

Protokoll Immunhistochemie für anti-human Prox-1 (Cat# 102-PA32, RELIA Tech GmbH)
(AG Funkt. Anatomie, Prof. Gasse / PD Dr. C. Staszuk)

1. Tag:

- 2 x 5min Xylol
- 5min Isopropanol
- 5min 96% EtOH
- 5min 70% EtOH
- 5min 50% EtOH
- 5min 20% EtOH
- Aqua dest

- für 20' Objektträger in kochenden Citratpuffer (pH 6) im kochenden Wasserbad einstellen,
- anschließend ca. 20' abkühlen lassen
- einspannen in Cover plates
- 3 x 5min spülen mit Tris-Puffer
- 10min Pepsin¹ bei 37°C (je 200 µl)
- 3 x 5min spülen mit Tris-Puffer
- 10min Peroxidase-Block (10% H₂O₂ in MeOH)
- 3 x 5min spülen mit Tris-Puffer
- 30min normales Ziegsenserum² RT (je 2Tr.)
- Primärantikörper – über Nacht im Kühlschrank
[Antikörperverdünnung: 1:400 (in Aqua bidest)]

2. Tag:

- 3 x 5min spülen mit Tris-Puffer
- 20min Sekundär-Brücken-Antikörper – Link³
- 3 x 5min spülen mit Tris-Puffer
- 20min Streptavidin – Peroxidase – Label³
- 3 x 5min spülen mit Tris-Puffer
- 5min Inkubation mit DAB⁴
- Aqua dest
- 10sec Toluidinblau; Aqua dest; 80 % Alkohol; aufsteigende Reihe – Eindecken mit DePeX⁵

Reagenzien

¹ Pro Taqs Pepsin Digest (Acetic) Quartett Immundiagnostika und Biotechnologie GmbH, Berlin)

² Proteinblock, Normal goat serum, BioGenex

³ Super Sensitive Link-Label ICH Detection System, BioGenex

⁴ Liquid DAB , BioGenex

⁵ DePeX: Serva 18243

Puffer:

Tris-Puffer: 6,1g Trizma Base, 37ml 1N HCl, 8g NaCl, 0,1ml Tween 20 (0,01%)
ad 1000ml Aqua dest, pH 7,6 (+/-0,2 einstellen)

Citrat-Puffer: Stammlösung A: 0,1M Zitronensäure
Stammlösung B: 0,1M Natriumcitrat
Gebrauchslösung: 18ml Lösung A + 82ml Lösung B
ad 1000ml Aqua dest; pH auf 6 einstellen