

**REAGENSBESCHRIJVING****Kloon** MCM2 26H6.19, MCM2 27C5.6, TOP2A SWT3D1**Ig-klasse** IgG₁**Immunogeen** Recombinant Humaan MCM2 en TOP2A**1. BEOOGD GEBRUIK**

Voor in-vitrodiagnostiek.

Voor gebruik met manuele kleuring of geautomatiseerde kleuring met behulp van de Dako Envision[®]+ detectiechemie.

De ProEx[™] C immunohistochemische test is bedoeld voor de kwalitatieve evaluatie van afwijkende S-fase-inductie van in formaline gefixeerde en in paraffine ingebedde weefselbiopsieën. De resultaten moeten door een bevoegde deskundige worden geïnterpreteerd, rekening houdend met de klinische anamnese van de patiënt en andere diagnostische tests.

2. SAMENVATTING EN UITLEG

Minichromosome maintenance (MCM) en topo-isomerase II alfa (TOP2A) eiwitten spelen een belangrijke regulerende rol bij eukaryotische DNA-replicatie. De HPV-oncoproteïnen E6 en E7 bijvoorbeeld, slaan essentiële controlepunten uit de celcyclus over, hetgeen resulteert in een verlengde en afwijkende cyclus van de S-fase-inductie. Tijdens de transcriptionele activering van de afwijkende celcyclus nemen de niveaus van MCM2- en TOP2A-eiwitten in de prolifererende cellen toe.

Bij zowel MCM2- als TOP2A-eiwitten is overexpressie aangetoond in een aantal verschillende dysplastische en maligne weefsels waaronder cervicale neoplasie¹⁻⁵. De overexpressie van deze eiwitten in morfologisch abnormale cellen, zoals aangetoond door een matig-tot-intens nucleair kleuringspatroon met behulp van immunohistochemische (IHC) technieken, wijst op de aanwezigheid van afwijkende S-fase-inductie.

3. GELEVERD REAGENS

ProEx[™] C-antilichaamreagens bevat muis-monoklonale anti-MCM2 en anti-TOP2A, gezuiverd uit weefselcultuursupernatans en verdund in gebufferde zoutoplossing met proteïn stabilisatoren en 0,09% natriumazide.

4. PRINCIPES VAN DE PROCEDURE

In formaline gefixeerde en in paraffine ingebedde weefselmonsters worden geprepareerd, op glazen objectglaasjes geplaatst en gedeparaffineerd. De geprepareerde monsters worden voorbehandeld met een buffer om antigene gebieden bloot te stellen. Er worden blokkeermiddelen toegevoegd om achtergrondkleuring veroorzaakt door endogene peroxidase tot een minimum te beperken. Het monster wordt vervolgens geïncubeerd met het ProEx[™] C-antilichaamreagens. Toevoeging van een aan enzym gekoppeld chromogeensysteem resulteert in de vorming van een zichtbaar chromogeenproduct in de antigeen-antilichaam bindende gebieden. Op het monster wordt vervolgens achtergrondkleuring toegepast met hematoxyline en op het objectglaasje wordt een dekglasje geplaatst. De resultaten worden geïnterpreteerd door een getraind deskundige met behulp van een lichtmicroscop.

ProEx[™] C immunohistochemische test kan worden gebruikt voor zowel handmatige als geautomatiseerde kleuring.

5. VEREISTE MAAR NIET BIJGELEVERDE MATERIALEN EN REAGENTIA (voor handmatige procedure)

- EDTA 5X – Cat #CB9172 (BioCare)
- EnVision[®]+ Kit – Cat # K4007 (Dako)
- Mayer's hematoxyline – Cat # S3309 (Dako)
- Wasbuffer 10X – Cat # S3006 (Dako)
- Universele muis-negatieve controle – Cat # N1698 (Dako)
- Hogedrukpan
- Glazen objectglaasjes (SuperFrost[®] Plus of gelijkwaardig)
- Preparatiemedium (ShurMount[®] of gelijkwaardig)
- Pipetten en pipettips (voor volumeafgifte van 20 , 200 en 1000)
- Timer (met mogelijkheid voor intervallen van 1-60 minuten)
- Gedemineraliseerd water
- Ethanol 95%, 100%
- Glazen dekglasjes
- Markeerstift voor het laboratorium
- 10 L fles (Nalgene[®] of gelijkwaardig)
- Steriele wegwerpflessen
- Objectglaasjesdroger

