

FLEX
Monoclonal Mouse
Anti-Human
Wilms' Tumor 1 (WT1) Protein
Clone 6F-H2
Ready-to-Use
(Link)

English
Code IR055

Intended use

For in vitro diagnostic use.

FLEX Monoclonal Mouse Anti-Human Wilms' Tumor (WT1), Clone 6F-H2, Ready-to-Use (Link), is intended for use in immunohistochemistry (IHC) together with Autostainer Link instruments. This antibody is useful for the identification of Wilms' tumor, acute leukemias, malignant mesothelioma, serous ovarian adenocarcinoma, granulosa cell tumor, and other tumors (1, 7-10). Differential classification is aided by the results from a panel of antibodies. The clinical interpretation of any staining or its absence should be complemented by morphological studies using proper controls and should be evaluated within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a qualified pathologist. This antibody is intended to be used after the primary diagnosis of tumor has been made by conventional histopathology using nonimmunologic histochemical stains.

Summary and explanation

WT1 is a gene involved in the induction of Wilms' tumor, a pediatric renal malignancy. *WT1* encodes a zinc finger transcription factor which recognizes the early growth response (*EGR-1*) consensus sequence found in promoters of growth factor genes. The protein encoded by *WT1* regulates transcription of other genes and can function both as a transcriptional activator and repressor. *WT1* has been demonstrated to repress transcription of various growth-related genes such as platelet-derived growth factor A chain (*PDGF-A*) and insulin-like growth factor (*IGF*) (3-5). The transcriptional activity of this protein, however, can be modulated through physical interactions between *WT1* and p53. In the absence of wild-type p53, *WT1* has been demonstrated to function as a transcriptional activator of the *EGR-1* promoter in transfection assays (6).

Refer to *Dako General Instructions for Immunohistochemical Staining* or the detection system instructions of IHC procedures for: Principle of Procedure, Materials Required, Not Supplied, Storage, Specimen Preparation, Staining Procedure, Quality Control, Troubleshooting, Interpretation of Staining, General Limitations.

Reagent provided

Ready-to-use monoclonal mouse antibody provided in liquid form in a buffer containing stabilizing protein and 0.015 mol/L NaN₃.

Clone: 6F-H2 Isotype: IgG1, kappa

Immunogen

Truncated human *WT1* protein corresponding to N-terminal amino acids 1–181 (1,2)

Specificity

Alternate splicing of the *WT1* transcript gene results in four distinct mRNA species which are present in different amounts. The predicted molecular weight of the *WT1* protein ranges from 46 to 49 kDa depending on the mRNA species however, the *WT1* proteins derived from cells migrate at 50 to 55 kDa in SDS-PAGE (4). This antibody recognizes an epitope found in the amino terminal 84 encoded amino acids of *WT1*. It reacts with all isoforms of the full-length *WT1* and also identifies *WT1* lacking exon 2, frequently found in subsets of sporadic Wilms' tumors. In immunoprecipitation assays, the antibody has been shown to recognize full-length and *in vitro* translated *WT1*. It also detects full-length denatured *WT1* (55 kDa) in Western blots of *WT1* baculovirus-infected cell lysates (1).

Precautions

1. For in vitro diagnostic use.
2. For professional users.
3. 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.
4. As with any product derived from biological sources, proper handling procedures should be used.
5. Wear appropriate Personal Protective Equipment to avoid contact with eyes and skin.
6. Unused solution should be disposed of according to local, State and Federal regulations.

