

**FLEX**  
**Monoclonal Mouse**  
**Anti-Human**  
**p53 Protein**  
 Clone DO-7  
**Ready-to-use**  
 (Link)

**Code IR616**

**ENGLISH**

<b>Intended use</b>	<p>For in vitro diagnostic use.</p> <p>FLEX Monoclonal Mouse Anti-Human p53 Protein, Ready-to-Use, (Link), is intended for use in immunohistochemistry (IHC) together with Autostainer Link instruments. This antibody labels wild-type and mutant-type p53 protein and is useful for investigation of p53 accumulation in human neoplasias (1, 2). Differential classification of tumors 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.</p>
<b>Summary and explanation</b>	<p>p53 is a nuclear phosphoprotein with a molecular mass of 53 kDa. Wild-type p53 protein is present in a wide variety of normal cells, but the protein has a very short half-life and thus is present in only minute amounts (1), generally below the detection level of immunohistochemical methods (3). Somatic mutation of the <i>p53</i> gene is a very frequent event in the development of human neoplasia, and because mutant p53 proteins often are much more stable than wild-type p53 protein, the mutant p53 protein accumulates to a high level (1). As examples, p53 protein accumulation was observed in 76% of 212 human malignant lesions, including breast, colon and stomach carcinomas, melanoma, embryonal carcinoma of the testis, transitional carcinoma of the urinary bladder, uterine carcinoma and soft tissue sarcomas (4).</p> <p>Wild-type p53 protein functions as a transcription factor, i.e. as a modulator which can turn crucial genes either on or off. It also inhibits DNA replication and is a check-point control molecule for progression of the cell cycle. Furthermore, p53 protein is involved in the regulation of apoptosis. In transfection assays, wild-type <i>p53</i> behaves as a tumor suppressor, while mutant <i>p53</i> behaves as a dominant transforming oncogene (1).</p> <p>Refer to <i>Dako General Instructions for Immunohistochemical Staining</i> 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.</p>
<b>Reagent provided</b>	<p>Ready-to-use monoclonal mouse antibody provided in liquid form in a buffer containing stabilizing protein and 0.015 mol/L sodium azide.</p> <p><u>Clone</u>: DO-7 (1). <u>Isotype</u>: IgG2b, kappa.</p>
<b>Immunogen</b>	<p>Recombinant human wild-type p53 protein (1).</p>
<b>Specificity</b>	<p>In Western blotting of lysate of the A431 human vulval carcinoma cell line, the antibody labels a 53 kDa band, corresponding to the mutant type p53, which is expressed by A431. The epitope recognized by the antibody is located between the N-terminal amino acids 1 and 45 and possibly between amino acids 37 and 45 of the human p53 protein (1).</p> <p>SDS-PAGE analysis of immunoprecipitates formed between lysate of the BT474 breast cancer cell line and the antibody shows reaction with a 53 kDa protein corresponding to p53 (1).</p> <p>In IHC the antibody labels mutant-type p53 in the A431 cell line and wild-type p53 in the SVK14 cell line (SV40-transformed keratinocyte line) (1).</p>
<b>Precautions</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. For in vitro diagnostic use.</li> <li>2. For professional users.</li> <li>3. This product contains sodium azide (NaN<sub>3</sub>), 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.</li> <li>4. As with any product derived from biological sources, proper handling procedures should be used.</li> <li>5. Wear appropriate Personal Protective Equipment to avoid contact with eyes and skin.</li> <li>6. Unused solution should be disposed of according to local, State and Federal regulations.</li> </ol>
<b>Storage</b>	<p>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.</p>
<b>Specimen preparation</b>	<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 using Dako PT Link. For details, please refer to the PT Link User Guide. Optimal results are obtained by pretreating tissues using EnVision FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (Code K8004)</p> <p><u>Paraffin-embedded sections</u>: Pre-treatment of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections is recommended using the 3-in-1 specimen preparation procedure for Dako PT Link. After staining the sections must be dehydrated, cleared and mounted using permanent mounting method.</p> <p><u>Deparaffinized sections</u>: Pre-treatment of deparaffinized formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections is recommended using Dako PT Link and following the same procedure as described for paraffin-embedded sections. After staining the slides should be mounted using an aqueous or 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 FLEX IHC Microscope Slides (Code K8020) is recommended.</p>
<b>Staining procedure</b>	<p>The recommended visualization system is EnVision FLEX, High pH (Link) (Code K8000). The staining steps and incubation times are pre-programmed into the Autostainer Link software. The recommended reagent application volume is 1 x 200 µL or 2 x 150 µL per slide. 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 instrument, please contact Dako Technical Support. All incubation steps should be performed at room temperature.</p>

