

## EnVision™ FLEX, High pH (Dako Omnis)

Code GV800

2nd edition/ 2ème édition / 2. Auflage

The kit contains reagents sufficient for 600 tests. For Dako Omnis instruments.

Les réactifs contenus dans ce kit permettent d'effectuer 600 tests. Pour les appareils Dako Omnis.

Die in diesem Kit enthaltenen Reagenzien sind ausreichend für 600 Tests. Für Dako Omnis Geräte.

Optional reagents/ Réactifs en option/ Optionale Reagenzien:

<b>Code</b>	<b>Product name/ Nom du produit/ Produktname</b>	<b>Tests</b>
GV804	EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (Dako Omnis)	225
GV805	EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (50x) (Dako Omnis)	225
GC807	Wash Buffer (20x) (Dako Omnis)	
GC808	Hematoxylin (Dako Omnis)	600
GV809	EnVision™ FLEX+ Rabbit LINKER (Dako Omnis)	75
GV821	EnVision™ FLEX+ Mouse LINKER (Dako Omnis)	75
GV825	EnVision™ FLEX DAB+ Substrate Chromogen System (Dako Omnis)	150

Other options/ Autres options/ Weitere Optionen:

K8020	FLEX IHC Microscope Slides	500
-------	----------------------------	-----

## Contents/ Table des matières/ Inhalt

Page/ Page/ Seite

### ENGLISH

Intended Use .....	4
Summary and Explanation.....	4
Reagents .....	5
A. Materials provided .....	5
B. Materials required but not provided.....	5
C. Optional reagents .....	6
Precautions .....	7
Storage.....	8
Reagent Preparation.....	9
Specimen Collection and Preparation .....	9
Procedure.....	10
Staining procedure.....	10
Quality Control.....	11
Interpretation of Results.....	11
Limitations .....	12
Explanation of symbols.....	32

### FRANÇAIS

Utilisation prévue .....	13
Résumé et explication .....	13
Réactifs .....	14
A. Matériel fourni.....	14
B. Matériel requis mais non fourni .....	14
C. Réactifs en option.....	15
Précautions d'emploi .....	16
Conservation .....	17
Préparation des réactifs.....	18
Prélèvement et préparation des échantillons .....	19
Procédure.....	19
Procédure de coloration .....	19
Contrôle qualité .....	22
Interprétation des résultats .....	22
Limites.....	22
Explication des symboles.....	32

## DEUTSCH

Verwendungszweck.....	23
Zusammenfassung und Erklärung .....	23
Reagents (Reagenzien).....	24
A. Mitgelieferte Materialien.....	24
B. Erforderliches, aber nicht mitgeliefertes Material.....	24
C. Optionale Reagenzien .....	25
Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen.....	26
Lagerung .....	27
Reagenzienvorbereitung.....	28
Entnahme und Vorbereitung der Probe.....	28
Verfahren.....	29
Färbeverfahren .....	29
Qualitätskontrolle.....	31
Auswertung der Ergebnisse.....	31
Einschränkungen.....	31
Erläuterung der Symbole .....	32

## **ENGLISH**

### **Intended Use**

For in vitro diagnostic use.

EnVision™ FLEX, High pH (Dako Omnis) visualization system is intended for use in immunohistochemistry together with Dako Omnis instruments. The system detects primary mouse and rabbit antibodies and the reaction is visualized by EnVision™ FLEX DAB+ Chromogen. If used with EnVision™ FLEX+ Rabbit LINKER (Code GV809) or EnVision™ FLEX+ Mouse LINKER (Code GV821) signal amplification of primary rabbit antibodies or primary mouse antibodies, respectively, can be achieved. The EnVision™ FLEX reagents are intended for use on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections.

### **Summary and Explanation**

EnVision™ FLEX visualization system is a flexible system giving optimal staining on Dako Omnis instruments, when using the protocol recommended in this package insert.

Prior to staining formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections are subjected to onboard deparaffinization and hydration followed by heat-induced epitope retrieval (HIER) using the target retrieval reagent specified in the package insert for the primary antibody. This kit includes EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (DM848). Alternatively, EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (Code GV804) or EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (50x) (Code GV805) is recommended. Some primary antibodies require enzymatic pre-treatment of tissue for optimal staining instead of HIER.

Endogenous peroxidase should be blocked with EnVision™ FLEX Peroxidase-Blocking Reagent (DM841) included in the kit. Due to an effective washing procedure and the presence of stabilizing proteins in the Dako reagents, extra blocking steps to reduce non-specific background staining are unnecessary.

Wash Buffer (20x) (GC807) available as optional reagent is recommended.

Primary antibodies are not provided with the kit. We recommend the use of Dako FLEX Ready-to-Use Primary Antibodies or Dako concentrated Primary Antibodies (see respective package inserts for guidelines).

EnVision™ FLEX+ Rabbit LINKER (Code GV809) may be applied for an optional signal amplification of rabbit primary antibodies. For signal amplification when using mouse primary antibodies, EnVision™ FLEX+ Mouse LINKER (Code GV821) may be applied. As a guideline: EnVision™ FLEX+ Rabbit LINKER provides 2-3 fold signal amplification and EnVision™ FLEX+ Mouse LINKER provides 4-5 fold signal amplification.

Dako EnVision™ FLEX /HRP reagent (DM842) in the kit consists of a dextran backbone to which a large number of horseradish peroxidase (HRP) molecules and secondary antibody molecules have been coupled. A unique chemistry is used for the coupling reaction, which permits the binding of up to 100 HRP molecules and up to 20 antibody molecules per backbone.

The substrate system in the kit consists of two components: EnVision™ FLEX DAB+ Chromogen (DM847), a concentrated diaminobenzidine (DAB) solution, and EnVision™ FLEX Substrate Buffer (DM843) containing hydrogen peroxide. Before use EnVision™ FLEX DAB+ Chromogen must be diluted in EnVision™ FLEX Substrate Buffer. The substrate system produces a crisp brown end product at the site of the target antigen. Timely mixing of chromogen and buffer is automatically performed onboard Dako Omnis.

Hematoxylin (Code GC808) is recommended for counterstaining. The reagent provides a clear blue, nuclear staining.

The stained tissue sections should be mounted with organic-solvent-based mounting medium.

## Reagents

### A. Materials provided

DM841

EnVision™ FLEX  
PEROXIDASE-BLOCKING  
REAGENT  
(Dako Omnis)

**EnVision™ FLEX Peroxidase-Blocking Reagent (Dako Omnis)**

8 x 22.5 mL, ready-to-use

Phosphate buffer containing hydrogen peroxide, 15 mmol/L NaN<sub>3</sub> and detergent.

DM842

EnVision™ FLEX  
/HRP  
(Dako Omnis)

**EnVision™ FLEX /HRP (Dako Omnis)**

8 x 22.5 mL, ready-to-use

Dextran coupled with peroxidase molecules and goat secondary antibody molecules against rabbit and mouse immunoglobulins. In buffered solution containing stabilizing protein and preservative.

DM847

EnVision™ FLEX  
DAB+ CHROMOGEN  
(Dako Omnis)

**EnVision™ FLEX DAB+ Chromogen (Dako Omnis)**

8 x 1 mL

3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride in organic solvent.

The color of this reagent may vary from strong violet to colorless without having any influence on the performance of the kit.

DM843

EnVision™ FLEX  
SUBSTRATE BUFFER  
(Dako Omnis)

**EnVision™ FLEX Substrate Buffer (Dako Omnis)**

16 x 26 mL

Buffered solution containing hydrogen peroxide and preservative.

DM848

EnVision™ FLEX  
TARGET RETRIEVAL SOLUTION  
HIGH pH (50x)  
(Dako Omnis)

**EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (Dako Omnis)**

9 x 68 mL, 50x concentrated

Tris/EDTA buffer, pH 9

### B. Materials required but not provided

Antibody diluent, e.g. Dako Antibody Diluent (Code S0809)

Clarify Clearing Agent (Code GC810)

Dako FLEX Ready-to-Use Primary Antibodies or suitably diluted concentrated primary rabbit or mouse antibodies from Dako

Dako Omnis instrument

Dako Omnis instrumentation utensils

Dako Proteinase K, Ready-to-Use (if necessary) (Code S3020)

FLEX Universal Negative Control, Rabbit, Ready-to-Use (Code GA600), FLEX Universal Negative Control, Mouse, Ready-to-Use (Code GA750), or suitable negative control reagent for the primary antibody

Hematoxylin (Dako Omnis) (Code GC808) or suitable hematoxylin reagent for counterstaining

Microscope slides, e.g. Dako FLEX IHC Microscope Slides (Code K8020)

Mounting medium (organic-solvent-based) and coverslips

Wash Buffer (20x) (Dako Omnis) (Code GC807)

0.3 M Sulfuric Acid (Code GC203)

### C. Optional reagents

**GV804**  
DM848

EnVision™ FLEX  
TARGET RETRIEVAL SOLUTION  
HIGH pH (50x)  
(Dako Omnis)

**EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (Dako Omnis)**  
3 x 68 mL, 50x concentrated  
Tris/EDTA buffer, pH 9

**GV805**  
DM849

EnVision™ FLEX  
TARGET RETRIEVAL SOLUTION  
LOW pH (50x)  
(Dako Omnis)

**EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (50x) (Dako Omnis)**  
3 x 68 mL, 50x concentrated  
Citrate buffer, pH 6.1

**GC807**  
DM851

WASH BUFFER (20x)  
(Dako Omnis)

**Wash Buffer (20x) (Dako Omnis)**  
20 x 175 mL, 20x concentrated  
Tris-buffered saline solution containing Tween 20, pH 7.6 (±0.1).

