

*Invitrogen PicTure™-MAX Polymer
Detection Kit
Invitrogen Polymer Detection System*

<u>CAT. NO.</u>	<u>FOR PRIMARY ANTIBODY</u>	<u>CHROMOGEN</u>	<u>GOOD FOR</u>
87-9083	Broad Spectrum*	AEC	1000 slides

*Will react with mouse, rabbit, guinea pig and rat primary antibodies.

INTENDED USE

For In Vitro Diagnostic Use. Interpretation must be made within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a qualified pathologist.

PicTure™-MAX Polymer Detection kits are designed to reveal antigens that have reacted with a user-supplied primary antibody on human tissue. Paraffin-embedded tissues can be used.

BACKGROUND

The Invitrogen *PicTure™-MAX* Polymer Detection kit features Invitrogen's proprietary HRP polymer technology to provide excellent sensitivity and high specificity. Invitrogen's polymer technology allows for intense nuclear, cytoplasmic, and membrane antigen staining. Drawbacks of other polymer systems include compromised cell penetration ability that can cause weak nuclear staining.¹ Invitrogen's polymer conjugate contains multiple HRPs to provide excellent sensitivity. Invitrogen *PicTure™-MAX* Polymer kits do not contain biotin nor streptavidin, so potential background due to endogenous biotin activity is completely avoided.

Due to the increased sensitivity of PicTure-MAX, many Invitrogen prediluted 2ndGen primary antibodies will require a 1:2 or higher dilution. For a complete list of our primary antibodies, please refer to www.invitrogen.com/pathology or contact Invitrogen Technical Support at tech_support@invitrogen.com

PROTOCOL SUMMARY

After formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections are deparaffinized in xylene and dehydrated in a graded series of ethanol, an endogenous peroxidase quenching step is performed. This endogenous peroxidase activity can be quenched by either using 3% hydrogen peroxide in methanol or Invitrogen Peroxo-Block™ (Cat. No. 00-2015). No blocking solution is required. After incubating the primary antibody on the tissue, the secondary antibody is added, HRP polymer is added, and after a wash step, the AEC chromogen is then added, and the peroxidase catalyzes the substrate (hydrogen peroxide) and converts the chromogen to a red deposit, which visualizes the location of the antigen.

STORAGE AND SHELF LIFE

Store kit at 2-8°C. All performance claims are void after kit expiration date.

REAGENTS SUPPLIED

- Reagent A. One dropper bottle (110 mL) of ready-to-use secondary antibody.
- Reagent B. One dropper bottle (110 mL) of ready-to-use HRP polymer conjugate.
- Reagent C. One dropper bottle (110 mL) of ready-to-use AEC *Single Solution* chromogen

REAGENTS AND MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Xylene, ethanol, and absolute methanol
- Distilled or deionized water
- 30% hydrogen peroxide
- 10 mM phosphate-buffered saline (PBS) (Optional: 0.05% Tween 20)
- Mini PAP Pen (Invitrogen Cat. No 00-8877)
- Primary antibody
- Hematoxylin (Invitrogen Cat. No. 00-8001)
- Mounting Media
 - Clearmount™ (Invitrogen Cat. No. 00-8110) or
 - GVA Mounting Solution (Invitrogen Cat. No.00-8000)

SUGGESTED STAINING PROTOCOL

A. PRELIMINARY PREPARATION OF SLIDES

<u>1. SPECIMEN PREPARATION</u>	<p>-Appropriate tissue and antigen fixation is required to obtain reproducible performance and reliable interpretations. Suitable fixatives include: 10% neutral buffered formalin, B5, Bouin's, Zinc formalin or alcohol-base fixatives.</p> <p>-10% neutral buffered formalin, B5, Bouin's, Zinc formalin or alcohol-base fixatives are regarded as suitable fixatives for most antigens of clinical significance.</p> <p>- Formalin-fixed tissues post-fixed in B5 before paraffin embedding may show improved stain. Cell smears prepared from body fluids should be made to assure a monolayer of cells. Multilayers of cells can trap staining reagents and interfere with the interpretation of the results. Smears should be fixed immediately after preparation. Depending on the properties of the antigen, cell smears are usually stable for one to two weeks when stored at 4°C.</p> <p>- Fixation of cytospin or frozen sections can be done with acetone (100%) at 4°C for a period of 10 minutes.</p>
<u>2. SLIDE PREPARATION</u>	<p>-Precoat slides with HistoGrip™ (Invitrogen Cat. No. 00-8050). As an alternative, precoat with 0.1% poly-L-lysine in water, then air dry.</p>
<u>3. DEPARAFFINIZATION AND REHYDRATION</u>	<p>-Paraffin sections are deparaffinized with xylene and rehydrated in a graded series of ethanol. Wash cell smears or tissue in a PBS bath for 10 minutes before starting the staining procedure. Note: Do not allow specimen or tissue sections to dry from this point on.</p>
<u>4. CONTROL SLIDES</u>	<p>Three control slides are necessary for the interpretation of results.</p> <ul style="list-style-type: none">• Positive Tissue Control: A specimen, processed in the same way as the unknown, contains the antigen to be stained.• Reagent Control/Negative Control-1: An additional slide that will be treated with a non-immune serum instead of same concentration of primary antibody. Any staining observed on the specimen is probably due to non-specific protein binding or non-specific binding of other reagents.• Negative Control-2: A specimen, processed in the same way as the unknown, does not contain the antigen to be stained [optional].

