



ZytoChem-Plus AP Kit, Broad Spectrum

REF / Cat. No.:	AP008RED	80 Réactions (avec Fast Red), 8 ml
	AP060	600 Réactions, 60 ml
	AP125	1.250 Réactions, 125 ml
	AP500	5.000 Réactions, 500 ml

Mode d'emploi

Champs d'application

Les coffrets ZytoChem-Plus AP fonctionnent selon le principe streptavidine-biotine et sont destinés à la détection qualitative d'antigènes dans des tissus fixés et inclus dans la paraffine, dans des coupes cryostat et dans des préparations cellulaires. Il est possible d'examiner des tissus qui ont subi différents procédés de fixation, comme par ex. formaldéhyde (formaline tamponnée neutre), B5, liquide de Bouin, éthanol ou HOPE.

Pour l'utilisation comme méthode diagnostique in vitro.

Résumé / explication

L'objectif de la coloration immunohistochimique est la visualisation des antigènes tissulaires et cellulaires.

Les coffrets ZytoChem-Plus AP sont des coffrets de détection hautement sensibles pour l'immunohistochimie et l'immunozytochimie. Ils fonctionnent avec la technique streptavidine-biotine pour laquelle un anticorps secondaire biotinylé lie plusieurs molécules d'un conjugué de la streptavidine et de la phosphatase alcaline (alkaline phosphatase, AP). La visualisation se fait par une réaction enzyme-substrat en présence d'une composante chromophore qui permet finalement une analyse microscopique.

L'anticorps secondaire biotinylé dans les coffrets ZytoChem-Plus AP (Broad Spectrum) est polyvalent. C'est la raison pour laquelle il est possible de détecter des anticorps primaires monoclonaux et polyclonaux à partir de la souris, du lapin, du rat et du cochon d'Inde avec les coffrets ZytoChem-Plus AP.

Principe de la méthode

Les coupes tissulaires incluses en paraffine sont tout d'abord déparaffinées et réhydratées.

La coloration de fond par la liaison non spécifique de l'anticorps primaire ou de l'anticorps secondaire est minimisée par l'incubation avec une solution de blocage (Cette étape peut être supprimée si l'anticorps primaire est dilué dans un tampon approprié).

Puis a lieu l'incubation avec l'anticorps primaire spécifique. Après une étape de lavage, on applique l'anticorps secondaire biotinylé ("anticorps de liaison", "link"). Celui-ci sert de liaison entre l'anticorps primaire et le conjugué streptavidine-phosphatase alcaline ("label AP"). Après une étape de lavage, ce conjugué est appliqué et lie sur le reste de biotine de l'anticorps de liaison. Après une autre étape de lavage, on démarre une réaction enzymatique avec la phosphatase alcaline en ajoutant une solution de substrat/chromogène, réaction au cours de laquelle se forme un précipité coloré, visible par microscope de lumière, sur le lieu de la liaison de l'anticorps primaire.

La coloration dépend du chromogène utilisé. Le chromogène Fast Red (contenu que dans le coffret AP008RED) forme sur le lieu de l'antigène cible un produit de réaction rouge. D'autres chromogènes appropriés sont Permanent AP-Red (= rose/rouge), néo-fuch sine (= rose/rouge) ou NBT (= bleu/noir, substrat ici BCIP).

Réactifs fournis

REF / Cat. No. AP008RED

8 ml	Blocking Solution	Reagent 1	(prêt à l'emploi)
8 ml	Biotinylated Secondary Antibody, polyvalent	Reagent 2	(prêt à l'emploi)
8 ml	Streptavidin-AP-Conjugate	Reagent 3	(prêt à l'emploi)
8 x 5 ml	Naphthol-Phosphate Buffer (substrat tampon)		
8	Fast Red-Tablets/comprimés (chromogène)		

REF / Cat. No. AP060

4 x 15 ml	Blocking Solution	Reagent 1	(prêt à l'emploi)
4 x 15 ml	Biotinylated Secondary Antibody, polyvalent	Reagent 2	(prêt à l'emploi)
4 x 15 ml	Streptavidin-AP-Conjugate	Reagent 3	(prêt à l'emploi)