**GC808**  
DM846

HEMATOXYLIN  
(Dako Omnis)

**Hematoxylin (Dako Omnis)**  
8 x 22.5 mL, ready-to-use  
Aqueous solution of hematoxylin.

**GV809**  
DM845

EnVision™ FLEX+  
RABBIT LINKER  
(Dako Omnis)

**EnVision™ FLEX+ Rabbit LINKER (Dako Omnis)**  
1 x 22.5 mL, ready-to-use  
Buffered solution containing stabilizing protein and an antimicrobial agent.

**GV821**  
DM844

EnVision™ FLEX+  
MOUSE LINKER  
(Dako Omnis)

**EnVision™ FLEX+ Mouse LINKER (Dako Omnis)**  
1 x 22.5 mL, ready-to-use  
Buffered solution containing stabilizing protein and an antimicrobial agent.

**GV825**  
DM847 +  
DM843

**EnVision™ FLEX DAB+ Substrate Chromogen System (Dako Omnis)**

EnVision™ FLEX  
DAB+ CHROMOGEN  
(Dako Omnis)

**EnVision™ FLEX DAB+ Chromogen (Dako Omnis)**  
2 x 1 mL  
3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride in organic solvent.  
The color of this reagent may vary from strong violet to colorless without having any influence on the performance of the kit.

EnVision™ FLEX  
SUBSTRATE BUFFER  
(Dako Omnis)

**EnVision™ FLEX Substrate Buffer (Dako Omnis)**  
4 x 26 mL  
Buffered solution containing hydrogen peroxide and preservative.

## Precautions

1. For professional users.
2. EnVision™ FLEX /HRP contains material of animal origin and it cannot be excluded that trace amounts of human material could be present due to manufacturing procedures. As with any product derived from biological sources, proper handling should be used.
3. Do not expose EnVision™ FLEX Peroxidase-Blocking Reagent, EnVision™ FLEX /HRP, EnVision™ FLEX Substrate Buffer, EnVision™ FLEX DAB+ Chromogen or EnVision™ FLEX Substrate Working Solution to strong light.
4. EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) contains 5-10% trometamol, 1-5% nonylphenol, ethoxylated, and 1-5% acetic acid, (ethylenedinitrilo)tetra-, disodium salt, dihydrate. EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) is labeled:



### Warning

H319	Causes serious eye irritation.
H411	Toxic to aquatic life with long lasting effects.
P280	Wear eye or face protection.
P273	Avoid release to the environment.
P264	Wash hands thoroughly after handling.
P305 + P351+ P338	IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.
P337 + P313	If eye irritation persists: Get medical attention.
P501	Dispose of contents and container in accordance with all local, regional, national and international regulations.

5. For EnVision™ FLEX Peroxidase-Blocking Reagent, a safety data sheet is available for professional users on request.
6. EnVision™ FLEX DAB+ Chromogen contains 1-5% biphenyl-3,3',4,4'-tetrayltetraammonium tetrachloride, and is labeled:



### Danger

H350	May cause cancer.
H341	Suspected of causing genetic defects.
P201	Obtain special instructions before use.
P202	Do not handle until all safety precautions have been read and understood.
P280	Wear protective gloves. Wear eye or face protection. Wear protective clothing.
P308 + P313	IF exposed or concerned: Get medical attention.
P405	Store locked up.
P501	Dispose of contents and container in accordance with all local, regional, national and international regulations.

As a general rule, persons under 18 years of age are not allowed to work with this product. Users must be carefully instructed in the proper work procedure, the dangerous properties of the product and the necessary safety instructions. Please refer to the Safety Data Sheet for additional information.

7. Wear appropriate Personal Protective Equipment to avoid contact with eyes and skin.
8. Unused solution should be disposed of according to local, State and Federal regulations.

## Storage

Store EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) at 2-8 °C. Store EnVision™ FLEX Peroxidase-Blocking Reagent, EnVision™ FLEX /HRP, EnVision™ FLEX DAB+ Chromogen and EnVision™ FLEX Substrate Buffer in the dark at 2-8 °C. During storage the cap should be closed.

Onboard stability of EnVision™ FLEX Peroxidase-Blocking Reagent, EnVision™ FLEX /HRP, EnVision™ FLEX DAB+ Chromogen and EnVision™ FLEX Substrate Buffer is 75 hours. Onboard stability of diluted EnVision FLEX™ Target Retrieval Solution, High pH and Low pH is 7 days. Remaining onboard stability is tracked by the Dako Omnis software.

Do not use after expiration date stamped on the vials. If reagents are stored under any conditions other than those specified, the conditions must be verified by the user. If unexpected staining is observed which cannot be explained by variations in laboratory procedures and a problem with the product is suspected, contact Dako Technical Support.



## Reagent Preparation

### **A.1 EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (DM848, Code GV804) or EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (50x) (DM849, Code GV805)**

Prepare a working solution by diluting the EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) or Low pH (50x) concentrate 1:50 in distilled or deionized water. The following procedure is recommended:

1. Fill a Dako Omnis bulk bottle to the fill line with distilled or deionized water (3.325 L). Ensure to place the bulk bottle on a horizontal surface before filling.
2. Empty one 68 mL EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) or Low pH (50x) (Dako Omnis) concentrate bottle into the bulk bottle.
3. Transfer the detachable label from the concentrate bottle and attach it to the bulk bottle.
4. Fasten the lid and gently invert the bulk bottle 2-3 times.

Unused diluted solution may be stored at 2-8 °C for one month. The diluted solution can be used within 7 days when stored onboard the Dako Omnis instrument. Discard solution if cloudy in appearance.

### **A.2 Wash Buffer (20x) (DM851, Code GC807)**

Prepare a working solution by diluting the Wash Buffer (20x) (Dako Omnis) concentrate 1:20 in Dako Omnis bulk bottle using distilled or deionized water. To minimize foaming the following procedure is recommended:

1. Fill a Dako Omnis bulk bottle to the fill line with distilled or deionized water (3.325 L). Ensure to place the bulk bottle on a horizontal surface before filling.
2. Empty one 175 mL Wash Buffer (20x) (Dako Omnis) concentrate bottle into the bulk bottle.
3. Transfer the detachable label from the concentrate bottle and attach it to the bulk bottle.
4. Fasten the lid and gently invert the bulk bottle 2-3 times.

Unused diluted solution may be stored at 2-8 °C for one month. The diluted solution can be used within 7 days when stored onboard the Dako Omnis instrument. Remaining onboard stability is tracked by the Dako Omnis software. Discard solution if cloudy in appearance.

### **A.3 EnVision™ FLEX Substrate Working Solution**

The DAB-containing EnVision™ FLEX Substrate Working Solution is prepared onboard the Dako Omnis instrument. The automated process mixes one part of EnVision™ FLEX DAB+ Chromogen (DM847) with 50 parts of EnVision™ FLEX Substrate Buffer (DM843). Substrate Working Solution will always be prepared for one rack (containing 1-5 slides) at a time. The volumes supplied are sufficient for loading of 200 racks.

## Specimen Collection and Preparation

The specimens should be formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections.

Fixation time is dependent on fixative and tissue type/thickness. For example, tissue blocks with a thickness of 3-4 mm should be fixed in neutral-buffered formalin for 18-24 hours.

The optimal thickness of paraffin-embedded sections is 4 µm.

The specimens should be mounted on microscope slides. For greater adherence of tissue sections to glass slides, the use of FLEX IHC Microscope Slides (Code K8020) is recommended.

The sections should be mounted on the slides as flat and wrinkle-free as possible. Too many wrinkles will have an impact on the staining results.

**NOTE:** The microscope slides must have a width suitable for the Dako Omnis instrument. Please refer to Dako Omnis Basic User Guide for definition of usable microscope slides.

Paraffin sections should be mounted from a pre-heated water bath containing distilled or deionized water. The water bath should contain no additives (such as gelatin, poly-L-lysine etc.). Sections should be dried by heating, generally at a temperature not above 60 °C for up to 60 minutes. To ensure proper adherence of sections to slides it is important to drain the water from beneath the sections prior to the oven drying process.

## Procedure

EnVision™ FLEX visualization system has been developed for use on the Dako Omnis instrument in combination with Dako primary antibodies.

The automated procedure on Dako Omnis includes deparaffinization of tissue sections, heat-induced epitope retrieval, immunohistochemical staining and counterstaining of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. The protocol steps for the automated procedures can be displayed, printed and edited according to the Dako Omnis Basic and Advanced User Guides.

The pretreatment procedure and staining protocol depends on the the antibody. Please refer to the package insert for the individual Dako primary antibody.

Before running protocols on your Dako Omnis instrument, please read carefully the Dako Omnis Basic User Guide.

The EnVision™ FLEX protocol is pre-programmed in the Dako Omnis software. Please refer to Dako Omnis Basic User Guide for detailed instructions on preparing the instrument for staining and Dako Omnis Advanced User Guide for detailed instructions on protocols.

## Staining procedure

When using FLEX RTU Primary Antibodies for Dako Omnis the optimal staining protocol is programmed into the Dako Omnis software.

Please refer to the package insert for the individual FLEX RTU Primary Antibody or Dako concentrated Primary Antibody for optimal pre-treatment method and incubation times. For easy setup of new protocols, it is recommended to use one of the protocol templates described below.

From the Dako Omnis Workstation, chose one of three protocol templates containing the recommended staining steps and incubation times for the EnVision™ FLEX visualization system (refer to Table 2 for overview):

FLEX  
FLEX+ Mouse  
FLEX+ Rabbit

The protocol templates can be used for the generation of custom protocols for specific primary antibodies. The following protocol steps can be customized:

- Target retrieval reagent (for heat-induced epitope retrieval), temperature and incubation time
- Primary antibody and incubation time
- Labeled polymer incubation time (reduction only)
- Counterstain reagent and incubation time

The user must verify the applied protocol.

