|  |  |
| --- | --- |
| OUS_logo_RGB_HighRes | Vedlegg til: Standard monolayerpreparering av 50 µm paraffinsnitt  Dok ID: 135303 |
|  |  |

**KORT PROTOKOLL FOR MONOLAYERPREPARERING**

1. Tilsett 4 ml xylen, inkuber i 15 minutter. Fjern xylenen.
2. Tilsett 4 ml xylen, inkuber i 15 minutter. Fjern xylene.
3. Tilsett 4 ml absolutt etanol, inkuber i 5 minutter. Fjern etanolen.
4. Tilsett 4 ml 96% etanol, inkuber i 5 minutter.
5. Tilsett 2 ml destillert H2O, inkuber i 2 minutter.
6. Tilsett 2 ml destillert H2O, overfør prøven fra dramsglass til sentrifugerør.
7. Sentrifuger ved 1500 rpm i 10 minutter. Fjern supernatanten.
8. Tilsett 8 ml PBS. Vær påpasselig med at vevet ikke flyter på toppen av væsken. Sentrifuger ved 1500 rpm i 10 minutter. Fjern supernatanten.
9. Tilsett 1 ml 0.5 mg/ml proteaseløsning sammen med 1-2 magneter.

Proteaseløsningen kan lages ved å veie opp tilstrekkelig protease i mg og deretter tilsette «2 ganger volumet» med PBS. For eksempel veies opp 5.6 mg protease, + 11.2 ml PBS.

Plassér prøven i stativ på magnetrører ved maks hastighet i 60 – 75 minutter avhengig av type vev (graviditetsprodukter – 60 min, andre vev 75 min). Vurdér om vevet er godt nok løst, - hvis ikke kan det behandles noen minutter til.

1. Tilsett 8 ml kald PBS og filtrer prøven gjennom et 60 µm nylonmesh filter
2. Sentrifuger ved 2500 rpm i 20 minutter. Fjern supernatanten.
3. Tilsett 0,5 – 3 ml PBS til kjernepelleten, eller så mye løsning som man erfaringsvis trenger.
4. For å lage monolayere, pipetteres kjernesuspensjon i prøvekamrene i cytospinnkyvetten. Start med 100 µl. Deretter tilpasses volumet (maksvolum i kyvettene er 500 µl).
5. Sett monolayerene i formalin til neste dag.