EnVision™ G|2 System/AP, Rabbit/Mouse (Permanent Red)

Code K5355

4th edition/ 4ème édition/ 4. Auflage

For use with rabbit and mouse primary antibodies. For 50 or 500 tests.

Pour utilisation avec des anticorps primaires de lapin et de souris. Pour 50 ou 500 tests.

Zur Verwendung mit primären Kaninchen- und Mausantikörpern Für 50 bzw. 500 Tests.

Contents/ Table des matières/ Inhalt

Page/ Page/ Seite

ENGLISH

Intended Use 4
Summary and Explanation 4
Principles of Procedure 4
Reagents 4
Reagents provided 4
Materials required, but not provided 5
Precautions 6
Specimen Preparation 6
Procedure 6
A. Reagent preparation 6
B. Staining Procedure for Manual Use 7
C. Staining Procedure for Dako Autostainer Instruments 8
Interpretation of Results 9
References 24
Explanation of symbols 24

FRANÇAIS

Utilisation prévue 11
Résumé et explication 11
Principes de la procédure 11
Réactifs 11
Réactifs fournis 11
Matériels requis mais non fournis 12
Précautions 13
Conservation 13
Préparation des échantillons 13
Procédure 14
A. Préparation des réactifs 14
B. Procédure de coloration pour utilisation manuelle 14
C. Procédure de coloration pour Dako Autostainer Instruments 15
Interprétation des résultats 17
Références 24
Explication des symboles 24

DEUTSCH

Verwendungszweck 18
Zusammenfassung und Erklärung 18
Verfahrensprinzip 18
Reagenzien 18
Mitgelieferte Reagenzien 18
Erforderliches, aber nicht mitgeliefertes Material 19
Vorsichtsmaßnahmen 20
Aufbewahrung 20
Vorbereitung der Probe 20
Verfahren 21
A. Reagenzvorbereitung 21
B. Manuelles Färbeverfahren 21
C. Färbeverfahren für Dako Autostainer Instruments 22
Auswertung der Ergebnisse 24
Literatur 24
Erläuterung der Symbole 24

ENGLISH

Intended Use

For in vitro diagnostic use.

This visualization system is intended for use in immunocytochemistry with primary mouse or rabbit antibodies, supplied by the user, for the detection of antigens in formalin fixed, paraffin-embedded tissues, frozen sections, or fixed cell smears. This system may be used in manual procedures or with Dako Autostainer instruments.

Interpretation of results must be made within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a qualified pathologist.

Summary and Explanation

The EnVision™ G|2 System/AP is a 2nd generation EnVision™ visualization kit. This system is useful for the detection of antigens present in low concentrations. The system is biotin-free, thus significantly reducing non-specific staining resulting from endogenous avidin-biotin activity. Due to the high sensitivity of the system, optimal dilutions of the primary antibodies can be several-fold greater than those used for the traditional EnVision™, ABComplex or LSAB methods.

Principles of Procedure

The kit is employed in a three-step procedure where the first step is incubation of the specimen with an optimally diluted primary mouse or rabbit antibody, and the second step is incubation with the EnVision™ G|2, Rabbit/Mouse (LINK) reagent of the kit. This reagent is a dextran polymer, which also carries antibodies to rabbit and mouse immunoglobulins. In the third step, an alkaline phosphatase-labelled amplification polymer is added. The reaction is visualized by Permanent Red Chromogen also included in the kit.

Reagents

Reagents provided

Code K5355 – 50 tests

The materials listed below are sufficient for 50 tests. The number of tests is based on the use of 200 µL of each reagent per test:

Vial 1	1 x 11 mL	RABBIT/MOUSE (LINK) **Rabbit/Mouse (LINK)** Ready-to-use. Dextran coupled with secondary antibodies against rabbit and mouse immunoglobulins. In buffered solution containing stabilizing protein and preservative.
Vial 2	1 x 11 mL	AP ENZYME (ENHANCER) **AP Enzyme (ENHANCER)** Ready-to-use. Alkaline phosphatase labelled amplification polymer in buffered solution containing stabilizing protein and preservative.
Vial 3	1 x 11 mL	SUBSTRATE BUFFER **Permanent Red Substrate Buffer** Substrate buffer solution.

Vial 4	1 x 150 µL	PERMANENT RED CHROMOGEN **Permanent Red Chromogen** Permanent Red Chromogen solution.

Code K5355 – 500 tests
The materials listed below are sufficient for 500 tests. The number of tests is based on the use of 200 µL of each reagent per test:

Vial 1	10 x 11 mL	RABBIT/MOUSE (LINK) **Rabbit/Mouse (LINK)** Ready-to-use. Dextran coupled with secondary antibodies against rabbit and mouse immunoglobulins. In buffered solution containing stabilizing protein and preservative.
Vial 2	10 x 11 mL	AP ENZYME (ENHANCER) **AP Enzyme (ENHANCER)** Ready-to-use. Alkaline phosphatase labelled amplification polymer in buffered solution containing stabilizing protein and preservative.
Vial 3	10 x 11 mL	SUBSTRATE BUFFER **Permanent Red Substrate Buffer** Substrate buffer solution.
Vial 4	1 x 1.5 mL	PERMANENT RED CHROMOGEN **Permanent Red Chromogen** Permanent Red Chromogen solution.

Materials required, but not provided
Absorbent wipes
Ammonia water, 37 mmol/L (optional)
Antibody Diluent, Dako Codes S0809 or S2022
Counterstain; Hematoxylin, such as water-based Dako Mayer's Hematoxylin Code S3309
Coverslips
Dako Autostainer instrument (optinal)
Distilled or deionised water
Epitope Retrieval Solution
Ethanol, 95% and 70%
Humid chamber (optional)
Light microscope (20-800x objective magnification)
Mounting media, such as Dako Glycergel™ Mounting Medium, Code C0563, or Dako Faramount, Aqueous Mounting Medium, Ready-to-Use, Code S3025, or non-anqueous permanent mounting medium, Dako Code S3026
Positive and Negative Tissues to use as process controls
Primary antibodies and negative control reagents
Slides, SuperFrost Plus, poly-L-lysine coated slides or Dako Silanized Slides, Code S3003
Staining jars or baths
Timer (capable of 2-40 minute intervals)
Wash bottles
Wash Buffer, Dako Code S3006
Water bath with lid
Xylene, toluene or xylene substitutes

Precautions

1. For professional users.
2. Vial 1, Rabbit/Mouse (LINK) and Vial 2, AP Enzyme (ENHANCER), contain material of animal origin. As with any product derived from biological sources, proper handling should be used.
3. Do not use Vial 3, Permanent Red Substrate Buffer if a precipitate is visible at room temperature.
4. Do not expose Vial 4, Permanent Red Chromogen or the prepared Substrate Working Solution to strong light.
5. Vial 4, Permanent Red Chromogen, contains ≥3-<5% hydrochloric acid and does not require hazard labeling. Safety Data Sheet (SDS) is available for professional users on request.
6. This product contains sodium azide (NaN3), a chemical highly toxic in pure form. At product concentrations, though not classified as hazardous, sodium azide may react with lead and copper plumbing to form highly explosive build-ups of metal azides. Upon disposal, flush with large volumes of water to prevent metal azide build-up in plumbing.
7. Wear appropriate Personal Protective Equipment to avoid contact with eyes and skin.
8. Unused solution should be disposed of according to local, State and Federal regulations.

Storage

Store the kit at 2-8 °C. Do not use after expiration date stamped on the kit. Do not interchange kit components from different lots. If reagents are stored under any conditions other than those specified, the conditions must be verified by the user (1). If unexpected staining is observed which cannot be explained by variations in laboratory procedures and a problem with the product is suspected, contact our Technical Services.

