

DAB-kleuring voor de detectie van C3d in longweefsel

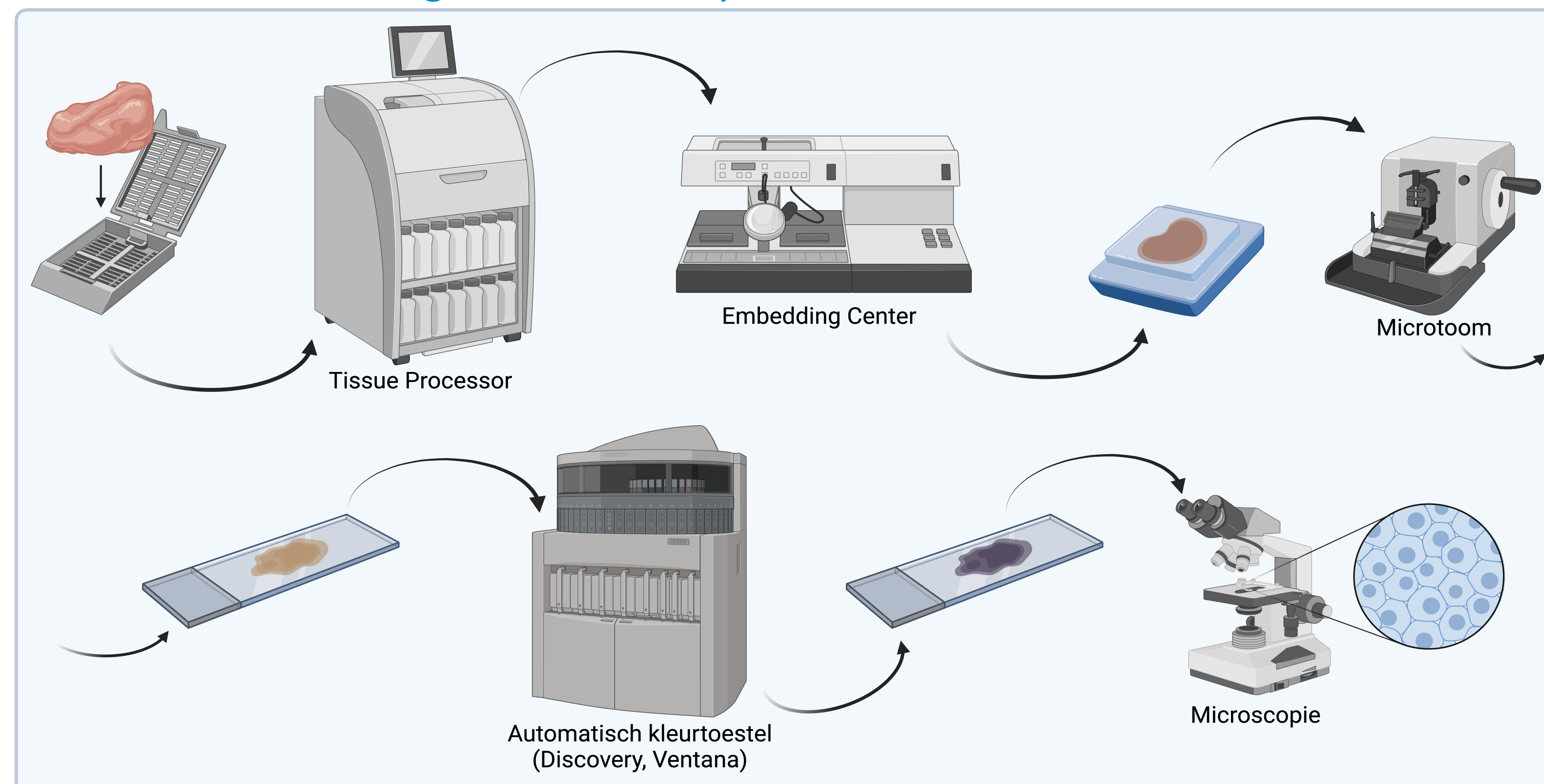
Jana Menten, Stephanie Vanheyst (stagementor), C-Path Diepenbeek

Inleiding

C3d is een proteïne dat een rol speelt in de complementactivatie van een cel. Het is een deel van de derde component van het complementsysteem (C3) en versterkt de immunoreactie op een antigen, wanneer het ermee bindt. C3d is dus het actieve deel van C3, dat ontstaat bij de activatie van het complementsysteem.