- Objectglaasjesrek met kleuringschaaltjes
- Xyleen of xyleenvervangers
- Lichtmicroscop (10x, 20x (optioneel), 40x objectieven)

6. VOORZORGSMAATREGELEN**6.1. Voor in-vitrodiagnostiek.**

6.2. Het reinigen van objectglaasjes met gebruik van xyleen moet gebeuren onder een goedgekeurde afzuigkap voor giftige gassen.

6.3. DAB (3,3'-diaminobenzidine) is geclassificeerd als vermoedelijk carcinogeen. Vermijd lichamelijk contact en langdurige of herhaalde blootstelling. Gebruik onder een goedgekeurde afzuigkap voor giftige gassen.

6.4. Het ProEx[™] C-antilichaamreagens bevat natriumazide (NaN₃), een chemische stof die in zuivere vorm uiterst giftig is. Hoewel natriumazide in productconcentraties niet wordt geclassificeerd als gevaarlijk, kan het toch reageren met loden en koperen leidingen, waarbij uiterst explosieve metaalaziden worden gevormd. Bij het afvoeren spoelen met ruime hoeveelheden water om ophoping van metaalaziden in de leidingen te voorkomen.

6.5. Monsters en alle aan monsters blootgestelde materialen dienen te worden behandeld als potentiële overdragers van infecties en met inachtneming van de juiste voorzorgsmaatregelen te worden verwijderd. Reagentia nooit met de mond pipetteren en contact van reagentia en monsters met de huid en slijmvliezen vermijden. Indien reagentia in contact komen met gevoelige plekken op het lichaam, dient u deze met een ruime hoeveelheid water te wassen.

6.6. Beperk microbiële verontreiniging van reagentia tot een minimum om niet-specifieke kleuring te vermijden.

6.7. Andere incubatietijden, -temperaturen of -methoden dan vermeld kunnen leiden tot onjuiste resultaten.

6.8. Gebruik het ProEx[™] C-antilichaamreagens niet na de uiterste gebruiksdatum zoals op de verpakking vermeld staat. Als reagentia bewaard worden onder andere omstandigheden dan vermeld in de productbijsluiters, moeten de omstandigheden door de gebruiker worden gecontroleerd.

6.9. Draag de juiste beschermende uitrusting om contact van reagentia met ogen en huid te vermijden. Zie het veiligheidsinformatieblad voor verdere informatie.

7. INSTRUCIES VOOR GEBRUIK**7.1. Voorbereiding van het monster**

7.1.1. Snijd coupes van 4 uit het weefselblokje en plaats de coupes op SuperFrost[®] Plus glazen objectglaasjes.

7.1.2. Voorzie de objectglaasjes van een etiket.

7.1.3. Laat de objectglaasjes gedurende 20 minuten drogen in een heteluchtoven.

7.2. Reagensvoorbereiding

7.2.1. 1X wasbuffer, 10 L

7.2.1.1. Meng 9 liter gedemineraliseerd H₂O met 1 liter 10X wasbuffer.

7.2.1.2. Sluit af en meng door een paar keer om te keren.

7.2.1.3. Voorzie de fles van een etiket met een gebruiksdatum van 5 dagen vanaf de bereidingsdatum.

7.2.1.4. Bewaar bij kamertemperatuur (20-25 °C).

7.2.2. 1X EDTA (dagelijks vers klaarmaken)

7.2.2.1. Voeg 40 ml 5X EDTA toe aan een schone beker van 250 ml.

7.2.2.2. Voeg 160 ml gedemineraliseerd H₂O toe.

7.2.2.3. Meng door voorzichtig te roeren.

7.2.3. Hematoxyline (dagelijks vers klaarmaken)

7.2.3.1. Vul een reageerbuisje van 25 ml met 20 ml gedestilleerd H₂O.

7.2.3.2. Voeg 1 ml Mayer's hematoxyline toe.

7.2.3.3. Sluit het reageerbuisje af en meng door een paar keer om te keren.

8. KLEURINGSPROTOCOL (handmatig of geautomatiseerd)**8.1. Opmerkingen kleuringsprocedure**

8.1.1. Dit protocol kan worden gebruikt voor handmatige kleuring of geautomatiseerde kleuring met behulp van de Dako Envision[®]+ detectiechemie.

