

ZytoChem Fast AP One-Step Polymer anti-Mouse/Rabbit

REF / Cat. No.: **ZUC068-006** **60 Tests, 6 ml**
ZUC068-100 **1.000 Tests, 100 ml**

Gebrauchsanweisung

Zweckbestimmung

ZytoChem Fast AP One-Step Polymer anti-Mouse/Rabbit ist für den qualitativen Nachweis von Antigenen in fixierten und in Paraffin-eingebetteten Geweben, in Kryostatschnitten und in Zellpräparaten bestimmt. Es wurde für die Verwendung in Kombination mit monoklonalen und polyklonalen Primärantikörpern aus Maus und Kaninchen entwickelt. 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.

Das ZytoChem Fast AP One-Step Polymer ist ein sensitives Nachweisreagenz für die Immunhisto- und Immunzytochemie. Es handelt sich um eine Aminosäurekette, an die mehrere Moleküle Sekundärantikörper mit mehreren Molekülen Alkalischer Phosphatase (Alk. Phos., AP) kovalent gebunden sind. Die Visualisierung erfolgt über eine Enzym-Substrat-Reaktion in Gegenwart einer farbgebenden Komponente, die schließlich eine mikroskopische Auswertung ermöglicht.

Das Testsystem ist für den Nachweis monoklonaler und polyklonaler Primärantikörper aus Maus und Kaninchen geeignet. Kreuzreaktivitäten mit Primärantikörpern aus Ratte wurden beobachtet.

Im Unterschied zu anderen Nachweistechiken, die häufig nach dem Streptavidin-Biotin-Prinzip arbeiten, umgeht das ZytoChem Fast AP One-Step Polymer 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 im AP-Polymer 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 dem spezifischen Primärantikörper. Nach einem Waschschrift wird das AP-Polymer aufgetragen. Nach Abwaschen des überschüssigen AP-Polymers wird durch Hinzugabe 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 AP Red bildet am Ort des Zielantigens ein pink-rotes Reaktionsprodukt.

Geliefertes Reagenz

REF / Cat. No. **ZUC068-100**
100 ml **ZytoChem Fast AP One-Step Polymer anti-Mouse/Rabbit** (gebrauchsfertig)

REF / Cat. No. **ZUC068-006**
6 ml **ZytoChem Fast AP One-Step Polymer anti-Mouse/Rabbit** (gebrauchsfertig)

Empfohlene Chromogen-Substratsysteme:

Permanent AP Red Kit (2 Komponenten)

Best. Nr. ZUC001-125 1.250 Tests

Best. Nr. ZUC001-500 5.000 Tests

Benötigte Zusatzmaterialien, die nicht im Lieferumfang enthalten sind

Positives und negatives Kontrollgewebe

Xylol oder geeignete Ersatzstoffe

Ethanol, dest. H₂O

Waschpufferlösung (PBS oder TBS)

PAP Pen (Bestell Nr. LP0001, optional)

Blocking Solution (Lösung zur Proteinblockierung, optional)

Primärantikörper (anwenderspezifisch)

Reagenz zur Negativkontrolle

Substrat/Chromogen

Lösung zur Gegenfärbung

Eindeckmittel und Deckgläser

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 bei Lagerung bei 2-8°C bis zu dem auf dem Produktetikett angegebenen Verfallsdatum haltbar. Die Lösung darf nicht über das Verfallsdatum hinaus verwendet werden.

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 mikrobielle Verunreinigung der Lösung sollte vermieden werden, da sonst eine unspezifische Färbung auftreten könnte.

Zur Stabilisierung wird ProClin300 eingesetzt. Das Sicherheitsdatenblatt ist auf Anfrage 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. Blocking Solution (Proteinblock, dieser Schritt ist optional) | 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 5 Min. |
| 5. AP-Polymer anti-Mouse/Rabbit | 30 Min. |
| 6. Waschen mit Waschpuffer | 3 x 2 Min. |
| 7. Permanent AP Red (Kontrolle der Färbeintensität unter dem Mikroskop empfohlen) | 10-20 Min. |
| 8. Stoppen der Reaktion mit dest. H ₂ O, sobald die gewünschte Färbeintensität erreicht ist | |
| 9. Gegenfärben und Bläuen | |
| 10. Eindecken: permanent oder wässrig bei Permanent AP Red Kit. | |

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.

Zu erwartende Resultate

Während der Reaktion zwischen dem Substrat und der Alkalischen Phosphatase im AP-Polymer 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). 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.
- Der Primärantikörper stammt nicht aus Maus oder Kaninchen.
- 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.

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 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.
- 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 Waschschritte nach den Inkubationen mit dem Enzym-Polymer 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 einer Proteinblockierungslösung und verdünnen Sie den Primärantikörper in einem geeigneten Verdünnungspuffer.
- Die Inkubationszeit für den Primärantikörper war zu lang oder der Primärantikörper war zu stark konzentriert.
- Die Inkubationszeit für die Chromogen/Substrat-Arbeitslösung war zu lang und die Reaktionstemperatur war zu hoch (z.B. bei erhöhter Temperatur im Labor).

Leistungsdaten

Zytomed Systems hat Studien hinsichtlich der Leistung des Produktes 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



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