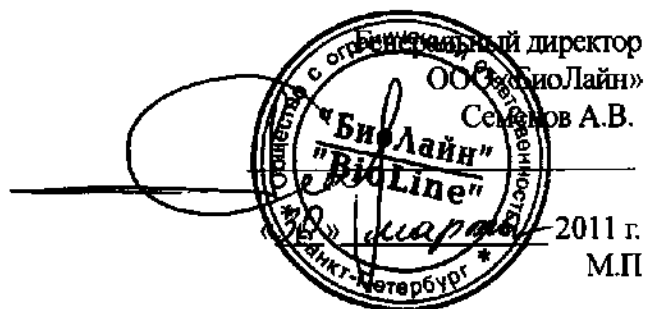


«УТВЕРЖДАЮ»



ИНСТРУКЦИЯ

по применению **Набора для предварительной ферментативной обработки - Bond Enzyme Pretreatment Kit [AR9551]**, производства **Лейка Микросистем Вертриеб Гмбх (Германия, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH)**

1. НАЗНАЧЕНИЕ
2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА
 - 2.1. Принцип действия
 - 2.2. Состав набора
3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ
4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ
6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ
7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА
8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ
9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ
10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

1. Назначение

Набор для предварительной ферментативной обработки - Bond Enzyme Pretreatment Kit [AR9551], производства Лейка Микросистем Вертриеб Гмбх (Германия, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH), предназначен для ферментативной демаскировки антигенов при проведении иммуногисто- и цитохимических исследований фиксированных формалином и заключенных в парафин тканей в автоматическом иммуногистостейнере Bond-maX.

2. Характеристика набора

2.1 Принцип действия

Основой иммуногистохимического (ИГХ) метода является иммунологическая реакция антигена и антитела. ИГХ-методы позволяют локализовать и идентифицировать клеточные и тканевые антигены, основываясь на их связывании с антителами.

Набор для предварительной ферментативной обработки позволяет открыть эпитопы на молекуле антигена, которые были замаскированы при проведении фиксации ткани и заключении в парафин, таким образом делая эпитопы доступными для первичных антител. Набор предназначен для использования в автоматическом иммуногистостейнере Bond-maX, способствует улучшению качества окраски препаратов при проведении иммуногистохимических исследований и снижает вероятность получения ложноотрицательных результатов.

Перед обработкой образца антителами следует провести блокировку эндогенной пероксидазной активности и демаскировку антигенов, в ряде случаев необходима именно ферментативная демаскировка. Далее образец инкубируют с первичными антителами. Для определения первичных антител используют вторичные антитела конъюгированные с полимером сцепленным с пероксидазой (которые входят в состав полимерной системы) и направлены к первичным антителам. С полимером вторичных антител взаимодействует субстрат-хромогенная смесь. Для этого проводят инкубацию с субстрат-хромогенной смесью и DAB субстратным буфером. Образец докрашивают гематоксилином и заключают под покровное стекло.

2.2 Состав набора

1. Концентрат фермента, в состав которого входит протеолитический фермент протеиназа К (17 мг/мл) и стабилизатор, объем 1 мл.
2. Раствор для разведения фермента, в состав которого входит цитратный буфер, сурфактант и 0,35% ProClin 950, объем 200 мл.
3. Три контейнера Bond открытого типа, объем 7мл.

Перед использованием необходимо готовить рабочий раствор фермента, разведение подбирается индивидуально, в соответствии с особенностями исследуемого антигена.

3. Аналитические и диагностические характеристики

Данный набор необходим для улучшения качества иммуногистохимического окрашивания, которое широко используется как в клинической практике для диагностики различных заболеваний и, главным образом, в дифференциальной диагностике опухолей, так и в научно-исследовательской работе.

4. Меры предосторожности

- Этот продукт предназначен для диагностики *in vitro*.
- Никогда не пипетируйте раствор и избегайте контакта кожи и слизистых мембран с реагентами или образцами. Если реагенты или образцы соприкоснулись с чувствительными участками, промойте их обильным количеством воды и обратитесь к врачу.

