



# Immunologie: Fluoreszenz Topics

---

Ein Handbuch für die Immunfluoreszenz

## Inhalt

I.	Fluorochromkonjugierte Sekundärantikörper	3
1.	Allgemeine Informationen zu Fluorochromen	3
2.	Sekundärantikörper für die Immunfluoreszenz (Einfachmarkierung)	6
2.1.	Sekundärantikörper aus Ziege gegen Primärantikörper der Maus	6
2.2.	Sekundärantikörper aus Ziege gegen Primärantikörper des Kaninchen	6
2.3.	Sekundärantikörper aus Ziege gegen Primärantikörper der Ratte	7
3.	Sekundärantikörper für die Immunfluoreszenz (Doppelmarkierung aus gleicher Spezies)	8
3.1.	Prinzip der Doppelmarkierung mit Primärantikörpern aus derselben Spezies	8
3.2.	Fab-Fragmente für die Markierung mit Primärantikörpern aus gleicher Spezies	9
II.	Präparateherstellung für die Immunfluoreszenz	10
1.	Zellen aus Zellkultur	10
2.	Herstellung von 4-8 µm dicken Gefrierschnitten.	10
III.	Arbeitsprotokoll zur Immunfluoreszenz	11
1.	Einfachmarkierung	11
2.	Doppelmarkierung	12
2.1.	Beispiel A: Primärantikörper aus Maus und Kaninchen	12
2.2.	Beispiel B: Primärantikörper aus Maus und Ratte	13
2.3.	Beispiel 3: Zwei Primärantikörper aus Maus	14
2.4.	Beispiel 4: Zwei Primärantikörper aus Kaninchen	15
IV.	Indirekte Markierung in der Durchflusszytometrie	15
1.	Auswahl an Sekundärantikörpern	15

## I. Fluorochromkonjugierte Sekundärantikörper\*

\*Hersteller und Vertriebsrecht erteilt durch: Jackson ImmunoResearch Inc., USA

### 1. Allgemeine Informationen zu Fluorochromen

#### Cy2

Cy2 (Carbocyanin) wird bei 492 nm maximal angeregt und fluoresziert (508 nm maximal) wie FITC (520 nm) im grünen Bereich des sichtbaren Spektrums. Es ist photostabiler, weniger empfindlich gegenüber pH-Schwankungen sowie in dauerhaften organischen Eindeckmitteln leuchtstärker und langzeitstabiler als FITC.

Aufgrund dieser Eigenschaften kann Cy2 im Epifluoreszenzmikroskop länger sichtbar gemacht werden und kann heller erscheinen als FITC, auch ohne die Verwendung von Anti-Fading Agenzien in wässrigen Eindeckmitteln. Cy2 ist mit üblichen "FITC-(Fluoresceinisothiocyanat-) Filtern" kompatibel.

#### Cy3

Cy3 (Indocarbocyanin) hat das Absorptionsmaximum bei 550 nm; das Emissionsmaximum liegt bei 570 nm. Damit kann dieses extrem leuchtintensive (100fach stärker als FITC) und photostabile Fluorochrom in der Epifluoreszenzmikroskopie ohne apparativen Mehraufwand mit einem konventionellen TRITC-Filtersatz verwendet werden. Spezielle Cy3-Filter (z.B. Fa. Zeiss Filtersatz 20) sind ebenfalls von verschiedenen Anbietern erhältlich. Die Anregung von Cy3 kann zu 50% seiner Maximalabsorption mit den 514 nm oder 528 nm Strahlen eines Argon-Lasers angeregt werden, zu 75% des Maximums mit einem Helium/Neon-Laser (543 nm) oder mit einer Quecksilberlampe (546 nm). Cy3 wird häufig in Kombination mit Cy2 oder FITC für Doppelmarkierungen eingesetzt. Wegen der spektralen Überlappung der Fluoreszenzen von FITC und Cy3 ist dafür allerdings die Verwendung eines engen Bandpassfilters für FITC empfehlenswert. Steht ein konfokales Mikroskop mit einem Krypton/Argon-Laser und einem Infrarot-Detektor (CCD) zur Verfügung, kann Cy3 für Mehrfachmarkierungen auch sehr gut mit Cy5 kombiniert werden.

