

Gebrauchsanweisung



Diaminobenzidin (DAB)

CN75

3,3',4,4'-Tetraaminobiphenyltetrahydrochlorid

Peroxidasesubstrat.

Zum Nachweis endogener Peroxidase und zur Färbung immunhistochemischer Nachweise.

I. Einleitung

Weit verbreitetes Substrat der Peroxidase. DAB dient zum biochemischen und histologischen Nachweis von gewebeeigenen Peroxidasen wie Katalasen oder Cytochromoxidasen, sowie als Substrat der Meerrettichperoxidase (HRP) in histochemischen und cytologischen Nachweisen.

Geeignet zur Färbung von Schnitten und Western-Blots. Auch geeignet zum Nachweis der Aktivität von endogenen Peroxidasen in Mitochondrien und in Peroxisomen.

II. Mechanismus

DAB wird durch die HRP oxidiert und bildet ein in wässrigen und organischen Lösungsmitteln unlösliches Präzipitat brauner Farbe, das im normalen Licht detektiert werden kann und nicht ausbleicht.

III. Applikation

Rekonstitution: 5 % in destilliertem Wasser. Die Zugabe von wenigen Tropfen HCl verbessert die Löslichkeit.

III.1 Nachweis von Peroxidasen

Stocklösung: 1 % (10 mg/ml) in 50 mM Tris-Puffer oder Phosphatpuffer (z.B. PBS), pH ca. 7,3

Arbeitskonzentration: 0,05 - 0,1 % (0,5 - 1 mg/ml)

Inkubationspuffer: Tris- oder phosphatgepufferte Systeme wie z.B. 0,05 M Tris-Cl oder 0,1 M Na-Phosphatpuffer, pH 7,2 bis 7,4, PBS, TBS

Optional: Zugabe von 50-100 mM Imidazol

1. Zugabe von 3 ml DAB Stocklösung (1 %) zu 27 ml Inkubationspuffer (Endkonz. 0,1 %). Gut mischen.
2. Zugabe von 10 µl 30 % frisches Wasserstoffperoxid. Gut mischen.

3. Inkubation der Schnitte oder Blots in der Färbelösung bis zur gewünschten Farbstärke (ca. 5 - 15 min.)
4. Waschen in Wasser oder Inkubationspuffer (3 x 1 min)
5. Gegenfärbung falls erwünscht
6. Einbetten

III.2 Nachweis von Katalasen

Arbeitskonzentration: 1 - 2 % (10 - 20 mg/ml)

Inkubationspuffer: stark alkalischer Puffer wie z.B. Glycin-NaOH oder 50 mM Veronal-Acetat oder Tricine-Puffer. pH 9 - 10,5

Bitte beachten:

- DAB muss zunächst in Wasser gelöst werden. Ein Lösen in Puffer führt, wahrscheinlich durch die Bildung der freien Base des DAB, zu einer trüben Lösung.

- Der pH-Wert des Inkubationspuffers ist essentiell! Ein pH <7,0 vermindert die Signalstärke, ein pH >7,6 erhöht den Hintergrund (Peroxidase-Reaktion).

- Pufferlösungen für DAB nicht mit NaOH titrieren, wenn das DAB mit Blut in Kontakt kommen soll. Das Eisen im Hämoglobin oxidiert bei NaOH-Anwesenheit sofort DAB und bildet einen braunen Farbstoff.

- Arbeitslösung immer frisch ansetzen. Die Reaktion benötigt hohe Konzentrationen an frischem Wasserstoffperoxid.

- Die Zugabe von Imidazol erhöht die Sensitivität

- Ultradünnschnitte und Western-Blots können direkt im Färbereagenz inkubiert werden. Stärkere Schnitte sollten vor Zugabe des Wasserstoffperoxids für 5 bis 15 Minuten in der DAB-Lösung inkubiert werden, um die Diffusion des DABs an die Targetmoleküle zu ermöglichen.

- DAB ist nicht geeignet zum Nachweis von Peroxidasen und Katalasen aus *Caenorhabditis elegans* (Togo et al., 2000, Eur. J. Biochem. 267:1307-12)

IV. Signalverstärkung

Im Western-Blot und bei Gewebsschnitten kann die Sensitivität und Intensität der Farbreaktion durch Metallionen (Nickel, Kupfer, Kobalt, Silber) und Imidazol erhöht werden (z.B. Green et al., 1989, J. Clin. Pathol. 42:875-80).