REF / Cat. No. AP125

125 ml	Blocking Solution	Reagent 1	(prêt à l'emploi)
125 ml	Biotinylated Secondary Antibody, polyvalent	Reagent 2	(prêt à l'emploi)
125 ml	Streptavidin-AP-Conjugate	Reagent 3	(prêt à l'emploi)

REF / Cat. No. AP500

500 ml	Blocking Solution	Reagent 1	(prêt à l'emploi)
500 ml	Biotinylated Secondary Antibody, polyvalent	Reagent 2	(prêt à l'emploi)
500 ml	Streptavidin-AP-Conjugate	Reagent 3	(prêt à l'emploi)

Systèmes de substrat recommandés (s'ils ne sont pas déjà contenus dans le coffret):

<i>Permanent AP Red</i>	<i>Commande No.</i>	<i>ZUC001-125</i>	<i>1.250 Réactions</i>
	<i>Commande No.</i>	<i>ZUC001-500</i>	<i>5.000 Réactions</i>
<i>Fast Red Kit</i>	<i>Commande No.</i>	<i>RED055</i>	<i>550 Réactions</i>
	<i>Commande No.</i>	<i>RED125</i>	<i>1.250 Réactions</i>
	<i>Commande No.</i>	<i>RED500</i>	<i>5.000 Réactions</i>
<i>BCIP/NBT</i>	<i>Commande No.</i>	<i>K006</i>	<i>150 Réactions</i>

Matériels supplémentaires requis qui ne sont pas compris dans la fourniture

Tissus de contrôle positifs et négatifs

Xylène ou substituts de xylène appropriés

Ethanol, H₂O démin. ou dist.

Solution de tampon de lavage (Commande No. ZUC020)

Enzyme ou solution tampon pour le traitement des coupes (restauration de l'épitope)

Pink PAP Pen (Commande No. ZUC064)

Anticorps primaire (spécifique à l'utilisateur)

Tampon de dilution pour anticorps primaire (Commande No. ZUC025)

Réactifs de contrôle négatif

Substrat/chromogène

Solution pour la contre-coloration

Milieu de montage

Lamelles couvre-objets

Stockage et utilisation

Les solutions devraient être stockées à 2-8°C sans être diluées. Conserver les solutions à l'abri de la lumière. Ne pas les congeler. Les solutions livrées peuvent être conservées jusqu'à la date de péremption en cas de stockage à 2-8°C. Les solutions ne doivent pas être utilisées au-delà de la date de péremption. Les témoins positifs et négatifs doivent être employés parallèlement au matériau d'analyse. Si l'on observe une coloration inattendue ou des différences par rapport au résultat de coloration attendu, qui sont dues au réactif, veuillez contacter le fabricant ou votre distributeur sur place.

Mesures de précaution

Utilisation par du personnel spécialisé formé.

Porter un équipement de protection approprié afin d'éviter tout contact des réactifs avec les yeux, la peau ou les muqueuses. En cas de contact avec un des réactifs à un endroit sensible, rincer immédiatement avec des quantités importantes d'eau. Les agents de conservation ProClin 300 et l'azide de sodium (NaN₃) utilisé pour la stabilisation ne sont pas considérés comme une matière dangereuse dans la présente concentration. Des enrichissements en azide de sodium peuvent conduire à la formation d'azides métalliques hautement explosifs dans des tuyaux d'écoulement en plomb et en cuivre. Afin d'éviter de tels enrichissements en azide de sodium dans des tuyaux d'écoulement, il faut rincer avec beaucoup d'eau après l'élimination. La fiche de sécurité pour la substance pure est disponible sur demande.

Il faut éviter toute souillure microbienne des réactifs au risque, sinon, de voir apparaître une coloration non spécifique.

Préparation des réactifs

- Porter les réactifs à température ambiante avant utilisation.
- Déparaffiner et réhydrater les coupes en paraffine.
- Prétraitement (en option) par HIER (*Heat Induced Epitope Retrieval*) ou digestion enzymatique.
- Les coupes tissulaires doivent être couvertes entièrement avec différentes solutions afin d'éviter tout assèchement.
- Préparation de la solution de substrat-chromogène (valable pour AP008RED):
Mettre 1 comprimé (Fast Red Tablet) dans un flacon de tampon de substrat (Naphthol-Phosphate Buffer) et bien mélanger jusqu'à ce que le comprimé soit complètement décomposé. Utiliser la solution préparée immédiatement.

