

**Monoclonal Mouse  
Anti-Human  
Octamer-Binding Transcription Factor 3/4  
Clone N1NK**

**English  
Code M3649**

<b>Intended use</b>	<p>For in vitro diagnostic use.</p> <p>Monoclonal Mouse Anti-Human Octamer-Binding Transcription Factor 3/4, Clone N1NK, is intended for use in immunohistochemistry. Antibodies to octamer-binding transcription factor 3/4 (OCT3/4) may be useful for the identification of specific subtypes of germ cell tumors including seminoma, embryonal carcinoma, and intratubular germ cell neoplasia of unclassified type (IGCNU) (1-4). 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.</p>
<b>Synonyms for antigen</b>	<p>Octamer binding protein-3 (OCT3), octamer transcription factor-3 (OTF3), octamer binding protein-4 (OCT4), octamer transcription factor-4 (OTF4), POU5F1 (1-3, 5, 6).</p>
<b>Summary and explanation</b>	<p>Alternative splicing gives rise to two mRNA variants from the human OCT4 gene on chromosome 6, originally named OCT3A and OCT3B (7), thus the adapted OCT3/4 name. The OCT3A and OCT3B isoforms are composed of 360 and 265 amino acids, respectively, of which the 225 amino acids at the C-termini are identical. OCT3/4 belongs to the POU (Pit-Oct-Unc) transcription factor family which can activate the expression of their target genes through binding an octameric sequence motif of an AGTCAAAT consensus sequence (6). OCT3/4 is expressed in early embryonic cells and germ cells (1) and is central to the gene regulatory network responsible for self-renewal, pluripotency, and lineage commitment in embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells (5). OCT3/4 expression is also detected in specific subtypes of germ cell tumors, such as seminomas, germinomas, dysgerminoma, embryonal carcinoma, the germ cell component of gonadoblastomas, and IGCNU (1, 2, 4).</p> <p>Refer to Dako's <a href="#">General Instructions for Immunohistochemical Staining</a> or the detection system instructions of IHC procedures.</p>
<b>Reagent provided</b>	<p>Monoclonal mouse antibody provided in liquid form as cell culture supernatant in 0.05 mol/L Tris-HCl, 0.015 mol/L sodium azide, pH 7.2. This product contains stabilizing protein.</p> <p><u>Clone:</u> N1NK. <u>Isotype:</u> IgG1.</p> <p><u>Mouse IgG concentration mg/L:</u> See label on vial.</p> <p>The protein concentration between lots may vary without influencing the optimal dilution. The titer of each individual lot is compared and adjusted to a reference lot to ensure a consistent immunohistochemical staining performance from lot-to-lot.</p>
<b>Immunogen</b>	<p>Recombinant protein corresponding to 147 amino acids at N-terminus of human OCT3/4.</p>
<b>Specificity</b>	<p>In Western blotting of hES-TW1 cell lysates, Anti-OCT3/4, clone N1NK recognizes a major band of ~40 kDa corresponding to the expected molecular weight of OCT3/4 (8).</p>
<b>Precautions</b>	<ol style="list-style-type: none"><li>1. For professional users.</li><li>2. 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>3. As with any product derived from biological sources, proper handling procedures should be used.</li><li>4. Wear appropriate Personal Protective Equipment to avoid contact with eyes and skin.</li><li>5. 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>

**Quick Guide\***

Step		Comments
Fixation	Formalin	N/A
Pre-treatment	EnVision FLEX™, High pH (Code K8004)	20 min HIER, 3-in-1 using PT Link and PT Link Rinse Station
Dilution	1:50	20 min incubation
Dilution Buffer	Dako Antibody Diluent (Code S0809)	Dilute immediately prior to use
Negative Control	Negative Control, Mouse IgG1 (Code X0931)	20 min incubation
Visualization	EnVision™ FLEX+, High pH (Code K8002/K8012)	20 min incubation, 15 min Mouse (LINKER) incubation, 2x5 min DAB+ incubation
Counterstain	EnVision™ FLEX Hematoxylin (Code K8008/K8018)	5 min incubation
Control Tissue	Seminoma	Nuclear staining. Cytoplasmic staining in the presence of strong nuclear staining is acceptable.
Slides	FLEX IHC Microscope Slides (Code K8020)	Recommended for greater adherence of tissue sections to glass slides.
Mounting	Non-aqueous, permanent mounting required	After staining, the sections must be dehydrated, cleared and mounted using permanent mounting medium.
Instrumentation	Autostainer Link 48 and Autostainer Plus	Use instrument-specific vials (Code SK200-SK203 and Code S3425)

*\*The user must always read the package insert for detailed instructions of the staining procedure and handling of the product.*

**Specimen preparation**

**Paraffin sections:** The antibody can be used for labeling paraffin-embedded tissue sections fixed in formalin. Tissue specimens should be cut into sections of approximately 4 µm.