If the protocols are not available in the Dako Omnis system, please contact Dako Technical Services.

Table 2. Overview of EnVision™ FLEX/FLEX+ protocol templates.

Phase	Step	Reagent	Staining protocol template		
			FLEX	FLEX+ Mouse	FLEX+ Rabbit
Dewax	Dewax	Clarify Clearing Agent	yes	yes	yes
Target Retrieval	Target Retrieval	EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH or EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, Low pH or Custom reagent	97±2 °C* 30 min*	97±2 °C* 30 min*	97±2 °C* 30 min*
Staining	<i>Wash</i>	Wash Buffer (Dako Omnis)	wash	wash	wash
	Primary Antibody	20 min*	20 min*	20 min*	20 min*
	<i>Wash</i>	Wash Buffer (Dako Omnis)	wash	wash	wash
	Endogenous Enzyme Block	EnVision™ FLEX Peroxidase-Blocking Reagent	3 min	3 min	3 min
	<i>Wash</i>	Wash Buffer (Dako Omnis)	wash	wash	wash
	Secondary Reagent	EnVision™ FLEX+ Mouse or Rabbit LINKER	-	Mouse LINKER 10 min	Rabbit LINKER 10 min
	<i>Wash</i>	Wash Buffer (Dako Omnis)	-	wash	wash
	Labeled polymer	EnVision™ FLEX/HRP	20 min*	20 min*	20 min*
	<i>Wash</i>	Wash Buffer (Dako Omnis)	wash	wash	wash
	<i>Wash</i>	Wash Buffer (Dako Omnis)	wash	wash	wash
	Substrate Chromogen	EnVision™ FLEX Substrate Working Solution	5 min	5 min	5 min
	<i>Wash</i>	Wash Buffer (Dako Omnis)	wash	wash	wash
Counter-staining	Counterstain	Hematoxylin (Dako Omnis)*	3 min*	3 min*	3 min*
	<i>Wash</i>	Deionized Water	wash	wash	wash
	<i>Wash</i>	Wash Buffer (Dako Omnis)	wash	wash	wash

\* Customization is possible.

### Post-staining procedure

1. After completion of the run, remove the slide rack from the Unloading Station and transfer racks to fresh deionized water.
2. Dehydrate, clear, mount with permanent mounting media and coverslip the slides.

### Quality Control

Each staining run should include a known positive control specimen to ascertain a proper performance of all the applied reagents. If the positive control specimen fails to demonstrate positive staining, labeling of test specimens should be considered invalid.

A negative control reagent should be used with each specimen to identify any non-specific staining. If non-specific staining cannot be clearly differentiated from the specific staining, the labeling of the test specimen should be considered invalid.

### Interpretation of Results

The diaminobenzidine-containing Substrate Working Solution gives a brown color at the site of the target antigen recognized by the primary antibody. The brown color should be present on the positive control specimen at the expected localization of the target antigen. If non-specific staining is present, this will be recognized as a rather diffuse, brown staining on the slides treated with the negative control reagent. Nuclei will be stained blue by the hematoxylin counterstain.

## **Limitations**

1. For automated use on Dako Omnis instruments only. When performing staining using Dako concentrated primary antibodies, the optimal procedure must be determined and verified by the user.
2. For use on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections only. When using frozen sections or cell smears, the optimal procedure must be determined and verified by the user, unless specified in the Package Insert for the specific Dako Primary Antibody. Changes in the procedure may have impact on the number of tests provided with the kit.

## **FRANÇAIS**

### **Utilisation prévue**

Pour utilisation diagnostique in vitro.

Le système de visualisation EnVision™ FLEX, High pH (Dako Omnis) est destiné à une utilisation en immunohistochimie avec l'appareil Dako Omnis. Le système détecte les anticorps primaires de souris et de lapin et la réaction est visualisée à l'aide de EnVision™ FLEX DAB+ Chromogen. Utilisé avec EnVision™ FLEX+ Rabbit LINKER (réf. GV809) ou EnVision™ FLEX+ Mouse LINKER (réf. GV821), ce système permet d'obtenir une amplification du signal des anticorps primaires de lapin ou de souris, respectivement. Les réactifs EnVision™ FLEX sont destinés à être utilisés sur des coupes de tissus fixées au formol et incluses en paraffine.

### **Résumé et explication**

Le système de visualisation EnVision™ FLEX est un dispositif flexible qui permet d'obtenir une coloration optimale sur les instruments Dako Omnis, sous réserve de respecter le protocole recommandé dans la présente notice.

Avant de procéder à la coloration, les coupes de tissus fixées au formol et incluses en paraffine sont soumises à un déparaffinage et à une réhydratation sur l'instrument, puis à une procédure de restauration d'épitope induite par la chaleur (HIER) à l'aide du réactif de restauration des cibles indiqué dans la notice de l'anticorps primaire. Ce kit contient EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (DM848). Il est également possible d'utiliser les solutions EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (réf. GV804) ou EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (50x) (réf. GV805). Certains anticorps primaires nécessitent un prétraitement enzymatique du tissu pour une coloration optimale au lieu d'une procédure HIER.

La peroxydase endogène doit être bloquée à l'aide du réactif EnVision™ FLEX Peroxidase-Blocking Reagent (DM841) inclus dans le kit. En raison d'une procédure de lavage efficace et de la présence de protéines stabilisantes dans les réactifs Dako, des étapes de blocage supplémentaires ne sont pas nécessaires pour réduire la coloration du bruit de fond non spécifique.

Il est recommandé d'utiliser le tampon de lavage (20x) (GC807) disponible comme réactif en option.

Les anticorps primaires ne sont pas fournis dans le kit. L'utilisation des anticorps Dako FLEX Ready-to-Use Primary Antibodies ou des anticorps primaires concentrés Dako est recommandée (voir les notices respectives pour les instructions).

Le produit EnVision™ FLEX+ Rabbit LINKER (réf. GV809) peut être appliqué pour obtenir une amplification du signal des anticorps primaires de lapin (en option). Le produit EnVision™ FLEX+ Mouse LINKER (réf. GV821) peut être appliqué pour obtenir une amplification du signal lorsque des anticorps primaires de souris sont utilisés. De manière générale : Le produit EnVision™ FLEX+ Rabbit LINKER fournit une amplification du signal de 2 à 3 fois et le produit EnVision™ FLEX+ Mouse LINKER fournit une amplification du signal de 4 à 5 fois.

Le réactif Dako EnVision™ FLEX /HRP (DM842) du kit se compose d'une chaîne de dextrane sur laquelle un grand nombre de molécules de peroxydase de raifort (HRP) et de molécules d'anticorps secondaire ont été couplées. Une seule réaction chimique est utilisée pour la réaction de couplage, ce qui permet la liaison de 100 molécules de HRP maximum et de 20 molécules d'anticorps maximum par chaîne.

Le système du substrat contenu dans le kit est formé de deux composants : Le produit EnVision™ FLEX DAB+ Chromogen (DM847), une solution de diaminobenzidine (DAB) concentrée, et le tampon EnVision™ FLEX Substrate Buffer (DM843) contenant du peroxyde d'hydrogène. Avant emploi, le EnVision™ FLEX DAB+ Chromogen doit être dilué dans le tampon substrat EnVision™ FLEX Substrate Buffer. Le système du substrat forme un produit brun vif sur le site de l'antigène cible. Le mélange du chromogène et du tampon est automatiquement effectué sur l'instrument Dako Omnis. L'hématoxyline (réf. GC808) est recommandée pour la contre-coloration. Le réactif provoque une coloration nucléaire bleu clair.

Les coupes de tissus colorés doivent être montées avec un milieu de montage organique à base de solvant.

## Réactifs

### A. Matériel fourni

DM841

EnVision™ FLEX  
PEROXIDASE-BLOCKING  
REAGENT  
(Dako Omnis)

**EnVision™ FLEX Peroxidase-Blocking Reagent (Dako Omnis)**

8 x 22,5 mL, prêt à l'emploi

Tampon phosphate contenant du peroxyde d'hydrogène, 15 mmol/L NaN<sub>3</sub> et un détergent.

DM842

EnVision™ FLEX  
/HRP  
(Dako Omnis)

**EnVision™ FLEX /HRP (Dako Omnis)**

8 x 22,5 mL, prêt à l'emploi

Dextrane couplé à des molécules de peroxydase et à des molécules d'anticorps secondaires de chèvre dirigés contre les immunoglobulines de souris et de lapin. Dans une solution tamponnée contenant une protéine stabilisante et un agent conservateur.

DM847

EnVision™ FLEX  
DAB+ CHROMOGEN  
(Dako Omnis)

**EnVision™ FLEX DAB+ Chromogen (Dako Omnis)**

8 x 1 mL

Tétrahydrochlorure de 3,3'-diaminobenzidine dans un solvant organique.

La couleur de ce réactif peut varier de violet foncé à incolore, sans que cela ait une quelconque influence sur la performance du kit.

DM843

EnVision™ FLEX  
SUBSTRATE BUFFER  
(Dako Omnis)

**EnVision™ FLEX Substrate Buffer (Dako Omnis)**

16 x 26 mL

Solution tamponnée contenant du peroxyde d'hydrogène et un agent conservateur.

DM848

EnVision™ FLEX  
TARGET RETRIEVAL SOLUTION  
HIGH pH (50x)  
(Dako Omnis)

**EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (Dako Omnis)**

9 x 68 mL, Tampon Tris/EDTA,

pH 9 concentré 50x.

