värjäyksistä ei antanut positiivista signaalia. Kuvissa 3.-6. nähdään näistä värjäyksistä yksi vihreällä (Alexa 488) ja yksi punaisella (Alexa 594) merkkiaineella värjätty leike sekä näiden kontrollileikkeet, joita ei ole inkuboitu primaarivasta-aineessa.



Kuvassa 3. on 4 % PFA:lla (pH 7,4) fiksoitu näyte, joka on värjätty vihreällä merkkiaineella ja kuvassa 4. on saman lasin kontrollileike. Kuvista nähdään, että varsinainen värjäys ja kontrolli näyttävät samanlaisilta ja heikko vihreä väri molemmissa kuvissa on vain autofluoresenssia. Sinisenä näkyvät tumat, jotka on värjätty DAPI:lla.

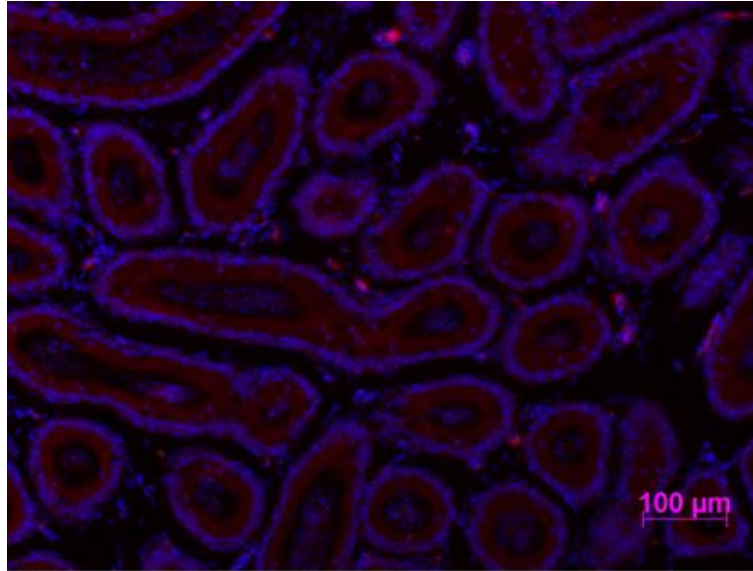


Kuva 3. GPR30-värjäys, Alexa 488, fiksatiivi 4% PFA (pH 7,4)

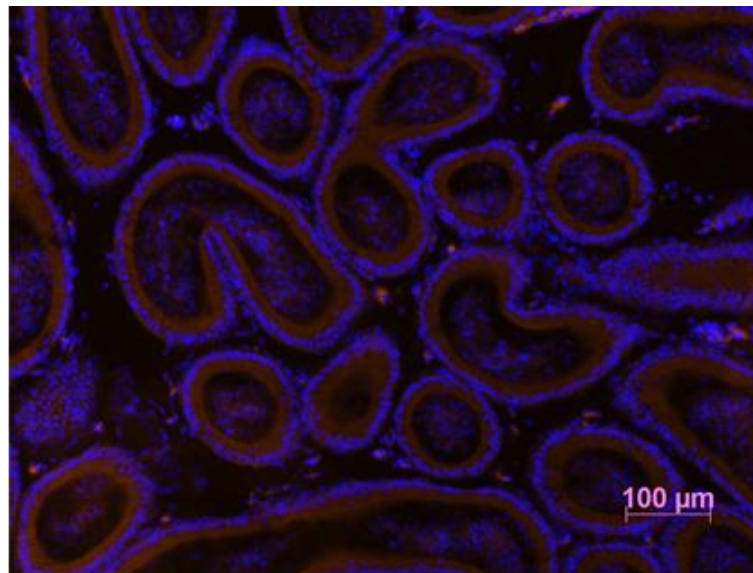


Kuva 4. GPR30-värjäys, kontrollileike

Kuvassa 5. nähdään PLP-fiksoidusta näytteestä leikattu leike, joka on värjätty punaista merkkiainetta (Alexa 594) käyttäen. Tässäkään kuvassa ei näy positiivista signaalia, vaan havaittavissa oleva värjäytyminen on vain taustaa, samoin kuin kuvan 6. kontrollileikkeessä.

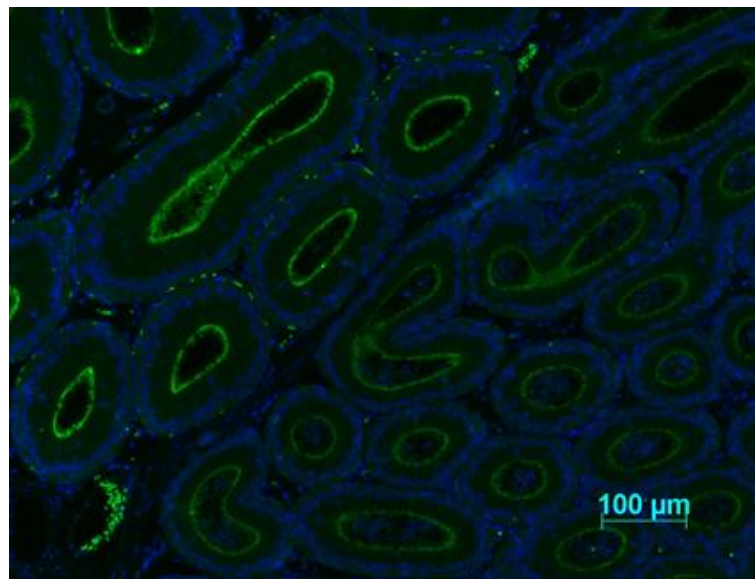


Kuva 5. GPR30-värjäys, Alexa 594, fiksatiivi PLP

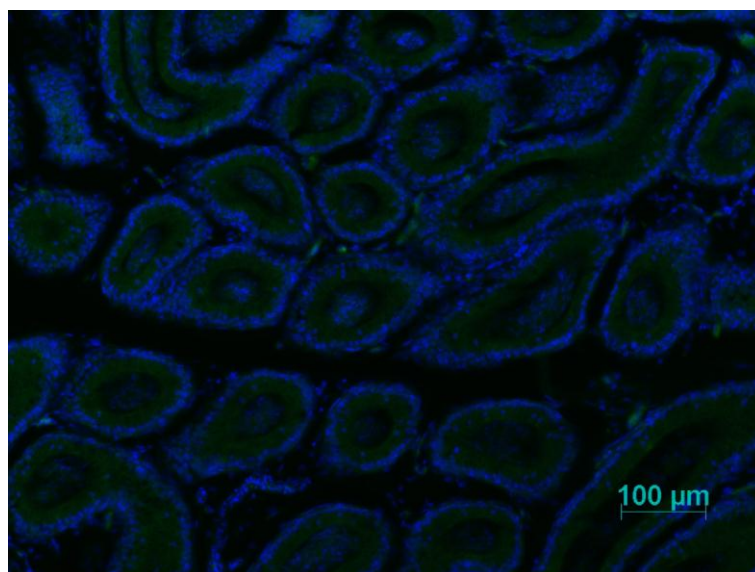


Kuva 6. GPR30-värjäys, kontrollileike

Seuraavat GPR30-vasta-ainevärjäykset tehtiin parafiinileikkeillä erilaisia antigeenien paljastusmenetelmiä kokeillen. Menetelmät olivat mikroaaltouunikäsittely TE-puskurissa, painekattilakäsittely sitraattipuskurissa sekä proteinaasi-K entsyymikäsittely. Kaikilla menetelmillä saatiin positiivinen signaali. Esimerkkikuvan 7. leike on esikäsitelty TE-puskurissa mikroaaltouunissa. GPR30-kudosreseptorit näkyvät kuvassa kirkkaan vihreinä kehinä lumenien ympärillä. Kuvan 8. kontrollileikkeessä spesifistä värjäytymistä ei ole.

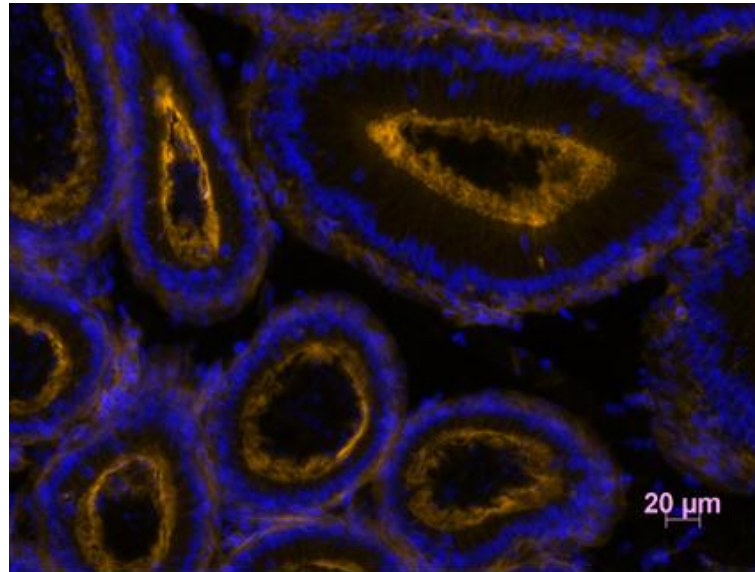


Kuva 7. GPR30-värjäys, Alexa 488, parafiinileike, TE-puskuri

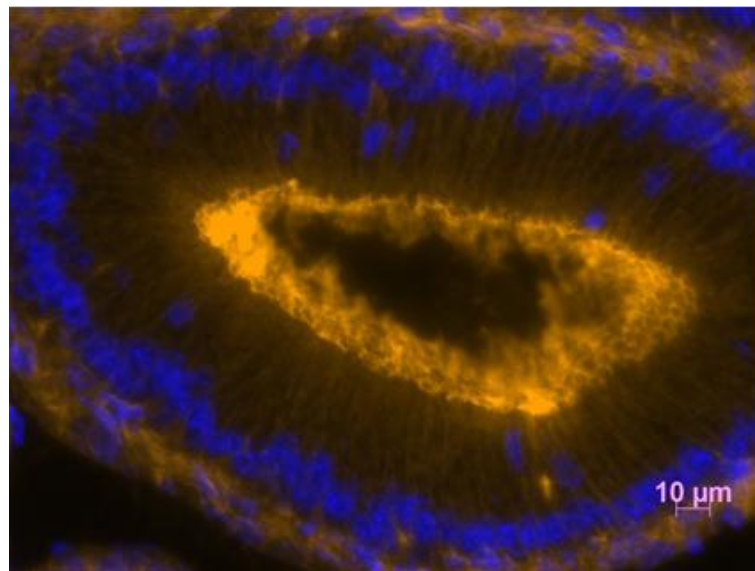


Kuva 8. GPR30-värjäys, parafiinileike, kontrolli

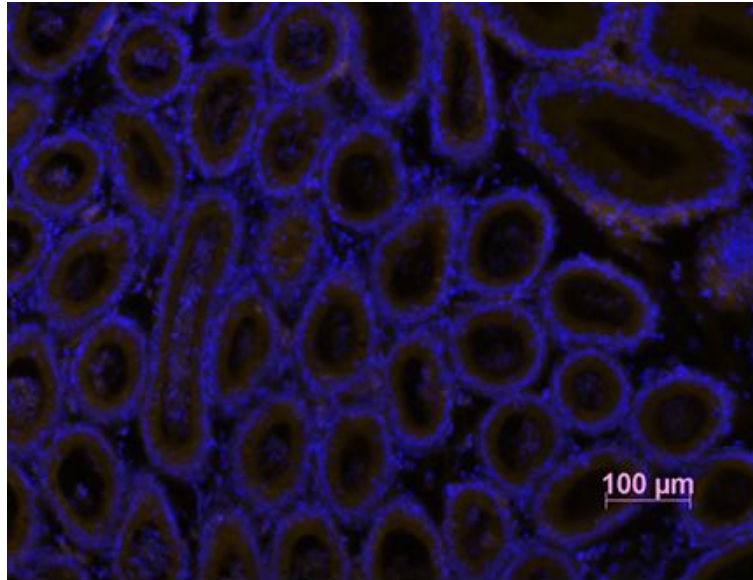
Lisäkivestubulusten stereociliat värjättiin falloidiinilla ja värjäykseen käytettiin jääleikkeitä, jotka oli leikattu aiemmin mainituilla tavoilla fiksoiduista näytteistä. Kaikissa laseissa näkyi voimakas värjäytyminen. Esimerkkikuvissa 9. ja 10. on 4% PFA:lla (pH 7,4) fiksoitu näyte. Stereociliat näkyvät oranssinkeltaisina (TRITC) ja DAPI:lla värjätyt tumat sinisinä. Kuvan 11. kontrollileikkeessä ciliat eivät ole värjäytyneet.



