

Система детекции Histofine® Simple Stain MAX PO (MULTI)

универсальный полимерный поливалентный окрашивающий реактив. Хранить при 2-8 °С. Сделано в Японии

Поставка реактива: 17 мл x 1 бутылка (170 тестов) Код: 414151F
17 мл x 3 бутылки (500 тестов) Код: 414152F
17 мл x 9 бутылок (1 500 тестов) Код: 414154F

1. ВВЕДЕНИЕ

Фирма NICHIREI BIOSCIENCES INC. разработала уникальную иммуно-гистохимическую красящую систему под названием Универсальный Иммуно-энзимный Полимер (UIP), метод, запатентованный в США, № патента 6,252,053. Он является оригинальной технологией фирмы. -Histofine® Simple Stain MAX PO (MULTI) обеспечивает и быстрое действие, и экономию времени при иммуно-гистохимическом применении.

2. ОПИСАНИЕ ПРЕПАРАТА

Жидкость, готовая к использованию. Меченый полимер - Histofine® Simple Stain MAX PO (MULTI) (Универсальный Иммуно-пероксидазный Полимер, антимишинный и антикроличий) изготовлен путем соединения аминокислотных полимеров с пероксидазой и антимишинным и антикроличьим иммуноглобулином козы, которые редуцируются до Fab антител. Он содержится в буфере MOPS (3-морфолинпропансульфоновой кислоты) (pH 6.5), со стабилизатором и бактерицидным средством.

Описание Histofine® Simple Stain MAX PO (MULTI) (Универсальный Иммуно-пероксидазный Полимер, Анти-мышинный и анти-кроличий).

Иммуноглобулиновая фракция выделена из иммунизированной козьей сыворотки путем переваривания, чтобы приготовить F(ab)₂ фрагмент.

Антиген специфичный F(ab)₂ аффинно очищен с антигеном. Твердофазная абсорбция была выполнена с человеческим сывороточным протеином. Полимер из аминокислот, меченый пероксидазой, был конъюгирован с Fab фрагментом, полученным редукцией F(ab)₂.

3. ПРЕДПОЛАГАЕМОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ IN VITRO

Реактив Histofine® Simple Stain MAX PO (MULTI) предназначен для иммуногистохимических исследований фиксированных в формалине в формалине. О применении для окрашивания замороженных срезов тканей читайте в п. 6. ПРОЦЕДУРА ОКРАШИВАНИЯ. Относительно этого реактива для других образцов можно узнать, обратившись в техническую службу фирмы NICHIREI BIOSCIENCES.

4. ПРИНЦИП

Антиген/антитело/Универсальный Иммуно-пероксидазный Полимерный комплекс может быть приготовлен путем реакции реактива с первичным мышиным или кроличьим антителом, соединенным с антигеном на срезе ткани. Ферментативное действие этого комплекса приводит к появлению окрашенного осадка, таким образом, окрашивая местоположение антигена.

5. ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ РЕАКТИВА ИЛИ ОБРАЩЕНИИ С НИМ

1. Прежде чем использовать реактив, внимательно прочитайте эту инструкцию.
2. Не используйте реактивы после истечения срока их годности.
3. Для профессионального использования.
4. С образцами, до и после фиксации, а также с другими материалами, используемыми вместе с ними, следует обращаться, как с биологически опасными материалами, соблюдая соответствующие правила предосторожности.
5. Вдыхание или проглатывание высоко аллергенного фиксирующего формальдегида - опасно. Надевайте защитную маску. При случайном проглатывании примите рвотное средство. При контакте с кожей или попадании в глаза, тщательно промойте их водой.
6. Органические реактивы - легковоспламеняющийся материал. Не используйте их вблизи открытого огня.
7. Никогда не раскапывайте реактивы в ртом, избегайте его попадания на кожу, слизистые оболочки и одежду.
8. Избегайте бактериального заражения реактивов, поскольку это может исказить результаты при их использовании.
8. Избегайте распыливания реактивов или образования брызг.
9. Как хромоген раствор ДАБ должен быть применен с осторожностью ввиду его канцерогенности.
10. Неиспользуемые реагенты должны быть утилизированы согласно местным правилам.

6. ПРОЦЕДУРА ОКРАШИВАНИЯ

■ Необходимы реактивы и материалы, не входящие в поставку

- Первичное антитело мыши или кролика
- Ксилол
- 100% этиловый спирт
- 95% этиловый спирт
- Раствор контрастной окраски
- 3% раствор перекиси водорода в абсолютном метаноле (добавить 1 часть средства 30% перекиси водорода к 9 частям абсолютного метанола)

- Фосфатно-солевой буферный раствор (pH 7.6±0.2)

NaCl 7.75 г
K₂HPO₄ 1.50 г
KH₂PO₄ 0.20 г

Дистиллированная вода 1 л

- Отрицательный контрольный реактив
- Покровное стекло
- Световой микроскоп
- Дистиллированная вода
- Влажная камера для инкубации препарата
- Заливочная среда
- Таймер
- Штативы
- Впитывающие салфетки

- Адгезирующий состав для срезов тканей (0.02% полилизин, силан и т.п.)

■ Хромогенный /субстрат реактив -Histofine® Simple Stain AEC, раствор (Без приготовления, одна бутылка) 500 тестов Код: 415 182 F
1 500 тестов Код: 415 184 F/Созданный NICHIREI BIOSCIENCES, одна бутылка, готовый к использованию без приготовления хромоген/субстрат, называемый *ti*-Histofine Simple Stain Substrate Solution (Простой Раствор Красящего Субстрата)

■ Приготовление образца [Срез ткани в парафине] В образцах могут возникнуть повреждение тканей или денатурации антигенов, когда они подвергаются воздействию сильно концентрированных фиксаторов или длительной фиксации плению. Таким образом, чтобы получить оптимальное закрепление, сохранение морфологии ткани и действие антигена, следует использовать образцы ткани, как можно более свежие, размером 1 см x 1 см x 0,5 см. Рекомендуется использовать фиксаторы, указанные далее.

Фиксирующий реактив

Время фиксации

Histofine® является зарегистрированной торговой маркой фирмы NICHIREI BIOSCIENCES.

При регистрации просьба всегда ссылаться на нас.

10% формалин или забуференный формалин 20% формалин 24 -48 часов
12 часов

[Срезы замороженной ткани] Образцы размещены в смеси (напр., смесь ОТС) и мгновенно заморожены в п-гексане, или твердой углекислоте или жидком азоте.

■ Подготовка срезов [Срезы ткани в парафине]

Срезы следует разместить на предметные стекла. Если с ними нужно провести такие действия, как восстановление, восстановление эпитопа под тепловым воздействием, или обработку трипсином, предметное стекло следует покрыть клейким веществом, как например 0,02% полилизин или силан, для каждого среза ткани.

[Срезы замороженной ткани]

Замороженные образцы размещаются на покрытые клейким веществом (например, 0,02% полилизин) предметные стекла и просушиваются на воздухе. Срезы фиксируются в 100% ацетоне в течение 10 минут при комнатной температуре или в 4% р-параформальдегида – фосфатно-солевом буферном растворе в течение 10 минут при 4°C и затем окрашиваются. Оптимальная концентрация и время инкубации первичных антител следует определять путем исследования. В некоторых случаях может потребоваться титр первичных антител, чтобы избежать избыточного окрашивания.

Если срезы содержат мало эндогенной пероксидазы, мало эритроцитов и мало гранулоцитов, гашение эндогенной пероксидазы можно делать.

[Контрольные образцы]

Потребуется позитивный контрольный образец, отрицательный контрольный образец и контрольный образец с реактивом, которые обрабатываются таким же образом, как и неизвестный образец, чтобы проанализировать результаты окрашивания.

■ Депарафинизация и регидратация

1. Обработка ксилолом

(1) Погрузите образцы в ксилол. Через 3 минуты выньте их и стряхните с них избыток ксилола.

(2) Повторите действия п. (1) дважды, используя свежий ксилол.

2. Обработка этиловым спиртом

(1) Погрузите образцы в 100% этиловый спирт. Через 3 минуты выньте их и стряхните с них избыток спирта.

(2) Повторите действия п. (1) дважды, используя свежий 100% этиловый спирт.

(3) Затем обработайте образцы 95% этиловым спиртом так же, как указано в 2-х предыдущих пунктах.

3. Промывка

После того, как образцы будут обработаны 95% спиртом, погрузите образцы в фосфатно-солевой буферный раствор на 5 минут.

■ Рекомендуемая процедура окрашивания

1. Гашение эндогенной пероксидазы

(1) Тщательно вытрите предметные стекла с образцами, чтобы удалить избыток раствора.

(2) Погрузите их в 3% раствор перекиси водорода в абсолютном метаноле на 10-15 минут при комнатной температуре.

(3) Промойте их в свежем фосфатно-солевом буферном растворе 3 раза, по 5 минут каждый раз.

2. Добавление и реакция первичного антитела

(1) Тщательно вытрите предметные стекла с образцами.

(2) Добавьте по 2 капли первичного антитела на образец, положительный контрольный образец, отрицательный контрольный образец так, чтобы полностью покрыть срезы.

(3) На контрольный образец с реактивом добавьте две капли отрицательного контрольного реактива (нормальная сыворотка) вместо первичного антитела.

(4) Выдержите их при комнатной температуре или при 4°C. (Следуйте инструкциям относительно времени выдержки, которые даны на упаковке первичного антитела.)

(5) Промойте их в свежем фосфатно-солевом буферном растворе 3 раза, по 5 минут каждый раз.

3. Добавление и реакция **Histofine® Simple Stain MAX PO** (Универсальный Иммуно-пероксидазный Полимер, Анти-мышинный и анти-кроличий).

(1) Тщательно вытрите предметные стекла с образцами, чтобы удалить избыток раствора.

(2) Добавьте по 2 капли Simple Stain MAX PO (MULTY) на образец так, чтобы полностью покрыть срезы. Выдержите их при комнатной температуре в течение 30 минут.

(3) Промойте их в свежем фосфатно-солевом буферном растворе 3 раза, по 5 минут каждый раз.

4. Добавление и реакция реактива хромогена/субстрата

(1) Тщательно вытрите предметные стекла с образцами, чтобы удалить избыток раствора.

(2) Добавьте по 2 капли реактива хромогена/субстрата на образец так, чтобы полностью покрыть срезы. Выдержите их при комнатной температуре в течение 5-20 минут.

(3) Промойте их в свежем фосфатно-солевом буферном растворе 3 раза, по 5 минут каждый раз.

5. Контрастное окрашивание

(1) Погрузите образцы в окрашивающий раствор для контрастирования

(2) Промойте их водопроводной водой.

6. Заключение гистологических срезов в заливочную среду

В случае если такой средой является субстраты, растворимые в спирте, например, АЕС, срезы ткани размещаются в заливочной среде на водной основе без дальнейшей обработки. Если средой являются нерастворимые в спирте субстраты, например, DAB, срезы размещаются в постоянной заливочной среде после промывки их водой, дегидрируются в последовательной серии погружений в спирт и очищаются ксилолом.

■ Анализ результатов

1. Наблюдение под микроскопом

Образцы исследуются под световым микроскопом до положительной реакции. Необходимо сравнить с тремя типами контрольных срезов для анализа результатов окрашивания.

- Положительный контрольный образец
Образец, содержащий антиген-мишень, который обрабатывается таким же образом, как и неизвестный образец.
- Отрицательный контрольный образец
Образец, не содержащий антиген-мишень, который обрабатывается таким же образом, как и неизвестный образец.
- Контрольный образец с препаратом

Контрольный образец используется и обрабатывается таким же образом, как и исследуемый образец, за исключением того, что отрицательный контрольный реактив используется вместо первичного антитела. Если образец окрашивается, возможно, это происходит вследствие необычной реакции необычных белковых связываний.

7. **ХРАНЕНИЕ** Хранить в темном месте при 2-8°C. Реагент стабилен 18 месяцев с момента производства

Histofine® является зарегистрированной торговой маркой фирмы NICHIREI BIOSCIENCES.

При регистрации просьба всегда ссылаться на нас.