#### Cy5

Cy5 (Indodicarbocyanin): Bei einer maximalen Absorption bei 650 nm weist Cy5 eine maximale Lichtemission bei 670 nm auf. Damit ist eine minimale Überlappung zu anderen Fluorochromen gegeben, womit sich der Einsatz dieses Farbstoffes vor allem für Mehrfachmarkierungen anbietet. Dabei können die anderen eingesetzten Fluorophore z.B. Cy2 und Cy3 oder FITC und Rhodamine Red-X sein. Da die Fluoreszenz von Cy5 mit dem menschlichen Auge nicht ausreichend wahrgenommen werden kann, kann Cy5 mit einem konventionellen Epifluoreszenzmikroskop nicht optimal bzw. kaum sichtbar gemacht werden, zumal die Quecksilberlampe, die in den meisten Geräten verwendet wird, nicht genügend Licht innerhalb des Anregungsbereiches von Cy5 emittiert. Daher sollte für die Detektion dieses Fluoreszenzfarbstoffs ein konfokales Mikroskop verwendet werden, das mit einem geeigneten Laser und einem Infrarot-Detektor ausgestattet ist. Cy5 kann durch einen Krypton/Argon-Laser (98% der Maximalabsorption mit 647 nm Wellenlänge), einem Helium/Neon-Laser (63% der Maximalabsorption mit 633 nm Wellenlänge) oder mit einem roten Dioden-Laser angeregt werden. Cy5 eignet sich außerdem sehr gut als dritte Fluoreszenz in der Durchflusszytometrie in allen Geräten, die mit einem zusätzlichen Laser ausgestattet sind, weil sich Cy5 nicht mit einem Argon-Laser anregen lässt. Allerdings gibt es Hinweise, dass bei der Messung von Blutzellen unspezifische Bindungen von Cy5 an Fc-Rezeptoren monozytärer Zellen auftreten können. In

diesem Fall sind APC-Konjugate, die ähnliche spektrale Eigenschaften wie Cy5 aufweisen, zu bevorzugen.

Ein besonderer Vorteil von Cy5 und seiner Anregung mit rotem Licht ist die resultierende niedrige Autofluoreszenz biologischer Proben.

### Eindeckmittel für Cyanin-Farbstoffe

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).

### FITC

FITC (Fluorescein-Isothiocyanat) wird maximal bei 492 nm angeregt und hat ein Emissionsmaximum bei 520 nm. Es wird routinemäßig für Einfach- und Doppelmarkierungen in der Immunfluoreszenz und Durchflusszytometrie eingesetzt. Als Schutz gegen zu schnelles Ausbleichen empfiehlt sich die Verwendung eines Anti-Fading Agens (gut geeignet z.B. n-Propylgallat, p-Phenylendiamin in gepuffertem Glycerol; J. Histochem 1993 Dec; 41 (12) 1833-40). FITC sollten aufgrund seiner Fadingeigenschaften bei Mehrfachmarkierungen immer für den Nachweis des stärker exprimierten Antigens genutzt werden.

### Rhodaminderivate

TRITC (Tetramethyl Rhodamin), RRX (Rhodamin RedX, Lissamin Rhodamin B-Derivat) und TRSC (Texas Red Sulfonylchlorid) sind Derivate von Rhodamin, die sich durch ihre Absorptionsspektren unterscheiden. Alle drei Fluorochrome sind für Doppelmarkierungen in Kombination mit FITC geeignet. Hier empfehlen wir aufgrund der im Vergleich zu TRITC geringeren Überlappung mit dem Spektrum von FITC die Verwendung von RRX. Dies ist aufgrund seiner spektralen Eigenschaften ein ideales Fluorochrom für Dreifachmarkierungen, die durch konfokale Laserscanning Mikroskopie ausgewertet werden können.

Rhodamine RedX ist ein eingetragenes Warenzeichen der Molecular Probes Inc.

### AMCA

AMCA (Aminomethylcoumarin) ist aufgrund seines Spektrums (maximale Absorption bei 350 nm, maximale Emission bei 450 nm) und der daraus resultierenden geringen Überlappung mit Spektren anderer Fluorochrome hervorragend für Mehrfachmarkierungen geeignet. Dabei muss darauf geachtet werden, dass mit diesem blauen Fluoreszenzfarbstoff das am stärksten exprimierte Antigen nachgewiesen wird, da diese Farbe von den menschlichen Augen schlechter wahrgenommen wird als andere. AMCA kann durch eine Quecksilberlampe angeregt und seine

Fluoreszenz bei Verwendung eines UV-Filtersatzes betrachtet werden. Für die fotografische Dokumentation empfiehlt sich die Verwendung eines Blaulichtempfindlichen Films und gegebenenfalls die Zugabe eines Anti-Fading Agens wie n-Propyl-Gallat.

AMCA eignet sich sowohl für Mehrfachmarkierungen in der Histologie als auch in der Durchflusszytometrie.

### **Phycoerythrin (PE)**

Prinzipiell sind Phycoerythrine für den Einsatz in der Histologie verwendbar. Allerdings weisen sie aufgrund ihrer Größe eine deutlich schlechtere Penetration im Gewebe auf, so dass für diese Anwendung besser Cy3- oder RRX-konjugierte Sekundärantikörper geeignet sind.

