

Dokumen nomor : CCRC-03-012-01	Tanggal :
Mengganti nomor : CCRC-02-012-00	Tanggal : 24 Maret 2009

URAIAN	DIBUAT OLEH	DIPERIKSA OLEH	DIPERIKSA OLEH	DISETUJU OLEH
Jabatan	Staf CCRC	Staf CCRC	Supervisor CCRC	Pimpinan CCRC
Paraf				
Nama	Aditya Fitriasaki	Dyaningtyas Dewi	Muthi' Ikawati	Edy Meiyanto
Tanggal	26 April 2010	26 April 2010		

PROSEDUR TETAP

PENGAMATAN EKSPRESI PROTEIN DENGAN METODE IMUNOSITOKIMIA

DAFTAR ISI

	HALAMAN
DAFTAR ISI	1
A. RIWAYAT REVISI DOKUMEN	2
B. TUJUAN	2
C. PENDAHULUAN	2
D. OPERASIONAL	3
1. Alat	3
2. Bahan	3
3. Prosedur Kerja	3
4. Analisis dan Interpretasi Data	7

Dokumen nomor : CCRC-03-012-01	Tanggal :
Mengganti nomor : CCRC-02-012-00	Tanggal : 24 Maret 2009

A. RIWAYAT REVISI DOKUMEN

No Dokumen	Tanggal	Dibuat oleh	Diperiksa oleh	Diperiksa oleh	Disetujui oleh
-		Endah P Septi Staff CCRC		Riris Istighfari J Supervisor CCRC	Edy Meiyanto Pimpinan CCRC
Isi	Menggunakan format lama Belum ada penomoran dokumen Belum ada prosedur pencatatan pada buku komunikasi harian				
No Dokumen	Tanggal	Dibuat oleh	Diperiksa oleh	Diperiksa oleh	Disetujui oleh
CCRC-02-012-00	24 Maret 2009	Aditya Fitriasari Staff CCRC	Adam Hermawan Staff CCRC	Muthi' Ikawati Supervisor CCRC	Edy Meiyanto Pimpinan CCRC
Isi	Menggunakan format baru Sudah ada penomoran dokumen Menyebutkan prosedur pencatatan pada buku komunikasi harian				
CCRC-03-012-01	26 April 2010	Aditya Fitriasari Staff CCRC	Dyaningtyas Dewi Staff CCRC	Muthi' Ikawati Supervisor CCRC	Edy Meiyanto Pimpinan CCRC
Isi	Menggunakan penomoran baru				

B. TUJUAN

Memberikan panduan secara detail dan bertahap mulai dari persiapan, pembuatan sampel, perlakuan, deteksi, dan interpretasi data hasil pengamatan ekspresi protein dengan metode imunositokimia.

C. PENDAHULUAN

Imunositokimia merupakan suatu metode yang digunakan untuk mendeteksi adanya ekspresi suatu protein spesifik atau antigen dalam sel dengan menggunakan antibodi spesifik yang akan berikatan dengan protein atau antigen.

Ada dua jenis metode imunositokimia, yaitu metode langsung dan metode tidak langsung. Pada metode langsung, antibodi yang mengikat fluoresen atau zat warna langsung berikatan dengan antigen pada sel. Sedangkan pada metode tidak langsung, antigen diikat pada antibodi primer secara langsung, kemudian ditambahkan antibodi sekunder yang mengikat enzim seperti peroksidase, alkali fosfatase, atau glukosa oksidase. Antibodi sekunder akan berikatan dengan antibodi primer. Selanjutnya ditambahkan substrat kromogen yang akan diubah oleh enzim sehingga terjadi pembentukan warna (pigmen) yang akan mewarnai sel.

Untuk menjamin antibodi agar dapat mengikat antigen, sel harus difiksasi dengan ditempelkan pada bahan pendukung padat sehingga antigen akan *immobile*. Hal ini dapat dilakukan dengan cara menumbuhkan sel pada slide mikroskop, *coverslip*, atau bahan pendukung plastik yang sesuai. Ada dua macam metode fiksasi, yaitu pelarut organik dan reagen *cross-linking*. Pelarut organik seperti alkohol dan aseton akan memindahkan lipid, mendehidrasi sel, dan mengendapkan protein. Reagen *cross-linking* seperti paraformaldehid membentuk jembatan intermolekuler melalui gugus amino bebas.

Imunositokimia melibatkan inkubasi sel dengan antibodi. Antibodi akan berikatan dengan antigen atau protein spesifik di dalam sel. Antibodi yang tidak berikatan dipisahkan dengan pencucian, sedangkan antibodi yang berikatan dideteksi secara langsung dengan antibodi primer berlabel, maupun secara tidak langsung dengan antibodi sekunder berlabel enzim atau fluoresen.

