

Mitgelieferte Reagenzien

Eines der folgenden:

Kat. Nr.	Bezeichnung Reagenz	Format	Volumen (ml)/Flasche
HK057-5KE	AR-10 Solution	10X Konzentrat	100
HK081-5KE	Citra Plus Solution	Gebrauchsfertig	250
HK081-20KE	Citra Plus Solution	Gebrauchsfertig	1000
HK086-5K	Citra Solution	10X Konzentrat	100
HK086-9K	Citra Solution	10X Konzentrat	500
HK087-5KE	Citra Solution	Gebrauchsfertig	250
HK087-20KE	Citra Solution	Gebrauchsfertig	1000
HK584-5KE	EZ-DeWax™ Solution*	Konzentrat	500

Antigen Retrieval ist patentrechtlich geschützt durch folgende Patente der Firma BioGenex: US-Patent Nr. 5,244,787, Nr. 5,578,452, Nr. 6,451,551; europäisches Patent Nr. 0607422 und japanisches Patent Nr. 3108099.

*US-Patent Nr. 6,451,551 und Nr. 6,632,598.

Benötigte Materialien (nicht im Lieferumfang)

Mikrowellenherd, Objektträger-Gestell und Behälter.

Microwave Pressure Cooker [®], *Kat. Nr. 62104, Nordic Ware* [®], *Minneapolis,MN;*

BioGenex Kat. Nr. NWO01-PC (Optional).

Lagerung und Handhabung

Alle Reagenzien bei 2–8 °C lagern. Nicht nach dem auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum verwenden.

Probenvorbereitung

Die geeignete Fixierung spielt eine wichtige Rolle bei der Konservierung der Gewebestruktur. Das Antigen-Wiederherstellungsprotokoll wird zur Verwendung bei Geweben empfohlen, die nur in Formalin fixiert wurden. Die fixierten Schnitte müssen korrekt in Paraffin eingebettet sein. Gewebeschnitte mit einer Dicke von 4–5 Mikron durchführen.

Vorsichtsmaßnahmen

HK511-YOKE, HK512-YOKE, HK513-YOKE, HK584-5KE



Carc 3;R40 = Verdacht auf krebserzeugende Wirkung.

S36/37; S60 = Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe und Schutzkleidung tragen.Dieses Produkt und sein Behälter sind als gefährlicher Abfall zu entsorgen.

Zubereitung von Arbeitslösungen

Die “Antigen Retrieval” Lösung ist in einem ready to use oder in einem konzentriertem Format verfügbar. Das 10-fach konzentrierte Format muss mit de-ionisiertem Wasser (ein Teil der konzentrierten Antigen Retrieval Lösung wird mit neun Teilen de-ionisiertem Wasser gemischt) 10-fach verdünnt werden. Die EZ-DeWax™ Lösung ist konzentriert und benötigt eine Rekonstituierung in 500 ml Reagenzien-Alkohol.

- AR1, AR2 und AR3 werden wie folgt vorbereitet:
- Schütteln Sie die Flasche heftig um die Komponenten des Konzentrates vollständig durchzumischen (die Lösung kann sich über die Zeit in die einzelnen Phasen separieren).
- Füllen Sie den gesamten Inhalt der Flasche in den entsprechende AR-Ballon.
- Fügen Sie 225 ml Alkohol histologischen Gütegrades in den Ballon bei (Anmerkung: AR Lösungen müssen in Alkohol histologischen Gütegrades rekonstituiert werden. Zum Beispiel:
- Fisher Alkohol Reagenzien-Gütegrad, Cat. No. A962, oder Sigma Alkohol Reagenzien-Gütegrad sind speziell denaturiert für den histologischen Gebrauch und ebenfalls spezifisch für den Einsatz in Gewebe-Verarbeitungssystemen gefiltert).
- Fügen Sie 4950 ml de-ionisiertes Wasser in den Ballon bei.
- Schliessen Sie den Ballon fest zu und schütteln Sie ihn mehrerer Sekunden lang, um die Lösung vollständig zu mischen.
- Lagern Sie die Lösung mit fest geschlossenem Deckel. Die Arbeitslösung kann bei Raumtemperatur gelagert und bis zu einem Monat lang verwendet werden.