8 ОБЩИЕ ОГРАНИЧЕНИЯ

- 8.1 Дайте реактивам достичь комнатной температуры (15-25°C) перед началом окрашивания.
- 8.2 Минимизируйте денатурацию антигена. Не инкубируйте образец при температуре выше 58°C в процессе обработки.
- 8.3 Не позволяйте ткани высыхать, ни на какой ступени окрашивания.
- 8.4 Оптимальная концентрация и время инкубации первых антител должны быть определены пользователем. В ряде случаев для предотвращения переокрашивания может быть необходимо предварительное разведение первых антител.
- 8.5 Если образцы содержат небольшое количество эндогенной пероксидазы, мало эритроцитов и мало гранулоцитов, этап гашения эндогенной пероксидазы, может быть пропущен.
- 8.6 Окрашивание тканей зависит от обработки образцов перед окрашиванием. Неправильная фиксация, замораживание, оттаивание, промывка, высушивание, нагрев или рассечение могут вызвать появление артефактов или ложноотрицательных результатов.
- 8.7 Результаты не будут оптимальными, если используются старые или незабуференные фиксаторы, или избыточный нагрев при парафиновой проводке или наклеивание срезов на предметные стекла.
- 8.8 Ложноположительные результаты могут появиться вследствие неспецифических связываний белков. Хотя -Histofine® Simple Stain MAX PO (MULTI) и не требует использования отдельных блокирующих реактивов, в некоторых случаях применение блокирующего реактива, содержащего «забивочный» белок, перед инкубацией первичного антитела может быть полезным для уменьшения фонового окрашивания.
- 8.9 Reagent Histofine® Simple Stain MAX PO (MULTI) создан для диагностики *ин vitro*. **Торговые агенты и дистрибьюторы фирмы NICHIREI BIOSCIENCES INC., NICHIREI BIOSCIENCES не несут ответственности за результаты использования Histofine® Simple Stain MAX PO (MULTI), если при его применении прямо или косвенно нарушаются местные регулирующие правила или патенты. Ни производитель NICHIREI BIOSCIENCES, ни его торговые агенты не может нести ответственность за любые нарушения патентных прав, которые могут возникнуть в результате неправильного использования продукта.**

9. УСТРАНЕНИЕ НЕПОЛАДОК

Проблема	Возможная причина	Способы устранения
○ Нет окрашивания, или слабый результат окрашивания на положительном контрольном образце и исследуемом образце	1. Высыхание образца во время окрашивания перед добавлением реактива.	1. Не допускайте пересыхания образцов ткани.
	2. Не подходит заливающий агент или парафин не полностью удален из срезов	2. Выберите подходящий заливающий агент или тщательно удалите парафин со срезов ткани - Замените ксилол или этиловый спирт.
	3. В буферном растворе присутствуют следы азида натрия, которые инактивируют пероксидазу, что препятствует окрашиванию.	3. - Используйте буферный раствор, не содержащий азида натрия. - Замените буферный раствор.
	4. Неправильная инкубация фермента и антитела.	4. Замените старый реактив хромоген/субстрат. - Тщательно удаляйте излишки раствора на каждой стадии процесса - Обеспечьте достаточное время для реакции с антителом. Особенно это касается первичного антитела, время инкубация которого должно соответствовать указаниям в инструкции.
○ Исследуемый образец не окрашивается, хотя положительный контрольный образец окрашивается.	1. Антиген денатурирован или скрыт во время фиксации или проводки	1. - Некоторые антигены чувствительны к фиксации или парафиновой проводке. Используйте менее активные фиксаторы и уменьшите время фиксации. - Чтобы обнаружился антиген, некоторым тканям требуется предварительная обработка, например, восстановление антигена, при нагреве или обработка трипсином.
	2. Антиген разложился путем аутолиза	2. - По возможности используйте образцы тканей, полученные при биопсии или хирургическим путем

Histofine® является зарегистрированной торговой маркой фирмы NICHIREI BIOSCIENCES.
 При регистрации просьба всегда ссылаться на нас.

Производитель товара: NICHIREI BIOSCIENCES INC. 6-19-20, Tsukiji, Chuo-ku, Tokyo, 104-8402, JAPAN
Phone: 81-3-3248-2207 Facsimile: 81-3-3248-2243 Импортёр: ООО "Микротесты б.м.в." (495) 969-98-26, info@microtesty.ru

		3.	В срезах присутствует меньше антигена.	3.	- Продлите время инкубации.
○	На всех препаратах интенсивно окрашивается фон.	1.	Эндогенная ферментативная активность не полностью блокирована.	1.	- Проверьте, правильно ли проведена процедура инкубации с эндогенной пероксидазой.
		2.	Обнаружились неспецифические комплексы	2.	- Перед добавлением пероксидазного антигена обработайте срезы нормальной сывороткой крови.
		3.	Аутолиз привел к избыточности антигенов, изолированных в гистологических растворах.	3.	- По возможности, достаньте образцы ткани.
		4.	Недостаточно удален парафин.	4.	Смените ксилол или этиловый спирт в таких случаях.
		5.	Антитело недостаточно смыто.	5.	Обеспечьте достаточную промывку после первого антитела.
		6.	Высокая температура помещения усиливает ферментные реакции.	6.	Поддерживайте в помещении температуру от 15 до 25°C. Сократите время реакции.
		7.	Пересыхание образцов ткани во время окрашивания после добавления реактива.	7.	- Не допускайте пересыхания образцов ткани.
○	Во время реакции срезы ткани отделяются от предметных стекол.	1.	Некоторые антигены требуют нагрева при проведении процедуры восстановления антигена или продления времени реакции с первичным антителом, что может привести к отделению образцов.	1.	- Размещайте срезы ткани на предметных стеклах, покрытых клеящим веществом, например, 0,02% полилизином или силаном.

REF Catalog/Code Number	 Temperature Limitations	IVD In Vitro Diagnostic Medical Device
 Manufacturer	LOT Batch Code	 Contains Sufficient for <N> Tests
 Use By	 Consult Instructions for Use	EC REP Authorized Representative in the European Community
 CE-mark, code of the notified body	 For IVD Performance Evaluation only	SAMPLE Sample

Производитель NICHIREI BIOSCIENCES INC., Ничирей Биосайнсиз Инк., 6-19-20, Тсукидзи Чуо-Ку Токио, 104-8402, Япония, тел: 81-3-3248-2207 Факс: 81-3-3248-224	Представитель производителя в Европе: СРО ЭКСБИО Оломоуц Овесна 14, 779 00 ОЛОМОУЦ Чешская Республика
--	--

Histofine® является зарегистрированной торговой маркой фирмы NICHIREI BIOSCIENCES.
При регистрации просьба всегда ссылаться на нас.



January, 2008

INSTRUCTIONS

N-Histofine® Simple Stain MAX PO (MULTI)

Universal Immuno-peroxidase Polymer, Anti-Mouse and -Rabbit
N-Histofine® Immunohistochemical staining reagent

Store at 2-8°C

Reagents supplied 17mL x 1 bottle (170 tests) Code : 414151F
 17mL x 3 bottles (500 tests) Code : 414152F
 17mL x 9 bottles (1500 tests) Code : 414154F

1. INTRODUCTION

NICHIREI BIOSCIENCES developed a unique immunohistochemical staining system called **Universal Immuno-enzyme Polymer (UIP)** method (US Patent No.6,252,053). This is NICHIREI BIOSCIENCES's original technique. **N-Histofine® Simple Stain MAX PO (MULTI)**, this provides both high sensitivity and time saving in immunohistochemical applications.

2. DESCRIPTION

Liquid. Ready to use.

N-Histofine® Simple Stain MAX PO (MULTI) (Universal Immuno-peroxidase Polymer, Anti-Mouse and -Rabbit) is the labeled polymer prepared by combining amino acid polymers with peroxidase and goat anti-mouse Ig and goat anti-rabbit Ig which are reduced to Fab. It is stored in MOPS (3-Morpholinopropanesulfonic acid) buffer (pH 6.5) containing stabilizer and antibacterial agent.

The IgG fraction purified from immunized goat serum is digested to prepare F(ab)₂ Antigen-specific F(ab)₂ is affinity-purified with the antigen. Solid-phase absorption is carried out with human serum protein. Peroxidase-labeled amino acid polymer is conjugated to Fab obtained by reducing F(ab)₂.

The system does not contain biotin nor streptavidin, so the background found with traditional biotin based detection system is completely avoided.

3. INTENDED USE

For In-vitro Diagnostic Use.

Interpretation must be made within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a qualified pathologist.

N-Histofine® Simple Stain MAX PO (MULTI) is designed to allow immunohistochemical tests, to reveal antigens that reacts with a user-supplied mouse primary antibody or rabbit primary antibody on human tissues and cells.

4. PRINCIPLE

The antigen / antibody / Universal Immuno-peroxidase Polymer complex can be prepared by allowing the reagent to react with a mouse or rabbit primary antibody bound to the antigen on tissue section. The enzymatic activity of this complex results in a colored deposit, thus staining the antigen site.

5. PRECAUTIONS

1. Before using this reagent, read these instructions.
2. Do not use reagents after the expiration date.
3. For professional users.
4. Specimens, before and after fixation, and all other materials exposed to them, should be handled like biohazardous materials with proper precautions.
5. Inhalation or ingestion of the highly allergic fixative formaldehyde is harmful. Wear protective mask. If swallowed, induce vomiting. If skin or eye contact occurs, wash thoroughly with water.
6. Organic reagents are flammable. Do not use near open flame.
7. Never pipette reagents by mouth and avoid their contact with skin, mucous membranes and clothes.

N-Histofine® is NICHIREI BIOSCIENCES's registered trademark. The registration countries would be referred to us.

8. Avoid microbial contamination of reagents as incorrect result may occur.
9. Avoid splashing of reagents or generation of aerosols.
10. As a chromogen, DAB solution should be handled with care for it contains carcinogen.
11. Unused solution should be disposed of according to local, State and Federal regulations.

6. STAINING PROCEDURES

□ Reagents and Materials required but not provided

- Xylene
- 95% ethanol
- 100% ethanol
- Phosphate buffered saline (PBS) (pH 7.6±0.2)
NaCl 7.75 g
K₂HPO₄ 1.50 g
KH₂PO₄ 0.20 g
distilled water 1L
- 3% solution of hydrogen peroxide in absolute methanol (Add 1 part of 30% hydrogen peroxide to 9 parts of absolute methanol)
- Mouse or rabbit primary antibody
- Negative control reagent
- Chromogen/substrate reagent
- Counter staining solution
- Distilled water
- Humidified chamber for slide incubation
- Light microscope
- Cover slips
- Mounting media
- Timer
- Staining racks or Coplin jars
- Absorbent wipes
- Adhesive for tissue section (0.02% poly-L-lysine, silane or the like)

□ Specimen preparation

[Paraffin-embedded tissue sections]

Specimens may undergo histological disintegration or antigenic denaturation when subjected to highly concentrated fixative or prolonged fixing. Thus, in order to obtain an optimal fixing, maintaining tissue morphology and antigen activity, tissues which are as fresh as possible and small in size (about 1cm x 1cm x 0.5cm) should be used. The fixatives as shown below are recommended.

Fixing reagent	Fixing time
10% formalin or buffered formalin	24-48 hours
20% formalin	12-24 hours

[Frozen tissue sections]

Specimens are embedded in compounds (like OTC compound) and snap-frozen in n-hexsan cooled in dry ice-acetone or liquid nitrogen.

□ Section preparation

[Paraffin embedded tissue sections]

The cut sections should be 3-6 μm and placed on slides. When further treatments are to be done such as Antigen Recovery, Heat-Induced Epitope Retrieval (HIER) or trypsin treatment, the glass slides should be coated with an adhesive like 0.02% poly-L-lysine or silane for tissue sections.

[Frozen tissue sections]

The cryostat sections are mounted on an adhesive (like 0.02% poly-L-lysine) - coated slides and air-dried well. The sections are fixed in 100% acetone for 10 minutes at room temperature or 4% paraformaldehyde-PBS solution for 10 minutes at 4°C and then stained.

[Control slides]

A positive control slide, negative control slide and reagent control slide are needed and processed in the same way as the unknown specimen slide to interpret staining results.

• Positive control slide

A specimen containing the target antigen which is processed in the same way as the unknown specimen.

• Negative control slide

A specimen not containing the target antigen which is processed in the same way as the unknown specimen.

• Reagent control slide

The control specimen is used and processed in the same way as the test specimen except that negative control reagent is used instead of primary antibody.

□ Deparaffinization and Rehydration

1. Treatment with xylene

(1) Immerse the slides in xylene. After 3 minutes, take out and shake off the excessive xylene in the slides.

(2) Repeat 1.(1) twice using fresh xylene.

2. Treatment with ethanol

(1) Immerse slides in 100% ethanol. After 3 minutes, take out and shake off the excessive 100% ethanol in the slides.

(2) Repeat 2.(1) once with fresh 100% ethanol.

(3) Then, treat them twice with 95% ethanol in the same way as described above.

3. Washing

After excessive ethanol is shaken off, immerse slides in PBS for 5 minutes.

□ Staining Procedures

1. Quenching of endogenous peroxidase

(1) Wipe areas around the sections on the slides carefully to remove excess solution.

(2) Immerse them in 3% solution of hydrogen peroxide in absolute methanol for 10-15 minutes at room temperature (15 - 25°C).

(3) Rinse them in fresh PBS for 3 times, each of 5 minutes duration.

2. Addition and reaction of the primary antibody

(1) Wipe areas around the sections on the slides carefully.

(2) Apply 2 drops (100µl) of primary antibody to specimen slide, positive control slide and negative control slide respectively so as to provide a complete cover of the sections.

(3) To the reagent control slide, apply two drops of negative control reagent (normal serum) in place of primary antibody.

(4) Incubate them at room temperature or 4°C. (Follow the instructions for incubation time data designated in the package insert of primary antibody)

(5) Rinse them in fresh PBS for 3 times, each of 5 minutes duration.

3. Addition and reaction of **N-Histofine**® Simple Stain MAX PO (MULTI) (Universal Immuno-peroxidase Polymer, Anti-Mouse and -Rabbit).

(1) Wipe areas around the sections on the slides carefully.

(2) Apply 2 drops (100µl) of Simple Stain MAX PO (MULTI) to each slide so as to provide a complete cover of the sections. Incubate at room temperature (15 - 25°C) for 30 minutes.

(3) Rinse them in fresh PBS for 3 times, each of 5 minutes duration.

4. Addition and reaction of chromogen/substrate reagent

(1) Wipe areas around the sections on the slides carefully.

(2) Apply 2 drops (100µl) of the chromogen/substrate reagent to each slide so as to provide a complete cover of the sections. Incubate at room temperature (15 - 25°C) for 5-20 minutes.