Dokumen nomor : CCRC-03-012-01	Tanggal :
Mengganti nomor : CCRC-02-012-00	Tanggal : 24 Maret 2009

D. OPERASIONAL

1. Alat

Mikropipet 20, 200, 1000 μ L
 Tabung reaksi kecil atau eppendorf
 Rak tabung kecil
 Vortex
 Cover slip
 Object glass
 24 well plate dan 6-well plate bekas/ dish bekas yang bersih.

2. Bahan

Stok sampel (10 mg) dalam eppendorf
 DMSO
 MK (DMEM/RPMI)
 PBS
 Reagen imunositokimia : Metanol, Larutan hidrogen peroksida, Novostain universal detection kit, Antibodi monoklonal primer untuk antigen yang ingin diamati (misal COX 2/VEGF/dll), Xylo, Mounting media

3. Penanaman Sel

No.	Pekerjaan	Perhatian
2.	Ambil sel dari inkubator CO ₂ , amati kondisi sel.	Gunakan kultur sel dalam kondisi 70-80% konfluen untuk dipanen.
3.	Lakukan panen sel sesuai Protokol Panen Sel .	-
4.	Lakukan perhitungan sel sesuai Protokol Perhitungan Sel	<ul style="list-style-type: none"> • Jumlah sel yang dibutuhkan untuk uji apoptosis dengan metode double staining adalah 5×10^4 sel/sumuran. • Membuat suspensi sel 5×10^4 sel masing-masing 1000 μl/sumuran.
6.	Siapkan 24 well plate dan cover slip.	-
5.	Masukkan cover slip ke dalam sumuran menggunakan pinset dengan hati-hati.	Setiap penggunaan coverslip, tulis di Kartu stock CCRC
6.	Transfer 200 μ l suspensi sel tepat di atas coverslip secara merata dan perlahan, kemudian diamkan selama 3-30 menit dalam inkubator agar sel menempel pada coverslip.	<ul style="list-style-type: none"> • Setiap akan mengisi sumuran, resuspensi sel kembali. • Pastikan sel sudah menempel pada coverslip dengan mikroskop inverted
7.	Tambahkan 800 μ l MK ke dalam sumuran secara perlahan.	-
8.	Amati keadaan sel di mikroskop untuk melihat distribusi sel.	-
11.	Jika dalam waktu semalam kondisi sel belum pulih, ganti media sel (MK) dan inkubasikan kembali.	Selalu amati kondisi sel sebelum perlakuan.

Dokumen nomor : CCRC-03-012-01	Tanggal :
Mengganti nomor : CCRC-02-012-00	Tanggal : 24 Maret 2009

4. Perlakuan Imunositokimia Sampel pada Sel

1.	Setelah sel normal kembali, segera buat satu konsentrasi sampel, yaitu pada IC ₅₀ untuk perlakuan sebanyak 1000 µl.	<ul style="list-style-type: none"> • Untuk imunositokimia, minimal diperlukan 3 perlakuan: <ol style="list-style-type: none"> a. Perlakuan dengan sampel. b. Kontrol sel tanpa antibodi primer (akan menunjukkan warna biru). c. Kontrol sel dengan antibodi primer. • Kontrol sel hanya ditambah MK.
2.	Ambil <i>24 well plate</i> yang telah berisi sel dari inkubator CO ₂ .	-
3.	Buang semua MK dari sumuran dengan pipet Pasteur secara perlahan-lahan.	-
4.	Isikan PBS masing-masing 500 µL ke dalam sumuran untuk mencuci sel.	-
5.	Buang PBS dari sumuran dengan pipet Pasteur secara perlahan-lahan.	-
6.	Masukkan sampel sebanyak 1000 µL ke dalam sumuran	-
7.	Masukkan 1000 µL MK untuk kontrol sel (2 kontrol sel).	-
8.	Inkubasi di dalam inkubator CO ₂	Lama inkubasi sel tergantung dari protein yang akan diamati
9.	Amati kondisi sel sebelum difiksasi	Dokumentasikan dengan kamera.
10.	Siapkan metanol dingin dan PBS.	
11.	Inkubasi sel dihentikan.	Pekerjaan selanjutnya, tidak perlu di dalam LAF.
12.	Buang semua media dari sumuran dengan pipet Pasteur secara perlahan.	-
13.	Isikan PBS 500 µl ke dalam masing-masing sumuran secara perlahan untuk mencuci sel.	-
14.	Buang PBS dari sumuran dengan pipet Pasteur secara perlahan.	-
15.	Ambil <i>cover slip</i> menggunakan pinset dengan bantuan ujung jarum dengan hati-hati.	-
16.	Letakkan di dalam sumuran <i>6-well plate</i> bekas atau dish bekas yang bersih.	-