- С образцами тканей и материалами, контактировавшими с ними, следует обращаться как с потенциально инфекционными и обеззараживать в соответствии с федеральными, государственными и местными инструкциями.
- Минимизируйте загрязнение реагентов микробами, иначе может произойти неспецифическое окрашивание.
- Изменения внешнего вида реагентов, такие как выпадение осадка или обесцвечивание указывают на нестабильность и непригодность. В таких случаях реагент не должен использоваться.

5. Оборудование и материалы

Для проведения ферментативной демаскировки с помощью настоящего набора необходимо следующее оборудование и материалы:

- 1) лабораторная посуда
- 2) де-ионизированная вода
- 3) батарея для депарафинизации и регидратации
- 4) микротом или микротом-криостат для нарезания гистологических срезов
- 5) термостол для расправления парафиновых срезов
- 6) предметные и покровные стекла
- 7) адгезивы (для прилипания гистологического среза к стеклу)
- 8) автоматический иммуногистостейнер Bond-maX (проведение демаскировки запрограммировано в приборе)
- 9) среды для заключения гистологических препаратов
- 10) световой микроскоп (для визуализации результатов окрашивания)

6. Анализируемые образцы

Образцы тканей, биопсии, участки органов.

7. Проведение иммуногистохимического анализа

- 1) Разместить срезы на стеклах, покрытых адгезивом.
- 2) Провести депарафинизацию в ксилоле или его заменителях.
- 3) Регидратировать через серию спиртов.
- 4) Промыть текущей водопроводной водой.
- 5) Провести процедуры демаскировки антигена. В соответствии с инструкциями к первичным антителам, для ряда антигенов показана ферментативная демаскировка, которую можно выполнить с использованием настоящего набора по программе прибора Bond-maX.
- 6) Промыть де-ионизированной водой.
- 7) Нейтрализовать эндогенную пероксидазу, используя пероксидазный блок, 5 мин.
- 8) Промыть 2 раза по 5 мин TBS буфером.
- 9) Инкубировать срезы 5 минут с протеиновым блоком.
- 10) Промыть 2 раза по 5 мин TBS буфером.
- 11) Обвести срезы гидрофобным карандашом
- 12) Инкубировать срезы с оптимально разведенными первичными антителами (время инкубации см. в инструкции, приложенной к первичным антителам).
- 13) Промыть 2 раза по 5 мин TBS буфером.

После депарафинизации, демаскировки и инкубации с первичными антителами для визуализации следует использовать систему детекции на основе пероксидазы или набор визуализации на основе полимера, сцепленного с пероксидазой..

8. Регистрация результатов

Оценить качество ферментативной демаскировки возможно только после проведения всей

процедуры иммуногистохимического окрашивания. Продукт иммуногистохимических реакций может иметь в клетке различную локализацию: мембранную, цитоплазматическую, ядерную, в области аппарата Гольджи.

Результаты иммуногистохимической реакции могут оцениваться полуколичественным или количественным способом, с помощью световой микроскопии, а в ряде случаев только качественной оценкой реакции.

9. Учет результатов реакции

При использовании иммуногистохимического метода с предварительной ферментативной демаскировкой антигенов необходима постановка контролей, под контролем иммуногистохимической реакции подразумевается проверка специфичности взаимодействия антител и, следовательно реальность полученной картины. Отрицательный контроль, свидетельствует о том, что исследуемый антиген в ткани не присутствует, положительный- наоборот, свидетельствует о наличии исследуемого антигена. Вместе с тем этот метод наиболее специфичен и чувствителен, чем рутинное гистологическое исследование и позволяет снизить количество ошибок и неверифицируемых диагнозов, произвести иммунофенотипирование опухолей лимфоидной и гематопозитической системы, новообразований мягких тканей и т.д.

10. Условия хранения и эксплуатации набора

Набор для предварительной ферментативной обработки следует хранить при температуре +2 - 8°C, не замораживать, после применения его необходимо немедленно вернуть в холодильник (t° +2 - 8 C). Знаками, указывающими на загрязнение и/или нестабильность являются мутность раствора, появление запаха и наличие осадка. Реагенты, входящие в состав набора, не следует применять после истечения срока годности, указанного на этикетке.

Генеральный директор ООО «БиоЛайн»

Александр Владимирович Семенов/

30 марта 2011 г.

