BIOZOL

Diagnostica Vertrieb GmbH, Oehleckerring 11-13

22419 Hamburg, Germany

Telephone: +49 (0)89 3799666-6 | **Fax:** +49 (0)89 3799666-99

E-Mail: info@biozol.de

Immunhistochemie (IHC)

IHC-Protokoll mit Proteinase K basierter Antigengewinnung

Gewebesektionierung, Deparaffinierung und Rehydrierung

1. Paraffinblöcke mit dem Mikrotom in 4-Mikron-Schnitte schneiden und auf geladene Objektträger legen (Fisher, ProbeOn, Kat. #22230900).
2. Objektträger in einem Gewebetrockenofen 45 Minuten lang bei 60°C erhitzen.
3. Waschen Sie die Objektträger 3x in Xylol für jeweils 5 Minuten bei Raumtemperatur.
4. Objektträger 3x mit 100%igem Alkohol jeweils 3 Minuten lang bei Raumtemperatur waschen.
5. Objektträger 2x mit 95%igem Alkohol jeweils 3 Minuten bei Raumtemperatur waschen.
6. Waschen der Objektträger in 80%igem Alkohol für 3 Minuten bei Raumtemperatur.
7. Objektträger 5 Minuten lang in fließendem destilliertem Wasser bei Raumtemperatur spülen.

Die folgenden Schritte sind bei Raumtemperatur durchzuführen. Die Gewebe zu keinem Zeitpunkt während des Färbevorgangs trocknen lassen.

Antigen-Entnahme

1. Objektträger in 1X TBS mit Tween (TBST) 1 Minute lang spülen.
2. Eine Arbeitslösung von Proteinase K (DAKO, Kat. #S3020) auf die Objektträger auftragen und 10 Minuten inkubieren.
3. Die Objektträger 1 Minute lang mit 1X TBST spülen.

Immunfärbung mit dem AP-Vektorrot-Nachweissystem

1. Universal Protein Block (DAKO, Kat. #X0909) auf die Objektträger auftragen und 20 Minuten inkubieren.

2. Proteinblock von den Objektträgern ablaufen lassen.
3. Verdünnten Primärantikörper auf die Objektträger auftragen und 45 Minuten inkubieren.
4. Objektträger 1 Minute lang mit 1X TBST spülen und inkubieren.
5. Einen biotinylierten Sekundärantikörper auf die Objektträger (spezifisch für den Wirt des Primärantikörpers) auftragen und 30 Minuten inkubieren.
6. Die Objektträger 1 Minute lang mit 1X TBST spülen.
7. Alkalische Phosphatase Streptavidin (Vektor, Kat. #VEC-AK-5000) auf die Objektträger auftragen und 30 Minuten inkubieren.
8. Die Objektträger 1 Minute lang mit 1X TBST spülen.
9. Alkalisches Phosphatase-Chromogen-Substrat (Vektor, Kat. #VEC-AK-5000) auf die Objektträger auftragen und 30 Minuten inkubieren.
10. Die Objektträger 1 Minute lang in destilliertem Wasser waschen.

Immunfärbung mit dem HRP-DAB-Nachweissystem

1. Peroxidase-Block (3% Wasserstoffperoxid) auf die Objektträger auftragen und 5 Minuten inkubieren.
2. Objektträger 1 Minute lang mit 1X TBST spülen.
3. Universal Protein Block (DAKO, Kat. #X0909) auf die Objektträger auftragen und 20 Minuten inkubieren.
4. Proteinblock von den Objektträgern ablaufen lassen.
5. Primärantikörper auf die Objektträger auftragen und 45 Minuten inkubieren.
6. Objektträger 1 Minute lang mit 1X TBST spülen.
7. LSAB2 System-HRP LINK-Lösung (DAKO, Kat. #K0679) auf die Objektträger auftragen und 15 Minuten inkubieren.
8. Die Objektträger 1 Minute lang mit 1X TBST spülen.
9. LSAB2 System-HRP Streptavidin-HRP Lösung (DAKO, Kat. #K0679) auf die Objektträger auftragen und 10 Minuten inkubieren.
10. Die Objektträger 1 Minute lang in 1X TBST spülen.
11. Vorbereitete DAB-Substrat-Chromogen-Lösung (DAKO, Kat. #K3468) auf die Objektträger auftragen und 5 Minuten inkubieren.
12. Die Objektträger 1 Minute lang mit 1X TBST spülen.

Gegenfärbung mit Hämatoxylin

Färbung der Objektträger mit 65% Harris' Hämatoxylin für 1 Minute. Hämatoxylin färbt Nukleinsäuren (Kerne) tief blau-violett.

Dehydrierung und Deckfärbung

Diese Methode sollte nur angewendet werden, wenn das verwendete Chromogensubstrat alkoholunlöslich ist (z.B. Vektorrot oder DAB).

1. Waschen Sie die Objektträger in 2 Wechseln mit 80% Alkohol jeweils 1 Minute lang.
2. Waschen Sie die Objektträger in 2 Wechseln mit jeweils 95% Alkohol für jeweils 1 Minute.
3. Waschen der Objektträger in 3 Wechseln mit jeweils 100% Alkohol für jeweils 1 Minute.
4. Waschen der Objektträger nach 3 xylenen Wechseln für jeweils 1 Minute.
5. Deckgläser mit einem Tropfen eines permanenten Rahmungsmediums auftragen.