### **Anti Fading Agenzien für FITC und AMCA:**

Als Schutz gegen zu schnelles Ausbleichen der Fluoreszenz (FITC und AMCA) empfehlen wir den Zusatz von 0,1 % p-Phenylendiamin in 80-90 % Glycerol in PBS (pH 7,2 - 9,0) bzw. 2 % n-Propyl-Gallat in entsprechend gepuffertem Glycerol.

## 2. Sekundärantikörper für die Immunfluoreszenz (Einfachmarkierung)

Diese Zusammenstellung an Sekundärantikörpern\* stellt eine Auswahl aus unserem Gesamtprogramm für die gängigsten Anwendungen dar. Selbstverständlich haben wir für jede einzelne Fragestellung einen optimalen Antikörper zur Verfügung. Wenn für Ihre Anwendung eine besondere Spezifität erforderlich ist, bieten wir auch Antikörper an, die gegen den Fc- oder den F(ab')<sub>2</sub>-Teil gerichtet sind.

\*Hersteller und Vertriebsrecht erteilt durch: Jackson ImmunoResearch Inc., USA

### 2.1. Sekundärantikörper aus Ziege gegen Primärantikörper der Maus\*

Markierung	Absorption	Emission	Kat.-Nr.	Menge
Cy2	490 nm	508 nm	115-225-062	1,5 mg
Cy3	550 nm	570 nm	115-165-062	1,5 mg
Cy5	650 nm	670 nm	115-175-062	1,5 mg
FITC	492 nm	520 nm	115-095-062	1,5 mg
TRITC	550 nm	570 nm	115-025-062	1,5 mg
RRX	570 nm	590 nm	115-295-062	1,5 mg
TRSC	596 nm	620 nm	115-075-062	1,5 mg
AMCA	350 nm	450 nm	115-155-062	1,5 mg

\* Diese Antikörper sind gegen Maus IgG (H+L) gerichtet und adsorbiert gegen Human-, Rind-, Pferd-Serumproteine.

### 2.2. Sekundärantikörper aus Ziege gegen Primärantikörper des Kaninchen\*

Markierung	Absorption	Emission	Kat.-Nr.	Menge
Cy2	490 nm	508 nm	111-225-045	1,5 mg
Cy3	550 nm	570 nm	111-165-045	1,5 mg
Cy5	650 nm	670 nm	111-175-045	1,5 mg
FITC	492 nm	520 nm	111-095-045	1,5 mg
TRITC	550 nm	570 nm	111-025-045	1,5 mg
RRX	570 nm	590 nm	111-295-045	1,5 mg
TRSC	596 nm	620 nm	115-075-062	1,5 mg
AMCA	350 nm	450 nm	115-155-062	1,5 mg

\*Diese Antikörper sind gegen Kaninchen IgG (H+L) gerichtet und adsorbiert gegen humane Serumproteine.

### 2.3. Sekundärantikörper aus Ziege gegen Primärantikörper der Ratte\*

Markierung	Absorption	Emission	Kat.-Nr.	Menge
Cy2	490 nm	508 nm	112-225-062	1,5 mg
Cy3	550 nm	570 nm	112-165-062	1,5 mg
Cy5	650 nm	670 nm	112-175-062	1,5 mg
FITC	492 nm	520 nm	112-095-062	1,5 mg
TRITC	550 nm	570 nm	112-025-062	1,5 mg
RRX	570 nm	590 nm	112-295-062	1,5 mg
TRSC	596 nm	620 nm	112-075-062	1,5 mg
AMCA	350 nm	450 nm	112-155-062	1,5 mg

\* Diese Antikörper sind gegen Ratte IgG (H+L) gerichtet und adsorbiert gegen Human-, Rind-, Pferd-Serumproteine.

### 3. Sekundärantikörper für die Immunfluoreszenz (Doppelmarkierung aus derselben Spezies)

Fab-Fragmente können zur vollständigen Absättigung von Immunglobulinen eingesetzt werden. Damit kann zum einem eine Doppelmarkierung von Primärantikörpern aus derselben Spezies oder eine Blockierung von endogenen Immunglobulinen in Zellen oder auf Schnitten ermöglicht werden.

#### 3.1. Prinzip der Doppelmarkierung mit Primärantikörpern aus derselben Spezies

##### Beispiel 1: Zwei Primärantikörper aus Maus



Die im Überschuss eingesetzten Fab-Fragmente decken den ersten Primärantikörper vollständig ab, so dass keine freien Bindungsstellen mehr vorhanden sind. Anschließend kann der zweite Primärantikörper mit einem üblicherweise eingesetzten Sekundärantikörper detektiert werden.