8.1.2. Alle reagentia dienen voorafgaand aan immunokleuring op kamertemperatuur (20-25 °C) te worden gebracht.

8.1.3. Alle incubaties moeten bij kamertemperatuur worden uitgevoerd, tenzij anders vermeld.

8.1.4. Laat de preparaten tijdens de kleuringsprocedure niet uitdrogen. Uitgedroogde preparaten kunnen een verhoogde niet-specifieke kleuring

vertonen. Objectglasjes dienen in een bevochtigingskamer te worden geplaatst voor langdurige incubaties.

8.2. Epitooptversterking

- 8.2.1. Deparaffineer de preparaten in xyleen, in 3 wisselbeurten (van elk vijf minuten), gevolgd door 100% alcohol, in 3 wisselbeurten (van elk vijf minuten).
- 8.2.2. Rehydrateer de preparaten door ze te spoelen in gedemineraliseerd H₂O.
- 8.2.3. Dompel de objectglasjes in bereide 1X EDTA-bufteroplossing en plaats de houder in een hogedrukpan. Verhit de objectglasjes in de hogedrukpan gedurende 30 seconden.
- 8.2.4. Laat de objectglasjes na het verstrijken van de verhittingstijd nog 10 minuten in de buffer in de hogedrukpan afkoelen.
- 8.2.5. Spoel de objectglasjes af met gedemineraliseerd H₂O en breng ze over naar een schone Coplin jar met 1X wasbuffer.

8.3. Peroxidase blokkeerreagens

- 8.3.1. Tik overmatige wasbuffer af.
- 8.3.2. Laad de objectglasjes in een voorbereide bevochtigingskamer (gevuld met met water bevochtigde keukenrol of gaas).
- 8.3.3. Gebruik 200 µl peroxidase blokkeerreagens om de weefselcoupe te bedekken.
- 8.3.4. Incubeer gedurende 5 minuten (+1 minuut).
- 8.3.5. Spoel de objectglasjes in 1X wasbuffer, in 3 wisselbeurten van elk 2 minuten.

8.4. Primaire antilichaamreagens

- 8.4.1. Tik overmatige wasbuffer af.
- 8.4.2. Laad de objectglasjes in de voorbereide bevochtigingskamer (gevuld met met water bevochtigde keukenrol of gaas).
- 8.4.3. Gebruik 200 µl ProEx™ C-antilichaamreagens om de weefselcoupe volledig te bedekken.
- 8.4.4. Incubeer gedurende 40 minuten bij kamertemperatuur (20-25 °C).
- 8.4.5. Spoel elke objectglaasje afzonderlijk af met wasbuffer met behulp van een wasfles (richt de stroom niet rechtstreeks op de weefselcoupe).
- 8.4.6. Spoel de objectglasjes in wasbuffer, in 3 wisselbeurten van elk 2 minuten.

8.5. Detectiechemie (met behulp van EnVision® reagentia)

- 8.5.1. Tik overmatige wasbuffer af.
- 8.5.2. Laad de objectglasjes in een voorbereide bevochtigingskamer (gevuld met met water bevochtigde keukenrol of gaas).
- 8.5.3. Gebruik 200 µl HRP-polymeerreagens om de weefselcoupe volledig te bedekken.
- 8.5.4. Incubeer gedurende 30 minuten (+1 minuut).
- 8.5.5. Spoel de objectglasjes in wasbuffer, in 3 wisselbeurten van elk 2 minuten.
- 8.5.6. Tik overmatige buffer af.
- 8.5.7. Laad de objectglasjes in een voorbereide bevochtigingskamer (gevuld met met water bevochtigde keukenrol of gaas).
- 8.5.8. Gebruik 200 µl DAB-werkoplossingsreagens om de weefselcoupe te bedekken.
- 8.5.9. Incubeer gedurende 5 minuten (+ 1 minuut).
- 8.5.10. Spoel de objectglasjes in stromend gedistilleerd H₂O gedurende 5 minuten.
- 8.5.11. Spoel de objectglasjes 1 maal in wasbuffer gedurende 2 minuten.