Kuva 9. Stereociliat, TRITC, fiksaatiivi 4% PFA (pH 7,4)

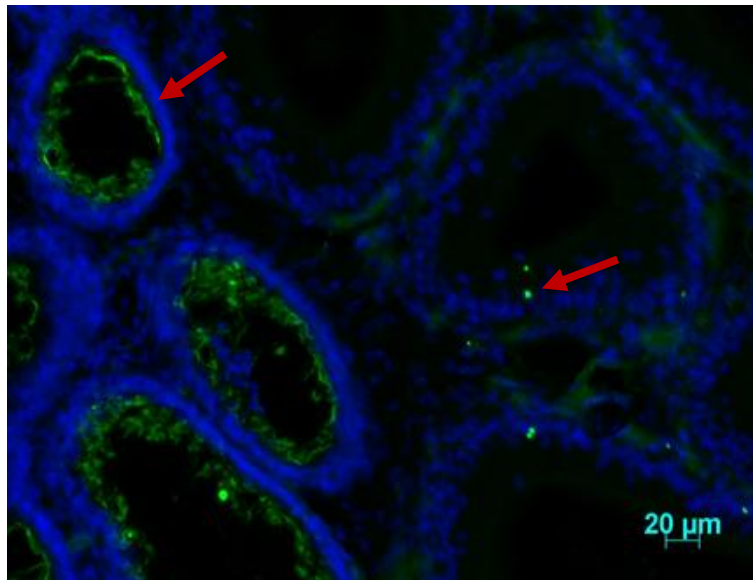


Kuva 10. Yhden tubuluksen stereociliat, suurennos kuvasta 7.



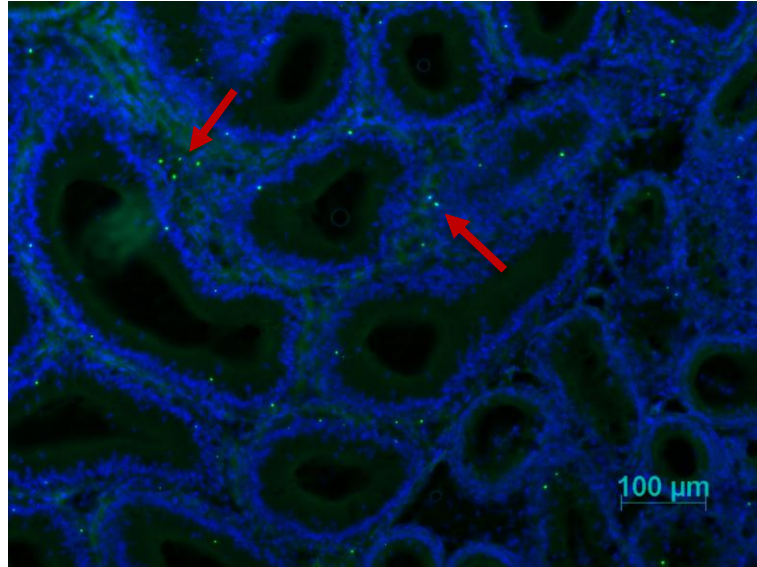
Kuva 11. Stereocilia-värjäyksen kontrollileike

Primaariciliat värjättiin anti-asetyloidulla tubuliinilla jääleikkeistä. Kuvassa 12. primaariciliat näkyvät yksittäisinä kirkkaanvihreinä pisteinä. Kuvan vasemmassa laidassa näkyvät värjäytyneinä myös efferent ductin ciliat, jotka värjäystuloksen perusteella ovat samaa primaariciliatyyppeä.

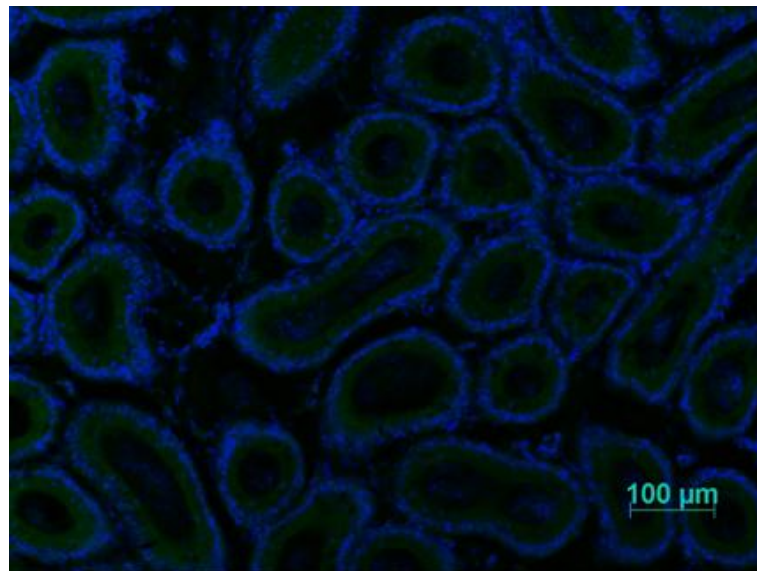


Kuva 12. Primaariciliat, Alexa 488, fiksatiivi 4% PFA (pH 7,4)

Pienemmällä suurennoksella otettu kuva 13. antaa paremman käsityksen primaaricilioiden sijainnista. Kirkkaat vihreät pisteet kaikkialla kuvassa oletettavasti ovat primaaricilioita. Kuvan 14. kontrollileikkeessä samanlaista värjäytymistä ei havaita.

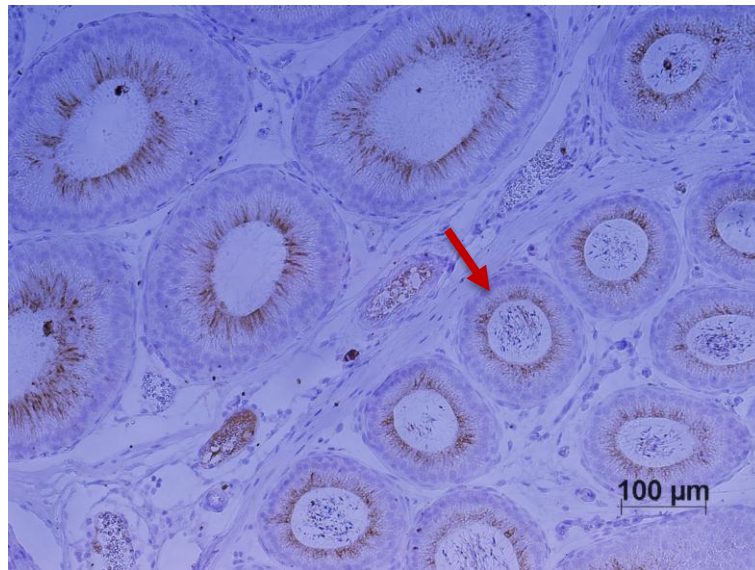


Kuva 13. Primaariciliat, pienempi suurennos kuvasta 10

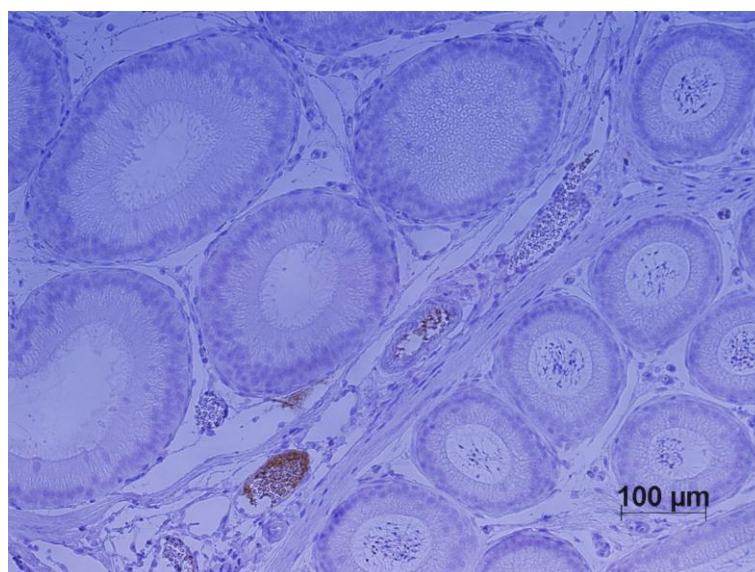


Kuva 14. Primaaricilia-värjäyksen kontrollileike

Primaaricilia-värjäyksen spesifisyyden varmistamiseksi ciliat värjättiin parafiinileikkeistä immunoperoksidaasimenetelmällä eri antigeenien paljastusmenetelmiä käyttäen. Proteinaasi-K entsyymillä käsitellyissä leikkeissä värjäytyminen oli heikkoa, TE-puskuri- ja sitraattipuskurikäsitellyt näytteet värjäytyivät voimakkaammin. Kuvassa 15. on sitraattipuskurissa käsitelty näyte, jossa värjäytyminen nähdään DAB kromogeenin aikaansaamana ruskeana sakkana (nuoli). Mayerin hematoksyliinillä taustavärjätetyt tumat näkyvät vaaleansinisinä. Kuvan 16. kontrollileike ei ole värjäytynyt.

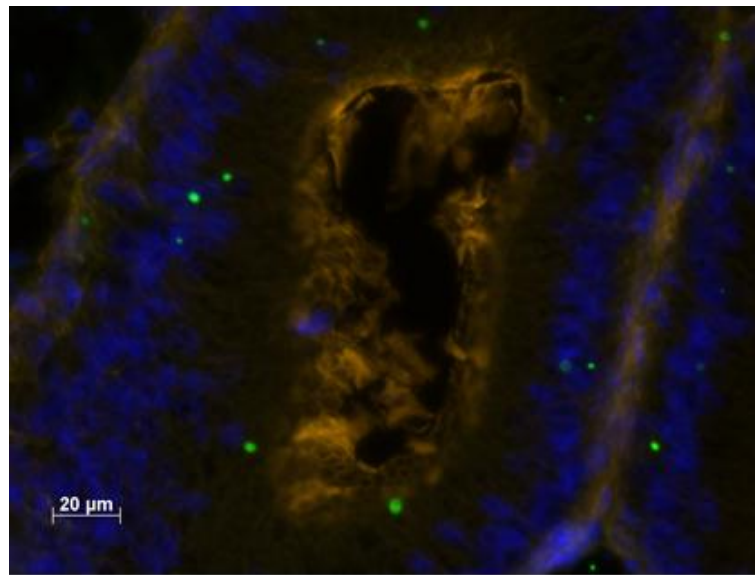


Kuva 15. Primaaricilioiden peroksidaasivärjäys, sitraattipuskuri



Kuva 16. Primaaricilioiden peroksidaasivärjäyksen kontrollileike

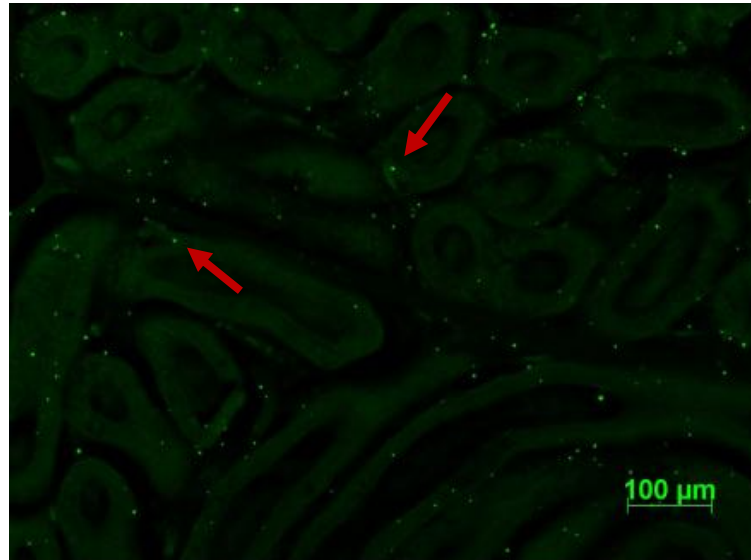
Kaksi eri ciliatyyppeä, primaariciliat ja setreociliat, värjättiin samasta leikkeestä tekemällä kaksoisvärjäys anti-asetyloidulla tubuliinilla ja falloidiinilla. Värjäys tehtiin jääleikkeillä, jotka oli leikattu 4% PFA:lla (pH 7,4) ja PLP:llä fiksoiduista näyteblokeista. Kuvassa 17. on 40x suurennos yhdestä lisäkivestubuluksesta. Stereociliat näkyvät oranssinkeltaisena lumenin ympärillä ja primaariciliat vihreinä pisteinä eri puolilla tubulusta, todennäköisesti solujen välitiloissa. DAPI:lla värjätyt tumat näkyvät sinisinä, kuten aiemmissakin kuvissa.