Storage	Store at 2-8 °C. Do not use after expiration date stamped on vial. If reagents are stored under any conditions other than those specified, the conditions must be verified by the user. There are no obvious signs to indicate instability of this product. Therefore, positive and negative controls should be run simultaneously with patient specimens. If unexpected staining is observed which cannot be explained by variations in laboratory procedures and a problem with the antibody is suspected, contact Dako Technical Support.
Specimen preparation	<p>The antibody can be used for labeling formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. Tissue specimens should be cut into sections of approximately 4 µm.</p> <p>Pre-treatment with heat-induced epitope retrieval (HIER) is required. Optimal results are obtained by pretreating tissues using EnVision FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (Code K8004).</p> <p><u>Deparaffinized sections:</u> Pre-treatment of deparaffinized formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections is recommended using Dako PT Link. For details, please refer to the PT Link User Guide.</p> <p>Follow the pre-treatment procedure outlined in the package insert for EnVision FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (Code K8004). The following parameters should be used for PT Link: Pre-heat temperature: 65 °C; epitope retrieval temperature and time: 97 °C for 20 (±1) minutes; cool down to 65 °C. Rinse sections with diluted room temperature EnVision FLEX Wash Buffer (20x) (Code K8007).</p> <p><u>Paraffin-embedded sections:</u> As alternative specimen preparation, both deparaffinization and epitope retrieval can be performed in the PT Link using a modified procedure. See the PT Link User Guide for instructions. After the staining procedure has been completed, the sections must be dehydrated, cleared and mounted using a permanent mounting method.</p> <p>The tissue sections should not dry out during the treatment or during the following immunohistochemical staining procedure. For greater adherence of tissue sections to glass slides, the use of Dako Silanized Slides (Code S3003) is recommended.</p>
Staining procedure	<p>The recommended visualization system is EnVision FLEX+, Mouse, High pH (Link) (Code K8002). The staining steps and incubation times are pre-programmed into the Autostainer Link software. Please refer to the proper Autostainer Link User Guide for detailed instructions on loading slides and reagents. If the protocols are not available on the used Autostainer platform, please contact Dako Technical Support. All incubation steps should be performed at room temperature.</p> <p>Optimal conditions may vary depending on specimen and preparation methods, and should be determined by each individual laboratory.</p> <p>Counterstaining in hematoxylin is recommended using EnVision FLEX Hematoxylin (Link) (Code K8008).</p> <p>Positive and negative control tissues as well as negative control reagent should be run simultaneously using the same protocol as the patient specimens. The positive control tissue should include epithelial cells and the majority of the smooth muscle cells and the cells/structures should display reaction patterns as described for this tissue in "Performance characteristics". The recommended negative control reagent is FLEX Negative Control, Mouse (Link) (Code IR750).</p>
Staining interpretation	The cellular staining pattern is cytoplasmic and/or nuclear; however only nuclear staining is relevant.
Performance characteristics	<p><u>Normal tissues:</u> Antibodies to WT1, including clone 6F-H2, have been demonstrated to label the cytoplasm in some tissue specimens. Cytoplasmic staining of blood vessels and connective tissue of lung alveoli was observed (7). Granular cytoplasmic staining has also been reported in mature myelocytic cells (10).</p> <p><u>Abnormal tissues:</u> High levels of WT1 expression have been demonstrated in the epithelial and blastemal components of Wilms' tumors, whereas stromal elements were found to be expressed at very low levels (9). The WT1 protein was immunolocalized, using anti-WT1 (clone 6F-H2), to the nuclei of malignant mesothelioma cells (7,8). WT1 protein expression have also been demonstrated in the majority of acute leukemias but not in cells from chronic myelogenous leukemia, except when in blast crisis. The antibody labeled the nuclei of leukemia blast cells but was unreactive with normal mononuclear cells and normal peripheral CD34+ hematopoietic progenitor cells (1,10). In addition to specific nuclear immunoreactivity, antibodies to WT1 (including clone 6F-H2) have been reported to stain the cytoplasm of tumor cells in some cases of adenocarcinoma and the desmoplastic stroma and basement membrane of some carcinoma specimens. Perinuclear staining of tumor cells in malignant mesothelioma has also been observed (8). This cytoplasmic staining may represent cross-reactivity with an epitope unrelated to WT1 (8,10).</p>

Français
Réf. IR055

Utilisation prévue	Pour utilisation diagnostique in vitro.
	L'anticorps FLEX Monoclonal Mouse Anti-Human Wilms' Tumor (WT1), Clone 6F-H2, Ready-to-Use (Link), est destiné à une utilisation en immunohistochimie (IHC) avec les instruments Autostainer Link. Cet anticorps est

utile pour l'identification des tumeurs de Wilms, des leucémies aiguës, des mésothéliomes malins, des adénocarcinomes ovariens séreux, des tumeurs de la granulosa et des autres tumeurs (1, 7-10). La classification différentielle est facilitée par les résultats provenant d'un panel d'anticorps. L'interprétation clinique de toute coloration ou son absence doit être complétée par des études morphologiques en utilisant des contrôles appropriés et doit être évaluée en fonction des antécédents cliniques du patient et d'autres tests diagnostiques par un pathologiste qualifié. Cet anticorps est destiné à être utilisé après un diagnostic primaire de tumeur par histopathologie traditionnelle utilisant des colorations histochimiques non immunologiques.