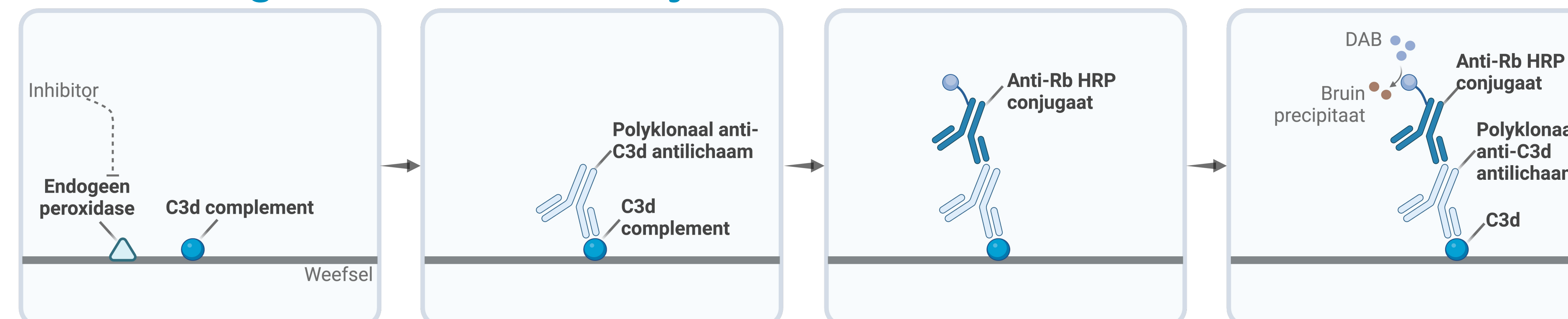
Voor dit experiment wordt een nieuw protocol opgesteld en geoptimaliseerd met een polyclonaal primair antilichaam. Er worden *Formalin-Fixed Paraffin-Embedded coupes* (FFPE) gemaakt, die gekleurd worden met een immunohistochemische kleuring (IHC). De kleuring van het longweefsel wordt automatisch uitgevoerd met de Discovery-stainer (Ventana). Voor de detectie wordt gebruik gemaakt van een primair antilichaam, een secundair antilichaam, geconjugeerd met *Horse Radish Peroxidase* (HRP), en een DAB-kit (Ventana). Om de onderliggende weefselstructuren zichtbaar te maken, wordt nog een tegenkleuring met Hematoxyline en Bluing Reagent (Ventana) uitgevoerd.

Staalflow IHC-kleuring van FFPE-coupes



Figuur 1: Staalflow voor IHC-kleuring van *Formalin-Fixed Paraffin-Embedded coupes* (FFPE-coupes); gecreërd met BioRender.com