8.6. Achtergrondkleuring

- 8.6.1. Laad de objectglasjes in een voorbereide bevochtigingskamer (gevuld met met water bevochtigde keukenrol of gaas).
- 8.6.2. Gebruik 200 µl hematoxyline achtergrondkleuring om de weefselcoupe volledig te bedekken.
- 8.6.3. Incubeer gedurende 5 minuten (±10 seconden).
- 8.6.4. Spoel de objectglasjes gedurende 3 minuten af in stromend H₂O.

8.7. Preparatie

- 8.7.1. Dompel de objectglasjes onder in 95% ethanol, gedurende 1 minuut of 25 onderdempelingen.
- 8.7.2. Dompel de objectglasjes onder in absolute alcohol, in 4 wisselbeurten van elk 1 minuut of 25 onderdempelingen.
- 8.7.3. Reinig met xyleen, in 3 wisselbeurten van elk 1 minuut of 25 onderdempelingen.

8.7.4. Bedek de objectglasjes met glazen dekglasjes met een niet-waterig, permanent preparatiemedium.

9. STABILITEIT

- 9.1. Ongeopende reagentiaflacons zijn stabiel tot de op de flacon vermelde uiterste gebruiksdatum, mits bewaard bij de aanbevolen temperaturen.
- 9.2. Na opening zijn de reagentia stabiel gedurende negentig (90) dagen, mits bewaard bij de aanbevolen temperaturen.

10. KWALITEITSCONTROLE

- 10.1. Variabiliteit in de resultaten is vaak te wijten aan verschillen in monsterbehandeling, die afwijkt van de aanbevolen testprocedures. Raadpleeg de richtlijnen voor kwaliteitscontrole van het College of American Pathologists (CAP) Certification Program for Immunohistochemistry voor aanvullende informatie.
- 10.2. Gebruik met elke kleuringsrun een positieve weefselcontrole om de werking van het assay te controleren. Als de positieve weefselcontrole geen positieve kleuring vertoont, moeten de resultaten met de andere testmonsters als verdacht of ongeldig worden beschouwd.
- 10.3. Gebruik met elke kleuringsrun een negatief controleweefsel om de specificiteit van de primaire antistof te controleren en een indicatie van specifieke achtergrondkleuring te krijgen. Als de negatieve weefselcontrole een positieve specifieke kleuring vertoont, moeten de resultaten met de andere testmonsters als verdacht of ongeldig worden beschouwd.
- 10.4. Voor de evaluatie van niet-specifieke of achtergrondkleuring kan in plaats van de primaire antistof ook een niet-specifiek negatieve controleweefsel worden gebruikt.

11. INTERPRETATIE

Matig-tot-intens bruine kleuring in de celkernen wijst op de aanwezigheid van afwijkende S-fase-inductie. De gekleurde objectglasjes dienen door een patholoog te worden beoordeeld met behulp van een lichtmicroscop. De resultaten moeten door een bevoegde deskundige worden geïnterpreteerd, rekening houdend met de klinische anamnese van de patiënt en andere diagnostische tests.

12. BEPERKINGEN

- 12.1. Immunohistochemische kleuring vereist speciale training voor de selectie en toepassing van reagentia.
- 12.2. Met dit reagens kunnen 25 tests worden uitgevoerd op basis van 200 µl reagens per objectglaasje.
- 12.3. Sommige normale cellen kunnen positief kleuren voor afwijkende S-fase-inductie.
- 12.4. Optimale weefselkleuring is afhankelijk van de fixatie en verwerking van het monster.
- 12.5. Niet-specifieke of toegenomen achtergrondkleuring kan zich voordoen als gevolg van, maar niet beperkt tot, variaties in de procedure, inadequate spoeling tussen assaystappen en/of niet correct verwerkte monsters.