Optimal conditions may vary depending on specimen and preparation methods, and should be determined by each individual laboratory. Counterstaining in hematoxylin is recommended using EnVision FLEX Hematoxylin (Link) (Code K8008).

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 colon and colon adenocarcinoma and the cells/structures should display reaction patterns as described for these tissues in "Performance characteristics". The recommended negative control reagent is FLEX Negative Control, Mouse, (Link) (Code IR750).

<b>Staining interpretation</b>	Cells labeled by the antibody generally display nuclear staining, but cytoplasmic staining has been reported in some cases (5).
<b>Performance characteristics</b>	<p><u>Normal tissues:</u> In normal and reactive mesothelium the antibody labeled 0/40 cases, and in 27 mesotheliomas, normal cells, e.g. fibroblasts and endothelial cells were negative (2). In colon, only the scattered benign basal epithelial cells show a weak to moderate nuclear staining reaction.</p> <p><u>Abnormal tissues:</u> In follicular lymphoma an increasing accumulation of p53 in centroblasts was observed with morphological progression resulting in 1/16 cases of grade I, 10/21 cases of grade II, and 6/6 cases of grade III being labeled (3). In mesotheliomas the antibody labeled 7/26 cases of epithelial type (1 to 25% labeled cells), 1/7 cases of mixed type (25 to 50% labeled cells), and 1/3 cases of mesenchymal type (more than 75% labeled cells) (2). The neoplastic cells in colon adenocarcinoma show a moderate to strong nuclear staining reaction.</p>

