

N-Histofine



N-Histofine Simple Stain[®] AP (MULTI)

Univerzální imuno-polymer s alkalickou fosfatázou, anti-myší a anti-králíčí
N-Histofine imunohistochemické barvicí reagens Skladovat při 2-8 °C

Diagnostika dodávaná:

17 ml. X 1 lahvička (170 testů) kód : 414261F

17 ml. X 3 lahvičky (500 testů) kód: 414262F

Vyrobeno v Japonsku

1. ÚVOD

Firma Nichirei vyvinula unikátní imunohistochemický barvicí postup nazvaný metoda **Univerzálního Imuno-enzymového Polymeru (UIP)**. Tento originální barvicí postup je patentován firmou Nichirei. N-Histofine Simple Stain AP (MULTI) se vyznačuje jak vysokou citlivostí metody, tak úsporou času a práce při histochemickém použití.

2. SLOŽENÍ

Tekutý přípravek, k okamžitému použití. N-Histofine Simple Stain AP (MULTI) (Univerzální imuno-peroxidázový polymer, anti-myší a anti-králíčí) je značený polymer připravený spojením aminokyselinového polymeru s alkalickou fosfatázou a kozími anti-myšími a anti-králíčími 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 AP (MULTI) (Univerzální imuno-peroxidázový polymer, anti-myší a anti-králíčí):

Purifikovaný 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 alkalickou fosfatázou.

3. POUŽITÍ

N-Histofine Simple Stain AP (MULTI) je určen pro použití v imunohistochemických studiích; myší nebo králíčí primární protilátky si uživatel dodává sám. Tato reagentie je běžně použitelná pro řezy lidských tkání fixované formaldehydem a zalité parafinem. Pro barvení řezů zmrazených lidských tkání prostudujte prosím kapitulu **6. POSTUP BARVENÍ**. Pokud se týká použití těchto reagentií v ostatních případech, kontaktujte prosím marketingové oddělení firmy EXBIO Olomouc s.r.o. .

4. PRINCIP

Komplex antigen/protilátka/univerzální imuno-alkalická fosfatáza polymer vzniká vazbou **UIP** na primární myší nebo králíčí 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 reagentie s prošlou expirační dobou
- 3) Vzorky (před i po fixaci; všechny 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 reagentie jsou hořlavé. Nepoužívejte je v blízkosti otevřeného ohně.
- 6) Nikdy nepipetujte reagentie ústy a chraňte se před jejich stykem s kůží, sliznicemi a oděvem.
- 7) Vyvarujte se mikrobiální kontaminaci reagentií; může vést k nesprávným výsledkům.
- 8) Vyvarujte se rozstříkávání reagentií nebo vzniku aerosolu.
- 9) Pouze pro výzkum, ne pro diagnostické použití.

6. POSTUP BARVENÍ

Květen 2019

■ Požadovaný materiál a reagentie (nejsou součástí dodávky)

- Primární protilátky, myší nebo králičí
 - Xylen
 - 100 % etanol
 - 95 % etanol
 - Dobarvovací roztok (pozadí)
 - PBS pufr pH $7,6 \pm 0,2$ (NaCl 7,75g; K_2HPO_4 1,50g; KH_2PO_4 0,20g v 1 l dest. vody)
 - 0,1M TBS (pH $7,5 \pm 0,2$) roztok A 100 ml, roztok B 100 ml, destil. voda 800 ml.
- Složení roztoku A: $C_4H_{11}NO_3-CH_3COOH$ (pH $7,5 \pm 0,2$) 12,11g, dest.voda 1 l.
Složení roztoku B: NaCl 87,66g, dest. voda 1 l.
- Chromogenní substrát (*N*-Histofine New Fuchsin substrate kit kat.kód 415161F)

■ Příprava vzorku

[Nátěry]

1. Odeberte krev do zkumavky s EDTA a udělejte nátěr na sklíčku.
2. Vysušte sklíčko vzduchem 20-30 minut.
3. Fixujte buňky pomocí BFA při 4°C 30 sekund.
4. Opláchněte pod vodovodem 30-60 sekund.
5. Setřepjte vodu a ponořte do PBS na 5 minut.

[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 (1cm x 1 cm x 0,5 cm). Dále doporučujeme tuto fixaci:

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

Řezy (3 - 6 μ m silné) jsou umístěny na podložní sklíčka. Pro 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.