##### Beispiel 2: Zwei Primärantikörper aus Kaninchen



Die im Überschuss eingesetzten Fab-Fragmente decken den ersten Primärantikörper vollständig ab, so dass keine freien Bindungsstellen mehr vorhanden sind. Zusätzlich wird der erste Primärantikörper aus Kaninchen mit den Fab-Fragmenten aus Ziege maskiert, der dadurch mit einem gebräuchlichen Maus anti-Ziege Antikörper detektiert werden kann. Anschließend kann der zweite Primärantikörper mit einem üblicherweise eingesetzten Sekundärantikörper nachgewiesen werden.

### 3.2. Fab-Fragmente für die Doppelmarkierung mit Primärantikörpern aus derselben Spezies

Spezifität	Markierung	Kat.-Nr.	Menge
Fab Ziege anti-Human IgG (H+L)	Cy2	109-227-003	1,0 mg
	Cy3	109-167-003	1,0 mg
	Cy5	109-177-003	1,0 mg
	unkonjugiert	109-007-003	1,0 mg
	FITC	109-097-003	1,0 mg
	RRX	109-297-003	1,0 mg
Fab Ziege anti-Maus IgG (H+L)	Cy2	115-227-003	1,0 mg
	Cy3	115-167-003	1,0 mg
	Cy5	115-177-003	1,0 mg
	unkonjugiert	115-007-003	1,0 mg
	FITC	115-097-003	1,0 mg
	RRX	115-297-003	1,0 mg
Fab Ziege anti-Kaninchen IgG (H+L)	Cy2	111-227-003	1,0 mg
	Cy3	111-167-003	1,0 mg
	Cy5	111-177-003	1,0 mg
	unkonjugiert	111-007-003	1,0 mg
	FITC	111-097-003	1,0 mg
	RRX	111-297-003	1,0 mg
Fab Ziege anti-Ratte IgG (H+L)	Cy2	112-227-003	1,0 mg
	Cy3	112-167-003	1,0 mg
	Cy5	112-177-003	1,0 mg
	unkonjugiert	112-007-003	1,0 mg
	FITC	112-097-003	1,0 mg
	RRX	112-297-003	1,0 mg
Fab Kaninchen anti-Ziege IgG (H+L)	Cy2	305-227-003	0,5 mg
	Cy3	305-167-003	0,5 mg
	Cy5	305-177-003	0,5 mg
	unkonjugiert	305-007-003	1,0 mg
	FITC	305-097-003	0,5 mg
	RRX	305-297-003	0,5 mg

## II. Präparateherstellung für die Immunfluoreszenz

### - Arbeitslösungen -

#### PBS-Puffer:

8 g NaCl

1,3 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

4 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

pH 7,4 mit 1N HCl einstellen, auf 1 l mit Aqua bidest. auffüllen

Alternativ kann der fertige PBS-Puffer mit bereits eingestelltem pH-Wert als Pulver bei der Fa. Sigma (#P3813) bestellt werden.

PBS-BSA: PBS mit 1% (w/v) Rinderserum-Albumin.

### 1. Zellen aus Zellkultur

1. Zellen über Nacht auf Objektträgern bei 37°C anwachsen lassen. Kurz mit PBS waschen
2. Zellen unter Verwendung einer der folgenden Möglichkeiten fixieren:
  - § 2 min in eisgekühltem Aceton, anschließend 5 min lufttrocknen.
  - § 5 min in -10°C kaltem Methanol, anschließend 5 min lufttrocknen.
  - § 10 min in 1% Formalin in PBS, Zellen dürfen dann nicht mehr austrocknen.

weiter mit dem Immunfluoreszenz-Protokoll.

### 2. Herstellung von 4-8 µm dicken Gefrierschnitten.

1. Schnitte auf saubere, fettfreie Objektträger aufziehen und langsam (30 min) auf Raumtemperatur aufwärmen.
2. Schnitte unter Verwendung einer der folgenden Möglichkeiten fixieren:
  - § 10 min in eisgekühltem Aceton. Schnitte anschließend 5 min lufttrocknen.
  - § 5-10 min in Aceton/Methanol (1:2).

weiter mit dem Immunfluoreszenz-Protokoll.

### III. Arbeitsprotokoll zur Immunfluoreszenz

Alle folgenden Inkubationsschritte sollten in einer feuchten Kammer durchgeführt werden. Vor Zusatz der einzelnen Antikörper müssen Pufferreste mit Zellstoff oder über eine Wasserstrahlpumpe vorsichtig von den Präparaten abgesaugt werden. Die Verdünnungen werden, soweit nicht anders beschrieben, in PBS-Puffer vorgenommen.

#### - Arbeitslösungen -

##### PBS-Puffer:

8 g NaCl

1,3 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

4 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

pH 7,4 mit 1N HCl einstellen, auf 1 l mit Aqua bidest. auffüllen

Alternativ kann der fertige PBS-Puffer mit bereits eingestelltem pH-Wert als Pulver bei der Fa. Sigma (#P3813) bestellt werden.

