

1. ÚVOD

Firma Nichirei vyvinula jedinečný imunohistochemický barvicí postup nazvaný metoda **Univerzálního Immuno-enzymového Polymeru (UIP)**. Tento originální barvicí postup je patentován firmou Nichirei. *N*-Histofine Simple Stain MAX PO (MULTI) se vyznačuje jak vysokou citlivostí metody tak úsporou času při histochemickém použití.

2. SLOŽENÍ

Tekutý přípravek, k okamžitému použití. *N*-Histofine Simple Stain MAX PO (MULTI) (Univerzální imuno-peroxidázový polymer, anti-myší a anti-králičí) je značený polymer připravený spojením aminokyselinového polymeru s peroxidázou a kozími anti-myšími a anti-králičími imunoglobuliny, redukovanými na Fab fragment. Tento polymer je uchováván v MOPS (3-morfolinpropansulfonová kyselina) pufru (pH 6,5) obsahujícím stabilizátor a antibakteriální agens.

Popis *N*-Histofine Simple Stain MAX PO (MULTI) (Univerzální imuno-peroxidázový polymer, anti-myší a anti-králičí):

Purifikované IgG z imunizovaného kozího séra se rozštěpí na F(ab)₂ frakce. Antigen-specifické F(ab)₂ jsou afinitně čištěné s antigenem. Absorbce na pevné fázi byla provedena s proteiny lidského séra. Fab fragment získaný redukcí F(ab)₂, je pak navázán na aminokyselinový polymer s navázanou peroxidázou.

3. POUŽITÍ

N-Histofine Simple Stain MAX PO (MULTI) je navržen na použití v imunohistochemických studiích; myší nebo králičí primární protilátky si uživatel dodává sám. Tato reagencie je běžně použitelná pro řezy lidských tkání fixované formaldehydem a zalité parafínem. Pro barvení řezů zmrazených lidských tkání prostudujte prosím kapitolu **6. POSTUP BARVENÍ**. Pokud se týká použití těchto reagensů v ostatních případech, kontaktujte prosím marketingové oddělení firmy EXBIO Olomouc s.r.o. .

4. PRICIP

Komplex antigen/protilátka/univerzální imuno-peroxidázový polymer vzniká vazbou **UIP** na primární myší nebo králičí protilátky navázané na antigeny řezu tkáně. Enzymatická aktivita tohoto komplexu závisí na množství barviva a poloze antigenu.

5. BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ PŘI POUŽITÍ A MANIPULACI

- 1) Před použitím si přečtěte návod k použití
- 2) Nepoužívejte reagencie s prošlou expirační dobou
- 3) Vzorky (před i po fixaci; všechn materiál který s nimi přišel do styku) jsou biologickým rizikovým materiálem, s nímž je nutno pracovat dle patřičných bezpečnostních pravidel.
- 4) Inhalace nebo požití vysoce alergického fixátoru formaldehydu je nebezpečné. Používejte ochrannou masku. Při požití vyvolejte zvracení. Při kontaminaci kůže nebo očí, důkladně omyjte postižené místo vodou.
- 5) Organické reagencie jsou hořlavé. Nepoužívejte je v blízkosti otevřeného ohně.
- 6) Nikdy nepipetujte reagencie ústy a chraňte se před jejich stykem s kůží, sliznicemi a oděvem.
- 7) Vyvarujte se mikrobiální kontaminaci reagensů; může vést k nesprávným výsledkům.
- 8) Vyvarujte se rozstříkávání reagensů nebo vzniku aerosolu.

6. POSTUP BARVENÍ

n Požadovaný materiál a reagencie (nejsou součástí dodávky)

- Primární protilátky, myší nebo králičí
- Xylen
- 100 % etanol

- 95 % etanol
- Dobarvovací roztok
- 3 % roztok peroxidu vodíku v absolutním metanolu (1 díl 30 % H₂O₂, 9 dílů absolutního metanolu)
- PBS pufr pH 7,6 ± 0,2 (NaCl 7,75g; K₂HPO₄ 1,50g; KH₂PO₄ 0,20g v 1 l dest. vody)
- Adhezivum pro přichycení řezu tkáně (0,02 % poly-L-lyzin, silan atd.)
- Reagencie pro negativní kontrolu
- Krycí sklíčka
- Světelný mikroskop
- Destilovaná voda
- Vlhká komůrka pro inkubaci vzorků (sklíček)
- Montovací médium
- Stopky
- Držák na vzorky/sklíčka nebo Coplinova nádoba
- Buničina k osušení
- Chromogenní substrát (*N*-Histofine Simple Stain AEC roztok)

Nichirei vyvinul jednoduchý chromogenní substrát k okamžitému použití nazvaný *N*-Histofine Simple Stain Substrate Solution. Nichirei doporučuje následující

	Název výrobku	500 vzorků	1500 vzorků
AEC	<i>N</i> -Histofine Simple Stain AEC	Kód: 415182F	Kód: 415184F
DAB*	<i>N</i> -Histofine Simple Stain DAB	Kód: 415172F	Kód: 415174F

* - Tento přípravek je ve vývoji

n Příprava vzorku

[Pro parafinové řezy]

Pokud jsou vzorky vystaveny vysoce koncentrovanému fixačnímu reagens nebo jsou fixována dlouhou dobu, může dojít k histologické desintegraci nebo denaturaci antigenu. Pro optimální fixaci se zachovalou tkáňovou morfologií a antigenní aktivitou, doporučujeme používat co nejčerstvější vzorky tkáně o malém rozměru (1 cm x 1 cm x 0,5 cm).