(3) Rinse them in distilled water for 3 times, each of 5 minutes duration.

5. Counter-staining

(1) Immerse them in the counterstain solution.

(2) Wash them well with tap water.

6. Mounting

In case of alcohol soluble substrates like AEC, the tissue sections are mounted with water-based mounting media without further treatment. In case of alcohol insoluble substrates like DAB, they are mounted with permanent mounting media after washing with water, dehydrated in graded series of alcohol and cleared in xylene.

□ Interpretation of results

Microscopic observation

The slides are examined under a light microscope for reaction. It is necessary to make comparison with three types of control slides for interpreting staining results.

• Positive control slide

Positive staining is observed.

• Negative control slide

Positive staining isn't observed.

• Reagent control slide

If the slide is stained, it is probably due to non-specific reaction or non-specific protein binding.

The specificity and sensitivity of antigen detection is dependent on specific primary antibody used.

7. STORAGE & SHELF LIFE

Store at 2-8°C. The reagent is stable 18 months after manufacturing.

8. GENERAL LIMITATION

(1) Allow this reagents to come to room temperature (15 - 25°C) before staining.

(2) To minimize denaturing of antigens, do not expose tissues to temperature in excess of 58°C during processing.

(3) Don't make tissues dry in each staining step.

(4) The optimal concentration and incubation time of primary antibodies should be determined by the investigation. In some cases, further dilution of primary antibodies may be required to prevent over staining.

(5) If the sections contain few endogenous peroxidase, few erythrocytes and few granulocytes, quenching of endogenous peroxidase may be omitted.

(6) Tissue staining is dependent on the handling and processing of the tissue prior to staining. Improper fixation, freezing, thawing, washing, drying, heating, or sectioning may produce artifacts or false-negative results.

(7) Results will not be optimal if old or unbuffered fixatives are used, or excessively heated during embedding or during attachment of sections to slides.

(8) False-positive results may be seen due to nonspecific binding of proteins. Although **N-Histofine**® Simple Stain MAX PO (MULTI) does not require the use of blocking reagent separately, in some cases the application of blocking reagent containing an irrelevant protein, prior to incubation with the primary antibody, may be useful for reducing the background.

(9) **N-Histofine**® Simple Stain MAX PO (MULTI) is designed for in-vitro diagnostic use. NICHIREI BIOSCIENCES INC., NICHIREI BIOSCIENCES sales agents and distributors will take no responsibility for **N-Histofine**® Simple Stain MAX PO (MULTI) when used in a way which directly or indirectly violates local regulations or patents. Neither NICHIREI BIOSCIENCES nor its sales agents can be held responsible for any patent infringement which may occur as a result of improper use of the product.

BLE SHOOTING

Problem	Possible cause	Solution
staining or ly weak staining results on the positive control slide and the unknown specimen slide	1. Drying-out of specimens during staining prior to addition of the reagents.. 2. The embedding agent is not suitable, or paraffin is not thoroughly removed from paraffin-embedded sections. 3. Any trace amount of sodium azide present in the buffer inactivates the peroxidase, making the staining impossible. 4. Inadequate incubation of the enzyme and antibody.	1. Use the Humidified chamber not to allow the tissue to dry out. 2. Select a suitable embedding agent or remove paraffin thoroughly from sections embedded. 2. Change xylene or ethanol as the case may be. 3. Use sodium azide free buffer solution. 3. Change buffer solution. 4. Change stale chromogen/substrate reagent. 4. Blot off excess solution thoroughly at each stage. 4. Provide sufficient time for reaction with antibody. In particular, primary antibody should be incubated for the time period specified in the insert.
○ The unknown specimen slide is not stained while the positive control slide is stained.	1. Antigen is denatured or masked during fixing or embedding process. 2. Antigen is decomposed by autolysis. 3. Less antigen is present in the sections.	1. Some antigens are sensitive to fixation or embedding. So use less potent fixative and decrease the fixing time. 1. The pretreatment is required for some tissues, in order to reveal the antigen, such as Antigen Recovery, Heat-Induced Epitope Retrieval (HIER) or trypsin treatment. 2. Use tissues obtained by biopsy or surgery, whenever possible. 3. Prolong the incubation time.
○ The backgrounds are intensively stained in all the slides.	1. Endogenous enzyme activity was not completely blocked. 2. Non-specific binding compositions are found. 3. Autolysis results in excessive antigens isolated in histological solutions. 4. Insufficient removal of paraffin. 5. Insufficient washing of antibody. 6. A high room temperature accelerates enzyme reactions. 7. Drying-out of specimens during staining after of the reagents.	1. Ensure that the procedure for quenching of endogenous peroxidase is right. 2. Before adding primary antibody, treat with 10% normal goat serum. 3. Obtain fresh tissues whenever available. 4. Change xylene or ethanol as the case may be. 5. Ensure thorough washing of antibody. 6. Keep room temperature at 15 to 25°C 6. Shorten reaction time. 7. Never allow the tissue to dry out.
○ During the reaction, tissue sections come off from the slides.	1. Some antigens require heat induced antigen retrieval procedure or prolonged reaction time with primary antibody, which may render the sections easily come off.	1. Mount tissue sections on slides coated with an adhesive such as 0.02% poly-L-lysine or silane.

10. REFERENCE

- (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) Sawada, H., *et al*: Case report: Altered decorin expression of systemic sclerosis by UVA1 (340-400 nm) 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-X^L. *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 rat 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 Protein Kinase C-beta Activation is Required for Oxidative Stress in Diabetic Nephropathy. *Diabetes.* 52: 2603-2614, 2003.

REF Catalog/Code Number	 Temperature Limitations	IVD In Vitro Diagnostic Medical Device
 Manufacturer	LOT Batch Code	 Contains Sufficient for (N) Tests
 Use By	 Consult Instructions for Use	EC REP Authorized Representative in the European Community
 CE-mark, code of the notified body	 For IVD Performance Evaluation only	SAMPLE Sample



NICHIREI BIOSCIENCES INC.
6-19-20, Tsukiji, Chuo-ku, Tokyo, 104-8402, JAPAN
Phone: 81-3-3248-2207, Facsimile: 81-3-3248-2243



EXBIO Olomouc s.r.o.
Ovesna 14, 779 00 OLOMOUC
CZECH REPUBLIC

Система детекции Histofine® Simple Stain MAX PO (M)

универсальный полимерный поливалентный окрашивающий реактив. Хранить при 2-8 °С. Сделано в Японии.
Поставка реактива: 17 мл x 1 бутылка (170 тестов) Код: 414131F
17 мл x 3 бутылки (500 тестов) Код: 414132F
17 мл x 9 бутылок (1 500 тестов) Код: 414134F

1. ВВЕДЕНИЕ

Фирма NICHIREI BIOSCIENCES INC. разработала уникальную иммуно-гистохимическую красящую систему под названием Универсальный Иммуно-энзимный Полимер (UIP), метод, запатентованный в США, № патента 6,252,053. Он является оригинальной технологией фирмы. -Histofine® Simple Stain MAX PO (M) обеспечивает быстрое действие, и экономию времени при иммуно-гистохимическом применении.

2. ОПИСАНИЕ ПРЕПАРАТА

Жидкость, готовая к использованию. Меченый полимер - Histofine® Simple Stain MAX PO (M) (Универсальный Иммуно-пероксидазный Полимер, антимышинный) изготовлен путем соединения аминокислотных полимеров с пероксидазой и антимышинным иммуноглобулином козы, которые редуцируются до Fab антигел. Он содержится в буфере MOPS (3-морфолинпропансульфоновой кислоты) (pH 6.5), со стабилизатором и бактерицидным средством.

Описание Histofine® Simple Stain MAX PO (M) (Универсальный Иммуно-пероксидазный Полимер, Анти-мышинный). Иммуноглобулиновая фракция выделена из иммунизированной козьей сыворотки путем переваривания, чтобы приготовить F(ab)₂ фрагмент.

Антиген специфичный F(ab)₂ аффинно очищен с антигеном. Твердофазная абсорбция была выполнена с человеческим сывороточным протеином. Полимер из аминокислот, меченый пероксидазой, был конъюгирован с Fab фрагментом, полученным редукцией F(ab)₂.

3. ПРЕДПОЛАГАЕМОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ IN VITRO

Реактив Histofine® Simple Stain MAX PO (M) предназначен для иммуногистохимических исследований фиксированных в формалине в формалине. О применении для окрашивания замороженных срезов тканей читайте в п. 6. ПРОЦЕДУРА ОКРАШИВАНИЯ. Относительно этого реактива для других образцов можно узнать, обратившись в техническую службу фирмы NICHIREI BIOSCIENCES.

4. ПРИНЦИП

Антиген/антитело/Универсальный Иммуно-пероксидазный Полимерный комплекс может быть приготовлен путем реакции реактива с первичным мышинным антителом, соединенным с антигеном на срезе ткани. Ферментативное действие этого комплекса приводит к появлению окрашенного осадка, таким образом, окрашивая местоположение антигена.

5. ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ РЕАКТИВА ИЛИ ОБРАЩЕНИИ С НИМ

1. Прежде чем использовать реактив, внимательно прочитайте эту инструкцию.
2. Не используйте реактивы после истечения срока их годности.
3. Для профессионального использования.
4. С образцами, до и после фиксации, а также с другими материалами, используемыми вместе с ними, следует обращаться, как с биологически опасными материалами, соблюдая соответствующие правила предосторожности.
5. Вдыхание или проглатывание высоко аллергенного фиксирующего формальдегида - опасно. Надевайте защитную маску. При случайном проглатывании примите рвотное средство. При контакте с кожей или попадании в глаза, тщательно промойте их водой.
6. Органические реактивы - легко воспламеняющийся материал. Не используйте их вблизи открытого огня.
7. Никогда не распыляйте реактивы в рот, избегайте его попадания на кожу, слизистые оболочки и одежду.
8. Избегайте бактериального заражения реактивов, поскольку это может исказить результаты при их использовании.
9. Избегайте распыливания реактивов или образования брызг.
9. Как хромоген раствор ДАБ должен быть применен с осторожностью ввиду его канцерогенности.
10. Неиспользуемые реагенты должны быть утилизированы согласно местным правилам.

6. ПРОЦЕДУРА ОКРАШИВАНИЯ

■ Необходимы реактивы и материалы, не входящие в поставку

- Первичное антитело мыши или кролика
- Ксилол
- 100% этиловый спирт
- 95% этиловый спирт
- Раствор контрастной окраски
- 3% раствор перекиси водорода в абсолютном метаноле (добавить 1 часть средства 30% перекиси водорода к 9 частям абсолютного метанола)
- Фосфатно-солевой буферный раствор (pH 7.6±0.2)
NaCl 7.75 г
K₂HPO₄ 1.50 г
KH₂PO₄ 0.20 г
Дистиллированная вода 1 л

- Отрицательный контрольный реактив
- Покровное стекло
- Световой микроскоп
- Дистиллированная вода
- Влажная камера для инкубации препарата
- Заливочная среда
- Таймер
- Штативы
- Впитывающие салфетки

- Адгезирующий состав для срезов тканей (0,02% полилизин, силан и т.п.)

- Хромогенный /субстрат реактив -Histofine® Simple Stain AEC, раствор (Без приготовления, одна бутылка) 500 тестов Код: 415.182 F 1 500 тестов Код: 415.184 F // Созданный NICHIREI BIOSCIENCES, одна бутылка, готовый к использованию без приготовления хромоген/субстрат, называемый *i/i*- Histofine Simple Stain Substrate Solution (Простой Раствор Красящего Субстрата)

■ Приготовление образца [Срез ткани в парафине] В образцах могут возникнуть повреждение тканей или денатурации антигенов, когда они подвергаются воздействию сильно концентрированных фиксаторов или длительной фиксации плению. Таким образом, чтобы получить оптимальное закрепление, сохранение морфологии ткани и действие антигена, следует использовать образцы ткани, как можно более свежие, размером 1 см x 1 см x 0,5 см. Рекомендуется использовать фиксаторы, указанные далее.

Фиксирующий реактив

10% формалин или забуференный формалин 20% формалин

Время фиксации

24 -48 часов
12 часов

Histofine® является зарегистрированной торговой маркой фирмы NICHIREI BIOSCIENCES.

При регистрации просьба всегда ссылаться на нас.

[Срезы замороженной ткани] Образцы размещены в смеси (напр., смесь ОТС) и мгновенно заморожены в п-гексане, твердой углекислоте или жидком азоте.

■ Подготовка срезов [Срезы ткани в парафине]

Срезы следует разместить на предметные стекла. Если с ними нужно провести такие действия, как восстановление эпителия под тепловым воздействием, или обработку трипсином, предметное стекло следует покрыть клеем, как например 0,02% полилизин или силан, для каждого среза ткани.

[Срезы замороженной ткани]

Замороженные образцы размещаются на покрытые клеем веществом (например, 0,02% полилизин) предметные стекла, просушиваются на воздухе. Срезы фиксируются в 100% ацетоне в течение 10 минут при комнатной температуре или в 4% параформальдегида – фосфатно-солевом буферном растворе в течение 10 минут при 4°C и затем окрашиваются. Оптимизируйте концентрацию и время инкубации первичных антител следует определять путем исследования. В некоторых случаях может потребоваться титр первичных антител, чтобы избежать избыточного окрашивания.

Если срезы содержат мало эндогенной пероксидазы, мало эритроцитов и мало гранулоцитов, гашение эндогенной пероксидазы можно не делать.

