

Histostain[®]-Plus Kits

Invitrogen[®] 2nd Generation

LAB-SA Detection System

<u>CAT. NO.</u>	<u>FOR PRIMARY ANTIBODY</u>	<u>CHROMOGEN</u>	<u>GOOD FOR</u>
85-9643	Broad Spectrum*	DAB	150 slides

*Will react with mouse, rabbit, guinea pig and rat primary antibodies.

INTENDED USE

For In Vitro Diagnostic Use. CAUTION: Not for human or animal therapeutic use. Uses other than the labeled intended use may be a violation of local law.

Interpretation must be made within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a qualified pathologist.

Histostain[®]-Plus kits are designed to reveal antigens that have reacted with a user-supplied primary antibody on human tissue or cell samples.

Frozen or paraffin-embedded tissues, freshly prepared lymphocytes, and fixed cultured cells can be used.

BACKGROUND

In 1987 Invitrogen Laboratories, Inc. introduced the Histostain[®]-SP detection kit—the first commercial kit to use the labeled-(strept)avidin-biotin (LAB-SA) method. Since then, LAB-SA (also known as Streptavidin-Biotin Amplification) has been acknowledged as the premier detection method for IHC⁽¹⁻⁴⁾. LAB-SA methodology is now widely used in basic research and routine testing. Histostain[®]-Plus kits use Invitrogen's second generation LAB-SA technology. This enhanced LAB-SA system provides enhanced sensitivity and performance in immunohistochemistry (IHC) applications. DAB stained slides can be dehydrated and permanently mounted using Histomount[™] mounting medium. Histostain[®]-Plus kits are designed to reveal the presence of antigens in human tissue or cell preparations. These kits can be used with all common sample preparation methods, including: frozen tissues, paraffin-embedded sections, and cell smears.

After formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections have been deparaffinized in xylene and dehydrated in a graded series of ethanol, an endogenous peroxidase quenching step is performed. This endogenous peroxidase activity can be quenched by either using 3% hydrogen peroxide in methanol or Invitrogen's Peroxo-Block[™] (Cat. No. 00-2015). Non-immune serum is used to eliminate non-specific background. After a user-supplied primary antibody has been incubated with a sample, Invitrogen's LAB-SA method uses an enhanced, human-absorbed, biotinylated, affinity-purified secondary antibody to react with the primary antibody. Enhanced horseradish peroxidase conjugated streptavidin (HRP-SA) is then bound to the biotinylated secondary antibody. The DAB then is used to create an intense brown deposit around the antigen/antibody/enzyme complex in the sample. Histostain[®]-Plus kits can also be used with automated stainers. Call Invitrogen's technical service for details.

Invitrogen offers prediluted 2ndGen primary antibodies that are ready-to-use with Histostain[®]-Plus kits. For a complete list of our primary antibodies, call for a free copy of Invitrogen Pathology Catalog or call Invitrogen's technical service for details.

STORAGE AND SHELF LIFE

Store kit at 2-8°C. All performance claims are void after kit expiration date.

REAGENTS SUPPLIED

Reagent A. One dropper bottle (15 mL) of ready-to-use serum blocking solution, 10% non-immune serum (goat)

Reagent B. One dropper bottle (15 mL) of ready-to-use biotinylated secondary antibody

Reagent C. One dropper bottle (15 mL) of ready-to-use streptavidin-peroxidase conjugate

Reagent D1. One dropper bottle (3 mL) of concentrated substrate buffer (20x)

Reagent D2. One dropper bottle (3 mL) of concentrated chromogen solution, DAB (20x)

Reagent D3. One dropper bottle (3 mL) of 0.6% hydrogen peroxide (20x)

REAGENTS AND MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

– Xylene, ethanol, and absolute methanol

– Distilled or deionized water

– 30% hydrogen peroxide

– 10 mM phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4 or 50 mM Tris-buffer saline (TBS), pH 7.8. Optional: 0.05% Tween 20.

– Mini PAP Pen (Invitrogen Cat. No 00-8877)

– Primary antibody

– Hematoxylin (Invitrogen Cat. No. 00-8001)

– Mounting Media: GVA (Invitrogen Cat. No. 00-8000), Clearmount[™] (Invitrogen Cat. No. 00-8110), or Histomount[™] (Invitrogen Cat. No. 00-8030)

SUGGESTED STAINING PROTOCOL

A. PRELIMINARY PREPARATION OF SLIDES

<u>1. SPECIMEN PREPARATION</u>	<p>-Appropriate tissue and antigen fixation is required to obtain reproducible performance and reliable interpretations. Suitable fixatives include: 10% neutral buffered formalin, B5, Bouin's, Zinc formalin or alcohol-base fixatives.</p> <p>-10% neutral buffered formalin, B5, Bouin's, Zinc formalin or alcohol-base fixatives are regarded as suitable fixatives for most antigens of clinical significance.</p> <p>- Formalin-fixed tissues post-fixed in B5 before paraffin embedding may show improved stain. Cell smears prepared from body fluids should be made to assure a monolayer of cells. Multilayers of cells can trap staining reagents and interfere with the interpretation of the results. Smears should be fixed immediately after preparation. Depending on the properties of the antigen, cell smears are usually stable for one to two weeks when stored at 4°C.</p> <p>- Fixation of cytospin or frozen sections can be done with acetone (100%) at 4°C for a period of 10 minutes.</p>
<u>2. SLIDE PREPARATION</u>	<p>-Precoat slides with HistoGrip™ (Invitrogen Cat. No. 00-8050). As an alternative, precoat with 0.1% poly-L-lysine in water, then air dry.</p>
<u>3. DEPARAFFINIZATION AND REHYDRATION</u>	<p>-Paraffin sections are deparaffinized with xylene and rehydrated in a graded series of ethanol. Wash cell smears or tissue in a PBS bath for 10 minutes before starting the staining procedure. Note: Do not allow specimen or tissue sections to dry from this point on.</p>
<u>4. CONTROL SLIDES</u>	<p>Three control slides are necessary for the interpretation of results.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Positive Tissue Control: A specimen, processed in the same way as the unknown, contains the antigen to be stained. • Reagent Control/Negative Control-1: An additional slide that will be treated with a non-immune serum instead of same concentration of primary antibody. Any staining observed on the specimen is probably due to non-specific protein binding or non-specific binding of other reagents. • Negative Control-2: A specimen, processed in the same way as the unknown, does not contain the antigen to be stained [optional].

B. STAINING PROTOCOL

Reagent	Specimen Preparation	Incubation Time (Min.)
<u>1. PEROXIDASE QUENCHING SOLUTION</u> (Not provided)	<p>This step is optional. Do step 1 if elimination of endogenous peroxidase activity is necessary.</p> <ol style="list-style-type: none"> a. For paraffin-embedded tissues, add 1 part of 30% hydrogen peroxide to 9 parts of absolute methanol. Mix well. b. Submerge slides in PEROXIDASE QUENCHING SOLUTION for 10 minutes. c. Wash with PBS 2 min., 3 times. Proceed to Step 2. <p>For frozen tissue, treat with Peroxo-Block™ (cat. no. 00-2015) for 45 sec. Wash immediately.</p>	10 (Optional)
<u>2. SERUM BLOCKING SOLUTION</u> Ready-to-use. Reagent A	<p>This step can be omitted if primary antibody contains a protein blocker (e.g. 10% non-immune serum).</p> <ol style="list-style-type: none"> a. Add 2 drops (100 µL) or enough to completely cover tissue, of SERUM BLOCKING SOLUTION to each section. Incubate for 10 min. b. Drain or blot off solution. DO NOT RINSE. 	10
<u>3. PRIMARY ANTIBODY</u> (Not provided).	<p>Optimal dilution and incubation times should be determined by the investigator. 2ndGen Primary antibodies are optimized for use with Histostain-Plus detection kits. (Dilution and incubation time are dependent on sample preparation, antibody affinity, amt. of antigen present, and antigen accessibility).</p> <ol style="list-style-type: none"> a. Apply 2 drops (100 µL) or enough to completely cover tissue, of PRIMARY ANTIBODY to each section. b. Incubate in moist chamber for 30-60 min. c. Rinse with PBS for 2 min., 3 times. 	30-60
<u>4. BIOTINYLATED SECOND ANTIBODY</u> Ready-to-use. Reagent B	<ol style="list-style-type: none"> a. Apply 2 drops (100 µL) or enough to completely cover tissue, of BIOTINYLATED SECOND ANTIBODY to each section. Incubate for 10 min. (For rat primary antibodies, incubate for 20 min.) b. Rinse with PBS for 2 min., 3 times. 	10
<u>5. ENZYME CONJUGATE</u> Ready-to-use. Reagent C	<ol style="list-style-type: none"> a. Apply 2 drops (100 µL) or enough to completely cover tissue, of ENZYME CONJUGATE to each section. Incubate for 10 min. b. Rinse with PBS for 2 min., 3 times. 	10
<u>6. DAB CHROMOGEN</u> Reagents D1, D2 and D3 20x concentrated components.	<ol style="list-style-type: none"> a. Add 1 drop of Reagent D1, 2 drops of Reagent D2 and 1 drop of Reagent D3 to 1 mL distilled or deionized water. Mix well. Protect from light and use within one hour. b. Apply 2 drops (100 µL) or enough to completely cover tissue, of DAB CHROMOGEN to each section. Incubate for 3-10 min. c. Rinse well with distilled water. 	3-10