**Pre-treatment:** Pre-treatment of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections with heat-induced epitope retrieval (HIER) is required. Optimal results are obtained by pretreating tissues with HIER using diluted EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (Code K8004). Deparaffinization, rehydration and epitope retrieval can be performed in Dako PT Link (Code PT100/PT101). For details, please refer to PT Link User Guide. The following parameters should be used for PT Link: Pre-heat temperature: 65 °C; epitope retrieval temperature and time: 97 °C for 20 (±1) minutes; cool down to 65 °C. Remove slide rack from PT tank and immediately dip slides in jar/tank (e.g., PT Link Rinse Station (Code PT109)) containing diluted room temperature EnVision™ FLEX Wash Buffer (20x) (Code K8007). Leave slides in Wash Buffer for 1-5 minutes.

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. After staining, the sections must be dehydrated, cleared and mounted using permanent mounting medium.

**Staining procedure**

**Dilution:** The recommended dilution of Monoclonal Mouse Anti-Human Octamer-Binding Transcription Factor 3/4, Clone N1NK, Code M3649, is 1:50. Dilute the antibody in Dako Antibody Diluent (Code S0809). Incubate pretreated tissue sections for 20 minutes at room temperature. These are guidelines only. Optimal conditions may vary depending on specimen and preparation method, and should be validated individually by each laboratory.

**Negative control:** The recommended negative control reagent is Dako Negative Control, Mouse IgG1 (Code X0931), diluted to the same Ig concentration as the primary antibody. Unless the stability of the diluted antibody and negative control has been established in the actual staining procedure, dilute these reagents immediately prior to use. Positive and negative controls should be run simultaneously with patient specimens.

**Visualization:** The recommended visualization system is EnVision™ FLEX+, High pH (Code K8002/K8012) in combination with EnVision™ FLEX+ Mouse (LINKER) (Code K8021/K8022) using a 20 minute incubation at room temperature. The incubation time for EnVision™ FLEX+ Mouse (LINKER) (Code K8021/K8022) is 15 minutes at room temperature. Follow the procedure enclosed with the selected visualization system(s).

**Automation:** The antibody is well-suited for immunohistochemical staining using automated platforms, such as Dako Autostainer, Autostainer Plus and Autostainer Link as well as PT Link for pre-treatment.

**Counterstaining:** The recommended counterstain is EnVision™ FLEX Hematoxylin (Code K8008/K8018). For optimal results, non-aqueous, permanent mounting medium is recommended.

**Controls:** Positive and negative control tissues should be run simultaneously using the same protocol as the patient specimens. The positive control tissue should include seminoma or embryonal carcinoma and the cells/structures should display reaction patterns as described for this tissue in the "Performance characteristics" section.

**Staining interpretation**

The cellular staining pattern is nuclear. Diffuse cytoplasmic staining in the presence of strong nuclear staining is acceptable.

**Performance characteristics****Normal tissues:**

Anti-OCT3/4 was non-reactive in the cell nuclei in all normal tissue types tested (9).

Tissue Type (# tested)	Positive Tissue Elements	Tissue Type (# tested)	Positive Tissue Elements
Adrenal (3)	0/3	Pancreas (3)	0/3
Bone marrow (3)	0/3	Parathyroid (3)	0/3
Breast (3)	0/3	Pituitary (3)	0/3
Cerebellum (3)	0/3	Prostate (3)	0/3
Cerebrum (3)	0/3	Salivary gland (3)	0/3
Cervix (3)	0/3	Skeletal Muscle	0/3
Colon (3)	0/3	Skin (3)	0/3
Esophagus (3)	0/3	Small intestine (3)	0/3
Heart (3)	0/3	Spleen (3)	0/3
Kidney (3)	0/3	Stomach (3)	0/3
Liver (3)	0/3	Testis (3)	0/3
Lung (3)	0/3	Thymus (3)	0/3
Mesothelial cells (3)	0/3	Thyroid (3)	0/3
Nerve, peripheral (3)	0/3	Tonsil (3)	0/3
Ovary (3)	0/3	Uterus (3)	0/3

Note: weakly positive immunostaining in the cytoplasm of epithelial cells was observed in 3 different normal tissue types. The reactive elements include epithelia of the testis (2/3), stomach (1/3), and small intestine (2/3). The weak positive staining was present in a percentage of epithelial cells in the testis (10-20%), stomach (50%), and small intestine (20%).