[Контрольные образцы]

Потребуется позитивный контрольный образец, отрицательный контрольный образец и контрольный образец с реактивом, которые обрабатываются таким же образом, как и неизвестный образец, чтобы проанализировать результаты окрашивания.

■ Депарафинизация и регидратация

1. Обработка ксилолом

(1) Погрузите образцы в ксилол. Через 3 минуты выньте их и стряхните с них избыток ксилола.

(2) Повторите действия п. (1) дважды, используя свежий ксилол.

2. Обработка этиловым спиртом

(1) Погрузите образцы в 100% этиловый спирт. Через 3 минуты выньте их и стряхните с них избыток спирта.

(2) Повторите действия п. (1) дважды, используя свежий 100% этиловый спирт.

(3) Затем обработайте образцы 95% этиловым спиртом так же, как указано в 2-х предыдущих пунктах.

3. Промывка

После того, как образцы будут обработаны 95% спиртом, погрузите образцы в фосфатно-солевой буферный раствор на 5 минут.

■ Рекомендуемая процедура окрашивания

1. Гашение эндогенной пероксидазы

(1) Тщательно вытрите предметные стекла с образцами, чтобы удалить избыток раствора.

(2) Погрузите их в 3% раствор перекиси водорода в абсолютном метаноле на 10-15 минут при комнатной температуре.

(3) Промойте их в свежем фосфатно-солевом буферном растворе 3 раза, по 5 минут каждый раз.

2. Добавление и реакция первичного антитела

(1) Тщательно вытрите предметные стекла с образцами.

(2) Добавьте по 2 капли первичного антитела на образец, положительный контрольный образец, отрицательный контрольный образец так, чтобы полностью покрыть срезы.

(3) На контрольный образец с реактивом добавьте две капли отрицательного контрольного реактива (нормальная сыворотка) вместо первичного антитела.

(4) Выдержите их при комнатной температуре или при 4°C. (Следуйте инструкциям относительно времени выдержки, которые даны на упаковке первичного антитела.)

(5) Промойте их в свежем фосфатно-солевом буферном растворе 3 раза, по 5 минут каждый раз.

3. Добавление и реакция **-Histofine® Simple Stain MAX PO (M)** (Универсальный Иммуно-пероксидазный Полимер, Анти-мышинный) (1)

Тщательно вытрите предметные стекла с образцами, чтобы удалить избыток раствора.

(2) Добавьте по 2 капли Simple Stain MAX PO (M) на образец так, чтобы полностью покрыть срезы. Выдержите их при комнатной температуре в течение 30 минут.

(3) Промойте их в свежем фосфатно-солевом буферном растворе 3 раза, по 5 минут каждый раз.

4. Добавление и реакция реактива хромогена/субстрата

(1) Тщательно вытрите предметные стекла с образцами, чтобы удалить избыток раствора.

(2) Добавьте по 2 капли реактива хромогена/субстрата на образец так, чтобы полностью покрыть срезы. Выдержите их при комнатной температуре в течение 5-20 минут.

(3) Промойте их в свежем фосфатно-солевом буферном растворе 3 раза, по 5 минут каждый раз.

5. Контрастное окрашивание

(1) Погрузите образцы в окрашивающий раствор для контрастирования

(2) Промойте их водопроводной водой.

6. Заключение гистологических срезов в заливочную среду

В случае если такой средой является субстраты, растворимые в спирте, например, AEC, срезы ткани размещаются в заливочной среде на водной основе без дальнейшей обработки. Если средой являются нерастворимые в спирте субстраты, например, DAB, срезы размещаются в постоянной заливочной среде после промывки их водой, дегидрируются в последовательной серии погружений в спирт и очищаются ксилолом.

■ Анализ результатов

1. Наблюдение под микроскопом

Образцы исследуются под световым микроскопом до положительной реакции. Необходимо сравнить с тремя типами контрольных срезов для анализа результатов окрашивания.

• Положительный контрольный образец

Образец, содержащий антиген-мишень, который обрабатывается таким же образом, как и неизвестный образец.

• Отрицательный контрольный образец

Образец, не содержащий антиген-мишень, который обрабатывается таким же образом, как и неизвестный образец.

• Контрольный образец с препаратом

Контрольный образец используется и обрабатывается таким же образом, как и исследуемый образец, за исключением того, что отрицательный контрольный реактив используется вместо первичного антитела. Если образец окрашивается, возможно, это происходит вследствие необычной реакции необычных белковых связываний.

7. ХРАНЕНИЕ Хранить в темном месте при 2-8°C. Реагент стабилен 18 месяцев с момента производства

Histofine® является зарегистрированной торговой маркой фирмы NICHIREI BIOSCIENCES.

При регистрации просьба всегда ссылаться на нас.

8. ОБЩИЕ ОГРАНИЧЕНИЯ

- 8.1 Дайте реактивам достичь комнатной температуры (15-25°C) перед началом окрашивания.
- 8.2 Минимизируйте денатурацию антигена. Не инкубируйте образец при температуре выше 58°C в процессе обработки.
- 8.3 Не позволяйте ткани высыхать, ни на какой ступени окрашивания.
- 8.4 Оптимальная концентрация и время инкубации первых антител должны быть определены пользователем. В ряде случаев для предотвращения переокрашивания может быть необходимо предварительное разведение первых антител.
- 8.5 Если образцы содержат небольшое количество эндогенной пероксидазы, мало эритроцитов и мало гранулоцитов, этап гашения эндогенной пероксидазы, может быть пропущен.
- 8.6 Окрашивание тканей зависит от обработки образцов перед окрашиванием. Неправильная фиксация, замораживание, оттаивание, промывка, высушивание, нагрев или рассечение могут вызвать появление артефактов или ложноотрицательных результатов.
- 8.7 Результаты не будут оптимальными, если используются старые или незабуференные фиксаторы, или избыточный нагрев при парафиновой проводке или наклеивание срезов на предметные стекла.
- 8.8 Ложноположительные результаты могут появиться вследствие неспецифических связываний белков. Хотя Histofine® Simple Stain MAX PO (M) и не требует использования отдельных блокирующих реактивов, в некоторых случаях применение блокирующего реактива, содержащего «забивочный» белок, перед инкубацией первичного антитела может быть полезным для уменьшения фонового окрашивания.
- 8.9 Реагент Histofine® Simple Stain MAX PO (M) создан для диагностики ин витро. **Торговые агенты и дистрибьюторы фирмы NICHIREI BIOSCIENCES INC., NICHIREI BIOSCIENCES не несут ответственности за результаты использования Histofine® Simple Stain MAX PO (M), если при его применении прямо или косвенно нарушаются местные регулирующие правила или патенты. Ни производитель NICHIREI BIOSCIENCES, ни его торговые агенты не может нести ответственность за любые нарушения патентных прав, которые могут возникнуть в результате неправильного использования продукта.**

9. УСТРАНЕНИЕ НЕПОЛАДОК

Проблема	Возможная причина	Способы устранения
○ Нет окрашивания, или слабый результат окрашивания на положительном контрольном образце и исследуемом образце	1. Высыхание образца во время окрашивания перед добавлением реактива.	1. Не допускайте пересыхания образцов ткани.
	2. Не подходит заливающий агент или парафин не полностью удален из срезов	2. Выберите подходящий заливающий агент или тщательно удалите парафин со срезов ткани - Замените ксилол или этиловый спирт.
	3. В буферном растворе присутствуют следы азиды натрия, которые инактивируют пероксидазу, что препятствует окрашиванию.	3. - Используйте буферный раствор, не содержащий азиды натрия. - Замените буферный раствор.
	4. Неправильная инкубация фермента и антитела.	4. Замените старый реактив хромоген/субстрат. - Тщательно удаляйте излишки раствора на каждой стадии процесса. - Обеспечьте достаточное время для реакции с антителом. Особенно это касается первичного антитела, время инкубация которого должно соответствовать указаниям в инструкции.
○ Исследуемый образец не окрашивается, хотя положительный контрольный образец окрашивается.	1. Антиген денатурирован или скрыт во время фиксации или проводки	1. - Некоторые антигены чувствительны к фиксации или парафиновой проводке. Используйте менее активные фиксаторы и уменьшите время фиксации. - Чтобы обнаружился антиген, некоторым тканям требуется предварительная обработка, например, восстановление антигена, при нагреве или обработка трипсином.
	2. Антиген разложился путем аутолиза	2. - По возможности используйте образцы ткани, полученные при биопсии или хирургическим путем

Histofine® является зарегистрированной торговой маркой фирмы NICHIREI BIOSCIENCES.
 При регистрации просьба всегда ссылаться на нас.

Производитель товара :NICHIREI BIOSCIENCES INC. 6-19-20, Tsukiji, Chuo-ku, Tokyo, 104-8402, JAPAN
Phone:81-3-3248-2207 Facsimile:81-3-3248-2243 Импортёр: ООО "Микротесты б.м.в." (495) 969-98-26, info@microtest.ru

		3.	В срезах присутствует меньше антигена.	3.	- Продлите время инкубации.
○	На всех препаратах интенсивно окрашивается фон.	1.	Эндогенная ферментативная активность не полностью блокирована.	1.	- Проверьте, правильно ли проведена процедура блокировки эндогенной пероксидазы.
		2.	Обнаружились неспецифические комплексы	2.	- Перед добавлением антитела обработайте нормальной сывороткой крови.
		3.	Аутолиз привел к избыточности антигенов, изолированных в гистологических растворах.	3.	- По возможности, доставляйте образцы ткани.
		4.	Недостаточно удален парафин.	4.	Смените ксилол или этиловый спирт в таком случае.
		5.	Антитело недостаточно смыто.	5.	Обеспечьте достаточную промывку после первого антитела.
		6.	Высокая температура помещения усиливает ферментные реакции.	6.	Поддерживайте в помещении температуру от 15 до 20°C. Сократите время реакции.
		7.	Пересыхание образцов ткани во время окрашивания после добавления реактива.	7.	- Не допускайте пересыхания образцов ткани.
○	Во время реакции срезы ткани отделяются от предметных стекол.	1.	Некоторые антигены требуют нагрева при проведении процедуры восстановления антигена или продления времени реакции с первичным антителом, что может привести к отделению образцов.	1.	- Размещайте срезы ткани на предметных стеклах, покрытых клеящим веществом, например, 0,02% полилизином или силаном.

REF Catalog/Code Number	 Temperature Limitations	IVD In Vitro Diagnostic Medical Device
 Manufacturer	LOT Batch Code	 Contains Sufficient for (N) Tests
 Use By	 Consult Instructions for Use	EC REP Authorized Representative in the European Community
CE CE-mark, code of the notified body	 For IVD Performance Evaluation only	SAMPLE Sample

Производитель NICHIREI BIOSCIENCES INC., Ничирей Биосайнз Инк., 6-19-20, Тсукидзи Чоу-Ку Токио, 104-8402, Япония, тел: 81-3-3248-2207 Факс: 81-3-3248-224	Представитель производителя в Европе: СРО ЭКСБИО Оломоуц Овесна 14, 779 00 ОЛОМОУЦ Чешская Республика
--	--

Histofine® является зарегистрированной торговой маркой фирмы NICHIREI BIOSCIENCES.
При регистрации просьба всегда ссылаться на нас.



January, 2008

INSTRUCTIONS

N-Histofine® Simple Stain MAX PO (M)

Universal Immuno-peroxidase Polymer, Anti-Mouse
N-Histofine® Immunohistochemical staining reagent

Store at 2-8°C

Reagents supplied 17mL x 1 bottle (170 tests) Code : 414131F
17mL x 3 bottles (500 tests) Code : 414132F
17mL x 9 bottles (1500 tests) Code : 414134F

1. INTRODUCTION

NICHIREI BIOSCIENCES developed a unique immunohistochemical staining system called **Universal Immuno-enzyme Polymer (UIP)** method (US Patent No.6,252,053). This is NICHIREI BIOSCIENCES's original technique. **N**-Histofine® Simple Stain MAX PO (M), this provides both high sensitivity and time saving in immunohistochemical applications.

2. DESCRIPTION

Liquid. Ready to use.

N-Histofine® Simple Stain MAX PO (M) (Universal Immuno-peroxidase Polymer, Anti-Mouse) is the labeled polymer prepared by combining amino acid polymers with peroxidase and goat anti-mouse Ig which are reduced to Fab. It is stored in MOPS (3-Morpholinopropanesulfonic acid) buffer (pH 6.5) containing stabilizer and antibacterial agent.

The IgG fraction purified from immunized goat serum is digested to prepare F(ab)₂. Antigen-specific F(ab)₂ is affinity-purified with the antigen. Solid-phase absorption is carried out with human serum protein. Peroxidase-labeled amino acid polymer is conjugated to Fab obtained by reducing F(ab)₂.

The system does not contain biotin nor streptavidin, so the background found with traditional biotin based detection system is completely avoided.

3. INTENDED USE

For In-vitro Diagnostic Use.

Interpretation must be made within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a qualified pathologist.

N-Histofine® Simple Stain MAX PO (M) is designed to allow immunohistochemical tests, to reveal antigens that reacts with a user-supplied mouse primary antibody on human tissues and cells.

4. PRINCIPLE

The antigen / antibody / Universal Immuno-peroxidase Polymer complex can be prepared by allowing the reagent to react with a mouse primary antibody bound to the antigen on tissue section. The enzymatic activity of this complex results in a colored deposit, thus staining the antigen site.