From this point on, the investigator should proceed with his or her own established laboratory protocols for counterstaining and mounting. Invitrogen recommends using Hematoxylin (Cat. No. 00-8001) as a counterstain and either Histomount™ (Cat. No. 00-8030) for DAB or Clearmount™ (Cat. No. 00-8010) as a mounting solution for AEC or DAB.

www.invitrogen.com

Invitrogen Corporation • 542 Flynn Rd • Camarillo • CA 93012 • Tel: 800.955.6288 • E-mail: techsupport@invitrogen.com

PI 85-9643 (PIN 31296)

(Rev 09/09) DCC-09-1008

© 2007 Invitrogen Corporation. All right reserved. These products may be covered by one or more Limited Use Label Licenses (see the Invitrogen Catalog or www.invitrogen.com). By use of these products you accept the terms and conditions of all applicable Limited Use Label Licenses.

INTERPRETATION OF RESULTS

The following table interprets results which might be achieved using various staining controls.

Case No.	+ control	reagent control	(-) control	Sample	Analysis
1	-	-	-	-	Procedure performed incorrectly.
2	+	+	+	+	Non-specific staining due to protein binding or endogenous peroxidase activity.
3	+	-	+	+/-	Negative control contains the antigen.
4	-	-	-	+	Positive control does not contain the antigen.
5	+	-	-	-	Sample does not contain the antigen.
6	+	-	-	+	Sample contains the antigen.

TROUBLESHOOTING

Possible causes for negative staining on positive slides:

1. Steps in the staining protocol were performed in incorrect sequence.
2. Primary or secondary antibody incubation steps were omitted.
3. Labile antigens were destroyed.
4. Specimen was improperly fixed and/or processed.
5. Specimen dehydrated during staining.

Possible causes for weak staining on all slides:

1. Specimen retained excess liquid after rinsing steps.
2. Incubation times were insufficient.
3. Substrate prepared improperly.
4. Deparaffinization was incomplete (staining may be accompanied by high background).

Possible causes for high background staining:

1. Endogenous peroxidase activity was incompletely blocked.
2. Deparaffinization was incomplete.
3. Excessive application of tissue adhesive.
4. Inadequate rinsing of slides.
5. Over-development of substrate.
6. Dehydration of specimen during staining.

REFERENCES

1. Elias JM, et al. *AM J Clin Pathol* 92:62-67, 1989.
2. Hsu SM and Raine L. In: *Advances in Immunochem* R.A.DeLellis, ed., Mason Publishing USA, Inc., New York, 1984, pp. 31-42.
3. Warnke R and Levy R. *J Histochem Cytochem* 28: 771-776, 1980.
4. Shi Z, et al. *J. Histochem Cytochem* 36(3): 317-322, 1988.

TRADEMARKS

NBA™, CAS-Block™, Clearmount™, HistoGrip™, Histomount™, and Peroxo-Block™ are trademarks of Zymed Laboratories, Inc. Zymed® and Histostain® are registered trademarks of Zymed Laboratories, Inc.

For more detailed information please refer to www.invitrogen.com.

IF YOU HAVE ANY QUESTIONS ABOUT THIS PRODUCT PLEASE CONTACT YOUR LOCAL DISTRIBUTOR

Authorized Representative for IVDD 98/79/EC: Invitrogen Ltd.
Inchinnan Business Park
3 Fountain Drive
Paisley
PA4 9RF
UK

www.invitrogen.com

Invitrogen Corporation • 542 Flynn Rd • Camarillo • CA 93012 • Tel: 800.955.6288 • E-mail: techsupport@invitrogen.com

PI 85-9643 (PIN 31296)

(Rev 09/09) DCC-09-1008

© 2007 Invitrogen Corporation. All right reserved. These products may be covered by one or more Limited Use Label Licenses (see the Invitrogen Catalog or www.invitrogen.com). By use of these products you accept the terms and conditions of all applicable Limited Use Label Licenses.

Paquetes Histostain-Plus®

Segunda generación de Invitrogen®

Sistema de detección LAB-SA

<u>Nº. DE CAT.</u>	<u>PARA ANTICUERPO PRIMARIO</u>	<u>CROMÓGENO</u>	<u>RECOMENDADO PARA</u>
85-9643	Amplio espectro*	DAB	150 portaobjetos

*Reaccionará con anticuerpos primarios de ratón, conejo, cobaya y rata.

PROPÓSITO DE USO

Para utilización en diagnóstico in vitro. La interpretación de los resultados debe realizarla un patólogo cualificado, dentro del contexto de la historia clínica del paciente y otras pruebas diagnósticas. Los paquetes Histostain®-Plus están diseñados para revelar antígenos que han reaccionado con un anticuerpo primario suministrado por el usuario en el tejido humano o en muestras de células. Se pueden usar tejidos congelados o en parafina, linfocitos preparados recientemente o células cultivadas fijadas.

ALMACENAMIENTO Y CONSERVACIÓN

Guardar el paquete entre 2°C a 8°C. Todas las reclamaciones sobre rendimiento serán nulas pasada la fecha de caducidad.

REACTIVOS SUMINISTRADOS

- Reactivo A. Un frasco cuentagotas (15 mL) de solución bloqueante con suero lista para usar, suero no inmune al 10% (cabra).
- Reactivo B. Un frasco cuentagotas (15 mL) de anticuerpo secundario biotinilado listo para usar
- Reactivo C. Un frasco cuentagotas (15 mL) de conjugado de estreptavidina-peroxidasa listo para usar
- Reactivo D1. Un frasco cuentagotas (3 mL) de tampón-sustrato concentrado (20x)
- Reactivo D2. Un frasco cuentagotas (3 mL) de solución de cromógeno concentrado, DAB (20x)
- Reactivo D3. Un frasco cuentagotas (3 mL) de peróxido de hidrógeno al 0,6% (20x)

REACTIVOS Y MATERIALES NO SUMINISTRADOS

- Xileno, etanol y metanol puro
- Agua destilada o desionizada
- Peróxido de hidrógeno al 30%
- Tampón fostafo salino 10 mM (PBS), pH 7,4 o Tris-HCl tampón salino 50 mM (TBS), pH 7,8. Opcional: Tween20 al 0,05%.
- Lápiz Mini PAP (Invitrogen, nº. de cat. 00-8877)
- Anticuerpo primario
- Hematoxilina (Invitrogen, nº. de cat. 00-8001)
- Medios de montaje (Invitrogen, nº. de cat. 00-8000)
 - Clearmount™ (Invitrogen, nº. de cat. 00-8110)
 - Histomount™ (Invitrogen, nº. de cat. 00-8030)