### B. Matériel requis mais non fourni

Diluant d'anticorps, par ex., Dako Antibody Diluent (réf. S0809)

Clearify Clearing Agent (réf. GC810)

Dako FLEX Ready-to-Use Primary Antibodies ou anticorps primaires de lapin ou de souris concentrés dilués de façon appropriée obtenus auprès de Dako

Instrument Dako Omnis

Ustensiles pour l'appareillage Dako Omnis

Dako Proteinase K, Ready-to-Use (si nécessaire) (réf. S3020)

FLEX Universal Negative Control, Rabbit, Ready-to-Use (réf. GA600), FLEX Universal Negative Control, Mouse, Ready-to-Use (réf. GA750) ou réactif de contrôle négatif approprié pour l'anticorps primaire

Hématoxyline (Dako Omnis) (réf. GC808) ou réactif à l'hématoxyline pour la contre-coloration

Lames de microscope, par ex. les lames Dako FLEX IHC Microscope Slides (réf. K8020)

Milieu de montage (organique à base de solvant) et lamelles de protection  
Tampon de lavage (20x) (Dako Omnis) (réf. GC807)  
Acide sulfurique 0,3 M (réf. GC203)

### C. Réactifs en option

**GV804**  
DM848

EnVision™ FLEX  
TARGET RETRIEVAL SOLUTION  
HIGH pH (50x)  
(Dako Omnis)

**EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (Dako Omnis)**  
3 x 68 mL, Tampon Tris/EDTA,  
pH 9 concentré 50x.

**GV805**  
DM849

EnVision™ FLEX  
TARGET RETRIEVAL SOLUTION  
LOW pH (50x)  
(Dako Omnis)

**EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (50x) (Dako Omnis)**  
3 x 68 mL, Tampon citrate,  
pH 6,1 concentré 50x.

**GC807**  
DM851

WASH BUFFER (20x)  
(Dako Omnis)

**Tampon de lavage (20x) (Dako Omnis)**  
20 x 175 mL, Solution saline de tampon Tris  
contenant du Tween 20, pH 7,6 (± 0,1) concentré 20x.

**GC808**  
DM846

HEMATOXYLIN  
(Dako Omnis)

**Hématoxyline (Dako Omnis)**  
8 x 22,5 mL, prêt à l'emploi  
Solution aqueuse d'hématoxyline.

**GV809**  
DM845

EnVision™ FLEX+  
RABBIT LINKER  
(Dako Omnis)

**EnVision™ FLEX+ Rabbit LINKER (Dako Omnis)**  
1 x 22,5 mL, prêt à l'emploi  
Solution tampon contenant une protéine stabilisante et un agent antimicrobien.

**GV821**  
DM844

EnVision™ FLEX+  
MOUSE LINKER  
(Dako Omnis)

**EnVision™ FLEX+ Mouse LINKER (Dako Omnis)**  
1 x 22,5 mL, prêt à l'emploi  
Solution tampon contenant une protéine stabilisante et un agent antimicrobien.

**GV825**  
DM847 +  
DM843

**EnVision™ FLEX DAB+ Substrate Chromogen System (Dako Omnis)**

EnVision™ FLEX  
DAB+ CHROMOGEN  
(Dako Omnis)

**EnVision™ FLEX DAB+ Chromogen (Dako Omnis)**  
2 x 1 mL  
Tétrahydrochlorure de 3,3'-diaminobenzidine dans un solvant organique.  
La couleur de ce réactif peut varier de violet foncé à incolore, sans que cela ait  
une quelconque influence sur la performance du kit.

EnVision™ FLEX  
SUBSTRATE BUFFER  
(Dako Omnis)

**EnVision™ FLEX Substrate Buffer (Dako Omnis)**  
4 x 26 mL  
Solution tamponnée contenant du peroxyde d'hydrogène et un agent  
conservateur.

## Précautions d'emploi

1. Pour utilisateurs professionnels.
2. EnVision™ FLEX /HRP contient des substances d'origine animale et on ne peut exclure le fait que des quantités infimes de substances humaines puissent être présentes en raison des procédures de fabrication. Comme avec tout produit d'origine biologique, respecter les procédures de manipulation appropriées.
3. Ne pas exposer les produits EnVision™ FLEX Peroxidase-Blocking Reagent, EnVision™ FLEX/HRP, EnVision™ FLEX Substrate Buffer, EnVision™ FLEX DAB+ Chromogen et EnVision™ FLEX Substrate Working Solution à une lumière intense.
4. EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) contient 5 - 10 % trométamol, 1 - 5 % nonoxinol, 1 - 5 % acide acétique (éthylènedinitrilo) tétra-, sel disodique dihydraté. EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) est désigné comme :



### Attention

- |                    |   |
|--------------------|---|
| H319               | Provoque une sévère irritation des yeux.  |
| H411               | Toxique pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme.  |
| P280               | Porter un équipement de protection des yeux ou du visage.   |
| P273               | Éviter le rejet dans l'environnement.   |
| P264               | Se laver les mains soigneusement après manipulation.  |
| P305 + P351 + P338 | EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX : Rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer. |
| P337 + P313        | Si l'irritation oculaire persiste : consulter un médecin.   |
| P501               | Éliminer le contenu et le récipient en conformité avec toutes réglementations locales, régionales, nationales, et internationales.  |
5. Une fiche de données de sécurité destinée aux utilisateurs professionnels est disponible sur demande pour le produit EnVision™ FLEX Peroxidase-Blocking Reagent.
  6. EnVision™ FLEX DAB+ Chromogen contient 1 - 5 % tétrachlorure de biphényle-3,3',4,4'-tétra-yltétrammonium et est désigné comme :



### Danger

- |             |  |
|-------------|--|
| H350        | Peut provoquer le cancer.  |
| H341        | Susceptible d'induire des anomalies génétiques.  |
| P201        | Se procurer les instructions avant utilisation.  |
| P202        | Ne pas manipuler avant d'avoir lu et compris toutes les dispositions de sécurité.  |
| P280        | Porter des gants de protection. Porter un équipement de protection des yeux ou du visage. Porter des vêtements de protection.      |
| P308 + P313 | EN CAS d'exposition prouvée ou suspectée : consulter un médecin.   |
| P405        | Garder sous clef.  |
| P501        | Éliminer le contenu et le récipient en conformité avec toutes réglementations locales, régionales, nationales, et internationales. |

D'une manière générale, les personnes âgées de moins de 18 ans ne sont pas autorisées à utiliser ce produit. Les utilisateurs doivent être formés aux procédures de travail adéquates, aux propriétés dangereuses du produit et aux instructions de sécurité nécessaires. Se reporter à la fiche de données de sécurité pour plus d'informations.

7. Porter un équipement de protection individuelle approprié pour éviter tout contact avec les yeux et la peau.



8. Les solutions non utilisées doivent être éliminées conformément aux réglementations locales et nationales.

## Conservation

Conserver EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) entre 2 et 8 °C. Conserver EnVision™ FLEX Peroxidase-Blocking Reagent, EnVision™ FLEX /HRP, EnVision™ FLEX DAB+ Chromogen et EnVision™ FLEX Substrate Buffer à l'abri de la lumière entre 2 et 8 °C. Pendant la conservation, le bouchon doit être fermé.

La stabilité sur l'appareil de EnVision™ FLEX Peroxidase-Blocking Reagent, EnVision™ FLEX /HRP, EnVision™ FLEX DAB+ Chromogen et EnVision™ FLEX Substrate Buffer est de 75 heures. La stabilité sur l'appareil de EnVision FLEX™ Target Retrieval Solution, High pH et Low pH dilués est de sept jours. La stabilité restante sur l'appareil est suivie par le logiciel Dako Omnis.

Ne pas utiliser après la date de péremption imprimée sur les flacons. Si les réactifs sont conservés dans des conditions autres que celles indiquées, celles-ci doivent être validées par l'utilisateur. Si une coloration inattendue est observée, qui ne peut être expliquée par des différences dans les procédures du laboratoire et qu'un problème lié au produit soit suspecté, contacter l'assistance technique de Dako.

## Préparation des réactifs

### **A.1 EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (DM848, réf. GV804) ou EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (50x) (DM849, réf. GV805)**

Préparer une solution de travail en diluant la solution de restauration des cibles EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) ou Low pH (50x) concentrée au 1:50ème dans de l'eau distillée ou déionisée. La procédure suivante est recommandée :

1. Remplir une bouteille de liquide de rinçage en gros volume Dako Omnis d'eau distillée ou déionisée jusqu'au trait de remplissage (3,325 L). S'assurer que la bouteille repose sur une surface horizontale avant de la remplir.
2. Vider un flacon de 68 mL de EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) ou Low pH (50x) (Dako Omnis) concentré dans la bouteille de liquide de rinçage en gros volume.
3. Transférer l'étiquette amovible du flacon de concentré sur la bouteille de liquide de rinçage en gros volume.
4. Bien fermer le couvercle et retourner délicatement la bouteille de liquide de rinçage en gros volume à 2 ou 3 reprises.

La solution diluée restante peut être conservée entre 2 et 8 °C pendant un mois. La solution diluée peut être utilisée pendant sept jours lorsqu'elle est conservée sur l'instrument Dako Omnis. Jeter la solution si elle a un aspect trouble.

### **A.2 Wash Buffer (20x) (DM851, réf. GC807)**

Préparer une solution de travail en diluant le tampon de lavage Wash Buffer (20x) (Dako Omnis) concentré au 1:20ème dans une bouteille de liquide de rinçage en gros volume Dako Omnis avec de l'eau distillée ou déionisée. Pour minimiser la formation de mousse, la procédure suivante est recommandée :

1. Remplir une bouteille de liquide de rinçage en gros volume Dako Omnis d'eau distillée ou déionisée jusqu'au trait de remplissage (3,325 L). S'assurer que la bouteille repose sur une surface horizontale avant de la remplir.
2. Vider un flacon de concentré de tampon de lavage Wash Buffer (20x) (Dako Omnis) de 175 mL dans la bouteille de liquide de rinçage en gros volume.
3. Transférer l'étiquette amovible du flacon de concentré sur la bouteille de liquide de rinçage en gros volume.
4. Bien fermer le couvercle et retourner délicatement la bouteille de liquide de rinçage en gros volume à 2 ou 3 reprises.