## Français

### Réf. M3649

**Utilisation prévue**

Pour utilisation diagnostique in vitro.

L'anticorps Monoclonal Mouse Anti-Human Octamer-Binding Transcription Factor 3/4, Clone N1NK, est destiné à être utilisé en immunohistochimie. Les anticorps dirigés contre le facteur 3/4 de transcription se liant à l'octamère (OCT3/4) peuvent être utilisés pour l'identification de certains sous-types de tumeurs de cellules germinales, notamment le séminome, le carcinome embryonnaire et la néoplasie germinale intratubulaire de type non classée (IGCNU) (1-4). 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.

**Synonymes de l'antigène**

Protéine 3 se liant à l'octamère (OCT3), facteur 3 de transcription se liant à l'octamère (OTF3), protéine 4 se liant à l'octamère (OCT4), facteur 4 de transcription se liant à l'octamère (OTF4), POU5F1 (1-3, 5, 6).

**Résumé et explication**

L'épissage alternatif du gène OCT4 humain situé sur le chromosome 6 génère deux variantes d'ARNm, initialement nommées OCT3A et OCT3B (7), d'où le nom OCT3/4. Les isoformes OCT3A et OCT3B sont constituées de 360 et 265 acides aminés, respectivement, dont les 225 acides aminés de l'extrémité C-terminale sont identiques. Le facteur OCT3/4 appartient à la famille des facteurs de transcription POU (Pit-Oct-Unc), capables d'activer l'expression de leurs gènes cibles en se liant au motif octamérique d'une séquence consensus AGTCAAAT (6). Le facteur OCT3/4 est exprimé dans les cellules embryonnaires précoces et dans les cellules germinales (1) et joue un rôle central dans la régulation des gènes responsables de la capacité d'autorenouvellement, du caractère pluripotent et de la détermination de la lignée des cellules souches embryonnaires et des cellules souches pluripotentes induites (5). L'expression du facteur OCT3/4 est également détectée dans certains sous-types de tumeurs de cellules germinales, telles que les séminomes, les germinomes, les dysgerminomes, le carcinome embryonnaire, l'élément germinal des gonadoblastomes et la néoplasie germinale intratubulaire de type non classée IGCNU (1, 2, 4).

Se référer au document *General Instructions for Immunohistochemical Staining* (Instructions générales de coloration immunohistochimique) de Dako ou aux instructions du système de détection relatives aux procédures IHC.

**Réactif fourni**

Anticorps monoclonal de souris fourni sous forme liquide comme surnageant de culture cellulaire dans un tampon Tris-HCl à 0,05 mol/L, de pH 7,2, contenant de l'azide de sodium à 0,015 mol/L. Ce produit contient une protéine stabilisante.

Clône : N1NK. Isotype : IgG1.

Concentration en IgG de souris en mg/L : Voir l'étiquette sur le flacon.

La concentration en protéines peut varier d'un lot à l'autre sans que cela influence la dilution optimale. Le titre de chaque lot est comparé et ajusté par rapport à un lot de référence pour assurer des performances de coloration immunohistochimiques cohérentes d'un lot à l'autre.

- Immunogène** Protéine recombinante correspondant à 147 acides aminés à l'extrémité N-terminale du facteur OCT3/4 humain.
- Spécificité** Par Western blot de lysats de cellules hES-TW1, l'anticorps anti-OCT3/4, clone N1NK, reconnaît une bande principale d'environ 40 kDa correspondant au poids moléculaire attendu du facteur OCT3/4 (8).
- Précautions d'emploi**
1. Pour utilisateurs professionnels.
  2. Ce produit contient de l'azide de sodium (NaN<sub>3</sub>), produit chimique hautement toxique sous sa forme pure. 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.
  3. Comme avec tout produit d'origine biologique, des procédures de manipulation appropriées doivent être respectées.
  4. Porter un équipement de protection individuelle approprié pour éviter tout contact avec les yeux et la peau.
  5. Les solutions non utilisées doivent être éliminées conformément aux réglementations locales, nationales et européennes.
- Conservation** Conserver 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 Dako.

