

Citrate Buffer, pH 7.1

For Heat Induced Epitope Retrieval (HIER)

<u>CAT. NO.</u>	<u>Form</u>	<u>Quantity</u>
00-5200	20X Concentrate	100 mL

BACKGROUND

Citrate Buffer solution is used in Heat Induced Epitope Retrieval (HIER) methods. Certain antibodies require HIER of formalin-fixed paraffin-embedded tissue⁽¹⁾ and cytological preparations⁽²⁾ to 'retrieve' immunoreactivity that has been compromised by processing (see Figure 1). Our laboratory results show enhanced immunostaining when Citrate Buffer, pH 6.0 is used with most antibodies. HIER is used to reverse the loss of antigenicity that occurs with some epitopes in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. We have found that some antibodies require HIER, and this procedure also enhances immunostaining with many antibodies. However, immunoreactivity with some antibodies is decreased with HIER—always refer to the primary antibody product insert. During HIER, tissue slides are immersed in Citrate Buffer solution and boiled (>95 °C) by hot plate or other appropriate heat source. Refer to the *Procedure For Use With HIER* section in this product insert for the complete method.

STORAGE AND SHELF LIFE

Store at 2-8°C. Do not freeze

STABILITY

There are no obvious signs to indicate instability. It has been quality controlled to assure consistent and reliable performance. Do not use after the expiration date stamped on container. With proper storage there is no significant loss of performance. If this buffer is stored under any conditions other than those specified, it must be validated by the user.

REAGENT PREPARATION

Dilute Citrate Buffer solution 1:20 in deionized or distilled water before using.

REAGENTS AND MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Hot Plate
- Slide holder
- 1 Liter Glass Beaker (Pyrex)
- PBS (Invitrogen® Cat. No. 00-3000)
- HistoGrip™ (Invitrogen® Cat. No. 00-8050)
- Deionized or distilled water

HIER PROCEDURE FOR FORMALIN FIXED, PARAFFIN EMBEDDED TISSUE SECTIONS

1. Adhere tissue to slide using HistoGrip™ (Invitrogen® Cat. No. 00-8050) silane or poly-L-lysine.
2. Deparaffinize in xylene and rehydrate tissue in graded alcohols.
3. Rinse in deionized water.
4. Rinse in PBS.
5. Block endogenous peroxidase with 0.5% hydrogen peroxide in for 10 minutes.
6. Rinse in PBS.
7. Put the slides in a slide rack and place in a 1L glass beaker (Pyrex) containing 500 mL of working solution of citrate buffer.
8. Place beaker on hot plate. Heat the solution until it boils and keep it boiling for 15 minutes. Note: alternative heat sources such as a pressure cooker can be used with an appropriate procedure.
9. After heating, remove beaker with slides from the hot plate and allow it to cool for 25 minutes.
10. Rinse slides with PBS.
11. If required, do avidin/biotin blocking. Note: HIER may enhance endogenous avidin/biotin activity.
12. If required, do general protein blocking step.
13. Start immunostaining protocol.

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. Norton A.J., et al. *J Pathol* 173 (4): 371-391, 1994.
2. Suthipintawong C, et al. *Diagn Cytopathol* 15: 167-174, 1996.

RELATED BUFFERS

	Concentration	Size	Invitrogen® Cat. No.	Recommended Antibody Use*
Citrate Buffer, pH 4.0	20X	100 mL	00-5100	Most cytokeratins, human immunoglobulins
Citrate Buffer, pH 7.1	20X	100 mL	00-5200	HER2, ER, PR, Ki-67, Bcl-2, Bcl-X _L , PCNA, Cyclin D1, p53, CD61, EGFr
EDTA	20X	100 mL	00-5500	CD3, CD4, CD8

TRADEMARKS

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

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

PI005200

(Rev 10/08) DCC-08-1089

© 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.

