



## ZytoChem Plus HRP Polymer Kit



**REF** / Kat. Č.: **POLHRP-006 60 testů, 6 ml**  
**POLHRP-100 1000 testů, 100 ml**

### Návod k použití

#### Využití

ZytoChem Plus HRP Polymer Kit je určen pro kvalitativní detekci antigenů ve formalínu fixovaných, tkáňových parafinových řezech, ve zmrazených tkáňových řezech a v cytologických vzorcích. Je vyvinuta pro použití v kombinaci s mono- a polyklonální primární protilátkou a séry získaných z myší a králíků.

Souprava může být použita pro vyšetření tkání fixovaných v různých roztocích, např. formalínu (neutrálně pufrovaný), B5, Bouin ethanol, nebo HOPE.

Je určena pro in vitro diagnostické použití.

#### Shrnutí a vysvětlení

Účelem imunohistochemického barvení je, aby byly tkáňové a buněčné antigeny viditelné.

ZytoChem Plus HRP Polymer Kit je detekční souprava s vysokou citlivostí určená pro použití v imunohistochemii a imunocytochemii. Enzym polymer v této sadě se skládá z několika molekul sekundární protilátky kovalentně vázaných k několika molekulám křenové peroxidázy (HRP).

Vizualizace nastává prostřednictvím reakce enzym-substrát v přítomnosti barvicího reakčního činidla, které umožní analýzu pomocí mikroskopu.

Testovací systém je vhodný pro detekci mono- a polyklonálních primárních protilátek a sér získaných z myší a králíků. Na rozdíl od jiných detekčních metod, které často používají streptavidin-biotin systém, kitu ZytoChem Plus HRP Polymer Kit se vyhýbá problém zbarvení pozadí způsobené přítomností endogenního biotinu ve tkáni.

#### Princip metody

Parafinové tkáňové řezy jsou nejprve odparafinovány a rehydratovány.

Aktivita endogenní peroxidázy v tkáni může způsobit nespecifické barvení. Tato enzymatická aktivita může být blokována inkubací v 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-roztoku (peroxid blok).

Zbarvení pozadí způsobené nespecifickou vazbou primární protilátky nebo sekundární protilátky v HRP-polymeru je minimalizováno inkubací v proteinovém blokovacím roztoku ("Blocking Solution", je součástí soupravy). Tento krok lze vynechat, jestliže primární protilátky byly naředěny ve vhodném pufru.

Dalším krokem je inkubace se specifickou primární protilátkou. Po promytí, je použito činidlo "PostBlock" a inkubuje se. Následují druhé promývání za použití HRP-polymeru. Jakýkoli přebytek nevázaného HRP-polymeru se důkladně odplaví po inkubaci. Přidáním chromogenního substrátu začne enzymatická reakce peroxidázy, což vede k barevnému srážení, kde je vázána primární protilátka.

Barva může být pozorována světelným mikroskopem.

Použitý chromogen určuje barvu. Chromogenu AEC vede ke vzniku červenohnědého produktu reakce v místě cílového antigenu. Chromogen DAB tvoří tmavě hnědou sráženu.

## Nabízené reagencie

### **REF** / Kat. Č. POLHRP-006

|      |                                   |                  |                |
|------|-----------------------------------|------------------|----------------|
| 6 ml | <b>Blocking Solution</b>          | <b>Reagent 1</b> | (ready-to-use) |
| 6 ml | <b>PostBlock</b>                  | <b>Reagent 2</b> | (ready-to-use) |
| 6 ml | <b>HRP-Polymer (Mouse/Rabbit)</b> | <b>Reagent 3</b> | (ready-to-use) |

### **REF** / Kat. Č. POLHRP-100

|        |                                   |                  |                |
|--------|-----------------------------------|------------------|----------------|
| 100 ml | <b>Blocking Solution</b>          | <b>Reagent 1</b> | (ready-to-use) |
| 100 ml | <b>PostBlock</b>                  | <b>Reagent 2</b> | (ready-to-use) |
| 100 ml | <b>HRP-Polymer (Mouse/Rabbit)</b> | <b>Reagent 3</b> | (ready-to-use) |

### **Doporučené substráty (pokud nejsou v kitu):**

|                              |                             |                   |
|------------------------------|-----------------------------|-------------------|
| <i>Permanent AEC Kit</i>     | <i>Kat. Č. ZUC054-200</i>   | <i>2000 testů</i> |
| <i>AEC Single Solution</i>   | <i>Kat. Č. ZUC037-008</i>   | <i>80 testů</i>   |
|                              | <i>Kat. Č. ZUC037-125</i>   | <i>1250 testů</i> |
| <i>AEC Substrate Kit</i>     | <i>Kat. Č. ZUC042-050</i>   | <i>500 testů</i>  |
|                              | <i>Kat. Č. ZUC042-500</i>   | <i>5000 testů</i> |
| <i>DAB Substrate Kit</i>     | <i>Kat. Č. DAB057</i>       | <i>500 testů</i>  |
|                              | <i>Kat. Č. DAB530</i>       | <i>5000 testů</i> |
| <i>DAB High Contrast Kit</i> | <i>Kat. Č. DAB500 plus</i>  | <i>500 testů</i>  |
|                              | <i>Kat. Č. DAB5000 plus</i> | <i>5000 testů</i> |