**Guide rapide\***

Étape		Commentaires
Fixation	Formol	N/A
Prétraitement	EnVision FLEX™, High pH (réf. K8004)	HIER de 20 minutes, 3 en 1 avec PT Link et PT Link Rinse Station
Dilution	1:50	Incubation de 20 minutes
Tampon de dilution	Dako Antibody Diluent (réf. S0809)	Diluer immédiatement avant utilisation
Contrôle négatif	Negative Control, Mouse IgG1 (réf. X0931)	Incubation de 20 minutes
Visualisation	EnVision™ FLEX+, High pH (réf. K8002/K8012)	Incubation de 20 minutes, incubation de 15 minutes avec le produit Mouse (LINKER), 2 incubations de 5 minutes avec le DAB+
Contre-coloration	EnVision™ FLEX Hematoxylin (réf. K8008/K8018)	Incubation de 5 minutes
Tissu de contrôle	Séminome	Coloration nucléaire. Une coloration cytoplasmique en présence d'une forte coloration nucléaire est acceptable.
Lames	FLEX IHC Microscope Slides (réf. K8020)	Recommandées pour une meilleure adhérence des coupes de tissus aux lames de verre.
Montage	Milieu de montage permanent non aqueux requis	Une fois la procédure de coloration terminée, les coupes doivent être déshydratées, éclaircies et montées à l'aide d'un milieu de montage permanent.
Appareillage	Autostainer Link 48 et Autostainer Plus	Utiliser les flacons propres à l'instrument (réf. SK200-SK203 et S3425)

*\*L'utilisateur doit toujours lire la notice pour obtenir des instructions détaillées sur la procédure de coloration et sur la manipulation du produit.*

## Préparation des échantillons

Coupes en paraffine : L'anticorps peut être utilisé pour le marquage des coupes de tissus inclus en paraffine et fixés au formol. L'épaisseur des coupes d'échantillons de tissu doit être d'environ 4 µm.

Prétraitement : Le prétraitement des coupes de tissus fixés au formol et inclus en paraffine par restauration d'épitope induit par la chaleur (HIER) est nécessaire. Des résultats optimaux sont obtenus en prétraitant les tissus par la méthode HIER, à l'aide de la solution diluée EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (réf. K8004). Le déparaffinage, la réhydratation et la restauration de l'épitope peuvent être réalisés dans l'appareil PT Link de Dako (réf. PT100/PT101). Pour plus de détails, se reporter au Guide d'utilisation du PT Link. Les paramètres suivants doivent être utilisés pour le PT Link : Température de préchauffage : 65 °C ; température et durée de restauration d'épitope : 97 °C pendant 20 (±1) minutes ; laisser refroidir jusqu'à 65 °C. Retirer le portoir à lames de la cuve du PT et plonger immédiatement les lames dans un récipient/cuve (par ex. PT Link Rinse Station, réf. PT109) contenant du tampon de lavage EnVision™ FLEX Wash Buffer (20x) dilué et à température ambiante (réf. K8007). Laisser les lames dans le tampon de lavage pendant 1 à 5 minutes.

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). Une fois la procédure de coloration terminée, les coupes doivent être déshydratées, éclaircies et montées à l'aide d'un milieu de montage permanent.

## Procédure de coloration

Dilution : La dilution recommandée pour l'anticorps Monoclonal Mouse Anti-Human Octamer-Binding Transcription Factor 3/4, Clone N1NK, réf. M3649, est de 1:50. Diluer l'anticorps dans le diluant Dako Antibody Diluent (réf. S0809). Incuber les coupes de tissu prétraitées pendant 20 minutes à température ambiante. Il ne s'agit là que de conseils. Les conditions optimales peuvent varier en fonction du prélèvement et de la méthode de préparation, et doivent être validées individuellement par chaque laboratoire.

Contrôle négatif : Le réactif de contrôle négatif recommandé est le Dako Negative Control, Mouse IgG1 (réf. X0931), dilué à la même concentration en IgG que l'anticorps primaire. À moins que la stabilité de l'anticorps dilué et du contrôle négatif n'ait été établie lors de la procédure de coloration en cours, diluer ces réactifs immédiatement avant utilisation. Des contrôles positifs et négatifs doivent être testés en même temps que les échantillons de patients.

Visualisation : Le système de visualisation recommandé est le système EnVision™ FLEX+, High pH (réf. K8002/K8012) associé au système EnVision™ FLEX+ Mouse (LINKER) (réf. K8021/K8022), avec une durée d'incubation de 20 minutes, à température ambiante. La durée d'incubation du système EnVision™ FLEX+ Mouse (LINKER) (réf. K8021/K8022) est de 15 minutes à température ambiante. Suivre la procédure incluse dans le(s) système(s) de visualisation sélectionné(s).

Automatisation : L'anticorps est bien adapté à la coloration immunohistochimique sur les plates-formes automatisées, telles que les systèmes Dako Autostainer, Autostainer Plus et Autostainer Link ainsi que le PT Link pour le prétraitement.