Solución tampón citrato, pH 7.1

Para la recuperación de epítipo inducida por el calor (HIER)

<u>CAT. N°</u>	<u>Forma</u>	<u>Cantidad</u>
00-5200	20X Concentrado	100 mL

La solución tampón de citrato se utiliza en los métodos de recuperación de epítipos inducida por calor (HIER). El tampón citrato, a pH 6,0 puede ser utilizado con la mayoría de los anticuerpos. El tampón citrato, a pH 4,0 debe ser utilizado con la mayoría de los anticuerpos anti citoqueratinas e inmunoglobulinas humanas. El tapón citrato, a pH 7,1 debe utilizarse con anticuerpos HER2, ER, PR, Bcl-2, Bcl-X_L, PCNA, Ciclina D1, p53, CD61 y EGFr.

ALMACENAMIENTO Y VIDA ÚTIL EN DEPÓSITO

Almacenar a 2-8 °C. No congelar

ESTABILIDAD

No hay señales evidentes de que exista inestabilidad. Se ha sometido a un control de calidad para garantizar el funcionamiento constante y fiable. No utilizar una vez pasada la fecha de caducidad estampada en el contenedor. Si se guarda adecuadamente no hay pérdida significativa del rendimiento. Si este tampón se guarda en condiciones distintas a las especificadas, debe ser validado por el usuario.

PREPARACIÓN DEL REACTIVO

Antes de usar, diluir solución tampón de Citrato 1:20 en agua desionizada o destilada.

REACTIVOS Y MATERIALES NECESARIOS PERO NO PROVISTOS

- Placa térmica
- Portaobjeto
- Vaso de precipitados de 1 litro (Pyrex)
- PBS (Invitrogen® Cat. N° 00-3000)
- HistoGrip™ Invitrogen® Cat. N° 00-8050)
- Agua desionizada o destilada

PROCEDIMIENTO HIER PARA CORTES DE TEJIDO INFILTRADOS EN PARAFINA Y FIJADOS EN FORMALINA.

1. Fijar el tejido al porta mediante HistoGrip™ (Invitrogen® Cat. N° 00-8050) silano o poli-L-lisina.
2. Desparafinizar en xileno y rehidratar el tejido en alcoholes graduados.
3. Enjuagar con agua desionizada.
4. Aclarar en PBS.
5. Bloquear peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno 0,5% durante 10 minutos.
6. Aclarar en PBS.
7. Colocar los portas en un portaobjeto y colocarlo en un vaso de precipitados de 1 L (Pyrex) que contenga 500 mL de solución de trabajo de tampón de citrato.
8. Colocar el vaso sobre la placa térmica. Calentar la solución hasta que hierva y mantener el hervor durante 5 minutos. Nota: con un procedimiento adecuado se pueden utilizar fuentes alternativas de calor, como una olla a presión.
9. Después de calentar, retirar el vaso de precipitados con los portas de la placa térmica y dejar que enfríe durante 25 minutos.
10. Enjuagar los portas con PBS.
11. Si es necesario, realizar el bloqueo de la avidina/biotina. Nota: el HIER puede aumentar la actividad endógena de la avidina/biotina.
12. Si es necesario, realizar el paso del bloqueo general de las proteínas.
13. Iniciar el protocolo de inmunotinción.

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 REGISTRADAS

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

**Para recibir información más detallada, consulte la versión en inglés de la hoja de datos o el sitio www.invitrogen.com.
SI TIENE ALGUNA PREGUNTA SOBRE ESTE PRODUCTO, COMUNÍQUESE CON 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

PI005200

(Rev 10/08) DCC-08-1089

© 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.

Solution de tampon citrate, pH 7.1

Pour restauration antigénique par la chaleur (RAC)

<u>NO DE CAT.</u>	<u>Forme</u>	<u>Quantité</u>
00-5200	Concentré 20X	100 mL

La solution de tampon citrate est utilisée dans les méthodes de restauration antigénique par la chaleur (RAC). Le tampon citrate pH 6,0 peut être utilisé avec la plupart des anticorps. Le tampon citrate pH 4,0 doit être utilisé avec la plupart des anticorps anti-protéine immunoglobuline humaine et cytotkératine. Le tampon citrate pH 7,1 doit être utilisé avec les anticorps HER2, ER, PR, Bcl-2, Bcl-X_L, PCNA, Cycline D1, p53, CD61 et EGFr.