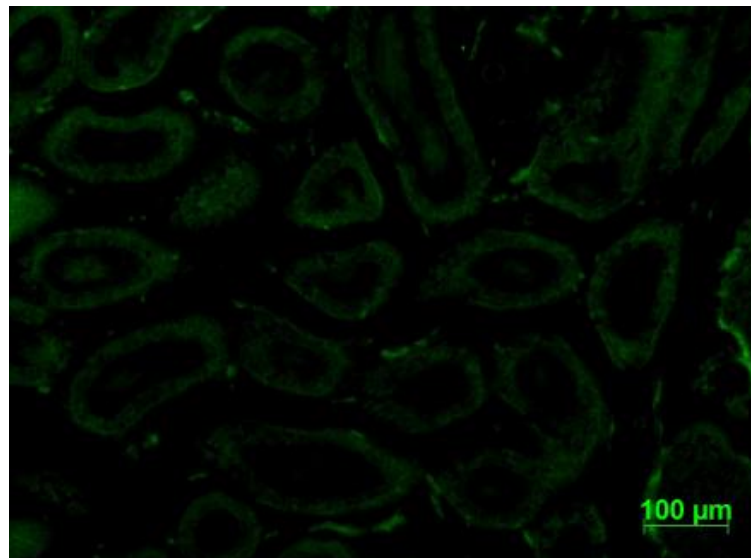
Kuva 17. Primaari- ja stereocilioiden kaksoisvärjäys, Alexa 488 ja TRITC



Kuva 18. on otettu 10x suurennoksella ja siinä nähdään useampia lisäkivestubuluksia. Jotta primaariciliat erottuisivat paremmin, kuvassa on näkyvissä on ainoastaan vihreän merkkiaineen (Alexa 488) kuvakerros. Primaariciliat näkyvät siinä selkeästi kirkkaina vihreinä pisteinä. Kuvan 19. kontrollileikkeessä on samalla tavoin ainoastaan vihreä kuvakerros. Siinä primaariciliat eivät ole värjäytyneet.

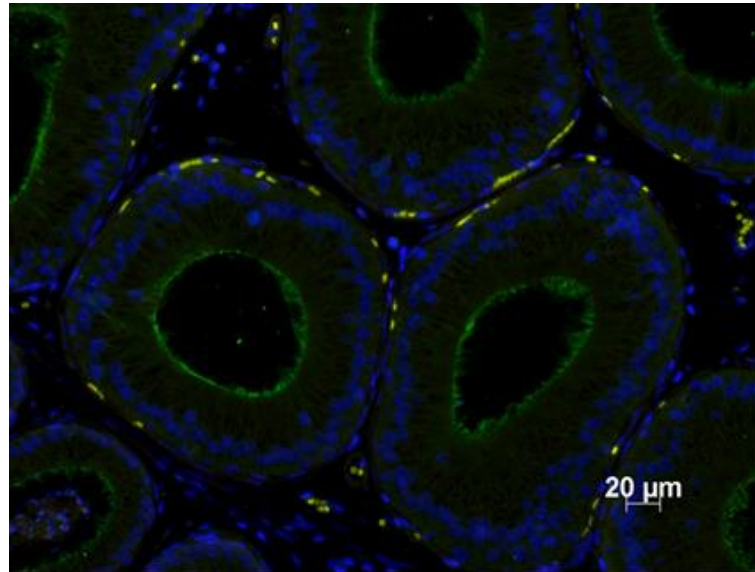


Kuva 18. Kaksoisvärjäyksen primaariciliat, Alexa 488 -kuvakerros

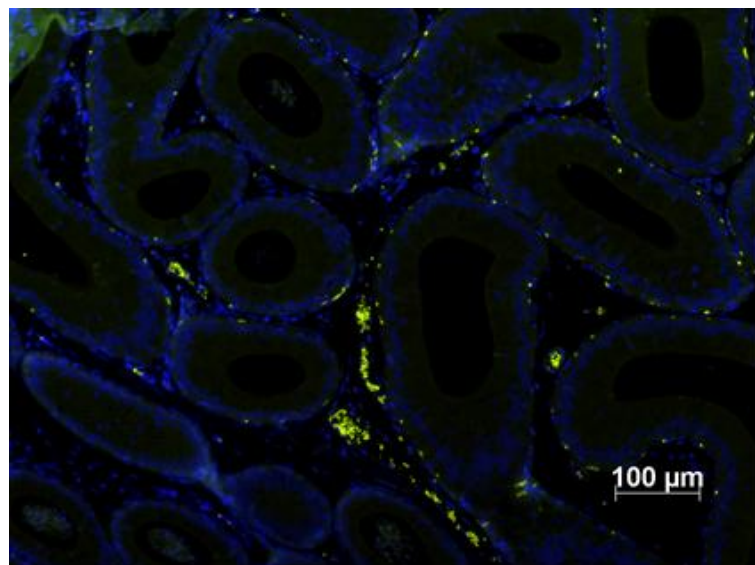


Kuva 19. Cilioiden kaksoisvärjäyksen kontrollileike, Alexa 488 -kuvakerros

Viimeisenä tehtiin GPR30-vasta-aineella ja falloidiinilla kaksoisvärjäys parafiinileikkeille. Tarkoituksena oli saada värjättyä samasta leikkeestä lisäkivestubulusten stereociliat sekä niissä oletetusti sijaitsevat GPR30-kudosreseptorit. Kuvassa 20. näkyvät GPR30-reseptorit kirkkaan vihreinä kehinä, mutta stereociliat eivät ole värjäytyneet lainkaan. Kuva 21. on saman näytteen puhdas kontrollileike, jossa ei ole spesifistä värjäytymistä.



Kuva 20. GPR30-falloidiini kaksoisvärjäys, sitraattipuskuri



Kuva 21. GPR30-falloidiini-värjäyksen kontrollileike

## 6 POHDINNAT

### 6.1 Tutkimustulosten pohdinta

Tässä tutkimuksessa tehtävänä oli paikantaa GPR30-kudosreseptori optimoimalla ensin vasta-aineelle toimivat värjäysolosuhteet. GPR30:n lisäksi oli paikannettava eri ciliatyypit, koska reseptoreiden oletettiin sijaitsevan niissä. Primaari- ja stereociliat värjättiin ensin erikseen ja sitten yhdessä kaksoisvärjäyksellä. Sen jälkeen GPR30-reseptorit ja ne ciliat, joissa reseptorit värjäystulosten perusteella sijaitsivat, värjättiin asian varmistamiseksi samasta leikkeestä kaksoisvärjäyksellä.

Ensimmäistä GPR30-värjäystä varten leikatut jääleikkeet oli fiksoitu 4%:sella PFA:lla, jonka pH oli tavanomainen 7,4. Leikkeet värjättiin sekundaarivasta-aineella, johon oli konjugoitu vihreä merkkiaine. Värjäys ei antanut positiivista signaalia millään laimennoksella, joten seuraavaksi kokeiltiin eri tavoin fiksoituja näytteitä. Osa näytteistä oli fiksoitu 4%:sella PFA:lla, jonka pH oli säädetty neljään, osa PLP:llä ja osa vain jäädyttämällä, ilman erillistä fiksatiivia. Leikkeiden värjäyksessä käytettiin sekundaarivasta-aineita, joista toisessa oli punainen ja toisessa vihreä leima. GPR30-vasta-aine ei toiminut jääleikkeillä edelleenkään. Positiivista signaalia ei saatu kummallakaan vasta-aineella eri fiksointimenetelmistä ja laimennoksista huolimatta. Näytteissä havaittiin ainoastaan autofluoresenssista johtuvaa taustavärjäytymistä, jota oli myös negatiivisissa kontrollinäytteissä.

Tutkimuksen suorittajalla oli vain vähän kokemusta jääleikkeiden leikkaamisesta ja immunohistokemiallisten värjäysten tekemisestä. Värjäysten epäonnistuminen jääleikkeillä tuskin kuitenkaan johtui ainoastaan tutkijan kokemattomuudesta, sillä värjäykset tehtiin kahdessa erässä ja kaikista eri menetelmin fiksoiduista blokeista värjättiin kaksi lasia. Ohjeita noudatettiin huolellisesti ja värjäykset suoritettiin ohjatusti. Tutkimuksen ohjaaja tarkisti, että vasta-ainelaimennokset oli laskettu oikein. Pipetointivirheen mahdollisuus on

olemassa, mutta tuskin se olisi sattunut joka leikkeen kohdalla ja molemmissa värjäyksissä. Kahta eri värillä konjugoitua sekundaarivasta-ainetta kokeilemalla varmistuttiin siitä, että ongelmana ei ollut vain jommankumman vasta-aineen toimimattomuus tai liian heikko signaali. Jos syynä olisi ollut esikäsitteilyistä huolimatta aldehydifiksatiivien aiheuttama antigeeniepitooppien peittyminen, fiksoimattomien näytteiden olisi pitänyt värjäytyä. Leikkeet olivat tutkimuksen tekijän vähäisestä jääleikkeiden leikkauskokemuksesta huolimatta teknisesti onnistuneita ja ne pysyivät laseilla hyvin.

Jääleikkeillä saatujen negatiivisten värjäystulosten vuoksi GPR30-vasta-ainevärjäystä kokeiltiin seuraavaksi parafiinileikkeillä. Parafiiniblokkeja varten lisäkivesnäytteet oli preparoitu suoraan fiksatiiviin eli 4%:seen PFA:han (pH7,4). Parafiinileikkeet esikäsiteltiin ennen värjäystä antigeenien paljastamiseksi. Antigeenien paljastusmenetelmät olivat mikroaaltouunikäsittely TE-puskurissa, painekattilakäsittely sitraattipuskurissa ja proteinaasi-K entsyymikäsittely. Näytteitä mikroskopoitaessa huomattiin, että kullakin menetelmällä käsitellyt näytteet antoivat positiivisen signaalin ja spesifinen värjäytyminen erottui selkeästi taustasta. GPR30-reseptorit näyttivät paikantuneen lumenin reunoille ja näkyivät vihreänä kehänä. Negatiivisissa kontroleissa spesifiä värjäytymistä ei ollut, joten värjäysten voitiin olettaa onnistuneen. GPR30-vasta-aineelle oli löydetty toimivat värjäysolosuhteet parafiinileikkeillä.

On vaikea sanoa, miksei värjäys onnistunut jääleikkeillä, mutta sen sijaan onnistui parafiinileikkeillä. Parafiinin prosessointi yleensä lisää taustaa ja sen vuoksi immunofluoresenssivärjäykset tehdään usein jääleikkeillä.

Stereociliat värjättiin falloidiinilla, johon oli konjugoitu fluoresoiva merkkiaine. Värjäys tehtiin jääleikkeillä, samalla tavoin fiksoiduista blokeista kuin GPR30-värjäyksessä. Näytteitä mikroskopoitaessa nähtiin voimakas spesifinen signaali lisäkivestubulusten lumenia ympäröivissä värekarvoissa ja todettiin, että falloidiinia olisi riittänyt vähäisempikin määrä.

Primaaricilioiden värjäykseen käytettiin anti-asetyloitua tubuliinia. Värjäykset tehtiin jääleikkeillä ja anti-asetyloidulle tubuliinille valittiin PLP-fiksoitu sekä 4%

PFA (pH 7,4) -fiksoitu näyte. Opinnäytetyön ohjaajan FT Petra Sipilän mukaan mikroskooppikuvissa näkyvä signaali oli spesifistä värjäytymistä, vaikka se näyttikin hieman samalta kuin liiallisesta vasta-ainemäärästä tai huonoista pesuista johtuvat väriainesostumat. Kontrollissa samanlaista värjäytymistä ei kuitenkaan ollut. Asian varmistamiseksi primaariciliat värjättiin parafiinileikkeistä immunoperoksidaasimenetelmällä aiemmin mainittuja esikäsittelyjä käyttäen. Entsymaattinen värjäys ei kuitenkaan antanut haluttua tulosta. Värjäytymistä nähtiin lumenia ympäröivissä soluissa, eikä solujen pinnalla lumenissa. Lisäksi se oli paljon laaja-alaisempaa, kuin fluoresenssivärjäyksissä. Kontrollinäytteet eivät kuitenkaan värjäytyneet. Todennäköisesti primaarivasta-aine tunnisti jotain epäspesifistä ja sai aikaan väärän positiivisen tuloksen. Primaaricilioita on yleensä vain 1 kpl solua kohden, joten fluoresenssivärjäysten tulokset vaikuttavat oikeammilta kuin peroksidaasivärjäyksen.

