

ZytoChem Plus AP Kit, Broad Spectrum

REF / Cat. No.:	AP008RED	80 Tests (mit Permanent Red), 8 ml
	AP060	600 Tests, 60 ml
	AP125	1.250 Tests, 125 ml
	AP500	5.000 Tests, 500 ml

Gebrauchsanweisung

Zweckbestimmung

Die ZytoChem Plus AP Kits arbeiten nach dem Streptavidin-Biotin-Prinzip und sind für den qualitativen Nachweis von Antigenen in fixierten und in Paraffin eingebetteten Geweben, in Kryostatschnitten und in Zellpräparaten bestimmt. Es können Gewebe untersucht werden, die unterschiedliche Fixierungsverfahren durchlaufen haben, wie z.B. Formaldehyd (neutral gepuffertes Formalin), B5, Bouin, Ethanol oder HOPE. Zum Gebrauch als Forschungsreagenz.

Zusammenfassung / Erläuterung

Ziel der immunhistochemischen Färbung ist die Visualisierung von Gewebe- bzw. Zellantigenen. Bei den ZytoChem Plus AP Kits handelt es sich um hoch sensitive Nachweiskits für die Immunhisto- und Immunzytochemie. Sie arbeiten mit der Streptavidin-Biotin-Technik, bei der ein biotinylierter Sekundärantikörper mehrere Moleküle eines Konjugates aus Streptavidin und Alkalischer Phosphatase (AP) bindet. Die Visualisierung erfolgt über eine Enzym-Substrat-Reaktion in Gegenwart einer farbgebenden Komponente, die schließlich eine mikroskopische Auswertung ermöglicht. Der biotinylierte Sekundärantikörper in den ZytoChem Plus AP Kits, Broad Spectrum (Breitspektrum), ist polyvalent. Daher können mit ZytoChem Plus AP Kits, Breitspektrum, mono- und polyklonale Primärantikörper aus Maus, Kaninchen, Ratte und Meerschweinchen nachgewiesen werden.

Prinzip der Methode

Schnittpräparate von in Paraffin eingebetteten Geweben werden zunächst entparaffiniert und rehydratisiert. Hintergrundfärbung durch unspezifische Bindung des Primärantikörpers oder des Sekundärantikörpers wird durch die Inkubation mit einer Blockierungslösung minimiert (Dieser Schritt kann entfallen, wenn der verwendete Primärantikörper in einem geeigneten Puffer verdünnt wurde).

Anschließend erfolgt die Inkubation mit dem spezifischen Primärantikörper. Nach einem Waschschrift wird der biotinylierte Sekundärantikörper („Brückenantikörper“, „Link“) aufgetragen. Dieser fungiert als Brücke zwischen dem Primärantikörper und dem Streptavidin-Alkalische Phosphatase-Konjugat („AP-Label“). Nach einem Waschschrift wird dieses Konjugat aufgetragen und bindet am Biotinrest des Brückenantikörpers. Nach einem weiteren Waschschrift wird durch Hinzugeben einer Substrat/Chromogenlösung eine enzymatische Reaktion mit der Alkalischen Phosphatase gestartet, in deren Verlauf sich am Ort der Bindung des Primärantikörpers ein Farbniederschlag bildet, der im Lichtmikroskop sichtbar ist.

Die Farbgebung ist abhängig vom verwendeten Chromogen. Das Chromogen Permanent Red (nur im Kit AP008RED enthalten) bildet am Ort des Zielantigens ein pink-rotes Reaktionsprodukt. Andere geeignete Chromogene sind Permanent AP Red (= pink-rot) oder NBT (= blau/schwarz, Substrat ist hier BCIP).