STOCKAGE ET DURÉE DE CONSERVATION

Conserver entre 2 et 8 °C. Ne pas congeler

STABILITÉ

Il n'existe aucun signe évident pour indiquer l'instabilité. Sa qualité a été contrôlée afin de garantir l'homogénéité et la fiabilité de sa performance. Ne pas utiliser après la date de péremption estampillée sur le carton. Il n'y aura pas de perte de performance importante si les conditions de stockage sont adéquates. Si ce tampon est conservé dans des conditions autres que celles spécifiées, il devra être validé par l'utilisateur.

PRÉPARATION DU RÉACTIF

Diluer la solution tampon au citrate 1:20 dans de l'eau désionisée ou distillée avant de l'utiliser.

RÉACTIFS ET MATÉRIEL NÉCESSAIRE MAIS NON FOURNIS

- Plaque chauffante
- Passe-vues
- Bêcher en verre de 1 litre (Pyrex)
- Soluté tampon de phosphate (PBS) (Invitrogen® No de cat. 00-3000)
- HistoGrip™ (Invitrogen® No de cat. 00-8050)
- Eau désionisée ou distillée

PROCÉDURE DE RAC POUR LES SECTIONS DE TISSU FIXÉS DANS DU FORMOL ET INCORPORÉES DANS DE LA PARAFFINE

1. Attacher le tissu sur la lame à l'aide de l'HistoGrip™ (Invitrogen® No de cat. 00-8050) en silane ou poly-L-lysine.
2. Déparaffiner dans du xylène et réhydrater le tissu dans des alcools classés.
3. Rincer à l'eau désionisée.
4. Rincer dans un soluté tampon de phosphate.
5. Bloquer la peroxydase endogène avec du peroxyde d'hydrogène à 0,5 % pendant 10 minutes.
6. Rincer dans un soluté tampon de phosphate.
7. Ranger les lames dans une grille à lames et la placer dans un bêcher en verre de 1 litre (Pyrex) contenant 500 mL de solution préparée d'tampon citrate.
8. Placer le bêcher sur la plaque chauffante. Chauffer la solution jusqu'à ébullition et garder à ébullition pendant 15 minutes. Remarque : d'autres sources de chaleur, tel qu'un autocuiseur, peuvent être utilisées si la procédure est appropriée.
9. Après l'avoir chauffé, retirer le bêcher avec les lames de la plaque chauffante et laisser refroidir pendant 25 minutes.
10. Rincer les lames dans du soluté tampon de phosphate (PBS).
11. Le cas échéant, effectuer un blocage d'avidine/biotine. Remarque: la RAC peut promouvoir une activité endogène avidine/biotine.
12. Au besoin, effectuer l'étape de blocage général des protéines.
13. Commencer le protocole d'immunocoloration.

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.

MARQUES DE COMMERCE

CAS-Block™, Clearmount™, HistoGrip™, Histomount™, et Peroxo-Block™ sont des marques de Zymed Laboratories, Inc. Zymed® et Histostain® sont des marques déposées de Zymed Laboratories, Inc.

Pour de plus amples informations, se reporter soit à la version anglaise des fiches techniques, soit au site Internet www.invitrogen.com.

SI VOUS AVEZ DES QUESTIONS CONCERNANT CE PRODUIT, VEUILLEZ VOUS ADRESSER À VOTRE REPRÉSENTANT LE PLUS PROCHE

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

PI005200

(Rev 10/08) DCC-08-1089

© 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.

