

## ZytoChem Plus Biotinylated Secondary Antibody (anti-Rabbit)

**REF** / Cat. No.: ZUC010-008 8 ml gebrauchsfertig

### Gebrauchsanweisung

#### Zweckbestimmung

ZytoChem Plus Biotinylated Secondary Antibody (anti-Rabbit) (ZUC010) ist Bestandteil eines der folgenden ZytoChem Plus Kits:

AP008RED-RB	80 Tests (mit Fast Red), 8 ml
AP060-RB	600 Tests, 60 ml
AP125-RB	1.250 Tests, 125 ml
AP500-RB	5.000 Tests, 500 ml
HRP008AEC-RB	80 Tests (mit AEC), 8 ml
HRP008DAB-RB	80 Tests (mit DAB), 8 ml
HRP060-RB	600 Tests, 60 ml
HRP125-RB	1.250 Tests, 125 ml
HRP500-RB	5.000 Tests, 500 ml

Diese ZytoChem Plus AP- und HRP-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- und HRP-Kits handelt es sich um hoch sensitive Nachweiskits für die Immunhisto- und -zytochemie. Sie arbeiten mit der Streptavidin-Biotin-Technik, bei der ein biotinylierter Sekundärantikörper mehrere Moleküle eines Konjugates aus Streptavidin und Enzym (Alkalischer Phosphatase, AP, oder Meerrettichperoxidase, HRP) bindet. Die Visualisierung erfolgt über eine Enzym-Substrat-Reaktion in Gegenwart einer farbgebenden Komponente (Chromogen), die schließlich eine lichtmikroskopische Auswertung ermöglicht.

#### 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 Enzym-Konjugat („AP-Label“ oder „HRP-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 dem Enzym 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.

#### Geliefertes Reagenz

**REF** / Cat. No. ZUC010-008

8 ml **Biotinylated Secondary Antibody (anti-Rabbit)** (gebrauchsfertig)

## Lagerung und Handhabung

Die Lösung sollte bei 2-8°C gelagert werden ohne weiter verdünnt zu werden. Bitte bewahren Sie die Lösung an einem lichtgeschützten Ort auf. Nicht einfrieren. Die Lösung ist bis zum auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum haltbar, wenn sie bei 2-8°C gelagert wurde. Die Lösung darf nicht über das Verfallsdatum hinaus verwendet werden.

## Vorsichtsmaßnahmen

Anwendung durch geschultes Fachpersonal. Sicherheitsdatenblätter für das Fachpersonal sind auf Anfrage erhältlich. 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. Das zur Stabilisierung eingesetzte Natriumazid ( $\text{NaN}_3$ ) gilt in der vorliegenden Konzentration nicht als Gefahrstoff. Natriumazidanreicherungen können in Abflussrohren aus Blei und Kupfer zur Bildung von hoch explosiven Metall-Aziden führen. Um solche Azidanreicherungen in Abflussrohren zu vermeiden, muss nach 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.

## Färbeprotokoll

1. Peroxidblock (3 %  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Lösung, nur bei Verwendung eines HRP-Nachweissystems) **10 Min.**
2. Waschen mit Waschpuffer **1 x 2 Min.**
3. Proteinblock (Blocking Solution, Reagent/Reagenz 1) (*Dieser Schritt ist optional*) **5 Min.**
4. Waschen mit Waschpuffer **1 x 2 Min.**
5. Primärantikörper (optimal verdünnt) oder negatives Kontrollreagenz **30-60 Min.**
6. Waschen mit Waschpuffer **3 x 2 Min.**
7. Sekundärantikörper (Biotinylated Secondary Antibody, anti-Rabbit, Reagent 2, gelb) **10-15 Min.**
8. Waschen mit Waschpuffer **3 x 2 Min.**
9. Enzym-Konjugat (Streptavidin-AP- bzw. Streptavidin-HRP-Conjugate, Reagent 3, rot) **10-15 Min.**
10. Waschen mit Waschpuffer **3 x 2 Min.**
11. Chromogenes Substrat **10-20 Min.**  
(Kontrolle der Färbeintensität unter dem Mikroskop empfohlen)
12. Stoppen der Reaktion mit dest.  $\text{H}_2\text{O}$ , sobald die gewünschte Färbeintensität erreicht ist
13. Gegenfärben und Bläuen
14. Eindecken: abhängig vom verwendeten Chromogen wässrig oder organisch über Xylol

## 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.

## Fehlersuche

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

Weitere Hinweise zu möglichen Fehlerquellen sowie Lösungsvorschläge finden Sie in den Gebrauchsanweisungen zu unseren Detektionskits, die ZytoChem Plus Biotinylated Secondary Antibody (anti-Rabbit) als Komponente enthalten. Diese Kits sind im Abschnitt „Zweckbestimmung“ aufgelistet.

## Zu erwartende Resultate

Während der Reaktion zwischen Substrat und Enzym (Alkalische Phosphatase oder Meerrettichperoxidase) bildet sich in Gegenwart des Chromogens 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, der endogenen Peroxidase 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. Die Aktivität der endogenen Peroxidase kann durch  $H_2O_2$  blockiert werden. 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. In einigen Fällen, insbesondere bei Alkalische Phosphatase-Systemen, kann ein doppelter Substrat/Chromogenschritt die Färbeintensität erhöhen.

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

### Leistungsdaten

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

### Literaturverzeichnis

Nadji M and Morales AR Ann N.Y. Acad Sci 420:134-9, 1983



[www.zytomed-systems.de](http://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