

N-Histofine Simple Stain MAX PO (MULTI)

Univerzální imuno-peroxidázový polymer, anti-myší a anti-králíčí

N-Histofine imunohistochemické barvicí reagens Skladovat při 2-8 °C

leden, 2019



Dodávané reagencie 17 ml x 1 lahvička (170 testů)
17 ml x 3 lahvičky (500 testů)
17 ml x 9 lahviček (1500 testů)

1. ÚVOD

Firma Nichirei vyvinula unikátní imunohistochemický barvicí postup, nazvaný metoda **Univerzálního Imuno-enzymového Polymeru (UIP)**. (US Patent č. 6,252,053) Tento originální barvicí postup je patentován firmou Nichirei Biosciences. N-Histofine Simple Stain MAX PO (MULTI) se vyznačuje vysokou citlivostí metody a 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-králíčí) je značený polymer připravený spojením aminokyselinového polymeru s peroxidázou a kozími anti-myšími a anti-králíčími imunoglobuliny, redukovanými na Fab fragment. Tento polymer je uchováván v MOPS (3-morfolinpropanosulfonová 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-králíčí):

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.

Systém neobsahuje biotin ani streptavidin, takže oproti tradičnímu detekčnímu systému na biotinové bázi je kompletně zamezeno zabarvení pozadí.

3. POUŽITÍ

Pro diagnostické použití in vitro.

Interpretace musí být provedena v kontextu s klinickou historií pacienta a ostatními diagnostickými testy kvalifikovaným patologem.

N-Histofine Simple Stain MAX PO (MULTI) je imunohistochemický test, který umožňuje odhalit antigeny na lidských tkáních a buňkách, které reagují s primárními myšími nebo králíčími protilátkami dodanými uživatelem.

4. PRICIP

Komplex antigen/protilátka/univerzální imuno-peroxidázový 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 reagencie s prošlou expirační dobou
- 3) Pro profesionální použití.
- 4) Vzorky (před i po fixaci; všechny materiál, který s nimi přišel do styku) jsou biologickým rizikovým materiálem, s nímž je nutno pracovat dle příslušných bezpečnostních pravidel.
- 5) 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.
- 6) Organické reagencie jsou hořlavé. Nepoužívejte je v blízkosti otevřeného ohně.
- 7) Nikdy nepipetujte reagencie ústy a chraňte se před jejich stykem s kůží, sliznicemi a oděvem.
- 8) Vyvarujte se mikrobiální kontaminaci reagencí; může vést k nesprávným výsledkům.
- 9) Vyvarujte se rozstříkávání reagencí nebo vzniku aerosolu.
- 10) S roztokem DAB jako chromogenem se musí zacházet opatrně, protože obsahuje karcinogen.
- 11) Nepoužitý roztok musí být zlikvidován v souladu s místními a státními nařízeními.

6. POSTUP BARVENÍ

■ Požadovaný materiál a reagencie (nejsou součástí dodávky)

- Primární protilátka, myší nebo králíčí
- 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-lyzín, 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

■ 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 antigení 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.

■ Příprava řezů

[Pro parafinové řezy]

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

[Pro tkáně zmrazené]

Řezy z kryostatu jsou umístěny na podložní sklíčko potažené adhesivem (např. 0,02 % poly-L-lyzinem) 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 10 minut s následným barvením.

[Kontrolní vzorky]

k interpretaci výsledků zbarvení musí být pozitivní, negativní sklíčko a kontrolní sklíčko s reagenií posuzováno stejným způsobem jako neznámý vzorek.

- Pozitivní kontrolní sklíčko
Vzorek obsahující cílový antigen, který je zpracován stejně jako neznámý vzorek.
- Negativní kontrolní sklíčko
Vzorek neobsahující cílový antigen, který je zpracován stejně jako neznámý vzorek.
- Kontrolní sklíčko s reagenií
Kontrolní vzorek je použit a zpracován stejným způsobem jako testovací vzorek s výjimkou, že místo primární protilátky je použita negativní kontrolní reagenie.

■ 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 1 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.

■ Doporučený postup barvení

1. Inaktivace endogenní peroxidázy

(1) Opatrně osušte okolí řezu

(2) Ponořte vzorek(y) do roztoku 3 % H₂O₂ v absolutním metanolu na 10-15 minut při pokojové teplotě 15-25°C

(3) Promyjte 3 x 5 minut v PBS.

2. Přidání a reakce primárních protilátek

- (1) Opatrně osušte okolí řezu
- (2) Přidejte 2 kapky (100 μ l) 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 (100 μ l) 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 (100 μ l) 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 pročištění xylenem zalijí permanentním médiem.

■ 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.

Specifita a citlivost detekce antigenů je závislá na použité specifické primární protilátce.

7. SKLADOVÁNÍ

Skladujte v temnu při 2 – 8 °C. Reagencie je stabilní 18 měsíců po vyrobení.