5. PRECAUTIONS

1. Before using this reagent, read these instructions.
2. Do not use reagents after the expiration date.
3. For professional users.
4. Specimens, before and after fixation, and all other materials exposed to them, should be handled like biohazardous materials with proper precautions.
5. Inhalation or ingestion of the highly allergic fixative formaldehyde is harmful. Wear protective mask. If swallowed, induce vomiting. If skin or eye contact occurs, wash thoroughly with water.
6. Organic reagents are flammable. Do not use near open flame.
7. Never pipette reagents by mouth and avoid their contact with skin, mucous membranes and clothes.
8. Avoid microbial contamination of reagents as incorrect result may occur.

N-Histofine® is NICHIREI BIOSCIENCES's registered trademark. The registration countries would be referred to us.

9. Avoid splashing of reagents or generation of aerosols.
10. As a chromogen, DAB solution should be handled with care for it contains carcinogen.
11. Unused solution should be disposed of according to local, State and Federal regulations.

6. STAINING PROCEDURES

□ Reagents and Materials required but not provided

- Xylene
- 95% ethanol
- 100% ethanol
- Phosphate buffered saline (PBS) (pH 7.6±0.2)
NaCl 7.75 g
K₂HPO₄ 1.50 g
KH₂PO₄ 0.20 g
distilled water 1L
- 3% solution of hydrogen peroxide in absolute methanol (Add 1 part of 30% hydrogen peroxide to 9 parts of absolute methanol)
- Mouse primary antibody
- Negative control reagent
- Chromogen/substrate reagent
- Counter staining solution
- Distilled water
- Humidified chamber for slide incubation
- Light microscope
- Cover slips
- Mounting media
- Timer
- Staining racks or Coplin jars
- Absorbent wipes
- Adhesive for tissue section (0.02% poly-L-lysine, silane or the like)

□ Specimen preparation

[Paraffin-embedded tissue sections]

Specimens may undergo histological disintegration or antigenic denaturation when subjected to highly concentrated fixative or prolonged fixing. Thus, in order to obtain an optimal fixing, maintaining tissue morphology and antigen activity, tissues which are as fresh as possible and small in size (about 1cm x 1cm x 0.5cm) should be used. The fixatives as shown below are recommended.

Fixing reagent	Fixing time
10% formalin or buffered formalin	24-48 hours
20% formalin	12-24 hours

[Frozen tissue sections]

Specimens are embedded in compounds (like OTC compound) and snap-frozen in n-hexsan cooled in dry ice-acetone or liquid nitrogen.

□ Section preparation

[Paraffin embedded tissue sections]

The cut sections should be 3-6 µm and placed on slides. When further treatments are to be done such as Antigen Recovery, Heat-Induced Epitope Retrieval (HIER) or trypsin treatment, the glass slides should be coated with an adhesive like 0.02% poly-L-lysine or silane for tissue sections.

[Frozen tissue sections]

The cryostat sections are mounted on an adhesive (like 0.02% poly-L-lysine) - coated slides and air-dried well. The sections are fixed in 100% acetone for 10 minutes at room temperature or 4% paraformaldehyde-PBS solution for 10 minutes at 4°C and then stained.

[Control slides]

A positive control slide, negative control slide and reagent control slide are needed and processed in the same way as the unknown specimen slide to interpret staining results.

- Positive control slide
A specimen containing the target antigen which is processed in the same way as the unknown specimen.
- Negative control slide
A specimen not containing the target antigen which is processed in the same way as the unknown specimen.
- Reagent control slide
The control specimen is used and processed in the same way as the test specimen except that negative control reagent is used instead of primary antibody.

□ Deparaffinization and Rehydration

1. Treatment with xylene
 - (1) Immerse the slides in xylene. After 3 minutes, take out and shake off the excessive xylene in the slides.
 - (2) Repeat 1.(1) twice using fresh xylene.
2. Treatment with ethanol
 - (1) Immerse slides in 100% ethanol. After 3 minutes, take out and shake off the excessive 100% ethanol in the slides.
 - (2) Repeat 2.(1) once with fresh 100% ethanol.
 - (3) Then, treat them twice with 95% ethanol in the same way as described above.
3. Washing
After excessive ethanol is shaken off, immerse slides in PBS for 5 minutes.

□ Staining Procedures

1. Quenching of endogenous peroxidase
 - (1) Wipe areas around the sections on the slides carefully to remove excess solution.
 - (2) Immerse them in 3% solution of hydrogen peroxide in absolute methanol for 10-15 minutes at room temperature (15 - 25°C).
 - (3) Rinse them in fresh PBS for 3 times, each of 5 minutes duration.
2. Addition and reaction of the primary antibody
 - (1) Wipe areas around the sections on the slides carefully.
 - (2) Apply 2 drops (100µl) of primary antibody to specimen slide, positive control slide and negative control slide respectively so as to provide a complete cover of the sections.
 - (3) To the reagent control slide, apply two drops of negative control reagent (normal serum) in place of primary antibody.
 - (4) Incubate them at room temperature or 4°C. (Follow the instructions for incubation time data designated in the package insert of primary antibody)
 - (5) Rinse them in fresh PBS for 3 times, each of 5 minutes duration.
3. Addition and reaction of **N-Histofine®** Simple Stain MAX PO (M) (Universal Immuno-peroxidase Polymer, Anti-Mouse).
 - (1) Wipe areas around the sections on the slides carefully.
 - (2) Apply 2 drops (100µl) of Simple Stain MAX PO (M) to each slide so as to provide a complete cover of the sections. Incubate at room temperature (15 - 25°C) for 30 minutes.
 - (3) Rinse them in fresh PBS for 3 times, each of 5 minutes duration.
4. Addition and reaction of chromogen/substrate reagent
 - (1) Wipe areas around the sections on the slides carefully.
 - (2) Apply 2 drops (100µl) of the chromogen/substrate reagent to each slide so as to provide a complete cover of the sections. Incubate at room temperature (15 - 25°C) for 5-20 minutes.
 - (3) Rinse them in distilled water for 3 times, each of 5 minutes duration.
5. Counter-staining
 - (1) Immerse them in the counterstain solution.
 - (2) Wash them well with tap water.
6. Mounting

In case of alcohol soluble substrates like AEC, the tissue sections are mounted with water-based mounting media without further treatment. In case of alcohol insoluble substrates like DAB, they are mounted with permanent mounting media after washing with water, dehydrated in graded series of alcohol and cleared in xylene.

□ Interpretation of results

Microscopic observation

The slides are examined under a light microscope for reaction. It is necessary to make comparison with three control slides for interpreting staining results.

- Positive control slide
Positive staining is observed.
- Negative control slide
Positive staining isn't observed.
- Reagent control slide
If the slide is stained, it is probably due to non-specific reaction or non-specific protein binding.

The specificity and sensitivity of antigen detection is dependent on specific primary antibody used.

7. STORAGE & SHELF LIFE

Store at 2-8°C. The reagent is stable 18 months after manufacturing.

8. GENERAL LIMITATION

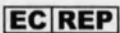
- (1) Allow this reagents to come to room temperature (15 - 25°C) before staining.
- (2) To minimize denaturing of antigens, do not expose tissues to temperature in excess of 58°C during processing.
- (3) Don't make tissues dry in each staining step.
- (4) The optimal concentration and incubation time of primary antibodies should be determined by the investigation. In some cases, further dilution of primary antibodies may be required to prevent over staining.
- (5) If the sections contain few endogenous peroxidase, few erythrocytes and few granulocytes, quenching of endogenous peroxidase may be omitted.
- (6) Tissue staining is dependent on the handling and processing of the tissue prior to staining. Improper fixation, freezing, thawing, washing, drying, heating, or sectioning may produce artifacts or false-negative results.
- (7) Results will not be optimal if old or unbuffered fixatives are used, or excessively heated during embedding or during attachment of sections to slides.
- (8) False-positive results may be seen due to nonspecific binding of proteins. Although **N-Histofine®** Simple Stain MAX PO (M) does not require the use of blocking reagent separately, in some cases the application of blocking reagent containing an irrelevant protein, prior to incubation with the primary antibody, may be useful for reducing the background.
- (9) **N-Histofine®** Simple Stain MAX PO (M) is designed for in-vitro diagnostic use. NICHIREI BIOSCIENCES INC., NICHIREI BIOSCIENCES sales agents and distributors will take no responsibility for **N-Histofine®** Simple Stain MAX PO (M) when used in a way which directly or indirectly violates local regulations or patents. Neither NICHIREI BIOSCIENCES nor its sales agents can be held responsible for any patent infringement which may occur as a result of improper use of the product.

SHOOTING

Problem	Possible cause	Solution
Staining or weak staining results on the positive control slide and the unknown specimen slide	1. Drying-out of specimens during staining prior to addition of the reagents. 2. The embedding agent is not suitable, or paraffin is not thoroughly removed from paraffin-embedded sections. 3. Any trace amount of sodium azide present in the buffer inactivates the peroxidase, making the staining impossible. 4. Inadequate incubation of the enzyme and antibody.	1. Use the Humidified chamber not to allow the tissue to dry out. 2. Select a suitable embedding agent or remove paraffin thoroughly from sections embedded. 2. Change xylene or ethanol as the case may be. 3. Use sodium azide free buffer solution. 3. Change buffer solution. 4. Change stale chromogen/substrate reagent. 4. Blot off excess solution thoroughly at each stage. 4. Provide sufficient time for reaction with antibody. In particular, primary antibody should be incubated for the time period specified in the insert.
The unknown specimen slide is not stained while the positive control slide is stained.	1. Antigen is denatured or masked during fixing or embedding process. 2. Antigen is decomposed by autolysis. 3. Less antigen is present in the sections.	1. Some antigens are sensitive to fixation or embedding. So use less potent fixative and decrease the fixing time. 1. The pretreatment is required for some tissues, in order to reveal the antigen, such as Antigen Recovery, Heat-Induced Epitope Retrieval (HIER) or trypsin treatment. 2. Use tissues obtained by biopsy or surgery, whenever possible. 3. Prolong the incubation time.
The backgrounds are intensively stained in all the slides.	1. Endogenous enzyme activity was not completely blocked. 2. Non-specific binding compositions are found. 3. Autolysis results in excessive antigens isolated in histological solutions. 4. Insufficient removal of paraffin. 5. Insufficient washing of antibody. 6. A high room temperature accelerates enzyme reactions. 7. Drying-out of specimens during staining after of the reagents.	1. Ensure that the procedure for quenching of endogenous peroxidase is right. 2. Before adding primary antibody, treat with 10% normal goat serum. 3. Obtain fresh tissues whenever available. 4. Change xylene or ethanol as the case may be. 5. Ensure thorough washing of antibody. 6. Keep room temperature at 15 to 25°C 6. Shorten reaction time. 7. Never allow the tissue to dry out.
During the reaction, tissue sections come off from the slides.	1. Some antigens require heat induced antigen retrieval procedure or prolonged reaction time with primary antibody, which may render the sections easily come off.	1. Mount tissue sections on slides coated with an adhesive such as 0.02% poly-L-lysine or silane.

10. REFERENCE

- (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) Sawada, H., *et al*: Case report: Altered decorin expression of systemic sclerosis by UVA1 (340-400 nm) 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-X^L. *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 rat 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 Protein Kinase C-beta Activation is Required for Oxidative Stress in Diabetic Nephropathy. *Diabetes.* 52: 2603-2614, 2003.

 Catalog/Code Number	 Temperature Limitations	 In Vitro Diagnostic Medical Device
 Manufacturer	 Batch Code	 Contains Sufficient for (N) Tests
 Use By	 Consult Instructions for Use	 Authorized Representative in the European Community
 CE-mark, code of the notified body	 For IVD Performance Evaluation only	 Sample



NICHIREI BIOSCIENCES INC.
6-19-20, Tsukiji, Chuo-ku, Tokyo, 104-8402, JAPAN
Phone:81-3-3248-2207, Facsimile:81-3-3248-2243



EXBIO Olomouc s.r.o.
Ovesna 14, 779 00 OLOMOUC
CZECH REPUBLIC

 -Histofine® is NICHIREI BIOSCIENCES's registered trademark. The registration countries would be referred to us.

Система детекции Histofine® Simple Stain MAX PO (R)

универсальный полимерный поливалентный окрашивающий реактив Хранить при 2-8 °С Сделано в Японии

Поставка реактива: 17 мл x 1 бутылка (170 тестов) Код: 414141F
17 мл x 3 бутылки (500 тестов) Код: 414142F
17 мл x 9 бутылок (1 500 тестов) Код: 414144F

1. ВВЕДЕНИЕ

Фирма NICHIREI BIOSCIENCES INC. разработала уникальную иммуно-гистохимическую красящую систему под названием Универсальный Иммуно-энзимный Полимер (UIP), метод, запатентованный в США, № патента 6,252,053. Он является оригинальной технологией фирмы. -Histofine® Simple Stain MAX PO (R) обеспечивает и быстрое действие, и экономию времени при иммуно-гистохимическом применении.

2. ОПИСАНИЕ ПРЕПАРАТА

Жидкость, готовая к использованию. Меченый полимер - Histofine® Simple Stain MAX PO (R) (Универсальный Иммуно-пероксидазный Полимер, антикриоличий) изготовлен путем соединения аминокислотных полимеров с пероксидазой и антикриоличий иммуноглобулином козы, которые редуцируются до Fab антител. Он содержится в буфере MOPS (3-морфолинпропансульфоновой кислоты) (pH 6.5), со стабилизатором и бактерицидным средством.