BioGenex Handbuch-Protokoll

Standardprotokoll

- Objektträger in deionisiertem Wasser abspülen. Objektträger in einen Kunststoff-Färbehalter** stellen, wobei alle leeren Einschübe mit blanken Objektträgern gefüllt werden. Den Halter in ein Objektträgerbad mit einer ausreichenden Menge der Antigen Retrieval Lösung zur Bedeckung des Gewebes auf den Objektträgern stellen.
- Den Herd auf hohe Leistung (500–1000 Watt) einstellen und die Lösung beobachten, bis es zu einem schnellen Aufkochen kommt, dann den Herd ausschalten. (Hinweis: Es dauert normalerweise 2–4 Minuten bis zum Aufkochen.) Die benötigte Zeit kann jedoch beträchtlich variieren, abhängig von mehreren Faktoren wie beispielsweise der Anfangstemperatur der Wiederherstellungslösung, der Wattzahl des Mikrowellenherds und dem Alter des Herds (es ist sehr wichtig, dass für jeden Durchlauf ein schnelles Aufkochen erreicht wird, bevor mit dem nächsten Schritt fortgefahren wird)
- Die Herdleistung auf etwa 200 W einstellen und 10 bis 15 Minuten auf köcheln lassen. (Diese Einstellung sollte notiert und für diesen Schritt bei allen nachfolgenden Durchläufen für den gleichen Antikörper verwendet werden. Jeder Antikörper sollte auf die optimale Zeit für diesen Schritt getestet werden.)
- Das Objektträgerbad aus dem Mikrowellenherd nehmen. Die Objektträger 20–30 Minuten auf Zimmertemperatur abkühlen lassen. Mit mehrfach gewechselttem deionisiertem Wasser abspülen. Die Objektträger in 1X PBS geben und mit dem Immunfärbeverfahren weitermachen.

Alternative Methode: Microwave Pressure Cooker Protokoll

Die alternative Methode verwendet einen Druckkochtopf im Inneren des Mikrowellenherds. Der von uns empfohlene Druckkochtopf ist über Nordic Ware[®] erhältlich oder kann bequem über BioGenex bezogen werden*

- Objektträger in einen Objektträgerhalter** stellen und alle leeren Einschübe mit blanken Objektträgern füllen. Den Halter in ein Objektträgerbad mit 250 ml Antigen Retrieval Lösung in Arbeitsstärke geben.

- Einen Kunststoff-Druckkochtopf mit 600 ml destilliertem Wasser füllen. Bis zu drei Bäder können Seite an Seite in den Druckkochtopf gestellt werden. Den Druckkochtopf entsprechend den Herstelleranweisungen abdecken.
- Den Druckkochtopf in die Mitte des Mikrowellenherds stellen und diesen für etwa 15 Minuten auf hohe Leistung (500–1000 Watt) einstellen, bis der Kochtopf vollständig unter Druck steht.
- Die Mikrowellenleistung auf 300–350 Watt reduzieren (40 % Leistung für 800-Watt-Herde) und die Lösung 15 Minuten köcheln lassen. Den Druckkochtopf dann aus dem Mikrowellenherd nehmen und die Abdeckung vorsichtig entsprechend den Herstelleranweisungen öffnen. Die Objektträger im Kochtopf 20 Minuten abkühlen lassen und dann mit der Immunfärbung weitermachen.

Qualitätskontrolle

Ein positiver Kontroll-Objektträger, der mit den gleichen Antigen-Wiederherstellungsbedingungen wie die Zielgewebe behandelt wurde, sollte bei jedem Experiment mitlaufen.

Dieses Produkt wurde durch ausgedehnte Tests an den folgenden Geweben überprüft: Magen, Niere, Leber und Haut.

Geeignete Kontroll-Objektträger mit und ohne Antigen-Wiederherstellung mitlaufen lassen. Die Antigen-Wiederherstellung sollte das Signal mit geeignetem Kontroll-Antikörper verstärken.

