

ZytoChem-Plus 2-Step Double Stain Polymer-Kit

REF / Cat. No.: **POL2DS-006** **60 Tests, 2 x 6 ml**
POL2DS-100 **1.000 Tests, 2 x 100 ml**

Gebrauchsanweisung

Zweckbestimmung

Das ZytoChem-Plus 2-Step Double Stain Polymer-Kit ist für den qualitativen Nachweis von Antigenen in fixierten, Paraffin eingebetteten Geweben, in Kryostatschnitten und in Zellpräparaten bestimmt. Es wurde speziell für immunhistochemische Doppelfärbungen mit Paaren von Primärantikörpern entwickelt, von denen einer aus der Maus und der zweite aus dem Kaninchen stammt.

Es können Gewebe untersucht werden, die unterschiedlichen 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 mit Hilfe von Primärantikörpern.

Bei dem ZytoChem-Plus 2-Step Double Stain Polymer-Kit handelt es sich um ein sensitives Nachweiskit für die Immunhisto- und Immunzytochemie. Dabei werden Enzym-Polymere eingesetzt, in denen mehrere Moleküle Sekundärantikörper mit mehreren Molekülen Enzym kovalent verbunden sind.

Die Double Stain 2-Step Polymer Kits bestehen aus zwei Arten solcher Enzym-Polymere: Eines der Polymere besteht aus Meerrettich-Peroxidase (HRP) und Sekundärantikörpern gegen Maus-Immunglobuline. Das zweite Polymer setzt sich aus Alkalischer Phosphatase (AP) und Sekundärantikörpern gegen Kaninchen-Immunglobuline zusammen.

Die Detektion der Primärantikörper erfolgt durch zwei nacheinander durchzuführende Enzym-Substrat-Reaktionen in Gegenwart farbgebender Substanzen (Chromogene), die schließlich eine mikroskopische Auswertung ermöglichen.

Dabei wird zunächst die HRP-Reaktion in Gegenwart von DAB/H₂O₂ durchgeführt, so dass sämtliche gebundenen Primärantikörper aus der Maus sichtbar werden. Anschließend werden durch Reaktion der AP mit einem geeigneten Substrat-Chromogen-Gemisch die gebundenen Kaninchen-Antikörper detektiert. Dieses zweite Chromogen sollte einen guten Kontrast zu DAB bilden. Wir empfehlen dafür Permanent AP Red (Bestell-Nr. ZUC001).

Das Testsystem ist für den Nachweis monoklonaler Antikörper aus der Maus (IgG und IgM) sowie mono- und polyklonaler Primärantikörper aus dem Kaninchen geeignet.

Im Unterschied zu Nachweistechiken, die nach dem Streptavidin-Biotin-Prinzip arbeiten, umgehen alle ZytoChem-Plus Polymer-Kits die bekannte Problematik der durch endogenes Biotin im Präparat verursachten Hintergrundfärbung.

Prinzip der Methode

Schnittpräparate von in Paraffin eingebetteten Geweben werden zunächst entparaffiniert und rehydratisiert.

Hintergrundfärbung durch unspezifische Bindung des Primärantikörpers oder des Sekundärantikörpers in den Polymeren wird durch die Inkubation mit einer Blockierungslösung („BlockingSolution“) minimiert. Dieser Schritt kann entfallen, wenn die verwendeten Primärantikörper in einem geeigneten Puffer verdünnt wurden.

Anschließend erfolgt die Inkubation mit den spezifischen Primärantikörpern, von denen der eine aus der Maus und der andere aus dem Kaninchen stammen muss. Die Primärantikörper werden entweder nacheinander oder als Gemisch auf das Präparat gegeben. Nach einem Waschschrift wird das HRP-Polymer anti-Maus aufgetragen. Nach Abwaschen des überschüssigen, nicht gebundenen HRP-Polymers wird das AP-Polymer anti-Rabbit auf den Schnitt gegeben.

Nach Abwaschen des überschüssigen AP-Polymers wird durch Zugabe einer DAB/H₂O₂-Lösung eine enzymatische Reaktion mit der HRP gestartet, in deren Verlauf sich am Ort der Bindung des Primärantikörpers aus der Maus ein brauner Farbniederschlag bildet, der im Lichtmikroskop sichtbar ist. Nach einem weiteren Waschschrift wird durch

Zugabe einer weiteren geeigneten Substrat-Chromogen-Lösung die AP-Reaktion gestartet. Durch den entstehenden Farbniederschlag wird nun der gebundene Primärantikörper aus dem Kaninchen lichtmikroskopisch sichtbar gemacht. Die Farbgebung ist abhängig vom verwendeten Chromogen. Das Chromogen DAB (kompatibel mit HRP) bildet am Ort des Zielantigens ein dunkelbraunes Reaktionsprodukt. Permanent AP Red (kompatibel mit AP) bildet am Ort des

Zielantigens ein rot-pinkes Reaktionsprodukt.