PROTOCOLO DE TINCIÓN SUGERIDO

A. PREPARACIÓN PRELIMINAR DE PORTAOBJETOS

<u>1. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA</u>	<ul style="list-style-type: none"> - Se necesita una fijación tisular y de antígenos apropiada para obtener comportamientos reproducibles e interpretaciones fiables. Algunos fijadores apropiados: fijadores de formalina neutra tamponada al 10%, de tipo B5, de Bouin, de formalina de Zinc o fijadores alcohólicos. - Se deberían preparar extensiones celulares directamente con fluidos corporales para asegurar una monocapa de células. Se deberían fijar las extensiones inmediatamente después de su preparación. Dependiendo de las propiedades del antígeno, las extensiones celulares suelen mantenerse estables durante una o dos semanas cuando se guardan a 4°C. - La fijación de los cortes centrifugados o congelados pueden hacerse con acetona al 100% a 4°C durante 10 minutos.
<u>2. PREPARACIÓN DE PORTAOBJETOS</u>	<ul style="list-style-type: none"> - Poner inicialmente una capa de HistoGrip™ (Invitrogen, nº. de cat. 00-8050). Como alternativa, se puede poner una capa inicial de poli-L-lisina al 0,1% en agua y secarla posteriormente al aire.
<u>3. DESPARAFINACIÓN Y REHIDRATACIÓN</u>	<ul style="list-style-type: none"> - Los cortes de parafina se desparafinan con xileno y se rehidratan con series graduales de etanol. Lavar las extensiones celulares o el tejido en un baño de PBS durante 10 minutos antes de empezar con el procedimiento de tinción.
<u>4. PORTAS DE CONTROL</u>	<ul style="list-style-type: none"> Son necesarios tres portas de control para la interpretación de los resultados. • Control Tisular Positivo: un espécimen, procesado de la misma manera que el desconocido, contiene el antígeno que debe teñirse. • Reactivo Control/Control Negativo-1: un porta adicional, que se tratará con un suero no-inmune en lugar de tratarse con la misma concentración de anticuerpo primario. Cualquier tinción observada en el espécimen es probablemente debida a la unión no-específica de proteína o a la unión no-específica de otros agentes. • Control Negativo-2: un espécimen, procesado de la misma manera que el desconocido, no contiene el antígeno que se debe teñir [opcional]

Nota: evite que se sequen la muestra o los cortes tisulares durante los siguientes pasos.

PROCOLO DE TINCIÓN SUGERIDO (CONTINUACIÓN)

B. PROCOLO DE TINCIÓN

Reactivo	Preparación de la muestra	TIEMPO DE INCUBACIÓN (minutos)
1. SOLUCIÓN PARA LA ELIMINACIÓN DE LA PEROXIDASA (NO suministrada)	Este paso es opcional. Realice este paso cuando se necesite eliminar actividad de la peroxidasa endógena. a. Para tejidos en parafina, añadir 1 parte de peróxido de hidrógeno al 30% a nueve partes de metanol puro (o sin diluir). Mezclar bien. b. Bañar los portaobjetos de la SOLUCIÓN PARA LA ELIMINACIÓN DE LA PEROXIDASA durante 10 minutos. c. Lavar con PBS (2 minutos, 3 veces). Seguir con el paso 2. En el caso de tejidos congelados, trátelos con Peroxo-Block™ (nº. de cat. 00-2015) durante 45 segundos. Lavar inmediatamente.	10 (opcional)
2. SOLUCIÓN BLOQUEANTE CON SUERO Lista para usar. Reactivo A	Se puede prescindir de este paso si el anticuerpo primario tiene un bloqueador de proteínas (por ejemplo, suero no inmune al 10%). a. Añadir 2 gotas (100 µL) de SOLUCIÓN BLOQUEANTE CON SUERO a cada corte, o lo suficiente como para cubrir completamente el tejido. Incubar durante 10 minutos. b. Drenar o secar suavemente la solución con papel absorbente. NO ENJUAGAR.	10
3. ANTICUERPO PRIMARIO (NO suministrada).	Los tiempos óptimos de disolución y de incubación deberán ser determinados por el investigador. Los anticuerpos primarios de segunda generación están optimizados para ser usados con los paquetes de detección. (Los tiempos de disolución y de incubación dependen de la preparación de la muestra, la afinidad del anticuerpo, la cantidad de antígeno presente y la accesibilidad del antígeno). a. Añadir 2 gotas (100 µL) de ANTICUERPO PRIMARIO a cada corte, o lo suficiente como para cubrir completamente el tejido. b. Incubar en una cámara de humedad durante 30-60 minutos. c. Enjuagar con PBS (2 minutos, 3 veces).	30-60
4. ANTICUERPO SECUNDARIO BIOTINILADO Listo para usar. Reactivo B	a. Añadir 2 gotas (100 µL) de ANTICUERPO SECUNDARIO BIOTINILADO a cada corte, o lo suficiente como para cubrir completamente el tejido. Incubar durante 10 minutos. (En el caso de anticuerpos primarios de rata, incubar durante 20 minutos). b. Enjuagar con PBS (2 minutos, 3 veces).	10
5. CONJUGADO ENZIMÁTICO Listo para usar. Reactivo C	a. Añadir 2 gotas (100 µL) de CONJUGADO ENZIMÁTICO a cada corte, o lo suficiente como para cubrir completamente el tejido. Incubar durante 10 minutos. b. Enjuagar con PBS (2 minutos, 3 veces).	10
6. CROMÓGENO DAB Componentes concentrados (20x) de los reactivos D1, D2 y D3.	a. Añadir 1 gota del reactivo D1, 2 gotas del reactivo D2 y 1 gota del reactivo D3 a 1 mL de agua destilada o desionizada. Mezclar bien. Proteger de la luz y usar durante la hora siguiente. b. Añadir 2 gotas (100 µL) de CROMÓGENO DAB a cada corte, o lo suficiente como para cubrir completamente el tejido. Incubar durante 3-10 minutos. c. Enjuagar bien con agua destilada.	3-10

A partir de este punto, el investigador debe proceder siguiendo sus propios protocolos de laboratorio para la contratinción y el montaje. Invitrogen recomienda el uso de Hematoxilina (Cat. Nº 00-8001) como contratinción y, o bien Histomount™ (Cat. Nº 00-8030) para DAB o Clearmount™ (Cat. Nº 00-8010) como solución de montaje para AEC o DAB.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

La tabla siguiente interpreta los resultados que podrían alcanzarse usando varios controles de tinción.

Caso Nº.	+ control	reactivo control	(-) control	Muestra	Análisis
1	-	-	-	-	Procesamiento incorrecto.
2	+	+	+	+	Tinción no-específica debida a la unión de proteína o a la actividad de la peroxidasa endógena.
3	+	-	+	+/-	El control negativo contiene el antígeno.
4	-	-	-	+	El control positivo no contiene el antígeno.
5	+	-	-	-	La muestra no contiene el antígeno.
6	+	-	-	+	La muestra contiene el antígeno.

www.invitrogen.com

Invitrogen Corporation • 542 Flynn Rd • Camarillo • CA 93012 • Tel: 800.955.6288 • E-mail: techsupport@invitrogen.com

PI 85-9643 (PIN 31296)

(Rev 09/09) DCC-09-1008

© 2007 Invitrogen Corporation. All right reserved. These products may be covered by one or more Limited Use Label Licenses (see the Invitrogen Catalog or www.invitrogen.com). By use of these products you accept the terms and conditions of all applicable Limited Use Label Licenses.

DETECCIÓN Y DIAGNÓSTICO DE AVERÍAS

Causas posibles de la tinción negativa en portaobjetos positivos:

1. Los pasos en el protocolo de tinción se realizaron en una secuencia incorrecta.
2. Se omitieron los pasos de incubación del anticuerpo primario o secundario.
3. Se destruyeron antígenos lábiles.
4. La muestra no se fijó y/o procesó correctamente.
5. La muestra se deshidrató durante la tinción.

Causas posibles de la tinción débil en todos los portaobjetos:

1. La muestra retuvo exceso de líquido después de los aclarados.
2. Los tiempos de incubación no fueron suficientes.
3. El sustrato no se preparó correctamente.
4. La desparafinización fue incompleta (la tinción puede acompañarse por un fondo elevado).