Primaaricilioiden fluoresenssivärjäyksen spesifisyys pyrittiin varmistamaan vielä kaksoisvärjäyksellä. Molemmat ciliatyypit värjättiin samasta leikkeestä eriväristen merkkiaineiden (TRITC ja Alexa 488) avulla. Mikroskooppikuvissa nähtiin stereociliat oranssinkeltaisina lumenia ympäröivien solujen pinnalla ja primaariciliat yksittäisinä vihreinä pisteinä kaikkialla tubuluksissa, todennäköisesti solujen välitiloissa. Kontrollit eivät olleet värjäytyneet. Värjäystulos oli sellainen, kuin erillisten ciliavärjäysten perusteella odotettiinkin. Voitiin siis todeta, että primaariciliat eivät sijaitse lisäkivestubuluksissa sellaisissa kohdissa, että niissä mahdollisesti olevat reseptorit voisivat osallistua signalointiin siittiöiden kanssa. Stereociliat sen sijaan näyttivät sijaitsevan reseptorien ja siittiöiden välisen signaloinnin kannalta suotuisalla paikalla lumenissa.

Kaikkien edellä tehtyjen värjäysten tulosten perusteella voitiin olettaa, että GPR30-reseptorit sijaitsevat stereocilioissa. Tämän todentamiseksi tehtiin kaksoisvärjäys, jossa samasta leikkeestä värjättiin GPR30-reseptorit sekä stereociliat. Värjäys tehtiin parafiinileikkeillä, koska GPR30-vasta-ainetta ei saatu toimimaan jääleikkeillä. Falloidiinin taas oletettiin aiempien kokemusten perusteella toimivan sekä jää- että parafiinileikkeillä. Leikkeet esikäsiteltiin

antigeenien paljastamiseksi painekattilassa sitraattipuskurissa. Kaksoisvärjäys ei onnistunut, sillä GPR30-reseptorit värjäytyivät, mutta stereociliat eivät. Kontrollit eivät värjäytyneet.

On vaikea sanoa, miksei falloidiini antanut tässä värjäyksessä positiivista signaalia, vaikka jääleikkeissä värjäytyminen oli voimakasta. Falloidiinin sitoutumiseksi F-aktiiniin proteiinin rakenteen tulisi olla lähes muuttumaton. Parafiini on saattanut peittää antigeeniepitooppeja ja antigeenin paljastusmenetelmä on voinut olla sopimaton. Kenties GPR30-vasta-aine on jollakin tavoin estänyt falloidiinin sitoutumisen. Tutkimuksen kokeellisiin osuuksiin tarkoitettu aika oli rajallinen, eikä se riittänyt enää värjäyksen toistamiseen ja eri puskureiden ja antigeenien paljastusmenetelmien kokeilemiseen. Falloidiinin toimivuus parafiinileikkeillä olisi tarvinnut testata yksistään ennen kaksoisvärjäystä, mutta ajan säästämiseksi tämä vaihe jätettiin välistä.

Tutkimustehtäviin saatiin vastaukset suurelta osin, mutta tällaisessa tutkimuksessa asiat eivät aina ole kovin yksiselitteisiä. Värjäystulosten perusteella GPR30-kudosreseptori sijaitsee initial segmentin lisäksi muissakin lisäkivessegmenteissä, mutta se ei välttämättä tarkoita sitä, ettei se voisi toimia segmenttispesifisesti. Muissa segmenteissä voi ilmentyä esimerkiksi inhibiittoreita, jotka estävät signaloinnin. Tämän tutkimuksen tulosten perusteella GPR30-reseptori jätetään kuitenkin tässä vaiheessa jatkotutkimusten ulkopuolelle. Kyseinen reseptori vaikutti silti mielenkiintoiselta, joten sen lokalisaatio haluttiin kunnolla varmistaa siitä huolimatta, ettei se ollut segmentti-spesifinen. Primaaricilioiden on näytetty toimivan signaalin välittäjinä ja monet reseptorit sijaitsevat niissä. Ajatuksena oli, että samankaltainen mekanismi voisi toimia myös lisäkiveksessä. (Sipilä 2012.) Tämän tutkimuksen tulosten perusteella näin ei kuitenkaan ole. Stereocilioista vastaavaa ei ole näytetty, joten reseptorien mahdollinen sijainti niissä viittaa mahdollisuuteen, että myös stereociliat välittävät signalointia. Tämän näyttäminen toteen olisi täysin uutta ja kiinnostavaa tietoa.

## 6.2 Tutkimuksen yleinen pohdinta

Tutkimuksen teoreettiseen osuuteen liittyvää kirjallisuutta lisäkiveksestä ja sen reseptoreista oli saatavilla hyvin niukasti, koska lisäkives on tutkimuskohteena melko uusi. Lähteet olivat englanninkielisiä tieteellisiä artikkelijulkaisuja, joita ei ollut aina helppo tulkita, koska asia oli vierasta ja vaikeaa. Kaikille termeille ei myöskään löytynyt suomenkielisiä vastineita. Laajempaa ja yksityiskohtaisempaa perehtymistä reseptorien toimintaan teoriaosuudessa ei katsottu tarpeelliseksi, koska tutkimuksen pääkohteena olivat immunohistokemialliset värjäykset ja niiden avulla tehdyt antigeenien paikannukset. Myös immunohistokemiaa käsitteleviä lähteitä oli suhteellisen vähän, mutta kirjallista materiaalia oli kuitenkin saatavilla, jotakin jopa suomenkielisenä. Jotkut lähteistä tosin olivat hieman vanhoja, mutta niissä käsitellyt tietyt immunohistokemian ja histologian perusasiat eivät ole muuttuneet. Lähteet pyrittiin valitsemaan kriittisesti, asianmukaisesti ja monipuolisesti.

Tässä tutkimuksessa tutkijan vastuuta lisäsi se, että hän teki kaikki kokeelliset osuudet preparoinnista (osan näytteistä preparoi tutkimuksen ohjaaja) asti itse sen sijaan, että olisi käyttänyt esimerkiksi valmiita kudosplokkeja tai valmiiksi leikattuja laseja. Tutkija koki tämän edukseen, koska tällä tavoin hän tiesi tarkalleen, miten missäkin vaiheessa oli menetelty. Toisaalta se lisäsi tutkimuksen luotettavuutta, mutta toisaalta tutkijan kokemattomuus saattoi aiheuttaa joitakin virheitä. Erilaisten liuosten ja laimennosten tekemiseen liittyvät laskutoimitukset olivat päässeet unohtumaan, joten tutkija koki ne aluksi hieman vaikeiksi. Kokemuksen myötä ne kuitenkin sujuivat hyvin. Välillä oli vaikea ymmärtää, miksi jokin värjäys ei toiminut, vaikka sillä oli kaikki edellytykset siihen.

Alkuperäisen tutkimussuunnitelman mukaan oli määrä paikantaa useampia reseptoreita sopivilla vasta-aineilla. Tutkimustehtäväksi muotoutui kuitenkin vain yhden potentiaalisen reseptorin paikantamisen, sillä värjäykseen käytettyä vasta-ainetta ei ollut testattu aiemmin ja näin ollen sille piti löytää toimivat

värjäysolosuhteet. Vasta-aineen optimoinnin lisäksi lisätutkimustehtäviksi tulivat reseptorien paikannuksessa apuna käytetyt ciliavärjäykset sekä kaksoisvärjäykset.

### 6.3 Tutkimuksen luotettavuus

Tutkimuksen luotettavuuden arvioinnin yhteydessä puhutaan yleensä reliabiliteetista ja validiteetista. Reliabiliteetti eli luotettavuus tarkoittaa tutkimuksen toteutuksen sekä tulosten tarkkuutta. Mittaustulosten (tässä värjäysten) tulee olla toistettavia ja ei-sattumanvaraisia. Tutkimuksen luotettavuutta parantaa tutkijan tarkka selostus tutkimuksen toteuttamisesta. Validiteetti eli pätevyys tarkoittaa tutkimusmenetelmän kykyä selvittää juuri sitä, mitä on tarkoituskin. Kokeellisessa tutkimuksessa ulkoisella validiteetilla tarkoitetaan myös sitä, että saadut tulokset ovat edustavia ja ne voidaan yleistää toisiin samanlaisiin kohteisiin. Sisäisellä validiteetilla tarkoitetaan muuttujien manipuloinnin vaikutusta tutkittavaan kohteeseen. (Anttila 2006; Vilka 2007; Hirsjärvi ym. 2010.)

Tämän tutkimuksen kaikki vaiheet suoritettiin reliabelisti hyvää tieteellistä käytäntöä noudattaen. Kudosblokeista leikatut leikkeet olivat edustavia tutkijan vähäisestä jääleikkeiden leikkauskokemuksesta huolimatta. Immunohistokemiallisissa ja entsyymaattisissa värjäyksissä värjäysohjeita noudatettiin tarkasti ja pipetoinnit tehtiin mahdollisimman huolellisesti. Tutkimuksen luotettavuutta lisäsi vasta-ainelaimennosten ja muiden laskujen tarkistuttaminen ohjaajalla. Värjäyksissä käytetyt reagenssit ja vasta-aineet olivat tuoreita, hyväkuntoisia ja oikein säilytettyjä. Kaikissa värjäyksissä oli kontrollileike, jonka avulla arvioitiin tuloksen luotettavuutta. Tulosten luotettavuus varmistettiin myös kaksoisvärjäysten avulla. Jokainen värjäys tehtiin lisäksi useammalla lasilla, jolloin vähennettiin sattumanvaraisuutta ja parannettiin toistettavuutta. Tutkimuksen suorittamisesta pidettiin myös tutkimuspäiväkirjaa ja kaikesta tehtiin mahdollisimman hyvät muistiinpanot,



joiden pohjalta kirjoitettiin tutkimusraportti. Kaikki tutkimustulokset otettiin huomioon ja julkaistiin.

Tutkimuksen validiteetti on hyvä, sillä teoreettinen sekä kokeellinen osuus vastaavat toisiaan ja valitulla kokeellisella menetelmällä pystyttiin selvittämään sitä, mitä oli tarkoituskin selvittää. Tutkimuksessa pystyttiin osoittamaan, että juuri muuttujien (värjäysolosuhteiden) vaihtelulla oli merkitystä värjäystulosten onnistumiseen. Immunohistokemiallisten värjäysten tulkinnasta tutkijalla ei ollut kokemusta, joten se tehtiin yhdessä ohjaajan kanssa. Värjäystulosten tulkinnat ja analyysi perustuvat tutkimuksen ohjaajan havaintoihin. Hänen mukaansa tulokset ovat edustavia ja yleistettävissä muihin samanlaisiin kohteisiin. Muut samankaltaiset kohteet tarkoittavat tässä hiiriä, koska tutkimukset on tehty hiirten lisäkiveksillä. Tutkimustulosten yleistämistä ihmisiin ei voida tehdä täysin luotettavasti ja yksiselitteisesti.

#### 6.4 Jatkotutkimusaiheet

Jatkotutkimusaiheena olisi muiden potentiaalisten, siittiöiden kypsymiseen vaikuttavien ja lisäkiveksessä sijaitsevien reseptorien paikantaminen sopivilla vasta-aineilla sekä reseptorien toiminnan testaus agonisteja ja antagonisteja käyttäen. Lisäksi olisi järkevää varmistaa GPR30-reseptorien sijainti stereocilioiden kärjissä, koska tässä tutkimuksessa GPR30-faloidiini-kaksoisvärjäystä ei saatu toimimaan. Stereocilioiden mahdollinen rooli signaloinnissa on kiinnostava ja sitä voisi tutkia eteenpäin.

