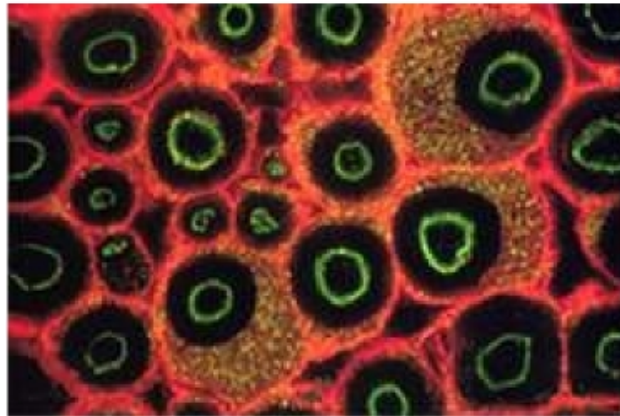


Immunologie: Sekundärantikörper

Die häufigsten Fragen zu Sekundärantikörpern aus dem Bereich
„Immunhistochemie und Immunfluoreszenz“



Welche Fluoreszenzfarben leuchten wie?

Markierung		Absorption	Emission	Farbe
Cy2	Carbocyanin	490 nm	508 nm	Grün
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat	492 nm	520 nm	Grün
Cy3	Indocarbocyanin	550 nm	570 nm	Rot
TRITC	Tetramethyl Rhodamin-Isothiocyanat	550 nm	570 nm	Rot
RRX	Rhodamin RedX	570 nm	590 nm	Rot
TRSC	Tetramethyl Rhodamin-Sulfonylchlorid	596 nm	620 nm	Rot
Cy5	Indodicarbocyanin	650 nm	670 nm	Infrarot
AMCA	Aminomethylcoumarin-Acetat	350 nm	450 nm	Blau

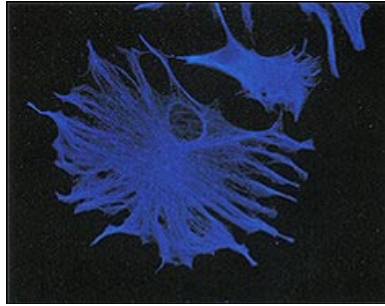
Welche "anti-Fading" Reagenzien empfiehlt dianova beim Einsatz von FITC-Konjugaten:

- § P-Phenylenediamine
- § N-Propyl Gallate
- § DABCO

Die "anti-Fading" Reagenzien lassen sich mit handelsüblichen Eindeckmedien kombinieren.

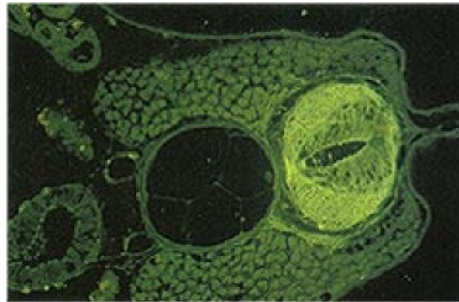
Welche „anti-Fading“ Reagenzien empfiehlt dianova beim Einsatz von Cy-Konjugaten