Causas posibles para la tinción elevada del fondo:

1. La actividad de la peroxidasa endógena no se bloqueó completamente.
2. La desparafinización fue incompleta.
3. Aplicación excesiva del adhesivo tisular.
4. Aclarado inadecuado de los portaobjetos.
5. Excesivo desarrollo del sustrato.
6. Deshidratación de la muestra durante la tinción.

MARCAS COMERCIALES

CAS-Block™, Clearmount™, HistoGrip™, Histomount™ y Peroxo-Block™ son marcas comerciales de Zymed Laboratories, Inc. Zymed® y Histostain® son marcas comerciales registradas de Zymed Laboratories, Inc.

**Para obtener más información vea la versión inglesa de la ficha técnica o vaya a www.invitrogen.com.
SI TIENE ALGUNA PREGUNTA SOBRE ESTE PRODUCTO, DIRÍJASE A SU DISTRIBUIDOR LOCAL.**

Representante autorizado de IVDD 98/79/EC: Invitrogen Ltd.
 Inchinnan Business Park
 3 Fountain Drive
 Paisley
 PA4 9RF
 UK

www.invitrogen.com

Invitrogen Corporation • 542 Flynn Rd • Camarillo • CA 93012 • Tel: 800.955.6288 • E-mail: techsupport@invitrogen.com

PI 85-9643 (PIN 31296)

(Rev 09/09) DCC-09-1008

© 2007 Invitrogen Corporation. All right reserved. These products may be covered by one or more Limited Use Label Licenses (see the Invitrogen Catalog or www.invitrogen.com). By use of these products you accept the terms and conditions of all applicable Limited Use Label Licenses.

Equipements Histocoloration-® Plus Invitrogen® 2^{ème} Génération Système de Détection LAB-SA

<u>CAT. NO.</u>	<u>POUR ANTICORPS PRIMAIRE</u>	<u>CHROMOGENE</u>	<u>BON POUR</u>
85-9643	Spectre Large*	DAB	150 lames

*Réagira avec les anticorps primaires des souris, des lapins, des cobayes et des rats.

UTILISATION VOULUE

Pour Utilisation de Diagnostiques In Vitro. L'interprétation doit être faite par un pathologiste qualifié dans le cadre des antécédents cliniques du patient et d'autres tests de diagnostics. L'équipement®-Plus est conçu pour révéler les antigènes qui ont réagi à l'anticorps primaire fourni par l'utilisateur sur un tissu humain ou des échantillons de cellules. Des tissus gelés ou de paraffine-incluse, lymphocytes fraîchement préparés, et des cellules fixées de culture peuvent être utilisés.

STOCKAGE ET DUREE DE CONSERVATION

Garder l'équipement à 2-8°C. Toute réclamation de performance est non recevable après la date d'expiration de l'équipement.

REACTIFS FOURNIS

- Réactif A. Une bouteille compte-gouttes (15 mL) de solution bloquante de sérum, prête à l'utilisation, 10% de sérum non-immun (chèvre).
- Réactif B. Une bouteille compte-gouttes (15 mL) d'anticorps second biotinylaté, prêt à l'utilisation.
- Réactif C. Une bouteille compte-gouttes (15 mL) de streptavidine-peroxydase conjugué, prêt à l'utilisation.
- Réactif D1. Une bouteille compte-gouttes (3 mL) de substrat tampon concentré 20x).
- Réactif D2. Une bouteille compte-gouttes (3 mL) de solution de chromogène DAB concentrée (20X).
- Réactif D3. Une bouteille compte-gouttes (3 mL) 0.6% de peroxyde d'hydrogène (20X).

REACTIFS ET MATERIELS NECESSAIRES MAIS PAS FOURNIS

- Xylène, éthanol, et méthanol absolu
- Eau distillée ou deionisée
- 30% peroxyde d'hydrogène
- 10 mM phosphate-tampon salin (PBS), pH 7.4 ou 50 mM Tris-tampon salin (TBS), pH 7.8. Optionnel: 0.05% Tween 20.
- Mini PAP Pen (Invitrogen Cat. No 00-8877)
- Anticorps primaire
- Hématoxyline (Invitrogen Cat. No. 00-8001)
- Monture Média (Invitrogen Cat. No. 00-8000)
 - Clearmount™ (Invitrogen Cat. No. 00-8110)
 - Histomount™ (Invitrogen Cat. No 00-8030)

PROTOCOLE DE COLORATION SUGGERE

A. PREPARATION PRELIMINAIRE DES LAMES.

<u>1. PREPARATION DE SPECIMENS :</u>	Un tissu approprié et une fixation d'antigène sont nécessaires pour obtenir une performance reproductible et des interprétations fiables. Fixatifs inclus appropriés: 10% de formaline neutrale tamponnée, B5, Bouin, formaline de Zinc ou fixatifs à base d'alcool. -Un frottis de cellules préparé à partir de fluides corporels doit être fait pour assurer une couche monomoléculaire de cellules. Le frottis doit être fixé immédiatement après la préparation. Selon les propriétés de l'antigène, les frottis cellulaires sont habituellement stables pendant une ou deux semaines si garder à 4°C. - Fixation de cytopspine ou sections gelées peuvent être faites avec de l'acétone (100%) à 4°C pendant une période de 10 minutes.
<u>2. PREPARATION DE LAMES :</u>	- Prênduire les lames avec du HistoGrip™ (Invitrogen Cat. No. 00-8050). En alternative, prênduire avec 0.1% poly-L-lysine dans l'eau, puis sécher à l'air.
<u>3. DEPARAFFINAGE ET REHYDRATATION:</u>	-Les sections de paraffine sont déparaffinées avec du xylène et réhydratées en une série graduée d'éthanol. Laver les frottis cellulaires ou le tissu dans un bain de PBS pendant 10 minutes avant de commencer la procédure de coloration.
<u>4. LAMES TÉMOINS</u>	Trois lames témoins seront nécessaires pour interpréter les résultats. • Témoin tissulaire positif : un spécimen traité de la même façon que l'inconnu contient l'antigène à colorer. • Témoin réactif / Témoin négatif - 1 : une lame supplémentaire qui sera traitée avec un sérum non immunitaire au lieu d'une même concentration de l'anticorps primaire. Il est probable que toute coloration observée sur le spécimen soit causée par une fixation non spécifique de protéine ou une fixation non spécifique d'autres réactifs. • Témoin négatif - 2 : un spécimen traité de la même façon que l'inconnu ne contient pas l'antigène à colorer [facultatif].

Note: Ne pas laisser sécher des sections de spécimen ou de tissu à partir de ce moment.