Wir empfehlen die Verstärkung mittels Nickel- oder Cobaltchlorid in Verbindung mit Imidazol:

0,05-0,1 % NiCl₂ in DAB/0,05 M Tris-Cl Puffer, pH 7,6 oder 0,02-0,06 % CoCl₂ in DAB/0,1 M Na-Phosphat Puf., pH 7,3

- Zugabe von Metallsalz, gut mischen

- Zugabe von Imidazol ad 0,07 % (10 mM), gut mischen

- Zugabe von H₂O₂ ad 0,01 %, gut mischen

- Inkubation bis zur gewünschten Farbtiefe (ca. 5 - 15 min)

Bitte beachten:

- Schnitte, die mit DAB/Metallionen gefärbt wurden, können dehydriert und hydrophob eingebettet werden.

- Die Metallsalzmenge kann zur Regulation der Farbstärke zwischen 0,01 und 0,25 % variiert werden. Nickel und Cobalt können auch gleichzeitig eingesetzt werden, was häufig die Gewebskontrastdarstellung weiter verbessert.

- Ultradünnschnitte und Western-Blots können direkt im Färbereagenz inkubiert werden. Stärkere Schnitte sollten vor Zugabe des Wasserstoffperoxids für 5 bis 15 Minuten in der DAB / Enhancer-Lösung inkubiert werden, um die Diffusion des DABs an die Targetmoleküle zu ermöglichen.

V. Lagerung

Lyophilisat: +4 °C

Lagerung der Stocklösung in Aliquots bei -20 °C

VI. Weitere Reagenzien


ROTI®Stock 10X PBS *ready-to-use* Lösung Best.-Nr. 1058

ROTI®Stock 10X TBS *ready-to-use* solution Best.-Nr. 1060
Wasserstoffperoxid 30 % Best. Nr. 8070

Imidazol Best.-Nr. X998

Nickel(II)-chlorid Hexahydrat Best.Nr. 4489

Kobalt(II)-chlorid Hexahydrat Best.-Nr. T889

 **Achtung** H315-H319-H335-H341-H351
P202-P261-P280-P305+P351+P338-P308+P313

Voller Wortlaut der Gefahren- und Sicherheitshinweise
siehe Sicherheitsdatenblatt Abschnitt 2.2

Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid

CN75.1	1 g
CN75.2	5 g
CN75.3	10 g

Carl Roth GmbH + Co. KG

Schoemperlenstraße 3-5 • 76185 Karlsruhe

Postfach 100121 • 76231 Karlsruhe

Telefon: +49 (0) 721/ 5606-0

Fax: +49 (0) 721/ 5606-149

info@carlroth.de • www.carlroth.de

ip 07/2021

Die Firma ist eine Kommanditgesellschaft mit Sitz in Karlsruhe, Reg. Gericht Mannheim HRA 100055. Persönlich haftende Gesellschafterin ist die Roth Chemie GmbH mit Sitz in Karlsruhe, Reg. Gericht Mannheim HRB 100428. Geschäftsführer: André Houdelet

Instructions for use



Diaminobenzidin (DAB) CN75

3,3',4,4'-Tetra-aminobiphenyl tetrahydrochloride

**Substrate of horseradish peroxidase.
For detection of endogenous peroxidase and for immunohistochemical stainings.**

I. Introduction

Popular substrate of peroxidases. DAB is used for biochemical and histological detection of endogenous peroxidases like katalase and cytochrome oxidase. Additionally, it is the most common substrate for horseradish peroxidase (HRP) in histochemical and cytological assays. Suitable for staining of sections and Western-Blots. Also suitable for detection of activity of endogenous peroxidases in Mitochondria and in Peroxisomes.

II. Mechanism

DAB is oxidised by HRP, forming a brown precipitate, which is insoluble in aqueous and organic solvents. This precipitate can be detected in visible light and does not bleach during long-term storage.

III. Application

Reconstitution: 5 % in distilled water (add few drops of HCl if DAB does not dissolve completely.)