SUGGESTED STAINING PROTOCOL CONTINUED

B. STAINING PROTOCOL

Reagent	Staining Procedures	Incubation Time (Min.)
<u>1. PEROXIDASE QUENCHING SOLUTION</u> (Not provided)	<p>This step is optional. Do step 1 if elimination of endogenous peroxidase activity is necessary.</p> <p>-For paraffin-embedded tissues,</p> <ol style="list-style-type: none">Add 1 part of 30% hydrogen peroxide to 9 parts of absolute methanol. Mix well.Submerge slides in PEROXIDASE QUENCHING SOLUTION for 10 minutes.Wash with PBS 2 min., 3 times. Proceed to Step 2. <p>For frozen tissue, treat with Peroxo-Block™ (cat. no. 00-2015) for 45 sec. Wash immediately. Peroxo-Block™ can also be used with paraffin tissues.</p>	10 (optional)
<u>2. PRIMARY ANTIBODY</u> (Not provided)	<p>Optimal dilution and incubation times should be determined by the investigator. 2nd Gen Primary antibodies are optimized for use with PicTure™-MAX detection kits. (Dilution and incubation time are dependent on sample preparation, antibody affinity, amt. of antigen present, and antigen accessibility).</p> <ol style="list-style-type: none">Apply 2 drops (100 µL) or enough to completely cover tissue, of PRIMARY ANTIBODY to each section.Incubate in moist chamber for 30 min.Rinse with PBS for 2 min., 3 times.	30
<u>3. SECONDARY ANTIBODY</u> Ready-to-use. Reagent A	<ol style="list-style-type: none">Apply 2 drops (100 µL) or enough to completely cover tissue, of SECONDARY ANTIBODY to each section.Incubate in moist chamber for 20 min.Rinse in PBS for 2 min., 3 times	20
<u>4. HRP POLYMER CONJUGATE</u> Ready-to-use. Reagent B	<ol style="list-style-type: none">Apply 2 drops (100 µL) or enough to completely cover tissue, of HRP POLYMER CONJUGATE to each section. Incubate for 30 min.Rinse with PBS for 2 min., 3 times.	30
<u>5. AEC Single Solution</u> <u>CHROMOGEN</u> Ready-to-use. Reagent C	<ol style="list-style-type: none">DO NOT EQUILIBRATE AEC Single Solution TO ROOM TEMPERATURE BEFORE USE.Add cold (2-8°C) AEC Single Solution to slides. Immediately return AEC Single Solution back to 2-8°C storage.Incubate slides at room temperature for 10 min.Rinse well with distilled water.* <p>*Note: AEC is alcohol soluble. Do not dehydrate.</p>	10

www.invitrogen.com

Invitrogen Corporation • 542 Flynn Rd • Camarillo • CA 93012 • Tel: 800.955.6288 • E-mail: techsupport@invitrogen.com

PIN: 32236

(Rev 08/08) 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.

From this point on, the investigator should proceed with his or her own established laboratory protocols for counterstaining and mounting. Invitrogen recommends using Hematoxylin (Cat. No. 00-8001) as a counterstain and either GVA (Cat. No. 00-8000) or Clearmount™ (Cat. No. 00-8010) as a mounting solution for AEC.

INTERPRETATION OF RESULTS

The following table interprets results which might be achieved using various staining controls.

Case No.	+ control	reagent control	(-) control	Sample	Analysis
1	-	-	-	-	Procedure performed incorrectly.
2	+	+	+	+	Non-specific staining due to protein binding or endogenous peroxidase activity.
3	+	-	+	+/-	Negative control contains the antigen.
4	-	-	-	+	Positive control does not contain the antigen.
5	+	-	-	-	Sample does not contain the antigen.
6	+	-	-	+	Sample contains the antigen.

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. Petrosyan K, et al. *J Histotechnology* 25(4): 247-250, 2002.

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

PIN: 32236

(Rev 08/08) 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.

Paquetes *PicTure*TM-MAX Sistema de detección de polímeros de Invitrogen

<u>Nº. DE CAT.</u>	<u>PARA ANTICUERPO PRIMARIO</u>	<u>CROMÓGENO</u>	<u>RECOMENDADO PARA</u>
87-9083	Amplio espectro*	AEC	1000 portaobjetos

*Reaccionará con anticuerpos primarios de ratón, conejo, cobaya y rata.

PROPÓSITO DE USO

Para utilización en diagnóstico in vitro. La interpretación de los resultados debe realizarla un patólogo cualificado, dentro del contexto de la historia clínica del paciente y otras pruebas diagnósticas.

Los paquetes *PicTure*TM-MAX están diseñados para revelar antígenos que han reaccionado con un anticuerpo primario suministrado por el usuario en el tejido humano. Se pueden usar tejidos congelados o en parafina.

ALMACENAMIENTO Y CONSERVACIÓN

Guardar el paquete entre 2°C a 8°C. Todas las reclamaciones sobre rendimiento serán nulas pasada la fecha de caducidad.

NOTA

Debido a la alta sensibilidad de *PicTure*TM-MAX, muchos anticuerpos primarios de Invitrogen prediluted *2ndGen* pueden requerir un 1:2 o una dilución más alta.

REACTIVOS SUMINISTRADOS

- Reactivo A. Un frasco cuentagotas (110 mL) de anticuerpo secundario listo para usar
- Reactivo B. Un frasco cuentagotas (110 mL) de conjugado de polímero HRP listo para usar
- Reactivo C. Un frasco gotero (110 mL) de AEC *Single Solution* Cromógena

REACTIVOS Y MATERIALES NO SUMINISTRADOS

- Xileno, etanol y metanol puro
- Agua destilada o desionizada
- Peróxido de hidrógeno al 30%
- Tampón fosfato salino 10 mM (PBS), pH 7,4 (opcional: Tween20 al 0,05%)
- Lápiz Mini PAP (Invitrogen, n°. de cat. 00-8877)
- Anticuerpo primario
- Hematoxilina (Invitrogen, n°. de cat. 00-8001)
- Medios de montaje (Invitrogen, n°. de cat. 00-8000)
 - ClearmountTM (Invitrogen, n°. de cat. 00-8110) o
 - GVA (Invitrogen, n°. de cat. 00-8000)