Résumé et explication

WT1 est un gène impliqué dans l'induction de la tumeur de Wilms, cancer rénal de l'enfant. *WT1* code pour un facteur de transcription à doigts de zinc qui reconnaît la séquence consensus du gène de croissance à réponse précoce (*EGR-1*) présente dans les promoteurs des gènes du facteur de croissance. La protéine encodée par le *WT1* régule la transcription d'autres gènes et peut agir à la fois comme un activateur et comme un répresseur de transcription. Il a été prouvé que le *WT1* agit comme un répresseur de transcription de plusieurs gènes liés à la croissance, tels que le facteur de croissance dérivé des plaquettes, chaîne A (*PDGF-A*) et le facteur de croissance insulino-mimétique (*IGF*) (3-5). L'activité de transcription de cette protéine peut toutefois être modulée par des interactions physiques entre le *WT1* et la p53. En l'absence de p53 de type sauvage, il s'avère que le *WT1* agit comme un activateur de transcription du promoteur d'*EGR-1* dans les essais de transfection (6).

Consulter le document *General Instructions for Immunohistochemical Staining* (Instructions générales de coloration immunohistochimique) de Dako ou les instructions du système de détection pour les procédures IHC : Principe de la procédure, Matériel requis mais non fourni, Conservation, Préparation des échantillons, Procédure de coloration, Contrôle de qualité, Dépannage, Interprétation de la coloration, Limites générales.

Réactif fourni

Anticorps monoclonal de souris prêt à l'emploi fourni sous forme liquide dans un tampon contenant une protéine stabilisante et 0,015 mol/L de NaN_3 .

Clone : 6F-H2 Isotype : IgG1, kappa

Immunogène

Protéine humaine *WT1* tronquée correspondant à la séquence N-terminale des acides aminés 1-181 (1,2)

Spécificité

L'épissage alternatif du gène de transcription *WT1* donne quatre espèces distinctes d'ARNm présentes en différentes quantités. Le poids moléculaire prévu de la protéine *WT1* est compris entre 46 et 49 kDa selon les espèces d'ARNm, cependant, les protéines *WT1* dérivées des cellules migrent entre 50 à 55 kDa avec SDS-PAGE (4). Cet anticorps reconnaît un épitope situé sur les 84 acides aminés terminaux de *WT1*. Il réagit à tous les isoformes de *WT1* pleine longueur et identifie également un exon 2 dépourvu de *WT1*, fréquemment observé dans les sous-ensembles de tumeurs de Wilms isolées. Dans les dosages par immunoprécipitation, il a été démontré que l'anticorps reconnaît la *WT1* pleine longueur ayant subi une traduction *in vitro*. Il détecte également la *WT1* pleine longueur dénaturée (55 kDa) lors de Western blots de lysats cellulaires de *WT1* infectés par baculovirus (1).

Précautions d'emploi

1. Pour utilisation diagnostique in vitro.
2. Pour utilisateurs professionnels.
3. 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 et former des accumulations d'azides métalliques hautement explosives. Lors de l'élimination, rincer abondamment à l'eau pour éviter toute accumulation d'azide métallique dans les canalisations.
4. Comme avec tout produit d'origine biologique, respecter les procédures de manipulation appropriées.
5. Porter un équipement de protection individuelle approprié pour éviter tout contact avec les yeux et la peau.
6. Les solutions non utilisées doivent être éliminées conformément aux réglementations locales, nationales et européennes.

