

# Immunhistochemische Färbung

## Versican (H-56): sc-25831 rabbit

1. Vor dem Wegfrieren Fixierung der Schnitte: **8 min** in **vorgekühltem** Aceton ( 4°C )
2. Auftauen der Gefrierschnitte: mind. **30 min bei RT** trocknen lassen
3. Schnitte mit **Fettstift** umranden
4. Peroxidaseblock: **5min** mit **0,5%igem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**
5. **2 x 5min** in PBS waschen
6. Blocken der unspez. Bindungsstellen mit **2% FCS, 1% Goatserum** (beides hitzeinaktiviert: 30 min bei 56°C) **in PBS 20 min** bei RT
7. **2 x 1 min** in PBS spülen
8. Schnitte mit Kleenex rundherum abwischen und sofort in feuchte Kammer legen
9. Avidin / Biotin-Blocking :
  - **200 µl** Lösung A auf Schnitte tropfen, **15 min** bei RT in feuchter Kammer
  - **2 x 1 min** in PBS waschen
  - **200 µl** Lösung B auf Schnitte tropfen und **15 min** inkubieren
  - **2 x 1 min** in PBS waschen
  - **1 x 2 min** in Gelatine-Waschlösung waschen
10. 1. AK mit Blocking Solution verdünnt (siehe Punkt 6): **VD 1:100** ca. 100 µl/Schnitt; Inkubation über Nacht bei 4°C in feuchter Kammer  
negativ Ko: **1 x PBS** statt 1. AK, **1 x ISO-Typ** statt 1.AK
9. **3 x 4 min** in PBS waschen, abtupfen
- 10.2. AK (**VD 1:1000**) draufpipettieren  
**45 min** bei RT in feuchter Kammer
11. ABC-Komplex herstellen:  
10 µl von A in 1000 µl PBS, mischen, 10 µl von B dazu, wieder gut mischen und 30 min stehen lassen
12. **3 x 4 min** in PBS waschen
13. Vorbereitetes ABC-Reagenz draufpipettieren, 200µl/Schnitt  
**45 min** bei RT in feuchter Kammer
14. AEC-Lösung vorbereiten:  
100 ml 0.1 M Acetat Puffer + 5 ml AEC-Stock, lichtgeschützt filtrieren! Stop-Lsg!  
kurz vor Gebrauch 50µl 30%iges H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dazugeben
15. **3 x 4 min** in PBS und **3 min** in **Acetat-Puffer** waschen
16. Schnitte in AEC-Lösung entwickeln, ab 3 min unter Kontrolle (Mikroskop)
17. Reaktion stoppen: Schnitte **4 min in Formaldehyd-Acetat** geben
18. **3 x 1 min** in **A.d.** waschen
19. ca. **30 sek** Gegenfärbung mit filtriertem **Gill's Hematoxin**

20. 1-2 waschen in Leitungswasser (3-4 x wechseln oder fließend) = **Bläuen** (ca.10 min)
21. spülen in A.d. (1-2 x wechseln)
22. Schnitte rasch eindecken mit Aquatex oder anderem wässrigen Eindeckmittel

**ISO-Typ-Kontrolle:**

statt 1. AK, gleiche Subklasse zB IgG2b in gleicher Konzentration wie 1.AK!

**Gelatine-Waschlsg:**

3 Teile PBS, 1 Teil von 0.8% Gelatine in A.d. ( aufkochen!)

**Gill`s Hematoxin:**

2 Teile Gills No.3 Hematoxin mit 1 Teil A.d. mischen, bei RT lagern. wiederverwendbar, vor jeden Gebrauch filtern

**AEC-Stock herstellen:**

6 Tabletten v. AEC (Fa. Sigma A-6926) in 30 ml n`n`-Dimethylformamide (FLOW!)

**Acetat-Puffer ( 0.1 M. pH 5.2 ):**

100 ml Essigsäure (23 ml v. Essigsäure in 2 l A.d.)  
300 ml Na acetate 0.2 M ( 54.43g Na acetate/ 2l A.d.)  
400 ml A.d.

**Stop-Lösung Formaldehyd-Acetat:**

90 ml Acetat-Puffer ( 0,1 M ) + 10 ml von 37% Formaldehyd

**Avidin/Biotin Blocking Kit:** Fa. Vector SP-2001

**ABC-Kit** Vecatstain Elite PK-6100

**Aquatex Eindeckmedium** Merck 1.08562 50ml