PROTOCOLE DE COLORATION SUGGERE CONTINU

B. PROTOCOLE DE COLORATION

Réactif	Préparation de Spécimens :	Temps d'Incubation (Min.)
<u>1. SOLUTION DE PEROXYDASE REFROIDISSANT</u> (Pas fournie).	Cette étape est optionnelle. Suivre l'étape 1 si l'élimination d'activité de peroxydase endogène est nécessaire. a. Pour des tissus de paraffine-incluse, ajouter 1 part 30% peroxyde d'hydrogène à 9 parts de méthanol absolu. Bien mélanger. b. Plonger les lames dans une SOLUTION DE PEROXYDASE REFROIDISSANT pendant 10 minutes. c. Laver avec du PBS 2 min., 3 fois. Passer à l'étape 2. Pour un tissu gelé, traité avec du Peroxo-Block™ (cat. no. 00-2015) pendant 45 sec. Laver immédiatement.	10 (Optionnel)
<u>2. SOLUTION BLOQUANTE DE SERUM</u> Prêt à l'utilisation. Réactif A	Cette étape peut être omise si l'anticorps primaire contient un contreur protéique (ex. 10% de sérum non-immun). a. Ajouter 2 gouttes (100 µL), ou suffisamment pour couvrir complètement le tissu de chaque section, de SOLUTION BLOQUANTE DE SERUM. Incuber pendant 10 min b. Egoutter ou sécher la solution. NE PAS RINCER.	10
<u>3. ANTICORPS PRIMAIRE</u> (Pas fourni).	La dilution optimale et le temps d'incubation doivent être déterminés par l'investigateur. <i>2^{ème} Gén</i> Les anticorps primaires sont optimisés par l'utilisation des équipements de détection Histocoloration-Plus. (Le temps de dilution et d'incubation est dépendant de la préparation des échantillons, de l'affinité des anticorps, amt. de la présence d'antigènes, et de l'accessibilité aux antigènes). a. Ajouter 2 gouttes (100 µL), ou suffisamment pour couvrir complètement le tissu de chaque section d'ANTICORPS PRIMAIRE. b. Incuber dans une chambre humide pendant 30-60 min. c. Rincer avec du PBS pendant 2 min., 3 fois.	30-60
<u>4. ANTICORPS SECONDAIRE BIOTINYLATE</u> Prêt à l'utilisation. Réactif B	a. Ajouter 2 gouttes (100 µL) ou suffisamment pour couvrir complètement le tissu de chaque section d'ANTICORPS SECONDAIRE BIOTINYLATE. Incuber pendant 10 min (Pour des anticorps primaires de rats, incuber pendant 20 min.) b. Rincer avec du PBS pendant 2 min., 3 fois.	10
<u>5. ENZYME CONJUGUE</u> Prêt à l'utilisation. Réactif C	a. Ajouter 2 gouttes (100 µL) ou suffisamment pour couvrir complètement le tissu de chaque section d'ENZYME CONJUGUE. Incuber pendant 10 min b. Rincer avec du PBS pendant 2 min., 3 fois.	10
<u>6. CHROMOGENE DAB :</u> Réactifs D1, D2 et D3 20x de composants concentrés.	a. Ajouter 1 goutte de Réactif D1, 2 gouttes de Réactif D2 et 1 goutte de Réactif D3 à 1 mL d'eau distillée ou déminéralisée. Bien mélanger. Protéger de la lumière et à utiliser dans l'heure. b. Appliquer 2 gouttes (100 µL) ou suffisamment pour couvrir complètement le tissu de CHROMOGENE DAB de chaque section. Incuber pendant 3-10 min. c. Bien rincer avec de l'eau distillée.	3-10

À partir d'ici, l'investigateur doit procéder avec ses propres protocoles de laboratoire pour la contre-coloration et la fixation. Invitrogen recommande l'utilisation d'hématoxyline (No de cat. 00-8001) comme contre-coloration et soit Histomount™ (No de cat. 00-8030) pour DAB soit Clearmount™ (No de cat. 00-8010) comme solution de fixation pour AEC ou DAB.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Le tableau suivant interprète les résultats pouvant être obtenus en utilisant divers témoins de coloration.

Dossier n°	témoin +	témoin réactif	témoin (-)	Échantillon	Analyse
1	-	-	-	-	Procédure effectuée de façon incorrecte.
2	+	+	+	+	Une coloration non spécifique causée par une fixation de protéine ou une activité de peroxydase endogène.
3	+	-	+	+/-	Le témoin négatif contient l'antigène.
4	-	-	-	+	Le témoin positif ne contient pas l'antigène.
5	+	-	-	-	L'échantillon ne contient pas l'antigène.
6	+	-	-	+	L'échantillon contient l'antigène.

www.invitrogen.com

Invitrogen Corporation • 542 Flynn Rd • Camarillo • CA 93012 • Tel: 800.955.6288 • E-mail: techsupport@invitrogen.com

PI 85-9643 (PIN 31296)

(Rev 09/09) DCC-09-1008

© 2007 Invitrogen Corporation. All right reserved. These products may be covered by one or more Limited Use Label Licenses (see the Invitrogen Catalog or www.invitrogen.com). By use of these products you accept the terms and conditions of all applicable Limited Use Label Licenses.

DÉPANNAGE

Causes possibles d'une coloration négative sur des lames positives :

1. Les étapes du protocole de coloration n'ont pas été exécutées dans le bon ordre.
2. Les étapes d'incubation des anticorps primaires ou secondaires ont été omises.
3. Les antigènes labiles ont été détruites.
4. Le spécimen était mal attaché et/ou traité.
5. Le spécimen s'est déshydraté pendant la coloration.

Causes possibles pour une coloration faible sur toutes les lames :

1. Le spécimen a retenu un excès de liquide après les étapes de rinçage.
2. Les temps d'incubation n'étaient pas suffisants.
3. Le substrat était mal préparé.
4. La déparaffination était incomplète (la coloration peut être accompagnée d'une coloration de fond élevée).

Causes possibles pour une coloration de fond élevée :

1. L'activité de la peroxydase endogène n'était pas complètement bloquée.
2. La déparaffination était incomplète.
3. Application excessive de l'adhésif tissulaire.
4. Mauvais rinçage des lames.
5. Surdéveloppement du substrat.
6. Déshydratation du spécimen pendant la coloration.

MARQUE DE FABRIQUE

CAS-Block™, Clearmount™, HistoGrip™, Histomount™, et Peroxo-Block™ sont des marques des Zymed Laboratories, Inc. Zymed® and Histostain® sont des marques enregistrées par les Zymed Laboratories, Inc.

**Pour des informations plus détaillées, veuillez vous référer aux feuilles de données en version anglaise ou aller sur www.invitrogen.com.
SI VOUS AVEZ DES QUESTIONS SUR CE PRODUIT, CONTACTEZ VOTRE DISTRIBUTEUR LOCAL.**

Représentant Autorisé pour IVDD 98/79/EC: Invitrogen Ltd.
Inchinnan Business Park
3 Fountain Drive
Paisley
PA4 9RF
UK

www.invitrogen.com

Invitrogen Corporation • 542 Flynn Rd • Camarillo • CA 93012 • Tel: 800.955.6288 • E-mail: techsupport@invitrogen.com

PI 85-9643 (PIN 31296)

(Rev 09/09) DCC-09-1008

© 2007 Invitrogen Corporation. All right reserved. These products may be covered by one or more Limited Use Label Licenses (see the Invitrogen Catalog or www.invitrogen.com). By use of these products you accept the terms and conditions of all applicable Limited Use Label Licenses.

Kit Histostain-Plus®
Invitrogen® 2^{da} Generazione
Sistemi di Rilevazione LAB-SA

<u>CAT. n.</u>	<u>PER ANTICORPI PRIMARI</u>	<u>CROMOGENO</u>	<u>PER</u>
85-9643	Ampio Spettro*	DAB	150 vetrini

*Reagisce con topo, coniglio, cavia e anticorpi primari di topo.

SCOPI D'UTILIZZO

Per uso diagnostico In Vitro. L'interpretazione deve essere effettuata da un patologo qualificato entro il contesto dell'anamnesi clinica del paziente ed in considerazione di altri test diagnostici. Il kit Histostain®-Plus è progettato per rilevare antigeni che hanno avuto reazioni con un anticorpo primario su tessuto umano fornito dal committente oppure campioni di cellula. Tessuti congelati oppure inclusi in paraffina, si possono utilizzare linfociti freschi, e colture cellulari fissate.

CONSERVAZIONE E DURATA A MAGAZZINO

Conservare il kit a 2-8 °C. Eventuali reclami sono nulli dopo la data di scadenza.

REAGENTI FORNITI

- Reagente A. Una boccetta contagocce (15 mL) di soluzione siero bloccante, 10% siero non-immune (capra) pronto per l'uso.
- Reagente B. Una boccetta contagocce (15 mL) di anticorpo secondario biotinilato pronto per l'uso.
- Reagente C. Una boccetta contagocce (15 mL) di streptavidina –coniugata con perossidasi pronta per l'uso.
- Reagente D1. Una boccetta contagocce (3 mL) di concentrato di tampone substrato (20x).
- Reagente D2. Una boccetta contagocce (3 mL) di soluzione cromogenica concentrata, DAB (20x).
- Reagente D3. Una boccetta contagocce (3 mL) di 0.6% perossido di idrogeno (20x).