Gelieferte Reagenzien

REF / Cat. No. AP008RED

8 ml	Blocking Solution	Reagent 1	(gebrauchsfertig)
8 ml	Biotinylated Secondary Antibody, polyvalent	Reagent 2	(gebrauchsfertig)
8 ml	Streptavidin-AP Conjugate	Reagent 3	(gebrauchsfertig)
8 x 5 ml	Permanent Red Buffer (Substratpuffer)		
2 ml	Permanent Red Concentrate (Chromogen)		

REF / Cat. No. AP060

4 x 15 ml	Blocking Solution	Reagent 1	(gebrauchsfertig)
4 x 15 ml	Biotinylated Secondary Antibody, polyvalent	Reagent 2	(gebrauchsfertig)
4 x 15 ml	Streptavidin-AP Conjugate	Reagent 3	(gebrauchsfertig)

REF / Cat. No. AP125

125 ml	Blocking Solution	Reagent 1	(gebrauchsfertig)
125 ml	Biotinylated Secondary Antibody, polyvalent	Reagent 2	(gebrauchsfertig)
125 ml	Streptavidin-AP Conjugate	Reagent 3	(gebrauchsfertig)

REF / Cat. No. AP500

500 ml	Blocking Solution	Reagent 1	(gebrauchsfertig)
500 ml	Biotinylated Secondary Antibody, polyvalent	Reagent 2	(gebrauchsfertig)
500 ml	Streptavidin-AP Conjugate	Reagent 3	(gebrauchsfertig)

Empfohlene Substratsysteme (soweit nicht bereits im Kit enthalten)

<i>Permanent AP Red</i>	<i>Best. Nr. ZUC001-125</i>	<i>1.250 Tests</i>
	<i>Best. Nr. ZUC001-500</i>	<i>5.000 Tests</i>
<i>BCIP/NBT</i>	<i>Best. Nr. K006</i>	<i>150 Tests</i>

Benötigte Zusatzmaterialien, die nicht im Lieferumfang enthalten sind

Positives und negatives Kontrollgewebe
 Xylol oder geeignete Ersatzstoffe
 Ethanol, demin. oder dest. H₂O
 Waschpufferlösung (Bestell Nr. ZUC020)
 Enzym oder Pufferlösung zur Schnitovorbehandlung (Epitop-Demaskierung)
 PAP Pen (Bestell Nr. LP0001)
 Primärantikörper (anwenderspezifisch)
 Verdünnungspuffer für Primärantikörper (Bestell Nr. ZUC025)
 Reagenz zur Negativkontrolle
 Substrat/Chromogen
 Lösung zur Gegenfärbung
 Eindeckmittel
 Deckgläser

Lagerung und Handhabung

Die Lösungen sollten bei 2-8°C gelagert werden ohne weiter verdünnt zu werden. Bitte bewahren Sie die Lösungen an einem lichtgeschützten Ort auf. Nicht einfrieren. Die Lösungen sind haltbar bis zum Verfallsdatum, wenn sie bei 2-8°C gelagert wurden. Die Lösungen dürfen nicht über das Verfallsdatum hinaus verwendet werden.

Vorsichtsmaßnahmen

Anwendung durch geschultes Fachpersonal. Das Sicherheitsdatenblatt ist auf Anfrage erhältlich. Tragen Sie Schutzausrüstung, um Augen-, Haut- oder Schleimhautkontakt mit den Reagenzien zu vermeiden. Falls Sie mit einem der Reagenzien an empfindlicher Stelle in Kontakt kommen, waschen Sie diese mit reichlich Wasser. Eine mikrobiologische Verunreinigung der Reagenzien sollte vermieden werden, da sonst eine unspezifische Färbung auftreten könnte. Zur Stabilisierung werden ProClin 300 und Natriumazid (NaN₃) eingesetzt. Natriumazidanreicherungen können in Abflussrohren aus Blei und Kupfer zur Bildung von hoch explosiven Metall-Aziden führen. Um solche Azidanreicherungen in Abflussrohren zu vermeiden, muss bei der Entsorgung mit reichlich Wasser nachgespült werden. Auf Anfrage ist das Sicherheitsdatenblatt für die Reinsubstanz erhältlich.

Vorbereitung der Reagenzien

- Reagenzien vor Gebrauch auf RT bringen.
- Paraffinschnitte entparaffinieren und rehydratisieren.
- Vorbehandlung (optional) durch HIER (*Heat Induced Epitope Retrieval*) oder enzymatischen Andau.
- Die Gewebeschnitte müssen vollständig mit den verschiedenen Lösungen überschichtet sein, um ein Austrocknen zu vermeiden.
- Ansetzen der Substrat-Chromogen-Lösung (gilt für AP008RED):
 2 Tropfen (60 µl) Permanent Red Concentrate (Chromogen) in eine Flasche Permanent Red Buffer (Substratpuffer) geben und mischen. Fertige Lösung unmittelbar verwenden.