Contre-coloration : Le contre-colorant recommandé est le produit EnVision™ FLEX Hematoxylin (réf. K8008/K8018). Pour des résultats optimaux, l'utilisation d'un milieu de montage permanent non aqueux est recommandée.

Contrôles : Des tissus de contrôle positifs et négatifs doivent être testés en parallèle selon le même protocole que pour les échantillons de patients. Le tissu de contrôle positif doit comprendre le séminome ou le carcinome embryonnaire et les cellules/structures doivent présenter des schémas de réaction tels que ceux décrits pour ce tissu à la section "Performances".

## Interprétation de la coloration

Le profil de coloration cellulaire est nucléaire. Une coloration cytoplasmique diffuse en présence d'une forte coloration nucléaire est acceptable.

## Performances

### Tissus sains :

L'anticorps anti-OCT3/4 n'a pas réagi dans les noyaux cellulaires des types de tissus sains testés (9).

Type de tissu (nombre testé)	Éléments tissulaires positifs	Type de tissu (nombre testé)	Éléments tissulaires positifs
Surrénale (3)	0/3	Pancréas (3)	0/3
Moelle osseuse (3)	0/3	Parathyroïde (3)	0/3
Sein (3)	0/3	Hypophyse (3)	0/3
Cervelet (3)	0/3	Prostate (3)	0/3
Cerebrum (3)	0/3	Glande salivaire (3)	0/3
Col de l'utérus (3)	0/3	Muscle squelettique	0/3
Côlon (3)	0/3	Peau (3)	0/3
Œsophage (3)	0/3	Intestin grêle (3)	0/3
Cœur (3)	0/3	Rate (3)	0/3
Rein (3)	0/3	Estomac (3)	0/3
Foie (3)	0/3	Testicule (3)	0/3
Poumon (3)	0/3	Thymus (3)	0/3
Cellules mésothéliales (3)	0/3	Thyroïde (3)	0/3
Nerf périphérique (3)	0/3	Amygdale (3)	0/3
Ovaire (3)	0/3	Utérus (3)	0/3

Remarque : Une coloration immunologique faiblement positive a été observée dans le cytoplasme de cellules épithéliales de trois différents types de tissus sains. Les éléments réactifs incluent l'épithélium du testicule (2/3), de l'estomac (1/3) et de l'intestin grêle (2/3). Cette coloration faiblement positive a été observée dans les cellules épithéliales du testicule (10-20%), de l'estomac (50%) et de l'intestin grêle (20%).

## Deutsch

### Code-Nr. M3649

#### Verwendungszweck

Zur In-vitro-Diagnostik.

Monoclonal Mouse Anti-Human Octamer-Binding Transcription Factor 3/4, Clone N1NK, ist für die Verwendung in der Immunhistochemie vorgesehen. Antikörper gegen Octamer-bindenden Transkriptionsfaktor 3/4 (OCT3/4) können nützlich sein bei der Identifizierung von spezifischen Subtypen von Keimzelltumoren, einschließlich Seminomen, embryonalen Karzinomen und intratubulärer Keimzell-Neoplasie unklassifizierten Typs (IGCNU) (1-4). Die klinische Auswertung einer eventuell eintretenden 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.

#### Synonyme Bezeichnungen des Antigen Zusammenfassung und Erklärung

Octamer-Bindungsprotein-3 (OCT3), Octamer Transkriptionsfaktor-3 (OTF3) Octamer Bindungsprotein-4 (OCT4) Octamer Transkriptionsfaktor-4 (OTF4), POU5F1 (1-3, 5, 6).

Alternatives Spleißen führt zu zwei mRNA-Varianten des menschlichen OCT4 Gen auf dem Chromosom 6, ursprünglich OCT3A und OCT3B (7) genannt, daher der angepasste OCT3/4-Name. Die OCT3A and OCT3B Isoformen bestehen jeweils aus 360 und 265 Aminosäuren, von denen 225 Aminosäuren am C-Terminus identisch sind. OCT3/4 gehört zur POE (Pit-Oct-Unc) Transkriptionsfaktor-Familie, welche die Expression ihrer Zielgene durch Bindung eines Octamer Sequenzmotivs einer AGTCAAAT Konsensus-Sequenz (6) aktivieren kann. OCT3/4 wird in den frühen embryonalen Zellen und Keimzellen (1) exprimiert und ist von zentraler Bedeutung für das regulatorische Netzwerk, das verantwortlich ist für Selbsterneuerung, Pluripotenz und Abstammung in embryonalen Stammzellen und induzierten pluripotenten Stammzellen (5). OCT3/4 Expression ist auch in spezifischen Subtypen von Keimzelltumoren wie Seminomen, Germinomen, Dysgerminomen, embryonalen Karzinomen, der Keimzellkomponente von Gonadoblastomen und IGCNU (1, 2, 4) nachgewiesen.