## FRANÇAIS

<b>Utilisation prévue</b>	<p>Pour utilisation diagnostique in vitro.</p> <p>L'anticorps FLEX Monoclonal Mouse Anti-Human p53 Protein, Ready-to-Use, (Link), est destiné à une utilisation en immunohistochimie (IHC) avec les instruments Autostainer Link. Cet anticorps marque la protéine p53 de types sauvage et mutant et facilite la recherche d'accumulation de p53 dans les néoplasies humaines (1, 2). La classification différentielle des tumeurs 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.</p>
<b>Résumé et explication</b>	<p>La p53 est une phosphoprotéine nucléaire ayant une masse moléculaire de 53 kDa. La protéine p53 de type sauvage est présente dans un grand nombre de cellules saines, mais cette protéine a une demi-vie très courte et n'est donc présente qu'en faible teneur (1), généralement en deçà du seuil de détection des méthodes immunohistochimiques (3). La mutation somatique du gène <i>p53</i> est un événement très fréquent dans le développement des néoplasies humaines et, du fait que les protéines p53 mutantes sont souvent beaucoup plus stables que la protéine p53 de type sauvage, la protéine p53 mutante s'accumule à un taux élevé (1). Par exemple, une accumulation de protéine p53 a été observée dans 76% des 212 lésions malignes humaines, notamment les carcinomes du sein, du côlon et de l'estomac, le mélanome, le carcinome embryonnaire du testicule, le carcinome transitionnel de la vessie, le carcinome utérin et les sarcomes des tissus mous (4).</p> <p>La protéine p53 de type sauvage agit comme facteur de transcription, c'est-à-dire comme modulateur qui peut soit activer, soit désactiver des gènes cruciaux. Elle inhibe également la réplication de l'ADN et est une molécule de contrôle des différentes étapes de la progression du cycle cellulaire. De plus, la protéine p53 est impliquée dans la régulation de l'apoptose. Dans les essais de transfection, la p53 de type sauvage se comporte comme suppresseur tumoral, alors que la p53 mutante agit comme oncogène transformant dominant (1).</p> <p>Consulter le document <i>General Instructions for Immunohistochemical Staining</i> (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.</p>
<b>Réactif fourni</b>	<p>Anticorps monoclonal de souris prêt à l'emploi fourni sous forme liquide dans un tampon contenant une protéine stabilisante et 0,015 mol/L d'azide de sodium.</p> <p><u>Clone</u> : DO-7 (1). <u>Isotype</u> : IgG2b, kappa.</p>
<b>Immunogène</b>	Protéine p53 recombinante humaine de type sauvage (1).
<b>Spécificité</b>	<p>Dans les analyses par Western blot du lysat de lignée cellulaire de carcinome vulvaire humain A431, l'anticorps marque une bande de 53 kDa, correspondant à la p53 de type mutant, qui est exprimée par l'A431. L'épitope reconnu par l'anticorps est localisé entre les acides aminés 1 et 45 du N-terminal et éventuellement entre les acides aminés 37 et 45 de la protéine p53 humaine (1).</p> <p>L'immunoblot PAGE en présence de SDS d'immunoprécipités formés entre le lysat de lignée cellulaire de cancer du sein BT474 et l'anticorps présente une réaction à une protéine de 53 kDa correspondant à la p53 (1).</p> <p>En immunohistochimie, l'anticorps marque la p53 de type mutant dans la lignée cellulaire A431 et la p53 de type sauvage dans la lignée cellulaire SVK14 (lignée de kératinocytes transformés par SV40) (1).</p>
<b>Précautions d'emploi</b>	<ol style="list-style-type: none"><li>1. Pour utilisation diagnostique in vitro.</li><li>2. Pour utilisateurs professionnels.</li><li>3. Ce produit contient de l'azide de sodium (Na<sub>3</sub>N), un produit chimique hautement toxique à l'état pur. 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.</li><li>4. Comme avec tout produit d'origine biologique, des procédures de manipulation appropriées doivent être respectées.</li><li>5. Porter un équipement de protection individuelle approprié pour éviter tout contact avec les yeux et la peau.</li><li>6. Les solutions non utilisées doivent être éliminées conformément aux réglementations locales, nationales et européennes.</li></ol>
<b>Conservation</b>	Conservé 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.
<b>Préparation des échantillons</b>	<p>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.</p> <p>Le prétraitement avec une restauration d'épitope induite par la chaleur (HIER) est nécessaire à l'aide du Dako PT Link. Pour plus de détails, se référer au Guide d'utilisation du PT Link. Des résultats optimaux sont obtenus en prétraitant les tissus à l'aide de la EnVision FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (réf. K8004).</p> <p><u>Coupes incluses en paraffine</u> : Le prétraitement des coupes de tissus fixées au formol et incluses en paraffine est recommandé à l'aide de la procédure 3 en 1 de préparation des échantillons pour Dako PT Link. Une fois la procédure de coloration terminée, les coupes doivent être déshydratées, éclaircies et montées selon une méthode de montage permanent.</p> <p><u>Coupes déparaffinées</u> : Le prétraitement des coupes tissulaires fixées au formol et incluses en paraffine puis déparaffinées est recommandé à l'aide du Dako PT Link en suivant la même procédure que pour les coupes incluses en paraffine, déjà décrite. Après coloration, un montage aqueux ou permanent des lames est recommandé.</p> <p>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 tissu sur les lames de verre, il est recommandé d'utiliser les lames FLEX IHC Microscope Slides (réf. K8020).</p>
<b>Procédure de coloration</b>	Le système de visualisation recommandé est le système EnVision FLEX, High pH (Link) (réf. K8000). Les étapes de coloration et les temps d'incubation sont préprogrammés dans le logiciel Autostainer Link. Le volume de réactif recommandé devant être appliqué est le suivant :