PROTOCOLO DE TINCIÓN SUGERIDO

A. PREPARACIÓN PRELIMINAR DE PORTAOBJETOS

1. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA	<ul style="list-style-type: none">- Se necesita una fijación tisular y de antígenos apropiada para obtener comportamientos reproducibles e interpretaciones fiables. Algunos fijadores apropiados: fijadores de formalina neutra tamponada al 10%, de tipo B5, de Bouin, de formalina de Zinc o fijadores alcohólicos.- Se deberían preparar extensiones celulares directamente con fluidos corporales para asegurar una monocapa de células. Se deberían fijar las extensiones inmediatamente después de su preparación. Dependiendo de las propiedades del antígeno, las extensiones celulares suelen mantenerse estables durante una o dos semanas cuando se guardan a 4°C.- La fijación de los cortes centrifugados o congelados pueden hacerse con acetona al 100% a 4°C durante 10 minutos.
2. PREPARACIÓN DE PORTAOBJETOS	<ul style="list-style-type: none">- Poner inicialmente una capa de HistoGrip™ (Invitrogen, n.º de cat. 00-8050). Como alternativa, se puede poner una capa inicial de poli-L-lisina al 0,1% en agua y secarla posteriormente al aire.
3. DESPARAFINACIÓN Y REHIDRATACIÓN	<ul style="list-style-type: none">- Los cortes de parafina se desparafinan con xileno y se rehidratan con series graduales de etanol. Lavar las extensiones celulares o el tejido en un baño de PBS durante 10 minutos antes de empezar con el procedimiento de tinción.
4. PORTAS DE CONTROL	<p>Son necesarios tres portas de control para la interpretación de los resultados.</p> <ul style="list-style-type: none">• Control Tisular Positivo: un espécimen, procesado de la misma manera que el desconocido, contiene el antígeno que debe teñirse.• Reactivo Control/Control Negativo-1: un porta adicional, que se tratará con un suero no-inmune en lugar de tratarse con la misma concentración de anticuerpo primario. Cualquier tinción observada en el espécimen es probablemente debida a la unión no-específica de proteína o a la unión no-específica de otros agentes.• Control Negativo-2: un espécimen, procesado de la misma manera que el desconocido, no contiene el antígeno que se debe teñir [opcional]

Nota: evite que se sequen la muestra o los cortes tisulares durante los siguientes pasos.

PROTOCOLO DE TINCIÓN SUGERIDO (CONTINUACIÓN)

B. PROTOCOLO DE TINCIÓN

Reactivo	Preparación de la muestra	TIEMPO DE INCUBACIÓN (minutos)
1. SOLUCIÓN PARA LA ELIMINACIÓN DE LA PEROXIDASA (NO suministrada)	<p>Este paso es opcional. Realice este paso cuando se necesite eliminar actividad de la peroxidasa endógena.</p> <ol style="list-style-type: none">Para tejidos en parafina, añadir 1 parte de peróxido de hidrógeno al 30% a nueve partes de metanol puro (o sin diluir). Mezclar bien.Bañar los portaobjetos de la SOLUCIÓN PARA LA ELIMINACIÓN DE LA PEROXIDASA durante 10 minutos.Lavar con PBS (2 minutos, 3 veces). Seguir con el paso 2. <p>En el caso de tejidos congelados, tráelos con Peroxo-Block™ (n.º de cat. 00-2015) durante 45 segundos. Lavar inmediatamente.</p>	10 (opcional)
2. ANTICUERPO PRIMARIO (NO suministrado).	<p>Los tiempos óptimos de disolución y de incubación deberán ser determinados por el investigador. Los anticuerpos primarios de segunda generación están optimizados para ser usados con los paquetes de detección <i>PicTure™</i>-MAX. (Los tiempos de disolución y de incubación dependen de la preparación de la muestra, la afinidad del anticuerpo, la cantidad de antígeno presente y la accesibilidad del antígeno).</p> <ol style="list-style-type: none">Añadir 2 gotas (100 µL) de ANTICUERPO PRIMARIO a cada corte, o lo suficiente como para cubrir completamente el tejido.Incubar en una cámara de humedad durante 30 minutos.Enjuagar con PBS (2 minutos, 3 veces).	30
3. ANTICUERPO SECUNDARIO Listo para usar. Reactivo A	<ol style="list-style-type: none">Añadir 2 gotas (100 µL) de ANTICUERPO SECUNDARIO a cada corte, o lo suficiente como para cubrir completamente el tejido. Incubar durante 20 minutos.Enjuagar con PBS (2 minutos, 3 veces).	20
4. CONJUGADO DE POLÍMERO HRP Listo para usar. Reactivo B	<ol style="list-style-type: none">Añadir 2 gotas (100 µL) de CONJUGADO DE POLÍMERO HRP a cada corte, o lo suficiente como para cubrir completamente el tejido. Incubar durante 30 minutos.Enjuagar con PBS (2 minutos, 3 veces).	30
4. CROMÓGENO AEC <i>Single Solution</i> CROMÓGENA AEC lista para usar. Reactivo C	<ol style="list-style-type: none">NO EQUILIBREE AEC <i>Single Solution</i> A LA TEMPERATURA AMBIENTE ANTES DE USO.Agregue AEC <i>Single Solution</i> frío a las diapositivas. Vuelva inmediatamente al almacenaje 2-8°C AEC <i>Single Solution</i>.Incube las diapositivas en la temperatura ambiente por 10 minutos.Enjuagar bien con agua destilada*. <p>*Nota: AEC es soluble en alcohol. No deshidratar.</p>	10

A partir de este punto, el investigador debe proceder siguiendo sus propios protocolos de laboratorio para la contratinción y el montaje. Invitrogen recomienda el uso de Hematoxilina (Cat. N.º 00-8001) como contratinción y, o bien GVA (Cat. N.º 00-8000) o Clearmount™ (Cat. N.º 00-8010) como solución de montaje.

www.invitrogen.com

Invitrogen Corporation • 542 Flynn Rd • Camarillo • CA 93012 • Tel: 800.955.6288 • E-mail: techsupport@invitrogen.com

PIN: 32236

(Rev 08/08) 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.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

La tabla siguiente interpreta los resultados que podrían alcanzarse usando varios controles de tinción.