Folgende Angaben bitte den *General Instructions for Immunohistochemical Staining* (Allgemeinen Richtlinien zur immunhistochemischen Färbung) oder den Anweisungen des Detektionssystems für IHC-Verfahren entnehmen.

#### Geliefertes Reagenz

Monoklonaler Maus-Antikörper in flüssiger Form als Zellkulturüberstand in 0,05 mol/L Tris-HCl-Puffer, pH 7,2, und 0,015 mol/L Natriumazid. Dieses Produkt enthält stabilisierendes Protein.

Klon: N1NK. Isotyp: IgG1.

Konzentration Maus-IgG mg/L: Siehe Behälteretikett.

Die Proteinkonzentration kann zwischen Chargen abweichen, ohne dass dies die optimale Verdünnung beeinflusst. Der Titer jeder Charge wird mit dem einer Referenzcharge verglichen und dieser angeglichen, um konstante immunhistochemische Färbegergebnisse zwischen den Chargen zu gewährleisten.

- Immunogen** Rekombinantes Protein, welches 147 Aminosäuren am N-Terminus des humanen OCT3/4 entspricht.
- Spezifität** Im Western Blotting von hES-TW1 Zellysaten, erkennt Anti-OCT3/4 Klon N1NK eine Hauptbande von ~ 40 kDa, welches dem erwarteten Molekulargewicht von OCT3/4 entspricht (8).
- Hinweise und  
Vorsichtsmaßnahmen**
1. Für geschultes Fachpersonal.
  2. 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 Metallazid-Anreicherung in den Leitungen zu vermeiden.
  3. Wie alle Produkte biologischen Ursprungs müssen auch diese ordnungsgemäß gehandhabt werden.
  4. Geeignete persönliche Schutzkleidung tragen, um Augen- und Hautkontakt zu vermeiden.
  5. Nicht verwendete Lösung ist entsprechend den örtlichen, staatlichen und EU-rechtlichen Bestimmungen 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 validiert 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 Dako Technischen Kundendienst aufzunehmen.

**Kurzanleitung\***

Schritt		Anmerkungen
Fixierung	Formalin	KEINE ANGABE
Vorbehandlung	EnVision FLEX™, High pH (Code-Nr. K8004)	20 Min. HIER, 3-in-1 mit PT Link und PT Link Rinse Station
Verdünnung	1:50	20 Min. Inkubation
Verdünnungspuffer	Dako Antibody Diluent (Code-Nr. S0809)	Unmittelbar vor der Verwendung verdünnen
Negativkontrolle	Negative Control, Mouse IgG1 (Code-Nr. X0931)	20 Min. Inkubation
Detektionssystem	EnVision™ FLEX+, High pH (Code-Nr. K8002/K8012)	20 Min. Inkubation, 15 Min. Mouse (LINKER) Inkubation, 2 x 5 Min. DAB+ Inkubation
Gegenfärbung	EnVision™ FLEX Hematoxylin (Code-Nr. K8008/K8018)	5 Min. Inkubation
Kontrollgewebe	Seminom	Nukleare Färbung. Zytoplasma-Färbung bei gleichzeitiger starker Nuklearfärbung ist akzeptabel.
Objektträger	FLEX IHC Microscope Slides (Code-Nr. K8020)	Für eine bessere Haftung der Gewebeschnitte an den Glas-Objektträgern empfohlen.
Eindecken	Nichtwässrige, permanente Eindeckung erforderlich	Nach dem Färben müssen die Schnitte dehydriert, geklärt und unter Verwendung eines permanenten Eindeckmediums eingedeckt werden.
Geräte	Autostainer Link 48 und Autostainer Plus	Gerätespezifische Behälter verwenden (Code-Nr. SK200-SK203 und Code-Nr. S3425)

*\*Der Anwender muss stets die Packungsbeilage lesen, um sich über die detaillierten Anweisungen für das Färbeverfahren und die Handhabung des Produkts zu informieren.*