**PBS-BSA:** PBS mit 1% (w/v) Rinderserum-Albumin.

#### 1. Einfachmarkierung

<b>Prinzip:</b>	
<b>Primärantikörper:</b>	Maus anti-Human
<b>Blockierung:</b>	5% Ziege-Normalserum (005-000-121)
<b>Sekundärantikörper:</b>	Ziege anti-Maus IgG (H+L) Cy3 (115-165-062) adsorbiert gegen Human-, Rind-, Pferd-Serumproteine

In diesem Beispiel wird ein Antikörper aus der Ziege gerichtet gegen Maus eingesetzt. Dieser ist adsorbiert gegen alle Serumproteine, die eine Hintergrundfärbung hervorrufen können. Adsorptionen gegen Rind und Pferd sind wichtig, da Serum aus diesen Spezies vielen Kulturmedien zugesetzt ist. Zur Blockierung wird das Normalserum aus der Spezies eingesetzt, aus der der Sekundärantikörper stammt, in diesem Beispiel also aus der Ziege.

1. Inkubation der Zellen/Gewebeschnitte mit 5-10% Normalserum in PBS für 20 min bei Raumtemperatur, um eine unspezifische Bindung der Antikörper zu vermeiden.
2. Schnitte 3 x 5 min mit PBS bei Raumtemperatur waschen.
3. Inkubation mit jeweils 50-100 µl Primärantikörper (Verdünnung nach Herstellerangaben) in PBS-BSA für 60 min bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C.
4. Schnitte 3 x 5 min mit PBS waschen.
5. Inkubation mit dem fluorochromkonjugierten Zweitantikörper für 60 min bei Raumtemperatur im Dunkeln in der folgenden Verdünnung mit PBS:
  - § Verdünnung Cy2 Cy3, Cy5-Konjugate: 1:100 - 1:800
  - § FITC, AMCA und PE, Rhodamin-Konjugate: 1:50 - 1:200
6. Schnitte 3 x 5 min mit PBS waschen.
7. Einbetten der Zellen/Gewebeschnitte in Mountingmedium, Eindecken, Analyse unter dem Fluoreszenzmikroskop. Aufbewahrung im Dunkeln bei 4°C (Glycerin/PBS).

## 2. Doppelmarkierung

### 2.1. Beispiel A: Primärantikörper aus Maus und Kaninchen

Prinzip:		
Primärantikörper:	Maus anti-Human Antigen A	Kaninchen anti-Human Antigen B
Blockierung:	5% Ziege-Normalserum (005-000-121)	
Sekundärantikörper:	Ziege anti-Maus IgG(H+L) FITC (115-095-146) oder Cy2( 115-225-146) adsorbiert gegen Kaninchen-, Human-, Rind-, Pferd-Serumproteine	Ziege anti-Kaninchen IgG(H+L) RRX (111-295-144) oder Cy3 (111-165-144) adsorbiert gegen Maus-, Human-, Ratte-Serumproteine

In diesem Beispiel erkennen sich die beiden Sekundärantikörper nicht gegenseitig, da beide aus der Ziege gewonnen wurden. Beide sind adsorbiert gegen alle Serumproteine, die eine Hintergrundfärbung hervorrufen können. Adsorptionen gegen Rind und Pferd sind wichtig, da Serum aus diesen Spezies vielen Kulturmedien zugesetzt ist. Die Adsorption des  $\alpha$ -Maus-Antikörpers gegen Kaninchen bzw. die des  $\alpha$ -Kaninchen-Antikörpers gegen Maus verhindern eine Kreuzreaktion mit den jeweils anderen Primärantikörpern.

1. Inkubation der Zellen/Gewebeschnitte mit 5% Normalserum aus der Ziege (005-000-121) in PBS für 20 min bei Raumtemperatur, um eine unspezifische Bindung der Antikörper zu vermeiden.
2. Schnitte 3 x 5 min mit PBS bei Raumtemperatur waschen.
3. Inkubation mit dem ersten Primärantikörper aus Maus (Verdünnung nach Herstellerangaben) in PBS-BSA für 60 min bei Raumtemperatur.
4. Schnitte 3 x 5 min mit PBS waschen.
5. Inkubation mit FITC-konjugiertem Ziege anti-Maus IgG (115-095-146), adsorbiert gegen Kaninchen/Human/Rind/Pferd/Schwein-Serumproteine für 60 min bei Raumtemperatur im Dunkeln.
  - § Verdünnung Cy2 Cy3, Cy5-Konjugate: 1:100 - 1:800
  - § FITC, AMCA und PE, Rhodamin-Konjugate: 1:50 - 1:200
6. Schnitte 3 x 5 min mit PBS waschen.
7. Inkubation mit dem zweiten Primärantikörper aus Kaninchen (Verdünnung nach Herstellerangaben) in PBS-BSA für 60 min bei Raumtemperatur.
8. Schnitte 3 x 5 min mit PBS waschen.
9. Inkubation mit RRX-konjugiertem Ziege anti-Kaninchen IgG, adsorbiert gegen Maus-, Human-, Ratte-Serumproteine (111-295-144) für 60 min bei Raumtemperatur im Dunkeln. Als Alternative kann auch ein Cy3-Konjugat (111-165-144) eingesetzt werden (Verdünnung siehe Punkt 5).
10. Schnitte 3 x 5 min mit PBS waschen.
11. Einbetten der Zellen/Gewebeschnitte in Mountingmedium, Eindecken, Analyse unter dem Fluoreszenzmikroskop. Aufbewahrung im Dunkeln bei 4°C (Glycerin/PBS).