Färbeprotokoll

- | | |
|---|-------------------|
| 1. Proteinblock (Blocking Solution, Reagent/Reagenz 1) (<i>Dieser Schritt ist optional</i>) | 5 Min. |
| 2. Waschen mit Waschpuffer | 1 x 2 Min. |
| 3. Primärantikörper (optimal verdünnt) oder negatives Kontrollreagenz | 30-60 Min. |
| 4. Waschen mit Waschpuffer | 3 x 2 Min. |
| 5. Sekundärantikörper (Biotinylated Secondary Antibody, polyvalent, Reagent 2, gelb) | 10-15 Min. |
| 6. Waschen mit Waschpuffer | 3 x 2 Min. |
| 7. Enzym-Konjugat (Streptavidin-AP-Conjugate, Reagent 3, rot) | 10-15 Min. |

8. Waschen mit Waschpuffer	3 x 2 Min.
9. Permanent Red Substrat-Chromogen-Lösung (bei AP008RED) *	5 Min.
10. Waschen mit dest. H ₂ O	1 Min.
11. Permanent Red Substrat-Chromogen-Lösung (bei AP008RED) *	5 Min.
12. Waschen mit dest. H ₂ O	3 x 1 Min.
13. Gegenfärben und Bläuen.	
14. wässrig oder nach Entwässerung aus dem Xylol eindecken	

* Bei Verwendung anderer Substrat-Chromogen-Systeme sollten die Inkubationszeiten angepasst werden.

Qualitätskontrolle

Zur genauen Auswertung sollte bei jedem Färbedurchgang eine Positiv- und eine Negativkontrolle mitgeführt werden. Die Positivkontrolle dient der Überprüfung der korrekten Verarbeitung der Probe. Ist die Negativkontrolle positiv, so weist dies auf eine unspezifische Färbung hin.

Zu erwartende Resultate

Während der Reaktion zwischen Substrat und Alkalischer Phosphatase in Gegenwart des Chromogens bildet sich am Ort der Bindung des Primärantikörpers ein Farbniederschlag, der im Lichtmikroskop ausgewertet werden kann. Die Farbgebung ist abhängig vom verwendeten Chromogen.

Grenzen der Methode

Die Immunhistochemie ist eine komplexe Methode, in der histologische sowie immunologische Detektionsmethoden kombiniert werden. Die Gewebeverarbeitung oder die Handhabung der Proben vor der eigentlichen Immunhistologie können zu ungenauen Ergebnissen führen, wenn die Richtlinien nicht eingehalten wurden (Nadji and Morales, 1983). Die Aktivität der endogenen Alkalischen Phosphatase oder der endogene Biotingehalt können unspezifische Färbungen verursachen. Die endogene Alkalische Phosphatase-Aktivität kann durch Levamisol blockiert werden. Levamisol hemmt allerdings weder die intestinale noch die plazentale Form der Alkalischen Phosphatase. Hintergrundfärbung durch endogenes Biotin kann, falls nötig, durch einen vorgeschalteten Avidin-Biotin Blockierungsschritt minimiert werden. Eine unzureichende Gegenfärbung oder falsches Eindecken können die Interpretation der Ergebnisse beeinflussen. Die Farbintensität des Endproduktes kann, insbesondere bei Lichteinfall, abnehmen. Zu lange Inkubation der Proteinblockierungslösung (Blocking Solution) kann die Signalintensität verringern. Wir empfehlen außerdem, die Blocking Solution anschließend abzuwaschen und nicht, wie bei anderen Verfahren, nur ablaufen zu lassen

Zytomed Systems garantiert, dass das Produkt bei korrekter Lagerung und Verwendung bis zum Ablauf des Haltbarkeitsdatums allen beschriebenen Anforderungen entspricht. Darüber hinaus gehende Garantien werden nicht gegeben.

Fehlersuche und –behebung

Sollte eine ungewöhnliche Färbung auftreten, so lesen Sie bitte diese Packungsbeilage auf eventuelle Hinweise oder kontaktieren Sie den Hersteller.