Fehlerbehebung

- Ein Überkochen der Lösung vermeiden, da dies dazu führen kann, dass sich das Gewebe vom Objektträger ablöst oder austrocknet.
- Einige Gewebe neigen eher dazu, sich während der Antigen-Wiederherstellung von den Objektträgern abzulösen (insbesondere Fettgewebe). Falls dies auftritt, kann es erforderlich sein, die Antigen Retrieval Lösung vor Zugabe vor Objektträger zum Kochen zu bringen und dann 3–5 Minuten leicht köcheln zu lasen. Dann 20–30 Minuten auf Zimmertemperatur abkühlen, bevor mit der Immunohistochemie weitergemacht wird.
- Eine unspezifische Färbung in der Negativkontrolle kann durch Exposition von endogenem Biotin verursacht werden. Eine übermäßige Wiederherstellung kann gelegentlich dazu führen, dass das Gewebe wie gefrorenes Gewebe reagiert. Das macht das Nachweissystem zu stark oder den Antikörper zu konzentriert. Eine weitere Titration kann erforderlich sein. Das Einbeziehen eines zusätzlichen Avidin-Biotin-Blocks sollte eine Anfärbung des exponierten Biotins verhindern.
- Nach der Antigen-Wiederherstellung können die Objektträger falls erforderlich über Nacht in PBS bei 4 °C gelagert werden. Das kann jedoch bei einigen Geweben zur Ablösung führen und sollte möglichst vermieden werden.
- Wenn die positive Kontrolle ein optimales Signal gibt, die Negativkontrolle keinen Hintergrund zeigt und der Test-Objektträger ein negatives oder schwaches Signal gibt, wurde möglicherweise ein anderes Fixiermittel verwendet. Um bei Gewebeschnitten, die mit einem anderen Mittel fixiert wurden, das bestmögliche Signal zu erhalten, wird eine Optimierung der Antigen-Wiederherstellungsbedingungen empfohlen.
- Die Informationen über Färbemuster und -intensität bei anderen Antikörpern sind den entsprechenden Packungsbeilagen von Antikörpern und Nachweissystemen zu entnehmen.

Erwartete Ergebnisse

Die Antigen-Wiederherstellung kann eine deutlich verbesserte Anfärbung einer breiten Palette von monoklonalen und polyklonalen Antikörpern bewirken. Dies hilft, eine falsch negative Anfärbung von überfixiertem Gewebe auszugleichen, die Palette der verwendbaren Antikörper zu vergrößern und die Brauchbarkeit archivierter Gewebe zu steigern. Die optimierte Antigen-Wiederherstellung sollte das Signal/Rauch-Verhältnis in der Immunohistochemie verbessern.

Einschränkungen des Verfahrens

Das Antigen-Wiederherstellungsprotokoll wird *nur für Formalin-fixierte* Gewebe empfohlen. Andere Fixative oder Fixierverfahren können möglicherweise nicht vergleichbare Resultate ergeben. Die Interpretation der Färbungsergebnisse obliegt der alleinigen Verantwortung des Anwenders.

Leistungsmerkale

BioGenex hat Untersuchungen zur Beurteilung der Leistungsfähigkeit all seiner Antigen-Wiederherstellungsreagenzien unter Verwendung verschiedener BioGenex Antikörper und Nachweissysteme durchgeführt. BioGenex Antigen-Wiederherstellungsreagenzien haben reproduzierbare und konsistente Ergebnisse gezeigt, bei Verwendung innerhalb eines einzigen Durchlaufs, bei verschiedenen Durchläufen, mit verschiedenen Chargen und, falls zutreffend, auch beim Vergleich zwischen manuellen und automatisierten Durchläufen. Die Produkte wurden für die auf den Etiketten angegebenen Zeiträume als stabil bestimmt, entweder mit Standard-Echtzeit- oder beschleunigten Testmethoden. BioGenex sichert die Produktqualität durch 100%ige Qualitätskontrolle für alle freigegebenen Produkte und durch Überwachungsprogramme.

ESPANOL, SPANISH

Uso previsto

Las soluciones de recuperación de antígenos son para uso diagnóstico *in vitro*, para recuperar la antigenicidad del tejido fijado con formol y embebido en parafina.