Specimen Preparation

For use with formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections as well as frozen tissue sections and fixed cell smears. A variety of fixatives may be used for specimen preservation. Standard methods for tissue processing for immunocytochemical staining should be used for all tissue sections (2). The optimal thickness of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections and frozen sections is 4-6 µm. The specimen should be mounted on microscope slides. The sections should be mounted on the slides as flat and wrinkle-free as possible. Too many wrinkles will have an impact on the staining results.

NOTE: For use on Dako Autostainer instruments, the microscope slides must have a width of no more than 26 mm to be able to fit into the slide holder.

Paraffin sections should be mounted from a pre-heated water bath containing distilled or deionised water. The water bath should contain no additives (such as gelatine, poly-L-lysine etc.). Sections should be dried by heating, generally at a temperature not above 60 ℃ for a minimum of 60 minutes (e.g. overnight). To ensure proper adherence of sections to slides it is important to drain the water from beneath the sections prior to the oven drying process.

Procedure

A. Reagent preparation

A.1 Substrate Working Solution

A working solution of Permanent Red Chromogen is prepared by thoroughly mixing 100 parts of Permanent Red Substrate Buffer (Vial 3) with 1 part of Permanent Red Chromogen (Vial 4) e.g. mix 1 mL Permanent Red Substrate Buffer (Vial 3) with 10 µL Permanent Red Chromogen (Vial 4). Prepare only the volume required for the number of slides that shall be stained. Use the

solution within 30 minutes. The Substrate Working Solution should be prepared in an Autostainer Reagent Vial when used on the Dako Autostainer instrument.

A.2 Guideline for optimal dilution of primary antibodies

The use of EnVision™ G|2 System/AP requires a dilution of Dako concentrated primary antibodies when applied. Dako primary antibodies should typically be diluted 4-10x more than the recommendations given in the package inserts for the individual primary antibody when used with EnVision™ G|2 System/AP. This is a guideline only, optimal dilution should be determined by the user.

The primary antibodies should be diluted in Dako Antibody Diluent, Codes S0809 or S2022.

B. Staining Procedure for Manual Use

The following pre-treatment steps should be carried out before using the EnVision™ G|2 System/AP on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. The specimen should be deparaffinized and rehydrated. Some specimens should be subjected to epitope demasking by heat-induced epitope retrieval or enzyme digestion. Please refer to the package insert of the individual Dako primary antibody for specific information on specimen preparation. Following demasking, the specimen should be rinsed gently with wash buffer solution from a wash bottle (do not focus directly on tissue) and placed in a fresh wash buffer bath for 5 minutes.

All reagents should be equilibrated to room temperature (20-25 ℃) prior to immunostaining. Likewise, all incubations should be performed at room temperature.

Do not allow specimens to dry during the staining procedure. Dried specimens may display increased non-specific staining.

Step 1: Primary antibody or negative control reagent
Tap off excess wash buffer and carefully wipe around the specimen to remove any remaining liquid and to keep the reagent within the prescribed area. Apply 200 µL optimally diluted primary antibody or negative control reagent to cover specimen. Incubate for 30 (± 1) minutes. Rinse gently with wash buffer solution from a wash bottle (do not focus directly on tissue) and place in a fresh wash buffer bath for 5 minutes.

Step 2: Vial 1, Rabbit/Mouse (LINK)
Tap off excess wash buffer and wipe slides as before. Apply 200 µL Rabbit/Mouse (LINK) to cover the specimen. Incubate for 30 (± 1) minutes. Rinse specimen as described in Step 1, twice.

Step 3: Vial 2, AP Enzyme (ENHANCER)
Tap off excess wash buffer and wipe slides as before. Apply 200 µL AP Enzyme (ENHANCER) to cover the specimen. Incubate for 30 (± 1) minutes. Rinse specimen as described in Step 1, twice.

Step 4: Substrate Working Solution
Prepare Substrate Working Solution as described in section A.1. Prepared Substrate Working Solution should be used within 30 minutes.

Tap off excess buffer and wipe slides as before. Apply 200 µL Substrate Working Solution to cover the specimen. Incubate for 5-20 minutes. Rinse slides gently with distilled or deionised water. Collect chromogen-containing waste in a hazardous materials container for proper disposal. Place rinsed slides in a fresh distilled or deionised water bath for 5 minutes.

Step 5: Counterstain (instructions are for hematoxylin)
Immerse slides in a bath of hematoxylin. Length of incubation depends on the strength of hematoxylin used. Follow hematoxylin counterstaining with a thorough rinse in distilled or deionised water.

Optional: Immerse tissue slides into a bath of 37 mmol/L ammonia water and rinse gently in distilled or deionised water for 2-5 minutes. Ammonia water (37 mmol/L) is prepared by mixing 2.5 mL of 15 mol/L (concentrated) ammonia hydroxide with 1 liter of distilled or deionised water. Unused 37 mmol/L ammonia water may be stored at room temperature (20-25 ℃) in a tightly capped bottle for up to 12 months.

Step 6: Mounting
For aqueous mounting, mounting media such as Dako Glycergel™ Mounting Medium, Code C0563, or Faramount Aqueous Mounting Medium Code S3025 is recommended.

For non-aqueous, permanent mounting, Dako Permanent Mounting Media, Code S3026 is recommended after slides have been left to air-dry completely.

C. Staining Procedure for Dako Autostainer Instruments

All reagents in the kit, except Vial 4, are provided in Autostainer Reagent Vials. The Substrate Working Solution should be prepared in an Autostainer Reagent Vial, when used on the Dako Autostainer instrument. EnVision™ G|2 System/AP has been adapted for use on the Dako Autostainer Instruments according to the template outlined below.

Before staining according to the template on the Dako Autostainer Instruments, please read carefully the **Operators Manual for the dedicated Autostainer Instrument.**

Prior to starting the Autostainer Instrument, slides and reagents must be placed according to the **Slide Layout Map** and the **Reagent Layout Map.**

The following pre-treatment steps should be carried out before using the EnVision™ G|2 System/AP on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. The specimen should be deparaffinized and rehydrated. Some specimens should be subjected to epitope demasking by heat-induced epitope retrieval or enzyme digestion. Please refer to the package insert of the individual Dako primary antibody for specific information on specimen preparation. Following demasking, the specimen should be rinsed gently with wash buffer solution from a wash bottle (do not focus directly on tissue) and placed in a fresh wash buffer bath for 5 minutes.

All reagents should be equilibrated to room temperature (20-25 ℃) prior to immunostaining. Likewise, all incubations should be performed at room temperature.

Do not allow specimens to dry during the staining procedure. Dried specimens may display increased non-specific staining.

Step 1: Programming of the Autostainer Instrument
Prior to the first application of the EnVision™ G|2 System/AP on the Autostainer Instrument, a new template has to be made. Please refer to the template below and to the Operators Manual for the dedicated Autostainer Instrument.

Template: K5355

1. Rinse Buffer
2. Primary Antibody - 200
3. Rinse Buffer
4. Secondary Reagent - 200
5. Rinse Buffer
6. Auxiliary - 200
7. Rinse Buffer
8. Tertiary Reagent - 200
9. Rinse Buffer
10. Auxiliary - 200
11. Rinse Buffer
12. *Swtch
13. Substrate-Batch - 200
14. Rinse Buffer
15. *Swtch
16. Auxiliary
17. Rinse Buffer
18. Auxiliary

NOTE: The “auxiliary” step should be set to “rinse buffer” in staining runs with 10 or less slides. For staining runs with more than 10 slides the “auxiliary” step should be set to “none”. This ascertains comparable wash times.

Before loading slides according to the **PROGRAM STAINING RUN SCREEN**, the following reagents have to be added to the reagent list. Please refer to Table 1 below for name, template step and incubation time, and to the Operator’s Manual for the dedicated Autostainer Instrument.