## 2.2. Beispiel B: Primärantikörper aus Maus und Ratte

<b>Prinzip:</b>		
<b>Primärantikörper:</b>	Maus anti-Human Antigen A	Ratte anti-Human Antigen B
<b>Blockierung:</b>	5% Ziege-Normalserum (005-000-121)	
<b>Sekundärantikörper:</b>	Ziege anti-Maus IgG(H+L) FITC (115-095-166) oder Cy2( 115-225-166) adsorbiert gegen Kaninchen-, Human-, Rind-, Pferd-, Ratte-Serumproteine	Ziege anti-Ratte IgG(H+L) RRX (112-295-167) oder Cy3 (112-165-167) adsorbiert gegen Kaninchen-, Human-, Rind-, Pferd-,Maus-Serumproteine

In diesem Beispiel erkennen sich die beiden Sekundärantikörper nicht gegenseitig, da beide aus der Ziege gewonnen wurden. Beide sind adsorbiert gegen alle Serumproteine, die eine Hintergrundfärbung hervorrufen können. Adsorptionen gegen Rind und Pferd sind wichtig, da Serum aus diesen Spezies vielen Kulturmedien zugesetzt ist. Die Adsorption des  $\alpha$ -Maus-Antikörpers gegen Ratte bzw. die des  $\alpha$ -Ratte-Antikörpers gegen Maus verhindert eine Kreuzreaktion mit den jeweils anderen Primärantikörpern.

1. Inkubation der Zellen/Gewebeschnitte mit 5% Normalserum aus der Ziege (005-000-121) in PBS für 20 min bei Raumtemperatur, um eine unspezifische Bindung der Antikörper zu vermeiden.
2. Schnitte 3 x 5 min mit PBS bei Raumtemperatur waschen.
3. Inkubation mit dem ersten Primärantikörper aus Maus (Verdünnung nach Herstellerangaben) in PBS-BSA für 60 min bei Raumtemperatur.
4. Schnitte 3 x 5 min mit PBS waschen.
5. Inkubation mit FITC-konjugiertem Ziege anti-Maus IgG, adsorbiert gegen Kaninchen-, Ratte-, Human-, Rind-, Pferd-Serumproteine (115-095-166) für 60 min bei Raumtemperatur im Dunkeln.
  - § Verdünnung Cy2 Cy3, Cy5-Konjugate: 1:100 - 1:800
  - § FITC, AMCA und PE, Rhodamin-Konjugate: 1:50 - 1:200
6. Schnitte 3 x 5 min mit PBS waschen.
7. Inkubation mit dem zweiten Primärantikörper aus Ratte (Verdünnung nach Herstellerangaben) in PBS-BSA für 60 min bei Raumtemperatur.
8. Schnitte 3 x 5 min mit PBS waschen.
9. Inkubation mit RRX-konjugiertem Ziege anti-Ratte IgG, adsorbiert gegen Kaninchen-, Maus-, Human-, Rind-, Pferd-Serumproteine (112-295-167) für 60 min bei Raumtemperatur im Dunkeln. Als Alternative kann auch ein Cy3-Konjugat (112-165-167) eingesetzt werden. (Verdünnung siehe Punkt 5).
10. Schnitte 3 x 5 min mit PBS waschen.
11. Einbetten der Zellen/Gewebeschnitte in Mountingmedium, Eindecken, Analyse unter dem Fluoreszenzmikroskop. Aufbewahrung im Dunkeln bei 4°C (Glycerin/PBS).

