



ZytoChem-Plus HRP Kit, Broad Spectrum

REF / Cat. No.:	HRP008AEC	80 Réactions (avec AEC), 8 ml
	HRP008DAB	80 Réactions (avec DAB), 8 ml
	HRP060	600 Réactions, 60 ml
	HRP125	1250 Réactions, 125 ml
	HRP500	5000 Réactions, 500 ml

Mode d'emploi

Champs d'application

Les coffrets ZytoChem-Plus HRP 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 HRP 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 peroxydase du raifort (Horse Radish Peroxidase, HRP). 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 HRP, Broad Spectrum (spectre large), est polyvalent. C'est la raison pour laquelle il est possible de détecter des anticorps primaires mono- et polyclonaux à partir de la souris, du lapin, du rat et du cochon d'Indes avec les coffrets ZytoChem-Plus HRP, Broad Spectrum.

Principe de la méthode

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

La peroxydase endogène dans la coupe tissulaire, qui peut conduire ultérieurement à une coloration de fond non désirée, est inactivée par incubation de la préparation avec une solution H₂O₂ à 3% ("bloc peroxyde").

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-peroxydase du raifort ("label HRP"). 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 peroxydase en ajoutant un substrat/une solution 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 AEC (contenu que dans le coffret HRP008AEC) forme sur le lieu de l'antigène cible un produit de réaction rouge brun. DAB (contenu que dans le coffret HRP008DAB) forme un produit de réaction brun foncé.

Réactifs fournis

REF / Cat. No. HRP008AEC

8 mL	Peroxide Block		(prêt à l'emploi)
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-HRP-Conjugate	Reagent 3	(prêt à l'emploi)
7 x 5 mL	AEC Substrate Buffer (substrat tampon)		
3 mL	AEC Concentrate (chromogène)		

REF / Cat. No. HRP008DAB

8 mL	Peroxide Block		(prêt à l'emploi)
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-HRP-Conjugate	Reagent 3	(prêt à l'emploi)
7 x 5 mL	DAB Substrate Buffer (substrat tampon)		
3 mL	DAB Concentrate (chromogène)		

REF / Cat. No. HRP060

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-HRP-Conjugate	Reagent 3	(prêt à l'emploi)

REF / Cat. No. HRP125

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-HRP-Conjugate	Reagent 3	(prêt à l'emploi)

REF / Cat. No. HRP500

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-HRP-Conjugate	Reagent 3	(prêt à l'emploi)

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

<i>Permanent AEC Kit</i>	<i>Commande No. ZUC054-200</i>	<i>2000 Réactions</i>
<i>AEC Single Solution</i>	<i>Commande No. ZUC037-008</i>	<i>80 Réactions</i>
	<i>Commande No. ZUC037-125</i>	<i>1.250 Réactions</i>
<i>AEC Substrate Kit</i>	<i>Commande No. ZUC042-050</i>	<i>500 Réactions</i>
	<i>Commande No. ZUC042-500</i>	<i>5.000 Réactions</i>
<i>DAB Substrate Kit</i>	<i>Commande No. DAB057</i>	<i>500 Réactions</i>
	<i>Commande No. DAB530</i>	<i>5.000 Réactions</i>
<i>DAB High Contrast Kit</i>	<i>Commande No. DAB500 plus</i>	<i>500 Réactions</i>
	<i>Commande No. DAB5000 plus</i>	<i>5.000 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 dest.

Solution de tampon de lavage (Commande No. ZUC020)

Bloc peroxyde (ZUC019)

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

Les agents de conservation ProClin 300 et l'azide de sodium (NaN_3) sont utilisés pour la stabilisation. 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 est disponible sur demande.

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 AEC (valable pour HRP008AEC):
Mettre 2 gouttes (100 μL) de concentré AEC (AEC Concentrate) dans un flacon de tampon de substrat (AEC Substrate Buffer) et bien mélanger.
- Préparation de solution de substrat DAB (valable pour HRP008DAB):
Mettre 4 gouttes (200 μL) de concentré DAB (DAB Concentrate) dans un flacon de tampon de substrat (DAB Substrate Buffer) et bien mélanger.

Protocole de coloration

- | | |
|---|-------------------|
| 1. Bloc peroxyde (Peroxide Block ou solution H_2O_2 à 3 %) | 10 Min. |
| 2. Lavage avec un tampon de lavage | 1 x 2 Min. |
| 3. Bloc de protéine (Blocking Solution, Reagent 1) (<i>Optionnelle</i>) | 5 Min. |
| 4. Lavage avec un tampon de lavage | 1 x 2 Min. |
| 5. Anticorps primaire (optimalement dilué) ou réactif de contrôle négatif | 30-60 Min. |
| 6. Lavage avec un tampon de lavage | 3 x 2 Min. |
| 7. Anticorps secondaire
(Biotinylated Secondary Antibody, polyvalent, Reagent 2, jaune) | 10-15 Min. |
| 8. Lavage avec un tampon de lavage | 3 x 2 Min. |
| 9. Conjugué d'enzyme (Streptavidin-HRP Conjugate, Reagent 3, rouge) | 10-15 Min. |
| 10. Lavage avec un tampon de lavage | 3 x 2 Min. |
| 11. AEC ou DAB
(Contrôle de l'intensité de coloration sous microscope recommandé) | 5-15 Min. |
| 12. Arrêt de la réaction avec H_2O dest. dès que l'intensité de coloration désirée est atteinte | |
| 13. Contre-coloration et blanchissement | |
| 14. Montage comme suit: aqueux pour AEC, permanent pour DAB | |

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 peroxydase du raifort 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 peuvent conduire à des résultats imprécis si les directives n'ont pas été respectées (Nadji and Morales, 1983). L'activité de la peroxydase endogène ou la teneur en biotine endogène peut

provoquer des colorations non spécifiques. L'activité de la peroxydase peut être bloquée par H₂O₂. Le tissu qui contient l'antigène d'enveloppe du virus de l'hépatite B (HBsAg), peut provoquer des résultats erronément positifs en cas d'utilisation de systèmes de détection avec HRP (Horse radish peroxidase/ peroxydase du raifort sauvage) (Omata *et al*, 1980). 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.

Zytomed Systems garantit que le produit remplira toutes les exigences indiquées et sera conservable jusqu'à la date de péremption, 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.
- Chromogène/solution de travail du 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.
- Les temps d'incubation étaient trop courts ou l'anticorps primaire était trop fortement dilué.
- Chromogène/solution de travail du substrat était trop vieux.

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 le chromogène/la solution de travail de 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 peroxydase endogène contenue dans le tissu. La solution de blocage H₂O₂ utilisée n'était possiblement plus suffisamment active.

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

Omata M et al. Am J Clin Pathol 73(5): 626-32, 1980

12. Décembre 2013

Rev: A1213

Doc: DBF_HRP008AEC_DAB_060_125_500

Légende des symboles sur les étiquettes:

	Bestellnummer Catalog Number Référence 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		Hersteller / Manufacturer / Fabricant Zytomed Systems GmbH Anhaltinerstraße 16 14163 Berlin, Germany Tel: (+49) 30-804 984 990 www.zytomed-systems.de
	Achtung/Gefahr Warning/Danger Attention/Danger		Achtung Warning Attention		Gefahr Danger Danger