Table 1. Necessary additions to the reagent list

Reagent	**Code**	**Template Step**	**Incubation Time**
Primary antibodies not already in the Autostainer list	Individual	Primary Antibody	30 minutes
Rabbit/Mouse (LINK)	K5355	Secondary Reagent	30 minutes
AP Enzyme (ENHANCER)	K5355	Tertiary Reagent	30 minutes
Substrate Working Solution	K5355	Substrate-Batch	10 minutes

Step 2: Staining protocol

Load the Template (**K5355**) for EnVision™ G|2 System/AP, Rabbit/Mouse (Permanent Red) detection kit, into the **PROGRAM STAINING RUN SCREEN**. Specify the number of slides in the run, and load the reagents with incubation times into the template. The positioning of the slides will then be shown in the **Slide Layout Map Screen**, and the positioning and volume of the reagent to be loaded on the Autostainer Instrument will be shown in the **Reagent Layout Map Screen**. Please also refer to the Operator’s Manual.

Prior to loading the slides according to the **Slides Layout Map Screen**, it is recommended to pre-wet the slides for 5 minutes in the Dako Wash Buffer, Code S3006. Position the vials in the reagent rack according to the **Reagent Layout Map**. Take care to load proper reagents and proper volumes. Pay particular attention to the loading of the vials with primary antibodies. Prime the water and buffer pumps. Start the program. After program end rinse slides in distilled or deionised water. For counterstain and mounting, please refer to Step 5 and 6 in section B.

Interpretation of Results

Use of the Permanent Red Chromogen yields a permanent red reaction product at the site of the target antigen, which can be visualized with standard optical light microscopy.

Endogenous alkaline phosphatase activity in some tissues may yield false-positive results. This endogenous activity may be inhibited by use of Dako Dual Endogenous Enzyme Block, Code S2003 or Levamisole Code X3021. Levamisole does not inhibit the intestinal or placental form of

alkaline phosphatase and may not be useful for staining of specimens containing these isoenzymes. Refer to the package inserts for Codes S2003 and X3021 for instructions for use.

If non-specific staining is present, this will be recognized as a diffuse, red staining on the slides treated with the negative control reagent.

Nuclei will be stained blue by the hematoxylin counterstain.

FRANÇAIS

Utilisation prévue

Pour utilisation en diagnostic *in vitro*.

Ce kit de visualisation est conçu pour être utilisé en immunocytochimie avec des anticorps primaires de souris et de lapin, fournis par l'utilisateur, pour la détection d'antigènes dans des tissus fixés au formol et inclus en paraffine, des coupes congelées, ou des frottis cellulaires fixés. Ce kit peut être utilisé avec les procédures manuelles ou sur les Dako Autostainer Instruments.

Les résultats doivent être interprétés par un pathologiste qualifié et tenir compte des antécédents cliniques du patient ainsi que d'autres tests diagnostiques.

Résumé et explication

Le kit EnVision™ G|2 System/AP est un kit de visualisation EnVision™ de 2ème génération. Ce kit permet la détection des antigènes présents à de faibles concentrations. Ce kit ne contient pas de biotine, ce qui permet de réduire de manière significative la coloration non spécifique résultant d'une activité avidine-biotine endogène. En raison de la haute sensibilité de ce kit, des dilutions optimales des anticorps primaires peuvent être plusieurs fois supérieures à celles utilisées pour les méthodes classiques EnVision™, ABComplex ou LSAB.

Principes de la procédure

Ce kit est utilisé dans une procédure à trois étapes : la première étape consistant à incuber l'échantillon en présence d'un anticorps primaire de souris ou de lapin dilué de manière optimale, et la deuxième étape est l'incubation en présence du réactif EnVision™ G|2, Rabbit/Mouse (LINK) du kit. Ce réactif est un polymère dextrane, qui comporte également des anticorps dirigés contre les immunoglobulines de lapin et de souris. Au cours de la troisième étape, un polymère d'amplification marqué à la phosphatase alcaline est ajouté. La réaction est visualisée par Permanent Red Chromogen également incluse dans ce kit.

Réactifs

Réactifs fournis

N°de cat. K5355 – 50 tests

Les quantités listées ci-dessous permettent d'effectuer 50 tests. Le nombre de tests est basé sur l'utilisation de 200 µL de chaque réactif par test :

Flacon 1	1 x 11 mL	RABBIT/MOUSE (LINK) **Rabbit/Mouse (LINK)** Prêt à l'emploi. Dextrane associé à des anticorps secondaires dirigés contre les immunoglobulines de souris et de lapin. Dans une solution tamponnée contenant une protéine stabilisante et un conservateur.
Flacon 2	1 x 11 mL	AP ENZYME (ENHANCER) **AP Enzyme (ENHANCER)** Prêt à l'emploi. Polymère d'amplification marqué à la phosphatase alcaline dans une solution tamponnée contenant une protéine stabilisante et un conservateur.

Flacon 3	1 x 11 mL	SUBSTRATE BUFFER **Permanent Red Substrate Buffer** Solution de tampon de substrat.
Flacon 4	1 x 150 µL	PERMANENT RED CHROMOGEN **Permanent Red Chromogen** Solution de Permanent Red Chromogen.

N° de cat. K5355 – 500 tests
Les quantités listées ci-dessous permettent d'effectuer 500 tests. Le nombre de tests est basé sur l'utilisation de 200 µL de chaque réactif par test :

Flacon 1	10 x 11 mL	RABBIT/MOUSE (LINK) **Rabbit/Mouse (LINK)** Prêt à l'emploi. Dextrane associé à des anticorps secondaires dirigés contre les immunoglobulines de souris et de lapin. Dans une solution tamponnée contenant une protéine stabilisante et un conservateur.
Flacon 2	10 x 11 mL	AP ENZYME (ENHANCER) **AP Enzyme (ENHANCER)** Prêt à l'emploi Polymère d'amplification marqué à la phosphatase alcaline dans une solution tamponnée contenant une protéine stabilisante et un conservateur.
Flacon 3	10 x 11 mL	SUBSTRATE BUFFER **Permanent Red Substrate Buffer** Solution de tampon de substrat.
Flacon 4	1 x 1,5 mL	PERMANENT RED CHROMOGEN **Permanent Red Chromogen** Solution de Permanent Red Chromogen.

Matériels requis mais non fournis
Lingettes absorbantes
Ammoniaque, 37 mmol/L (en option)
Diluant d'anticorps, Dako, N° de cat. S0809 ou S202 2
Contre-colorant ; Hématoxyline, telle que l'hématoxyline de Mayer aqueuse de Dako N° de cat. S3309
Lamelles de protection
Dako Autostainer instrument (en option)
Eau distillée ou déionisée
Solution de restauration de l'épitope
Éthanol, à 95 % et 70 %
Chambre humide (en option)
Microscope optique (grossissement de 20x à 800x)
Milieu de montage, de type Dako Glycergel™ Mounting Medium (N° de cat. C0563), ou Dako Faramount, Aqueous Mounting Medium, Ready-to-Use (N° de cat. S3025) ou milieu de montage permanent non aqueux, Dako (N° de cat. S3026)
Tissus de contrôle positif et négatif à utiliser comme contrôles de la procédure
Anticorps primaires et réactifs de contrôle négatif
Lames, SuperFrost Plus, enduites de poly-L-lysine ou Dako Silanized Slides (N° de cat. S3003)
Cuves ou bains de coloration
Chronomètre (pouvant accepter des intervalles de 2 à 40 minutes)
Flacons de lavage

Dako Wash Buffer N° de cat. S3006
Bain-marie avec couvercle
Xylène, toluène ou substituts de xylène

Précautions

1. Pour utilisateurs professionnels.
2. Le Flacon 1, Rabbit/Mouse (LINK) et le Flacon 2, AP Enzyme (ENHANCER), contiennent des matériaux d'origine animale. Comme avec tout produit d'origine biologique, des procédures de manipulation appropriées doivent être respectées.
3. Ne pas utiliser le Flacon 3 renfermant le tampon substrat Permanent Red si un précipité est visible à température ambiante.
4. Ne pas exposer à une lumière vive le Flacon 4, Permanent Red Chromogen ou la Substrate Working Solution préparée.
5. Flacon 4, Permanent Red Chromogen, contient ≥3-<5% hydrochloric acid et ne nécessite pas d'étiquetage de sécurité. La fiche de données de sécurité (FDS) destinée aux utilisateurs professionnels est disponible sur demande..
6. Ce produit contient de l'azide de sodium (NaN_3), produit chimique hautement toxique dans sa forme pure. Aux concentrations du produit, bien que non classé comme dangereux, l'azide de sodium peut réagir avec le cuivre et le plomb des canalisations pour former des accumulations d'azides métalliques hautement explosifs. Lors de l'élimination, rincer abondamment à l'eau pour éviter toute accumulation d'azide métallique dans les canalisations.
7. Porter un vêtement de protection approprié pour éviter le contact avec les yeux et la peau.
8. Les solutions non utilisées doivent être éliminées conformément aux réglementations locales et nationales.