Описание Histofine® Simple Stain MAX PO (M) (Универсальный Иммуно-пероксидазный Полимер, Антикриоличий).
Иммуноглобулиновая фракция выделена из иммунизированной козьей сыворотки путем переваривания, чтобы приготовить F(ab)₂ фрагмент.

Антиген специфичный F(ab)₂ аффинно очищен с антигеном. Твердофазная абсорбция была выполнена с человеческим сывороточным протеином. Полимер из аминокислот, меченый пероксидазой, был конъюгирован с Fab фрагментом, полученным редуцией F(ab)₂.

3. ПРЕДПОЛАГАЕМОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ

ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ IN VITRO

Реактив Histofine® Simple Stain MAX PO (R) предназначен для иммуногистохимических исследований фиксированных в формалине в формалине. О применении для окрашивания замороженных срезов тканей читайте в п. 6. ПРОЦЕДУРА ОКРАШИВАНИЯ. Относительно этого реактива для других образцов можно узнать, обратившись в техническую службу фирмы NICHIREI BIOSCIENCES.

4. ПРИНЦИП

Антиген/антитело/Универсальный Иммуно-пероксидазный Полимерный комплекс может быть приготовлен путем реакции реактива с первичным кроличьим антителом, соединенным с антигеном на срезе ткани. Ферментативное действие этого комплекса приводит к появлению окрашенного осадка, таким образом, окрашивая местоположение антигена.

5. ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ РЕАКТИВА ИЛИ ОБРАЩЕНИИ С НИМ

1. Прежде чем использовать реактив, внимательно прочитайте эту инструкцию.
2. Не используйте реактивы после истечения срока их годности.
3. Для профессионального использования.
4. С образцами, до и после фиксации, а также с другими материалами, используемыми вместе с ними, следует обращаться, как с биологически опасными материалами, соблюдая соответствующие правила предосторожности.
5. Вдыхание или проглатывание высоко аллергенного фиксирующего формальдегида - опасно. Надевайте защитную маску. При случайном проглатывании примите рвотное средство. При контакте с кожей или попадании в глаза, тщательно промойте их водой.
6. Органические реактивы - легковоспламеняющийся материал. Не используйте их вблизи открытого огня.
7. Никогда не раскапывайте реактивы в ртом, избегайте его попадания на кожу, слизистые оболочки и одежду.
8. Избегайте бактериального заражения реактивов, поскольку это может исказить результаты при их использовании.
8. Избегайте распыливания реактивов или образования брызг.
9. Как хромоген раствор ДАБ должен быть применен с осторожностью ввиду его канцерогенности.
10. Неиспользуемые реагенты должны быть утилизированы согласно местным правилам.

6. ПРОЦЕДУРА ОКРАШИВАНИЯ

■ Необходимы реактивы и материалы, не входящие в поставку

- Первичное антитело мыши или кролика
- Ксилол
- 100% этиловый спирт
- 95% этиловый спирт
- Раствор контрастной окраски
- 3% раствор перекиси водорода в абсолютном метаноле (добавить 1 часть средства 30% перекиси водорода к 9 частям абсолютного метанола)

- Фосфатно-солевой буферный раствор (pH 7.6±0.2)

NaCl 7.75 г

K₂HPO₄ 1.50 г

KH₂PO₄ 0.20 г

Дистиллированная вода 1 л

- Отрицательный контрольный реактив
- Покровное стекло
- Световой микроскоп
- Дистиллированная вода
- Влажная камера для инкубации препарата
- Заливочная среда
- Таймер
- Штативы
- Впитывающие салфетки

- Адгезирующий состав для срезов тканей (0,02% полилизин, силан и т.п.)

• Хромогеновый /субстрат реактив -Histofine® Simple Stain AEC, раствор (Без приготовления, одна бутылка) 500 тестов Код: 415 182 F
1 500 тестов Код: 415 184 F/Созданный NICHIREI BIOSCIENCES, одна бутылка, готовый к использованию без приготовления хромоген/субстрат, называемый *ti*- Histofine Simple Stain Substrate Solution (Простой Раствор Красящего Субстрата)

■ Приготовление образца [Срез ткани в парафине] В образцах могут возникнуть повреждение тканей или денатурации антигенов, когда они подвергаются воздействию сильно концентрированных фиксаторов или длительной фиксации плению. Таким образом, чтобы получить оптимальное закрепление, сохранение морфологии ткани и действие антигена, следует использовать образцы ткани, как можно более свежие, размером 1 см x 1 см x 0,5 см. Рекомендуется использовать фиксаторы, указанные далее.

Фиксирующий реактив

10% формалин или забуференный формалин 20% формалин

Время фиксации

24 -48 часов

12 часов

Histofine® является зарегистрированной торговой маркой фирмы NICHIREI BIOSCIENCES.

При регистрации просьба всегда ссылаться на нас.

[Срезы замороженной ткани] Образцы размещены в смеси (напр., смесь ОТС) и мгновенно заморожены в п-гексане твердой углекислотой или жидком азоте.

■ Подготовка срезов [Срезы ткани в парафине]

Срезы следует разместить на предметные стекла. Если с ними нужно провести такие действия, как восстановление эпителия под тепловым воздействием, или обработку трипсином, предметное стекло следует покрыть клеем, как например 0,02% полилизин или силан, для каждого среза ткани.

[Срезы замороженной ткани]

Замороженные образцы размещаются на покрытые клеем веществом (например, 0,02% полилизин) предметные стекла, просушиваются на воздухе. Срезы фиксируются в 100% ацетоне в течение 10 минут при комнатной температуре или в 4% параформальдегида – фосфатно-солевом буферном растворе в течение 10 минут при 4°C и затем окрашиваются. Оптимизация концентрации и времени инкубации первичных антител следует определять путем исследования. В некоторых случаях может потребоваться титр первичных антител, чтобы избежать избыточного окрашивания.

Если срезы содержат мало эндогенной пероксидазы, мало эритроцитов и мало гранулоцитов, гашение эндогенной пероксидазы можно не делать.

[Контрольные образцы]

Потребуется позитивный контрольный образец, отрицательный контрольный образец и контрольный образец с реактивом, которые обрабатываются таким же образом, как и неизвестный образец, чтобы проанализировать результаты окрашивания.

■ Депарафинизация и регидратация

1. Обработка ксилолом

(1) Погрузите образцы в ксилол. Через 3 минуты выньте их и стряхните с них избыток ксилола.

(2) Повторите действия п. (1) дважды, используя свежий ксилол.

2. Обработка этиловым спиртом

(1) Погрузите образцы в 100% этиловый спирт. Через 3 минуты выньте их и стряхните с них избыток спирта.

(2) Повторите действия п. (1) дважды, используя свежий 100% этиловый спирт.

(3) Затем обработайте образцы 95% этиловым спиртом так же, как указано в 2-х предыдущих пунктах.

3. Промывка

После того, как образцы будут обработаны 95% спиртом, погрузите образцы в фосфатно-солевой буферный раствор на 5 минут.

■ Рекомендуемая процедура окрашивания

1. Гашение эндогенной пероксидазы

(1) Тщательно вытрите предметные стекла с образцами, чтобы удалить избыток раствора.

(2) Погрузите их в 3% раствор перекиси водорода в абсолютном метаноле на 10-15 минут при комнатной температуре.

(3) Промойте их в свежем фосфатно-солевом буферном растворе 3 раза, по 5 минут каждый раз.

2. Добавление и реакция первичного антитела

(1) Тщательно вытрите предметные стекла с образцами.

(2) Добавьте по 2 капли первичного антитела на образец, положительный контрольный образец, отрицательный контрольный образец так, чтобы полностью покрыть срезы.

(3) На контрольный образец с реактивом добавьте две капли отрицательного контрольного реактива (нормальная сыворотка) вместо первичного антитела.

(4) Выдержите их при комнатной температуре или при 4°C. (Следуйте инструкциям относительно времени выдержки, которые даны на упаковке первичного антитела.)

(5) Промойте их в свежем фосфатно-солевом буферном растворе 3 раза, по 5 минут каждый раз.

3. Добавление и реакция **-Histofine® Simple Stain MAX PO (R)** (Универсальный Иммуно-пероксидазный Полимер, Антикриолический) (1) Тщательно вытрите предметные стекла с образцами, чтобы удалить избыток раствора.

(2) Добавьте по 2 капли Simple Stain MAX PO (R) на образец так, чтобы полностью покрыть срезы. Выдержите их при комнатной температуре в течение 30 минут.

(3) Промойте их в свежем фосфатно-солевом буферном растворе 3 раза, по 5 минут каждый раз.

4. Добавление и реакция реактива хромогена/субстрата

(1) Тщательно вытрите предметные стекла с образцами, чтобы удалить избыток раствора.

(2) Добавьте по 2 капли реактива хромогена/субстрата на образец так, чтобы полностью покрыть срезы. Выдержите их при комнатной температуре в течение 5-20 минут.

(3) Промойте их в свежем фосфатно-солевом буферном растворе 3 раза, по 5 минут каждый раз.

5. Контрастное окрашивание

(1) Погрузите образцы в окрашивающий раствор для контрастирования

(2) Промойте их водопроводной водой.

6. Заключение гистологических срезов в заливочную среду

В случае если такой средой является субстрат, растворимые в спирте, например, АЕС, срезы ткани размещаются в заливочной среде на водной основе без дальнейшей обработки. Если средой являются нерастворимые в спирте субстраты, например, DAB, срезы размещаются в постоянной заливочной среде после промывки их водой, дегидрируются в последовательной серии погружений в спирт и очищаются ксилолом.

■ Анализ результатов

1. Наблюдение под микроскопом

Образцы исследуются под световым микроскопом до положительной реакции. Необходимо сравнить с тремя типами контрольных срезов для анализа результатов окрашивания.

• Положительный контрольный образец

Образец, содержащий антиген-мишень, который обрабатывается таким же образом, как и неизвестный образец.

• Отрицательный контрольный образец

Образец, не содержащий антиген-мишень, который обрабатывается таким же образом, как и неизвестный образец.

• Контрольный образец с препаратом

Контрольный образец используется и обрабатывается таким же образом, как и исследуемый образец, за исключением того, что отрицательный контрольный реактив используется вместо первичного антитела. Если образец окрашивается, возможно, это происходит вследствие необычной реакции необычных белковых связываний.

7. ХРАНЕНИЕ. Хранить в темном месте при 2-8°C. Реагент стабилен 18 месяцев с момента производства

Histofine® является зарегистрированной торговой маркой фирмы NICHIREI BIOSCIENCES.

При регистрации просьба всегда ссылаться на нас.

ОБЩИЕ ОГРАНИЧЕНИЯ

- 8.1 Дайте реактивам достичь комнатной температуры (15-25°C) перед началом окрашивания.
- 8.2 Минимизируйте денатурацию антигена. Не инкубируйте образец при температуре выше 58°C в процессе обработки.
- 8.3 Не позволяйте ткани высыхать, ни на какой ступени окрашивания.
- 8.4 Оптимальная концентрация и время инкубации первых антител должны быть определены пользователем. В ряде случаев для предотвращения переокрашивания может быть необходимо предварительное разведение первых антител.
- 8.5 Если образцы содержат небольшое количество эндогенной пероксидазы, мало эритроцитов и мало гранулоцитов, этап гашения эндогенной пероксидазы, может быть пропущен.
- 8.6 Окрашивание тканей зависит от обработки образцов перед окрашиванием. Неправильная фиксация, замораживание, оттаивание, промывка, высушивание, нагрев или рассечение могут вызвать появление артефактов или ложноотрицательных результатов.
- 8.7 Результаты не будут оптимальными, если используются старые или незабуференные фиксаторы, или избыточный нагрев при парафиновой проводке или наклеивание срезов на предметные стекла.
- 8.8 Ложноположительные результаты могут появиться вследствие неспецифических связываний белков. Хотя Histofine® Simple Stain MAX PO (R) и не требует использования отдельных блокирующих реактивов, в некоторых случаях применение блокирующего реактива, содержащего «забивочный» белок, перед инкубацией первичного антитела может быть полезным для уменьшения фонового окрашивания.
- 8.9 Reagent Histofine® Simple Stain MAX PO (R) создан для диагностики ин витро. **Торговые агенты и дистрибьюторы фирмы NICHIREI BIOSCIENCES INC., NICHIREI BIOSCIENCES не несут ответственности за результаты использования Histofine® Simple Stain MAX PO (R), если при его применении прямо или косвенно нарушаются местные регулирующие правила или патенты. Ни производитель NICHIREI BIOSCIENCES, ни его торговые агенты не может нести ответственность за любые нарушения патентных прав, которые могут возникнуть в результате неправильного использования продукта.**

9. УСТРАНЕНИЕ НЕПОЛАДОВ

Проблема	Возможная причина	Способы устранения
○ Нет окрашивания, или слабый результат окрашивания на положительном контрольном образце и исследуемом образце	1. Высыхание образца во время окрашивания перед добавлением реактива.	1. Не допускайте пересыхания образцов ткани.
	2. Не подходит заливающий агент или парафин не полностью удален из срезов	2. Выберите подходящий заливающий агент или тщательно удалите парафин со срезов ткани - Замените ксилол или этиловый спирт
	3. В буферном растворе присутствуют следы азиды натрия, которые инактивируют пероксидазу, что препятствует окрашиванию.	3. - Используйте буферный раствор, не содержащий азиды натрия. - Замените буферный раствор.
	4. Неправильное инкубация фермента и антитела	4. Замените старый реактив хромоген/субстрат. - Тщательно удаляйте излишки раствора на каждой стадии процесса. - Обеспечьте достаточное время для реакции с антителом. Особенно это касается первичного антитела, время инкубация которого должно соответствовать указаниям в инструкции.
○ Исследуемый образец не окрашивается, хотя положительный контрольный образец окрашивается.	1. Антиген денатурирован или скрыт во время фиксации или проводки	1. - Некоторые антигены чувствительны к фиксации или парафиновой проводке. Используйте менее активные фиксаторы и уменьшите время фиксации. - Чтобы обнаружился антиген, некоторым тканям требуется предварительная обработка, например, восстановление антигена, при нагреве или обработка трипсином.
	2. Антиген разложился путем аутолиза	2. - По возможности используйте образцы ткани, полученные при биопсии или хирургическим путем

Histofine® является зарегистрированной торговой маркой фирмы NICHIREI BIOSCIENCES.
 При регистрации просьба всегда ссылаться на нас.