Fixační reagens	Doba fixace
10 % formaldehyd nebo pufrovaný formaldehyd	24 - 48 hod
20 % formaldehyd	12 - 24 hod

[Pro tkáně zmrazené]

Vzorky jsou ponořeny do média (např. OTC medium) a rychle zmrazeny v *n*-hexanu chlazeném suchým ledovým acetonem nebo tekutým dusíkem.

n Příprava řezů

[Pro parafinové řezy]

Řezy (3 - 6 μm silné) jsou umístěny na podložní sklíčka. Při další manipulaci jako např. odkrytí antigenů, tepelně indukované odhalení epitopu nebo působení trypsinu, musí být podložní sklíčko potaženo adhesivem např. 0,02 % poly-L-lyzinem nebo silanem.

[Pro tkáně zmrazené]

Řezy z kryostatů jsou umístěny na podložní sklíčko potažené adhesivem (např. 0,02 % poly-L-lyzinem nebo silanem) a nechají se dobře zaschnout na vzduchu. Potom se zafixují buď 100 % acetonem (10 min.) při pokojové teplotě nebo 4 % roztokem paraformaldehydu v PBS při 4 °C s následným barvením.

Optimální koncentrace a inkubační doba reakce primárních protilátek musí být otestována. V některých případech je doporučeno naředění primárních protilátek aby nedošlo k přebarvení.

Pokud řezy/vzorky obsahují pouze malá množství endogenní peroxidázy, erytrocytů a granulocytů, může se vynechat krok inaktivace endogenní peroxidázy.

[Kontrolní vzorky]

K posouzení výsledků neznámého vzorku je potřeba zároveň vyšetřit stejným způsobem pozitivní a negativní vzorky.

n Deparafinizace a rehydratace

1. Použití xylenu

(1) Ponořte vzorek do xylenu. Po 3 minutách vzorek vyjměte a xylen odstraňte ze sklíčka. (2) Zopakujte ještě 2 x s čistým xylenem.

2. Použití etanolu

(1) Ponořte vzorek do 100 % etanolu. Po 3 minutách vzorek vyjměte a 100 % etanol odstraňte ze sklíčka.

(2) Zopakujte ještě 2 x s čistým 100 % etanolem.

(3) Nyní 2 x opakujte kroky 1 a 2 s 95 % etanolem.

3. Promytí

Po odstranění etanolu ponořte vzorky na 5 minut do PBS.

n Doporučený postup barvení

1. Inaktivace endogenní peroxidázy

(1) Opatrně osušte okolí řezu

(2) Ponořte vzorek(y) do roztoku 3 % H₂O₂ v absolutním metanolu na 10 minut při pokojové teplotě

(3) Promyjte 3 x 5 minut v PBS.

2. Přidání a reakce primárních protilátek

(1) Opatrně osušte okolí řezu

(2) Přidejte 2 kapky primární protilátky na vzorek, pozitivní a negativní kontrolu tak, aby pokryly celou plochu řezu

(3) Pro potvrzení barvicí reakce, na kontrolní sklíčko, dejte 2 kapky negativního kontrolního činidla (normální sérum) místo primárních protilátek.

(4) Inkubujte při pokojové teplotě nebo 4 °C (podle informace na příbalovém letáku protilátek).

(5) Promyjte 3 x 5 minut v PBS.

3. Přidání a reakce *N*-HistoFine Simple Stain MAX PO (MULTI) (Univerzální imuno-peroxidázový polymer, anti-myší a anti-králičí)

(1) Opatrně osušte okolí řezu

(2) Přidejte 2 kapky Simple Stain MAX PO (MULTI) na všechny vzorky tak, aby pokryly celou plochu řezu. Inkubujte 30 minut při pokojové teplotě.

(3) Promyjte 3 x 5 minut v PBS.

4. Přidání a reakce s chromogenním substrátem

(1) Opatrně osušte okolí řezu

(2) Přidejte 2 kapky chromogenu/substrátu na všechny vzorky tak, aby pokryly celou plochu řezu. Inkubujte 5 - 20 minut při pokojové teplotě.

(3) Promyjte 3 x 5 minut destilovanou vodou.

5. Dobarvení

(1) Ponořte vzorky do dobarvovacího roztoku

(2) Promyjte vzorky tekoucí vodou

6. Montování preparátu

Při použití substrátu rozpustném v alkoholu (AEC), se řezy zalijí vodou rozpustným médiem bez další manipulace. Při použití substrátu v alkoholu nerozpustném (DAB), se vzorky po promytí vodou, dehydrataci v alkoholovém gradientu a počištění xylenem zalijí permanentním médiem.

n Interpretace výsledků

1. Mikroskopické pozorování

Pro zjištění pozitivní reakce se vzorky prohlédnou pod světelným mikroskopem. Pro interpretaci výsledků je nezbytné provedení všech tří typů kontroly.