Conservation

Conserver entre 2 et 8 °C. Ne pas utiliser après la date limite de péremption indiquée sur le kit. Ne pas interchanger les composants de kits provenant de différents lots. Si les réactifs sont conservés dans des conditions autres que celles indiquées, celles-ci doivent être validées par l'utilisateur (1). Si une coloration inattendue est observée, ne pouvant être expliquée par un changement des procédures du laboratoire et en cas de suspicion d'un problème avec le produit, contacter notre service technique.

Préparation des échantillons

Pour utilisation sur des tissus fixés au formol et inclus en paraffine, ainsi que sur des tissus congelés et des frottis cellulaires fixés. Plusieurs fixateurs peuvent être utilisés pour la conservation des échantillons. Des méthodes standard de traitement des tissus pour coloration immunocytochimique doivent être utilisées pour toutes les coupes de tissus (2). L'épaisseur optimale des coupes de tissus fixés au formol et inclus en paraffine et des coupes congelées est de 4 à 6 µm. L'échantillon doit être monté sur des lames de microscope. Les coupes doivent être montées sur des lames aussi plates et lisses que possible. Trop d'aspérités peuvent avoir un impact sur les résultats de coloration.

REMARQUE : Pour l'utilisation sur des Dako Autostainer instruments, les lames de microscope doivent avoir une épaisseur de 26 mm maximum pour pouvoir être placées dans le porte-lames.

Les coupes incluses en paraffine doivent être montées à partir d'un bain-marie préchauffé contenant de l'eau distillée ou déionisée. Le bain-marie ne doit contenir aucun additif (comme la gélatine, la poly-L-lysine, etc.). Les coupes doivent être séchées par chauffage, généralement à une température inférieure à 60 °C pendant 60 minut es minimum (ex. : toute une nuit). Pour garantir l'adhérence adéquate des coupes sur les lames, il est important de drainer l'eau présente sous les coupes avant de les placer dans une étuve de séchage.

Procédure

A. Préparation des réactifs

A.1 Substrate Working Solution

Une solution de Permanent Red Chromogen est préparée en mélangeant vigoureusement 100 doses de Permanent Red Substrate Buffer (Flacon 3) avec 1 dose de Permanent Red Chromogen (Flacon 4) ex. : mélanger 1 mL de Permanent Red Substrate Buffer (Flacon 3) avec 10 µL de Permanent Red Chromogen (Flacon 4). Ne préparer que le volume nécessaire pour le nombre de lames devant être coloré. Utiliser la solution dans les 30 minutes. La Substrate Working Solution doit être préparée dans un flacon de réactifs de l'Autostainer lorsqu'elle est utilisée sur le Dako Autostainer instrument.

A.2 Conseils pour une dilution optimale des anticorps primaires

L'utilisation du kit EnVision™ G|2 System/AP requiert une dilution d'anticorps primaires concentrés Dako. Les anticorps primaires Dako doivent généralement être dilués 4 à 10x plus que ce qui est stipulé dans les recommandations des notices de produits pour chaque anticorps primaire utilisé avec le kit EnVision™ G|2 System/AP. Il ne s'agit ici que de conseils ; la dilution optimale doit être déterminée par l'utilisateur.

Les anticorps primaires doivent être dilués dans du Dako Antibody Diluent, N° de cat. S0809 ou S2022.

B. Procédure de coloration pour utilisation manuelle

Les étapes de prétraitement suivantes doivent être effectuées avant d'utiliser le kit EnVision™ G|2 System/AP sur des coupes de tissus fixés au formol et inclus en paraffine. L'échantillon doit être déparaffiné et réhydraté. Certains échantillons doivent être soumis à un démasquage de l'épitope par une procédure de restauration de l'épitope par la chaleur ou une digestion enzymatique. Veuillez vous référer à la notice du produit de chaque anticorps primaire Dako pour des informations spécifiques sur la préparation des échantillons. Après le démasquage, l'échantillon doit être rincé doucement à l'aide d'une solution de tampon de lavage contenue dans un flacon de lavage (ne pas diriger le jet directement sur les tissus) et placé dans un bain de tampon renouvelé pendant 5 minutes.

Tous les réactifs doivent être portés à température ambiante (20–25 °C) avant la coloration immunologique. De même, toutes les incubations doivent être effectuées à température ambiante.

Ne pas laisser les échantillons sécher pendant la procédure de coloration. Les échantillons séchés peuvent présenter une coloration non spécifique plus importante.

Étape 1 : Anticorps primaire ou réactif de contrôle négatif
Tapoter pour éliminer l'excès de tampon de lavage et essuyer avec précaution autour de l'échantillon pour enlever tout liquide restant et maintenir le réactif dans la zone indiquée. Appliquer 200 µL d'anticorps primaire ou de réactif de contrôle négatif à dilution optimale pour recouvrir l'échantillon. Incuber pendant 30 minutes (± 1 minute). Rincer doucement à l'aide d'une solution de tampon de lavage contenue dans un flacon de lavage (ne pas diriger le jet directement sur les tissus) et placer dans un bain de tampon renouvelé pendant 5 minutes.

Étape 2 : Flacon 1, Rabbit/Mouse (LINK)
Tapoter pour enlever l'excès de tampon de lavage et essuyer les lames comme décrit ci-avant. Appliquer 200 µL de Rabbit/Mouse (LINK) pour recouvrir l'échantillon. Incuber pendant 30 minutes (± 1 minute). Rincer l'échantillon comme indiqué à l'étape 1, à deux reprises.

Étape 3 : Flacon 2, AP Enzyme (ENHANCER)
Tapoter pour enlever l'excès de tampon de lavage et essuyer les lames comme décrit ci-avant. Appliquer 200 µL de AP Enzyme (ENHANCER) pour recouvrir l'échantillon. Incuber pendant 30 minutes (± 1 minute). Rincer l'échantillon comme indiqué à l'étape 1, à deux reprises.

Étape 4 : Substrate Working Solution

Préparer la Substrate Working Solution comme décrit à la section A.1. La Substrate Working Solution préparée doit être utilisée dans les 30 minutes.
Tapoter pour enlever l'excès de tampon et essuyer les lames comme décrit ci-avant. Appliquer 200 µL de Substrate Working Solution pour recouvrir l'échantillon. Incuber pendant 5 à 20 minutes. Rincer doucement les lames à l'eau distillée ou déionisée. Recueillir les déchets de chromogène dans un conteneur pour déchets biologiques pour les éliminer de manière appropriée. Placer les lames dans un bain d'eau distillée ou déionisée renouvelé pendant 5 minutes.

Étape 5 : Contre-coloration (instructions pour l'hématoxyline)
ÉTAPE 2. Immerger les lames dans un bain d'hématoxyline. La durée d'incubation dépend de la puissance de l'hématoxyline utilisée. Après contre-coloration à l'hématoxyline, rincer abondamment à l'eau distillée ou déionisée.