Conservation

Conserver entre 2 et 8 °C. Ne pas utiliser après la date de péremption imprimée sur le flacon. Si les réactifs sont conservés dans des conditions autres que celles indiquées, celles-ci doivent être validées par l'utilisateur. Il n'existe pas de signe particulier pour indiquer l'instabilité de ce produit. Par conséquent, des contrôles positifs et négatifs doivent être testés en même temps que les échantillons de patient. Si une coloration inattendue est observée, qui ne peut être expliquée par des différences dans les procédures du laboratoire et qu'un problème lié à l'anticorps est suspecté, contacter l'assistance technique de Dako.

Préparation des échantillons

L'anticorps peut être utilisé pour le marquage des coupes de tissus incluses en paraffine et fixées au formol. L'épaisseur des coupes d'échantillons tissulaires doit être d'environ 4 µm.

Le prétraitement avec une restauration d'épitope induite par la chaleur (HIER) est nécessaire. Des résultats optimaux sont obtenus en prétraitant les tissus à l'aide de EnVision FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (réf. K8004).

Coupes déparaffinées : Le prétraitement des coupes tissulaires déparaffinées, fixées au formol et incluses en paraffine, est recommandé à l'aide du Dako PT Link. Pour plus de détails, se référer au Guide d'utilisation du PT Link.

Suivre la procédure de prétraitement indiquée dans la notice pour le produit EnVision FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x), (réf. K8004). Les paramètres suivants doivent être utilisés pour le PT Link : Température de préchauffage : 65 °C ; température et durée de restauration de l'épitope : 97 °C pendant 20 minutes

(±1 minute) ; laisser refroidir jusqu'à 65 °C. Rincer les coupes avec un tampon de lavage dilué à température ambiante EnVision FLEX (20x) (réf. K8007).

Coupes incluses en paraffine : Comme préparation alternative des échantillons, le déparaffinage et la restauration d'épitope peuvent être réalisés dans le PT Link à l'aide d'une procédure modifiée. Se référer aux instructions du Guide d'utilisation du PT Link. Une fois la procédure de coloration terminée, les coupes doivent être déshydratées, éclaircies et montées selon une méthode de montage permanent.

Les coupes de tissus ne doivent pas sécher lors du traitement ni lors de la procédure de coloration immunohistochimique suivante. Pour une meilleure adhérence des coupes de tissus sur les lames de verre, il est recommandé d'utiliser des lames silanisées Dako Silanized Slides (réf. S3003).

Procédure de coloration

Le système de visualisation recommandé est le système EnVision FLEX+, Mouse, High pH (Link) (réf. K8002). Les étapes de coloration et les temps d'incubation sont préprogrammés dans le logiciel Autostainer Link. Se reporter au Guide d'utilisation de l'Autostainer Link correspondant pour plus de détails sur le chargement des lames et des réactifs. Si les protocoles ne sont pas disponibles sur la plateforme Autostainer utilisée, contacter l'assistance technique Dako. Toutes les étapes d'incubation doivent être effectuées à température ambiante.

Les conditions optimales peuvent varier en fonction de l'échantillon et des méthodes de préparation, et doivent être déterminées par chaque laboratoire individuellement.

Il est recommandé d'effectuer une contre-coloration à l'aide de EnVision FLEX Hematoxylin (Link) (réf. K8008).

Les tissus de contrôle positifs et négatifs, ainsi que le réactif de contrôle négatif, doivent être testés en parallèle selon le même protocole que pour les échantillons de patients. Le tissu de contrôle positif doit comprendre les cellules épithéliales et la majorité des cellules du muscle lisse, et les cellules/structures doivent présenter des schémas de réaction tels que décrits pour ce tissu dans les "Performances". Le réactif de contrôle négatif recommandé est le FLEX Negative Control, Mouse, (Link) (réf. IR750).

Interprétation de la coloration

Le schéma de coloration cellulaire est cytoplasmique et/ou nucléaire ; cependant, seule la coloration nucléaire est pertinente.

Performances

Tissus sains : Des anticorps anti-WT1, dont le clone 6F-H2, ont marqué le cytoplasme de certains échantillons tissulaires. Une coloration cytoplasmique positive a été observée dans les vaisseaux sanguins et le tissu conjonctif des alvéoles pulmonaires (7). Une coloration cytoplasmique granulaire a également été observée dans les cellules myélocytaires matures (10).

