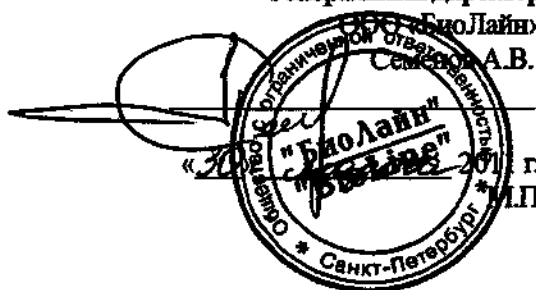


«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ООО «БиоЛайн»

Семшов А.В.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению **Набора визуализации на основе полимера NovoLink и пероксидазы, производства Лейка Микросистем Верtrieb 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 визуализации на основе полимера NovoLink и пероксидазы, производства Лейка Микросистем Вертриеб Гмбх (Германия, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH), предназначен для выявления мышечных иммуноглобулинов M, G и кроличьих иммуноглобулинов G первичных антител с помощью вторичных антител козы конъюгированных с полимером NovoLink™ сцепленным с пероксидазой.

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.

Принцип иммуногисто- и цитохимического метода исследования основан на окраске биологического материала (образцов ткани - гистологических препаратов, биопсий (для гистохимии) и цитологических препаратов, мазков, для цитохимии, в условиях сохранения морфологии клеток, позволяющий определить локализацию искомого антигена в различных тканях, типах клеток, клеточных структурах с помощью специфических антител и чувствительных компонентов набора визуализации.

Перед обработкой образца антителами следует провести блокировку эндогенной пероксидазной активности и демаскировку антигенов. Далее образец инкубируют с первичными антителами. Для определения первичных антител используют вторичные антитела конъюгированные с полимером NovoLink™ сцепленным с пероксидазой (которые входят в состав набора визуализации) 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. Пероксидазный блок.
2. Протеиновый блок.
3. Усилитель проникновения полимера.
4. Вторичные антитела, конъюгированные с полимером сцепленным с пероксидазой.
5. Хромоген DAB
6. DAB буфер (полимер).
7. Гематоксиллин 0,02%.

Хромоген DAB разводится в соотношении 1/20 с использованием DAB буфера (добавить 50µL хромогена DAB к 1мл NOVOLINK™ DAB буфера (полимер)).

Пероксидазный блок, протеиновый блок, усилитель проникновения полимера, вторичные антитела, конъюгированные с полимером сцепленным с пероксидазой и гематоксиллин готовы к использованию.

3. Аналитические и диагностические характеристики

Данные наборы необходимы для 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. Наборы рассчитаны на 50, 250, 500 и 1250 тестов. В состав набора входят все реагенты, которые необходимы для проведения иммуногистохимического исследования.

4. Меры предосторожности

- Этот продукт предназначен для диагностики *in vitro*.
- Никогда не пицетируйте ртом 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.
- Реагент вторичных антител содержит азид натрия в качестве консерванта. Азид натрия вреден при попадании внутрь. Храните вне досягаемости детей. Храните отдельно от пищевых продуктов, спиртных напитков и кормов для животных. Азид натрия следует смывать большими количествами воды.
- DAB хромоген вреден при попадании внутрь. Храните вне досягаемости детей. Храните отдельно от пищевых продуктов, спиртных напитков и кормов для животных.

5. Оборудование и материалы

Для проведения иммуногистохимического исследования с помощью набора визуализации на основе полимера NovoLink и пероксидазы необходимо следующее оборудование и материалы:

- 1) лабораторная посуда
- 2) буферные растворы
- 3) батарея для депарафинизации и регидратации
- 4) микротом или микротом-криостат для нарезания гистологических срезов
- 5) термостойкий для расправления парафиновых срезов
- 6) предметные и покровные стекла
- 7) адгезивы (для прилипания гистологического среза к стеклу)
- 8) влажная камера
- 9) первичные антитела
- 10) термостаты 37°C, 56°C (для инкубации образца ткани с антителами)
- 11) гистологические красители
- 12) среды для заключения гистологических препаратов
- 13) 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, если это требуется (см. инструкцию, приложенную к первичным антителам).
- 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 протенновым 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 набор.

1. Инкубировать срезы 30 минут с усилителем проникновения полимера.
2. Промыть 2 раза по 5 мин TBS буфером.
3. Инкубировать срезы 30 минут с вторичными антителами, конъюгированными с полимером сцепленным с пероксидазой.
4. Промыть 2 раза по 5 мин TBS буфером.
5. Инкубировать срезы с рабочим разведением DAB 5 мин.
6. Промыть водой.
7. Докрасить гематоксилином.
8. Промыть водой 5 минут.
9. Провести дегидратацию, очищение, затем покрыть заключающим раствором.

8. Регистрация результатов

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 этого метода 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 визуализации на основе полимера NovoLink и пероксидазы следует хранить при температуре $+2 - 8^{\circ}\text{C}$, не замораживать, после применения их необходимо немедленно вернуть в холодильник ($t^{\circ} +2 - 8^{\circ}\text{C}$). 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»

А. марта 2011 г.