### Beispiel 3: Zwei Primärantikörper aus Maus

<b>Prinzip:</b>		
<b>Primärantikörper:</b>	Maus anti-Human Antigen A	Maus anti-Human Antigen B
<b>Blockierung:</b>	5% Ziege-Normalserum (005-000-121)	
<b>Sekundärantikörper:</b>	Fab Ziege anti-Maus IgG (H+L) FITC (115-097-003) oder Fab Ziege anti-Maus IgG (H+L) Cy2 (115-227-003)	Ziege anti-Maus IgG (H+L) RRX (115-295-062) Oder Ziege anti-Maus IgG (H+L) Cy3 (115-165-062)

Die im Überschuss eingesetzten Fab-Fragmente decken den ersten Primärantikörper vollständig ab, so dass keine freien Bindungsstellen mehr vorhanden sind. Anschließend kann der zweite Primärantikörper mit einem üblicherweise eingesetzten Sekundärantikörper detektiert werden.

1. Inkubation der Zellen/Gewebeschnitte mit 5% Normalserum aus der Ziege (005-000-121) in PBS für 20 min bei Raumtemperatur, um eine unspezifische Bindung der Antikörper zu vermeiden, dann 3 x Waschen mit PBS. Dieser Schritt kann auch ausgelassen werden.
2. Inkubation mit dem ersten Primärantikörper aus Maus (Verdünnung nach Herstellerangaben) in PBS-BSA für 60 min bei Raumtemperatur.
3. Schnitte 3 x 5 min mit PBS waschen.
4. Inkubation mit einem Überschuss an FITC-konjugiertem Fab Ziege anti-Maus IgG (115-097-003) für 60 min bei Raumtemperatur im Dunkeln.
  - § Verdünnung Fab-Fragmente: 1:50-1:200
5. (optional) Ein kurzes Nachfixieren des Antikörper-Fab-Komplexes hilft ein eventuelles „abschwimmen“ des Fab-Fragments zu verhindern
6. Schnitte 3 x 5 min mit PBS waschen.
7. Inkubation mit dem zweiten Primärantikörper aus Maus (Verdünnung nach Herstellerangaben) in PBS-BSA für 60 min bei Raumtemperatur.
8. Schnitte 3 x 5 min mit PBS waschen.
9. Inkubation mit RRX-konjugiertem Ziege anti-Maus IgG, adsorbiert gegen Human/Rind/Pferd-Serumproteine (115-295-062) für 60 min bei Raumtemperatur im Dunkeln. Als Alternative kann auch ein Cy3-Konjugat (115-165-062) eingesetzt werden.
  - § Verdünnung Cy2, Cy3, Cy5-Konjugate: 1:100-1:800
  - § Verdünnung FITC, AMCA, PE, Rhodamin-Konjugate: 1:50-1:200
10. Schnitte 3 x 5 min mit PBS waschen.
11. Einbetten der Zellen/Gewebeschnitte in Mountingmedium, Eindecken, Analyse unter dem Fluoreszenzmikroskop. Aufbewahrung im Dunkeln bei 4°C (Glycerin/PBS).

### 2.3. Beispiel 4: Zwei Primärantikörper aus Kaninchen

Prinzip:		
Primärantikörper:	Kaninchen anti-Human Antigen A	Kaninchen anti-Human Antigen B
Fab-Fragment	Fab Ziege anti-Kaninchen IgG (H+L) unmarkiert (111-007-003)	
Sekundärantikörper:	Maus anti-Ziege IgG (H+L) FITC (205-095-108) adsorbiert gegen Kaninchen-, Human-, Maus-Serumproteine	Maus anti-Kaninchen IgG (H+L) RRX (211-295-109) adsorbiert gegen Ziege-, Human-, Maus-, Schaf-Serumproteine

Die im Überschuss eingesetzten Fab-Fragmente decken den ersten Primärantikörper vollständig ab, so dass keine freien Bindungsstellen mehr vorhanden sind. Zusätzlich wird der erste Primärantikörper aus Kaninchen mit den Fab-Fragmenten aus Ziege maskiert, der dadurch mit einem gebräuchlichen Maus anti-Ziege Antikörper detektiert werden kann. Anschließend kann der zweite Primärantikörper mit einem üblicherweise eingesetzten Sekundärantikörper nachgewiesen werden.

1. Inkubation der Zellen/Gewebeschnitte mit 5% Normalserum aus der Maus (015-000-120) in PBS für 20 min bei Raumtemperatur, um eine unspezifische Bindung der Antikörper zu vermeiden, anschließend 3 x Waschen mit PBS. Dieser Schritt kann auch ausgelassen werden.
2. Inkubation mit dem ersten Primärantikörper aus Kaninchen (Verdünnung nach Herstellerangaben) in PBS-BSA für 60 min bei Raumtemperatur.
3. Schnitte 3 x 5 min mit PBS waschen.
4. Inkubation mit einem Überschuss an unmarkiertem Fab Ziege anti-Kaninchen IgG (111-007-003) für 60 min bei Raumtemperatur im Dunkeln.