Caso N°.	+ control	reactivo control	(-) control	Muestra	Análisis
1	-	-	-	-	Procesamiento incorrecto.
2	+	+	+	+	Tinción no-específica debida a la unión de proteína o a la actividad de la peroxidasa endógena.
3	+	-	+	+/-	El control negativo contiene el antígeno.
4	-	-	-	+	El control positivo no contiene el antígeno.
5	+	-	-	-	La muestra no contiene el antígeno.
6	+	-	-	+	La muestra contiene el antígeno.

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 COMERCIALES

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

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

PIN: 32236

(Rev 08/08) 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.

Equipements PicTure™-MAX Invitrogen Système de Détection Polymère

<u>CAT. NO.</u>	<u>POUR ANTICORPS PRIMAIRE</u>	<u>CHROMOGENE</u>	<u>BON POUR</u>
-----------------	------------------------------------	-------------------	-----------------

87-9083	Spectre Large*	AEC	1000 lames
---------	----------------	-----	------------

*Réagira avec les anticorps primaires des souris, des lapins, des cobayes et des rats.

UTILISATION VOULUE

Pour Utilisation de Diagnostiques In Vitro. L'interprétation doit être faite par un pathologiste qualifié dans le cadre des antécédents cliniques du patient et d'autres tests de diagnostics.

L'équipement PicTure™-MAX est conçu pour révéler les antigènes qui ont réagi à l'anticorps primaire fourni par l'utilisateur sur un tissu humain. Des tissus gelés ou de paraffine-incluse être utilisés.

STOCKAGE ET DUREE DE CONSERVATION

Garder l'équipement à 2-8°C. Toute réclamation de performance est non recevable après la date d'expiration de l'équipement.

REMARQUE

En raison de la sensibilité élevée de PicTure™-MAX, beaucoup d'anticorps primaires de Invitrogen prediluted 2ndGen peuvent exiger un 1:2 ou dilution plus élevée.

REACTIFS FOURNIS

Réactif A. Une bouteille compte-gouttes (110 mL) de anticorps secondaire prêt à l'utilisation.

Réactif B. Une bouteille compte-gouttes (110 mL) de polymère HRP conjugué prêt à l'utilisation.

Réactif C. Un flacon compte-gouttes (110 mL) de chromogène de *Single Solution* AEC prêt à l'emploi

REACTIFS ET MATERIELS NECESSAIRES MAIS PAS FOURNIS

- Xylène, éthanol, et méthanol absolu
- Eau distillée ou déminéralisée
- 30% peroxyde d'hydrogène
- 10 mM phosphate-tampon salin (PBS), pH 7.4 (Optionnel: 0.05% Tween 20)
- Mini PAP Pen (Invitrogen Cat. No 00-8877)
- Anticorps primaire
- Hématoxyline (Invitrogen Cat. No. 00-8001)
- Monture Média (Invitrogen Cat. No. 00-8000)
 - Clearmount™ (Invitrogen Cat. No. 00-8110) ou
 - GVA (Invitrogen Cat. No 00-8000)

PROTOCOLE DE COLORATION SUGGERE

A. PREPARATION PRELIMINAIRE DES LAMES.

<u>1. PREPARATION DE SPECIMENS</u> :	Un tissu approprié et une fixation d'antigène sont nécessaires pour obtenir une performance reproductible et des interprétations fiables. Fixatifs inclus appropriés: 10% de formaline neutrale tamponnée, B5, Bouin, formaline de Zinc ou fixatifs à base d'alcool. -Un frottis de cellules préparé à partir de fluides corporels doit être fait pour assurer une couche monomoléculaire de cellules. Le frottis doit être fixé immédiatement après la préparation. Selon les propriétés de l'antigène, les frottis cellulaires sont habituellement stables pendant une ou deux semaines si garder à 4°C. - Fixation de cytopspine ou sections gelées peuvent être faites avec de l'acétone (100%) à 4°C pendant une période de 10 minutes.
<u>2. PREPARATION DE LAMES :</u>	- Préenduire les lames avec du HistoGrip™ (Invitrogen Cat. No. 00-8050). En alternative, préenduire avec 0.1% poly-L-lysine dans l'eau, puis sécher à l'air.
<u>3. DEPARAFFINAGE ET REHYDRATATION:</u>	-Les sections de paraffine sont déparaffinées avec du xylène et réhydratées en une série graduée d'éthanol. Laver les frottis cellulaires ou le tissu dans un bain de PBS pendant 10 minutes avant de commencer la procédure de coloration.
<u>4. LAMES TÉMOINS</u>	Trois lames témoins seront nécessaires pour interpréter les résultats. • Témoin tissulaire positif : un spécimen traité de la même façon que l'inconnu contient l'antigène à colorer. • Témoin réactif / Témoin négatif - 1 : une lame supplémentaire qui sera traitée avec un sérum non immunitaire au lieu d'une même concentration de l'anticorps primaire. Il est probable que toute coloration observée sur le spécimen soit causée par une fixation non spécifique de protéine ou une fixation non spécifique d'autres réactifs. • Témoin négatif - 2 : un spécimen traité de la même façon que l'inconnu ne contient pas l'antigène à colorer [facultatif].

Note: Ne pas laisser sécher des sections de spécimen ou de tissu à partir de ce moment.

