

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор
ООО «БиоЛайн»
Семенов А.В.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению Полимерной системы Бонд - Bond Polymer Refine Detection [DS9800],
производства Лейка Микросистем Вертриеб Гмбх (Германия, Leica Mikrosysteme
Vertrieb GmbH)

1. НАЗНАЧЕНИЕ
2. ХАРАКТЕРИСТИКА СИСТЕМЫ
 - 2.1. Принцип действия
 - 2.2. Состав системы
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

Полимерная система Бонд - Bond Polymer Refine Detection [DS9800], производства Лейка Микросистем Вертриеб Гмбх (Германия, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH), предназначена для выявления мышиных иммуноглобулинов М, G и кроличьих иммуноглобулинов G первичных антител с помощью вторичных антител конъюгированных с полимером сцепленным с пероксидазой в автоматическом иммуногистостейнере Bond-maX.

2. Характеристика системы

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 системы детекции.

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 конъюгированных 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 покрывное стекло. Весь процесс происходит автоматически по заданной программе в автоматическом иммуногистостейнере Bond-maX.

2.2 Состав системы

1. Пероксидный блок, 30 мл
2. Усилитель проникновения полимера
3. Вторичные козы антитела меченные полимером, 30 мл
4. DAB часть 1 66 мМ 3,3'-диаминобензидин тетрагидрохлорид в стабилизирующем растворе, 2,4 мл
5. DAB часть B 0,05% перекись водорода в стабилизирующем растворе, 30 мл
6. DAB часть B 0,05% перекись водорода в стабилизирующем растворе, 30 мл
7. Гематоксилин 0,02% гематоксилин, 30 мл

Все реагенты в готовом разведении, дополнительное смешивание и разведение не рекомендуется.

3. Аналитические и диагностические характеристики

Данная система необходима 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. Система рассчитана на 300 тестов. В состав системы входят все реагенты, которые необходимы для проведения иммуногистохимического исследования в автоматическом иммуногистостейнере Bond-maX, особенно это актуально при больших потоках необходимых исследований.

4. Меры предосторожности

- Этот продукт предназначен для диагностики in vitro.
- Никогда не пипетируйте 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 содержат 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 полимерной системы Бонд 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) термосток для расправления парафиновых срезов
- 6) автоматический иммуногистостейнер Bond-maX
- 7) предметные и покровные стекла
- 8) адгезивы (для прилипания гистологического среза к стеклу)
- 9) первичные антитела
- 10) среды для заключения гистологических препаратов
- 11) 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 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 данную систему в иммуногистостейнере по заданной программе, при этом время и количество повторений определяется программой, а последовательность аналогична таковой при ручной методике:

1. Инкубировать срезы с усилителем проникновения полимера.
2. Промыть TBS буфером.
3. Инкубировать срезы с вторичными антителами, конъюгированными с полимером сцепленным с пероксидазой.
4. Промыть TBS буфером.
5. Инкубировать срезы с рабочим разведением DAB (несколько раз, в зависимости от заданной программы).
6. Промыть водой.
7. Докрасить гематоксилином.
8. Промыть водой.
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 гематопоетической системы, новообразований мягких тканей и т.д.

10. Условия хранения и эксплуатации набора

Полимерную систему Бонд следует хранить при температуре +2 - 8°C, не замораживать, после применения ее 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.





Семенов А.В.