REAGENTI E MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI

- Xilene, etanolo, e metanolo assoluto
- Distillata oppure deionizzata acqua
- 30% di perossido di idrogeno
- 10 mM soluzione fisiologica tamponata al fosfato (PBS), pH 7,4 oppure 50 mM soluzione salina Tris-tamponata (TBS), pH 7,8. Facoltativo: 0,05% Tween 20.
- Mini PAP Pen (Invitrogen Cat. n. 00-8877)
- Primari anticorpo
- Ematossilina (Invitrogen Cat. n. 00-8001)
- Mezzo di inclusione (Invitrogen Cat. n. 00-8000)
 - Clearmount™ (Invitrogen Cat. n. 00-8110)
 - Histomount™ (Invitrogen Cat. n.00-8030)

PROTOCOLLO DI COLORAZIONE SUGGERITO

A. PREPARAZIONE PRELIMINARE DEI VETRINI

<u>1. PREPARAZIONE DEL CAMPIONE</u>	<ul style="list-style-type: none"> - È necessaria l'appropriata fissazione del tessuto e dell'antigene per ottenere performance riproducibile ed interpretazioni affidabili. Fissativi idonei includono: 10% di formalina neutra tamponata, B5, Bouin's, formalina zincata oppure fissativi a base di alcool. - Si dovrebbero effettuare strisci cellulari preparati da liquidi organici per assicurare un monostrato di cellule. Gli strisci andrebbero fissati immediatamente dopo la preparazione. A seconda delle proprietà dell'antigene, gli strisci cellulari sono di solito stabili da una a due settimane se conservati a 4 °C. - Si può effettuare la fissazione di cytospin oppure di sezioni congelate con acetone (100%) a 4 °C oppure per una durata di 10 minuti.
<u>2. PREPARAZIONE DEL VETRINO</u>	-Pre rivestire i vetrini con HistoGrip™ (Invitrogen Cat. No. 00-8050). In alternativa, pre rivestire con 0,1% poli-L-lisina in acqua, dopodiché far asciugare all'aria.
<u>3. DEPARAFFINIZZAZIONE E REIDRATAZIONE</u>	- Dalle sezioni si toglie la paraffina vengono deparaffinate con xilene e reidratate in una scala crescente di etanolo. Lavare gli strisci cellulari oppure tessuto in un bagno PBS per 10 minuti prima di iniziare la procedura di colorazione.
<u>4. VETRINI DI CONTROLLO</u>	<p>Per l'interpretazione dei risultati occorrono tre vetrini di controllo.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Controllo tissutale positivo: un provino, trattato secondo le stesse modalità osservate per quello non noto, contenente l'antigene da colorare. • Controllo reagente/Controllo negativo-1: un vetrino supplementare che verrà trattato con un siero non immune anziché con la stessa concentrazione dell'anticorpo primario. Qualsiasi eventuale colorazione del provino è probabilmente riconducibile ad un legame proteinico aspecifico o ad un legame aspecifico di altri reagenti. • Controllo negativo-2: un provino, trattato secondo le stesse modalità osservate per quello non noto, non contenente l'antigene da colorare [facoltativo].

Nota: da questo momento in poi non fate asciugare il campione oppure le sezioni di tessuto.

PROTOCOLLO DI COLORAZIONE CONSIGLIATO CONTINUAZIONE

B. PROTOCOLLO DI COLORAZIONE

Reagente	Preparazione del Campione	Tempo di Incubazione (Min.)
<u>1. SOLUZIONE QUENCHING DI PEROSSIDASI</u> (Non fornito)	Questo passaggio è opzionale. Eseguire il passaggio 1 se è necessaria l'attività di eliminazione di perossidasi endogena. a. Per i tessuti inclusi in paraffina, aggiungere il 30% di perossido di idrogeno a 9 parti di metanolo assoluto. Mescolare bene. b. Immergere vetrini in SOLUZIONE QUENCHING DI PEROSSIDASI per 10 minuti. c. Lavare con PBS 2 min., 3 volte. Procedere al Passaggio 2. In caso di tessuti congelati, trattare con Peroxo-Block™ (cat. no. 00-2015) per 45 sec. Lavare immediatamente.	10 (Opzionale)
<u>2. SOLUZIONE SIERO BLOCCANTE</u> Pronto per l'uso. Reagente A	Questo passaggio può essere omesso se l'anticorpo primario contiene un bloccante proteico (ad es. 10% di siero non immune). a. Aggiungere 2 gocce (100 µL) di SOLUZIONE SIERO BLOCCANTE oppure una quantità sufficiente da ricoprire completamente il tessuto, per ciascuna sezione. Incubare per 10 min. b. Rimuovere con un tampone la soluzione in eccesso. NON RISCIAQUARE.	10
<u>3. ANTICORPO PRIMARIO</u> (Non fornito).	I tempi di diluizione e di incubazione ottimali dovrebbero essere stabiliti dall'operatore. <i>2nd Gen</i> Gli anticorpi primari sono ottimizzati per l'uso con i kit per la rilevazione Histostain-Plus. (Tempi di diluizione e incubazione dipendono dalla preparazione dei campioni, affinità degli anticorpi, la quantità di antigene presente, e accessibilità antigene). a. Applicare 2 gocce (100 µL) oppure abbastanza da ricoprire completamente il tessuto, di ANTICORPO PRIMARIO per ciascuna sezione. b. Incubare in ambiente umido per 30-60 min. c. Risciacquare con PBS oppure 2 min., 3 volte.	30-60
<u>4. ANTICORPO SECONDARIO BIOTINILATO</u> Pronto per l'uso. Reagente B	a. Applicare 2 gocce (100 µL) oppure abbastanza da ricoprire completamente il tessuto, di ANTICORPO SECONDARIO BIOTINILATO per ciascuna sezione. Incubare per 10 min. (Per anticorpi primari di ratti, incubare per 20 min.) b. Risciacquare con PBS per 2 min, 3 volte.	10
<u>5. ENZIMA CONIUGATO</u> Pronto per l'uso. Reagente C	a. Applicare 2 gocce (100 µL) oppure abbastanza da ricoprire completamente il tessuto, di ENZIMA CONIUGATO per ciascuna sezione. Incubare per 10 min. b. Risciacquare con PBS per 2 min, 3 volte.	10
<u>6. DAB CROMOGENO</u> Reagenti D1, D2 e D3 20x composti concentrati.	a. Aggiungere 1 goccia di Reagente D1, 2 gocce di reagente D2 e 1 goccia di reagente D3 ad 1 mL di acqua distillata oppure deionizzata. Mescolare bene. Proteggere da luce e utilizzare entro un'ora. b. Applicare 2 gocce (100 µL) oppure abbastanza da ricoprire completamente il tessuto, di CROMOGENO DAB a ciascuna sezione. Incubare per 3-10 min. c. Risciacquare bene con acqua distillata.	3-10

Da questo punto in poi, l'investigatore dovrebbe attenersi ai protocolli vigenti presso il proprio laboratorio per l'esecuzione delle procedure di controcolorazione e fissaggio. La Invitrogen raccomanda l'uso dell'Ematossilina (N. Cat. 00-8001) per la controcolorazione e di Histomount™ (N. Cat. 00-8030) per la DAB o Clearmount™ (N. Cat. 00-8010) quale mezzo di fissaggio per l'AEC o la DAB.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Nella tabella sottostante si riporta l'interpretazione dei risultati ottenibili utilizzando vari controlli per la colorazione.

N. caso	Controllo +	Controllo reagente	Controllo (-)	Campione	Analisi
1	-	-	-	-	Procedura eseguita scorrettamente.
2	+	+	+	+	Colorazione aspecifica dovuta a legame proteinico o ad attività perossidasi endogena.
3	+	-	+	+/-	Il controllo negativo contiene l'antigene.
4	-	-	-	+	Il controllo positivo non contiene l'antigene.
5	+	-	-	-	Il campione non contiene l'antigene.
6	+	-	-	+	Il campione contiene l'antigene.

www.invitrogen.com

Invitrogen Corporation • 542 Flynn Rd • Camarillo • CA 93012 • Tel: 800.955.6288 • E-mail: techsupport@invitrogen.com

PI 85-9643 (PIN 31296)

(Rev 09/09) DCC-09-1008

© 2007 Invitrogen Corporation. All right reserved. These products may be covered by one or more Limited Use Label Licenses (see the Invitrogen Catalog or www.invitrogen.com). By use of these products you accept the terms and conditions of all applicable Limited Use Label Licenses.