PROTOCOLE DE COLORATION SUGGERE CONTINU

B. PROTOCOLE DE COLORATION

Réactif	Préparation de Spécimens :	Temps d'Incubation (Min.)
1. SOLUTION DE PEROXYDASE REFROIDISSANT (Pas fournie).	Cette étape est optionnelle. Suivre l'étape 1 si l'élimination d'activité de peroxydase endogène est nécessaire. a. Pour des tissus de paraffine-incluse, ajouter 1 part 30% peroxyde d'hydrogène à 9 parts de méthanol absolu. Bien mélanger. b. Plonger les lames dans une SOLUTION DE PEROXYDASE REFROIDISSANT pendant 10 minutes. c. Laver avec du PBS 2 min., 3 fois. Passer à l'étape 2. Pour un tissu gelé, traité avec du Peroxo-Block™ (cat. no. 00-2015) pendant 45 sec. Laver immédiatement.	10 (Optionnel).
2. ANTICORPS PRIMAIRE (Pas fourni).	La dilution optimale et le temps d'incubation doivent être déterminés par l'investigateur. 2 ^{ème} Gén Les anticorps primaires sont optimisés par l'utilisation des équipements de détection PicTure™-MAX. (Le temps de dilution et d'incubation sont dépendants de la préparation des échantillons, de l'affinité des anticorps, amt. de la présence d'antigènes, et de l'accessibilité aux antigènes). a. Ajouter 2 gouttes (100 µL) ou suffisamment pour couvrir complètement le tissu de chaque section d'ANTICORPS PRIMAIRE. b. Incuber dans une chambre humide pendant 30 min. c. Rincer avec du PBS pendant 2 min., 3 fois.	30
3. ANTICORPS SECONDAIRE Prêt à l'utilisation. Réactif A	a. Ajouter 2 gouttes (100 µL) ou suffisamment pour couvrir complètement le tissu de chaque section de ANTICORPS SECONDAIRE. Incuber pendant 20 min. b. Rincer avec du PBS pendant 2 min., 3 fois.	20
4. POLYMER HRP CONJUGUE Prêt à l'utilisation. Réactif B	a. Ajouter 2 gouttes (100 µL) ou suffisamment pour couvrir complètement le tissu de chaque section de POLYMER HRP CONJUGUE. Incuber pendant 30 min. b. Rincer avec du PBS pendant 2 min., 3 fois.	30
5. CHROMOGENE AEC : CHROMOGENE de Single Solution AEC prêt à l'emploi. Réactif C	a. N'EQUILIBREZ PAS AEC Single Solution A LA TEMPERATURE AMBIANTE AVANT L'EMPLOI. b. Ajoutez AEC Single Solution froid aux glissières. AEC immédiatement de retour de nouveau au stockage 2-8°C. c. Incubez les glissières à la température ambiante pendant 10 minutes. d. Bien rincer à l'eau distillée*. *Remarque : l'AEC est un alcool soluble. Ne pas déshydrater.	10

À partir d'ici, l'investigateur doit procéder avec ses propres protocoles de laboratoire pour la contre-coloration et la fixation. Invitrogen recommande l'utilisation d'hématoxyline (No de cat. 00-8001) comme contre-coloration et soit GVA (No de cat. 00-8000) soit Clearmount™ (No de cat. 00-8010) comme solution de fixation.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Le tableau suivant interprète les résultats pouvant être obtenus en utilisant divers témoins de coloration.

Dossier n°	témoin +	témoin réactif	témoin (-)	Échantillon	Analyse
1	-	-	-	-	Procédure effectuée de façon incorrecte.
2	+	+	+	+	Une coloration non spécifique causée par une fixation de protéine ou une activité de peroxydase endogène.
3	+	-	+	+/-	Le témoin négatif contient l'antigène.
4	-	-	-	+	Le témoin positif ne contient pas l'antigène.
5	+	-	-	-	L'échantillon ne contient pas l'antigène.
6	+	-	-	+	L'échantillon contient l'antigène.

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.

www.invitrogen.com

Invitrogen Corporation • 542 Flynn Rd • Camarillo • CA 93012 • Tel: 800.955.6288 • E-mail: techsupport@invitrogen.com

PIN: 32236

(Rev 08/08) 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.

6. Déshydratation du spécimen pendant la coloration.

MARQUE DE FABRIQUE

CAS-Block™, Clearmount™, HistoGrip™, Histomount™, et Peroxo-Block™ sont des marques des Zymed Laboratories, Inc. Zymed® et Histostain® sont des marques enregistrées par les Zymed Laboratories, Inc.

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

PIN: 32236

(Rev 08/08) 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.

PicTure™-MAX Kits Invitrogen Sistema di rilevazione polimeri

<u>CAT. NO.</u>	<u>PER ANTICORPI PRIMARI</u>	<u>CROMOGENO</u>	<u>PER</u>
87-9083	Ampio spettro*	AEC	1000 vetrini

*Reagisce con topo, coniglio, cavia ed anticorpi primari di topo.

SCOPI D'UTILIZZO

Per uso diagnostico In Vitro. L'interpretazione deve essere effettuata da un patologo qualificato entro il contesto dell'anamnesi clinica del paziente ed in considerazione di altri test diagnostici.

Il kit *PicTure*™-MAX kit è in grado di rilevare gli antigeni che hanno reagito con un anticorpo primario fornito dal committente su tessuto umano. Si possono utilizzare tessuti congelati oppure inclusi in paraffina.

CONSERVAZIONE E DURATA A MAGAZZINO

Conservare il kit a 2-8 °C. Eventuali reclami dopo la data di scadenza sono nulli.

NOTA

A causa di alta sensibilità di *PicTure*™-MAX, molti anticorpi primari di Invitrogen prediluted 2ndGen possono richiedere 1:2 o un'più alta diluizione.

REAGENTI FORNITI

Reagente A. Una boccetta contagocce (110 mL) di anticorpo secondario pronto per l'uso
Reagente B. Una boccetta contagocce (110 mL) di polimero coniugato HRP pronto per l'uso
Reagente C. Una boccetta contagocce (110 mL) di Cromogeno per *Single Solution AEC* pronto per l'uso.