III.1 Detection of Peroxidase

Stock solution: 1 % (10 mg/ml) in 50 mM Tris buffer, or phosphate buffer (e.g. PBS), pH approx. 7.3

Working concentration: 0.05 - 0.1 % (0.5 - 1 mg/ml)

Incubation Buffer: Tris- or phosphate buffered systems like e.g. 0.05 M Tris-Cl or 0.1 M Na-Phosphate buffer, pH 7.2 bis 7.6, PBS, TBS
Optional: Add 50 – 100 mM imidazole

1. Add 3 ml DAB stock solution (1 %) to 27 ml incubation buffer (final conc. 0.1 %) and mix well.
2. Add 10 µl of 30 % fresh hydrogen peroxide and mix well.
3. Incubate sections or Blots in the staining solution up to the colour intensity required (approx. 5 - 15 mins.)
4. Wash in water or pure incubation buffer (3 x 1 min)
5. Counterstain if required
6. Embed

III.2 Detection of Catalases

Working concentration: 1 - 2 % (10 - 20 mg/ml)

Incubation Buffer: Highly alkaline buffer, like e. g. glycine-NaOH or 50 mM Veronal acetate or Tricine-buffer. pH 9 – 10.5

Note:

- DAB has to be dissolved in water. Solubilisation in buffer leads to cloudy solutions, presumably due to formation of the free base of DAB.
- The pH of the incubation buffer is essential! pH <7.0 diminishes staining intensity, pH >7.0 enhances background staining (peroxidase-staining).
- Do not titrate buffer solutions for DAB with NaOH, if DAB shall be used with blood. In the presence of NaOH, the iron of the hemoglobine starts oxidising DAB at once, resulting in a precipitating brown dye.
- Always use freshly prepared working solution. For oxidation high concentrations of fresh hydrogen peroxide are needed.
- Addition of Imidazole enhances sensitivity of the staining.
- Ultra-thin-sections and Western-Blots may be incubated directly in the staining mix. Thicker sections should be incubated for approx. 5 mins. in DAB solution prior to adding the hydrogen peroxide, in order to allow the DAB to diffuse to the target molecules.
- DAB is not suitable for detection of Peroxidase or Catalase of *Caenorhabditis elegans* (Togo *et al.*, 2000, *Eur. J. Biochem.* 267:1307-12).

IV. Signal enhancement

In Western-Blot systems as well as in sections, sensitivity and intensity of staining may be enhanced by a colour reaction of metal ions (Nickel, Copper, Cobalt, Silver) and Imidazole (e.g. Green *et al.*, 1989, *J. Clin. Pathol.* 42:875-80). We recommend enhancement by Nickel-, or Cobalt chloride combined with Imidazole:
0.05-0.1 % NiCl₂ in DAB/0.05 M Tris-Cl buffer, pH 7.6 or
0.02-0.06 % CoCl₂ in DAB/0.1 M Na-Phosphate buf. pH 7.3

- Addition of metal salt, mix well
- Addition of Imidazole ad 0.07 % (10 mM), mix well
- Addition of H₂O₂ ad 0.01 %, mix well
- Incubation up to the colour intensity required (approx. 5 - 15 mins.)

Note:

- Sections stained with DAB/metal ions may be dehydrated and embedded hydrophobously.
- In order to optimize staining, the amount of metal salts may be varied from 0.01 to 0.25 %. Nickel and Cobalt may also be added in parallel, in many cases further enhancing the contrast of stained tissue.
- Ultra-thin-sections and Western-Blots may be incubated directly in the staining mix. Thicker sections should be incubated for approx. 5 mins. in DAB / enhancer solution prior to adding the hydrogen peroxide, in order to allow the DAB to diffuse to the target molecules.

V. Storage

Lyophilisate: +4 °C

Storage of stock solution in aliquots at -20 °C

VI. Further Reagents

ROTI®Stock 10X PBS ready-to-use solution

Art. No. 1058

ROTI®Stock 10X TBS ready-to-use solution


Art. No. 1060

Hydrogen peroxide 30 % Art. No. 8070

Imidazole Art. No. X998

Nickel(II) chloride hexahydrate Art. No. 4489

Cobalt(II) chloride hexahydrate Art. No. T889

 **Warning** H315-H319-H335-H341-H351
P202-P261-P280-P305+P351+P338-P308+P313

Full text of hazard- and precautionary statements
see material safety data sheet section 2.2

Diaminobenzidin tetrahydrochloride

CN75.1	1 g
CN75.2	5 g
CN75.3	10 g