1 x 200 µL ou 2 x 150 µL par lame. 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 l'instrument Autostainer utilisé, 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 le côlon et l'adénocarcinome du côlon, et les cellules/structures doivent présenter des schémas de réaction tels que ceux décrits pour ces tissus dans "Performances". Le réactif de contrôle négatif recommandé est le produit FLEX Negative Control, Mouse, (Link) (réf. IR750).

#### Interprétation de la coloration

Les cellules marquées par l'anticorps présentent généralement une coloration nucléaire, mais une coloration cytoplasmique a été signalée dans certains cas (5).

#### Performances

**Tissus sains :** Dans le mésothélium sain et réactif, l'anticorps a marqué 0 cas sur 40, et dans 27 mésothéliomes, les cellules saines, par exemple les fibroblastes et les cellules endothéliales, étaient négatives (2). Dans le côlon, seules des cellules épithéliales basales bénignes disséminées présentent une coloration nucléaire faible à modérée.

**Tissus anormaux :** Dans le lymphome folliculaire, une accumulation croissante de p53 dans les centroblastes a été observée avec une évolution morphologique entraînant le marquage de 1 cas sur 16 de grade I, 10 cas sur 21 de grade II et 6 cas sur 6 de grade III (3). Dans les mésothéliomes, l'anticorps marque 7 cas sur 26 de type épithélial (1 à 25% de cellules marquées), 1 cas sur 7 de type mixte (25 à 50% de cellules marquées) et 1 cas sur 3 de type mésenchymateux (plus de 75% de cellules marquées) (2). Les cellules néoplasiques de l'adénocarcinome du côlon présentent une coloration nucléaire modérée à forte.

## DEUTSCH

#### Verwendungszweck

Zur In-vitro-Diagnostik.

FLEX Monoclonal Mouse Anti-Human p53 Protein, Ready-to-Use, (Link), ist zur Verwendung in der Immunhistochemie (IHC) in Verbindung mit Autostainer Link-Geräten bestimmt. Dieser Antikörper markiert den Wildtyp und den Mutantentyp des p53-Proteins und eignet sich für die Untersuchung der p53-Akkumulation in menschlichen Neoplasien (1, 2). Die Differenzialklassifikation von Tumoren 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

p53 ist ein nukleäres Phosphoprotein mit einem Molekulargewicht von 53 kDa. Wildtyp-p53-Protein findet sich in einer Vielfalt normaler Zellen. Seine Halbwertszeit ist jedoch sehr kurz, so dass es nur in winzigen Mengen vorliegt (1) und die Nachweisgrenze in der Regel immunhistochemische Methoden unterschreitet (3). Die somatische Mutation des p53-Gens ist ein sehr häufiges Ereignis bei der Entstehung menschlicher Neoplasien. Weil mutante p53-Proteine oft bedeutend stabiler als das Wildtyp-p53-Protein sind, kann mutantes p53-Protein einen hohen Spiegel erreichen (1). Akkumulationen von p53-Protein wurden beispielsweise bei 76% der 212 malignen Läsionen des Menschen beobachtet, darunter Brust-, Dickdarm- und Magenkarzinome, Melanome, embryonale Karzinome der Hoden, Übergangskarzinome der Harnblase, Uteruskarzinome und Weichteilsarkome (4).

Das Wildtyp-p53-Protein fungiert als Transkriptionsfaktor, d. h. als Modulator, der ausschlaggebende Gene ein- und ausschalten kann. Es hemmt zudem die DNA-Replikation und ist ein „Checkpoint“-Molekül für die Zellzyklusprogression. Darüber hinaus ist das p53-Protein an der Regulation der Apoptose beteiligt. Bei Transfektionsassays verhält sich das Wildtyp-p53 wie ein Tumorsuppressor, während mutantes p53 als dominantes transformierendes Onkogen fungiert (1).