Facultatif : Immerger les lames de tissus dans un bain d'ammoniaque à 37 mmol/L et rincer doucement dans de l'eau distillée ou déionisée pendant 2 à 5 minutes. L'ammoniaque (37 mmol/L) est préparée en mélangeant 2,5 mL d'hydroxyde d'ammonium à 15 mol/L (concentré) et 1 litre d'eau distillée ou déionisée. L'ammoniaque à 37 mmol/L non utilisée peut être conservée à température ambiante (20–25 °C) dans un flacon fermé hermétiquement pendant 12 mois maximum.

Étape 6 : Montage
Pour le montage aqueux, l'utilisation des milieux de montage tels que Dako Glycergel™ Mounting Medium, N° de cat. C0563, ou Faramount Aqueous Mounting Medium N° de cat. S3025 est recommandée.

Pour un montage permanent non aqueux, le Dako Permanent Mounting Media (N° de cat. S3026) est recommandé après avoir laissé les lames sécher complètement à l'air libre.

C. Procédure de coloration pour Dako Autostainer Instruments

Tous les réactifs du kit, à l'exception du Flacon 4, sont fournis comme Autostainer Reagent Vials. La Substrate Working Solution doit être préparée dans un flacon de réactifs de l'Autostainer lorsqu'elle est utilisée sur le Dako Autostainer instrument. Le kit EnVision™ G|2 System/AP a été adapté pour être utilisé sur les Dako Autostainer Instruments conformément au modèle indiqué ci-dessous.

Avant d'effectuer la coloration conformément au modèle sur les Dako Autostainer Instruments, veuillez lire attentivement le Manuel de l'utilisateur de l'**Autostainer Instrument correspondant.**

Avant de démarrer l'Autostainer Instrument, les lames et les réactifs doivent être placés conformément au **Slide Layout Map** et au **Reagent Layout Map.**

Les étapes de prétraitement suivantes doivent être effectuées avant d'utiliser le kit EnVision™ G|2 System/AP sur des coupes de tissus fixés au formol et inclus en paraffine. L'échantillon doit être déparaffiné et réhydraté. Certains échantillons doivent être soumis à un démasquage de l'épitope par une procédure de restauration de l'épitope par la chaleur ou une digestion enzymatique. Veuillez vous référer à la notice du produit de chaque anticorps primaire Dako pour des informations spécifiques sur la préparation des échantillons. Après le démasquage, l'échantillon doit être rincé doucement à l'aide d'une solution de tampon de lavage contenue dans un flacon de lavage (ne pas diriger le jet directement sur les tissus) et placé dans un bain de tampon renouvelé pendant 5 minutes.

Tous les réactifs doivent être portés à température ambiante (20–25 °C) avant la coloration immunologique. De même, toutes les incubations doivent être effectuées à température ambiante.

Ne pas laisser les échantillons sécher pendant la procédure de coloration. Les échantillons séchés peuvent présenter une coloration non spécifique plus importante.

Étape 1 : Programmation de l'Autostainer Instrument
Avant la première application du kit EnVision™ G|2 System/AP sur l'Autostainer Instrument, un nouveau modèle doit être défini. Veuillez vous référer au modèle ci-dessous et au Manuel de l'utilisateur pour connaître l'Autostainer Instrument correspondant.

Modèle : K5355

1. Rinse Buffer
2. Primary Antibody - 200
3. Rinse Buffer
4. Secondary Reagent - 200
5. Rinse Buffer
6. Auxiliary - 200
7. Rinse Buffer
8. Tertiary Reagent - 200
9. Rinse Buffer
10. Auxiliary - 200
11. Rinse Buffer
12. *Swtch
13. Substrate-Batch - 200
14. Rinse Buffer
15. *Swtch
16. Auxiliary
17. Rinse Buffer
18. Auxiliary

REMARQUE : L'étape « auxiliaire » doit être réglée sur « rincer le tampon » lors des cycles de coloration avec 10 lames maximum. Pour les cycles de coloration portant sur plus de 10 lames, l'étape « auxiliaire » doit être réglée sur « aucune ». Cela garantit des durées de lavage comparables.

Avant de charger les lames conformément à l'écran **PROGRAM STAINING RUN SCREEN** les réactifs suivants doivent être ajoutés à la liste des réactifs. Veuillez vous référer au Tableau 1 ci-dessous pour connaître le nom, l'étape du modèle et le temps d'incubation, et au Manuel de l'utilisateur pour connaître l'Autostainer Instrument correspondant.

Tableau 1. Ajouts nécessaires à la liste des réactifs

Réactif	**N°de cat.**	**Étape du modèle**	**Durée d'incubation**
Anticorps primaires ne figurant pas encore dans la liste de l'Autostainer	Variable	Anticorps primaire	30 minutes
Rabbit/Mouse (LINK)	K5355	Réactif secondaire	30 minutes
AP Enzyme (ENHANCER)	K5355	Réactif tertiaire	30 minutes
Substrate Working Solution	K5355	Lot de substrat	10 minutes

Étape 2 : Protocole de coloration

Charger le modèle (**K5355**) pour le kit de détection EnVision™ G|2 System/AP, Rabbit/Mouse (Permanent Red), à l'écran **PROGRAM STAINING RUN SCREEN**. Indiquer le nombre de lames dans le cycle et charger les réactifs avec les durées d'incubation dans le modèle. Le positionnement des lames sera alors affiché à l'écran **Slide Layout Map Screen**, et le positionnement et le volume du réactif devant être chargé sur l'Autostainer Instrument s'afficheront à l'écran **Reagent Layout Map Screen**. Veuillez également vous référer au Manuel de l'utilisateur.

Avant de charger les lames conformément à l'écran **Slides Layout Map Screen**, il est recommandé de pré-humidifier les lames pendant 5 minutes dans du Dako Wash Buffer, N°de cat. S3006. Placer les flacons dans le portoir des réactifs en suivant le **Reagent Layout Map**. Prendre soin de charger les réactifs appropriés et les volumes adéquats. Faire particulièrement attention lors du chargement des flacons d'anticorps primaires. Amorcer les pompes à eau et à tampon. Lancer le programme. Une fois le programme terminé, rincer les lames dans de l'eau distillée ou déionisée. Pour la contre-coloration et le montage, veuillez vous référer aux Étapes 5 et 6 de la section B.

Interprétation des résultats

L'utilisation de Permanent Red Chromogen entraîne l'apparition d'un produit de réaction rouge permanent sur le site de l'antigène cible, qui peut être observé à l'aide d'un microscope optique standard.

Une activité endogène de phosphatase alcaline dans certains tissus peut générer des faux positifs. Cette activité endogène peut être inhibée par l'utilisation de Dako Dual Endogenous Enzyme Block (N° de cat. S2003) ou de Levamisole (N ° de cat. X3021). Le lévamisole n'inhibe pas la forme intestinale ou placentaire de la phosphatase alcaline et peut ne pas être efficace pour la coloration des échantillons contenant ces isoenzymes. Se référer aux notices produit pour connaître les instructions d'utilisation des N° de cat. S2003 et X3021.

En cas de coloration non spécifique, celle-ci sera reconnue comme étant une coloration rouge diffuse sur les lames traitées par réactif de contrôle négatif.

Les noyaux seront colorés en bleu par le contre-colorant hématoxyline.

DEUTSCH

Verwendungszweck

Zur In-vitro-Diagnostik.

Dieses Visualisierungssystem dient zum immunzytochemischen Nachweis von Antigenen in formalinfixierten, paraffineingebetteten Geweben, Kryostatgeweben oder fixierten Zellausstrichen unter Verwendung vom Anwender bereitgestellter primärer Maus- bzw. Kaninchen-Antikörper. Es ist in manuellen Verfahren oder mit Dako Autostainer Instruments anwendbar.