Dokumen nomor : CCRC-03-012-01	Tanggal :
Mengganti nomor : CCRC-02-012-00	Tanggal : 24 Maret 2009

17	Beri label pada masing-masing sumuran perlakuan.	Jangan sampai tertukar penandaannya.
18	Teteskan 300 µl metanol dingin, inkubasi 10 menit di dalam <i>freezer</i> .	-
19	Buang metanol secara perlahan, jangan sampai <i>cover slip</i> terbalik.	Jika pengecatan akan dilanjutkan pada hari berikutnya, simpan <i>cover slip</i> di dalam <i>freezer</i> .
20	Tambahkan 500 µl PBS pada <i>cover slip</i> , diamkan selama 5 menit. Ambil dan buang PBS dengan mikropipet 1000 µl.	Lakukan pencucian dengan PBS sebanyak 2 kali. Proses ini dilakukan untuk mencuci sel dari sisa metanol.
21	Tambahkan 500 µl akuades, diamkan selama 5 menit. Buang akuades.	Lakukan pencucian dengan akuades 2 kali. Proses ini dilakukan untuk mencuci sel.
22	Teteskan larutan hidrogen peroksida (<i>blocking solution</i>). Inkubasi selama 10 menit. Buang larutan dengan mikropipet.	Proses ini dilakukan untuk mengurangi pengecatan yang tidak spesifik karena adanya peroksidase endogen.
23	Teteskan <i>prediluted blocking serum</i> . Inkubasi selama 10 menit. Buang larutan.	Proses ini dilakukan untuk mencegah pengecatan yang tidak spesifik.
24	Teteskan antibodi monoklonal primer untuk antigen yang ingin diamati	Lama inkubasi antibodi primer tergantung pada antibodi yang digunakan Jika diinkubasi overnight, simpan sampel dalam keadaan lembab dan disimpan dalam suhu 20°C
25	Tambahkan 500 µl PBS. Inkubasi selama 5 menit. Buang PBS.	-
26	Teteskan antibodi sekunder yang dilabel biotin (<i>biotinylated universal secondary antibody</i>), inkubasi selama 10 menit.	-
27	Tambahkan 500 µl PBS. Inkubasi selama 5 menit. Buang PBS.	-
28	Teteskan reagen yang berisi kompleks streptavidin-enzim peroksidase, inkubasi selama 10 menit.	-
29	Tambahkan 500 µl PBS. Inkubasi selama 5 menit. Buang PBS.	-
30	Teteskan larutan substrat kromogen DAB, inkubasi selama 10 menit.	-
31	Tambahkan akuades 500 µl, kemudian buang kembali.	-

Dokumen nomor : CCRC-03-012-01	Tanggal :
Mengganti nomor : CCRC-02-012-00	Tanggal : 24 Maret 2009

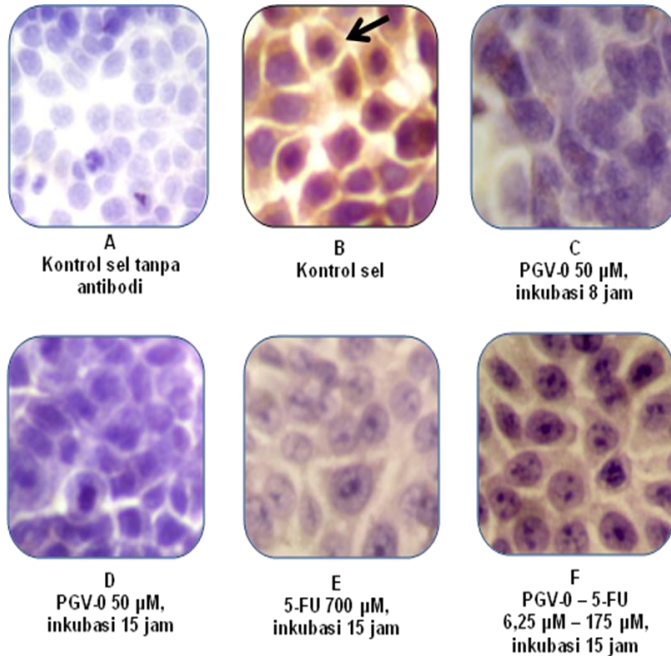
32	Teteskan larutan MayeHaematoxylin, inkubasi selama 3 menit.	Proses ini dilakukan untuk <i>counterstain</i> .
33	Tambahkan akuades 500 μ l, kemudian buang kembali.	-
34	Angkat <i>cover slip</i> dengan pinset secara hati-hati, kemudian celupkan dalam xylol.	-
35	Celupkan <i>cover slip</i> dalam alkohol. Keringkan <i>cover slip</i> .	-
36	Letakkan <i>cover slip</i> di atas <i>object glass</i> , tetesi dengan lem (<i>mounting media</i>). Tutup <i>cover slip</i> dengan <i>cover slip</i> kotak.	-
37	Amati ekspresi protein dengan mikroskop cahaya.	-
38.	Setiap selesai melakukan pekerjaan, lakukan sanitasi seperti pada Protokol Persiapan Kerja In Vitro di Laboratorium.	-