La solution diluée restante peut être conservée entre 2 et 8 °C pendant un mois. La solution diluée peut être utilisée pendant sept jours lorsqu'elle est conservée sur l'instrument Dako Omnis. La stabilité restante sur l'appareil est suivie par le logiciel Dako Omnis. Jeter la solution si elle a un aspect trouble.

### **A.3 EnVision™ FLEX Substrate Working Solution**

La solution de travail du substrat EnVision™ FLEX Substrate Working Solution contenant de la DAB est préparée sur l'instrument Dako Omnis. Le processus automatisé mélange une part de EnVision™ FLEX DAB+ Chromogen (DM847) et 50 parts de EnVision™ FLEX Substrate Buffer (DM843). La solution de travail du substrat sera toujours préparée pour un portoir (contenant 1 à 5 lames) à la fois. Les volumes fournis sont suffisants pour charger 200 portoirs.

## Prélèvement et préparation des échantillons

Les échantillons doivent être des coupes de tissus fixées au formol et incluses en paraffine.

Le temps de fixation dépend du fixateur et du type/de l'épaisseur du tissu. Par exemple, les blocs de tissu d'une épaisseur de 3 à 4 mm doivent être fixés au formol neutre tamponné pendant 18 à 24 heures.

L'épaisseur optimale des coupes incluses en paraffine est de 4 µm.

Les échantillons doivent être montés sur des lames de microscope. 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).

Les coupes doivent être montées sur les lames, en restant aussi plates que possible et avec le moins de plis possible. Trop de plis aurait un impact sur les résultats de la coloration.

**REMARQUE :** Les lames de microscope doivent posséder une largeur adaptée à l'instrument Dako Omnis. Se reporter au Guide d'utilisation de base du Dako Omnis pour consulter les caractéristiques des lames de microscope utilisables sur l'instrument.

Les coupes en paraffine doivent être montées depuis un bain préchauffé contenant de l'eau distillée ou déionisée. Le bain-marie ne doit contenir aucun additif (tel que de la gélatine, de la poly-L-lysine, etc.). Les coupes doivent être séchées par chauffage, en général à une température ne dépassant pas 60 °C pendant 60 minutes maximum. Pour garantir une bonne adhérence des coupes aux lames, il est important d'égoutter l'eau se trouvant sous les coupes avant de passer à la procédure de séchage dans une étuve.

## Procédure

Le système de visualisation EnVision™ FLEX a été conçu pour une utilisation sur l'instrument Dako Omnis en association avec les anticorps primaires Dako.

La procédure automatisée sur Dako Omnis inclut le déparaffinage des coupes de tissu, la restauration d'épitope induite par la chaleur, la coloration immunohistochimique et la contre-coloration des coupes de tissu fixées au formol et incluses en paraffine. Les étapes du protocole pour les procédures automatisées peuvent être affichées, imprimées et éditées conformément au Guide d'utilisation de base du Dako Omnis et au Guide d'utilisation avancée (Dako Omnis Advanced User Guide).

La procédure de prétraitement et le protocole de coloration dépendent de l'anticorps. Veuillez vous reporter à la notice de chaque anticorps primaire Dako.

Avant d'exécuter des protocoles sur l'instrument Dako Omnis, lire attentivement le Guide d'utilisation de base du Dako Omnis.

Le protocole EnVision™ FLEX est préprogrammé dans le logiciel Dako Omnis. Se reporter au Guide d'utilisation de base du Dako Omnis pour plus de détails sur la préparation de l'instrument à la coloration, et au Dako Omnis Advanced User Guide (Guide d'utilisation avancée du Dako Omnis) pour plus de détails sur les protocoles.

### Procédure de coloration

Lorsque vous utilisez des anticorps primaires FLEX RTU pour Dako Omnis, le protocole de coloration optimal est programmé dans le logiciel Dako Omnis.

Se reporter à la notice individuelle des anticorps primaires FLEX RTU et des anticorps primaires concentrés Dako pour obtenir la méthode de prétraitement optimale et les durées d'incubation adéquates. Pour configurer facilement de nouveaux protocoles, il est recommandé d'utiliser l'un des modèles de protocole décrits ci-dessous.

À partir de la station de travail Dako Omnis, choisir l'un des trois modèles de protocole contenant les étapes de coloration et les durées d'incubation recommandées pour le système de visualisation EnVision™ FLEX (se reporter au Tableau 2 pour une vue d'ensemble) :

FLEX  
FLEX+ Mouse  
FLEX+ Rabbit

(125835-001)

P04120EFG\_01\_GV800/2015.05 p. 19/32

Les modèles de protocole peuvent être utilisés pour générer des protocoles personnalisés pour des anticorps primaires donnés. Les étapes de protocole suivantes peuvent être personnalisées :

- Réactif de restauration d'épitope (pour la restauration d'épitope induite par la chaleur), température et durée d'incubation
- Anticorps primaire et durée d'incubation
- Durée d'incubation du polymère marqué (réduction uniquement)
- Contre-colorant et durée d'incubation

L'utilisateur doit vérifier le protocole appliqué.

Si les protocoles ne sont pas disponibles sur le système Dako Omnis, contacter l'assistance technique de Dako.

Tableau 2 : Vue d'ensemble des modèles de protocole EnVision™ FLEX/FLEX+.

Phase	Étape	Réactif	Modèle de protocole de coloration		
			FLEX	FLEX+ Mouse	FLEX+ Rabbit
Déparaffinage	Déparaffinage	Clearify Clearing Agent	Oui	Oui	Oui
Restauration des cibles	Restauration des cibles	EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH ou EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, Low pH ou Réactif personnalisé	97 ± 2 °C* 30 min*	97 ± 2 °C* 30 min*	97 ± 2 °C* 30 min*
Coloration	Lavage	Wash Buffer (Dako Omnis)	Lavage	Lavage	Lavage
	Anticorps primaire	20 min*	20 min*	20 min*	20 min*
	Lavage	Wash Buffer (Dako Omnis)	Lavage	Lavage	Lavage
	Blocage enzymatique endogène	EnVision™ FLEX Peroxidase-Blocking Reagent	3 min	3 min	3 min
	Lavage	Wash Buffer (Dako Omnis)	Lavage	Lavage	Lavage
	Réactif secondaire	EnVision™ FLEX+ Mouse ou Rabbit LINKER	-	Mouse LINKER 10 min	Rabbit LINKER 10 min
	Lavage	Wash Buffer (Dako Omnis)	-	Lavage	Lavage
	Polymère marqué	EnVision™ FLEX/HRP	20 min*	20 min*	20 min*
	Lavage	Wash Buffer (Dako Omnis)	Lavage	Lavage	Lavage
	Lavage	Wash Buffer (Dako Omnis)	Lavage	Lavage	Lavage
	Substrat chromogène	EnVision™ FLEX Substrate Working Solution	5 min	5 min	5 min
	Lavage	Wash Buffer (Dako Omnis)	Lavage	Lavage	Lavage
	Contre-coloration	Contre-coloration	Hematoxylin (Dako Omnis)*	3 min*	3 min*
Lavage		Eau déionisée	Lavage	Lavage	Lavage
Lavage		Wash Buffer (Dako Omnis)	Lavage	Lavage	Lavage

\* Personnalisation est possible.

#### Procédure post-coloration

1. À la fin du cycle, retirer le portoir à lames de l'Unloading Station (station de déchargement) et immerger les portoirs dans de l'eau déionisée propre.
2. Déshydrater, éclaircir et monter les coupes à l'aide d'un milieu de montage permanent, puis déposer sur les lames des lamelles de protection.

## **Contrôle qualité**

Chaque cycle de coloration doit comprendre un échantillon de contrôle positif connu pour vérifier la bonne performance de tous les réactifs appliqués. Si l'échantillon de contrôle positif ne présente pas de coloration positive, le marquage des échantillons à analyser doit être considéré comme non valide.

Un réactif de contrôle négatif doit être utilisé avec chaque échantillon afin d'identifier toute coloration non spécifique. Si une coloration non spécifique ne peut pas être clairement différenciée de la coloration spécifique, le marquage de l'échantillon à analyser doit être considéré comme non valide.

## **Interprétation des résultats**

La solution de travail du substrat contenant de la diaminobenzidine produit une coloration brune sur le site de l'antigène cible reconnu par l'anticorps primaire. La couleur brune doit être présente sur l'échantillon de contrôle positif là où l'antigène cible est attendu. Si une coloration non spécifique est présente, elle sera reconnue comme une coloration brune diffuse sur les lames traitées avec le réactif de contrôle négatif. Les noyaux seront colorés en bleu par le contre-colorant à l'hématoxyline.

## **Limites**

1. Pour une utilisation automatisée sur les instruments Dako Omnis uniquement. Lors d'une coloration d'anticorps primaires concentrés Dako, la procédure optimale doit être déterminée et vérifiée par l'utilisateur.
2. Réservé à une utilisation sur des coupes de tissus fixées au formol et incluses en paraffine uniquement. Lors de l'utilisation de coupes congelées ou de frottis cellulaires, la procédure optimale doit être déterminée et vérifiée par l'utilisateur à moins qu'elle soit spécifiée dans la notice de l'anticorps primaire spécifique de Dako. Des modifications apportées à la procédure peuvent avoir une influence sur le nombre de tests que le kit permet d'effectuer.