Die Ergebnisse müssen von einem qualifizierten Pathologen unter Berücksichtigung der Krankengeschichte und anderer Diagnostiktests des Patienten ausgewertet werden.

Zusammenfassung und Erklärung

Bei dem EnVision™ G|2 System/AP handelt es sich um ein EnVision™ Visualisierungssystem der zweiten Generation. Dieses System eignet sich für den Nachweis vorhandener Antigene in niedrigen Konzentrationen. Da es sich um ein biotinfreies System handelt, werden unspezifische Färbungen aus endogenen Avidin-Biotin-Aktivitäten deutlich abgeschwächt. Das System ist sehr empfindlich, daher können optimale Verdünnungen des primären Antikörpers mehrfach höher sein als bei den herkömmlichen EnVision™, ABComplex - oder LSAB-Verfahren.

Verfahrensprinzip

Das Kit wird in einem Dreischritt-Verfahren eingesetzt, bei dem der erste Schritt in der Inkubation der Probe mit einem optimal verdünnten primären Maus- bzw. Kaninchen-Antikörper und der zweite Schritt in der Inkubation mit dem EnVision™ G|2, Rabbit/Mouse (LINK)-Reagenz des Kits besteht. Dieses Reagenz ist ein Dextranpolymer, das auch Antikörper gegen Kaninchen- bzw. Maus-Immunglobuline enthält. In einem dritten Schritt wird ein mit alkalischer Phosphatase markiertes Polymer zur Amplifikation hinzugefügt. Die Reaktion wird mit dem ebenfalls im Kit enthaltenen Permanent Red Chromogen sichtbar gemacht.

Reagenzien

Mitgelieferte Reagenzien

Code-Nr. K5355 – 50 Tests
Die unten aufgeführten Materialien sind ausreichend für 50 Tests. Die Anzahl der Tests basiert auf einer Reagenzienmenge von je 200 µL pro Test.

Fläschchen 1	1 x 11 mL	RABBIT/MOUSE (LINK) **Rabbit/Mouse (LINK)** Gebrauchsfertig. Mit sekundären Antikörpern gegen Kaninchen- und Maus-Immunglobulin gekoppeltes Dextran. In gepufferter Lösung, enthält ein stabilisierendes Protein und Konservierungsmittel.
Fläschchen 2	1 x 11 mL	AP ENZYME (ENHANCER) **AP Enzyme (ENHANCER)** Gebrauchsfertig. Mit alkalischer Phosphatase markiertes Amplifikations-Polymer in gepufferter Lösung; enthält ein stabilisierendes Protein sowie Konservierungsmittel.

Fläschchen 3	1 x 11 mL	SUBSTRATE BUFFER **Permanent Red Substrate Buffer** Substratpuffer-Lösung
Fläschchen 4	1 x 150 µL	PERMANENT RED CHROMOGEN **Permanent Red Chromogen** Permanent Red Chromogen-Lösung

Code-Nr. K5355 – 500 Tests
Die unten aufgeführten Materialien sind ausreichend für 500 Tests. Die Anzahl der Tests basiert auf einer Reagenzienmenge von je 200 µL pro Test.

Fläschchen 1	10 x 11 mL	RABBIT/MOUSE (LINK) **Rabbit/Mouse (LINK)** Gebrauchsfertig. Mit sekundären Antikörpern gegen Kaninchen- und Maus-Immunglobulin gekoppeltes Dextran. In gepufferter Lösung, enthält ein stabilisierendes Protein und Konservierungsmittel.
Fläschchen 2	10 x 11 mL	AP ENZYME (ENHANCER) **AP Enzyme (ENHANCER)** Gebrauchsfertig. Mit alkalischer Phosphatase markiertes Amplifikations-Polymer in gepufferter Lösung; enthält ein stabilisierendes Protein sowie Konservierungsmittel.
Fläschchen 3	10 x 11 mL	SUBSTRATE BUFFER **Permanent Red Substrate Buffer** Substratpuffer-Lösung
Fläschchen 4	1 x 1,5 mL	PERMANENT RED CHROMOGEN **Permanent Red Chromogen** Permanent Red Chromogen-Lösung

Erforderliches, aber nicht mitgeliefertes Material
Absorbierende Tücher
Ammoniakwasser, 37 mmol/L (optional)
Dako Antibody Diluent, Code-Nr. S0809 oder S2022
Gegenfärbung; Hämatoxylin, z.B. Dako Mayer's Hämatoxylin, Code-Nr. S3309 (auf wässriger Basis)
Deckgläser
Dako Autostainer (optional)
Destilliertes oder entionisiertes Wasser
Epitope Retrieval Solution
Ethanol, 95 % und 70 %
Feuchtigkeitskammer (optional)
Lichtmikroskop (20-fache bis 800-fache Vergrößerung)
Fixiermittel, wie Dako Glycergel™ Mounting Medium (Code-Nr. C0563) oder Dako Faramount, Aqueous Mounting Medium, Ready-to-Use (Code-Nr. S3025) bzw. nichtwässriges permanentes Fixiermittel, Dako (Code-Nr. S3026)
Positive und negative Kontrollgewebe zur Verfahrenskontrolle
Primäre Antikörper und Negativkontrolle
Objektträger, SuperFrost Plus, Poly-L-Lysin beschichtet oder Dako Silanized Slides (Code-Nr. S3003)
Färbeschalen oder Bäder
Zeitmesser (muss Intervalle von 2–40 Minuten anzeigen können)
Waschflaschen

Waschpuffer, Dako (Code-Nr. S3006)
Wasserbad mit Deckel
Xylol, Toluol oder Xylolersatz

Vorsichtsmaßnahmen

1. Nur für Fachpersonal bestimmt.
2. Die Fläschchen 1, Kaninchen/Maus (LINK) und 2, AP-Enzyme (ENHANCER) enthalten Material tierischen Ursprungs. Wie alle Produkte biologischen Ursprungs müssen auch diese entsprechend gehandhabt werden.
3. Fläschchen 3, Permanent Red Substratpuffer, nicht verwenden, wenn bei Raumtemperatur Präzipitat sichtbar ist.
4. Fläschchen 4, Permanent Red Chromogen oder angesetzte Substrate Working Solution keinem starken Lichteinfall aussetzen.
5. Fläschchen 4, Permanent Red Chromogen, enthält ≥3-<5% Salzsäure und erfordert keine Gefahrenkennzeichnung. Von fachlich qualifizierten Anwendern können Sicherheitsdatenblätter (SDS) angefordert werden.

   Vorsicht. Dieses Produkt enthält eine Substanz, die noch nicht vollständig erforscht wurde. Die Klassifizierung ist ausschließlich auf der Grundlage eines Vergleichs mit Substanzen ähnlicher Struktur erfolgt.
6. Dieses Produkt enthält Natriumazid (NaN_3), eine in reiner Form äußerst giftige Chemikalie. Ansammlungen von Natriumazid können auch in Konzentrationen, die nicht als gefährlich klassifiziert sind, mit Blei- und Kupferabflussrohren reagieren und hochexplosive Metallazide bilden. Nach der Entsorgung stets mit viel Wasser nachspülen, um Azidansammlungen in den Leitungen vorzubeugen.
7. Entsprechende Schutzkleidung tragen, um Augen- und Hautkontakt zu vermeiden.
8. Nicht verwendete Lösung ist entsprechend örtlichen, bundesstaatlichen und staatlichen Richtlinien zu entsorgen.

Aufbewahrung

Bei 2–8 °C aufbewahren. Nach Ablauf des auf dem Kit aufgedruckten Verfallsdatums nicht mehr verwenden. Kitkomponenten aus unterschiedlichen Chargen nicht austauschen. Werden die Reagenzien nicht entsprechend den angegebenen Bedingungen aufbewahrt, müssen die Bedingungen vom Anwender geprüft werden (1). Falls es zu einer unerwarteten Färbung kommt, die sich nicht durch Unterschiede bei Laborverfahren erklären lässt und auf ein Problem mit dem Produkt hindeutet, ist unser technischer Kundendienst zu verständigen.

