

Färbung von Gehirnschnitten mit fluoreszierenden Nissl- Farbstoffen

Nissl-Färbung ist eine in der Histologie weit verbreitete Methode zur Darstellung der Morphologie neuronaler Gewebe. Sie basiert auf der Wechselwirkung basischer Farbstoffe mit dem Nukleinsäuregehalt der Zellen. Aufgrund der intensiven Proteinsynthese enthalten die Perikaryen von Neuronen große Mengen ribosomaler RNA im rauen endoplasmatischen Retikulum (Nissl-Schollen). Dadurch ist die zytoplasmatische Färbung von Neuronen deutlich stärker als in den Zellkernen. Auf dieser Grundlage lassen sich gefärbte Neuronen von Gliazellen unterscheiden, weshalb die Nissl-Färbung als spezifisch für den Nachweis von Neuronen gilt.

Fluoreszierende Nissl-Farbstoffe sind zellundurchlässige Farbstoffe, die in Abwesenheit von Nukleinsäuren nicht fluoreszieren, bei Bindung an RNA oder DNA jedoch eine deutliche Verstärkung der Fluoreszenz zeigen. Wir bieten hochkonzentrierte (1.000×) fluoreszierende Nissl-Farbstoffe mit unterschiedlichen spektralen Eigenschaften an.

Handhabung und Entsorgung

Vor dem Öffnen sollte jedes Gefäß auf Raumtemperatur gebracht und kurz in einer Mikrozentrifuge zentrifugiert werden, um die Lösung am Gefäßboden zu sammeln. Sollten Farbstoffpartikel sichtbar sein, können diese nach Erwärmung des Röhrchens durch kurzes Sonifizieren oder kräftiges Vortexen wieder gelöst werden.

Wichtiger Hinweis: Es liegen derzeit keine Daten zur Mutagenität oder Toxizität fluoreszierender Nissl-Farbstoffe vor. Da diese Reagenzien an Nukleinsäuren binden, sollten sie als potenzielle Mutagene behandelt und mit entsprechender Vorsicht gehandhabt werden. Die DMSO-Stammlösung erfordert besondere Vorsicht, da DMSO die Aufnahme organischer Moleküle in Gewebe fördern kann. Wie bei allen Nukleinsäurereagenzien sind Lösungen fluoreszierender Nissl-Farbstoffe gemäß den geltenden lokalen Vorschriften zu entsorgen.

Vorbereitungshinweise

- Wird die Nissl-Färbung mit immunhistochemischen Verfahren kombiniert, sollten zunächst die Antikörperinkubationen erfolgen, gefolgt von der Färbung mit dem fluoreszierenden Nissl-Farbstoff.
- Blockierungslösungen mit Pferdeserum, Rinderserumalbumin (BSA) oder Magermilchpulver können das Fluoreszenzsignal des Nissl-Farbstoffs quenchen. Eine mögliche Alternative ist 0,5 % Fischgelatine.

Färbung von Kryoschnitten

1. Verwenden Sie Poly-L-Lysin-beschichtete Objektträger zum Auffangen der Kryoschnitte. Lassen Sie die Schnitte an der Luft trocknen.

Wichtig: Da bei der Färbung auf Objektträgern der Farbstoff nur von einer Seite in den Schnitt diffundiert, verwenden sie die Schnitten mit einer Dicke von maximal 25 µm.

2. Fixieren Sie die Schnitte 15 Minuten lang in eiskaltem, gepuffertem 4 % Paraformaldehyd.
3. Waschen Sie die Schnitte zweimal für 10 Minuten in 0,1 M phosphatgepufferter Salzlösung (PBS), pH 7,4.

4. Inkubieren Sie die Schnitte 10 Minuten bei Raumtemperatur in 0,1 % TBS (PBS mit 0,1 % Triton® X-100). Dieser Schritt ist für eine optimale Färbung erforderlich.
5. Waschen Sie die Schnitte zweimal für 5 Minuten in PBS.
6. Stellen Sie die Färbelösung her, indem Sie das Farbstoff-Konzentrat 1:1000 in PBS verdünnen und gründlich mischen. Die optimale Verdünnung ist experimentell zu ermitteln.
7. Pipettieren Sie ca. 200 µL der Färbelösung auf den Objektträger, sodass der Schnitt vollständig bedeckt ist. Inkubieren Sie 20 Minuten bei Raumtemperatur.
8. Entfernen Sie die Färbelösung und waschen Sie die Schnitte 10 Minuten in 0,1 % TBS bei Raumtemperatur.
9. Waschen Sie die Schnitte zweimal für 5 Minuten in PBS.
10. Für optimale Ergebnisse waschen Sie die Schnitte zusätzlich für 2 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C in PBS.
11. Falls gewünscht, führen Sie eine Gegenfärbung durch und waschen Sie die Schnitte anschließend in PBS.

Färbung freischwimmender Gehirnschnitte

1. Sammeln Sie fixierte Gehirnschnitte in den Vertiefungen einer Multiwell-Zellkulturplatte.
2. Waschen Sie die Schnitte zweimal für 10 Minuten in 0,1 M PBS, pH 7,4.
3. Inkubieren Sie die Schnitte 10 Minuten bei Raumtemperatur in 0,1 % TBS (PBS mit 0,1 % Triton® X-100). Dieser Schritt ist für optimale Färbeergebnisse erforderlich.
4. Stellen Sie die Färbelösung wie oben beschrieben (1:1000 in PBS) her und mischen Sie gründlich. Optimale Verdünnung sind experimentell zu ermitteln.
5. Geben Sie pro Vertiefung ca. 500 µL Färbelösung hinzu und inkubieren Sie 20 Minuten bei Raumtemperatur.
6. Entfernen Sie die Färbelösung und waschen Sie die Schnitte 10 Minuten in 0,1 % TBS bei Raumtemperatur.
7. Waschen Sie die Schnitte zweimal für 5 Minuten in PBS.
8. *(Optional)* Für optimale Ergebnisse spülen Sie zusätzlich 2 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C in PBS. Führen Sie eine Gegenfärbung durch und spülen Sie anschließend in PBS.
9. Falls gewünscht, führen Sie eine Gegenfärbung durch und waschen Sie anschließend in PBS.
10. Ziehen Sie die Schnitte vorsichtig auf Poly-L-Lysin-beschichtete oder andere adhäsive Objektträger auf.

Deckglasaufgabe

1. Tragen Sie ein geeignetes Einbettungsmedium auf und bedecken Sie die Schnitte mit einem Deckglas. Wir empfehlen unser [Lumimount Einbettungsmedium](#) sowie das [detaillierte Eindeckprotokoll](#).
2. Die Färbung bleibt bei lichtgeschützter Lagerung bei 4 °C oder -20 °C für mehrere Wochen oder länger stabil. Allerdings kann der Hintergrund mit der Zeit zunehmen, da der Farbstoff in das Einbettungsmedium ausdiffundiert.