## **DEUTSCH**

### **Verwendungszweck**

Zur In-vitro-Diagnostik.

Das EnVision™ FLEX, High pH (Dako Omnis) Detektionssystem ist für die Verwendung in der Immunhistochemie in Verbindung mit Dako Omnis Geräten bestimmt. Das System weist primäre Maus- und Kaninchen-Antikörper nach und zeigt die Reaktion durch EnVision™ FLEX DAB+ Chromogen an. Durch Verwendung von EnVision™ FLEX+ Rabbit LINKER (Code-Nr. GV809) bzw. EnVision™ FLEX+ Mouse LINKER (Code-Nr. GV821) können die Signale der primären Maus- bzw. Kaninchenantikörper verstärkt werden. Die EnVision™ FLEX Reagenzien sind zur Verwendung auf formalinfixierten, paraffineingebetteten Gewebeschnitten vorgesehen.

### **Zusammenfassung und Erklärung**

Das EnVision™ FLEX Detektionssystem ist ein flexibles System, das bei Dako Omnis Geräten bei Verwendung des in der Packungsbeilage empfohlenen Protokolls optimale Färbung bietet.

Vor der Färbung werden die formalinfixierten, paraffineingebetteten Gewebeschnitte einer integrierten Entparaffinierung und Rehydrierung, gefolgt von hitzeinduzierter Epitopdemaskierung (HIER) mit der in der Packungsbeilage des primären Antikörpers angegebenen Demaskierungsreagenz unterzogen. Dieses Kit enthält EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (DM848). Alternativ dazu kann EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (Code-Nr. GV8004) oder EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (50x) (Code-Nr. GV805) eingesetzt werden. Bei einigen primären Antikörpern sind die Färbeergebnisse besser, wenn anstelle des HIER-Verfahrens eine Gewebepreparierung mit Enzymen vorgenommen wird.

Endogene Peroxidase sollte mit dem im Kit enthaltenen EnVision™ FLEX Peroxidase-Blocking Reagent (DM841) blockiert werden. Das wirkungsvolle Waschverfahren und die in den Dako-Reagenzien vorhandenen Stabilisationsproteine machen weitere Blockierungsschritte zur Verminderung einer unspezifischen Hintergrundfärbung überflüssig.

Es wird die Verwendung eines Waschpuffers (20x) (GC807) empfohlen, der als optionales Reagenz erhältlich ist.

Primäre Antikörper gehören nicht zum Lieferumfang. Wir empfehlen Dako FLEX Ready-to-Use Primary Antibodies bzw. konzentrierte Primary Antibodies von Dako (siehe entsprechende Packungsbeilagen).

EnVision™ FLEX+ Rabbit LINKER (Code-Nr. GV809) kann wahlweise zur Verstärkung des Signals von primären Kaninchen-Antikörpern eingesetzt werden. Bei der Verwendung von primären Maus-Antikörpern kann zur Verstärkung des Signals EnVision™ FLEX+ Mouse LINKER (Code-Nr. GV821) eingesetzt werden. Als Richtwert: EnVision™ FLEX+ Rabbit LINKER liefert zwei- bis dreifache Signalverstärkung, EnVision™ FLEX+ Mouse LINKER vier- bis fünffache Signalverstärkung.

Dako EnVision™ FLEX /HRP Reagenz (DM822) im Kit besteht aus einem Dextran-Backbone, an den zahlreiche Meerrettichperoxidase (HRP)-Moleküle und Moleküle sekundärer Antikörper gekoppelt sind. Die Kupplungsreaktion besteht aus einer einzigartigen chemischen Reaktion, die es ermöglicht, pro Backbone bis zu 100 HRP-Moleküle und bis zu 20 Antikörper-Moleküle zu binden.

Das Substratsystem im Kit besteht aus zwei Komponenten: EnVision™ FLEX DAB+ Chromogen (DM847), einer konzentrierten Diaminobenzidinlösung (DAB-Lösung), und dem wasserstoffperoxidhaltigen EnVision™ FLEX Substrate Buffer (DM843). Vor der Anwendung muss EnVision™ FLEX DAB+ Chromogen mit EnVision™ FLEX Substrate Buffer verdünnt werden. Das Substratsystem führt zu einem kontrastreichen braunen Endprodukt am Ort des Zielantigens. Zeitgerechtes Mischen von Chromogen und Puffer erfolgt automatisch im Dako Omnis.

Zum Gegenfärben wird Hämatoxylin (Code-Nr. GC808) empfohlen. Dieses Reagenz erzeugt eine deutliche nukleare Blaufärbung.

Zum Eindecken der gefärbten Gewebeschnitte eignen sich Eindeckmedien auf Basis organischer Lösungsmittel.

## Reagents (Reagenzien)

### A. Mitgelieferte Materialien

DM841

EnVision™ FLEX  
PEROXIDASE-BLOCKING  
REAGENT  
(Dako Omnis)

**EnVision™ FLEX Peroxidase-Blocking Reagent (Dako Omnis)**

8 x 22,5 mL, gebrauchsfertig

Wasserstoffperoxidhaltiger Phosphatpuffer, 15 mmol/L NaN<sub>3</sub> und Detergenz.

DM842

EnVision™ FLEX  
/HRP  
(Dako Omnis)

**EnVision™ FLEX /HRP (Dako Omnis)**

8 x 22,5 mL, gebrauchsfertig

Mit Peroxidasemolekülen und sekundären Ziegenantikörpermolekülen gegen Kaninchen- und Maus-Immunglobuline gekoppeltes Dextran. In gepufferter Lösung mit Stabilisatorprotein und Konservierungsmittel.

DM847

EnVision™ FLEX  
DAB+ CHROMOGEN  
(Dako Omnis)

**EnVision™ FLEX DAB+ Chromogen (Dako Omnis)**

8 x 1 mL

3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid in organischem Lösungsmittel.

Farbschwankungen bei diesem Reagenz (kräftig violett bis farblos) haben keinerlei Einfluss auf die Leistung des Kits.

DM843

EnVision™ FLEX  
SUBSTRATE BUFFER  
(Dako Omnis)

**EnVision™ FLEX Substrate Buffer (Dako Omnis)**

16 x 26 mL

Gepufferte Lösung mit Wasserstoffperoxid und Konservierungsmittel.

DM848

EnVision™ FLEX  
TARGET RETRIEVAL SOLUTION  
HIGH pH (50x)  
(Dako Omnis)

**EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (Dako Omnis)**

9 x 68 mL, 50fach konzentriert

Tris/EDTA-Puffer, pH 9

### B. Erforderliches, aber nicht mitgeliefertes Material

Antikörperversdünner, z. B. Dako Antibody Diluent (Code-Nr. S0809)

Clarify Clearing Agent (Code-Nr. GC810)

Gebrauchsfertige Dako FLEX Primary Antibodies oder entsprechend verdünnte konzentrierte primäre Kaninchen- bzw. Mausantikörper von Dako

Dako Omnis Gerät

Zubehör für Dako Omnis Geräte

Dako Proteinase K, gebrauchsfertig (falls erforderlich) (Code-Nr. S3020)

FLEX Universal Negative Control, Rabbit, Ready-to-Use (Code-Nr. GA600), FLEX Universal Negative Control, Mouse, Ready-to-Use (Code-Nr. GA750) oder geeignetes Negativkontrollreagenz für primären Antikörper

Hematoxylin (Dako Omnis) (Code-Nr. GC808) oder geeignetes Hämatoxylin-Reagenz zum Gegenfärben

Objektträger, z. B. Dako FLEX IHC Microscope Slides (Code-Nr. K8020)

Eindeckmedium (auf Basis organischer Lösungsmittel) und Deckgläser

Wash Buffer (20x) (Dako Omnis) (Code-Nr. GC807)

0.3 M Sulfuric Acid (Code-Nr. GC203)



## C. Optionale Reagenzien

**GV804**  
DM848

EnVision™ FLEX  
TARGET RETRIEVAL SOLUTION  
HIGH pH (50x)  
(Dako Omnis)

**EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (Dako Omnis)**  
3 x 68 mL, 50fach konzentriert  
Tris/EDTA-Puffer, pH 9

**GV805**  
DM849

EnVision™ FLEX  
TARGET RETRIEVAL SOLUTION  
LOW pH (50x)  
(Dako Omnis)

**EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (50x) (Dako Omnis)**  
3 x 68 mL, 50fach konzentriert  
Citrat-Puffer, pH 6,1

**GC807**  
DM851

WASH BUFFER (20x)  
(Dako Omnis)

**Wash Buffer (20x) (Dako Omnis)**  
20 x 175 L, 20fach konzentriert  
Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween 20, pH 7,6 (±0,1).

**GC808**  
DM846

HEMATOXYLIN  
(Dako Omnis)

**Hematoxylin (Dako Omnis)**  
8 x 22,5 mL, gebrauchsfertig  
Wässrige Hämatoxylinlösung.

**GV809**  
DM845

EnVision™ FLEX+  
RABBIT LINKER  
(Dako Omnis)

**EnVision™ FLEX+ Rabbit LINKER (Dako Omnis)**  
1 x 22,5 mL, gebrauchsfertig  
Gepufferte Lösung mit Stabilisierungsprotein und antimikrobieller Substanz.

**GV821**  
DM844

EnVision™ FLEX+  
MOUSE LINKER  
(Dako Omnis)

**EnVision™ FLEX+ Mouse LINKER (Dako Omnis)**  
1 x 22,5 mL, gebrauchsfertig  
Gepufferte Lösung mit Stabilisierungsprotein und antimikrobieller Substanz.