### **Potřebný materiál (nedodává se s kitem)**

Positivní a negativní kontrolní tkáň  
Xylen nebo vhodné náhražky  
Ethanol, destilovaná H<sub>2</sub>O  
3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> roztok (Kat. č. ZUC019)  
Reagencie pro enzymatické trávení nebo teplý pretreatment  
Wash buffer PBS nebo TBS (Kat. č. ZUC020)  
Pink PAP Pen (Kat. č. ZUC064)  
Primární protilátka (definovaná uživatelem)  
Primární antibody diluent (Kat.č. ZUC025)  
Negativní kontrola  
Chromogenní substrát  
Counter stain solution  
Montovací medium  
Krycí skla

### **Skladování a manipulace**

Roztoky by měly být skladovány při teplotě 2-8 °C bez dalšího ředění. Uložte činidla na tmavém místě a chraňte je před mrazem. Za těchto podmínek jsou činidla stabilní až do doby expirace uvedené na štítku. Nepoužívejte přípravek po uplynutí doby expirace.

Pozitivní a negativní kontroly musí být prováděny souběžně s testovaným materiálem. Pokud budete pozorovat neobvyklé barvení nebo jiné odchylky od očekávaných výsledků, které by mohly být způsobené tímto činidlem, prosím, kontaktujte technickou podporu Zytomed Systems nebo místního distributora.

### **Bezpečnostní opatření**

S puřem může pracovat pouze kvalifikovaný personal.

Noste ochranný oděv, aby se zabránilo kontaktu činidla nebo vzorku s očima, pokožkou nebo sliznicí. V případě, že činidlo nebo vzorek přijde do styku s citlivou oblastí, vypláchněte nebo omyjte velkým množstvím vody. Je nutné se vyhnout mikrobiální kontaminaci činidla, protože jinak může dojít k nespecifické reakci.

ProClin 300 a ProClin 950 jsou používány ke stabilizaci Materiálové bezpečnostní listy (MSDS) jsou k dispozici na vyžádání.

### Příprava reagensií

Reagents should be at room temperature when used.

- Deparaffinise and rehydrate paraffin-embedded tissue sections.
- Pre-treatment (optional) with HIER (*Heat Induced Epitope Retrieval*) or enzymatic digestion.
- Tissue sections have to be completely covered with the different reagents in order to avoid drying out.

### Postup barvení

- |                                                                                                         |            |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 1. Peroxide blocking (3 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> solution)                                       | 10 min.    |
| 2. Washing with wash buffer                                                                             | 1 x 2 min. |
| 3. Blocking Solution (protein block, Reagent 1) ( <i>This step is optional.</i> )                       | 5 min.     |
| 4. Washing with wash buffer                                                                             | 1 x 2 min. |
| 5. Primary antibody (optimally diluted) or negative control reagent                                     | 30-60 min. |
| 6. Washing with wash buffer                                                                             | 3 x 5 min. |
| 7. PostBlock (Reagent 2, yellow)                                                                        | 20 min.    |
| 8. Washing with wash buffer                                                                             | 3 x 5 min. |
| 9. HRP-polymer (Reagent 3, red)                                                                         | 30 min.    |
| 10. Washing with wash buffer                                                                            | 3 x 2 min. |
| 11. AEC or DAB ( <i>Controlling the colour intensity via light microscope is recommended.</i> )         | 5-15 min.  |
| 12. Stopping the reaction with distilled H <sub>2</sub> O when the desired colour intensity is attained |            |
| 13. Counterstaining and blueing                                                                         |            |
| 14. Mounting: aqueous with AEC, permanent with DAB                                                      |            |

### Příprava reagensií

Reakční činidla by měla mít při použití pokojovou teplotu.

- Odparafinujte a rehydratujte parafinové tkáňové řezy.
- Pre-treatment (volitelně) pomocí HIER (*Heat Induced Epitope Retrieval*) nebo enzymatické trávení.
- Tkáňové řezy musí být zcela pokryty různými reakčními činidly, aby se zabránilo vysychání.

### Postup barvení

- |                                                                                      |            |
|--------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 1. Blokování peroxidem (3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> roztok)                     | 10 min.    |
| 2. Promytí Wash Buffer                                                               | 1 x 2 min. |
| 3. Blocking Solution (protein blok, Reagent 1) (Tento krok je volitelný)             | 5 min.     |
| 4. Promytí Wash Buffer                                                               | 1 x 2 min. |
| 5. Primární protilátka (optimálně zředěná) nebo negativní kontrola                   | 30-60 min. |
| 6. Promytí Wash Buffer                                                               | 3 x 5 min. |
| 7. PostBlock (Reagent 2, žlutá)                                                      | 20 min.    |
| 8. Promytí Wash Buffer                                                               | 3 x 5 min. |
| 9. HRP-polymer (Reagent 3, red)                                                      | 30 min.    |
| 10. Promytí Wash Buffer                                                              | 3 x 2 min. |
| 11. AEC nebo DAB (Ovládání intenzity barev pod světelným mikroskopem je doporučena.) | 5-15 min.  |
| 12. Zastavení reakce destilovanou vodou, pokud je dosaženo barevné intenzity         |            |
| 13. Kontrast a modření                                                               |            |
| 14. Upevnění: vodný s AEC, permanentní s DAB                                         |            |

### Kontrola kvality

Doporučujeme provádět pozitivní a negativní kontrolu s každým barvením. Pozitivní kontrola umožňuje validaci odpovídající zpracování vzorku. Pokud má negativní kontrola pozitivní výsledek, jedná se pravděpodobně o nespecifické barvení.