<b>Gewebevorbereitung</b>	<p><u>Paraffinschnitte:</u> Der Antikörper kann für die Markierung von formalinfixierten, paraffineingebetteten Gewebeschnitten verwendet werden. Gewebeproben sollten in Schnitte von ca. 4 µm Stärke geschnitten werden.</p> <p><u>Vorbehandlung:</u> Es ist eine Vorbehandlung der formalinfixierten und paraffineingebetteten Gewebeschnitte durch hitzeinduzierte Epitopdemaskierung (HIER) erforderlich. Optimale Ergebnisse können durch HIER-Vorbehandlung der Gewebe mit EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (Code-Nr. K8004) erzielt werden. Entparaffinierung, Rehydrierung und Epitopdemaskierung können im Dako PT Link (Code-Nr. PT100/PT101) durchgeführt werden. Weitere Informationen hierzu: siehe PT Link-Benutzerhandbuch. Für PT Link sind die folgenden Parameter zu verwenden: Temperatur auf 65 °C vorwärmen; Epitopdemaskierungstemperatur und -zeit: 97 °C für 20 (±1) Minuten; auf 65 °C abkühlen. Die Objektträgerhalter aus dem PT Link-Tank nehmen und die Objektträger sofort in einen Behälter/Tank (z. B. PT Link Rinse Station (Code-Nr. PT109)) mit verdünntem, auf Raumtemperatur gebrachtem EnVision™ FLEX Waschpuffer (20x) (Code-Nr. K8007) tauchen. Die Objektträger 1-5 Minuten lang im Waschpuffer belassen.</p> <p>Während der Gewebevorbehandlung 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. Nach dem Färben müssen die Schnitte dehydriert, geklärt und unter Verwendung eines permanenten Eindeckmediums eingedeckt werden.</p>
<b>Färbeverfahren</b>	<p><u>Verdünnung:</u> Die empfohlene Verdünnung von Monoclonal Mouse Anti-Human Octamer-Binding Transcription Factor 3/4, Klon N1NK, Code-Nr. M3649, ist 1:50. Den Antikörper in Dako Antibody Diluent (Code-Nr. S0809) verdünnen. Die vorbehandelten Gewebeschnitte 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren. Diese Angaben sind nur Richtlinien. Optimale Bedingungen können je nach Gewebe und Vorbereitungsverfahren unterschiedlich sein und sollten vom jeweiligen Labor selbst ermittelt werden.</p> <p><u>Negativkontrolle:</u> Als Negativkontrollreagenz wird Dako Negative Control, Mouse IgG1 (Code-Nr. X0931) empfohlen, das auf dieselbe Ig-Konzentration wie der primäre Antikörper verdünnt wurde. Es wird empfohlen, Antikörper und Negativkontrolle unmittelbar vor deren Verwendung zu verdünnen, außer wenn deren Stabilität im aktuellen Färbeverfahren festgelegt wurde. Positiv- und Negativkontrollen sollten zur gleichen Zeit wie die Patientengewebe getestet werden.</p> <p><u>Detektionssystem:</u> Das empfohlene Detektionssystem ist EnVision1™ FLEX, High pH (Link) (Code-Nr. K8002/K8012) in Verbindung mit EnVision™ FLEX+ Mouse (LINKER) (Code-Nr. K8021/K8022) mit einer 20-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur. Die Inkubationszeit für EnVision™ FLEX+ Mouse (LINKER) (Code-Nr. K8021/K8022) beträgt 15 Minuten bei Raumtemperatur. Das dem/den gewählten Detektionssystem(en) beiliegende Verfahren befolgen.</p> <p><u>Automatisierung:</u> Der Antikörper eignet sich sehr gut für immunhistochemische Färbungen mit automatisierten Systemen, z. B. mit Dako Autostainer, Autostainer Plus und Autostainer Link sowie PT Link für die Vorbehandlung.</p> <p><u>Gegenfärben:</u> Die empfohlene Gegenfärbung ist EnVision™ FLEX Hematoxylin (Code-Nr. K8008/K8018). Für optimale Ergebnisse wird ein nichtwässriges permanentes Eindeckmedium empfohlen.</p> <p><u>Kontrollen:</u> Positiv- und Negativkontrollgewebe sollten zur gleichen Zeit und mit demselben Protokoll wie die Patientengewebe getestet werden. Das Positivkontrollgewebe sollte Seminom oder embryonales Karzinom einschließen, und die Zellen/Strukturen sollten die Reaktionsmuster aufweisen, die im Abschnitt „Leistungseigenschaften“ für dieses Gewebe beschrieben sind.</p>
<b>Auswertung der Färbung</b>	<p>Das zelluläre Färbemuster ist nuklear. Diffuse zytoplasmatische Färbung bei gleichzeitiger starker Nuklearfärbung ist akzeptabel.</p>



**Leistungseigenschaften**

Normale Gewebe:

Anti-OCT3/4 war nicht reaktiv in den Zellkernen aller getesteten normalen Gewebetypen (9).

