

## P84 Immunhistochemie – Färbeprotokoll

### Waschpuffer:

1 x PBS oder  
1 x TBS

### Citratpuffer

0,1 M Citronensäure Monohydrat (= 5,25g/250 ml) = Stammlsg. A

0,1 M Na-citrat (= 14,71 g/500 ml) = Stammlsg. B

(die Stammlösungen sind bei 4 °C haltbar)

Gebrauchslösung: 9 ml Stamm A + 41 ml Stamm B + 450 ml A.dest, pH 6,0 einstellen

### EDTA-Puffer

1 mM EDTA (= 0,37 g/1000 ml) , pH 8,0

### Kits

- **SuperSensitive™ Link-Label IHC Detection System** Biogenex (#QP900-9L)
- **Liquid DAB+ Substrate Chromogen System** DAKO (#K348)

### Stammlösungen

2,5% Trypsin (10x) Gibco #15090-046

### Arbeitsvorgang:

- 1) Entparaffinieren bis zum A.dest.
- 2) Antigen Retrieval
  - a) ohne Epitop-Demaskierung : bei 4) weiter
  - b) mit Epitop-Demaskierung enzymatisch : Inkubation mit 0,1% Trypsin (vorgewärmt auf 37°C) für 10 Minuten, Reaktion in A.dest abstoppen
  - c) mit Epitop-Demaskierung Mikowelle (Citrat- oder EDTA-Puffer) □ im „Milestone Microwave Vacuum Histoprocessor“ mit dem jeweiligen Puffer (Programm: GPR 100 C), abkühlen auf RT ca. 20 min
- 3) 3 x 5 min waschen in A.dest
- 4) 10 min 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zum Blocken endogener Peroxidase
- 5) 3 x 5 min waschen in A.dest
- 6) 1 h RT Blocken mit 5 % Normal Goat Serum (NGS) angesetzt im jeweiligen Waschpuffer
- 7) Primärantikörper in der jeweiligen Verdünnung, angesetzt in 5 % NGS/Waschpuffer, bei 4 °C ÜN
- 8) 3 x 5 min waschen im jeweiligen Waschpuffer

- 9) 20 min RT Link Antikörper (BioGenex)
- 10) 3 x 5 min waschen im jeweiligen Waschpuffer
- 11) 20 min RT Streptavidin Peroxidase (BioGenex)
- 12) 3 x 5 min waschen im jeweiligen Waschpuffer
- 13) 1 Tropfen DAB Substrat 1-5 min (Mikroskop Kontrolle!)
- 14) Abstoppen in A.dest
- 15) Gegenfärbung in Hämatoxylin (vorher filtrieren!) 5-10 sec
- 16) 1-2 min bläuen in warmem Leitungswasser
- 17) 1 x kurz 70 % Alkohol
- 18) 2 x kurz 96 % Alkohol
- 19) 2 x 1-2 min 100 % Alkohol
- 20) 2 x 3-5 min Xylol
- 21) Eindecken in DPX-Mount

### **Bemerkungen**

Welcher Puffer zum Antigen Retrieval und Waschen zur Anwendung kommt, muss, falls im Datenblatt des Primärantikörpers nicht angegeben, zunächst getestet werden!

Antigen-Retrieval: falls keine Informationen darüber vorliegen, ohne Demaskierung mit Schritt 4 beginnen. Alle Methoden der Demaskierung beeinträchtigen die Qualität des Präparates. Falls keine positive Reaktion erfolgt, zuerst b) durchführen, dann c).

Zusammenpipettiertes DAB-Substrat nur 14 Tage bei 4°C haltbar!

Das Trypsin wird jedes Mal frisch angesetzt!