13. PROBLEEMOPLOSSING

Probleem	Mogelijke oorzaak	Actie
Geen kleuring op objectglaasjes positieve controle	Reagentia niet in de juiste volgorde gebruikt.	Bekijk kleuringsprotocol opnieuw.
	Weglaten van een reagens.	Herhaal kleuringsprotocol.
	Incorrecte bereiding DAB.	Bereid conform de specificaties van de fabrikant en herhaal het kleuringsprotocol.
Zwakke kleuring op objectglaasjes positieve controle	Onvoldoende antigeenversterking.	Controleer incubatietijden en temperatuur antigeen/epitooopversterkingsbuffer (zie paragraaf 8.2).
	Verkeerde antigeenversterkingsbuffer gebruikt.	Bekijk kleuringsprotocol opnieuw en bereid buffer conform de richtlijnen van de fabrikant.
	Ontoereikende incubatie primaire antistof.	Bekijk kleuringsprotocol opnieuw en pas incubatietijden aan.
	Primaire antistof is verdund.	Gebruik primaire antistof conform de richtlijnen van de fabrikant.
	Er blijft overmatige wasbuffer achter op objectglaasje voor gebruik volgende reagens.	Herhaal kleuringsprotocol. Tik en veeg overmatige wasbuffer af.
	Overmatige achtergrondkleuring	Inadequate spoeling tussen assaystappen.
Te lange incubatietijden met hoofdreagentia.		Bekijk kleuringsprotocol opnieuw en pas incubatietijden aan.
Objectglaasjes drogen uit tijdens assay-incubatie of spoelstappen.		Herhaal kleuringsprotocol. Controleer bevochtigingskamer.

14. REFERENTIES

1. Kastan M and Bartec J.

Cell cycle checkpoints and cancer. *Nature*, 2004. Vol 432:316-323.

2. Massague J. G1 cell-cycle control and cancer. *Nature*, 2004. Vol 432:298-306.

3. Freeman A, Morris LS, Millis AD, Stoeber K, Laskey RA, Williams GH and Coleman N. Minichromosome Maintenance Proteins as Biological Markers of Dysplasia and Malignancy. *CI Cancer Research*, 1999. Vol 5:2121-2132.

4. Ishimi Y, Okayasu I, Kato C, Kwon H, Kimura H, Yamada K and Song S. Enhanced expression of MCM proteins in cancer cells derived from uterine cervix. *Eur. J. Biochem* 2003. 270:1089-1101.

5. Lei M and Tye BK. Initiating DNA synthesis: from recruiting to activating the MCM Complex. *J Cell Science* 2001. Vol. 114 (8): 1447-1454.

15. SYMBOLENIJST



Bestelnummer



Voor *in-vitro*diagnostiek



Raadpleeg de gebruiksaanwijzing



Bevat 7 ml



Let op, raadpleeg de bijgeleverde documentatie



Beperkingen bewaar temperatuur



Batchcode



Houdbaar tot jiii-mm-dd of jjjj-mm



Fabrikant

TECHNISCHE INFORMATIE

In de Verenigde Staten belt u gratis naar de TriPath technische dienst op 1-866-874-7284.

TRIPATH-IMAGING



TriPath Imaging, Inc.
780 Plantation Drive
Burlington, NC 27215 VS
(800) 426-2176

Ontwikkeld met technologie van Millennium Pharmaceuticals, Inc.

MILLENNIUM

M en **MILLENNIUM** zijn handelsmerken van Millennium Pharmaceuticals, Inc.

Millennium Pharmaceuticals, Inc.
40 Landsdowne Street
Cambridge, MA 02139 VS
www.millennium.com

TriPath Imaging® is een geregistreerd handelsmerk van TriPath Imaging, Inc.
ProEx is een product en handelsmerk van TriPath Imaging, Inc.