Vorbereitung der Probe

Zur Verwendung mit formalinfixierten, paraffineingebetteten Gewebeschnitten sowie gefrorenen Gewebeschnitten und fixierten Zellausstrichen. Für die Konservierung der Proben sind verschiedene Fixiermittel geeignet. Bei allen Gewebeschnitten sind Standardverfahren der Gewebeverarbeitung für die immunzytochemische Färbung anzuwenden (2). Für formalinfixierte, paraffineingebettete Gewebeschnitte und Gefrierschnitte beträgt die optimale Dicke 4–6 µm. Die Probe auf Objektträger für die Mikroskopie fixieren. Die Schnitte sind auf den Objektträgern so flach und faltenfrei wie möglich zu fixieren. Zu viele Falten wirken sich negativ auf die Färbungsergebnisse aus.

HINWEIS: Für den Einsatz in Dako Autostainern dürfen die Objektträger nicht breiter als 26 mm sein, damit sie in die Objektträger-Halterung passen.

Paraffineingebettete Schnitte sollten aus einem vorgewärmten Wasserbad mit destilliertem oder entionisiertem heraus fixiert werden. Dieses Wasserbad darf keine Additive enthalten (wie z.B. Gelatine, Poly-L-Lysin usw.). Die Schnitte werden mindestens 60 Minuten lang (z.B. über Nacht) durch Wärme getrocknet, gewöhnlich bei einer Temperatur von höchstens 60 ℃. Damit die Schnitte gut auf den Objektträgern haften, muss vor dem Trockenprozess im Ofen alles Wasser unter den Schnitten entfernt worden sein.

Verfahren

A. Reagenzvorbereitung

A.1 Substrat-Arbeitslösung

Eine Permanent Red Chromogen-Arbeitslösung wird durch gründliches Mischen von 100 Teilen Permanent Red Substratpuffer (Fläschchen 3) mit einem (1) Teil Permanent Red Chromogen (Fläschchen 4) angesetzt, z.B. durch Mischen von 1 mL Permanent Red Substratpuffer aus Fläschchen 3 mit 10 µL Permanent Red Chromogen aus Fläschchen 4. Nur soviel ansetzen, wie für die zu färbenden Objektträger erforderlich ist. Lösung innerhalb von 30 Minuten verbrauchen. Ist die Substrat-Arbeitslösung für den Dako Autostainer vorgesehen, diese in einem Reagenzglas des Autostainers ansetzen.

A.2 Richtlinie für die optimale Verdünnung primärer Antikörper

Für das EnVision™ G|2 System/AP ist es erforderlich, die konzentrierten primären Antikörper von Dako vor der Verwendung zu verdünnen. Primäre Dako-Antikörper sollten bei Verwendung mit EnVision™ G|2 System/AP normalerweise 4–10 mal stärker verdünnt werden als in der Packungsbeilage für den jeweiligen primären Antikörper empfohlen. Dieses ist nur eine Richtlinie. Optimale Verdünnungen sind vom Anwender selbst zu ermitteln.

Die primären Antikörper in Dako Antibody Diluent, Code-Nr. S0809 oder S2022 verdünnen.

B. Manuelles Färbeverfahren

Vor Anwendung des EnVision™ G|2 System/AP auf formalinfixierten, paraffineingebetteten Gewebeschnitte folgende Vorbehandlungsschritte durchführen. Die Probe entparaffinieren und rehydrieren. Einige Proben bedürfen einer Epitopdemaskierung durch hitzeinduzierte Epitopdemaskierung oder enzymatische Verdauung. Detaillierte Angaben zur Probenvorbereitung bitte der Packungsbeilage des jeweiligen primären Antikörpers von Dako entnehmen. Nach der Demaskierung die Probe mit Waschpufferlösung aus einer Waschflasche (Strahl nicht direkt auf das Gewebe richten) vorsichtig spülen und 5 Minuten in ein frisches Waschpufferbad legen.

Vor Beginn der Immunfärbung alle Reagenzien auf Raumtemperatur (20–25℃) bringen. Alle Inkubationen ebenfalls bei Raumtemperatur durchführen.

Proben dürfen während der Färbung nicht austrocknen. Trockene Proben können unspezifische Färbungen aufweisen.

Schritt 1: Primäre Antikörper oder Negativkontrolle
Überschüssigen Waschpuffer durch Abklopfen entfernen und den Bereich um die Probe herum vorsichtig abtupfen, um Flüssigkeitsreste zu entfernen und das Reagenz an der vorgesehenen Stelle zu halten. 200 µL optimal verdünnten primären Antikörper oder Negativkontrolle zugeben, um die Probe zu bedecken. 30 (±1) Minuten inkubieren. Mit Pufferlösung aus einer Waschflasche (Strahl nicht direkt auf das Gewebe richten) vorsichtig spülen und 5 Minuten in ein frisches Pufferbad legen.

Schritt 2: Fläschchen 1, Kaninchen/Maus (LINK)
Überschüssigen Waschpuffer abklopfen und Objektträger wie zuvor abwischen. 200 µL Kaninchen/Maus (LINK) zugeben, um die Probe zu bedecken. 30 (±1) Minuten inkubieren. Probe zweimal wie unter Schritt 1 beschrieben spülen.

Schritt 3: Fläschchen 2, AP Enzyme (ENHANCER)
Überschüssigen Waschpuffer abklopfen und Objektträger wie zuvor abwischen. Die Probe mit 200 µL AP Enzyme (ENHANCER) bedecken. 30 (±1) Minuten inkubieren. Probe zweimal wie unter Schritt 1 beschrieben spülen.

Schritt 4: Substrat-Arbeitslösung
Die Substrat-Arbeitslösung wie in Abschnitt A.1 beschrieben ansetzen. Angesetzte Substrat-Arbeitslösung innerhalb von 30 Minuten verbrauchen.

Überschüssigen Puffer abklopfen und Objektträger wie zuvor abwischen. Die Probe mit 200 µL Substrat-Arbeitslösung bedecken. 5–20 Minuten inkubieren. Objektträger vorsichtig mit destilliertem oder entionisiertem Wasser spülen. Chromogenhaltige Abfallprodukte in einem Sondermüllbehälter auffangen und entsprechend entsorgen. Objektträger 5 Minuten in einem frischen Bad mit destilliertem oder entionisiertem Wasser spülen.

Schritt 5: Gegenfärbung (Anweisungen für Hämatoxylin)
Objektträger in ein Hämatoxylin-Bad eintauchen. Die Inkubationsdauer richtet sich nach der Stärke der verwendeten Hämatoxylinlösung. Nach der Hämatoxylin-Gegenfärbung gründlich in destilliertem oder entionisiertem Wasser spülen.

Optional: Die Objektträger mit den Gewebeschnitten in ein Bad mit 37 mmol/L Ammoniakwasser einlegen und 2–5 Minuten vorsichtig mit destilliertem oder entionisiertem Wasser spülen. Ammoniakwasser (37 mmol/L) wird durch Mischen von 2,5 (±0,5) mL (konzentriertem) 15 mol/L Ammoniumhydroxid mit 1 Liter destilliertem oder entionisiertem Wasser zubereitet. Nicht verwendetes 37 mmol/L Ammoniakwasser kann bei Raumtemperatur (20–25 ℃) in einer gut verschlossenen Flasche bis zu 12 Monate aufbewahrt werden.

Schritt 6: Fixierung
Zur Fixierung im wässrigen Medium werden Fixiermittel Dako Glycergel™ Mounting Medium, Code-Nr. C0563, oder Faramount Aqueous Mounting Medium (Code-Nr. S3025) empfohlen.

Zur permanenten Fixierung im nicht-wässrigen Medium wird Dako Permanent Mounting Media (Code-Nr. S3026) empfohlen, nachdem die Objektträger an der Luft vollständig getrocknet sind.