REAGENTI E MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI

- Xilene, etanolo, e metanolo assoluto
- Acqua distillata oppure deionizzata
- 30% di perossido di idrogeno
- 10 mM di soluzione fisiologica tamponata al fosfato (PBS), pH 7,4 (Optional: 0,05% Tween 20)
- Mini PAP Pen (Invitrogen Cat. n. 00-8877)
- Anticorpo primario
- Ematossilina (Invitrogen Cat. n. 00-8001)
- Mezzo di inclusione (Invitrogen Cat. n. 00-8000)
 - Clearmount™ (Invitrogen Cat. n. 00-8110) o
 - GVA (Invitrogen Cat. n.00-8000)

PROTOCOLLO DI COLORAZIONE SUGGERITO

A. PREPARAZIONE PRELIMINARE DEI VETRINI

<u>1. PREPARAZIONE DEL CAMPIONE</u>	<ul style="list-style-type: none">- È necessaria l'appropriata fissazione del tessuto e dell'antigene per ottenere performance riproducibile ed interpretazioni affidabili. Fissativi idonei includono: 10% di formalina neutra tamponata, B5, Bouin's, formalina zincata oppure fissativi a base di alcool.- Si dovrebbero effettuare strisci cellulari preparati da liquidi organici per assicurare un monostrato di cellule. Gli strisci andrebbero fissati immediatamente dopo la preparazione. A seconda delle proprietà dell'antigene, gli strisci cellulari sono di solito stabili da una a due settimane se conservati a 4 °C.- Si può effettuare la fissazione di cytospin oppure di sezioni congelate con acetone (100%) a 4 °C oppure per una durata di 10 minuti.
<u>2. PREPARAZIONE DEL VETRINO</u>	-Pre rivestire i vetrini con HistoGrip™ (Invitrogen Cat. No. 00-8050). In alternativa, pre rivestire con 0,1% poli-L-lisina in acqua, dopodiché far asciugare all'aria.
<u>3. DEPARAFFINIZZAZIONE E REIDRATAZIONE</u>	- Dalle sezioni si toglie la paraffina vengono deparaffinate con xilene e reidratate in una scala crescente di etanolo. Lavare gli strisci cellulari oppure tessuto in un bagno PBS per 10 minuti prima di iniziare la procedura di colorazione.
<u>4. VETRINI DI CONTROLLO</u>	Per l'interpretazione dei risultati occorrono tre vetrini di controllo. <ul style="list-style-type: none">• Controllo tissutale positivo: un provino, trattato secondo le stesse modalità osservate per quello non noto, contenente l'antigene da colorare.• Controllo reagente/Controllo negativo-1: un vetrino supplementare che verrà trattato con un siero non immune anziché con la stessa concentrazione dell'anticorpo primario. Qualsiasi eventuale colorazione del provino è probabilmente riconducibile ad un legame proteinico aspecifico o ad un legame aspecifico di altri reagenti.• Controllo negativo-2: un provino, trattato secondo le stesse modalità osservate per quello non noto, non contenente l'antigene da colorare [facoltativo].

Nota: da questo momento in poi non fate asciugare i campioni né sezioni di tessuto.

PROTOCOLLO DI COLORAZIONE CONSIGLIATO CONTINUAZIONE

B. PROTOCOLLO DI COLORAZIONE

Reagente	Preparazione dei campioni	Tempo di incubazione (Min.)
<u>1. PEROSSIDASI QUENCHING SOLUZIONE</u> (Non fornito)	Questo passaggio 2opzionale. Eseguire il passaggio 1 se è necessaria l'attività di eliminazione di perossidasi endogena. a. Per tessuti inclusi in paraffina, aggiungere 30% di perossido di idrogeno a 9 parti di metanolo assoluto. Mescolare bene. b. Immergere vetrini in PEROXIDASE QUENCHING SOLUZIONE per 10 minuti. c. Lavare con PBS 2 min., 3 volte. Procedere al Passaggio 2. In caso di tessuti congelati, trattare con Peroxo-Block™ (cat. no. 00-2015) per 45 sec. Lavare immediatamente.	10 (Optional)
<u>2. ANTICORPI PRIMARI</u> (Non forniti).	I tempi di diluizione e di incubazione ottimale dovrebbero essere stabiliti dall'operatore. 2 nd Gen Gli anticorpi primari sono ottimizzati per l'uso con i detection kits PicTure™-MAX. (tempi di diluizione e incubazione dipendono dalla preparazione dei campioni, affinità degli anticorpi, la quantità di antigene presente, e l'accessibilità antigene). a. Applicare 2 gocce (100 µL) oppure abbastanza da ricoprire completamente il tessuto, di ANTICORPO PRIMARI O per ciascuna sezione. b. Incubare in ambiente umido per 30 min. c. Risciacquare con PBS oppure 2 min., 3 volte.	30
<u>3. ANTICORPO SECONDARIO</u> Pronto per l'uso. Reagente A	a. Applicare 2 gocce (100 µL) oppure una quantità sufficiente da ricoprire completamente il tessuto di ANTICORPO SECONDARIO a ciascuna sezione. Incubare per 20 min. b. Sciacquare con PBS per 2 min., 3 volte.	20
<u>4. POLIMERO CONIUGATO HRP</u> Pronto per l'uso. Reagente B	a. Applicare 2 gocce (100 µL) oppure una quantità sufficiente da ricoprire completamente il tessuto di POLIMERO CONIUGATO HRP a ciascuna sezione. Incubare per 30 min. b. Sciacquare con PBS per 2 min., 3 volte.	30
<u>5. AEC CROMOGENO</u> CROMOGENO per Single Solution AEC pronto per l'uso. Reagente C.	a. NON EQUILIBRI AEC Single Solution ALLA TEMPERATUR AMBIENTE PRIMA DELL'USO. b. Aggiunga AEC freddo (2-8°C). AEC di ritorno immediatamente ad immagazzinaggio 2-8°C. c. Incubi gli scorrevoli alla temperatura ambiente: 10 minuti. d. Risciacquare accuratamente con acqua distillata*. *Nota: l'AEC è solubile in alcol. Non disidratare.	10