8. OMEZENÍ

- (1) Před barvením nechte diagnostika vytemperovat při pokojové teplotě (15-25°C).
- (2) Aby se minimalizovalo denaturování antigenů, nevystavujte tkáň nadměrné teplotě nad 58°C.
- (3) Při každém barvicím kroku nechejte tkáň vyschnout.
- (4) Optimální koncentrace a inkubační čas primární protilátky by měla být stanovena odzkoušením. V některých případech může být požadováno další zředění primární protilátky, aby se předešlo přebarvení.
- (5) Pokud řezy obsahují málo endogenní peroxidázy, erytrocytů a granulocytů, můžeme odstranění endogenní peroxidázy vynechat.
- (6) 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.

(7) 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.

(8) 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) *N*-Histofine Simple Stain MAX PO (MULTI) je pro diagnostiku *in vitro*.

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.

9. PROBLÉMY A JEJICH ŘEŠENÍ

Problém

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

Možná příčina

1. Vyschnutí vzorků během barvení.

Řešení - Nenechte vzorky zaschnout, používejte vlhkou komůrku, aby nedošlo k zaschnutí.

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 bloků. Použijte slabší fixační reagens a zkraťte dobu fixace
- b) U některých tkání je nutná příprava před barvením vedoucí k odmaskování antigenů (Antigen Recovery, HIER nebo trypsin příprava)

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 % kozi 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 vmytí protilátky

6. Vysoká teplota v laboratoři urychlila enzymatickou reakci

- a) Udržujte teplotu laboratoře na 15 - 25 °C
- b) Zkraťte reakční dobu

7. Zaschnutí vzorku během barvení .

- Nikdy nenechejte tkáň zaschnout.

- **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 skříčka potažená adhezivem (např. 0,02 % poly-L-lyzinem nebo silanem)

10. Literatura

- 1) Kimura, N., *et al*: Synaptotagmin I Expression in Mast Cells of Normal Human Tissues, Systemic Mast Cell Disease, and a Human Mast Cell Leukemia Cell Line. *J.Histochem. Cytochem.* 49: 341-346,2001.
- 2) Naito, Z., *et al*: Expression and accumulation of lumican protein in uterine cervical cancer cells at the periphery of cancer nests. *Int. J. Oncol.* 20: 943-948,2002.
- 3) Hoshino, Y., *et al*: Maximal HIV-1 Replication in Alveolar Macrophages during Tuberculosis Requires both Lymphocyte Contact and Cytokines. *J. Exp. Med.* 195: 495-505,2002.
- 4) Sawada, H., *et al*: Characterization of an Anti-Decorin Monoclonal Antibody, and Its Utility. *J. Biochem.* 132: 997-1002,2002.
- 5) Ozaki, K., *et al*: Mast Cell tumors of the Gastrointestinal Tract in 39 Dogs. *Vet. Pathol.* 39:557-564,2002.
- 6) Zen, Y., *et al*: 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) Savada, H., *et al*: Case report: Altered decorin expression of systemic sclerosis by UVA1 (340-400nm)phototherapy: Immunohistochemical analysis of 3 cases. *BMC Dermatol.* 3:2,2003
- 8) Takagi-Morishita, Y., *et al*: Mouse Uterine Epithelial Apoptosis is Associated with Expression of Mitochondrial Voltage-Dependent Anion Channels, Release of Cytochrome c from Mitochondria, and the Ratio of Bax to Bcl 2 or Bcl-X1. *Biol. Reprod.* 68:1178-1184,2003.
- 9) Morimoto, R., *et al*: Co-expression of vesicular glutamate transporters (VGLUT1 and VGLUT2) and their association with synaptic-like microvesicles in fat pinealocytes. *J. Neurochem.* 84: 382-391, 2003.
- 10) Nakatani, K., *et al*: Cytoglobin/STAP, its unique localization in splanchnic fibroblast-like cells and function in organ fibrogenesis. *Lab.invest.* 84: 91-101,2003.
- 11) Kitada, M., *et al*: Translocation of Glomerular p47phox and p67phox by ProteinKinase C-beta Activation is Required for Oxidative Stress in Diabetic Nephropathy. *Diabetes.* 52 :2603-2614,2003.

Upozornění: Pro identifikaci různých symbolů slouží níže uvedená tabulka

| | |
|--|--|
|  | Dostačující pro <n> |
|  | Čtěte návod k použití |
|  | Spotřebujte do (datum expirace) |
|  | Číslo šarže |
|  | Katalogové číslo |
|  | Upozornění |
|  | Výrobce |
|  | Zplnomocněný zástupce Evropského společenství |
|  | Diagnostický zdravotnický prostředek in vitro |
|  | Składujte při (omezení teploty) |
|  | Nepoužívejte opakovaně |
|  | Tento produkt splňuje požadavky směrnice 98/79/EC pro diagnostické prostředky in vitro |



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