Gelieferte Reagenzien

REF / Cat. No. POL2DS-006

6 ml HRP-Polymer x Mouse (gebrauchsfertig)

6 ml AP-Polymer x Rabbit (gebrauchsfertig)

REF / Cat. No. POL2DS-100

100 ml HRP-Polymer x Mouse (gebrauchsfertig)

100 ml AP-Polymer x Rabbit (gebrauchsfertig)

Empfohlene Substratsysteme:

<i>DAB Substrate Kit</i>	<i>Best. Nr. DAB057</i>	<i>500 Tests</i>
<i>(2 Komponenten)</i>	<i>Best. Nr. DAB530</i>	<i>5.000 Tests</i>
<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>

Weitere verfügbare Substratsysteme:

<i>DAB High Contrast Kit</i>	<i>Best. Nr. DAB500 plus</i>	<i>500 Tests</i>
<i>(2 Komponenten)</i>	<i>Best. Nr. DAB5000 plus</i>	<i>5.000 Tests</i>
<i>AEC Single Solution</i>	<i>Best. Nr. ZUC037-008</i>	<i>80 Tests</i>
	<i>Best. Nr. ZUC037-125</i>	<i>1.250 Tests</i>
<i>AEC Substrate Kit</i>	<i>Best. Nr. ZUC042-050</i>	<i>500 Tests</i>
<i>(2 Komponenten)</i>	<i>Best. Nr. ZUC042-500</i>	<i>5.000 Tests</i>
<i>Permanent AEC Kit</i>	<i>Best. Nr. ZUC054-200</i>	<i>2.000 Tests</i>
<i>(4 Komponenten)</i>		
<i>Permanent HRP Green</i>	<i>Best. Nr. ZUC070-100</i>	<i>1.000 Tests</i>
<i>(2 Komponenten)</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)

Blocking Solution (Lösung zur Proteinblockierung, Bestell-Nr. ZUC007, optional)

Primärantikörper oder Antikörper-Cocktail (anwenderspezifisch)

Verdünnungspuffer für Primärantikörper (Bestell-Nr. ZUC025)

Reagenz zur Negativkontrolle

Substrat/Chromogen (1 x HRP-kompatibel, 1 x AP-kompatibel)

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. Positiv- und Negativkontrollen müssen parallel zum Untersuchungsmaterial mitgeführt werden. Wenn eine unerwartete Färbung oder Abweichungen vom zu erwartenden Färbeergebnis beobachtet werden, die vermutlich auf das Reagenz zurückzuführen sind, kontaktieren Sie bitte den Hersteller.

Vorsichtsmaßnahmen

Anwendung durch geschultes Fachpersonal. Tragen Sie Schutzausrüstung, um Augen-, Haut- oder Schleimhautkontakt mit dem Reagenz zu vermeiden. Falls Sie mit dem Reagenz 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 Natriumazid und ProClin 300 eingesetzt. Das Sicherheitsdatenblatt ist auf Anfrage erhältlich.

Typisches Färbeprotokoll

- | | |
|--|------------|
| 1. BlockingSolution (Protein-Block) <i>(Dieser Schritt ist optional)</i> | 5 Min. |
| 2. Waschen mit Waschpuffer | 1 x 2 Min. |
| 3. erster Primärantikörper (optimal verdünnt) oder negatives Kontrollreagenz | 30-60 Min. |
| 4. Waschen mit Waschpuffer | 3 x 2 Min. |
| 5. zweiter Primärantikörper (optimal verdünnt)
<i>(Die beiden Primärantikörper können auch als Gemisch/Cocktail aufgetragen werden)</i> | 30-60 Min. |
| 6. Waschen mit Waschpuffer | 3 x 2 Min. |
| 7. HRP-Polymer anti-Mouse | 30 Min. |
| 8. Waschen mit Waschpuffer | 3 x 2 Min. |
| 9. DAB <i>(Kontrolle der Färbeintensität unter dem Mikroskop empfohlen)</i> | 10 Min. |
| 10. Waschen mit Waschpuffer | 3 x 2 Min. |
| 11. AP-Polymer anti-Rabbit | 30 Min. |
| 12. Waschen mit Waschpuffer | 3 x 2 Min. |
| 13. Permanent AP Red <i>(Kontrolle der Färbeintensität unter dem Mikroskop empfohlen)</i> | 20 Min. |
| 14. Stoppen der Reaktion mit dest. H ₂ O, sobald die gewünschte Färbeintensität erreicht ist | |
| 15. Gegenfärben und Bläuen | |
| 16. Eindecken: Je nach verwendeten Chromogenen wässrig oder über Ethanol/Xylol permanent | |