Resumen y explicación

La técnica de Recuperación del antígeno¹ es un nuevo método para el rescate de antígeno en un tejido fijado con formol y embebido en parafina. Consiste en calentar los cortes en un horno microondas en presencia de una solución de recuperación del antígeno. La calidad del resultado de la tinción depende en gran medida de que se siga estrictamente el protocolo de recuperación del antígeno. Si la recuperación de los antígenos es incompleta, la tinción es clara y puede ser alta en el fondo. El usuario que siga el protocolo estándar que se expone en el reverso de esta hoja verá una tinción nítida y transparente del núcleo con un fondo escaso o nulo.

Principios del procedimiento

La fijación de los tejidos con formol induce una reticulación proteica que ayuda a mantener la morfología celular al inactivar las enzimas digestivas y conservar el citoesqueleto. Al mismo tiempo, puede provocar cambios de conformación en los epitopos. Con ello, se puede perder la reactividad ante un anticuerpo específico de ese antígeno. El tratamiento de alta energía de tales proteínas en un pH adecuado restaura la estructura de los epitopos y, en consecuencia, se recupera la reactividad del anticuerpo hacia el antígeno diana. Este proceso se define como “recuperación del antígeno”. Shi y cols. sugirieron en 1991 que la recuperación del antígeno debilita o rompe la reticulación inducida por formol. Con ello se potencia la penetración de los anticuerpos y la accesibilidad de los epitopos.

Reactivos suministrados

Uno de los siguientes:

Nº de ref.	Descripción del reactivo	Formato	Volumen (ml)/frasco
HK057-5KE	Solución AR-10	Concentrado 10X	100

HK081-5KE	Citra Plus Solution	Listo para usar	250
HK081-20KE	Citra Plus Solution	Listo para usar	1000
HK086-5K	Citra Solution	Concentrado 10X	100
HK086-9K	Citra Solution	Concentrado 10X	500
HK087-5KE	Citra Solution	Listo para usar	250
HK087-20KE	Citra Solution	Listo para usar	1000
HK584-5KE	EZ-DeWax™ Solution	Concentrado	500

Reactivos necesarios pero no suministrados

Homo microondas, gradilla y recipientes para portaobjetos.

Microwave Pressure Cooker [®], *Nº de ref. 62104, Nordic Ware* [®], *Minneapolis,MN;*

BioGenex Nº de ref. NWO01-PC (Opcional).

Almacenamiento y manipulación

Almacenar todos los reactivos a 2-8 °C. No usar después de las fechas de caducidad que se indican en las etiquetas de los reactivos.

Preparación de la muestra

La fijación apropiada es primordial en la conservación de la estructura del tejido. Se recomienda usar el protocolo de recuperación en tejidos que se han fijado sólo con formol. Comprobar que los cortes estén correctamente embebidos en parafina. Cortar secciones de tejido de 4-5 micras.

Precauciones

HK511-YOKE, HK512-YOKE, HK513-YOKE, HK584-5KE



Carc 3;R40 = Posibles efectos cancerígenos.

S36/37; S60 = Úsense indumentaria y guantes de protección adecuados.Elimínse el producto y su recipiente como residuos peligrosos.

Preparación de las soluciones de trabajo

La Solución de Recuperación de Antígenos (Antigen Retrieval Solution) está disponible en dos formatos: lista para usar o concentrada. El formato con una concentración de 10X tiene que diluirse diez veces con agua desionizada (mezcle una parte de Solución concentrada de Recuperación de Antígenos con nueve partes de agua desionizada).

La solución EZ-DeWax(tm) es concentrada y tiene que reconstituirse en 500ml de alcohol reactivo.

- Para AR1, AR2 y AR3, realice los siguientes pasos:
- Agite bien la botella para mezclar correctamente los componentes del concentrado (es posible que, con el tiempo, la solución se haya separado en sus diferentes fases).
- Vierta todo el contenido de la botella en el correspondiente bidón de AR.
- Añada 225 ml de alcohol para uso histológico al bidón. (Nota: las soluciones AR deben reconstituirse con alcohol para uso histológico. Por ejemplo, los productos Fisher Reagent Grade Alcohol, Nº Cat. A962, y Sigma Reagent Alcohol, Nº Cat. R8382, están especialmente desnaturalizados para uso histológico y, además, se han filtrado específicamente para su uso en procesadores de tejido).
- Añada 4950 ml de agua desionizada all bidón. Tape bien el bidón y agítelo durante algunos segundos, hasta que la solución esté completamente mezclada.
- Antes de almacenar el bidón, asegúrese de que está bien tapado. La solución de trabajo puede almacenarse y utilizarse a temperatura ambiente, y como máximo en el plazo de 1 mes.