## LÄHTEET

- Aho, H. 1999. Histologiset menetelmät patologiassa. Turku: Turun yliopisto, kliinis-teoreettinen laitos, patologia. 14-16.
- Anttila, P. 2006. Ilmaisu, teos, tekeminen ja tutkiva toiminta. 2. painos. Hamina: Akatiimi Oy. 269-274, 511-518.
- Avenel, J.; Shur, B. D. & Hess, R. A. 2011. Estrogen, Efferent Ducts, and the Epididymis. *Biology of Reproduction*. Vol. 84, No. 2/2011. 207-217.
- Bancroft, J. D. & Floyd, A. D. 2008. Light Microscopy. Teoksessa Bancroft, J. D. & Gamble, M. (toim.) *Theory and Practice of Histological Techniques*. 6. painos. Churchill Livingstone Elsevier. 48-50.
- Boenisch, T. 2009a. Antibodies. Teoksessa Kumar, G. L. & Rudbeck, L. (toim.) *Immunohistochemical Staining Methods*. 5. painos. Carpinteria, CA: Dako North America. 1-6.
- Boenisch, T. 2009b. Basic Enzymology. Teoksessa Kumar, G. L. & Rudbeck, L. (toim.) *Immunohistochemical Staining Methods*. 5. painos. Carpinteria, CA: Dako North America. 15-18.
- Boenisch, T. 2009c. Basic Immunochemistry. Teoksessa Kumar, G. L. & Rudbeck, L. (toim.) *Immunohistochemical Staining Methods*. 5. painos. Carpinteria, CA: Dako North America. 11-13.
- Brandtzaeg, P.; Halstensen, T. S.; Huitfeldt, H. S. & Valens, K. N. 1997. Immunofluorescence and Immunoenzyme Histochemistry. Teoksessa Johnstone, A. P. & Turner, M. W. (toim.) *Immunohistochemistry 2: A Practical Approach*. New York: Oxford University Press Inc. 72-76, 111-117.
- Buchwalow, I. B. & Böcker, W. 2010. *Immunohistochemistry: Basics and Methods*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag. 1-7, 9-17, 19-21, 31-37, 41-55, 61-74, 91-93. Saatavissa <http://www.dawsonera.com.ezproxy.turkuamk.fi>
- Christensen, N. K. & Winther, L. 2009. Multi-Staining Immunohistochemistry. Teoksessa Kumar, G. L. & Rudbeck, L. (toim.) *Immunohistochemical Staining Methods*. 5. painos. Carpinteria, CA: Dako North America. 103-108.
- Cornwall, G. A. & von Horsten, H. H. 2007. Sperm Maturation in the Epididymis: Role of Segment-Specific Microenvironments. Teoksessa Carrell, D. T. (toim.) *The Genetics of Male Infertility*. Totowa, NJ: Humana Press. 211-226.
- Cornwall, G. A. 2009. New Insights into Epididymal Biology and Function. *Human Reproduction Update*. Vol. 15, No. 2/2009. 213-227.
- Davenport, J. R. & Yoder, B. K. 2005. An Incredible Decade for the Primary Cilium: A Look at a Once-Forgotten Organelle. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*. Vol. 289, No. 6/2005. 1159-1169.
- Farmilo, A. J. & Stead, R. H. 2009. Fixation and Processing. Teoksessa Kumar, G. L. & Rudbeck, L. (toim.) *Immunohistochemical Staining Methods*. 5. painos. Carpinteria, CA: Dako North America. 29-32.
- Grizzle, W. E.; Fredenburgh, J. L. & Myers, R. B. 2008. Fixation of Tissues. Teoksessa Bancroft, J. D. & Gamble, M. (toim.) *Theory and Practice of Histological Techniques*. 6. painos. Churchill Livingstone Elsevier. 53-59.

- Gupta, G. S. 2005. Proteomics of Spermatogenesis. 1. painos. New York, NY: Springer. 811-815.
- Hayat, M. A. 2002. Microscopy, Immunohistochemistry, and Antigen Retrieval Methods For Light and Electron Microscopy. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers. 1, 31-42, 53-64, 71-80, 89-90, 96-98, 117-120, 124-131, 148-153.
- Hess, R. A.; Fernandes, S. A. F.; Gomes, G. R. O.; Oliveira, C. L.; Lazari, M. F. M. & Porto, C. S. 2011. Estrogen and Its Receptors in Efferent Ductules and Epididymis. Journal of Andrology. Vol. 32, No. 6/2011. 600-609.
- Hirsjärvi, S.; Remes, P. & Sajavaara, P. 2010. Tutki ja kirjoita. 15.-16. painos. Helsinki: Kustannusosakeyhtiö Tammi. 23, 130-131, 134-140, 164, 177-184, 231-233.
- Hladik, C. L. & White, C. L. 2008. Immunohistochemistry Quality Control. Teoksessa Bancroft, J. D. & Gamble, M. (toim.) Theory and Practice of Histological Techniques. 6. painos. Churchill Livingstone Elsevier. 480-484.
- Jackson, P. & Blythe, D. 2008. Immunohistochemical Techniques. Teoksessa Bancroft, J. D. & Gamble, M. (toim.) Theory and Practice of Histological Techniques. 6. painos. Churchill Livingstone Elsevier. 435-445, 452-454, 468.
- Jequier, A. M. 2011. Male Infertility: A Clinical Guide. 2. painos. Cambridge: Cambridge University Press. 11-13.
- Järvinen, P. & Järvinen, A. 2004. Tutkimustyön metodeista. Tampere: Opinpajan kirja. 47-53.
- Key, M. 2009. Immunohistochemistry Staining Methods. Teoksessa Kumar, G. L. & Rudbeck, L. (toim.) Immunohistochemical Staining Methods. 5. painos. Carpinteria, CA: Dako North America. 57-60.
- Kiernan, J. A. 1999. Histological & Histochemical Methods: Theory and Practice. 3. painos. Oxford: Butterworth-Heinemann. 11-31, 390-392, 413-416.
- Knoblauch, S. & True, L. 2012. Male Reproductive System. Teoksessa Treuting, P. M. & Dintzis, S. (toim.) Comparative Anatomy and Histology : A Mouse and Human Atlas. 1. painos. Elsevier. 291-293.
- Koe-eläin keskus, Turun yliopisto. 2012. Viitattu 28.1.2012. <http://www.animalcenter.utu.fi>
- Kuula, A. 2006. Tutkimusetiikka. Tampere: Vastapaino. 33-39.
- Laasonen, A. 2011. Esivalmistelut immunoentsyymivärjäyksiä varten. Teoksessa Naukkarinen, A. (toim.) Immunohistokemian peruskurssi. 6. painos. Kuopio: Itä-Suomen yliopisto.
- Laki koe-eläintoiminnasta 20.1.2006/62
- Maggiolini, M. & Picard, D. 2010. Journal of Endocrinology. Vol. 204, No. 2/2010. 105-114.
- Mäkinen, O. 2006. Tutkimusetiikan ABC. Helsinki: Kustannusosakeyhtiö Tammi. 24-27, 158-162, 172-174.
- Naukkarinen, A. & von Boguslawsky, K. 1998. Immunohistokemia. Teoksessa Rantala, I. & Lounatmaa, K. (toim.) Biologinen valomikroskopia. Helsinki: Yliopistopaino. 133-136, 140-149, 151-154, 156-159.
- Naukkarinen, A. 2010. Immunohistokemiallisten värjäysten tulkinta. Teoksessa Naukkarinen, A. (toim.) Immunohistokemian jatkokurssi. 6. painos. Kuopio: Itä-Suomen yliopisto.

- Naukkarinen, A. 2011a. Immunohistokemian perusteita. Teoksessa Naukkarinen, A. (toim.) Immunohistokemian peruskurssi. 6. painos. Kuopio: Itä-Suomen yliopisto.
- Naukkarinen, A. 2011b. Merkkiaineet eli leimat immunohistokemiassa. Teoksessa Naukkarinen, A. (toim.) Immunohistokemian peruskurssi. 6. painos. Kuopio: Itä-Suomen yliopisto.
- Naukkarinen, A. 2011c. Polymeeritekniikat immunohistokemiassa. Teoksessa Naukkarinen, A. (toim.) Immunohistokemian peruskurssi. 6. painos. Kuopio: Itä-Suomen yliopisto.
- Page, S. T.; Amory, J. K. & Bremner, W. J. Advances in Male Contraception. *Endocrine Reviews*. Vol. 29, No. 4/2008. 465-483.
- Prossnitz, E. R.; Arteburn, J. B. & Sklar, R.A. 2007. GPR30: A G Protein-Coupled Receptor for Estrogen. *Molecular and Cellular Endocrinology*. Vol. 265-266. No. 2/2007. 138-142.
- Prossnitz, E. R.; Arteburn, J. B.; Smith, H. O.; Oprea, T. I.; Sklar L.A. & Hathaway, H. J. 2008. Estrogen Signaling Through the Transmembrane G Protein-Coupled Receptor GPR30. *Annual Review of Physiology*. No. 70/2008. 165-190.
- Prossnitz, E. R. & Maggiolini, M. 2009. Mechanisms of Estrogen Signaling via GPR30. *Molecular and Cellular Endocrinology*. Vol. 308. No. 1-2/2009. 32-38.
- Proviisorin koulutusohjelman farmaseuttikiintiön aineistokokeen 28. 5. 2009 arviointikriteerit. Koulutus- ja kehittämispalvelu Aducate, Itä-Suomen yliopisto 2009. Saatavissa [https://www.uef.fi/c/document\\_library/get\\_file?uuid=ea222dc3-17fc-4f1d-8359-c7dd3840408f&groupId=78409&p\\_l\\_id=78589](https://www.uef.fi/c/document_library/get_file?uuid=ea222dc3-17fc-4f1d-8359-c7dd3840408f&groupId=78409&p_l_id=78589)
- Rantala, I. & Laasonen, A. 2000. Immunohistokemialliset värjäykset. *Moodi* 4-5/2000. 148-152.
- Rasmussen, O. F. 2009. Controls. Teoksessa Kumar, G. L. & Rudbeck, L. (toim.) Immunohistochemical Staining Methods. 5. painos. Carpinteria, CA: Dako North America. 127-130.
- Robaire, B. & Viger, R. S. 1995. Regulation of Epididymal Epithelial Cell Functions. *Biology of Reproduction*. Vol. 52, No. 2/1995. 226-228.
- Robaire, B.; Hinton, B. T. & Orgebin-Crist, M-C. 2006. The Epididymis. Teoksessa Neill, J. D. (toim.) Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. 3. painos. Elsevier. 1071-1095.
- Robinson, J. P.; Sturgis, J. & Kumar, G. L. 2009. Immunofluorescence. Teoksessa Kumar, G. L. & Rudbeck, L. (toim.) Immunohistochemical Staining Methods. 5. painos. Carpinteria, CA: Dako North America. 61-65.
- Ruttimann, J. 2011. New Directions in Male Contraceptives. *Endocrine News* 6/2011. 44-45.
- Singla, V. & Reiter, J. F. 2006. The Primary Cilium as the Cell's Antenna: Signaling at a Sensory Organelle. *Science*. Vol. 313, No. 5787/2006. 629-633.
- Sipilä, P. 2011 & 2012. Henkilökohtainen tiedonanto.
- Solunetti 2006. Viitattu 2.3.2012. <http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/hyaluronaani/2/>
- Spencer, L. T. & Bancroft, J. D. 2008. Tissue Processing. Teoksessa Bancroft, J. D. & Gamble, M. (toim.) Theory and Practice of Histological Techniques. 6. painos. Churchill Livingstone Elsevier. 84-87.
- Tuomi, J. & Sarajärvi, A. 2006. Laadullinen tutkimus ja sisällönanalyysi. 1.-4. painos. Helsinki: Kustannusosakeyhtiö Tammi. 18-21, 87-88.
- Tutkimuseettinen neuvottelulautakunta. 2011. Hyvä tieteellinen käytäntö ja sen loukkausten käsitteleminen. Viitattu 28.1.2012. [http://www.tenk.fi/hyva\\_tieteellinen\\_kaytanto/kaytanto.html](http://www.tenk.fi/hyva_tieteellinen_kaytanto/kaytanto.html),

[http://www.tenk.fi/hyva\\_tieteellinen\\_kaytanto/loukkaukset.html](http://www.tenk.fi/hyva_tieteellinen_kaytanto/loukkaukset.html)

Vilka, H. 2007. Tutki ja mittaa. Helsinki: Kustannusosakeyhtiö Tammi. 18-26, 152-154.

Vilka, H. 2009. Tutki ja kehitä. 1.-3. painos. Helsinki: Kustannusosakeyhtiö Tammi. 29-31.

Wendelboe, H. G. & Bisgaard, K. 2009. Background. Teoksessa Kumar, G. L. & Rudbeck, L. (toim.) Immunohistochemical Staining Methods. 5. painos. Carpinteria, CA: Dako North America. 115-121.

## **IMMUNOFLUORESCENCE STAINING PROTOCOL FOR FROZEN SECTIONS**

### **1. Preparation of Slides**

- Before staining, warm slides at room temperature for 30 minutes and fix in ice cold acetone for 5 minutes. Air dry for 30 minutes.
- Wash in PBS 2x2 min.

### **2. Procedure**

1. Rinse sections in PBS-Tween20 for 2x2 min.
2. Serum Blocking: incubate sections with normal serum block (3% BSA + 5% NGS) –species same as secondary antibody, for 30 minutes to block non-specific binding of immunoglobulin.
3. Primary Antibody: incubate sections with primary antibody at appropriate dilution in primary antibody dilution buffer for 1 hour at room temperature or overnight at 4°C.
4. Rinse in PBS-Tween20.
5. Secondary Antibody: incubate sections with secondary antibody at appropriate dilution in PBS for 30 minutes at room temperature. Protect slides from light starting from this step.
6. Rinse in PBS-Tween20 for 3x2 min.
7. Counterstain with PI or DAPI if desire (5min)
8. Rinse in PBS-Tween20.
9. Dehydrate through 95% ethanol for 2min, 100% ethanol for 2x3 min.
10. Coverslip with anti-fade mounting medium (Moviol).