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, Gewebepreparation, 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 Natriumazid enthält.

**Klon:** DO-7 (1). **Isotyp:** IgG2b, Kappa.

#### Immunogen

Rekombinantes humanes Wildtyp-p53-Protein (1).

#### Spezifität

Beim Western-Blotting von Lysaten der menschlichen Vulvakarzinom-Zelllinie A431 markiert der Antikörper eine 53-kDa-Bande, die dem mutanten Typ p53 entspricht, der von A431 exprimiert wird. Das vom Antikörper erkannte Epitop ist zwischen den N-terminalen Aminosäuren 1 und 45 und möglicherweise zwischen den Aminosäuren 37 und 45 des menschlichen p53-Proteins lokalisiert (1).

Eine SDS-PAGE-Analyse der Immunpräzipitate, die zwischen dem Lysat aus der BT474-Brustkrebs-Zelllinie und dem Antikörper gebildet wurden, zeigte eine Reaktion mit einem 53 kDa schweren, p53 entsprechenden Protein (1).

In der IHC markiert der Antikörper den mutanten Typ p53 in der A431-Zelllinie und den Wildtyp p53 in der SVK14-Zelllinie (SV40-transformierte keratinozyte Linie) (1).

#### Vorsichtsmaßnahmen

1. Zur In-vitro-Diagnostik.
2. Für Fachpersonal.
3. Dieses Produkt enthält Natriumazid (NaN<sub>3</sub>), 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 Metall-Azid-Anreicherung 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.

#### Gewebepreparation

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) mit dem Dako PT Link erforderlich. Weitere Informationen hierzu siehe PT Link-Benutzerhandbuch. Optimale Ergebnisse können durch Vorbehandlung der Gewebe mit EnVision FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (Code-Nr. K8004) erzielt werden.

**Paraffineingebettete Schnitte:** Die Vorbehandlung der formalinfixierten, paraffineingebetteten Schnitte mit dem 3-in-1-Gewebepreparationsverfahren für Dako PT Link wird empfohlen. Nach dem Färben müssen die Schnitte dehydriert, geklärt und mit einer permanenten Eindeckmethode auf den Objektträger aufgebracht werden.

**Entparaffinierte Schnitte:** Eine Vorbehandlung der entparaffinierten, formalinfixierten, paraffineingebetteten Gewebeschnitte mit Dako PT Link und nach demselben Verfahren, wie für die paraffineingebetteten Schnitte beschrieben, wird empfohlen. Nach Durchführung des Färbeverfahrens müssen die Objektträger unter Verwendung eines geeigneten permanenten Eindeckmediums eingedeckt werden.

Während der Gewebepreparation oder während des anschließenden immunhistochemischen Färbeverfahrens dürfen die Gewebeschnitte nicht austrocknen. Für eine bessere Haftung der Gewebeschnitte an den Glas-Objektträgern werden FLEX IHC Microscope Slides (Code-Nr. K8020) empfohlen.

#### Färbeverfahren

Das empfohlene Detektionssystem ist EnVision FLEX, High pH (Link) (Code-Nr. K8000). Die Färbeschritte und Inkubationszeiten sind in der Autostainer Link-Software vorprogrammiert. Das empfohlene Reagenzvolumen beträgt 1 x 200 µL oder 2 x 150 µL pro Objektträger. Detaillierte Anweisungen zum Laden der Objektträger und Reagenzien bitte dem Benutzerhandbuch zum Autostainer Link entnehmen. Wenn die Protokolle auf dem verwendeten Autostainer-Gerät nicht verfügbar sind, wenden Sie sich an den technischen Kundendienst von Dako. 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 Hematoxylin (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 Dickdarm und Dickdarm-Adenokarzinom enthalten, und die Zellen/Strukturen sollten die für dieses Gewebe unter „Leistungseigenschaften“ beschriebenen Reaktionsmuster aufweisen. Das empfohlene Negativkontrollreagenz ist FLEX Negative Control, Mouse, (Link) (Code-Nr. IR750).