Protocolo manual de BioGenex

Protocolo estándar

- Aclare los portaobjetos con agua desionizada. Coloque los portaobjetos en un soporte de tinción de plástico**, llenando las ranuras vacías con portaobjetos en blanco. Coloque el soporte en un baño de portaobjetos que contenga el volumen suficiente de solución de recuperación del antígeno para cubrir adecuadamente los tejidos en los portaobjetos.
- Encienda el horno (500-1000 vatios) y vigile de cerca la solución hasta que comience un rápido hervor, y después apague el horno. (Nota: Habitualmente se tarda 2-4 minutos para alcanzar el hervor. No obstante, la cantidad de tiempo requerida puede variar significativamente dependiendo de varios factores, como la temperatura inicial de la solución de recuperación, el voltaje del horno microondas y la antigüedad del horno (es muy importante que se alcance el hervor rápido en cada serie antes de continuar con el paso siguiente).
- Fije la potencia del horno aproximadamente en 200 W y déjelo hervir durante 10-15 minutos a fuego lento. (Esta configuración se anotará y se usará en este paso en todas las series sucesivas para el mismo anticuerpo. En cada anticuerpo se deberá comprobar el tiempo óptimo de este paso).
- Extraiga el baño de portaobjetos del horno microondas. Deje enfriar los portaobjetos durante 20-30 minutos a temperatura ambiente. Aclárelos con varios cambios de agua desionizada. Coloque los portaobjetos en PBS 1X y continúe con el procedimiento de inmunotinción.

Método alternativo: Protocolo de Microwave Pressure Cooker

El método alternativo usa una olla a presión dentro del horno microondas. La olla a presión recomendada es la suministrada por Nordic Ware[®], o bien la puede adquirir en BioGenex para su comodidad[®].

- Coloque los portaobjetos en un soporte**, llenando las ranuras vacías con portaobjetos en blanco. Ponga el soporte en el baño de portaobjetos con 250 ml de Antigen Retrieval Solution a la concentración de trabajo.
- Llene la olla a presión de plástico con 600 ml de agua destilada. Se pueden colocar hasta tres baños lado a lado en la olla a presión. Cubra la olla a presión siguiendo las instrucciones del fabricante.
- Ponga la olla a presión en el centro del horno microondas y enciéndalo a una potencia alta (500-1000 vatios) durante aproximadamente 15 minutos, hasta que se alcance la máxima presión en la olla.
- Reduzca la potencia del microondas a 300-350 vatios (40% de la potencia para los hornos de 800 vatios) y deje que la solución hierva a fuego lento durante 15 minutos. Extraiga a continuación la olla a presión del microondas y abra la tapa despacio siguiendo las instrucciones del fabricante. Deje enfriar los portaobjetos durante 20 minutos dentro de la olla y después continúe con el procedimiento de inmunotinción.

Control de calidad

En cada experimento se debe incluir un portaobjetos de control positivo que se haya tratado con las mismas condiciones de recuperación del antígeno que los tejidos de interés.

Este producto se ha validado mediante un estudio exhaustivo en los siguientes tejidos: estómago, riñón, hígado y piel.

Procese los portaobjetos de control adecuados, con y sin la recuperación del antígeno. La recuperación del antígeno debe mejorar la señal con un anticuerpo de control apropiado.