## IMMUNOFLUORESCENCE STAINING PROTOCOL FOR PARAFFIN SECTIONS

### 1. Preparation of Slides

- Deparaffinize sections in xylene 2x5 min
- Rehydration:
  - 100% EtOH 2x3 min
  - 95% EtOH 2x2 min
  - 75% EtOH 2x2 min
- Rinse in distilled water
- Follow procedure for pretreatment as required

### 2. Pre-treatments of Tissue Sections

Antigenic determinants masked by formalin-fixation and paraffin-embedding often may be exposed by epitope unmasking, enzymatic digestion or saponin, etc. NOTE: Do not use this pre-treatment with frozen sections or cultured cells that are not paraffin-embedded!

#### Antigen Retrieval

- **Sodium Citrate buffer** (10mM Sodium Citrate pH 6 + 0,05% Tween20) in pressure cooker (PickCell Laboratories 2100 Retriever, Netherlands) for two hours
- **TE buffer** (pH 9) in microwave-oven
- **Proteinase K-enzyme**, 15 min at room temperature

### 3. Procedure

#### Day 1

1. Wash in 1xPBS 2x5 min
2. 100mM NH<sub>4</sub>Cl, 3 min, **for fluorescent staining only**
3. Wash in 1xPBS 2x5 min
4. Incubate 30 min in blocking solution (3% BSA+5% NGS in 1xPBS)
5. Incubate over night with primary antibody

#### Day 2

6. Wash in 1xPBS 2x5 min
7. Incubate 10 min in 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in darkness (not necessary for fluorescent staining)
8. Wash in 1xPBS 2x5 min
9. Incubate 30 min with secondary antibody at room temperature in darkness
10. Wash in 1xPBS 3x5 min

#### **If the secondary antibody is fluorescent:**

11. Counterstain with DAPI (1:10 000) and mount with Moviol

#### **If the secondary antibody is an HRP-conjugate continue as follows:**

11. Develop with Dako's DAB (1:50), dip slide in dH<sub>2</sub>O to stop the reaction
12. Counterstain with filtered Hematoxylin, dip slide in dH<sub>2</sub>O to stop the reaction
13. Dehydrate:
  - 75% EtOH 2x2 min
  - 95% EtOH 2x2 min
  - 100% EtOH 2x2 min
  - Xylene 2x2 min
14. Mount with Pertex



**PLP (WITH 4% PFA) FIXATIVE****To make 40 ml:**

Mix together: 1.425 ml of solution A

6.1 ml of solution B

27.48 ml H<sub>2</sub>O

**Solution A:** 0.2M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (MW 137.99) Can be kept in the fridge

**Solution B:** 0.2M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (MW 177.99) Keep at room temperature

Add: 0.0855g Sodium Periodate (Fisher S398-100) MW 213.89

0.548g Lysine (Sigma L-5626) MW 182.65

2g sucrose (Sigma S-9378/Fisher 55-500) MW 342

Add: 1 ampulla of 5 ml of paraformaldehyde (16%)

**PLP fixing:**

Fix the freshly isolated tissues by immersion in PLP for 4 hours (rat epididymis), or 3 hours (mouse epididymis) at room temperature or overnight at 4°C.

Wash the tissues with normal PBS 5x5 min.



Rev. 8.5.10

For Research Use Only.

### G Protein-Coupled Receptor 1 (GPER/GPR30) Rabbit anti-Human Polyclonal Antibody

<b>CatalogID</b>	LS-A4268
<b>Target Protein</b>	G Protein-Coupled Estrogen Receptor 1 (GPER/GPR30)
<b>Family</b>	GPCR / Transmembrane Estrogen Receptor
<b>Host</b>	Rabbit
<b>Species Reactivity</b>	Human
<b>Clonality</b>	Polyclonal
<b>Immunogen</b>	Synthetic peptide – KLH conjugated
<b>Epitope</b>	2nd extracellular domain of human
<b>Mouse Homology:</b>	86% (Identity) / 100% (Similarity)
<b>Rat Homology:</b>	86% (Identity) / 100% (Similarity)
<b>Purification</b>	Immunoaffinity Chromatography
<b>Volume</b>	50 µL
<b>Weight</b>	50 µg
<b>Concentration</b>	1 mg/mL
<b>Presentation</b>	PBS, 0.1% sodium azide
<b>Recommended Storage</b>	Long term: -70°C; Short term: +4 °C
<b>Applications</b>	Immunofluorescence (IF) (Optimal dilution to be determined by the researcher)

---

**For research use only. Not intended for human, diagnostic, therapeutic, or drug use.**

**Summary of Expression:** GPR30 is a transmembrane intracellular estrogen receptor (Revankar et al. 2005). Progesterin inhibits growth in breast cancer cells through GPR30.

---

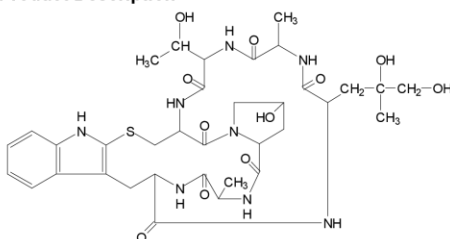
4 H Constitution Way · Woburn, MA 01801 · Phone: 1.800.200.5459 · Fax: 781-939-6963 · [www.mblintl.com](http://www.mblintl.com)

## Product Information

### Phalloidin from *Amanita phalloides* and Phalloidin Conjugates (Coumarin, FITC, and TRITC)

Phalloidin, Catalog Number **P2141**  
Phalloidin, Coumarin labeled, Catalog Number **P2495**  
Phalloidin, Fluorescein isothiocyanate labeled, Catalog Number **P5282**  
Phalloidin, Tetramethylrhodamine B isothiocyanate, Catalog Number **P1951**

#### Product Description



#### Physical Properties Of Phalloidin

(Catalog Number P2141):  
Molecular Formula: C<sub>35</sub>H<sub>48</sub>N<sub>8</sub>O<sub>11</sub>S  
Molecular Weight: 788.9 (anhydrous)  
Extinction Coefficient:<sup>2</sup> E<sub>1%</sub><sup>1cm</sup> = 0.597 (295 nm in water)  
Store at Room Temperature

#### Physical Properties Of Phalloidin, Coumarin labeled

(Catalog Number P2495):  
Molecular Formula: C<sub>62</sub>H<sub>75</sub>N<sub>11</sub>O<sub>15</sub>S<sub>2</sub>  
Molecular Weight: 1278.45  
Excitation:<sup>2</sup> 384 nm  
Emission:<sup>2,3</sup> 470 nm  
Molar Extinction Coefficient:<sup>4</sup> 10,000 (275 nm in ethanol)  
Storage Temperature -20 °C

#### Physical Properties Of Phalloidin, Fluorescein isothiocyanate labeled

(Catalog Number P5282):  
Molecular Formula: C<sub>58</sub>H<sub>63</sub>N<sub>10</sub>O<sub>14</sub>S<sub>4</sub>  
Molecular Weight: 1252.4  
Excitation:<sup>3</sup> 495 nm  
Emission:<sup>3</sup> 513 nm  
Molar Extinction Coefficient:<sup>3</sup> 70,000 (495 nm)  
Storage Temperature -20 °C

#### Physical Properties Of Phalloidin, Tetramethylrhodamine B isothiocyanate (TRITC)

(Catalog Number P1951):  
Molecular Formula: C<sub>62</sub>H<sub>72</sub>N<sub>12</sub>O<sub>12</sub>S<sub>4</sub>  
Molecular Weight: 1305.6  
Excitation:<sup>3,5</sup> 540–545 nm  
Emission:<sup>3,5</sup> 570–573 nm  
Molar Extinction Coefficient:<sup>3</sup> 80,000 (545 nm)  
Storage Temperature -20 °C

Phalloidin is a fungal toxin isolated from the poisonous mushroom *Amanita phalloides*. Its toxicity is attributed to the ability to bind F actin in liver and muscle cells. As a result of binding phalloidin, actin filaments become strongly stabilized. Phalloidin has been found to bind only to polymeric and oligomeric forms of actin, and not to monomeric actin. The dissociation constant of the actin-phalloidin complex has been determined to be on the order of  $3 \times 10^{-5}$  M.<sup>6</sup> Phalloidin differs from amanitin in rapidity of action; at high dose levels, death of mice or rats occurs within 1 or 2 hours.<sup>1</sup>

Fluorescent conjugates of phalloidin are used to label actin filaments for histological applications.<sup>2,3,5-9</sup> Some structural features of phalloidin are required for the binding to actin. However, the side chain of amino acid 7 ( $\gamma$ - $\delta$ -dihydroxyleucine) is accessible for chemical modifications without appreciable loss of affinity for actin. Coumarin,<sup>3,6</sup> FITC,<sup>3,6</sup> and TRITC<sup>3,7</sup> phalloidin conjugates are offered for these applications. The TRITC conjugate is considered less susceptible to photobleaching than the FITC conjugate.<sup>7</sup>

#### Precautions and Disclaimer

This product is for R&D use only, not for drug, household, or other uses. **Please consult the Material Safety Data Sheet for information regarding hazards and safe handling practices.**

**Preparation Instructions**

Solutions should be prepared fresh and protected from light when ever possible.

Solubility in water (0 °C): 0.5%; much more soluble in hot water; freely soluble in methanol, ethanol, butanol, and pyridine.<sup>1</sup>

Sigma tests the solubility of these products in methanol at the following concentrations:

Phalloidin: 10 mg/ml

Phalloidin-Coumarin: 1 mg/ml

Phalloidin-FITC: 0.5 mg/ml

Phalloidin-TRITC: 0.5 mg/ml

**Procedure**

Stock solutions of phalloidin conjugates have been made in methanol or DMSO at 0.1–5 mg/ml. Final staining solutions in aqueous physiological buffers are in the concentration range of 0.1–100 µM with corresponding incubation times of 15 minutes to 72 hours. The following procedure may be used as a guideline for staining cells:<sup>5</sup>

1. Cells are washed with phosphate buffered saline (PBS).
2. Cells are fixed for 5 minutes in 3.7% formaldehyde solution in PBS. Then washed extensively in PBS.
3. Cells may be dehydrated with acetone, permeabilized with 0.1% TRITON® X-100 in PBS, and washed again in PBS.
4. Cells are stained with a 50 µg/ml fluorescent phalloidin conjugate solution in PBS (containing 1% DMSO from the original stock solution) for 40 minutes at room temperature.
5. Wash several times with PBS to remove unbound phalloidin conjugate.

**References**

1. The Merck Index, 12<sup>th</sup> ed., p. 1238 entry 7336 (1996).
2. Small, J.V. et al., *J. Cell Science*, **89**, 21 (1988).
3. Faulstich, H. et al., *J. Muscle Res. Cell Motility*, **9**, 370 (1988).
4. J. Am. Pharm. Assoc. Sci. Ed., **39**,107 (1950).
5. Waggoner, A. et al., *Methods in Cell Biology*, **30**, 449 (1989).
6. Wulf, E. et al., *Proc. Nat. Acad. of Sci., USA*, **76**, 4498 (1979).
7. Faulstich, H. et al., *Exp. Cell Res.*, **144**, 73 (1983).
8. Lawson, M.A., and Maxfield, F.R., *Nature*, **377**, 75 (1995).
9. Heidecker, M. et al., *Biochemistry*, **34**, 11017 (1995).
10. *New Eng. J. Med.*, **269**, 223 (1963).

TRITON is a registered trademark of Dow Chemical Co.

CS,RGB,MAM 12/09-1

Sigma brand products are sold through Sigma-Aldrich, Inc. Sigma-Aldrich, Inc. warrants that its products conform to the information contained in this and other Sigma-Aldrich publications. Purchaser must determine the suitability of the product(s) for their particular use. Additional terms and conditions may apply. Please see reverse side of the invoice or packing slip.



3050 Spruce Street  
 Saint Louis, Missouri 63103 USA  
 Telephone 800-325-5832 • (314) 771-5765  
 Fax (314) 286-7828  
 email: techserv@slai.com  
 sigma-aldrich.com

## Product Information

### Monoclonal Anti-Acetylated Tubulin

#### Clone 6-11B-1

produced in mouse, purified immunoglobulin

Catalog Number **T7451**

#### Product Description

Monoclonal Anti-Acetylated Tubulin (mouse IgG2b isotype) is derived from the hybridoma 6-11B-1 produced by the fusion of mouse myeloma cells and splenocytes from a mouse immunized with acetylated tubulin from the outer arm of *Strongylocentrotus purpuratus* (sea urchin). The isotype is determined using a double diffusion immunoassay using Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Reagents, Catalog Number ISO2.