RISOLUZIONE DEI PROBLEMI

Cause possibili di colorazione negativa nei vetrini positivi:

1. Le fasi previste dal protocollo di colorazione non sono state eseguite nell'ordine corretto.
2. Sono state omesse le fasi di incubazione dell'anticorpo primario e secondario.
3. Sono stati distrutti degli anticorpi labili.
4. I provini non sono stati debitamente fissati e/o trattati.
5. I provini si sono disidratati nel corso della colorazione.

Cause possibili di colorazione debole in tutti i vetrini:

1. I provini hanno trattenuto il liquido in eccesso accumulatosi durante le fasi di risciacquo.
2. Sono stati osservati tempi di incubazione insufficienti.
3. Il substrato non è stato preparato correttamente.
4. Deparaffinizzazione incompleta (la colorazione potrebbe essere accompagnata da fondo elevato).

Cause possibili di colorazione con fondo elevato:

1. L'attività perossidasi endogena non è stata bloccata completamente.
2. Deparaffinizzazione incompleta.
3. Applicazione di un quantitativo eccessivo di adesivo per tessuti.
4. Risciacquo inadeguato dei vetrini.
5. Sovrasviluppo del substrato.
6. Disidratazione dei provini durante la colorazione.

MARCHI REGISTRATI

CAS-Block™, Clearmount™, HistoGrip™, Histomount™ e Peroxo-Block™ sono marchi registrati di Zymed Laboratories, Inc. Zymed® e Histostain® sono marchi registrati di Zymed Laboratories, Inc.

Per informazioni più dettagliate vi preghiamo di consultare la versione inglese del catalogo oppure visitate il sito www.invitrogen.com. SE AVETE DOMANDE SUL PRODOTTO, CONTATTATE IL VOSTRO DISTRIBUTORE PIÙ VICINO.

Rappresentante Autorizzato per IVDD 98/79/EC: Invitrogen Ltd.
Inchinnan Business Park
3 Fountain Drive
Paisley
PA4 9RF
UK

www.invitrogen.com

Invitrogen Corporation • 542 Flynn Rd • Camarillo • CA 93012 • Tel: 800.955.6288 • E-mail: techsupport@invitrogen.com

PI 85-9643 (PIN 31296)

(Rev 09/09) DCC-09-1008

© 2007 Invitrogen Corporation. All right reserved. These products may be covered by one or more Limited Use Label Licenses (see the Invitrogen Catalog or www.invitrogen.com). By use of these products you accept the terms and conditions of all applicable Limited Use Label Licenses.

Histostain-Plus® Kits

Invitrogen® 2. Generation

LAB-SA Nachweis System

<u>Cat. Nr.</u>	<u>FÜR PRIMÄRE ANTIKÖRPER</u>	<u>CHROMOGEN</u>	<u>GUT FÜR</u>
85-9643	Breites Spektrum*	DAB	150 Objektträger

*Reagiert auf primäre Antikörper von Maus, Kaninchen, Meerschweinchen und Ratte.

BEABSICHTIGTER NUTZEN

Für In Vitro Diagnostischem Gebrauch. Die Interpretation muss im Zusammenhang mit der klinischen Vorgeschichte des Patienten und anderen Diagnostiktests eines qualifizierten Pathologen vorgenommen werden. Der Histostain®-Plus ist dazu bestimmt, Antigene aufzudecken, die mit einem Nutzer- gelieferten primären Antikörper auf menschlichem Gewebe oder Zellmustern reagiert haben. Eingefrorene oder Paraffin- eingebettete Gewebe, frisch präparierte Lymphozyten und fixierte kultivierte Zellen können benutzt werden.

LAGERUNG UND LAGERFÄHIGKEIT

Den Kit bei 2-8°C lagern. Alle Leistungsansprüche sind ungültig nach dem Kit-Ablaufdatum.

GELIEFERTE REAGENTIEN

Reagens A. Eine Tropfflasche (15 mL) gebrauchsfertiger Serum Blockierungs Lösung, 10%iges nicht-immun Serum (Ziege).

Reagens B. Eine Tropfflasche (15 mL) gebrauchsfertiger biotinierte zweiter Antikörper.

Reagens C. Eine Tropfflasche (15 mL) gebrauchsfertiges Streptavidin-Peroxidase-Konjugat.

Reagens D1. Eine Tropfflasche (3 mL) konzentriertes Substratpuffer (3x).

Reagens D2. Eine Tropfflasche (3 mL) konzentrierte Chromogen-Lösung, DAB (20x).

Reagens D3. Eine Tropfflasche (3 mL) 0.6%iges Hydrogen Peroxid (20x).

BENÖTIGTE ABER NICHT GELIEFERTE REAGENTIEN UND MATERIALIEN

- Xylene, Aethanol, und reines Methanol
- Destilliertes oder deionisiertes Wasser
- 30% Hhydrogen Peroxide
- 10 mM Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS), pH 7.4 oder 50 mM Tris-Puffer Salzlösung (TBS), pH 7.8. Optional: 0.05% Tween 20.
- Mini PAP Pen (Invitrogen Cat. Nr. 00-8877)
- Primärer Antikörper
- Mayer Haematoxylin (Invitrogen Cat. Nr. 00-8001)
- Präpariermittel (Invitrogen Cat. Nr. 00-8000)
 - Clearmount™ (Invitrogen Cat. Nr. 00-8110)
 - Histomount™ (Invitrogen Cat. No 00-8030)

EMPFOHLENES FÄRBUNGSPROTOKOLL

A. VORLÄUFIGE PRÄPARATION VON OBJEKTTRÄGERN

<u>1. PROBEN PRÄPARATION</u>	Angemessene Gewebe- und Antigenfixierung ist erforderlich, um reproduzierbare Leistung und verlässliche Auswertungen zu erhalten. Geeignete Fixiermittel umfassen: 10%iges neutral gepuffertes Formalin, B5, Bouin's, Zinc Formalin oder Alkohol basierte Fixiermittel. - Von Körperflüssigkeiten präparierte Zellabstriche sollten gemacht werden, um eine Monoschicht von Zellen sicherzustellen. Abstriche sollten unmittelbar nach der Präparation fixiert werden. Abhängig von den Eigenschaften des Antigens, sind Zellabstriche gewöhnlich für eine bis zwei Wochen stabil, wenn sie bei 4°C gelagert sind. - Fixierung von zytospin oder eingefrorene Sektionen können mit Azeton (100%) bei 4°C für einen Zeitraum von 10 Minuten gemacht werden.
<u>2. OBJEKTTRÄGER PRÄPARATION:</u>	- Objektträger mit HistoGrip™ (Invitrogen Cat. Nr. 00-8050) vorbeschichten. Als alternative mit 0.1% Poly-L-lysine in Wasser vorbeschichten, dann lufttrocknen.
<u>3. DEPARAFFINISIERUNG AND REHYDRATION:</u>	Paraffinsektionen werden deparaffinisiert mit Xylene and rehydriert in einer abgestuften Reihe von Aethanol. Zellabstriche oder Gewebe in einem PBS-bad für 10 Minuten waschen, bevor mit dem Färbungsverfahren begonnen wird.
<u>4. KONTROLLOBJEKTTRÄGER</u>	Zur Auslegung der Ergebnisse sind drei Kontrollobjektträger erforderlich. • Positive Gewebekontrolle: Eine auf die gleiche Art wie die unbekannte Probe bearbeitete Probe, die das zu färbende Antigen enthält. • Reagenzkontrolle/Negative Kontrolle-1: Ein zusätzlicher Objektträger, der mit einem Nicht-Immuns serum anstatt mit der gleichen Konzentration des primären Antikörpers behandelt wird. Jede in der Probe zu beobachtende Färbung ist wahrscheinlich auf die nicht-spezifische Proteinbindung oder die nicht-spezifische Bindung anderer Reagenzien zurückzuführen. • Negative Kontrolle-2: Eine auf die gleiche Art wie die unbekannte Probe bearbeitete Probe, die nicht das zu färbende Antigen enthält [optional].