· Pozitivní kontrola

Vzorek obsahuje cílový antigen který prochází stejným procesem jako vyšetřovaný neznámý vzorek

· Negativní kontrola

Vzorek neobsahuje cílový antigen který prochází stejným procesem jako vyšetřovaný neznámý vzorek

· Kontrola reakce

Zpracuje se kontrolní vzorek stejným procesem jako vyšetřovaný testovaný vzorek, avšak místo primární protilátky se použije negativní kontrolní reagens. Pokud je tento vzorek zbarven, došlo pravděpodobně k nespecifické reakci navázáním na nespecifický protein.

7. SKLADOVÁNÍ

Skladujte v temnu při 2 – 8 °C.

8. OMEZENÍ

Tkáňové barvení závisí také na manipulaci a procesech, kterými tkáň prošla před barvením. Nevhodná fixace, zmrazení, rozmrazení, promytí, osušení, zahřátí nebo řezání může vést k nesprávným nebo špatným výsledkům.

Pokud použijete k barvení starý či nepufrovaný fixační prostředek, nebo když dojde k nadměrnému zahřátí při vkládání do média pro řezání či během umístění na podložní sklíčko, nemusí být výsledky barvení optimální.

Nesprávné výsledky barvení mohou vzniknout z důvodu vazby na nespecifické proteiny. Ačkoliv *N*-Histofine Simple Stain MAX PO (MULTI) nevyžaduje zvláštní použití blokátorů, v některých případech může aplikace blokátoru před inkubací s primární protilátkou vést k potlačení nežádoucího barvení pozadí.

9. PODMÍNKY POUŽITÍ

Prodejci a distributoři Nichirei, ani firma Nichirei Corporation nejsou zodpovědní za přímé i nepřímé přestupky proti místním zákonům a patentům vzniklé použitím *N*-Histofine Simple Stain MAX PO (MULTI), ani za porušení patentových práv vzniklých nesprávným použitím výrobků.

10. PROBLÉMY A JEJICH ŘEŠENÍ

Problém

- Nedošlo k zbarvení nebo pouze slabému zbarvení u pozitivní kontroly a neznámého vzorku.

Možná příčina - Řešení

1. Vyschnutí vzorků během barvení.
 - Nenechte vzorky zaschnout.
 2. Došlo k použití nevhodného média pro zalití do bloku nebo k nedostatečnému odstranění parafinu ze vzorku.
 - a) Použijte vhodné médium nebo zcela odstraňte parafin ze vzorku
 - b) Vyměňte xylen/etanol za nový
 3. V pufru je přítomen azid sodný který inaktivoval peroxidázu.
 - a) Použijte pufr bez NaN_3
 - b) Použijte jiný pufr
 4. Došlo k neadekvátní inkubaci enzymu a protilátky
 - a) Vyměňte starý chromogenní substrát
 - b) Odstraňte po každém promytí přebytečný roztok
 - c) Dodržte správný čas pro reakci s protilátkou. Každá primární protilátka vyžaduje jiný čas po přidání.
- Neznámý vzorek není zbarven a pozitivní kontrola ano
1. Antigen byl denaturován nebo zamaskován během fixace nebo zalévání
 - a) Některé antigeny jsou citlivé na fixaci a zalévání do bločků. Použijte slabší fixační reagens a zkráťte dobu fixace
 - b) U některých tkání je nutná příprava před barvením vedoucí k odmaskování antigenů (Antigen Recovery, HIER)
 2. Antigen byl zničen autolýzou

- Použijte tkáň získané biopsií nebo chirurgicky, pokud je to možné

3. Na řezu je přítomno málo antigenů
- Prodlužte dobu inkubace

○ Došlo k intenzivnímu zbarvení pozadí na všech sklíčkách

1. Nebyla celkově zablokována enzymatická aktivita

- Ujistěte se že proces inaktivace endogenních peroxidáz proběhl správně

2. Došlo k tvorbě nespecifických vazeb

- Před přidáním primárních protilátek přidejte 10 % kozí sérum

3. Autolýzou vznikl v histologických roztocích přebytek antigenů

- Pokud je to možné použijte čerstvou tkáň

4. Nebyl správně odstraněn parafin

- Vyměňte xylen/etanol za nový

5. Nebyla správně vymyta protilátka

- Zajistěte pečlivé vymytí protilátky

6. Vysoká teplota v laboratoři urychlila enzymatickou reakci

- a) Udržujte teplotu laboratoře na 15 - 20 °C

b) Zkraťte reakční dobu

○ Během barvení došlo k odloupení vzorku od podložního skla

1. Některé antigeny vyžadují tepelně indukované odhalení nebo delší reakční čas s primární protilátkou což může vést k snadnému odloupení vzorku/řezu od podložního skla

- Pokládejte řezy pouze na podložní sklíčka potažená adhezivem (např. 0,02 % poly-L-lyzinem nebo silanem)