Tissus anormaux : Des niveaux d'expression de WT1 élevés ont été observés dans les composants épithéliaux et blastémaux des tumeurs de Wilms, tandis que les éléments stromaux étaient exprimés à des taux très faibles (9). La protéine WT1 a été immunolocalisée, à l'aide de l'anticorps anti-WT1 (clone 6F-H2), sur les noyaux des cellules de mésothéliome malin (7,8). L'expression de la protéine WT1 a également été démontrée dans la majorité des leucémies aiguës mais pas dans les cellules de leucémie myélogène chronique, sauf en cas de crise blastique. L'anticorps a marqué les noyaux des cellules blastiques de leucémie mais n'a pas réagi aux cellules mononucléaires normales et aux cellules progénitrices hématopoïétiques CD34+ périphériques normales (1,10). Outre une immunoréactivité nucléaire spécifique, les anticorps anti-WT1 (dont le clone 6F-H2) ont marqué le cytoplasme de cellules tumorales dans certains cas d'adénocarcinomes et le stroma desmoplastique et la membrane basale de certains échantillons de carcinomes. Une coloration périnucléaire de cellules tumorales a également été observée dans des mésothéliomes malins (8). Il est possible que ce marquage cytoplasmique représente une réactivité croisée avec un épitope sans relation avec WT1 (8,10).

Deutsch Code-Nr. IR055

Verwendungszweck Zur In-vitro-Diagnostik.

FLEX Monoclonal Mouse Anti-Human Wilms' Tumor (WT1), Clone 6F-H2, Ready-to-Use (Link) ist zur Verwendung in der Immunhistochemie (IHC) in Verbindung mit Autostainer Link-Geräten bestimmt. Dieser Antikörper eignet sich zur Identifizierung von Wilms-Tumoren, akuter Leukämien, malignen Mesotheliome, seröser Eierstock-Adenokarzinome, Granulosazelltumoren sowie weiterer Tumore (1, 7-10). Die Differenzialklassifikation wird durch die Ergebnisse eines Antikörper-Panels unterstützt. Die klinische Auswertung einer eintretenden oder ausbleibenden Färbung sollte durch morphologische Studien mit geeigneten Kontrollen ergänzt werden und von einem qualifizierten Pathologen unter Berücksichtigung der Krankengeschichte und anderer diagnostischer Tests des Patienten vorgenommen werden. Dieser Antikörper kommt nach der Primärdiagnose des Tumors durch konventionelle Histopathologie unter Verwendung von nicht immunologischen histochemischen Färbungen zum Einsatz.

Zusammenfassung und Erklärung

WT1 ist ein Gen, das an der Einleitung des Wilms-Tumors, einer Nieren-Malignität bei Kindern, beteiligt ist. *WT1* kodiert einen Zinkfinger-Transkriptionsfaktor, der die frühe Wachstumsreaktions(EGR-1)-Konsensussequenz erkennt, die in Promotoren von Wachstumsfaktorgenen nachweisbar ist. Das von *WT1* kodierte Protein reguliert die Transkription anderer Gene und kann als transkriptionaler Aktivator und Repressor verwendet werden. *WT1* hat gezeigt, dass es die Transkription verschiedener wachstumsbezogener Gene, z. B. die von Thrombozyten abgeleitete Wachstumsfaktor-A-Kette (*PDGF-A*) und den insulinähnlichen Wachstumsfaktor (*IGF*), hemmen

kann (3-5). Die transkriptionale Aktivität dieses Proteins kann allerdings durch physikalische Interaktionen zwischen WT1 und p53 moduliert werden. In Abwesenheit des p53-Wildtyps wurde nachgewiesen, dass WT1 als ein transkriptionaler Aktivator des *EGR-1*-Promotors in Transfektionsassays funktioniert (6).

Folgende Angaben bitte den *General Instructions for Immunohistochemical Staining* (Allgemeine Richtlinien zur immunhistochemischen Färbung) von *Dako* bzw. den Anweisungen des Detektionssystems für IHC-Verfahren entnehmen: Verfahrensprinzipien; Erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien; Lagerung; Gewebevorbereitung; Färbeverfahren; Qualitätskontrolle; Fehlerbehandlung; Auswertung der Färbung; Allgemeine Beschränkungen.