Da questo punto in poi, l'investigatore dovrebbe attenersi ai protocolli vigenti presso il proprio laboratorio per l'esecuzione delle procedure di controcolorazione e fissaggio. La Invitrogen raccomanda l'uso dell'Ematossilina (N. Cat. 00-8001) per la controcolorazione e di alcool glicero-vinilico (Glycerol Vinyl Alcohol, GVA) (N. Cat. 00-8000) o di Clearmount™ (N. Cat. 00-8010) quale mezzo di fissaggio.

www.invitrogen.com

Invitrogen Corporation • 542 Flynn Rd • Camarillo • CA 93012 • Tel: 800.955.6288 • E-mail: techsupport@invitrogen.com

PIN: 32236

(Rev 08/08) 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.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Nella tabella sottostante si riporta l'interpretazione dei risultati ottenibili utilizzando vari controlli per la colorazione.

N. caso	Controllo +	Controllo reagente	Controllo (-)	Campione	Analisi
1	-	-	-	-	Procedura eseguita scorrettamente.
2	+	+	+	+	Colorazione aspecifica dovuta a legame proteinico o ad attività perossidasi endogena.
3	+	-	+	+/-	Il controllo negativo contiene l'antigene.
4	-	-	-	+	Il controllo positivo non contiene l'antigene.
5	+	-	-	-	Il campione non contiene l'antigene.
6	+	-	-	+	Il campione contiene l'antigene.

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 REGISTRATI

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

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

PIN: 32236

(Rev 08/08) 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.

PicTure™-MAX Kits Invitrogen Polymer Nachweis System

<u>Cat. Nr.</u>	<u>FÜR PRIMÄRE ANTIKÖRPER</u>	<u>CHROMOGEN</u>	<u>GUT FÜR</u>
87-9083	Breites Spektrum*	AEC	1000 Objektträger

*Reagiert auf primäre Antikörper von Maus, Kaninchen, Meerschweinchen und Ratte.

BEABSICHTIGTER NUTZEN

Für In Vitro Diagnostischem Gebrauch. Die Interpretation muss im Zusammenhang mit der klinischen Vorgeschichte des Patienten und anderen Diagnostiktests eines qualifizierten Pathologen vorgenommen werden.

Der *PicTure™*-MAX Kit ist dazu bestimmt, Antigene aufzudecken, die mit einem Nutzer- gelieferten primären Antikörper auf menschlichem Gewebe reagiert haben. Paraffin-eingebettete Gewebe können benutzt werden.

LAGERUNG UND LAGERFÄHIGKEIT

Den Kit bei 2-8°C lagern. Alle Leistungsansprüche sind ungültig nach dem Kit-Ablaufdatum.

HINWEIS

Wegen der hohen Empfindlichkeit von *PicTure™*-MAX, viele Invitrogen prediluted *2ndGen* Primärantikörper können 1:2 oder eine höhere Verdünnung erfordern.

GELIEFERTE REAGENTIEN

Reagens A. Eine Tropfflasche (110 mL) gebrauchsfertiges Sekundärantikörper

Reagens B. Eine Tropfflasche (110 mL) gebrauchsfertiges HRP Poly Konjugat

Reagens C. Eine Tropfflasche (110 mL) gebrauchsfertiges AEC *Single Solution*-Chromogen

BENÖTIGTE ABER NICHT GELIEFERTE REAGENTIEN UND MATERIALIEN

- Xylene, Aethanol, und reines Methanol
- Destilliertes oder deionisiertes Wasser
- 30%iges Hydrogen Peroxide
- 10 mM Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) (Optional: 0.05% Tween 20)
- Mini PAP Pen (Invitrogen Cat. Nr. 00-8877)
- Primärer Antikörper
- Haematoxylin (Invitrogen Cat. Nr. 00-8001)
- Präpariermittel (Invitrogen Cat. Nr. 00-8000)
 - Clearmount™ (Invitrogen Cat. Nr. 00-8110) oder
 - GVA (Invitrogen Cat. No 00-8000)

EMPFOHLENES FÄRBUNGSPROTOKOLL

A. VORLÄUFIGE PRÄPARATION VON OBJEKTTRÄGERN

<u>1. PROBEN PRÄPARATION</u>	Angemessene Gewebe- und Antigenfixierung ist erforderlich, um reproduzierbare Leistung und verlässliche Auswertungen zu erhalten. Geeignete Fixiermittel umfassen: 10%iges neutral gepuffertes Formalin, B5, Bouin's, Zinc Formalin oder Alkohol basierte Fixiermittel. - Von Körperflüssigkeiten präparierte Zellabstriche sollten gemacht werden, um eine Monoschicht von Zellen sicherzustellen. Abstriche sollten unmittelbar nach der Präparation fixiert werden. Abhängig von den Eigenschaften des Antigens, sind Zellabstriche gewöhnlich für eine bis zwei Wochen stabil, wenn sie bei 4°C gelagert sind. - Fixierung von zytospin oder eingefrorene Sektionen können mit Azeton (100%) bei 4°C für einen Zeitraum von 10 Minuten gemacht werden.
<u>2. OBJEKTTRÄGER PRÄPARATION:</u>	- Objektträger mit HistoGrip™ (Invitrogen Cat. Nr. 00-8050) vorbeschichten. Als alternative mit 0.1% Poly-L-lysine in Wasser vorbeschichten, dann lufttrocknen.
<u>3. DEPARAFFINISIERUNG AND REHYDRATION:</u>	Paraffinsektionen werden deparaffinisiert mit Xylene and rehydriert in einer abgestuften Reihe von Aethanol. Zellabstriche oder Gewebe in einem PBS-bad für 10 Minuten waschen, bevor mit dem Färbungsverfahren begonnen wird.
<u>4. KONTROLLOBJEKTTRÄGER</u>	Zur Auslegung der Ergebnisse sind drei Kontrollobjektträger erforderlich. • Positive Gewebekontrolle: Eine auf die gleiche Art wie die unbekannte Probe bearbeitete Probe, die das zu färbende Antigen enthält. • Reagenzkontrolle/Negative Kontrolle-1: Ein zusätzlicher Objektträger, der mit einem Nicht-Immenserum anstatt mit der gleichen Konzentration des primären Antikörpers behandelt wird. Jede in der Probe zu beobachtende Färbung ist wahrscheinlich auf die nicht-spezifische Proteinbindung oder die nicht-spezifische Bindung anderer Reagenzien zurückzuführen. • Negative Kontrolle-2: Eine auf die gleiche Art wie die unbekannte Probe bearbeitete Probe, die nicht das zu färbende Antigen enthält [optional].