+Beachten Sie: Erlauben Sie keinen Proben- oder Gewebesektionen von diesem Zeitpunkt an zu trocknen.

EMPFOHLENES FÄRBUNGSPROTOKOLL FORTGESETZT

B. FÄRBUNGSPROTOKOLL

Reagens	Proben Präparation	Inkubationszeit (Min.)
<u>1. PEROXIDASE LÖSCHUNGSLÖSUNG:</u> (NICHT geliefert)	Dieser Schritt ist optional. Schritt 1 ausführen, wenn die Elimination von endogener Peroxidase Aktivität notwendig ist. a. 1 Teil 30%iges Hydrogen Peroxid zu 9 Teilen reinem Methanol geben. Gut mischen. b. Die Objektträger für 10 Min. in PEROXIDASE-LÖSCHUNGS- LÖSUNG tauchen. c. Mit PBS 2 Min., 3 mal waschen. Mit Schritt 2 fortfahren. Gewebe mit Peroxo-Block™ (cat. nr. 00-2015) für 45 Sek. behandeln. Sofort waschen.	10 (optional)
<u>2. SERUM BLOCKIERUNGS LÖSUNG:</u> Gebrauchsfertig. Reagens A.	Dieser Schritt kann ausgelassen werden, wenn der primäre Antikörper einen Proteinblocker enthält (z.B. 10%iges nicht-immun Serum). a. 2 Tropfen (100 µL) SERUM BLOCKIERUNG LÖSUNG auf jede Sektion geben oder genug, um das Gewebe vollständig zu bedecken. Für 10 Min. inkubieren b. Die Lösung trocken legen oder löschen Sie aus. NICHT SPÜLEN	10
<u>3. PRIMÄRE ANTIKÖRPER</u> (NICHT geliefert).	Optimale Verdünnung und Inkubationszeiten sollten vom Untersuchenden bestimmt werden. 2 nd Gen Primäre Antikörper sind optimiert für die Benutzung des NBA™ Nachweis Kits. (Verdünnung und Inkubationszeit sind abhängig von Musterpräparation, Antikörperaffinität, von Antigen Präsenz, und Antigen Verfügbarkeit). a. 2 Tropfen (100 µL) von PRIMÄRER ANTIKÖRPER auf jede Sektion geben oder genug, um das Gewebe vollständig zu bedecken. b. Im Feuchtraum für 30-60 Min. inkubieren. c. Mit PBS für 2 Min., 3 mal spülen.	30-60
<u>4. BIOTINYLATED SECOND ANTI BODY</u> Gebrauchsfertig. Reagens B.	a. 2 Tropfen (100 µL) von BIOTINILIERTEM SEKUNDÄREN ANTIKÖRPER auf jede Sektion geben oder genug, um das Gewebe vollständig zu bedecken. Für 10 Min. inkubieren. (Für primäre Antikörper von Ratten inkubieren Sie für 20 min.) b. Mit PBS für 2 Min., 3 mal spülen.	10
<u>5. ENZYM KONJUGAT</u> Gebrauchsfertig. Reagens C.	a. Geben Sie 2 Tropfen (100 µL) von ENZYM KONJUGAT auf jede Sektion oder genug, um das Gewebe vollständig zu bedecken Für 10 Min. inkubieren. b. Spülen Sie mit PBS für 2 Min., 3 mal.	10
<u>6. DAB CHROMOGEN:</u> Reagentien D1, D2 und D3 20x konzentrierte Komponenten.	a. Vorbereitung: 1 Tropfen von Reagens D1, 2 Tropfen von Reagens D2 und 1 Tropfen von Reagens D3 auf 1 mL destilliertes oder deionisiertes Wasser geben. Gut mischen. Vor Licht schützen und innerhalb einer Stunde benutzen. B. 2 Tropfen (100 µL) von DAB CHROMOGEN auf jede Sektion geben oder genug, um das Gewebe vollständig zu bedecken. Für 3-10 Min. inkubieren. C. Gut mit destilliertem Wasser spülen.	3-10

Ab diesem Punkt sollte der Prüfer gemäß den eigenen festgelegten Laborprotokollen für Gegenfärbung und Mounting fortfahren. Invitrogen empfiehlt den Gebrauch von Hämatoxylin (Kat.- Nr. 00-8001) zur Gegenfärbung und entweder Histomount™ (Kat.- Nr. 00-8030) für DAB oder Clearmount™ (Kat.- Nr. 00-8010) als Mountinglösung für AEC oder DAB.

AUSLEGUNG DER ERGEBNISSE

In der folgenden Tabelle sind die Ergebnisse ausgelegt, die mit verschiedenen Färbungskontrollen erzielt werden könnten.

Fall-Nr.	+ Kontrolle	Reagenzkontrolle	(-) Kontrolle	Probe	Analyse
1	-	-	-	-	Verfahren falsch durchgeführt.
2	+	+	+	+	Nicht-spezifische Färbung auf Grund von Proteinbindung oder endogener Peroxidase-Aktivität.
3	+	-	+	+/-	Negative Kontrolle enthält das Antigen.
4	-	-	-	+	Positive Kontrolle enthält nicht das Antigen.
5	+	-	-	-	Probe enthält nicht das Antigen.
6	+	-	-	+	Probe enthält das Antigen.

FEHLERBEHEBUNG

Mögliche Ursachen für eine negative Färbung auf positiven Objektträgern:

1. Die Reihenfolge der Schritte des Färbungsprotokolls wurde nicht eingehalten.
2. Die Inkubationsschritte für den primären oder sekundären Antikörper wurden ausgelassen.
3. Labile Antigene wurden zerstört.
4. Die Probe wurde nicht richtig fixiert und/oder verarbeitet.
5. Die Probe trocknete während der Färbung aus.

Mögliche Ursachen für eine schwache Färbung auf allen Objektträgern:

1. Nach der Spülung blieb zuviel Flüssigkeit in der Probe zurück.
2. Die Inkubationszeiten waren nicht ausreichend.
3. Das Substrat wurde falsch vorbereitet.
4. Unvollständige Deparaffinierung (Färbung ist von einer starken Hintergrundfärbung begleitet).

Mögliche Ursachen für starke Hintergrundfärbung:

1. Endogene Peroxidase-Aktivität wurde unvollständig blockiert.
2. Unvollständige Deparaffinierung.
3. Übermäßiger Gebrauch von Gewebefixiermittel.
4. Unzureichende Spülung der Objektträger.
5. Überentwicklung des Substrats.
6. Dehydrierung der Probe während der Färbung.

WARENZEICHEN

CAS-Block™, Clearmount™, HistoGrip™, Histomount™, and Peroxo-Block™ sind waenzeichen der Zymed Laboratories, Inc. Zymed® and Histostain® sind eingetragene Warenzeichen der Zymed Laboratories, Inc.

Für genauere Information beziehen Sie sich bitte entweder auf die englische Version auf der Datenplatte oder auf www.invitrogen.com. SOLLTEN SIE IRGENDWELCHE FRAGEN ÜBER DIESES PRODUKT HABEN, WENDEN SIE SICH BITTE AN IHREN ÖRTLICHEN VERTEILER

Bevollmächtigter Repräsentant für IVDD 98/79/EC: Invitrogen Ltd.
Inchinnan Business Park
3 Fountain Drive
Paisley
PA4 9RF
UK

www.invitrogen.com

Invitrogen Corporation • 542 Flynn Rd • Camarillo • CA 93012 • Tel: 800.955.6288 • E-mail: techsupport@invitrogen.com

PI 85-9643 (PIN 31296)

(Rev 09/09) DCC-09-1008

© 2007 Invitrogen Corporation. All right reserved. These products may be covered by one or more Limited Use Label Licenses (see the Invitrogen Catalog or www.invitrogen.com). By use of these products you accept the terms and conditions of all applicable Limited Use Label Licenses.