Производитель товара: NICHIREI BIOSCIENCES INC. 6-19-20, Tsukiji, Chuo-ku, Tokyo, 104-8402, JAPAN
Phone: 81-3-3248-2207 Facsimile: 81-3-3248-2243 Импортёр: ООО "Микротесты б.м.в." (495) 969-98-26, info@microtesty.ru

○ На всех препаратах интенсивно окрашивается фон.	3.	В срезах присутствует меньше антигена.	3.	- Продлите время инкубации.
	1.	Эндогенная ферментативная активность не полностью блокирована.	1.	- Проверьте, правильно ли проведена процедура эндогенной пероксидазы.
	2.	Обнаружились неспецифические комплексы	2.	- Перед добавлением пероксидазы антитела обработайте срезы нормальной сывороткой крови.
	3.	Аутолиз привел к избыточности антигенов, изолированных в гистологических растворах.	3.	- По возможности, доставьте образцы ткани.
	4.	Недостаточно удален парафин.	4.	Смените ксилол или этиловый спирт в таком случае.
	5.	Антитело недостаточно смыто.	5.	Обеспечьте достаточную промывку после первого антитела.
	6.	Высокая температура помещения усиливает ферментные реакции.	6.	Поддерживайте в помещении температуру от 15 до 25°C. Сократите время реакции.
○ Во время реакции срезы ткани отделяются от предметных стекол.	7.	Пересыхание образцов ткани во время окрашивания после добавления реактива.	7.	- Не допускайте пересыхания образцов ткани.
	1.	Некоторые антигены требуют нагрева при проведении процедуры восстановления антигена или продления времени реакции с первичным антителом, что может привести к отделению образцов.	1.	- Размещайте срезы ткани на предметных стеклах, покрытых клеящим веществом, например, 0,02% полилизином или силаном.

REF Catalog/Code Number	 Temperature Limitations	IVD In Vitro Diagnostic Medical Device
 Manufacturer	LOT Batch Code	 Contains Sufficient for (N) Tests
 Use By	 Consult Instructions for Use	EC REP Authorized Representative in the European Community
CE CE-mark, code of the notified body	 For IVD Performance Evaluation only	SAMPLE Sample

Производитель NICHIREI BIOSCIENCES INC., Ничирей Биосайнсиз Инк., 6-19-20, Тсукидзи Чуо-Ку Токио, 104-8402, Япония, тел: 81-3-3248-2207 Факс: 81-3-3248-224	Представитель производителя в Европе: СРО ЭКСБИО Оломоуц Овесна 14, 779 00 ОЛОМОУЦ Чешская Республика
--	--

Histofine® является зарегистрированной торговой маркой фирмы NICHIREI BIOSCIENCES.
При регистрации просьба всегда ссылаться на нас.



January, 2008

INSTRUCTIONS

N-Histofine® Simple Stain MAX PO (R)

Universal Immuno-peroxidase Polymer, Anti-Rabbit
Histofine® Immunohistochemical staining reagent

Store at 2-8°C

Reagents supplied 17mL x 1 bottle (170 tests) Code : 414141F
17mL x 3 bottles (500 tests) Code : 414142F
17mL x 9 bottles (1500 tests) Code : 414144F

1. INTRODUCTION

NICHIREI BIOSCIENCES developed a unique immunohistochemical staining system called **Universal Immuno-enzyme Polymer (UIP)** method (US Patent No.6,252,053). This is NICHIREI BIOSCIENCES's original technique. **N-Histofine® Simple Stain MAX PO (R)**, this provides both high sensitivity and time saving in immunohistochemical applications.

2. DESCRIPTION

Liquid. Ready to use.

N-Histofine® Simple Stain MAX PO (R) (Universal Immuno-peroxidase Polymer, Anti-Rabbit) is the labeled polymer prepared by combining amino acid polymers with peroxidase and goat anti-rabbit Ig which are reduced to Fab. It is stored in MOPS (3-Morpholinopropanesulfonic acid) buffer (pH 6.5) containing stabilizer and antibacterial agent.

The IgG fraction purified from immunized goat serum is digested to prepare F(ab)₂. Antigen-specific F(ab)₂ is affinity-purified with the antigen. Solid-phase absorption is carried out with human serum protein. Peroxidase-labeled amino acid polymer is conjugated to Fab obtained by reducing F(ab)₂.

The system does not contain biotin nor streptavidin, so the background found with traditional biotin based detection system is completely avoided.

3. INTENDED USE

For In-vitro Diagnostic Use.

Interpretation must be made within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a qualified pathologist.

N-Histofine® Simple Stain MAX PO (R) is designed to allow immunohistochemical tests, to reveal antigens that reacts with a user-supplied rabbit primary antibody on human tissues and cells.

4. PRINCIPLE

The antigen / antibody / Universal Immuno-peroxidase Polymer complex can be prepared by allowing the reagent to react with a rabbit primary antibody bound to the antigen on tissue section. The enzymatic activity of this complex results in a colored deposit, thus staining the antigen site.

5. PRECAUTIONS

1. Before using this reagent, read these instructions.
2. Do not use reagents after the expiration date.
3. For professional users.
4. Specimens, before and after fixation, and all other materials exposed to them, should be handled like biohazardous materials with proper precautions.
5. Inhalation or ingestion of the highly allergic fixative formaldehyde is harmful. Wear protective mask. If swallowed, induce vomiting. If skin or eye contact occurs, wash thoroughly with water.
6. Organic reagents are flammable. Do not use near open flame.
7. Never pipette reagents by mouth and avoid their contact with skin, mucous membranes and clothes.
8. Avoid microbial contamination of reagents as incorrect result may occur.

N-Histofine® is NICHIREI BIOSCIENCES's registered trademark. The registration countries would be referred to us.

9. Avoid splashing of reagents or generation of aerosols.
10. As a chromogen, DAB solution should be handled with care for it contains carcinogen.
11. Unused solution should be disposed of according to local, State and Federal regulations.

6. STAINING PROCEDURES

□ Reagents and Materials required but not provided

- Xylene
- 95% ethanol
- 100% ethanol
- Phosphate buffered saline (PBS) (pH 7.6±0.2)
NaCl 7.75 g
K₂HPO₄ 1.50 g
KH₂PO₄ 0.20 g
distilled water 1L
- 3% solution of hydrogen peroxide in absolute methanol (Add 1 part of 30% hydrogen peroxide to 9 parts of absolute methanol)
- Rabbit primary antibody
- Negative control reagent
- Chromogen/substrate reagent
- Counter staining solution
- Distilled water
- Humidified chamber for slide incubation
- Light microscope
- Cover slips
- Mounting media
- Timer
- Staining racks or Coplin jars
- Absorbent wipes
- Adhesive for tissue section (0.02% poly-L-lysine, silane or the like)

□ Specimen preparation

[Paraffin-embedded tissue sections]

Specimens may undergo histological disintegration or antigenic denaturation when subjected to highly concentrated fixative or prolonged fixing. Thus, in order to obtain an optimal fixing, maintaining tissue morphology and antigen activity, tissues which are as fresh as possible and small in size (about 1cm x 1cm x 0.5cm) should be used. The fixatives as shown below are recommended.

Fixing reagent	Fixing time
10% formalin or buffered formalin	24-48 hours
20% formalin	12-24 hours

[Frozen tissue sections]

Specimens are embedded in compounds (like OTC compound) and snap-frozen in n-hexsan cooled in dry ice-acetone or liquid nitrogen.

□ Section preparation

[Paraffin embedded tissue sections]

The cut sections should be 3-6 µm and placed on slides. When further treatments are to be done such as Antigen Recovery, Heat-Induced Epitope Retrieval (HIER) or trypsin treatment, the glass slides should be coated with an adhesive like 0.02% poly-L-lysine or silane for tissue sections.

[Frozen tissue sections]

The cryostat sections are mounted on an adhesive (like 0.02% poly-L-lysine) - coated slides and air-dried well. The sections are fixed in 100% acetone for 10 minutes at room temperature or 4% paraformaldehyde-PBS solution for 10 minutes at 4°C and then stained.

[Control slides]

A positive control slide, negative control slide and reagent control slide are needed and processed in the same way as the unknown specimen slide to interpret staining results.

• Positive control slide

A specimen containing the target antigen which is processed in the same way as the unknown specimen.

• Negative control slide

A specimen not containing the target antigen which is processed in the same way as the unknown specimen.

• Reagent control slide

The control specimen is used and processed in the same way as the test specimen except that negative control reagent is used instead of primary antibody.

□ Deparaffinization and Rehydration

1. Treatment with xylene

(1) Immerse the slides in xylene. After 3 minutes, take out and shake off the excessive xylene in the slides.

(2) Repeat 1.(1) twice using fresh xylene.

2. Treatment with ethanol

(1) Immerse slides in 100% ethanol. After 3 minutes, take out and shake off the excessive 100% ethanol in the slides.

(2) Repeat 2.(1) once with fresh 100% ethanol.

(3) Then, treat them twice with 95% ethanol in the same way as described above.

3. Washing

After excessive ethanol is shaken off, immerse slides in PBS for 5 minutes.

□ Staining Procedures

1. Quenching of endogenous peroxidase

(1) Wipe areas around the sections on the slides carefully to remove excess solution.

(2) Immerse them in 3% solution of hydrogen peroxide in absolute methanol for 10-15 minutes at room temperature (15 - 25°C).

(3) Rinse them in fresh PBS for 3 times, each of 5 minutes duration.

2. Addition and reaction of the primary antibody

(1) Wipe areas around the sections on the slides carefully.

(2) Apply 2 drops (100µl) of primary antibody to specimen slide, positive control slide and negative control slide respectively so as to provide a complete cover of the sections.

(3) To the reagent control slide, apply two drops of negative control reagent (normal serum) in place of primary antibody.

(4) Incubate them at room temperature or 4°C. (Follow the instructions for incubation time data designated in the package insert of primary antibody)

(5) Rinse them in fresh PBS for 3 times, each of 5 minutes duration.

3. Addition and reaction of **N-Histofine**® Simple Stain MAX PO (R) (Universal Immuno-peroxidase Polymer, Anti-Rabbit).

(1) Wipe areas around the sections on the slides carefully.

(2) Apply 2 drops (100µl) of Simple Stain MAX PO (R) to each slide so as to provide a complete cover of the sections. Incubate at room temperature (15 - 25°C) for 30 minutes.

(3) Rinse them in fresh PBS for 3 times, each of 5 minutes duration.

4. Addition and reaction of chromogen/substrate reagent

(1) Wipe areas around the sections on the slides carefully.

(2) Apply 2 drops (100µl) of the chromogen/substrate reagent to each slide so as to provide a complete cover of the sections. Incubate at room temperature (15 - 25°C) for 5-20 minutes.

(3) Rinse them in distilled water for 3 times, each of 5 minutes duration.

5. Counter-staining

(1) Immerse them in the counterstain solution.

(2) Wash them well with tap water.

6. Mounting

In case of alcohol soluble substrates like AEC, the tissue sections are mounted with water-based mounting media without further treatment. In case of alcohol insoluble substrates like DAB, they are mounted with permanent mounting media after washing with water, dehydrated in graded series of alcohol and cleared in xylene.

□ Interpretation of results

Microscopic observation

The slides are examined under a light microscope for reaction. It is necessary to make comparison with three control slides for interpreting staining results.

• Positive control slide

Positive staining is observed.

• Negative control slide

Positive staining isn't observed.

• Reagent control slide

If the slide is stained, it is probably due to non-specific reaction or non-specific protein binding.

The specificity and sensitivity of antigen detection is dependent on specific primary antibody used.

7. STORAGE & SHELF LIFE

Store at 2-8°C. The reagent is stable 18 months after manufacturing.

8. GENERAL LIMITATION

(1) Allow this reagents to come to room temperature (15 - 25°C) before staining.

(2) To minimize denaturing of antigens, do not expose tissues to temperature in excess of 58°C during processing.

(3) Don't make tissues dry in each staining step.

(4) The optimal concentration and incubation time of primary antibodies should be determined by the investigation. In some cases, further dilution of primary antibodies may be required to prevent over staining.

(5) If the sections contain few endogenous peroxidase, few erythrocytes and few granulocytes, quenching of endogenous peroxidase may be omitted.

(6) Tissue staining is dependent on the handling and processing of the tissue prior to staining. Improper fixation, freezing, thawing, washing, drying, heating, or sectioning may produce artifacts or false-negative results.