Geliefertes Reagenz	Gebrauchsfertiger, monoklonaler Maus-Antikörper in flüssiger Form in einem Puffer, der stabilisierendes Protein und 0.015 mol/L NaN ₃ enthält. <u>Klon:</u> 6F-H2 <u>Isotyp:</u> IgG1, Kappa
Immunogen	Gekürztes menschliches WT1-Protein, das den N-Terminal-Aminosäuren 1-181 entspricht (1,2)
Spezifität	Alternatives Spleißen der <i>WT1</i> -Transkript-Gene führt zu vier verschiedenen mRNA-Spezies in unterschiedlichen Mengen. Das erwartete Molekulargewicht des WT1-Proteins liegt, abhängig von der mRNA-Spezies, zwischen 46 und 49 kDa. Allerdings migrieren die von Zellen abstammenden WT1-Proteine bei 50 to 55 kDa in SDS-PAGE (4). Dieser Antikörper erkennt ein Epitop, das in den Terminal-84-kodierten Aminosäuren von WT1 angetroffen werden kann. Er reagiert mit allen Isoformen des WT1 in voller Länge und identifiziert zudem WT1 mit fehlendem „Exon 2“, das häufig in Teilmengen des sporadischen Wilms-Tumors auftritt. In Immunpräzipitationsassays wurde aufgezeigt, dass der Antikörper das WT1 in voller Länge und WT1 aus <i>In-vitro</i> -Translation erkennt. Er erkennt auch denaturiertes WT1 (55 kDa) in voller Länge in Western-Blots von in mit dem Baculovirus infizierten WT1-Zelllysaten (1).
Vorsichtsmaßnahmen	<ol style="list-style-type: none">1. Zur In-vitro-Diagnostik.2. Für Fachpersonal.3. Dieses Produkt enthält Natriumazid (NaN₃), eine in reiner Form äußerst giftige Chemikalie. Bei den in diesem Produkt verwendeten Konzentrationen kann Natriumazid, obwohl nicht als gefährlich klassifiziert, mit in Wasserleitungen vorhandenem Blei oder Kupfer reagieren und zur Bildung von hochexplosiven Metallazid-Anreicherungen führen. Nach der Entsorgung muss mit reichlich Wasser nachgespült werden, um Metallazid-Anreicherungen in den Leitungen zu vermeiden.4. Wie alle Produkte biologischen Ursprungs müssen auch diese entsprechend gehandhabt werden.5. Geeignete persönliche Schutzausrüstung (PSA) tragen, um Augen- und Hautkontakt zu vermeiden.6. Nicht verwendete Lösung ist entsprechend örtlichen, staatlichen und EU-rechtlichen Richtlinien zu entsorgen.
Lagerung	Bei 2-8 °C lagern. Nach Ablauf des auf dem Behälter aufgedruckten Verfallsdatums nicht mehr verwenden. Werden die Reagenzien unter anderen als den angegebenen Bedingungen aufbewahrt, müssen diese Bedingungen vom Benutzer überprüft werden. Es gibt keine offensichtlichen Anhaltspunkte für die mögliche Instabilität dieses Produkts. Es sollten daher die Positiv- und Negativkontrollen gleichzeitig mit den Patientengewebeproben mitgeführt werden. Wenn eine unerwartete Anfärbung beobachtet wird, welche durch Änderungen in den Labormethoden nicht erklärt werden kann, und falls Verdacht auf ein Problem mit dem Antikörper besteht, ist Kontakt mit dem technischen Kundendienst von Dako aufzunehmen.
Gewebevorbereitung	Der Antikörper eignet sich zur Markierung von formalinfixierten und paraffineingebetteten Gewebeschnitten. Gewebeproben sollten in Schnitte von ca. 4 µm Stärke geschnitten werden. Es ist eine Vorbehandlung durch hitzeinduzierte Epitopdemaskierung (HIER-Verfahren) erforderlich. Optimale Ergebnisse können durch Vorbehandlung der Gewebe mit EnVision FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (Code-Nr. K8004) erzielt werden. <u>Entparaffinierte Schnitte:</u> Die Vorbehandlung der entparaffinierten, formalinfixierten, paraffineingebetteten Gewebeschnitte sollte mit Dako PT Link erfolgen. Weitere Informationen hierzu siehe PT Link-Benutzerhandbuch. Vorbehandlung gemäß der Beschreibung in der Packungsbeilage für EnVision FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (Code-Nr. K8004) durchführen. Für PT Link sind die folgenden Parameter zu verwenden: Temperatur auf 65 °C vorwärmen; Epitopdemaskierungstemperatur und -zeit: 97 °C für 20 (±1) Minuten; auf 65 °C abkühlen. Schnitte mit auf Raumtemperatur gebrachttem, verdünntem EnVision FLEX Wash Buffer (20x) (Code-Nr. K8007) spülen. <u>Paraffineingebettete Schnitte:</u> Alternativ können Entparaffinierung und Epitopdemaskierung im PT Link unter Verwendung eines modifizierten Verfahrens durchgeführt werden. Weitere Informationen finden Sie im PT Link-Benutzerhandbuch. Nach Abschluss des Färbeverfahrens müssen die Schnitte dehydriert, geklärt und mit einer permanenten Eindeckmethode eingedeckt werden. Während der Gewebevorbereitung oder während des anschließenden immunhistochemischen Färbeverfahrens dürfen die Gewebeschnitte nicht austrocknen. Für eine bessere Haftung der Gewebeschnitte an den Glas-Objektträgern werden Dako Silanized Slides (Code-Nr. S3003) empfohlen.

