

WORKING PROTOCOL
Anti human C4d Antibody (C4dpAb)

Cat. no.: BI- RC4D

Immunohistochemical staining of paraffin sections using the C4d Polyclonal Antibody

This protocol has been developed for staining of paraffin embedded tissue sections (tissue fixed with 4.5% neutrally buffered formalin)

1. Deparaffinize and rehydrate tissue section
2. For antigen retrieval, pressure-cook slides for 5 minutes at +125°C in TRIS/EDTA buffer (pH 8.5) (in Pascal Pressurized Heating Chamber, Dako or equivalent) and cool down to room temperature (20 minutes)
TRIS/EDTA Buffer: 10 ml 1M TRIS (pH 9) + 20 ml 0.05M EDTA (pH 7.5) + 970 ml H₂O bidest.
3. Wash sections in PBS
4. Block endogenous peroxidase with 3% H₂O₂ in PBS for 10 minutes
5. Wash sections in PBS
6. Apply 5 minutes UltraVision Block (LabVision)
7. Wash sections in PBS
8. Apply anti C4d antibody 1:30-1:50 in PBS including 1% BSA for 60 minutes at room temperature
9. Wash in PBS
10. Apply Value Primary Antibody Enhancer (LabVision) 20 minutes at room temperature
11. Wash in PBS
12. Apply Value HRP Polymer (LabVision) 30 minutes at room temperature (dark chamber)
13. Wash in PBS
14. Apply DAB or AEC chromogen (adjust time according to positive control)
15. Wash sections in tap water for 10 minutes
16. Counter stain sections with haemalaun acc. Mayer for 1 minute
17. Coverslip sections using an aqueous mounting media

Indirect immunofluorescence on frozen sections using the C4d Polyclonal Antibody.

1. Frozen sections are incubated with rabbit anti-C4d pAb in a dilution of 1:20-1:30 in phosphate buffered saline (PBS) for 30 minutes at room temperature.
2. Wash 4 times with PBS
3. After washing with PBS, bound antibody is detected by incubation with an appropriate FITC-labeled secondary anti-rabbit antibody (dilution according to the respective supplier's protocol).
4. Wash 4 times with PBS
5. Coverslip sections using an aqueous mounting media

Additional reagents required:

Detection System: LabVision Corporation, Cat. No.: TL-060-HLS or TL-125-HLS
UltraVision LP Value Large volume detection system HRP Polymer (ready to use)
<http://www.labvision.com/>

rev.no: 190104 (replacing 170306)

PROTOCOLE DE TRAVAIL

Anti human C4d Antibody (C4dpAb)

Cat. no.: BI- RC4D

Coloration immunohistochimique à l'aide de l'anticorps polyclonal C4d pour coupe en paraffine

Ce protocole a été mis au point pour la coloration de coupes de tissus inclus en paraffine (tissus fixés par une solution neutre à 4,5% de formol)

1. Déparaffiner et réhydrater la section de tissu
2. Pour la récupération de l'antigène, disposer les coupes pendant 5 minutes à +125°C dans du tampon TRIS/EDTA (pH 8,5) (dans une chambre de Pascal chauffante pressurisée, type Dako ou équivalent) et faire redescendre à température ambiante (20 minutes)
Tampon TRIS/EDTA : 10 ml 1M TRIS (pH 9) + 20 ml 0,05M EDTA (pH 7,5) + 970 ml H₂O bidistillée.
3. laver les coupes dans du tampon PBS
4. Bloquer la peroxidase endogène avec de l'H₂O₂ à 3% en tampon PBS pendant 10 minutes
5. laver les coupes dans du tampon PBS
6. Appliquer pendant 5 minutes le Block UltraVision (LabVision)
7. laver les coupes dans du tampon PBS
8. Appliquer pendant 60 minutes à température ambiante l'anticorps anti- C4d dilué entre 1/30 et 1/50 en tampon PBS à 1% de SAB
9. laver dans du tampon PBS
10. Apply Value Primary Antibody Enhancer (LabVision) 20 minutes at room temperature
11. laver dans du tampon PBS
12. Appliquer le polymère Value HRP (LabVision) pendant 30 minutes à température ambiante (chambre noire)
13. laver dans du tampon PBS
14. Appliquer le chromogène DAB ou AEC (ajuster le temps d'incubation par rapport au contrôle positif)
15. Laver les coupes à l'eau du robinet pendant 10 minutes
16. Contre-colorer les coupes avec de l'hémalum acc. Mayer pendant 1 minute
17. Couvrir les coupes à l'aide d'un milieu de montage aqueux

Immunofluorescence indirecte à l'aide de l'anticorps polyclonal C4d sur coupes congelées.

1. Les coupes congelées sont mises à incuber pendant 30 minutes à température ambiante avec l'anti-C4d pAb de lapin à une dilution entre 1/20 et 1/30 en tampon phosphate salin (PBS).
2. Laver 4 fois avec du tampon PBS
3. Après lavage au PBS, l'anticorps lié est détecté par incubation avec un anticorps secondaire-FITC anti-Ig de lapin (dilution selon le protocole fourni par le fabricant).
4. Laver 4 fois avec du tampon PBS
5. Couvrir les coupes à l'aide d'un milieu de montage aqueux

Réactifs supplémentaires nécessaires:

Système de détection: LabVision Corporation, Cat. No.: TL-060-HLS or TL-125-HLS
UltraVision LP Value Large volume detection system HRP Polymer (prêt-à-l'emploi)
<http://www.labvision.com/>

rev.no: 190104 (replacing 170306)



Biomedica Medizinprodukte GmbH, A-1210 Wien, Divischgasse 4
Tel. +43/1/291 07 45, Fax +43/1/291 07 6389, E-mail info@bmgrp.com, www.bmgrp.com