(7) Results will not be optimal if old or unbuffered fixatives are used, or excessively heated during embedding or during attachment of sections to slides.

(8) False-positive results may be seen due to nonspecific binding of proteins. Although **N-Histofine**® Simple Stain MAX PO (R) does not require the use of blocking reagent separately, in some cases the application of blocking reagent containing an irrelevant protein, prior to incubation with the primary antibody, may be useful for reducing the background.

(9) **N-Histofine**® Simple Stain MAX PO (R) is designed for in-vitro diagnostic use. NICHIREI BIOSCIENCES INC., NICHIREI BIOSCIENCES sales agents and distributors will take no responsibility for **N-Histofine**® Simple Stain MAX PO (R) when used in a way which directly or indirectly violates local regulations or patents. Neither NICHIREI BIOSCIENCES nor its sales agents can be held responsible for any patent infringement which may occur as a result of improper use of the product.

SHOOTING

Problem	Possible cause	Solution
staining or very weak staining results on the positive control slide and the unknown specimen slide ○ The unknown specimen slide is not stained while the positive control slide is stained. ○ The backgrounds are intensively stained in all the slides. ○ During the reaction, tissue sections come off from the slides.	1. Drying-out of specimens during staining prior to addition of the reagents.. 2. The embedding agent is not suitable, or paraffin is not thoroughly removed from paraffin-embedded sections. 3. Any trace amount of sodium azide present in the buffer inactivates the peroxidase, making the staining impossible. 4. Inadequate incubation of the enzyme and antibody. 1. Antigen is denatured or masked during fixing or embedding process. 2. Antigen is decomposed by autolysis. 3. Less antigen is present in the sections. 1. Endogenous enzyme activity was not completely blocked. 2. Non-specific binding compositions are found. 3. Autolysis results in excessive antigens isolated in histological solutions. 4. Insufficient removal of paraffin. 5. Insufficient washing of antibody. 6. A high room temperature accelerates enzyme reactions. 7. Drying-out of specimens during staining after of the reagents. 1. Some antigens require heat induced antigen retrieval procedure or prolonged reaction time with primary antibody, which may render the sections easily come off.	1. Use the Humidified chamber not to allow the tissue to dry out. 2. Select a suitable embedding agent or remove paraffin thoroughly from sections embedded. 2. Change xylene or ethanol as the case may be. 3. Use sodium azide free buffer solution. 3. Change buffer solution. 4. Change stale chromogen/substrate reagent. 4. Blot off excess solution thoroughly at each stage. 4. Provide sufficient time for reaction with antibody. In particular, primary antibody should be incubated for the time period specified in the insert. 1. Some antigens are sensitive to fixation or embedding. So use less potent fixative and decrease the fixing time. 1. The pretreatment is required for some tissues, in order to reveal the antigen, such as Antigen Recovery, Heat-Induced Epitope Retrieval (HIER) or trypsin treatment. 2. Use tissues obtained by biopsy or surgery, whenever possible. 3. Prolong the incubation time. 1. Ensure that the procedure for quenching of endogenous peroxidase is right. 2. Before adding primary antibody, treat with 10% normal goat serum. 3. Obtain fresh tissues whenever available. 4. Change xylene or ethanol as the case may be. 5. Ensure thorough washing of antibody. 6. Keep room temperature at 15 to 25°C 6. Shorten reaction time. 7. Never allow the tissue to dry out. 1. Mount tissue sections on slides coated with an adhesive such as 0.02% poly-L-lysine or silane.

10. REFERENCE

- (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) Sawada, H., *et al*: Case report: Altered decorin expression of systemic sclerosis by UVA1 (340-400 nm) 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-X^L. *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 rat 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 Protein Kinase C-beta Activation is Required for Oxidative Stress in Diabetic Nephropathy. *Diabetes.* 52: 2603-2614, 2003.

 Catalog/Code Number	 Temperature Limitations	 In Vitro Diagnostic Medical Device
 Manufacturer	 Batch Code	 Contains Sufficient for (N) Tests
 Use By	 Consult Instructions for Use	 Authorized Representative in the European Community
 CE-mark, code of the notified body	 For IVD Performance Evaluation only	 Sample



NICHIREI BIOSCIENCES INC.
6-19-20, Tsukiji, Chuo-ku, Tokyo, 104-8402, JAPAN
Phone:81-3-3248-2207, Facsimile:81-3-3248-2243



EXBIO Olomouc s.r.o.
Ovesna 14, 779 00 OLOMOUC
CZECH REPUBLIC



DAB-Histofine®

DAB-3S kit

Peroxidase Chromogen/Substrate kit

NICHIREI BIOSCIENCES INC.

6-19-20, Tsukiji, Chuo-ku, Tokyo, 104-8402, JAPAN

Phone: 81-3-3248-2207 Facsimile: 81-3-3248-2243

Reagent supplied : 500 tests
1500 tests

Code : 415192F

Code : 415194F

3,3'-DIAMINOBENZIDINE TETRAHYDROCHLORIDE (DAB) SUBSTRATE KIT

SUBSTRATE FOR HORSERADISH PEROXIDASE

FORM

Liquid.

This product contains the following reagents;

Reagent A : DAB solution concentrate

Reagent B : Enhancer solution concentrate

Reagent C : Hydrogen peroxide solution concentrate

Dropping bottle

	[500 tests]	[1500 tests]
...	3mL × 1 bottle	9mL × 1 bottle
...	3mL × 1 bottle	9mL × 1 bottle
...	3mL × 1 bottle	9mL × 1 bottle
...	1 bottle	1 bottle

PREPARATION of Chromogen/Substrate solution

1. Add 1 drop of DAB solution concentrate (Reagent A) to 1 mL of distilled water into the tube. Mix well.
2. Add 1 drop of Enhancer solution concentrate (Reagent B) to 1 mL of diluted Reagent A solution. Mix again.
3. Add 1 drop of Hydrogen peroxide solution concentrate (Reagent C) to 1 mL of diluted Reagent A and Reagent B solution. Mix again.
4. The final mixture is stable for 14 days at 2-8°C with light shielding*.

*: Though the final mixture is stable for 14 days at 2-8 °C with light shielding, the mixture may result in a precipitate with time. The precipitation will have no effect on staining. However, in some cases, some precipitation attached on slides or tissues, may disturb getting crisp image. To avoid such precipitation attachment, following procedures are recommended.

1. Use supernatant of the mixture
2. Rinse the slides in PBS containing 0.1% Tween 20 or TBS containing Tween 20 at room temperature for three minutes, in twice, before and after the step of the mixture reaction described in USAGE.

Note regarding Dropping bottle

- 1) The dropping bottle may be suitable for dropping the final mixture on the slides, not for mixing the reagents, nor for storage of the final mixture.
- 2) If the final mixture is moved from the tube to the dropping bottle, careful handling (e.g. using pipette) is required.
- 3) If the remaining final mixture is stored, it shall be moved from the dropping bottle to appropriate vessels (e.g. sealed bottles or tubes) and stored at 2-8 °C with light shielding.
- 4) Rinse the dropping bottle thoroughly with distilled water after use and dry it enough prior to reuse.

USAGE

This substrate will produce a brown colored deposit upon reaction with peroxidase.

For color development, incubate the tissue section, which has been reacted with peroxidase conjugate, with 1-2 drops of the final mixture at room temperature for 5-20 minutes. Color development may be monitored with a microscope. After adequate coloration, wash the slide with tap water.

Note regarding the final mixture : Use the final mixture after adjusting to room temperature.

This brown deposit is insoluble in organic solvent. Therefore, the slide can be mounted with permanent mounting media after washing with water, dehydrated in graded series of alcohol and cleared in xylene.

STORAGE

Store at 2-8°C.

REMARKS

For In Vitro Diagnostic Use (IVD)

WARNING !

1. Reagent A (DAB solution concentrate) should be handled with care for it contains carcinogen.
2. Reagent C (Hydrogen peroxide solution concentrate) should be handled with care for it contains Hydrogen peroxide.

Реактив - Histofine® DAB-3S kit Peroxidase Chromogen/Substrate kit
субстрат для пероксидазы хрена - 3,3-Диаминобензидин тетрагидрохлорид (ДАБ)
субстрата набор

Поставка реактива: 3 мл x 3 флакона (500 тестов)
9 мл x 3 флаконов (1 500 тестов)

Код: 415192F
Код: 415194F

НАЗНАЧЕНИЕ.

Для Диагностики Ин Витро

Для профессионального использования

Диагностика должна базироваться на клинической истории и результатах диагностических тестов пациента.

ФОРМА.

Жидкость.

Продукт содержит следующие
реагенты

Реагент А : Концентрат
раствора ДАБ

Реагент В : Концентрат
раствора-усилителя

Реагент С : Концентрат
раствора H₂O₂

Флакон для распыливания

Пробирка

500 тестов

3млx1 флакон

3млx1 флакон

3млx1 флакон

1 флакон

1 шт.

1500 тестов

9млx1 флакон

9млx1 флакон

9млx1 флакон

1 флакон

1 шт.

ОПИСАНИЕ.

Набор реактивов Histofine® DAB-3S kit это система из хромогена и субстрата, подходящая для использования в иммуногистохимических окрашиваниях, основанных на пероксидазе. ДАБ может продуцировать преципитат (осадок) коричневого цвета при реакции с пероксидазой в месте нахождения антигена-мишени или нуклеиновой кислоты.

Приготовление раствора хромоген/субстрат

1. Добавьте 1 каплю Реактива А (концентрата раствора ДАБ) к 1 мл дистиллированной воды в пробирке. Хорошо смешайте
2. Добавьте 1 каплю Реактива В (Концентрат раствора-усилителя) к 1 мл разведенного реактива А. Снова перемешайте.
3. Добавьте 1 каплю Реактива С (Концентрат раствора H₂O₂) к 1 мл смеси раствора реактива А и реактива В и хорошо перемешайте как окончательную смесь*1.

*1 - Окончательная смесь стабильна 14 дней при температуре 2-8 °C в условиях, защищенных от света.

Преципитат формируется со временем. Преципитат, прилипший к стеклам или тканям, не нарушает окрашивание, однако, в некоторых случаях, получение чистого изображения может не получиться. Для избежания этого прилипания следующая процедура рекомендуется.

1. Использовать супернатант раствора этой смеси.
2. Промыть стекла в фосфатном буфере, содержащем 0,1% ТВИН 20 или Трис буфере, содержащем 0,1% раствор ТВИН20, при комнатной температуре - 3 минуты на соответствующих ступенях до и после окрашивания, описанных в разделе ИСПОЛЬЗОВАНИЕ.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ.

Довести окончательную смесь до комнатной температуры до использования.

Инкубируйте образец тканевого среза с конъюгатом пероксидазы первоначально.

В то же время, рекомендовано окрашивание негативного контроля, в котором используйте раствор фосфатного буфера вместо первых антител, для оценки результатов окрашивания. Для получения цвета, инкубируйте образец с 1-2 каплями приготовленной окончательной смеси, используя флакон для накапывания*2, при комнатной температуре в течение 5-20 минут.

Доведите время реакции наблюдением в микроскоп до контрастного окрашивания по сравнению с отрицательным контролем.

После появления адекватного окрашивания, промойте препарат водопроводной водой.

После промывания, дегидратации в спиртах восходящей крепости и просветления образца в ксилоле смонтируйте покрывное стекло на заключающее среду.

*2 Флакон для раскапывания применим для раскапывания готовой смеси на стекла, но не для приготовления реактивов и не для хранения реактивов.

Когда окончательная смесь перемещается из пробирки во флакон для раскапывания, необходимо адекватное пипетирование.

Промыть флакон для раскапывания тщательно с дистиллированной водой и высушить после использования.

ХРАНИЕНИЕ.

Хранить при 2-8°C.

ПРИМЕЧАНИЯ.

Для использования в диагностике ин витро (IVD)

Внимание!

1. Избегайте контакта с глазами, кожей и одеждой, предупреждая попадание в пищеварительный тракт и вдыхание.
2. Используйте Реагент А с адекватным вниманием вследствие того, что ДАБ может включаться в мутагены.
3. Используйте Реагент С с адекватным вниманием вследствие того, что он содержит перекись водорода.
4. Утилизируйте Реагент А, включающий растворы ДАБ, и неиспользованные растворы и компоненты как опасные химикаты согласно применяемым правилам и нормам.

REF Catalog/Code Number	 Temperature Limitations	IVD In Vitro Diagnostic Medical Device
 Manufacturer	LOT Batch Code	 Contains Sufficient for (N) Tests
 Use By	 Consult Instructions for Use	EC REP Authorized Representative in the European Community
 CE-mark, code of the notified body	 For IVD Performance Evaluation only	SAMPLE Sample

Производитель NICHIREI BIOSCIENCES INC., Ничирей Биосайнсиз Инк., 6-19-20, Тсукиджи Чуо-Ку Токио, 104-8402, Япония, тел: 81-3-3248-2207 Факс: 81-3-3248-224	Представитель производителя в Европе: СРО ЭКСБИО Оломоуц Овесна 14, 779 00 ОЛОМОУЦ Чешская Республика
--	--

Всего пронумеровано, прошнурово и
скреплено печатью 15 листов
Генеральный директор
ООО «Микротесты б.м.в.»

Елагина М.И.

Е.И. Елагина



Первому заместителю
КОПИЯ
ГЕНЕРАЛЬНЫЙ ДИРЕКТОР
ВЕРНА

Е.И. Елагина
ЕЛАГИНА МИ