Färbeverfahren

Das empfohlene Detektionssystem ist EnVision FLEX+, Mouse, High pH, (Link) (Code-Nr. K8002). Die Färbeschritte und Inkubationszeiten sind in der Autostainer Link-Software vorprogrammiert. Detaillierte Anweisungen zum Laden der Objektträger und Reagenzien bitte dem Benutzerhandbuch zum Autostainer Link entnehmen. Wenn die Protokolle auf der verwendeten Autostainer-Plattform nicht verfügbar sind, bitte den technischen Kundendienst von Dako verständigen. Alle Inkubationsschritte sollten bei Raumtemperatur durchgeführt werden.

Optimale Bedingungen können je nach Gewebe und Präparationsverfahren unterschiedlich sein und sollten vom jeweiligen Labor selbst ermittelt werden.

Die Gegenfärbung in Hämatoxylin sollte mit EnVision FLEX Hämatoxylin (Link) (Code-Nr. K8008) ausgeführt werden.

Positiv- und Negativkontrollgewebe sowie Negativkontrollreagenz sollten zur gleichen Zeit und mit demselben Protokoll wie die Patientengewebe getestet werden. Das Positivkontrollgewebe sollte Epithelzellen enthalten und die Mehrheit der glatten Muskelzellen und die Zellen/Strukturen müssen die für dieses Gewebe unter „Leistungseigenschaften“ beschriebenen Reaktionsmuster aufweisen. Das empfohlene Negativkontrollreagenz ist FLEX Negative Control, Mouse (Link) (Code-Nr. IR750).

Auswertung der Färbung

Das zelluläre Färbemuster ist zytoplasmatisch und/oder nuklear, allerdings ist nur die nukleare Färbung relevant.

Leistungseigenschaften










Normalgewebe: Es wurde nachgewiesen, dass Antikörper zu WT1, einschließlich des Klon 6F-H2, das Zytoplasma in einigen Gewebeproben markieren können. Es wurde eine zytoplasmatische Färbung bei Blutgefäßen und beim Bindegewebe der Lungenalveolen beobachtet (7). Eine granuläre zytoplasmatische Färbung wurde auch bei reifen Myelozyten festgestellt (10).

