

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Imunohistochemický Protokol

Řezy je nutné pro lepší přilnutí řezů ke sklíčku před vlastním zpracováním nechat 1 hodinu na vyhřívací ploténce. Používat skla superfrost +, nebo jiné s adhezivama

1	Termostat (60°C)	6 min
2	Xylen I (v kyvetě, při laboratorní teplotě)	10 min.
3	Alkoholeter (v kyvetě, při laboratorní teplotě)	10 min.
9	Čerstvá vodovodní voda (v kyvetě, při laboratorní teplotě)	7 min.
10	Destilovaná voda (v kyvetě, při laboratorní teplotě)	7 min.
11	PBS (v kyvetě, při laboratorní teplotě)	5 min.
12	Citrát EDTA (připravovaný ze zásobního roztoku, v mikrovlnce po dobu 5 min. při 650W)	5 min.
13	Chladnutí v pufru Citrát EDTA (nechat v původním roztoku, při pokojové teplotě)	20 min
14	Chladnutí v PBS	5 min.
15	3% roztok H₂O₂ v PBS (v kyvetě, při laboratorní teplotě)	20 min.
16	PBS (v kyvetě, při laboratorní teplotě)	2 x 5 min.
17	Mléko proti nespecifické vazbě (5% roztok v TBS + TWEEN v množství 1μl na 1 ml roztoku)	20 min.
18	Mléko odsát filtračním papírkem	
19	Primární protilátka (polyklonální) Anti-soya, Anti-wheat protein (ředěná ředidlem na protilátky (1:500), ve vlhčené komůrce, při teplotě 8°C)	12 hod přes noc
20	PBS (v kyvetě, při laboratorní teplotě)	2 x 5 min.
21	Příprava Vectastain Elite ABC KIT (ABC reagents) (ABC reagents připravíme podle návodu: 2 kapky reagentu A do 5ml TBS a přidat 2 kapky reagentu B, nutné 30 min před použitím)	
22	Příprava Vectastain Elite ABC KIT (biotinylovaná sekundární protilátka) (ABC kit připravíme podle návodu: 3 kapky séra do 10ml TBS a přidat 1 kapku biotin. protilátky, po aplikaci necháme ve vlhčené komůrce, při laboratorní teplotě)	
23	Vectastain Elite ABC KIT (biotinylovaná sekundární protilátka) (ve vlhčené komůrce, při laboratorní teplotě)	30 min.
24	PBS + TWEEN v množství 1μl na 1 ml roztoku (v kyvetě, při laboratorní teplotě)	2 x 5 min.
25	Vectastain Elite ABC KIT (ABC reagents) (ve vlhčené komůrce, při laboratorní teplotě)	30 min.
26	PBS (v kyvetě, při laboratorní teplotě)	2 x 5 min.
27	DAB (1 kapka DAB činidla do 1ml DAB ředidla, nutná kontrola zbarvení)	10sec. – 30min.
28	Destilovaná voda (v kyvetě, při laboratorní teplotě)	5 min.
29	Barvení pozadí (běžný barvicí postup Modifikovaný Calleja nebo toluidinová modř)	