Gewebetyp (Anz. getestet)	Positive Gewebe-Elemente	Gewebetyp (Anz. getestet)	Positive Gewebe-Elemente
Nebenniere (3)	0 von 3	Pankreas (3)	0 von 3
Knochenmark (3)	0 von 3	Nebenschilddrüse (3)	0 von 3
Brust (3)	0 von 3	Hypophyse (3)	0 von 3
Kleinhirn (3)	0 von 3	Prostata (3)	0 von 3
Großhirn (3)	0 von 3	Speicheldrüse (3)	0 von 3
Zervix (3)	0 von 3	Skelettmuskulatur	0 von 3
Dickdarm (3)	0 von 3	Haut (3)	0 von 3
Speiseröhre (3)	0 von 3	Dünndarm (3)	0 von 3
Herz (3)	0 von 3	Milz (3)	0 von 3
Niere (3)	0 von 3	Magen (3)	0 von 3
Leber (3)	0 von 3	Hoden (3)	0 von 3
Lunge (3)	0 von 3	Thymus (3)	0 von 3
Mesothelzellen (3)	0 von 3	Schilddrüse (3)	0 von 3
Nerv, peripher (3)	0 von 3	Mandeln (3)	0 von 3
Eierstock (3)	0 von 3	Uterus (3)	0 von 3

Hinweis: Eine schwach positive Immunfärbung im Zytoplasma von Epithelzellen wurde in drei verschiedenen normalen Gewebetypen beobachtet. Die reaktiven Elemente umfassen Epithelien der Hoden (2/3), des Magens (1/3), und des Dünndarms (2/3). Die schwach positive Färbung wurde in einem Anteil von Epithelzellen im Hoden (10-20%), Magen (50%) und Dünndarm (20%) gefunden.

**References  
Bibliographie  
Literaturnachweis**

1. Cheng L. Establishing a germ cell origin for metastatic tumors using OCT4 immunohistochemistry. *Cancer* 2004;101:2006-10.
2. Jones TD, Ulbright TM, Eble JN, Cheng L. OCT4: A sensitive and specific biomarker for intratubular germ cell neoplasia of the testis. *Clin Cancer Res* 2004;10:8544-47.
3. Ulbright TM. Germ cell tumors of the gonads: a selective review emphasizing problems in differential diagnosis, newly appreciated, and controversial issues. *Modern Path* 2005;18:S61-79
4. Høi-Hansen CE, Kraggerud SM, Abeler VM, Karen J, Meyts ERD, Lothe RA. Ovarian dysgerminoma are characterised by frequent KIT mutations and abundant expression of pluripotency markers. *Molecular Cancer* 2007;6:12
5. Bhartiya D, Kasiviswanathan S, Unni SK, Pethe P, Dhabalia J, Patwardhan S, et al. Newer insights into premeiotic development of germ cells in adult human testis using Oct-4 as a stem cell marker. *J Histochem Cytochem* 2010;58:1093-1106.
6. Pan GJ, Chang ZY, Pei D. Stem cell pluripotency and transcription factor Oct4. *Cell Res* 2002;12:321-9.
7. Takeda J, Seino S, Bell GI. Human Oct3 gene family: cDNA sequences, alternative splicing, gene organization, chromosomal location, and expression at low levels in adult tissues. *Nucleic Acids Res* 1992;20:4613-20.
8. Yu J. Mouse Monoclonal Anti-Oct3/4: A test of the specificity of Anti-Oct3/4 clone N1NK by Western blotting. 2013;D15899.
9. Yu J. Report of normal tissue immunohistochemical testing using mouse anti-human Octamer-binding transcription factor (Oct3/4), Clone N1NK. 2013;D13564.

REF Catalogue number	Temperature limitation	Consult instructions for use
Manufacturer	LOT Batch code	Use by
EC REP Authorized representative in the European Community		IVD In vitro diagnostic medical device

Dako North America, Inc.  
6392 Via Real  
Carpinteria, California 93013 USA  
Tel 805 566 6655  
Fax 805 566 6688  
Technical Support 800 424 0021  
Customer Service 800 235 5763

EC REP  
Dako Denmark A/S  
Produktionsvej 42  
DK-2600 Glostrup Denmark  
Tel +45 4485 9500  
Fax +45 4485 9595  
www.dako.com

PT0039/Rev C

Edition 08/13