**GV825**  
DM847 +  
DM843

**EnVision™ FLEX DAB+ Substrate Chromogen System (Dako Omnis)**

EnVision™ FLEX  
DAB+ CHROMOGEN  
(Dako Omnis)

**EnVision™ FLEX DAB+ Chromogen (Dako Omnis)**  
2 x 1 mL  
3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid in organischem Lösungsmittel.  
Farbschwankungen bei diesem Reagenz (kräftig violett bis farblos) haben  
keinerlei Einfluss auf die Leistung des Kits.

EnVision™ FLEX  
SUBSTRATE BUFFER  
(Dako Omnis)

**EnVision™ FLEX Substrate Buffer (Dako Omnis)**  
4 x 26 mL  
Gepufferte Lösung mit Wasserstoffperoxid und Konservierungsmittel.

## Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen

1. Für geschultes Fachpersonal.
2. EnVision™ FLEX/HRP enthalten Material tierischen Ursprungs; es kann nicht ausgeschlossen werden, dass aufgrund der Herstellungsverfahren auch Spuren von Material menschlichen Ursprungs enthalten sind. Wie alle Produkte biologischen Ursprungs muss auch dieses entsprechend gehandhabt werden.
3. EnVision™ FLEX Peroxidase-Blocking Reagent, EnVision™ FLEX /HRP, EnVision™ FLEX Substrate Buffer, EnVision™ FLEX DAB+ Chromogen oder EnVision™ FLEX Substrat-Arbeitslösung keinem starken Lichteinfall aussetzen.
4. EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) enthält 5 - 10% Trometamol, 1 - 5% Nonoxinol, 1 - 5% Essigsäure (Ethylendinitrilo) Tetra-, Dinatriumsalz-Dihydrat. EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) ist wie folgt gekennzeichnet:



### Achtung

- |                    |  |
|--------------------|--|
| H319               | Verursacht schwere Augenreizungen.   |
| H411               | Giftig für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.  |
| P280               | Augenschutz oder Gesichtsschutz tragen.  |
| P273               | Freisetzung in die Umwelt vermeiden.   |
| P264               | Nach Gebrauch Hände gründlich waschen.   |
| P305 + P351 + P338 | BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser ausspülen. Eventuell Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter ausspülen. |
| P337 + P313        | Bei anhaltender Augenreizung: ärztliche Hilfe hinzuziehen.   |
| P501               | Inhalt und Behälter in Übereinstimmung mit allen lokalen, regionalen, nationalen und internationalen Gesetzen entsorgen.                                       |
5. Für EnVision™ FLEX Peroxidase-Blocking Reagent steht auf Anfrage für professionelle Benutzer ein Sicherheitsdatenblatt zur Verfügung.
  6. EnVision™ FLEX DAB+ Chromogen enthält 1 - 5% Biphenyl-3,3',4,4'-tetrayltetraammoniumtetrachlorid und ist wie folgt gekennzeichnet:



### Gefahr

- |            |  |
|------------|--|
| H350       | Kann Krebs erzeugen.   |
| H341       | Steht im Verdacht, genetische Defekte zu verursachen.  |
| P201       | Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen.   |
| P202       | Vor Handhabung sämtliche Sicherheitsratschläge lesen und verstehen.  |
| P280       | Schutzhandschuhe tragen. Augenschutz oder Gesichtsschutz tragen. Schutzkleidung tragen.                                  |
| P308+ P313 | BEI Exposition oder falls betroffen Ärztliche Hilfe anfordern.   |
| P405       | Unter Verschluss aufbewahren.  |
| P501       | Inhalt und Behälter in Übereinstimmung mit allen lokalen, regionalen, nationalen und internationalen Gesetzen entsorgen. |

Als Hauptregel ist die Arbeit mit diesem Produkt Personen unter 18 Jahren untersagt. Der Benutzer ist in der Ausführung der Arbeit den gefährlichen Eigenschaften dieses Produktes sowie den notwendigen Sicherheitsmaßnahmen gründlich zu unterweisen. Weitere Informationen entnehmen Sie dem Sicherheitsdatenblatt (SDB).

7. Entsprechende Schutzkleidung tragen, um Augen- und Hautkontakt zu vermeiden.
8. Nicht verwendete Lösung ist entsprechend der örtlichen, staatlichen und EU-rechtlichen Bestimmungen zu entsorgen.

## Lagerung

Store EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) bei 2-8 °C. Store EnVision™ FLEX Peroxidase-Blocking Reagent, EnVision™ FLEX /HRP, EnVision™ FLEX DAB+ Chromogen und EnVision™ FLEX Substrate Buffer im Dunkeln bei 2-8 °C. Während der Lagerung ist der Deckel geschlossen zu halten.

Stabilität im Gerät von EnVision™ FLEX Peroxidase-Blocking Reagent, EnVision™ FLEX/HRP EnVision™ FLEX DAB+ Chromogen und EnVision™ FLEX Substrate Buffer beträgt 75 Stunden. Stabilität im Gerät von verdünnter EnVision FLEX™ Target Retrieval Solution, High pH und Low pH beträgt 7 Tage. Die verbleibende Stabilität im Gerät wird von der Dako Omnis Software protokolliert.

Nach Ablauf des auf den Behältern aufgedruckten Verfallsdatums nicht mehr verwenden. Werden die Reagenzien unter anderen als den angegebenen Bedingungen aufbewahrt, müssen diese Bedingungen vom Benutzer validiert 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 Produkt besteht, ist Kontakt mit dem Dako Technischen Kundendienst aufzunehmen.

## Reagenzienvorbereitung

### **A.1 EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (DM848, Code-Nr. GV804) oder EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (50x) (DM849, Code-Nr. GV805)**

Eine Arbeitslösung durch Verdünnen der konzentrierten EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) oder Low pH (50x) mit destilliertem oder entionisiertem Wasser im Verhältnis 1:50 herstellen. Empfohlen wird folgendes Verfahren:

1. Eine Dako Omnis Spülflasche bis zur Fülllinie mit destilliertem oder entionisiertem Wasser befüllen (3,325 L). Spülflasche vor dem Befüllen auf eine ebene Oberfläche stellen.
2. Eine 68-mL-Flasche konzentrierte EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) oder Low pH (50x) (Dako Omnis) in die Spülflasche füllen.
3. Ablösbare Kennzeichnung von der Konzentratflasche auf die Spülflasche übertragen.
4. Deckel aufsetzen und Spülflasche vorsichtig zwei bis drei Male umdrehen.

Unverbrauchte verdünnte Lösung kann bei 2-8 °C einen Monat lang aufbewahrt werden. Die verdünnte Lösung kann bei Lagerung im Dako Omnis Gerät 7 Tage lang gebraucht werden. Angesetzte Lösung mit getrübbem Aussehen muss entsorgt werden

### **A.2 Wash Buffer (20x) (DM851, Code-Nr. GC807)**

Arbeitslösung durch Verdünnen des konzentrierten Wash Buffer (20x) (Dako Omnis) 1:20 mit destilliertem oder entionisiertem Wasser in Dako Omnis Spülflasche vorbereiten. Zum Minimieren der Schaumbildung wird folgendes Verfahren empfohlen:

1. Eine Dako Omnis Spülflasche bis zur Fülllinie mit destilliertem oder entionisiertem Wasser befüllen (3,325 L). Spülflasche vor dem Befüllen auf eine ebene Oberfläche stellen.
2. Eine 175-mL-Flasche konzentrierten Wash Buffer (20x) (Dako Omnis) in eine Spülflasche füllen.
3. Ablösbare Kennzeichnung von der Konzentratflasche auf die Spülflasche übertragen.
4. Deckel aufsetzen und Spülflasche vorsichtig zwei bis drei Male umdrehen.

Unverbrauchte verdünnte Lösung kann bei 2-8 °C einen Monat lang aufbewahrt werden. Die verdünnte Lösung kann bei Lagerung im Dako Omnis Gerät 7 Tage lang gebraucht werden. Die verbleibende Stabilität im Gerät wird von der Dako Omnis Software protokolliert. Angesetzte Lösung mit getrübbem Aussehen muss entsorgt werden

### **A.3 EnVision™ FLEX Substrate Working Solution**

Die DAB-haltige EnVision™ FLEX Substrate Working Solution wird im Dako Omnis Gerät vorbereitet. Bei dem automatischen Prozess wird ein Teil von EnVision™ FLEX DAB+ Chromogen (DM847) mit 50 Teilen EnVision™ FLEX Substrate Buffer (DM843) gemischt. Substratarbeitslösung wird immer für einen Halter (mit 1-5 Objektträgern) gleichzeitig vorbereitet. Die bereitgestellten Volumen reichen für das Bestücken von 200 Haltern.

## Entnahme und Vorbereitung der Probe

Als Proben kommen formalinfixierte, paraffineingebettete Gewebeschnitte in Betracht.

Die Fixierung hängt von Art/Dicke des Fixationsmittels und des Gewebes ab. Zum Beispiel sollten Gewebelöcke mit einer Dicke von 3-4 mm in neutral gepuffertem Formalin 18-24 Stunden fixiert werden.

Die optimale Dicke paraffineingebetteter Schnitte beträgt 4 µm.

Die Proben auf Mikroskop-Objektträgern fixieren. Für eine bessere Haftung der Gewebeschnitte an den Glas-Objektträgern werden FLEX IHC Microscope Slides (Code-Nr. K8020) empfohlen.

Die Schnitte so flach und faltenfrei wie möglich auf den Objektträgern aufbringen. Zu viele Falten wirken sich negativ auf die Färbeergebnisse aus.

**HINWEIS:** Die Größe der Objektträger muss zum Dako Omnis Gerät passen. Eine Definition für verwendbare Objektträger befindet sich im Dako Omnis Benutzerhandbuch Basiswissen.