1. xylen
 - a) Ponořte sklíčka do xylenu. Po 3 minutách je vytáhněte a setřepjte nadbytečný xylen.
 - b) Opakujte krok 1.a) dvakrát s čerstvým xylenem
2. etanol
 - a) Ponořte sklíčka do 100% etanolu. Po 3 minutách je vytáhněte a setřepjte nadbytečný etanol.
 - b) Opakujte krok 2.a) jedenkrát s čerstvým 100% etanolem.
 - c) Postup zopakujte s 95% etanolem.
3. omytí
Po setřepání nadbytečného etanolu, ponořte sklíčka do PBS na 5 minut.

[Pro tkáně zmrazené]

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

Řezy z kryostatu 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 sekce obsahují málo endogenní peroxidázy, málo erytrocytů a málo granulocytů, může být kalení endogenní peroxidázy vynecháno.

[Kontrolní vzorky]

K posouzení výsledků neznámého vzorku je potřeba zároveň ošetřit stejným způsobem pozitivní , negativní vzorky a kontrolní vzorky pro interpretaci výsledku zbarvení.

Květen 2019

■ Doporučený postup barvení

1. 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 třikrát 5 minut pokaždé v čerstvém PBS.

2. Přidání a reakce *N*-Histofine Simple Stain AP (MULTI) (Univerzální imuno-alk. fosfatáza polymer, anti-myší a anti-králičí)

- (1) Opatrně osušte okolí řezu
- (2) Přidejte 2 kapky Simple Stain AP (MULTI) na všechny vzorky tak, aby pokryly celou plochu řezu. Inkubujte 30 minut při pokojové teplotě.
- (3) Promyjte třikrát 5 minut pokaždé v čerstvém PBS.
- (4) Promyjte v TBS 5 minut.

3. 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 třikrát 5 minut pokaždé v čerstvém PBS.

4. Dobarvení

- (1) Ponořte vzorky do dobarvovacího roztoku
- (2) Promyjte vzorky tekoucí vodou

5. Montování preparátu

Při použití substrátu New Fuchsin, na řezy použijeme ve vodě rozpustné montovací médium, nebo vzduchem vysušíme, vyčistíme pár sekund v xylenu a aplikujeme permanentní montovací médium.

■ 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 AP (MULTI) nevyžaduje zvláštní použití blokátorů, v některých případech může aplikace blokátoru před inkubací s primární protilátkou vést k potlačení nežádoucího zbarvení pozadí.

9. PODMÍNKY POUŽITÍ

N-Histofine Simple Stain AP (MULTI) je navržen pouze pro použití ve výzkumu, ne pro terapeutické a diagnostické použití. Prodejci a distributoři Nichirei, ani firma Nichirei Corporation nejsou zodpovědní za přímé i nepřímé přestupky

Květen 2019

proti místním zákonům a patentům vzniklé použitím *N*-Histofine Simple Stain AP (MULTI), ani za porušení patentových práv vzniklých nesprávným použitím výrobků.













10. PROBLÉMY A JEJICH ŘEŠENÍ


Problém	Možné příčiny	Řešení
Nedošlo k zbarvení nebo pouze slabému zbarvení u pozitivní kontroly a neznámého vzorku.	<ol style="list-style-type: none">1. Vyschnutí vzorků během barvení.2. Došlo k použití nevhodného média pro zalití do bloku nebo k nedostatečnému odstranění parafinu ze vzorku3. Došlo k neadekvátní inkubaci enzymu a protilátky	<ol style="list-style-type: none">1. Nenechte vzorky zaschnout2. Použijte vhodné médium nebo zcela odstraňte parafin ze vzorku2. Vyměňte xylen/etanol za nový3. Vyměňte starý chromogenní substrát3. Odstraňte po každém promytí přebytečný roztok3. Dodržte správný čas pro reakci s protilátkou. Každá primární protilátka vyžaduje jiný čas po přidání.
Neznámý vzorek není zbarven a pozitivní kontrola ano	<ol style="list-style-type: none">1. Antigen byl denaturován nebo zamaskován během fixace nebo zalévání2. Antigen byl zničen autolýzou3. Na řezu je přítomno málo antigenů	<ol style="list-style-type: none">1. Některé antigeny jsou citlivé na fixaci a zalévání do bločků. Použijte slabší fixační reagens a zkraťte dobu fixace1. U některých tkání je nutná příprava před barvením vedoucí k odmaskování antigenů (Antigen Recovery, HIER)2. Použijte tkáně získané biopsií nebo chirurgicky, pokud je to možné3. Prodlužte dobu inkubace
Došlo k intenzivnímu zbarvení pozadí na všech sklíčkách	<ol style="list-style-type: none">1. Nebyla celkově zablokována enzymatická aktivita2. . Došlo k tvorbě nespecifických vazeb3. Autolýzou vznikl v histologických roztocích přebytek antigenů4. Nebyl správně odstraněn parafin5. Nebyla správně vymyta protilátka6. Vysoká teplota v laboratoři urychlila enzymatickou reakci7. Vysušení vzorků během barvení po reagenciích	<ol style="list-style-type: none">1. přidejte Levamisol do roztoku chromogenu/substrátu. Ke snížení aktivity endogenních enzymů se používá roztok chromogenu/substrátu obsahující ImM Levamisol.2. Před přidáním primárních protilátek přidejte 10 % kozí sérum3. Pokud je to možné použijte čerstvou tkáň4. Vyměňte xylen/etanol za nový5. Zajistěte pečlivé vymytí protilátky6. Vysoká teplota v laboratoři urychlila enzymatickou reakci6. Zkraťte reakční dobu7. Nenechte vzorky zaschnout
Během barvení došlo k odloupení vzorku od podložního skla	<ol style="list-style-type: none">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	<ol style="list-style-type: none">1. Pokládejte řezy pouze na podložní sklíčka potažená adhezivem (např. 0,02 % poly-L-lyzinem nebo silanem).