+Beachten Sie: Erlauben Sie keinen Proben- oder Gewebesektionen von diesem Zeitpunkt an zu trocknen.

EMPFOHLENES FÄRBUNGSPROTOKOLL FORTGESETZT

B. FÄRBUNGSPROTOKOLL

Reagens	PROBEN PRÄPARATION	Inkubationszeit (Min.)
<u>1. PEROXIDASE LÖSCHUNGSLÖSUNG:</u> (NICHT geliefert)	Dieser Schritt ist optional. Schritt 1 ausführen, wenn die Elimination von endogener Peroxidase Aktivität notwendig ist. a. 1Teil 30%iges Hydrogen Peroxid zu 9 Teilen reinem Methanol geben. Gut mischen. b. Die Objektträger für 10 Min. in PEROXIDASE-LÖSCHUNGS- LÖSUNG tauchen. c. Waschen Sie Mit PBS 2 Min., 3 mal waschen. Mit Schritt 2 fortfahren. Gefrorenes Gewebe mit Peroxo-Block™ (cat. nr. 00-2015) für 45 Sek. behandeln. Sofort waschen.	10 (optional)
<u>2. PRIMÄRE ANTIKÖRPER</u> (NICHT geliefert)	Optimale Verdünnung und Inkubationszeiten sollten vom Untersuchenden bestimmt werden. <i>2ndGen</i> Primäre Antikörper sind optimiert für die Benutzung des <i>PicTure™</i> -MAX Kit. (Verdünnung und Inkubationszeit sind abhängig von Musterpräparation, Antikörperaffinität, von Antigen Präsenz, und Antigen Verfügbarkeit). a. 2 Tropfen (100 µL) von PRIMÄRER ANTIKÖRPER auf jede Sektion geben oder genug, um das Gewebe vollständig zu bedecken. b. Im Feuchtraum für 30 Min. inkubieren. c. Mit PBS für 2 Min., 3 mal spülen.	30
<u>3. SEKUNDÄRANTI KÖRPER</u> Gebrauchsfertig. Reagens A	a. 2 Tropfen (100 µL) von SEKUNDÄRANTI KÖRPER auf jede Sektion geben oder genug, um das Gewebe vollständig zu bedecken. Für 10 Min. inkubieren. b. Mit PBS für 2 Min., 3 mal spülen.	20
<u>4. HRP POLYMER CONJUGATE</u> Gebrauchsfertig. Reagens B	a. 2 Tropfen (100 µL) von HRP POLYMER KONJUGAT auf jede Sektion geben oder genug, um das Gewebe vollständig zu bedecken. Für 30 Min. inkubieren. b. Mit PBS für 2 Min., 3 mal spülen.	30
<u>5. AEC CHROMOGEN:</u> AEC Single Solution-CHROMOGEN, gebrauchsfertig. Reagens C.	a. GLEICHEN SIE AEC Single Solution NICHT ZUR RAUMTEMPERATUR VOR GEBRAUCH AB b. Fügen Sie kaltes AEC Single Solution Dias hinzu. Rückhol-AEC Single Solution sofort zurück zu Lagerung 2-8°C c. Inkubieren Sie Dias bei der Raumtemperatur für 10 Minute aus. d. Gründlich mit destilliertem Wasser spülen*. *Hinweis: AEC ist alkohollöslich. Nicht dehydrieren.	10

Ab diesem Punkt sollte der Prüfer gemäß den eigenen festgelegten Laborprotokollen für Gegenfärbung und Mounting fortfahren. Invitrogen empfiehlt den Gebrauch von Hämatoxylin (Kat.- Nr. 00-8001) zur Gegenfärbung und entweder GVA (Kat.- Nr. 00-8000) oder Clearmount™ (Kat.- Nr. 00-8010) als Mountinglösung.

www.invitrogen.com

Invitrogen Corporation • 542 Flynn Rd • Camarillo • CA 93012 • Tel: 800.955.6288 • E-mail: techsupport@invitrogen.com

PIN: 32236

(Rev 08/08) 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.

AUSLEGUNG DER ERGEBNISSE

In der folgenden Tabelle sind die Ergebnisse ausgelegt, die mit verschiedenen Färbungskontrollen erzielt werden könnten.

Fall-Nr.	+ Kontrolle	Reagenzkontrolle	(-) Kontrolle	Probe	Analyse
1	-	-	-	-	Verfahren falsch durchgeführt.
2	+	+	+	+	Nicht-spezifische Färbung auf Grund von Proteinbindung oder endogener Peroxidase-Aktivität.
3	+	-	+	+/-	Negative Kontrolle enthält das Antigen.
4	-	-	-	+	Positive Kontrolle enthält nicht das Antigen.
5	+	-	-	-	Probe enthält nicht das Antigen.
6	+	-	-	+	Probe enthält das Antigen.

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.

WARENZEICHEN

CAS-Block™, Clearmount™, HistoGrip™, Histomount™, and Peroxo-Block™ sind Warenzeichen der Zymed Laboratories, Inc. Zymed® und Histostain® sind eingetragene Warenzeichen der Zymed Laboratories, Inc.

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

PIN: 32236

(Rev 08/08) 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.