DAB-kleuring van C3d in Discovery-stainer

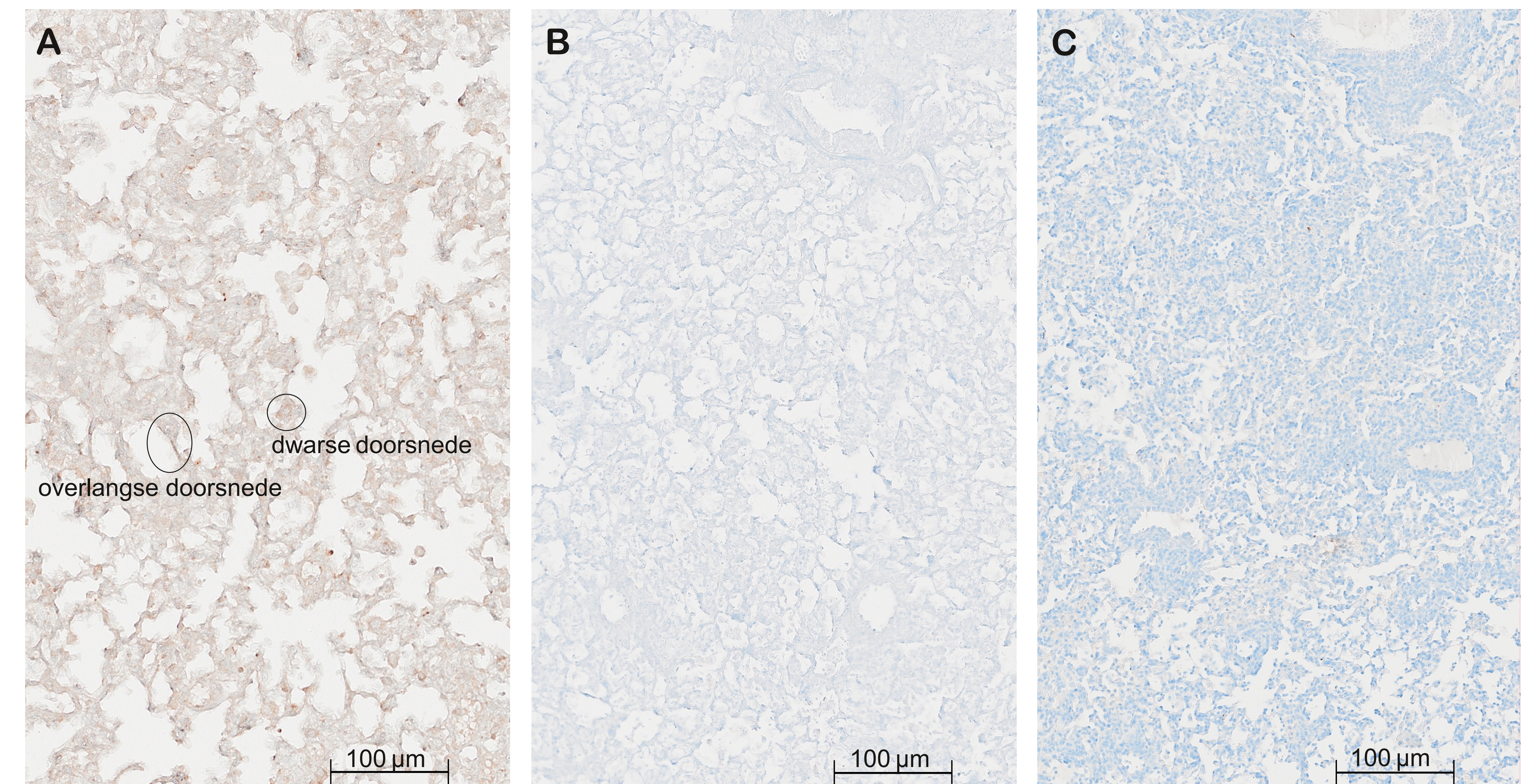


Figuur 2: Schematische voorstelling van C3d-detectie met behulp van DAB-kit (Ventana); gecreërd met BioRender.com

Aspecifieke kleuring en endogeen peroxidase wordt geïnhibeerd door Option 1, Inhibitor CM en Discovery Inhibitor (Ventana). Het primair antilichaam is een polyclonaal complement C3d fragment antilichaam. Als secundair antilichaam wordt een anti-rabbit HRP conjugaat (Ventana) gebruikt. Daarna werden de coupes gekleurd met de ChromoMap DAB-kit (Ventana). Hierbij activeert H_2O_2 het HRP-enzym, waardoor 3, 3'-diaminobenzidine (DAB) wordt omgezet in een radicaal dat met koper reageert tot een bruin reactieproduct. Als tegenkleuring wordt gebruik gemaakt van Hematoxyline en Bluing Reagent (Ventana).

Resultaten

Na het uitvoeren van verschillende testrondes, werd een succesvolle IHC-kleuring voor C3d bekomen. In afbeelding A wordt de positieve controle weergegeven. Deze vertoont duidelijk een sterk positief signaal in de alveolaire capillairen, omcirkeld in afbeelding A. Afbeelding B is de negatieve controle. We zien nog een lichte achtergrondkleuring, omdat het weefsel geïnflammeerd is en er exudaat met verschillende enzymen in aanwezig is, die de kleurstoffen absorberen. De isotype controle in afbeelding C toont ook een duidelijk negatief resultaat. Hieruit kan besloten worden dat er geen sprake is van aspecifieke binding van het primair antilichaam. De kleuring is dus kwalitatief genoeg voor beoordeling door de patholoog.



Figuur 3: Afbeeldingen van de positieve (A), negatieve (B) en isotype controle (C) met in afbeelding A C3d-positieve afzetting in alveolaire capillairen (omcirkeld)

Conclusie

Het is een bekend probleem dat het detecteren van complementfactoren met IHC in weefsel geen simpele opdracht is. Meestal wordt er gebruik gemaakt van een fluorescente kleuring voor de detectie. Hierdoor moet de optimalisatie goed doordacht worden. De alveoli in het longweefsel zijn kleine structuren, waardoor een sterk signaal moeilijk te creëren is. De concentratie antilichaam moet daarom hoog genoeg zijn. Omdat het gebruikte weefsel een inflammatoir weefsel is, is er exudaat in aanwezig dat veel enzymen bevat en daardoor de kleurstoffen absorbeert. Hierdoor ontstaat een sterke achtergrondkleuring. Om toch een sterk signaal te bekomen zonder te veel achtergrond, wordt dus een hoge concentratie antilichaam gebruikt in combinatie met een goede voorbehandeling.

Het gebruik van een hogere concentratie primair antilichaam in combinatie met een goede voorbehandeling geeft uiteindelijk toch een kleuring die geschikt is.

Referenties

1. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Basic immunology: functions and disorders of the immune system. 6de dr. Philadelphia: Elsevier; 2019.
2. Toapanta FR, Ross TM. Complement-mediated activation of the adaptive immune responses: Role of C3d in linking the innate and adaptive immunity. Immunol Res [Internet]. 2006 [gciteerd 30 april 2024];36(1-3):197-210. Beschikbaar op: <https://link.springer.com/article/10.1385/IR:36:1:197>
3. Complement C3d fragment Polyclonal Antibody (BS-4877R) [Internet]. [gciteerd 5 juni 2024]. Beschikbaar op: <https://www.thermofisher.com/antibody/product/Complement-C3d-fragment-Antibody-Polyclonal/BS-4877R>