Soluzione tamponata a base di citrato, pH 7.1

Per il richiamo dei determinanti antigeni indotto mediante calore (Heat Induced Epitope Retrieval, HIER)

<u>N. CAT.</u>	<u>Forma</u>	<u>Quantità</u>
00-5200	Concentrato 20X	100 mL

La soluzione tamponata a base di citrato è utilizzata nei metodi di richiamo dei determinanti antigeni indotto mediante calore (Heat Induced Epitope Retrieval, HIER). Il tampone a base di citrato con pH 6,0 può essere utilizzato con la maggior parte degli anticorpi. Il tampone a base di citrato con pH 4,0 dovrebbe essere usato con la maggior parte degli anticorpi proteinici dell'immunoglobulina umana e della citocheratina. Il tampone a base di citrato con pH 7,1 dovrebbe essere usato con gli anticorpi HER2, ER, PR, Bcl-2, Bcl-X_L, PCNA, Ciclina D1, p53, CD61 e EGFr.

CONSERVAZIONE E DURATA A MAGAZZINO

Conservare a 2-8 °C. Non congelare

STABILITÀ

Non vi sono segni ovvi ad indicazione dell'instabilità. La soluzione è stata sottoposta ad un controllo della qualità per garantire la coerenza e l'affidabilità della performance. Non usare dopo la data di scadenza riportata sul contenitore. Se si osservano le debite modalità di conservazione, non vi è alcuna perdita di performance significativa. Qualsiasi altra condizione di conservazione del tampone che si discosti da quelle specificate deve essere convalidata dall'utente.

PREPARAZIONE DEI REAGENTI

Prima dell'uso, diluire la Soluzione tamponata a base di citrato in acqua deionizzata o distillata osservando un rapporto di 1:20.

REAGENTI E MATERIALI OCCORRENTI MA NON ACCLUSI

- Piastra riscaldante
- Portavetrini
- Becher di vetro da 1 litro (pirex)
- PBS (N. Cat. Invitrogen® 00-3000)
- HistoGrip™ (N. Cat. Invitrogen® 00-8050)
- Acqua distillata o deionizzata

PROCEDURA HIER PER SEZIONI TISSUTALI FISSATE IN FORMALINA ED INCLUSE IN PARAFFINA

1. Far aderire il tessuto al vetrino usando l'idruro di silicio o la poli-l-lisina HistoGrip™ (N. Cat.® Invitrogen 00-8050).
2. Eseguire la deparaffinazione in xilene e reidratare il tessuto immergendolo in alcoli selezionati.
3. Risciacquare in acqua deionizzata.
4. Risciacquare in PBS.
5. Bloccare la perossidasi endogena con perossido di idrogeno allo 0,5% per 10 minuti.
6. Risciacquare in PBS.
7. Inserire i vetrini nell'apposito rack per vetrini ed immergere in un becher di vetro da 1 litro (pirex) contenente 500 mL di soluzione attiva di tamponata a base di citrato.
8. Appoggiare il becher sulla piastra riscaldante. Riscaldare la soluzione fino alla bollitura e lasciare bollire per 15 minuti. Nota: si possono utilizzare delle fonti di riscaldamento alternative, quali un bollitore a pressione, adottando le debite procedure.
9. Al termine del riscaldamento, rimuovere il becher contenente i vetrini dalla piastra riscaldante e lasciare raffreddare per 25 minuti.
10. Risciacquare i vetrini con PBS.
11. Se necessario, eseguire il blocco dell'avidina/biotina. Nota: la procedura di HIER potrebbe promuovere l'attività dell'avidina/biotina endogena.
12. Se necessario, eseguire la fase di blocco generale delle proteine.
13. Avviare il protocollo di immunocolorezione.

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 COMMERCIALI

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

Per informazioni più dettagliate vi preghiamo di consultare la versione inglese della scheda tecnica oppure visitate il sito www.invitrogen.com.

SE AVETE DOMANDE CIRCA IL 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

PI005200

(Rev 10/08) DCC-08-1089

© 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.