#### Auswertung der Färbung

Mit diesem Antikörper markierte Zellen weisen in der Regel eine nukleäre Färbung auf, in einigen Fällen kann jedoch auch eine zytoplasmatische Färbung auftreten (5).

#### Leistungseigenschaften










**Normalgewebe:** Bei normalem und reaktivem Mesothel markierte der Antikörper 0/40 Fällen. Bei 27 Mesotheliomen testeten die normalen Zellen, z. B. Fibroblasten und Endothelzellen, negativ (2). In Dickdarm weisen nur die verstreuten benignen Basalepithelzellen fokal eine schwache bis mäßige Färbereaktion auf.

**Anormales Gewebe:** Beim follikulären Lymphom wird mit morphologischer Progression eine zunehmende Akkumulation von p53 in Zentroblasten beobachtet, mit resultierender Zunahme der positiven Reaktion: 1/16 Fällen bei Grad I, 10/21 Fällen bei Grad II und 6/6 Fällen bei Grad III (3). Bei Mesotheliomen markierte der Antikörper 7/26 Fälle der epithelialen Form (1-25% markierte Zellen), 1/7 Fälle der Mischform (25-50% markierte Zellen) und 1/3 Fälle der mesenchymalen Form (über 75% markierte Zellen) (2). Die neoplastischen Zellen im Dickdarm-Adenokarzinom zeigten eine mäßige bis starke Färbereaktion.

#### References/ Bibliographie/ Literaturnachweise

1. Vojtěšek B, Bártek J, Midgley CA, Lane DP. An immunochemical analysis of the human nuclear phosphoprotein p53. New monoclonal antibodies and epitope mapping using recombinant p53. J Immunol Methods 1992; 151:237-44.
2. Ramael M, Lemmens G, Eerdeken C, Buysse C, Deblie I, Jacobs W, et al. Immunoreactivity for p53 protein in malignant mesothelioma and non-neoplastic mesothelium. J Pathol 1992; 168:371-5.
3. Cooper K, Haffajee Z. bcl-2 and p53 protein expression in follicular lymphoma. J Pathol 1997; 182:307-10.
4. Bártek J, Bártková J, Vojtěšek B, Stašková Z, Lukáš J, Rejthar A, et al. Aberrant expression of the p53 oncoprotein is a common feature of a wide spectrum of human malignancies. Oncogene 1991; 6:1699-703.
5. Kontogeorgos G, Kapranos N, Thodou E, Sambaziotis D, Tsagarakis S. Immunocytochemical accumulation of p53 in corticotroph adenomas: Relationship with heat shock proteins and apoptosis. Pituitary 1999; 1:207-12.

#### Explanation of symbols / Explication des symboles / Erläuterung der Symbole

	Catalogue number Référence du catalogue Katalognummer	 2°C - 8°C	Temperature limitation Limites de température Zulässiger Temperaturbereich		Use by Utiliser avant Verwendbar bis
	In vitro diagnostic medical device Dispositif médical de diagnostic in vitro In-vitro-Diagnostikum		Contains sufficient for <n> tests Contenu suffisant pour <n> tests Inhalt ausreichend für <n> Tests		Manufacturer Fabricant Hersteller
	Consult instructions for use Consulter les instructions d'utilisation Gebrauchsanweisung beachten		Batch code Réf. du lot Chargenbezeichnung		Authorized representative in the European Community Représentant agréé dans la Communauté européenne Autorisierte Vertretung in der Europäischen Gemeinschaft



Agilent Technologies Singapore (International) Pte Ltd.  
No. 1 Yishun Avenue 7  
Singapore, 768923  
Tel. +44 161 492 7050  
www.agilent.com

Revision/ Révision/ Revision 2020.11