Monoclonal Anti-Acetylated Tubulin recognizes an epitope located on the  $\alpha 3$  isoform of *Chlamydomonas* axonemal  $\alpha$ -tubulin,<sup>1</sup> within four residues of Lys<sup>40</sup> when this amino acid is acetylated.<sup>2</sup> A sequence very similar to the one detected by the antibody in *Chlamydomonas* is found in the majority of  $\alpha$ -tubulins, but the corresponding region is markedly divergent in some  $\alpha$ -tubulin isoforms from chicken, *Drosophila*, and yeast.<sup>2</sup> The antibody has been used to detect acetylated  $\alpha$ -tubulins from many organisms that are frequently studied in the laboratory: protista, plants, invertebrates, and vertebrates (e.g., human, mouse, pig, bovine, rat, hamster, monkey, chicken, frog).<sup>3</sup> Details on the strains of organisms and microtubule structures containing acetylated  $\alpha$ -tubulin detected by the antibody have been described.<sup>3</sup> Occasionally, the epitope recognized by the antibody may be absent or masked, as it is in the rat kangaroo epithelial-like cell line PtK<sub>2</sub>.<sup>4</sup> The antibody may be used in immunoblotting, quantitative dot blot, ELISA, solid phase RIA, immunohistology, and electron microscopy.<sup>5</sup>

Tubulin is the major building block of microtubules. This intracellular, cylindrical filamentous structure is present in almost all eukaryotic cells. Microtubules function as structural and mobile elements in mitosis, intracellular transport, flagellar movement and in the cytoskeleton. Tubulin is a heterodimer, which consists of  $\alpha$ -tubulin and  $\beta$ -tubulin; both subunits have a molecular weight of 50,000 and share considerable homology. At least three modifications of tubulin subunits have been described: the phosphorylation of  $\beta$ -tubulin from brain, the removal of the carboxyterminal tyrosine from

$\alpha$ -tubulin in vertebrate tissues and the acetylation of the amino group of lysine(s) in  $\alpha$ -tubulin.

Acetylation of  $\alpha$ -tubulin is a post-translational modification that consists of the reversible addition of an acetyl group to Lys<sup>40</sup>, achieved by a specific acetylase. Acetylation of  $\alpha$ -tubulin is an important feature of axoneme assembly in a variety of organisms. Tubulin acetylation may play a prevalent role in the differentiation of microtubule structure and function.<sup>1, 6, 7</sup>

Monoclonal antibody recognizing the acetylated form of tubulin, together with monoclonal antibodies to other types of tubulins ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\beta$ -tubulin isotype I + II,  $\beta$ -tubulin isotype III, and tyrosine tubulin) provide specific and useful tools in studying the intracellular distribution of tubulin and the static and dynamic aspects of cytoskeleton.

#### Reagent

Supplied as a solution in 0.01 M phosphate buffered saline, pH 7.4, containing 15 mM sodium azide.

Antibody concentration: ~1 mg/mL

#### Precautions and Disclaimer

This product is for R&D use only, not for drug, household, or other uses. Please consult the Material Safety Data Sheet for information regarding hazards and safe handling practices.

#### Storage/Stability

For continuous use, store at 2-8 °C for up to one month. For extended storage, freeze in working aliquots. Repeated freezing and thawing, or storage in "frost-free" freezers, is not recommended. If slight turbidity occurs upon prolonged storage, clarify the solution by centrifugation before use. Working dilution samples should be discarded if not used within 12 hours.

#### Product Profile

Immunoblotting: a working antibody concentration of 0.03-0.06  $\mu$ g/mL is recommended using total rat brain extract.



**Dako**  
**EnVision+ System- HRP**  
**Labelled Polymer**  
 Anti-mouse

**Code K4000** 15 mL  
**Code K4001** 110 mL

**ENGLISH**

**Intended use**

For In Vitro diagnostic use.

These instructions apply to the **Dako EnVision+, Peroxidase** (Dako EnVision+, HRP).

This product is intended for use with primary antibodies from **mouse** supplied by the user for the qualitative identification of antigens by light microscopy in normal and pathological paraffin-embedded tissues, cryostat tissues or cell preparations. Tissues processed in a variety of fixatives including ethanol, B-5, Bouin's, zinc formalin, and neutral buffered formalin may be used.

Refer to the "General Instructions for Immunohistochemical Staining" or the Detection System "Instructions" of IHC procedures for: (1) Principle of Procedure, (2) Materials Required, Not Supplied, (3) Storage, (4) Specimen Preparation, (5) Staining Procedure, (6) Quality Control, (7) Troubleshooting, (8) Interpretation of Staining, (9) General Limitations.

**Summary and explanation**

The EnVision+ System, HRP is a two-step IHC staining technique. This system is based on an HRP labelled polymer which is conjugated with secondary antibodies. The labelled polymer does not contain avidin or biotin. Consequently, nonspecific staining resulting from endogenous avidin-biotin activity in liver, kidney, lymphoid tissues and cryostat sections is eliminated or significantly reduced. The reagent in the Dako EnVision+, HRP is ready-to-use. This system is an extremely sensitive method and, as a result, optimal dilutions of the primary antibody are up to 20 times higher than those used for the traditional PAP technique, and several-fold greater than those used for the traditional ABC or LSAB methods. This protocol offers an enhanced signal generating system for the detection of antigens present in low concentrations or for low titer primary antibodies.

Primary antibodies produced in mouse react well with the labelled polymer. The interpretation of any positive staining or its absence should be complemented by morphological and histological studies with proper controls.

**Principles of procedure**

Any endogenous peroxidase activity is quenched by incubating the specimen with an appropriate endogenous peroxidase blocking reagent. The specimen is then incubated with an appropriately characterized and diluted mouse primary antibody, followed by incubation with the labelled polymer using two sequential 30-minute incubations. ***It should be noted that for antibodies requiring enzyme digestion or target retrieval, it may be necessary to increase incubation times of the primary antibody and labelled polymer by 5 to 10 minutes.*** Staining is completed by a 5–30 minute incubation with a suitable substrate-chromogen.

**Reagents provided**

**Code K4000**

The following material is sufficient for 150 tissue sections, based upon 100 µL per section:

Quantity	Description
----------	-------------

1 x 15 mL	<b>Labelled Polymer</b> Peroxidase labelled polymer conjugated to goat anti-mouse immunoglobulins in Tris-HCl buffer containing stabilizing protein and an anti-microbial agent.
-----------	---

**Code K4001**

The following material is sufficient for 1100 tissue sections, based upon 100 µL per section:

Quantity	Description
----------	-------------

1 x 110 mL	<b>Labelled Polymer</b> Peroxidase labelled polymer conjugated to goat anti-mouse immunoglobulins in Tris-HCl buffer containing stabilizing protein and an anti-microbial agent.
------------	---

**Materials required, but not supplied**

Absorbent wipes  
 Control tissue, positive and negative  
 Counterstain; aqueous based, such as Mayer's Hematoxylin or Lillie's Modified Mayer's Hematoxylin (code S3309)  
 Coverslips  
 Distilled Water  
 Ethanol, absolute and 95%  
 Light microscope (20x-800x)  
 Mounting media, such as Glycerol<sup>®</sup> Mounting Medium (code C0563) or Faramount, Aqueous Mounting medium, Ready-to-use (code S3025) or nonaqueous permanent mounting medium, Ultramont (code S1964)  
 Primary antibodies and negative control reagent  
 Slides, Poly-L-lysine coated or Silanized Slides (code S3003)  
 Staining jars or baths  
 Timer (capable of 3-40 minute intervals)  
 Wash bottles  
 Wash Buffer Solution  
 Xylene, toluene or xylene substitutes

**For K4000 or K4001 EnVision+, Peroxidase, the following reagents are required in addition to the above list:**

Endogenous peroxidase blocking reagent such as Peroxidase Block (code S2001)  
 Substrate-Chromogen solution such as AEC+ Substrate-Chromogen (code K3469) 110 mL, ready-to-use) or Liquid DAB+ (code S2002)

**Optional Materials Required but Not Supplied**

Ammonium hydroxide, 15 mol/L diluted to 0.037 mol/L  
 PAP Pen (code S2002)

**Precautions**

1. For professional users.
2. Do not use reagents beyond expiration date for prescribed storage method. If reagents are stored under any conditions other than those specified in the product insert, they must be validated by the user.
3. Do not substitute reagents from other lot numbers or from kits of other manufacturers.
4. Enzymes and substrate-chromogens may be affected adversely if exposed to excessive light levels. Do not store kit components or perform staining in strong light, such as direct sunlight.
5. Incubation times or temperatures other than those specified may give erroneous results; any such changes must be validated by the user.
6. As with any product derived from biological sources, proper handling procedures should be used.
7. Wear appropriate Personal Protective Equipment to avoid contact with eyes and skin.
8. Unused solution should be disposed of according to local, State and Federal regulations.

**Reagent preparation**

It is convenient to prepare the following reagents prior to staining.

**Wash Buffer Solution**

TBST, 0.05 mol/L Tris Buffered Saline with Tween (code S3006) is the recommended wash buffer for automated and manual IHC detection. TBS, 0.05 mol/L Tris buffered Saline (code S1968) and PBS, 0.02 mol/L Phosphate Buffered Saline (code S3024), are also suitable wash buffer solutions for manual staining. Wash Buffer solutions containing sodium azide are not recommended. Sodium azide will inactivate peroxidase (HRP) resulting in negative staining. Store unused buffer at 2–8°C. Discard buffer if cloudy in appearance.

Distilled water may be used for rinsing the peroxidase block, substrate and counterstain.

**Primary Antibody**

NP-Series "Plus" ready-to-use antibodies are optimized and recommended for use with Dako "Plus" high sensitivity detection systems. Concentrated antibodies are also available from Dako. Optimization of concentrated antibodies is required by the end user. Dilutions should be prepared using Antibody Diluent (code S0809), or a diluent containing 0.05 mol/L Tris-HCl buffer with 1% bovine serum albumin (BSA). Dako N-Series ready-to-use antibodies are not optimized for use with Dako "plus" detection systems. For most primary antibodies used with this kit, an incubation time of 30 minutes is sufficient.

**Negative Control Reagent**

When using Dako NP-Series "Plus" ready-to-use antibodies, Universal Negative Control+ optimized for use with mouse (code NP015) NP-Series "Plus" ready-to-use antibodies, is recommended as a negative control reagent.

Ideally, a negative control reagent contains an antibody which exhibits no specific reactivity with human tissues or normal/nonimmune serum in the same matrix/solution as the diluted primary antibody. The negative control reagent should be the same subclass and animal species as the primary antibody, diluted to the same immunoglobulin or protein concentration as the diluted primary antibody using the same diluent. The incubation period for the negative control reagent should correspond to the primary antibody.

**Counterstain**

The colored end-product of the staining reaction is alcohol soluble and should only be used with aqueous-based counterstains such as Mayer's hematoxylin or Lillie's Modified Mayer's Hematoxylin (code S3309). Follow counterstaining of hematoxylin with a thorough rinse in distilled water, then immerse tissue slides into a bath of 0.037 mol/L ammonia or similar bluing agent. 0.037 mol/L ammonia water is prepared by mixing 2.5 mL of 15 mol/L (concentrated) ammonium hydroxide with 1 liter of water.

Unused 0.037 mol/L ammonia may be stored at room temperature (20–25°C) in a tightly capped bottle for up to 12 months.

Consult manufacturers' guidelines for alternative counterstaining procedures.

**Mounting Media**

Glycergel Mounting Medium (code C0563) or Faramount, Aqueous Mounting Medium, Ready-to-use (code S3025) is recommended for aqueous mounting. Glycergel must be heated to at least 50°C just prior to use. Non-aqueous permanent mounting medium Ultramount (code S1964) may also be used.

**Storage**

EnVision+, HRP is to be stored at 2–8°C. Do not freeze. Do not use after expiration printed on reagent vials and product label.

Alteration in the appearance of any reagent, such as precipitation, may indicate instability or deterioration. In such cases, the reagent(s) is (are) not to be used.

There are no obvious signs to indicate instability of these products. Therefore, positive and negative controls should be tested simultaneously with patient specimens. If unexpected staining is observed which cannot be explained by variation in laboratory procedures and a problem with the kit is suspected, contact Dako Technical Support.

**Specimen preparation****Paraffin-embedded Tissue**

Refer to the "General Instructions for Immunohistochemical Staining" and/or the Antibody Specification Sheet.

