

Anti-human Podoplanin (Cat# 101-M40) for formalin-fixed paraffin-embedded sections

- 1) Paraffinschnitte (2-4 µm) auf Poly-Lysin-Objektträger
- 2) Entparaffinieren: - Xylol (10 min)
 - Aceton (10 min)
 - Aceton /Puffergemisch (10 min)
 - 3 x spülen mit Waschlösung
- 3) Mikrowelle: 3 x 10 min in entsprechenden Puffer aufkochen (Gesamte Glasküvette in Mikrowelle stellen)
 - a) EDTA-Puffer: 0,1 M EDTA in aqua dest, pH 8,0
 - b) Citrat-Puffer/10 mM, pH 6,0
 - A: Zitronensäure, 19,2 g auf 1L aqua dest
 - B: Na-Citrat, 29,41 g auf 1L aqua dest

9 ml Stammlösung A + 50 ml Stammlösung B, auf 500 ml mit aqua dest auffüllen
(pH-Einstellung nur mit Lsg. B)

 - dann Schnitte für 25 min im Waschlösung auf RT abkühlen
(für CRLR-Ak: Citrat-Puffer besser!)
- 4) Zugabe des Primär-Aks (wird im fertigen Puffer von DAKO verdünnt (S3022))
 - Schnitte kurz auf Papier abtropfen lassen (3-4 Schnitte auf einmal herausnehmen)
 - Flüssigkeit um Schnitte herum abwischen
 - Zugabe des Primär-Aks
 - Inkubation ½ h RT
 - 3 x spülen mit Waschlösung
 - Schnitte kurz abtropfen lassen etc.
- 5) Zugabe des Überbrückungs-.AK (Monoklonaler Maus anti-Kaninchen-IgG)
Code-Nr. M 0737 1: 250
 - 1/2h RT
 - 3 x spülen mit Waschlösung
 - Schnitte kurz abtropfen lassen etc.
- 6) Zugabe des Anti-Maus-IgG vom Kaninchen 1:
Inkubation 1/2h RT
 - 3 x spülen mit Waschlösung
 - Schnitte kurz abtropfen lassen etc.
- 7) Zugabe des APAAP-Komplexes
Inkubation 1/2h RT
 - 3 x spülen mit Waschlösung
 - Schnitte kurz abtropfen lassen etc.
- 8) Zugabe des Chromogens (NaphtholAS-MXPhosphat plus FastredTR-Salz)(Ansetzen des Chromogens, s. Extrazettel)
 - Inkubation 25 min RT

- 3 x spülen mit Waschpuffer
 - Schnitte kurz abtropfen lassen etc.
- (6,7,8 Kit von DAKO: Universal-DAKO APAAP Kit Maus)**
- Gegenfärbung: Hämalaun
 - 45 sec
 - 3 x 5 min in lauwarmen Leitungswasser
 - 1 x 5 min in dest. H₂O

9) Eindecken der Schnitte in Glycergel (DAKO) /muß in heißes Wasserbad gestellt werden

- nach jedem Schritt können Schnitte in Puffer stehen gelassen werden

Waschpuffer: Ansatz für 40 L

351g NaCl

274g Tris-HCL

36g Tris-Base