Protocole de coloration

1. Bloc de protéine (Blocking Solution, Reagent/Réactif 1) (*Cette étape est optionnelle*) **10 Min.**
2. Lavage avec un tampon de lavage **1 x 2 Min.**
3. Anticorps primaire (optimalement dilué) ou réactif de contrôle négatif **30-60 Min.**
4. Lavage avec un tampon de lavage **3 x 2 Min.**
5. Anticorps secondaire (Biotinylated Secondary Antibody, polyvalent, Reagent 2, jaune) **10-15 Min.**
6. Lavage avec un tampon de lavage **3 x 2 Min.**
7. Conjugué d'enzyme (Streptavidin-AP-Conjugate, Reagent 3, rouge) **10-15 Min.**
8. Lavage avec un tampon de lavage **3 x 2 Min.**
9. Fast Red, Permanent AP-Red, BCIP/NBT ou Néo-fuchsine
(Contrôle de l'intensité de coloration sous microscope recommandé) **10-20 Min.**
10. Arrêt de la réaction avec H₂O dist. dès que l'intensité de coloration désirée est atteinte
11. Contre-coloration et bleuissement
12. Montage comme suit: aqueux pour Fast Red, permanent pour Permanent AP Red, Néo-fuchsine ou BCIP/NBT

Contrôle de qualité

Pour une analyse précise, un témoin positif et un témoin négatif devraient être réalisés pour chaque série de coloration. Le témoin positif sert à vérifier le traitement correct de l'échantillon. Si le témoin négatif s'avère positif, cela indique une coloration non spécifique.

Résultats à attendre

Pendant la réaction entre le substrat et la phosphatase alcaline en présence du chromogène, il se forme sur le lieu de liaison de l'anticorps primaire un précipité coloré qui peut être analysé par microscope de lumière. La coloration dépend du chromogène utilisé.

Limites de la méthode

L'immunohistochimie est une méthode complexe au sein de laquelle sont combinées des méthodes de détection histologiques et immunologiques. Le traitement du tissu ou la manipulation des échantillons en amont de l'immunohistologie proprement dite peut conduire à des résultats imprécis si les directives n'ont pas été respectées (Nadji and Morales, 1983). L'activité de la phosphatase alcaline ou la teneur en biotine endogène peut provoquer des colorations non spécifiques. L'activité de la phosphatase alcaline endogène peut être bloquée par lévamisole. Cependant, le lévamisole ne bloque ni la forme intestinale ni placentaire de la phosphatase alcaline. Pour cette raison les tissus de cette origine sont à colorer par des systèmes de coloration à la peroxydase (par exemple HRP125). La coloration de fond par de la biotine endogène peut, si nécessaire, être minimisée par une étape de blocage avidine-biotine en amont.

Une contre-coloration insuffisante ou un montage incorrect peut influencer l'interprétation des résultats.

L'intensité colorée du produit final peut diminuer en particulier en cas d'incidence de la lumière.

Une trop longue incubation de la solution de blocage de protéine (Blocking Solution) peut diminuer l'intensité du signal. Nous recommandons, en outre, de laver ensuite la Blocking Solution et non pas, comme pour d'autres procédés, de la laisser s'écouler uniquement.

Pour obtenir une sensibilité élevée nous recommandons un pas double substrat/chromogène (2 x Fast Red, Permanent AP Red ou néo-fuchsine).

Zytemed Systems garantit que le produit remplira toutes les exigences indiquées et sera conservable jusqu'à la date de préemption, si les conditions de stockage et d'utilisation sont suivies. Nous ne pouvons pas offrir d'autres garanties.

Recherche d'erreurs/Élimination d'erreurs

En cas de colorations anormales, veuillez lire la notice explicative ou contacter le fabricant.