Dokumen nomor : CCRC-03-012-01	Tanggal :
Mengganti nomor : CCRC-02-012-00	Tanggal : 24 Maret 2009

5. Interpretasi Data

1. Ekspresi protein tertentu (misal COX-2) akan ditunjukkan dengan warna coklat pada sitoplasma (bukan inti sel). Warna biru pada sitoplasma menunjukkan tidak adanya ekspresi pada sel atau level ekspresi yang rendah sehingga tidak terdeteksi.

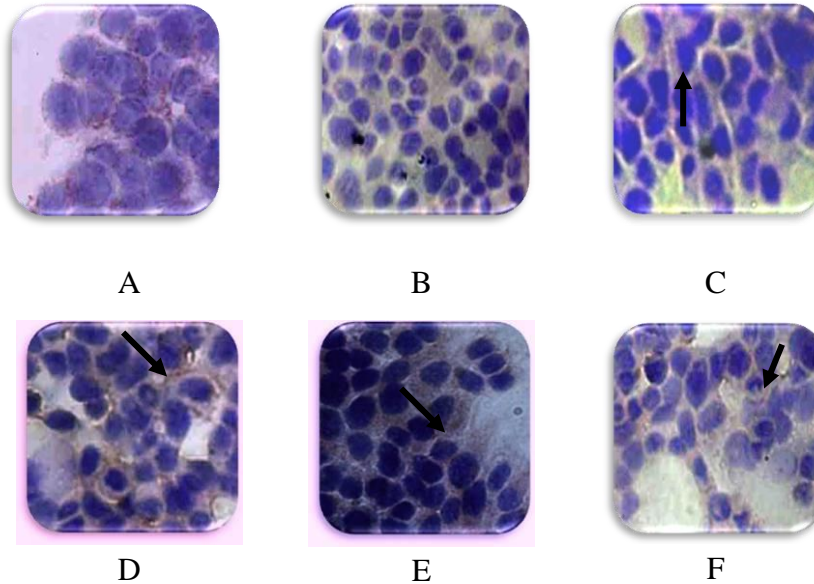
Contoh hasil pengamatan ekspresi protein COX-2 pada sel WiDr setelah perlakuan PGV-0 dan 5-FU :



Efek perlakuan PGV-0, 5-FU, dan kombinasi keduanya terhadap ekspresi COX-2 sel WiDr. Kontrol sel tanpa penambahan antibodi primer anti-COX-2 menunjukkan warna biru muda pada sitoplasma (A). Kontrol sel WiDr dengan pengecatan antibodi primer anti-COX-2 memperlihatkan ekspresi COX-2 yang tinggi yang terlihat dari sitoplasma yang berwarna coklat tua (ditunjukkan dengan tanda panah) (B). Perlakuan PGV-0 50 µM memberikan penurunan ekspresi COX-2 yang signifikan, baik pada waktu inkubasi 8 jam (C) maupun inkubasi 15 jam (D). Pengamatan dilakukan di bawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x.

Dokumen nomor : CCRC-03-012-01	Tanggal :
Mengganti nomor : CCRC-02-012-00	Tanggal : 24 Maret 2009

2. Mengetahui lokalisasi protein tertentu. Ekspresi protein tertentu (misal Pgp) akan ditunjukkan dengan warna coklat pada membran plasma. namun jika terdapat pada sitoplasma menunjukkan bahwa perlakuan x mampu menghambat lokalisasi Pgp dari inti sel menuju membran plasma.



P-gp expression on MCF-7/DOX cells after treatment of NAR, DOX and its combination. MCF-7/DOX cells (5×10^4 cells/well) were seeded on coverslips in 24-well plate and 24 h after plating, the cells were treated with agents for 18 h. A. MCF-7 WT, B. Without anti-P-gp, C. Vehicle, D. DOX, E. NAR, F. NAR-DOX Cells expressed P-gp showed brown color in cytoplasm. Original magnification was 400x.

Jika ada sesuatu dalam SOP ini tidak bisa dilakukan atau tidak sesuai dengan kenyataan di lapangan, segera laporkan kepada Staff/Supervisor CCRC