

N-Histofine Simple Stain® AP (MULTI)

Univerzální imuno-alkalická fosfatáza polymer, anti-myší a anti-králíčí

N-Histofine imunohistochemické barvicí reagens

Skladovat při 2-8 °C

1. ÚVOD

Firma Nichirei vyvinula unikátní imunohistochemický barvicí postup nazvaný metoda **Univerzálního Immuno-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-morfolinpropan sulfonová 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; 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 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.

6. POSTUP BARVENÍ

n Požadovaný materiál a reagensie (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)
- zkumavka pro odběr krve s EDTA.
- Reagensie 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
- BFA: NaH_2PO_4 15mg, K_2HPO_4 120mg, dest.voda 30ml, aceton 45ml, formalin 25ml.
- Adhezivum pro přichycení řezu tkáně (0,02 % poly-L-lyzin, silan atd.)

n 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 $4^\circ C$ 30 sekund.
4. Opláchněte pod vodovodem 30-60 sekund.
5. Setřepete 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 (1 cm 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 μm 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 setřepete 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 setřepete 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 tkáň 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.

[Kontrolní vzorky]

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

n 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.

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 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

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 AP (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 zkraťte 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)