C. Färbeverfahren für Dako Autostainer Instruments

Alle Reagenzien des Kits, mit Ausnahme von Fläschchen 4, werden in Autostainer Reagent Vials geliefert. Ist die Substrat-Arbeitslösung für den Dako Autostainer vorgesehen, diese in einem Reagenzglas des Autostainers ansetzen. EnVision™ G|2 System/AP wurde, wie aus der untenstehenden Matrix ersichtlich, für die Verwendung auf den Dako Autostainer Instruments optimiert.

Das **Bedienerhandbuch des betreffenden Autostainer Instruments** vor Färbungen mit Dako Autostainer Instruments gemäß dem Schema gründlich lesen.

Objektträger und Reagenzien müssen vor der Verwendung des Autostainers gemäß der **Slide Layout Map** bzw. der **Reagent Layout Map** positioniert werden.

Folgende Vorbehandlungsschritte vor Anwendung des EnVision™ G|2 System/AP auf formalinfixierten, paraffineingebetteten Gewebeschnitte durchführen. Die Probe entparaffinieren und rehydrieren. Einige Proben bedürfen einer Epitopdemaskierung durch hitzeinduzierte Epitopdemaskierung oder enzymatische Andauung. Detaillierte Angaben zur Probenvorbereitung bitte der Packungsbeilage des jeweiligen primären Antikörpers von Dako entnehmen. Nach der Demaskierung die Probe mit Waschpufferlösung aus einer Waschflasche (Strahl nicht direkt auf das Gewebe richten) vorsichtig spülen und 5 Minuten in ein frisches Waschpufferbad legen.

Vor Beginn der Immunfärbung alle Reagenzien auf Raumtemperatur (20–25℃) bringen. Alle Inkubationen ebenfalls bei Raumtemperatur durchführen.

Proben dürfen während der Färbung nicht austrocknen. Trockene Proben können unspezifische Färbungen aufweisen.

Schritt 1: Programmierung des Autostainers
Vor der erstmaligen Verwendung von EnVision™ G|2 System/AP on the Autostainer Instrument ist eine neue Matrix/ein neues Schema zu erstellen. Bitte für den jeweiligen Autostainer die Matrix unten und das Benutzerhandbuch beachten.

Matrix: K5355

1. Rinse Buffer
2. Primary Antibody - 200
3. Rinse Buffer
4. Secondary Reagent - 200
5. Rinse Buffer
6. Auxiliary - 200
7. Rinse Buffer
8. Tertiary Reagent - 200
9. Rinse Buffer
10. Auxiliary - 200
11. Rinse Buffer
12. *Swtch
13. Substrate-Batch - 200
14. Rinse Buffer
15. *Swtch
16. Auxiliary
17. Rinse Buffer
18. Auxiliary

HINWEIS: Bei Färbedurchläufen mit höchstens 10 Objektträgern sollte der „Zusatz"-Schritt auf „Pufferspülgang" eingestellt werden. Für Färbedurchläufe mit mehr als 10 Objektträgern den „Zusatz"-Schritt auf „Keine" einstellen. Dieses gewährleistet vergleichbare Waschzeiten.

Vor dem Beladen mit Objektträgern gemäß dem **BILDSCHIRM FÄRBEDURCHLAUF PROGRAMMIEREN** müssen folgende Reagenzien zur Reagenzienliste hinzugefügt werden. Bitte Bezeichnung, Matrixschritt und Inkubationszeit der Tabelle 1 und dem Benutzerhandbuch des jeweiligen Autostainers entnehmen.

Tabelle 1. Notwendige Ergänzungen der Reagenzienliste

Reagenz	Code-Nr.	Matrix-Schritt	Inkubations-zeit
In der Autostainer-Liste noch nicht enthaltene primäre Antikörper	Individuell	Primärer Antikörper	30 Minuten
Rabbit/Mouse (LINK)	K5355	Sekundäres Reagenz	30 Minuten
AP Enzyme (ENHANCER)	K5355	Tertiäres Reagenz	30 Minuten
Substrate Working Solution	K5355	Substrat-Charge	10 Minuten

Schritt 2: Färbeprotokoll
Die Matrix (**K5355**) für das EnVision™ G|2 System/AP, Rabbit/Mouse (Permanent Red) Detektionskit in den **PROGRAM STAINING RUN SCREEN** laden. Die Anzahl der Objektträger im Durchlauf angeben und die Reagenzien und deren Inkubationszeiten in die Matrix eingeben. Die Positionen der Objektträger werden dann im **Slide Layout Map Screen** angezeigt, während der **Reagent Layout Map Screen** die Positionen und Volumina der in den Autostainer zu ladenden Reagenzien angibt. Bitte auch das Benutzerhandbuch zu Rate ziehen.

Es ist empfehlenswert, die Objektträger vor der Beladung gemäß dem **Slides Layout Map Screen** 5 Minuten in Dako Waschpuffer, Code-Nr. S3006, vorzufeuchten. Die Fläschchen gemäß der **Reagent Layout Map** ins Reagenzgestell stellen. Unbedingt die richtigen Reagenzien in den korrekten Mengen verwenden. Dabei insbesondere bei der Beladung der Fläschchen mit primären Antikörpern äußerst sorgfältig vorgehen. Die Wasser- und Pufferpumpen vorpumpen. Das Programm starten. Nach Beendigung des Programms die

Objektträger mit destilliertem oder entionisiertem Wasser spülen. Angaben zu Gegenfärbung und Fixierung bitte den Schritten 5 und 6 in Abschnitt B entnehmen.

Auswertung der Ergebnisse

Permanent Red Chromogen bildet am Ort des Zielantigens ein permanentes, mit einem Standard-Lichtmikroskop darstellbares rotes Reaktionsprodukt.

In einigen Gewebearten kann die endogene Aktivität der alkalinen Phosphatase zu falsch positiven Ergebnissen führen. Diese endogene Aktivität kann durch Dako Dual Endogenous Enzyme Block (Code-Nr. S2003) oder Levamisol (Code-Nr. X3021) unterdrückt werden. Levamisol hemmt weder die intestinale noch die plazentale Form der alkalinen Phosphatase und eignet sich daher möglicherweise nicht für das Anfärben von Proben, die diese Isoenzyme enthalten. Anweisungen bitte den Packungsbeilagen der Code-Nummern S2003 und X3021 entnehmen.

Das Vorliegen einer unspezifischen Färbung stellt sich als diffuse Rotfärbung der mit der Negativkontrolle behandelten Objektträger dar.

Zellkerne werden durch die Hämatoxylin-Gegenfärbung blau gefärbt.

References/ Références/ Literatur

1. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988: Final Rule, 57CFR7163, February 28, 1992
2. Sheehan DC, Hrapchak BB. Theory and practice of histotechnology. St. Louis: CV Mosby Company; 1980

Explanation of symbols/ Explication des symboles/ Erläuterung der Symbole

REF	Catalogue number Référence du catalogue Bestellnummer	2°C 8°C	Temperature limitations Limites de température Zulässiger Temperaturbereich		Use by Utiliser avant Verwendbar bis
IVD	In vitro diagnostic medical device Dispositif médical de diagnostic in vitro In-vitro-Diagnostikum	Σ	Contains sufficient for <n> tests Quantité suffisante pour <n> tests Inhalt ausreichend für <n> Tests		Manufacturer Fabricant Hersteller
	Consult instructions for use Consulter les instructions d'utilisation Gebrauchsanweisung beachten	LOT	Batch code Code du lot Chargenbezeichnung		

Produced by/ Produit par/ Hergestellt durch:
Dako Denmark A/S
Produktionsvej 42 Tel. +45 44 85 95 00
DK-2600 Glostrup Fax +45 44 85 95 95
Denmark/ Danemark/ Dänemark
www.dako.com