§ Verdünnung Fab-Fragmente: 1:50-1:200

5. (optional) Ein kurzes Nachfixieren des Antikörper-Fab-Komplexes hilft ein eventuelles „abschwimmen“ des Fab-Fragments zu verhindern
6. Schnitte 3 x 5 min mit PBS waschen.
7. Inkubation mit FITC-konjugiertem Maus anti-Ziege IgG adsorbiert gegen Kaninchen-, Human-, Maus-Serumproteine (205-095-108) für 60 min bei Raumtemperatur im Dunkeln (Verdünnung siehe 2.1.5).
8. Schnitte 3 x 5 min mit PBS waschen.
9. Inkubation mit dem zweiten Primärantikörper aus Kaninchen (Verdünnung nach Herstellerangaben) in PBS-BSA für 60 min bei Raumtemperatur.
10. Schnitte 3 x 5 min mit PBS waschen.
11. Inkubation mit RRX-konjugiertem Maus anti-Kaninchen IgG adsorbiert gegen Ziege-, Human-, Maus-, Schaf-Serumproteine (211-295-109) für 60 min bei Raumtemperatur im Dunkeln (Verdünnung siehe 2.3.5).
12. Schnitte 3 x 5 min mit PBS waschen.
13. Einbetten der Zellen/Gewebeschnitte in Mountingmedium, Eindecken, Analyse unter dem Fluoreszenzmikroskop. Aufbewahrung im Dunkeln bei 4°C (Glycerin/PBS).

## IV. Indirekte Markierung in der Durchflusszytometrie

### 1. Auswahl an Sekundärantikörpern

Diese Zusammenstellung an Sekundärantikörpern\* für die indirekte Markierung in der Durchflusszytometrie stellt eine Auswahl aus unserem Gesamtprogramm für die gängigsten Anwendungen dar. Selbstverständlich haben wir für jede einzelne Fragestellung einen optimalen Antikörper zur Verfügung. Wenn für Ihre Anwendung eine besondere Spezifität erforderlich ist, bieten wir auch Antikörper an, die gegen den Fc- oder den F(ab')<sub>2</sub>-Teil gerichtet sind.

\*Hersteller und Vertriebsrecht erteilt durch: Jackson ImmunoResearch Inc., USA

Spezifität	Markierung	Kat.-Nr.	Menge
F(ab') <sub>2</sub> Ziege anti <b>Maus</b> IgG (H+L) ads. gegen Human-, Rind-, Pferd-, Schwein-Serumprot.	FITC	115-096-062	1,0 mg
F(ab') <sub>2</sub> Ziege anti <b>Maus</b> IgG (H+L) ads. gegen Human-, Rind-, Pferd-, Kaninchen-, Schwein-Serumprot.	R-PE	115-116-146	1,0 ml
F(ab') <sub>2</sub> Ziege anti <b>Ratte</b> IgG (H+L) ads. gegen Human-, Rind-, Pferd-, Schwein-Serumprot.	FITC	112-096-062	1,0 mg
F(ab') <sub>2</sub> Ziege anti <b>Ratte</b> IgG (H+L) ads. gegen Human-/Rind-/Pferd-/Kaninchen-/Schwein-Serumprot.	R-PE	112-116-143	1,0 ml
F(ab') <sub>2</sub> Esel anti <b>Kaninchen</b> IgG (H+L) ads. gegen Rind-, Huhn-, Ziege-, Guineapig-, Pferd-, Hamster-Serumprot.	FITC	711-096-152	0,3 mg
F(ab') <sub>2</sub> Esel anti <b>Kaninchen</b> IgG (H+L) ads. gegen Rind-, Huhn-, Ziege-, Guineapig-, Pferd-, Hamster-Serumprot	R-PE	711-116-152	1,0 ml

#### - Arbeitslösungen -

PBS-BSA: PBS mit 0,2% (w/v) BSA (dianova 001-000-161), 0,02% (w/v) NaN<sub>3</sub>.

#### - Arbeitsprotokoll -

1. Zu 100 µl Vollblut die entsprechende Menge Primärantikörper zugeben (nach Herstellerangaben), 15 min bei Raumtemperatur (18-25°C) inkubieren.
2. Waschen: Zugabe von 3 ml PBS-BSA zum Ansatz, 5 min bei 1200 rpm zentrifugieren, Überstand verwerfen.
3. Zugabe von 100 µl einer 1:80 bis 1:100 Verdünnung des FITC- oder Phycoerythrin (R-PE) konjugierten Sekundärantikörpers in PBS-BSA, Inkubation für 15 min bei Raumtemperatur (18-25°C).
4. Waschen: Zugabe von 3 ml PBS-BSA zum Ansatz, 5 min lang bei 1200 rpm zentrifugieren, Überstand verwerfen.
5. Mit dem normalen Protokoll für Lyse der roten Blutkörperchen und Fixierung der Zellen fortfahren.