Resolución de problemas

- No deje hervir la solución en exceso, ya que el tejido podría desprenderse del portaobjetos o secarse.
- Algunos tejidos son más propensos a desprenderse del portaobjetos durante la recuperación del antígeno (en particular, el tejido graso). Si esto ocurre, podría ser necesario llevar a ebullición la solución de recuperación del antígeno antes de añadir los portaobjetos, dejándolos hervir después suavemente durante 3-5 minutos. Seguidamente, enfrielos a temperatura ambiente durante 20-30 minutos antes de continuar con la inmunohistoquímica.
- La tinción inespecífica del control negativo puede deberse a la exposición de la biotina endógena. Un exceso de recuperación puede hacer que el tejido actúe como un tejido congelado. Con ello se consigue que el sistema de detección sea demasiado fuerte o que el anticuerpo esté demasiado concentrado. Puede ser necesaria una nueva valoración. La inclusión de un bloqueo adicional de avidina-biotina evitará la tinción de la biotina expuesta.
- Después de recuperar el antígeno, los portaobjetos se pueden almacenar toda la noche en PBS a 4 °C, si es necesario. Sin embargo, con ello se puede conseguir que se desprendan algunos tejidos, por lo que se evitará hacerlo.
- Se deberá usar un fijador diferente si el control positivo da una señal óptima, el control negativo no muestra tinción en el fondo, y el portaobjetos de prueba da una señal negativa o débil. Se recomienda optimizar las condiciones de recuperación del antígeno para obtener la mejor señal en los cortes de tejido fijados con un fijador diferente.
- Consulte en los prospectos correspondientes del anticuerpo y del sistema de detección el patrón y la intensidad con distintos anticuerpos.

Resultados esperados

La recuperación del antígeno puede producir una importante mejora de la tinción con varios anticuerpos monoclonales y policlonales. Con ello se evita la tinción negativa falsa del tejido fijado en exceso, y aumenta el número de anticuerpos que se pueden usar y la utilidad del tejido archivado. La recuperación optimizada del antígeno debe mejorar la relación señal-ruido en inmunohistoquímica.

Limitaciones del procedimiento

Se recomienda usar el protocolo de recuperación del antígeno *únicamente con tejidos fijados con formol*. Los resultados obtenidos con otros fijadores o procedimientos de fijación pueden no ser comparables. La interpretación del resultado de la tinción es únicamente responsabilidad del usuario.

Características de funcionamiento

BioGenex ha realizado estudios para evaluar el funcionamiento de todos los agentes de recuperación del antígeno usando varios anticuerpos y sistemas de detección de BioGenex. Los reactivos de recuperación de antígenos BioGenex han mostrado resultados reproducibles y coherentes cuando se usan en un solo procedimiento, entre procedimientos, entre lotes y, siempre que proceda, entre los procedimientos manuales y automatizados. Se ha determinado que los productos son estables durante los períodos que se especifican en las etiquetas, ya sea por métodos de tiempo real estándar o en condiciones aceleradas. BioGenex garantiza la calidad del producto mediante un control de calidad al 100% de todos los productos comercializados y mediante programas de seguimiento.

Bibliography

- Shi, S.R., et al. Antigen Retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. J Histochem Cytochem 39:741, 1991.
- Gown, A.M., et al. Microwave-based antigenic unmasking: a revolutionary new technique for routine immunohistochemistry. Appl. Immunohistochem 1:256-266, 1993.
- Shi, S.R., et al. Antigen Retrieval technique: a novel approach to immunohistochemistry on routinely processed tissue sections. Cell Vision 2:6-22, 1995.
- Shi, S.R., et al. Antigen Retrieval immunohistochemistry under the influence of pH using monoclonal antibodies. J Histochem Cytochem 43:193-201, 1995.

CE RE P	Representative in the European Community <p>Mandatario nella Comunità Europea</p> Bevollmächtigter in der Europäischen Gemeinschaft Representante autorizado en la Comunidad Europea	IVD	In Vitro Diagnostic Medical Device <p>Dispositivo medico-diagnostico in vitro</p> In Vitro Diagnostikum Producto sanitario para diagnóstico in vitro
	Cons ult Instructions for use <p>Consultare le istruzioni per l'uso</p> Gebrauchsanweisung beachten Consulte las instrucciones de uso		Temperature Limitation <p>Limiti di temperatura</p> Zulässiger Temperaturbereich Limite de temperatura
	Manufacturer <p>Fabricante</p> Hersteller Fabricante		