Citratpufferlösung, pH 7.1

Für wärmeinduziertes Epitop-Retrieval (HIER)

<u>KAT.-NR.</u>	<u>Formulierung:</u>	<u>Menge</u>
00-5200	20X Konzentrat	100 mL

Citratpufferlösung wird bei wärmeinduzierten Epitop-Retrieval- (HIER) Methoden verwendet. Citratpuffer, pH 6.0 kann mit den meisten Antikörpern verwendet werden. Citratpuffer, pH 4.0 sollte mit den meisten Cytokeratin- und humanen Immunglobulinprotein-Antikörpern verwendet werden. Citratpuffer, pH 7.1 sollte mit HER2, ER, PR, Bcl-2, Bcl-X_L, PCNA, Cyclin D1, p53, CD61 und EGFr Antikörpern verwendet werden.

AUFBEWAHRUNG UND HALTBARKEIT

Bei 2-8°C aufbewahren. Nicht einfrieren

STABILITÄT

Es bestehen keine offensichtlichen Anzeichen für die Instabilität. Es wurde qualitätsgeprüft, um eine gleichförmige und zuverlässige Leistung zu gewährleisten. Nicht nach dem auf dem Behälter aufgedruckten Verfalldatum verwenden. Bei ordnungsgemäßer Aufbewahrung besteht keine signifikante Leistungseinbuße. Wird dieser Puffer unter anderen Bedingungen aufbewahrt als die angegebenen, muss er vom Benutzer validiert werden.

VORBEREITUNG DES REAGENZ

Die Zitratpufferlösung vor dem Gebrauch im Verhältnis 1:20 mit deionisiertem oder destilliertem Wasser verdünnen.

ERFORDERLICHE, JEDOCH NICHT MITGELIEFERTE REAGENZEN UND MATERIALIEN

- Kochplatte
- Objektträgerhalter
- 1-Liter-Becherglas (Pyrex)
- PBS (Invitrogen® Kat.- Nr. 00-3000)
- HistoGrip™ (Invitrogen® Kat.-. Nr. 00-8050)
- Deionisiertes oder destilliertes Wasser

HIER-VERFAHREN FÜR FORMALIN-FIXIERTE, PARAFFIN-EINGEBETTETE GEWEBESCHNITTE

1. Gewebe an Objektträger mit HistoGrip™ (Invitrogen® Kat.-Nr. Nr. 00-8050) Silan oder Poly-L-Lysin anhaften.
2. Gewebe in Xylen entparaffinieren und in gradierten Alkoholen rehydrieren.
3. In deionisiertem Wasser spülen.
4. In PBS spülen.
5. Die endogene Peroxidase mit 0,5%igem Wasserstoffperoxid 10 Minuten lang blocken.
6. In PBS spülen.
7. Die Objektträger in ein Objektträgersrack stellen und in ein mit 500 mL Arbeitslösung Citratpufferlösung gefülltes 1-Liter-Becherglas (Pyrex) platzieren.
8. Das Becherglas auf die Kochplatte stellen. Die Lösung zum Kochen bringen und 15 Minuten lang kochen. Hinweis: Alternative Hitzequellen wie ein Schnellkochtopf können mittels einem angemessenen Verfahren verwendet werden.
9. Nach dem Erhitzen das Becherglas mit den Objektträgern von der Kochplatte nehmen und 25 Minuten abkühlen lassen.
10. Objektträger mit PBS abspülen.
11. Falls erforderlich, Avidin/Biotin-Blocking vornehmen. Hinweis: HIER kann die endogene Avidin/Biotin-Aktivität fördern.
12. Falls erforderlich, den allgemeinen Protein-Blocking-Schritt vornehmen.
13. Das Immunostaining-Protokoll starten.

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.

MARKEN

CAS-Block™, Clearmount™, HistoGrip™, Histomount™ und Peroxo-Block™ sind Marken von Zymed Laboratories, Inc. Zymed® und Histostain® sind eingetragene Marken von Zymed Laboratories, Inc.

Detailliertere Informationen sind entweder in der englischen Fassung des Datenblatts oder unter www.invitrogen.com zu finden.

BEI FRAGEN ZU DIESEM PRODUKT WENDEN SIE SICH BITTE AN IHR ÖRTLICHES VERTRIEBSUNTERNEHMEN.

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

PI005200

(Rev 10/08) DCC-08-1089

© 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.