Obwohl Anti-Fading Agenzien zur Visualisierung von Cyanin-Konjugaten in der Epifluoreszenzmikroskopie normalerweise nicht erforderlich sind, sollten sie in der konfokalen Laserscanningmikroskopie (CLSM) zu wässrigen Eindeckmedien hinzugefügt werden. Aber Vorsicht: es ist wichtig, den Gebrauch von Mountingmedien, die aromatische Amine enthalten, wie z.B. p-Phenylendiamin, zu vermeiden. Solche Anti-Fading Agenzien können mit Cyanin-Farbstoffen reagieren, insbesondere mit Cy2, und das halbe Molekül abspalten. Dies zeigt sich in einer schwachen und diffusen Fluoreszenz nach der Lagerung gefärbter Schnitte, bei Cy2 sogar innerhalb von Minuten. Daher sollten zum Eindecken Cyanin gefärbter Schnitte in wässrigen Medien andere Anti-Fading Agenzien wie n-Propylgallat (2%) oder DABCO (2,5%) benutzt werden; bewährt hat sich auch DABCO in Mowiol (Calbiochem). Besonders geeignet, speziell für die Konfokale Lasermikroskopie, sind jedoch organische Eindeckmedien. So bleicht vor allem Cy2 wegen des hochintensiven Laser-Imulses in wässrigem Eindeckmitteln sehr leicht, nicht jedoch in organischen, weder in flüssigen Medien wie Methylsalicylat noch in aushärtenden wie DPX. Eindecken mit (luftblasenfreiem) Entellan (in Toluol; Merck) bei Lagerung in Dunkelheit und 4° C gewährleistet in der Regel eine monatelange, meist Jahre dauernde Stabilität der Färbung (Cy3 z.B. bis zu 8 Jahren).



In welchen Kombinationen können Fluoreszenzfarbstoffe am besten in Mehrfachmarkierungen eingesetzt werden?

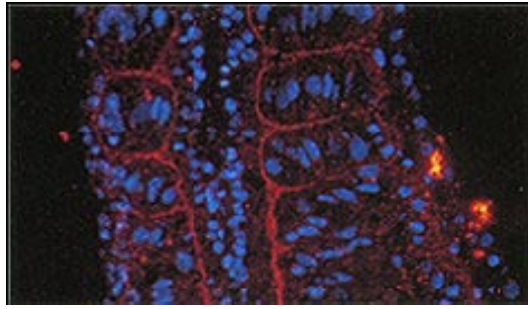
- § Cy2- in Kombination mit Cy3-konjugierten Antikörpern
- § Cy5-konjugierte Antikörpern in Kombination mit entweder Cy2- und Cy3-konjugierten Antikörpern
- § Cy5-konjugierte Ak in Kombination mit TexasRed-konjugierten Antikörpern
- § Rhodamine Red-X-konjugierte Antikörper in Kombination mit Cy2- und Cy5-konjugierten Antikörpern



Wie lassen sich Farbstoffe in der Immunhistochemie kombinieren?

Färbung über Peroxidase à Substrate: DAB, AEC

Färbung über Alkalische Phosphatase à Substrate: BCIP, FastRedRC Kernfärbung à Hämatoxylin, Toluidinblau, Methylgrün, Neutralrot Hintergrund-Gegenfärbung à Eosin, Fast Green FCF, Metanil Gelb



Für welche Anwendungen ist die Histochemie vorzuziehen, für welche Anwendungen die Fluoreszenzfärbung?

- § Enzymgekoppelte Sekundärantikörper: höhere Sensitivität der Applikation. Zu beachten ist, dass im Gewebe vorhandene, endogene Enzyme ausgeschaltet werden müssen.
- § Fluoreszenzgekoppelte Sekundärantikörper: Nachweis von gering exprimierten Molekülen.
- § Es ist leichter, einzelne fluoreszierende Spots vor dunklem Hintergrund zu erkennen, als eine enzymatische Farbreaktion auf kleinster Stelle vor diffusem Hintergrund.

Was sind die gängigsten Verdünnungen für Sekundärantikörper in der Histologie?

unkonjugiert	10 µg/ml
Alkalische Phosphatase (AP/AlkPhos)	1:500- 1:5000
Peroxidase (POD)	1:500- 1:5000
AlkPhos-/POD-konjugiertes Avidin/Streptavidin	1 - 2 µg/ml
Biotin-SP	1:200 - 1:1000
PAP-Komplexe	25 - 50 µg/ml
Fluorescein-konjugiertes Avidin/Streptavidin	2 - 5 µg/ml
Fluorochrome (FITC, TRITC, AMCA, TRSC, TexasRed)	1:50 - 1:1200
Carbocyanine (Cy2, Cy3, Cy5) und Rhodamine Red-X	1:100 - 1:800