Raisons possibles pour un résultat négatif sur une coupe de contrôle en fait positive:

- Les réactifs n'ont pas été utilisés dans l'ordre correct.
- Solution de travail de chromogène/substrat était trop vieux.
- Décoloration par incompatibilité entre chromogène et milieu de montage.
- Antigène/épitope n'est pas suffisamment accessible pour l'anticorps primaire. Si vous réalisez un démasquage d'antigène (HIER) pour l'anticorps testé, prolongez celui-ci le cas échéant.
- Antigène/épitope n'est pas stable pour la méthode réalisée de fixation et/ou de prétraitement. Testez d'autres méthodes de fixation ou de prétraitement.

Raisons possibles pour des colorations faibles:

- Fixation insuffisante ou trop forte.
- Déparaffinage incomplet.
- Antigène/épitope n'est pas suffisamment accessible pour l'anticorps primaire. Si vous réalisez un démasquage d'antigène (HIER) pour l'anticorps testé ou prolongez celui-ci le cas échéant.
- La solution de blocage de protéine utilisée (Blocking Solution) émanant du coffret était trop longtemps sur la préparation et n'a pas été lavée suffisamment.
- Après le nettoyage, il reste trop de tampon de lavage sur les coupes; les réactifs suivants sont ainsi trop fortement dilués.
- Pour l'emploi d'un tampon de lavage à base de PBS: L'activité de la phosphatase alcaline du coffret de preuve est bloquée par beaucoup trop de tampon de lavage sur les coupes.
- Les temps d'incubation étaient trop courts ou l'anticorps primaire était trop fortement dilué.
- La solution de travail de chromogène substrat était trop vieille.

Raisons possibles pour des colorations de fond extrêmes:

- Déparaffinage incomplet.
- Adhésif inapproprié ou en trop grande quantité pour l'enduction des lamelles.
- Lavage pas suffisant. Les étapes de lavage après les incubations avec le conjugué d'enzyme et la solution de chromogène/substrat sont, en particulier, critiques.
- Le tissu est desséché pendant la procédure (en partie).
- Liaison non spécifique de l'anticorps primaire sur la préparation. Travaillez dans ce cas avec la solution de blocage de protéine (Blocking Solution) et diluez l'anticorps primaire dans un tampon de dilution approprié.
- Le temps d'incubation pour l'anticorps primaire était trop long ou l'anticorps primaire était trop fortement concentré.
- Liaison non spécifique de l'anticorps secondaire sur la biotine endogène dans la coupe tissulaire. Réalisez un bloc avidine-biotine avant l'incubation avec l'anticorps primaire.
- Le temps d'incubation pour la solution de travail de chromogène/substrat était trop long et la température de réaction était trop élevée (par ex. en cas de température élevée en laboratoire).
- Le substrat est transformé par la phosphatase alcaline endogène contenue dans le tissu. Cette activité indésirable peut être souvent bloquée par lévamisole (voir "Limite de la méthode").

Performance:

Zytomed Systems a fait des études sur la performance du coffret. Ce produit a été jugé comme approprié pour l'utilisation prévue.

Littérature

Elias JM "Immunohistopathology – A practical Approach to Diagnosis" ASCP Press 2003
Nadji M and Morales AR Ann N.Y. Acad Sci 420:134-9, 1983

30. Janvier 2014

Rev: A0114

Doc: DBF_AP008RED_060_125_500

Légende des symboles sur les étiquettes:

	Bestellnummer Catalog Number Reference du catalogue		Verwendbar bis Use By Utiliser jusque		Gebrauchsanweisung beachten Consult Instructions for use Consulter les instructions d'utilisation
	Chargenbezeichnung Batch Code Code du lot		Lagerungstemperatur Temperature Limitation Limites de température		Nur für Forschungszwecke For Research Use Only Pour la recherche uniquement
	In vitro Diagnostikum In Vitro Diagnostic Medical Device Dispositif médical de diagnostic in vitro		Achtung/Gefahr Warning/Danger Attention/Danger		Achtung Warning Attention
	Achtung/Gefahr Warning/Danger Attention/Danger		Gefahr Danger Danger		Achtung/Gefahr Warning/Danger Attention/Danger
					 Hersteller / Manufacturer / Fabricant Zytomed Systems GmbH Anhalterstraße 16 14163 Berlin, Germany Tel: (+49) 30-804 984 990 www.zytomed-systems.de