Qualitätskontrolle

Zur genauen Auswertung sollten bei jedem Färbedurchgang Positiv- und Negativkontrollen mitgeführt werden. Die Positivkontrollen dienen der Überprüfung der korrekten Verarbeitung der Proben. Sind die Negativkontrollen positiv, so weist dies auf unspezifische Färbungen hin.

Zu erwartende Resultate

Während der Reaktion zwischen den Substraten und den Enzym-Polymeren (HRP bzw. AP) in Gegenwart der Chromogenen bilden sich am Ort der Bindung der Primärantikörper Farbniederschläge, die im Lichtmikroskop ausgewertet werden können. Die Farbgebung ist abhängig von den verwendeten Chromogenen.

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).

Das Reagenziensystem eignet sich ausschließlich für Doppelfärbungen mit Paaren von Primärantikörpern, von denen einer aus der Maus und der andere aus dem Kaninchen stammt. Primärantikörper anderer Spezies müssen mit anderen Techniken nachgewiesen werden. Gleiches gilt für die Verwendung von zwei Primärantikörpern aus der Maus oder zwei Primärantikörpern aus dem Kaninchen.

Für die erfolgreiche Durchführung der Doppelfärbung ist unbedingt zu prüfen, ob für beide Primärantikörper dieselbe Epitop-Demaskierungsmethode (thermisch oder enzymatisch) verwendet werden kann.

Die Aktivität der endogenen Peroxidase kann unspezifische Färbungen verursachen. Die Peroxidase-Aktivität kann durch H₂O₂ blockiert werden.

Die Aktivität der endogenen Alkalischen Phosphatase kann 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.

Eine unzureichende Gegenfärbung oder falsches Eindecken kann die Interpretation der Ergebnisse beeinflussen. Die Farbintensität des Endproduktes kann, insbesondere bei Lichteinfall, abnehmen.

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

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-Arbeitslösungen waren zu alt.
- Ausbleichen durch Unverträglichkeit von Chromogen und Eindeckmittel.
- Primärantikörper stammen nicht aus Maus und Kaninchen.
- Antigene/Epitope sind für die Primärantikörper nicht ausreichend zugänglich. Falls Sie für die getesteten Antikörper eine Antigen-Demaskierung (HIER) durchführen, verlängern Sie diese gegebenenfalls.
- Antigene/Epitope sind 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.
- Antigene/Epitope sind für die Primärantikörper nicht ausreichend zugänglich. Führen Sie eine Antigen-Demaskierung (HIER) durch oder verlängern Sie diese gegebenenfalls.
- Die verwendete Proteinblockierungslösung (Blocking Solution) 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 die Primärantikörper waren zu hoch verdünnt.
- Chromogen/Substrat-Arbeitslösungen waren 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 Waschschritte nach den Inkubationen mit den Enzym-Polymeren und den Chromogen/Substrat-Lösungen.
- Das Gewebe ist während der Prozedur (teilweise) ausgetrocknet.
- Unspezifische Bindung der Primärantikörper an das Präparat. Arbeiten Sie in diesem Fall mit einer Proteinblockierungslösung (Blocking Solution) und verdünnen Sie die Primärantikörper in einem geeigneten Verdünnungspuffer.
- Die Inkubationszeiten für die Primärantikörper waren zu lang oder die Primärantikörper waren zu stark konzentriert.
- Die Inkubationszeiten für die Chromogen/Substrat-Arbeitslösungen waren zu lang und die Reaktionstemperatur war zu hoch (z.B. bei erhöhter Temperatur im Labor).
- Das Substrat für die Alkalische Phosphatase 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).
- Das Substrat für die Meerrettich-Peroxidase wird von im Gewebe enthaltener endogener Peroxidase umgesetzt. Möglicherweise war die verwendete H₂O₂-Blockierungslösung nicht mehr ausreichend aktiv.

Leistungsdaten

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

Literatur

Elias JM. Immunohistopathology – A practical Approach to Diagnosis' ASCP Press 2003
Nadji M and Morales AR. Ann N Y Acad Sci 420:134-139, 1983
Omata M et al. Am J Clin Pathol 73:626-632, 1980



www.zytomed-systems.de

Zytomed Systems GmbH • Anhalterstraße 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



Nur für Forschungszwecke