Mögliche Gründe für ein negatives Ergebnis auf einem eigentlich positiven Kontrollschnitt:

- Reagenzien wurden nicht in der richtigen Reihenfolge eingesetzt.
- Chromogen/Substrat-Arbeitslösung war zu alt.
- Ausbleichen durch Unverträglichkeit von Chromogen und Eindeckmittel.
- Antigen/Epitop ist für den Primärantikörper nicht ausreichend zugänglich. Falls Sie für den getesteten Antikörper eine Antigen-Demaskierung (HIER) durchführen, verlängern Sie diese gegebenenfalls.
- Primärantikörper stammt nicht von einer der folgenden Spezies: Maus, Kaninchen, Ratte, Meerschwein
- Antigen/Epitop ist bei der durchgeführten Fixierungs- und/oder Vorbehandlungsmethode nicht stabil. Testen Sie andere Fixierungs- oder Vorbehandlungsmethoden.

Mögliche Gründe für schwache Färbungen:

- Unzureichende oder zu starke Fixierung.
- Unvollständige Entparaffinierung.
- Antigen/Epitop ist für den Primärantikörper nicht ausreichend zugänglich. Führen Sie eine Antigen-Demaskierung (HIER) durch oder verlängern Sie diese gegebenenfalls.
- Die verwendete Proteinblockierungslösung (Blocking Solution) aus dem Kit war zu lange auf dem Präparat oder wurde nicht ausreichend abgewaschen.
- Nach dem Waschen verbleibt zu viel Waschpuffer auf den Schnitten; die nachfolgenden Reagenzien werden dadurch zu stark verdünnt.
- Bei Verwendung eines auf PBS basierenden Waschpuffers: Die Aktivität der Alkalischen Phosphatase des Nachweiskits wird durch zu viel auf den Schnitten verbleibenden Waschpuffer gehemmt.
- Die Inkubationszeiten waren zu kurz oder der Primärantikörper war zu hoch verdünnt.
- Chromogen/Substrat-Arbeitslösung war zu alt.

Mögliche Gründe für übermäßige Hintergrundfärbungen:

- Unvollständige Entparaffinierung.
- Ungeeignetes oder zu viel Adhäsiv für die Beschichtung der Objektträger.
- Nicht ausreichendes Waschen. Kritisch sind besonders die Waschschrte nach den Inkubationen mit dem Enzymkonjugat und der Chromogen/Substrat-Lösung.
- Das Gewebe ist während der Prozedur (teilweise) ausgetrocknet.

- Unspezifische Bindung des Primärantikörpers an das Präparat. Arbeiten Sie in diesem Fall mit der Proteinblockierungslösung (Blocking Solution) und verdünnen Sie den Primärantikörper in einem geeigneten Verdünnungspuffer.
- Die Inkubationszeit für den Primärantikörper war zu lang oder der Primärantikörper war zu stark konzentriert.
- Unspezifische Bindung des Sekundärantikörpers an endogenes Biotin im Gewebeschnitt. Führen Sie vor der Inkubation mit dem Primärantikörper einen Avidin-Biotin-Block durch.
- Die Inkubationszeit für die Chromogen/Substrat-Arbeitslösung war zu lang und die Reaktionstemperatur war zu hoch (z.B. bei erhöhter Temperatur im Labor).
- Das Substrat wird von im Gewebe enthaltener endogener Alkalischer Phosphatase umgesetzt. Diese unerwünschte Aktivität kann in vielen Fällen mit Levamisol unterdrückt werden (vergl. Abschnitt Grenzen der Methode).

Leistungsdaten

Zytomed Systems hat Studien hinsichtlich der Leistung der Reagenzien des Kits durchgeführt. Das Produkt wurde als geeignet für den vorgesehenen Verwendungszweck beurteilt.

Literaturverzeichnis

Elias JM "Immunohistopathology – A practical Approach to Diagnosis" ASCP Press 2003
 Nadjji M and Morales AR Ann N.Y. Acad Sci 420:134-9, 1983



www.zytomed-systems.de

Zytomed Systems GmbH • Anhaltinerstraße 16 • 14163 Berlin, Germany • Tel: (+49) 30-804 984 990

Erklärungen zu den Symbolen auf dem Produktetikett

Die Symbole werden gemäß der ISO 15223-1 verwendet. Weitere Symbole auf dem Produktetikett können sein:



GSH02: Entzündlich



GSH05: Ätzend



GSH07: Achtung



GSH08: Systemische Gesundheitsgefährdungen

RUO

Nur für Forschungszwecke