Prior to IHC staining, tissues must be fixed and processed. Fixation prevents autolysis and putrefaction of excised tissues, preserves antigenicity, enhances the refractive index of tissue constituents and increases the resistance of cellular elements to tissue processing. Tissue processing includes dehydration, clearing of dehydrating agents, infiltration of embedding media, embedding and sectioning of tissues. The most common fixatives for IHC tissue preparations are discussed in the "General Instructions for Immunohistochemical Staining".

These are guidelines only. Optimal procedures must be determined and verified by the user. (For specific information regarding tissue fixation and processing, see references 1 and 2.)

**Staining procedure****Procedural Notes**

The user should read these instructions carefully and become familiar with the product content prior to use.

The reagent and instructions supplied have been designed for optimal performance. Further dilution of the product reagent or alteration of incubation times or temperatures may give erroneous results.

All reagents should be equilibrated to room temperature (20–25°C) prior to immunostaining. Likewise, all incubations should be performed at room temperature.

Do not allow tissue sections to dry during the staining procedure. Dried tissue sections may display increased nonspecific staining. Cover slides exposed to drafts. If prolonged incubations are used, place tissues in a humid environment.

The sensitivity of the EnVision+, HRP can be further increased by lengthening the incubation times of Steps 2 and 3 for 5-10 minutes.

**Staining Protocol****STEP 1 PEROXIDASE BLOCK**

Tap off excess buffer. Using a lintless tissue (such as Kimwipe or gauze pad), carefully wipe around the specimen to remove any remaining liquid and to keep reagent within the prescribed area.

Apply enough Peroxidase Block to cover specimen.

Incubate 5 (±1) minutes.

Rinse gently with distilled water or buffer solution from a wash bottle (do not focus flow directly on tissue) and place in a fresh buffer bath.

**STEP 2 PRIMARY ANTIBODY OR NEGATIVE CONTROL REAGENT**

Tap off excess buffer and wipe slides as before.

Apply enough optimally diluted primary antibody or negative control reagent to cover specimen.

Incubate 30 (±1) minutes.

Rinse gently with buffer solution from a wash bottle (do not focus flow directly on tissue) and place in a fresh buffer bath.

If the staining procedure must be interrupted, slides may be kept in a buffer bath following incubation

(105435-004)

302059EFG\_002 p. 3/16



of the primary antibody (Step 2) for up to one hour at room temperature (20–25 °C) without affecting the staining performance.

- STEP 3 LABELLED POLYMER-HRP ANTI-MOUSE**  
Tap off excess buffer and wipe slides as before.  
Apply enough Labelled Polymer from to cover specimen.  
Incubate 30 (±1) minutes.  
Rinse slides as in Step 2.
- STEP 4 SUBSTRATE-CHROMOGEN**  
Wipe slides as before.  
Apply enough substrate-chromogen solution to cover specimen.  
Incubate for 5-30 minutes.  
Rinse gently with distilled water from a wash bottle (do not focus flow directly on tissue).  
Collect substrate-chromogen waste in a hazardous materials container for proper disposal.
- STEP 5 HEMATOXYLIN COUNTERSTAIN (optional)**  
Immerse slides in a bath of aqueous hematoxylin (code S3309). Length of incubation depends on the strength of hematoxylin used.  
Rinse gently in a distilled water bath.  
Dip slides 10 times into a bath of 0.037 mol/L ammonia or similar bluing agent.  
Rinse slides in a bath of distilled or deionized water for 2-5 minutes.
- STEP 6 MOUNTING**  
Specimens may be mounted and coverslipped with an aqueous-based mounting medium such as GlycerGel Mounting Medium (code C0563) or Faramount (code S3025) or Non-aqueous permanent mounting medium, Ultramount (code S1964).

*Note: Slides may be read when convenient. However, some fading may occur if slides are exposed to strong light over a period of one week. To minimize fading, store slides in the dark at room temperature (20–25 °C).*

**Quality control**

Differences in tissue processing and technical procedures in the user’s laboratory may produce significant variability in results, necessitating regular performance of in-house controls in addition to the following procedures. See the quality control guidelines of the College of American Pathologists (CAP) Certification Program for Immunohistochemistry and references 3 through 5 for additional information. Refer to the specification sheet of each primary antibody used for details regarding sensitivity and immunoreactivity.

Refer to the “General Instructions for Immunohistochemical Staining” for further information on positive and negative controls.

**Staining interpretation**

Refer to the “General Instructions for Immunohistochemical Staining” for interpretation guidelines.

**Limitations**

Refer to the “General Instructions for Immunohistochemical Staining” for general limitations.

Use of old or unbuffered fixatives, or exposure of tissues to excessive heat (greater than 60 °C) during processing may result in decreased staining sensitivity.

Endogenous peroxidase or pseudoperoxidase activity can be found in hemoproteins such as hemoglobin, myoglobin, cytochrome, and catalase as well as in eosinophils.<sup>6,7</sup> This activity can be inhibited by incubating specimens with Peroxidase Block for five minutes prior to the application of the primary antibody. Blood and bone marrow smears and frozen tissues can also be treated with this reagent. However, this procedure does not abolish the reddish-brown pigment of hemoproteins. Alternately, a solution of methanol-hydrogen peroxide can be used. Some antigens may become denatured with this procedure.

Tissues from persons infected with hepatitis B virus and containing hepatitis B surface antigen (HBsAg) may exhibit nonspecific staining with horseradish peroxidase.<sup>8</sup>

Normal/nonimmune sera from the same animal source as the secondary antisera used in blocking steps may cause false-negative or false-positive results due to auto-antibodies or natural antibodies.

The reagents supplied in this kit have been optimally diluted. Further dilution may result in loss of antigen detection.

**Troubleshooting**

<i>Problem</i>	<i>Probable Cause</i>	<i>Suggested Action</i>
1. No staining of any slides.	1a. Reagents not used in proper order.  1b. Sodium azide.	1a. Review application of reagents.  1b. Use fresh azide-free buffer.
2. Weak staining of all slides.	2a. Sections retain too much solution after wash bath. 2b. Slides not incubated long enough.	2a. Gently tap off excess solution before wiping around section. 2b. Review recommended incubation times.

(105435-004)

302059EFG\_002 p. 4/16

3. Excessive background staining in all slides.	3a. Specimens contain high endogenous peroxidase activity.	3a. Use longer incubation time of peroxidase block.
	3b. Paraffin incompletely removed.	3b. Use fresh xylene or toluene baths. If several slides are stained simultaneously, the second xylene bath should contain fresh xylene.
	3c. Slides not properly rinsed.	3c. Use fresh solutions in buffer baths and wash bottles.
	3d. Faster than normal substrate reaction due to e.g. excessive room temperature.	3d. Use shorter incubation time with substrate-chromogen solution.
	3e. Sections dried during staining procedure.	3e. Use humidity chamber. Wipe only three to four slides at a time before applying reagent.
	3f. Nonspecific binding of reagents to tissue section.	3f. Apply a blocking solution containing an irrelevant protein.
	3g. Antibody too concentrated.	3g. Use higher dilution of the primary antibody.

NOTE: If the problem cannot be attributed to any of the above causes, or if the suggestive corrective action fails to resolve the problem, please call Dako Technical Support for further assistance.

Additional information on staining techniques and specimen preparation can be found in the *Handbook - Immunochemical Staining Methods*<sup>2</sup> (available from Dako), *Atlas of Immunohistochemistry*<sup>3</sup> and *Immunoperoxidase Techniques, A Practical Approach to Tumor Diagnosis*.<sup>10</sup>



**Dako**  
**Liquid DAB+ Substrate**  
**Chromogen System**

**English**

**Code K3468**

**Intended use**

For In Vitro Diagnostic Use.

This substrate-chromogen system is a high-sensitivity DAB system suitable for use in peroxidase-based immunohistochemical (IHC) and in situ hybridization (ISH) staining methods. Upon oxidation, DAB forms a brown end-product at the site of the target antigen or nucleic acid.<sup>1</sup>

Refer to Dako's *General Instructions for Immunohistochemical Staining* or the detection system instructions of IHC procedures for: 1) Principle of Procedure, 2) Materials Required, Not Supplied, 3) Storage, 4) Specimen Preparation, 5) Staining Procedure, 6) Quality Control, 7) Troubleshooting, 8) Interpretation of Staining, 9) General Limitations.

**Reagent provided**

The following materials, sufficient for preparation of 110 mL of substrate-chromogen solution, are included. This volume is sufficient for staining a minimum of 500 specimens.

Quantity	Description
1x5 mL	<b>DAB+ Chromogen</b> <b>DAB+ CHROMOGEN</b> 3,3'-diaminobenzidine in chromogen solution.
110 mL	<b>Substrate Buffer</b> <b>DAB+ SUBSTRATE BUFFER</b> Imidazole-HCl buffer, pH 7.5, containing hydrogen peroxide and an anti-microbial agent. 1x110 mL for manual staining 10x11 mL packaged for use with the Dako Autostainer.

**Precautions**

- For professional users.
- The DAB Chromogen and Substrate Buffer are sensitive to contamination from a variety of oxidizing agents such as metals, bacterial, dust and commonly used laboratory glassware. To avoid contamination and premature expiration, avoid contact of these reagents with any potential source of contamination.
- To avoid contamination, never pipette DAB Chromogen or Substrate Buffer directly from bottles. Pour out required amounts into clean containers and pipette from them. Do not return excess solutions to primary storage containers.
- Do not store the DAB components or perform staining in strong light, such as direct sunlight.
- As a general rule, persons under 18 years of age are not allowed to work with this product. Users must be carefully instructed in the proper procedure, the dangerous properties of the product and the necessary safety instructions.
- Wear appropriate Personal Protective Equipment to avoid contact with eyes and skin. Unused solution should be disposed of according to local, State, and Federal regulations.
- Safety Data Sheet available for professional users on request.

**Risk and Safety Statements**

**DAB+ Chromogen:** 1-5% Biphenyl-3,3',4,4'-tetrayltetraammonium tetrachloride / Hazard Symbol: Harmful

R40	Limited evidence of a carcinogenic effect.
R43	May cause sensitization by skin contact.
R68	Possible risk of irreversible effects.
S35	This material and its container must be disposed of in a safe way.
S36/37	Wear suitable protective clothing and gloves.

**Storage**

Store DAB Substrate-Chromogen system in original container at 2–8 °C.

There are no obvious signs to indicate instability of these products. Therefore, positive and negative controls should be tested simultaneously with patient specimens. If unexpected staining is observed which cannot be explained by variation in laboratory procedures and a problem with the kit is suspected, contact Dako Technical Support.

**Reagent preparation**

Add 1 drop (or 20 µL) of the DAB Chromogen per mL of Substrate Buffer.

Use the provided graduated tube to measure the amount of Substrate Buffer needed. Mix well and apply solution using the provided transfer pipette. After use, rinse graduated test tube and pipette thoroughly with distilled water. The prepared Substrate Working Solution (CHROM) should be stored at 2–8 °C and used within 5 days.

**Procedure**

For IHC and ISH staining, following incubation with the HRP reagent, place specimens in buffer bath. Tap off excess buffer and carefully wipe slide around specimen.

1. Cover specimen with the DAB solution. Incubate for 5–30 minutes. If desired, the incubation with the DAB Substrate-Chromogen can be carried out at higher temperatures than room temperature.
2. Rinse gently with distilled water.
3. Counterstain, if desired.
4. Coverslip with aqueous-based or permanent mounting media.

For capillary gap slide method, please observe the following recommendations:

1. There is no need to add detergents to this substrate-chromogen system to reduce surface tension.
2. Draw up the DAB Substrate-Chromogen for 20–30 seconds and blot the solution at least twice before incubating for 5–30 minutes.

**Results**

In IHC and ISH procedures, the DAB Substrate-Chromogen yields a brown reaction end-product at the site of the target antigen or nucleic acid.

For proper interpretation, positive and negative controls should accompany each staining run. Positive controls serve as indicators that specimen processing and handling were carried out correctly. Negative controls are useful for assessing nonspecific staining. Nonspecific staining, if present, is rather diffuse in appearance.

**Limitations**

Endogenous peroxidase or pseudoperoxidase activity, found in hemoproteins such as hemoglobin, myoglobin, cytochrome and catalase, as well as in eosinophils, may yield false-positive results.<sup>2,3</sup> In formalin-fixed tissue this activity can be inhibited by incubating the tissue in 3% hydrogen peroxide for five minutes prior to the application of primary antibody or probe. Blood, bone marrow smears and frozen tissue sections can be treated with Peroxidase Blocking Reagent (code S2001). However, this procedure does not abolish the reddish-brown pigment of hemoproteins. A solution of methanol-hydrogen peroxide can also be used; however, some antigens may become denatured with this procedure.

---