Paraffinschnitte sollten aus einem vorgewärmten Wasserbad mit destilliertem oder entionisiertem Wasser heraus fixiert werden. Dieses Wasserbad darf keine Zusätze enthalten (wie z. B. Gelatine, Poly-L-Lysin usw.). Die Schnitte werden bis zu 60 Minuten lang unter Wärme getrocknet, gewöhnlich bei einer Temperatur von höchstens 60 °C. Damit die Schnitte gut auf den Objektträgern haften, muss vor dem Trockenprozess im Ofen alles Wasser unter den Schnitten entfernt worden sein.

## Verfahren

Das EnVision™ FLEX Detektionssystem wurde für die Verwendung im Dako Omnis Gerät in Verbindung mit Dako Primary Antibodies entwickelt.

Das automatische Verfahren im Dako Omnis umfasst die Entparaffinierung von Gewebeschnitten, hitzeinduzierte Epitopdemaskierung, immunhistochemische Färbung und Gegenfärbung von mit Formalin fixierten, paraffineingebetteten Gewebeschnitten. Die Protokollschnitte für die automatischen Verfahren können gemäß dem Dako Omnis Handbuch Basiswissen und dem erweiterten Benutzerhandbuch angezeigt, gedruckt und bearbeitet werden.

Das Vorbehandlungsverfahren und das Färbeprotokoll hängen vom Antikörper ab. Angaben bitte der Packungsbeilage des jeweiligen primären Antikörpers von Dako entnehmen.

Vor dem Ausführen von Protokollen im Dako Omnis Gerät sorgfältig das Dako Omnis Benutzerhandbuch Basiswissen lesen.

Das EnVision™ FLEX Protokoll ist in der Dako Omnis Software vorprogrammiert. Weitere Anweisungen zum Vorbereiten des Geräts zum Färben befinden sich im Dako Omnis Benutzerhandbuch Basiswissen und weitere Anweisungen zu Protokollen im Dako Omnis erweiterten Benutzerhandbuch.

## Färbeverfahren

Für die Verwendung von FLEX RTU Primary Antibodies für Dako Omnis ist das optimale Färbeprotokoll in die Dako Omnis Software programmiert.

Die optimale Vorbehandlung und die Inkubationszeiten für den einzelnen FLEX RTU Primary Antibody oder konzentrierten Dako Primary Antibody sind in der jeweiligen Packungsbeilage zu finden. Für die einfache Einrichtung neuer Protokolle sollten die unten beschriebenen Protokollvorlagen verwendet werden.

Von der Dako Omnis Workstation eine von drei Protokollvorlagen mit den empfohlenen Färbeschritten und Inkubationszeiten für das EnVision™ FLEX Detektionssystem auswählen (Übersicht siehe Tabelle 2):

FLEX  
FLEX+ Mouse  
FLEX+ Rabbit

Die Protokollvorlagen können für die Erzeugung von benutzerdefinierten Protokollen für spezifische primäre Antikörper verwendet werden. Die folgenden Protokollschritte können angepasst werden:

- Demaskierungsreagenz (für hitzeinduzierte Epitopdemaskierung), Temperatur und Inkubationszeit
- Primärer Antikörper und Inkubationszeit
- Inkubationszeit mit markiertem Polymer (nur Reduktion)
- Gegenfärbungsreagenz und Inkubationszeit

Die Verifizierung des verwendeten Protokolls obliegt dem Anwender.

Wenn die Protokolle im Dako Omnis System nicht verfügbar sind, wenden Sie sich an den Dako Technischen Kundendienst.

Tabelle 2. Übersicht über EnVision™ FLEX/FLEX+ Protokollvorlagen.

Phase	Schritt	Reagenz	Färbeprotokollvorlage		
			FLEX	FLEX+ Mouse	FLEX+ Rabbit
Wachs-entfernung	Wachs-entfernung	Clarify Clearing Agent	Ja	Ja	Ja
Demaskierung	Demaskierung	EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH oder EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, Low pH oder Anwenderspezifisches Reagenz	97±2 °C* 30 min*	97±2 °C* 30 min*	97±2 °C* 30 min*
Färbung	Waschen	Wash Buffer (Dako Omnis)	Waschen	Waschen	Waschen
	Primärantikörper	20 min*	20 min*	20 min*	20 min*
	Waschen	Wash Buffer (Dako Omnis)	Waschen	Waschen	Waschen
	Endogener Enzymblock	EnVision™ FLEX Peroxidase-Blocking Reagent	3 min	3 min	3 min
	Waschen	Wash Buffer (Dako Omnis)	Waschen	Waschen	Waschen
	Sekundäres Reagenz	EnVision™ FLEX+ Mouse oder Rabbit LINKER	-	Mouse LINKER 10 min	Rabbit LINKER 10 min
	Waschen	Wash Buffer (Dako Omnis)	-	Waschen	Waschen
	Markiertes Polymer	EnVision™ FLEX/HRP	20 min*	20 min*	20 min*
	Waschen	Wash Buffer (Dako Omnis)	Waschen	Waschen	Waschen
	Waschen	Wash Buffer (Dako Omnis)	Waschen	Waschen	Waschen
	Substratchromogen	EnVision™ FLEX Substrate Working Solution	5 min	5 min	5 min
	Waschen	Wash Buffer (Dako Omnis)	Waschen	Waschen	Waschen
Gegen-färbung	Gegenfärbung	Hematoxylin (Dako Omnis)	3 min*	3 min*	3 min*
	Waschen	Entionisiertes Wasser	Waschen	Waschen	Waschen
	Waschen	Wash Buffer (Dako Omnis)	Waschen	Waschen	Waschen

\* Anpassung ist möglich.

### **Nach-Färbeverfahren**

1. Nach Abschluss des Durchlaufs Objektträgerhalter aus der Entladestation entfernen und Halter in frisches, deionisiertes Wasser tauchen.
2. Dehydrieren, klären und Objektträger mit permanentem Eindeckmedium und Deckgläsern eindecken.

### **Qualitätskontrolle**

Bei jedem Färbedurchlauf sollte eine als positiv bekannte Kontrollprobe mitgeführt werden, um die Leistung aller verwendeten Reagenzien zu bestätigen. Wenn das Positivkontrollgewebe keine Färbung aufweist, muss die Markierung der Testproben für ungültig erklärt werden.

Zum Ausschluss einer unspezifischen Färbung sollte ferner stets ein Negativkontrollreagenz mitlaufen. Ist die unspezifische Färbung nicht eindeutig von der spezifischen Färbung zu unterscheiden, muss die Markierung der Testproben für ungültig erklärt werden.












### **Auswertung der Ergebnisse**

Die Diaminobenzidin enthaltende Substrat-Arbeitslösung erzeugt am Ort des vom primären Antikörper erkannten Zielantigens ein braunes Endprodukt. Die Braunfärbung muss am erwarteten Ort des Zielantigens auf der Positivkontrolle vorhanden sein. Eine unspezifische Färbung stellt sich als eher diffuse Braunfärbung der mit dem Negativkontrollreagenz behandelten Objektträger dar. Zellkerne werden durch die Hämatoxylin-Gegenfärbung blau gefärbt.

### **Einschränkungen**

1. Nur für die automatisierte Benutzung in Dako Omnis Geräten. Das optimale Verfahren zum Färben mit konzentrierten Dako Primary Antibodies muss vom Anwender ermittelt und überprüft werden.
2. Nur zur Benutzung mit formalinfixierten, paraffineingebetteten Gewebeschnitten. Bei der Benutzung gefrorener Gewebeschnitte oder Zellabstriche muss der optimale Arbeitsablauf vom Benutzer ermittelt und festgelegt werden, solange dieser nicht in der Packungsbeilage für den spezifischen Dako Primary Antibody beschrieben ist. Änderungen des Arbeitsablaufes können Auswirkungen auf die Anzahl der im Kit mitgelieferten Tests haben.

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

 <p>Catalogue number Référence du catalogue Bestellnummer</p>	 <p>Temperature limitation Limites de température Zulässiger Temperaturbereich</p>	 <p>Batch code Code du lot Chargenbezeichnung</p>	 <p>GHS hazard pictogram (consult precautions section) Pictogrammes de danger SGH (voir la section Précautions d'emploi) GHS-Gefahrensymbol (siehe Abschnitt zu den Sicherheitshinweisen)</p>
 <p>In vitro diagnostic medical device Dispositif médical de diagnostic in vitro In-vitro-Diagnostikum</p>	 <p>Store in the dark Conserver dans l'obscurité Im Dunkeln aufbewahren</p>	 <p>Use by Utiliser avant Verwendbar bis</p>	 <p>GHS hazard pictogram (consult precautions section) Pictogrammes de danger SGH (voir la section Précautions d'emploi) GHS-Gefahrensymbol (siehe Abschnitt zu den Sicherheitshinweisen)</p>
 <p>Consult instructions for use Consulter les instructions d'utilisation Gebrauchsanweisung beachten</p>	 <p>Contains sufficient for &lt;n&gt; tests Contenu suffisant pour &lt;n&gt; tests Inhalt ausreichend für &lt;n&gt; Tests</p>	 <p>Manufacturer Fabricant Hersteller</p>	

The Dako EnVision™ Systems are covered by U.S. Patent 5,543,332.

Les systèmes Dako EnVision™ sont couverts par le brevet américain 5,543,332 et le brevet européen 594,772.

Die Dako EnVision™ Systeme sind durch folgende Patente geschützt: US-Patent 5,543,332 und Europäisches Patent 594,772.

Produced by/ Produit par/ Hersteller:  
Dako Denmark A/S  
Produktionsvej 42  
DK-2600 Glostrup  
Denmark/ Danemark/ Dänemark  
Tel. +45 44 85 95 00  
Fax +45 44 85 95 95

[www.Dako.com](http://www.Dako.com)