Anormales Gewebe: In den Epithel- und Blastem-Komponenten von Wilms-Tumoren wurde ein hohes Maß an WT1-Expression nachgewiesen, wohingegen für Stromaelemente nur sehr tiefe Expressionsniveaus nachgewiesen wurden (9). Das WT1-Protein wurde Anti-WT1 (Klon 6F-H2) bis zu den Zellkernen der malignen Mesothelzellen immunolokalisiert (7,8). Eine WT1-Protein-Expression wurde ebenfalls bei der Mehrheit der akuten Leukämien nachgewiesen, aber nicht in Zellen von chronischer myelogener Leukämie mit Ausnahme der Blastenkrise. Der Antikörper hat die Zellkerne der leukämischen Blastenzellen markiert, war aber nicht reaktiv mit gesunden mononuklearen Zellen und gesunden peripheren CD34+ hämatopoetischen Vorläuferzellen (1,10). Zusätzlich zur spezifischen nuklearen Immunreaktivität wurde beobachtet, dass Antikörper auf WT1 (einschließlich Klon 6F-H2) in einigen Fällen des Adenokarzinoms und der desmoplastischen Stroma- und Basalmembran einiger Karzinomproben das Zytoplasma dieser Tumorzellen färben. Eine perinukleäre Färbung der Tumorzellen in malignen Mesotheliomen konnte ebenfalls festgestellt werden (8). Diese zytoplasmatische Färbung kann seine Ursache in einer Kreuzreaktivität mit einem Epitop haben, das keinen Bezug zu WT1 hat (8,10).

References / Bibliographie / Literaturnachweise

1. Rauscher FJ, Morris JF, Fredericks WJ, Lopez-Guisa J, Balakrishnan C, Jost M, et al. Characterization of monoclonal antibodies directed to the amino-terminus of the WT1, Wilms' tumor suppressor protein. *Hybridoma* 1998; 17:191-8.
2. Menssen HD, et al. Presence of Wilms' tumor (*wt1*) transcripts and the WT1 nuclear protein in the majority of human acute leukemias. *Leukemia* 1995; 9:1060
3. Coppes MJ, et al. The role of *WT1* in Wilms tumorigenesis. *FASEB J* 1993; 7:886
4. Haber DA and Buckler AJ. *WT1*: A novel tumor suppressor gene inactivated in Wilms' tumor. *New Biol* 1992; 4(2):97
5. Rauscher FJ. The WT1 Wilms tumor gene product: A developmentally regulated transcription factor in the kidney that functions as a tumor suppressor. *FASEB J* 1993; 7:896
6. Maheswaran S, et al. Physical and functional interaction between WT1 and p53 proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:5100
7. Amin KM, et al. Wilms' tumor 1 susceptibility (*WT1*) gene products are selectively expressed in malignant mesothelioma. *Amer J Pathol* 1995; 146(2):344
8. Kumar-Singh S, et al. *WT1* mutation in malignant mesothelioma and WT1 immunoreactivity in relation to *p53* and growth factor receptor expression, cell-type transition, and prognosis. *J Pathol* 1997; 181:67
9. Varansi R, et al. Fine structure analysis of the *WT1* gene in sporadic Wilms tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:3554
10. Menssen HD, et al. Detection by monoclonal antibodies of the Wilms' tumor (*WT1*) nuclear protein in patients with acute leukemia. *Intl J Canc* 1997; 70:518

Explanation of symbols / Explication des symbols / Erläuterung der Symbole

 <p>Catalogue number Référence catalogue Katalognummer</p>	 <p>Temperature limitation Limites de température Zulässiger Temperaturbereich</p>	 <p>In vitro diagnostic medical device Dispositif médical de diagnostic in vitro In-vitro-Diagnostikum</p>
 <p>Manufacturer Fabricant Hersteller</p>	 <p>Batch code Réf. du lot Chargenbezeichnung</p>	 <p>Contains sufficient for <n> tests Contenance suffisante pour <n> tests Ausreichend für <n> Tests</p>
 <p>Use by Utiliser avant Verwendbar bis</p>	 <p>Consult instructions for use Consulter les instructions d'utilisation Gebrauchsanweisung beachten</p>	 <p>Authorized representative in the European Community Représentant agréé dans la Communauté européenne Autorisierte Vertretung in der Europäischen Gemeinschaft</p>



Dako North America, Inc.
6392 Via Real
Carpinteria, California 93013 USA

Tel 805 566 6655
Fax 805 566 6688
Technical Support 800 424 0021
Customer Service 800 235 5763



Dako Denmark A/S
Produktionsvej 42
DK-2600 Glostrup Denmark

Tel +45 4485 9500
Fax +45 4485 9595
www.agilent.com

PT0020/Rev D

Revision / Révision / Revision 2017.06