11. LITERATURA

Květen 2019

1. Kimura, N., : Synaptotagmin 1 Expression in Mast Cells of Normal Human tissues, !Systemic Mast LCell disease, and a Human Mast Cell Leukemia Cell Line. J. Histochem Cytochem 49:341-346,2001.
2. Naito,Z., ,, Expression and accumulation of lumican protein in uterine cervical cancer cells at the priphery of cancer nsts. Int. J. Oncol.20: 943-948,2002.
- 3.Hoshino,Y. : Maximal HIV-1 Replication in Alveolar Macrophages during Tuberculosis Requires goth Lymphocyte Contact and Cytokines. J. Exp.Med. 195:495-505,2002.
- 4.Sawada.H.: Characterization of an Anti-Decorin Monoclonal Antibody and Its Utility. J.Biochem. 132:997-1002,2002.
- 5.Ozaki,K.,“ Mast Cell Tumors of the Gastrointestinal Tract in 39 Dogs. Vet. Pathol. 39: 557-564, 2002.
- 6.Zen.Y.: Lipopolysaccharide Induces Overexpression of MUC2 and MUC5AC in Cultured Biliary Epithelial Cells. Possible Key Phenomenon of Hepatolithiasis. Am.J.Pthol.161:1475-1484,2002.
7. Sawada.H.: Characterization of an Anti-Decorin Monoclonal Antibody and Its Utility. J.Biochem. 132:997-1002,2002.
- 8.Takagi-Morishita, Y.: Mouse Uterine Epithelial Apoptosis is Associated with Expression of Mitochondrial Völtage-Dependent Anion Channels, Release of Cytochrome c from Mitochondria and the Ratio of Bax to Bcl-2 or BCl-X. Biol. Reprod. 68:1178-1184,2003.
- 9.Morimoto, R.: Co-expression of visicular glutamate transporters (VGLUTI and VGLUT2) and their association with synaptic-like microvesicles in rat pinealocytes. J.Neurochem.84:382-391,2003
- 10.Nakatani,K.:Cytoglobin/STAP, its unique localization is splachnic fibroblast-like cells and fuction in organ fibrogenesis. Lab. Invest.84:91-101,2003.
- 11.Kitada,M.: Translocation of Glomerular p47phox and p67phox by Protein Kinase C-beta Activation is Required for Oxidative Strdss in Diabetic Nphropathy. Diabetes.52: 2603-2614,2003.

	Konzultujte návod k použití		Pozor		Autorizovaný zástupce evropského společenství
	Použijte do		Nepoužívat opakovaně		In vitro diagnostický zdravotnický prostředek
	Číslo šarže		Výrobce		Skladujte v rozmezí teplot
	Katalogové číslo		Celkový počet testů		produkt splňuje požadavky směrnice 98/79/EC pro IVD

 **NICHIREI BIOSCIENCES INC.**
6-19-20, Tsukiji, Chuo-ku, Tokyo, 104-8402, JAPAN
Phone:81-3-3248-2207, Facsimile:81-3-3248-2243

 **EMERGO EUROPE**
Prinsessegracht 20
2514 AP The Hague
The Netherlands

Distributor

EXBIO Olomouc s.r.o.

Tel: 587 301 011

Email: info@exbio.com