### Očekávané výsledky

V průběhu reakce substrátu s křenovou peroxidázou v přítomnosti chromogenu, vzniká barevná sraženina v místě vazby primární protilátky. Tato reakce vzniká pouze v případě, že cílový antigen není přítomen v tkáni. Použitý chromogen určuje barvu sraženiny. Analýza se provádí za použití světelného mikroskopu

### Omezení procedury

Imunohistochemie je komplexní metoda, ve které se kombinují jak histologické tak imunologické metody detekce. Zpracování tkáně a manipulace před barvením, například variace ve fixaci a vkládání nebo inherentní vlastnosti tkáně mohou způsobit nekonzistentní výsledky (Nadji a Morales, 1983). V některých tkáních může způsobit

endogenní aktivita peroxidázy nespecifickou barvení. Aktivitu enzymu by měly být blokovány inkubací s roztokem peroxidu vodíku. Tkáně s obsahem povrchového antigenu hepatitidy B (HBsAg), mohou způsobit falešně pozitivní výsledky s HRP (horse radish peroxidase) detekčními systémy (Omata et al, 1980).

Nedostatečný kontrast a montování může ovlivnit interpretaci výsledků. Intenzita zbarvení reakčního produktu se může snižovat s časem, a to zejména při vystavení světlu.

Nadměrná expozice s blokovacím roztokem ("Blocking Solution") může mít za následek snížení intenzity signálu. Proto doporučujeme odplavovat blokovací roztok místo pouhého odkapání nebo vysušení v další proceduře

Zytomed Systems zaručuje, že výrobek bude splňovat všechny popsané požadavky od data odeslání až do data expirace, pokud je výrobek skladován a využíván podle doporučení. Žádná další záruka nemůže být poskytnuta. Za žádných okolností Zytomed Systems neodpovídá za případné škody vzniklé v důsledku použití poskytnutých činidel.

## Řešení problémů

Pokud budete pozorovat neobvyklé zabarvení nebo jiné odchylky od očekávaných výsledků přečtěte si prosím pečlivě tyto pokyny, obraťte se na technickou podporu Zytomed Systems nebo na místního distributora.

### Žádné barvení na vzorku pozitivní kontroly:

1. Chemikálie nebyly použity ve správném pořadí.
2. Chromogenní roztok substrátu byl příliš starý.
3. Bělení z důvodů nekompatibility chromogenu a montovacího média.
4. Antigen / epitop v tkáni byl nedostatečně přístupný primární protilátce. Zkuste pre-treatment, jako je tepelný pretreatment nebo enzym. Pokud jste použili pretreatment, zkuste ho prodloužit.
5. Primární protilátka ne z myši nebo králíka, ale z jiného druhu.
6. Antigen / epitop nebyl stabilní při fixaci nebo při pretreatmentu. Vyzkoušejte jinou fixaci nebo pre-treatment.

### Slabé barvení:

1. Nedostatečná fixace nebo prefixování.
2. Neúplné odparafinování.
3. Antigen / epitop v tkáni byl nedostatečně přístupný primární protilátce. Zkuste pre-treatment, jako je tepelný pretreatment nebo enzym. Pokud jste použili pretreatment, zkuste ho prodloužit.
4. Nadměrná inkubace v Blocking solution nebo nedostatečné promytí po tomto kroku.
5. Příliš mnoho promývacího pufru zůstává na sklíčkách po promývání, použijte ředící činidla v dalším kroku.
6. Inkubační doba byla příliš krátká nebo koncentrace primární protilátky příliš nízká.
7. Chromogenní roztok substrátu byl příliš starý.

### Nespecifická zabarvení pozadí nebo přebarvení:

1. Neúplná deparafinizace.
2. Nadměrné množství lepidla na tkáň na sklíčku.
3. Nedostatečné promytí zejména po inkubaci v enzymu polymeru nebo v roztoku chromogenního substrátu. Toto promývání je velmi důležité.
4. Tkáň s již nanesenými činidly částečně vyschnula.
5. Nespecifické vazby primární protilátky. Využijte Blocking solution dodávaný s touto soupravou nebo zředte primární protilátku ve vhodných činidlech.
6. Inkubace primární protilátky byla příliš dlouhá, nebo koncentrace primární protilátky příliš vysoká.
7. Inkubace roztoku chromogenního roztoku byla příliš dlouhá, nebo reakční teplota příliš vysoká (například pokud je vyšší teplota v laboratoři).
8. Substrát je metabolizován endogenní křenovou peroxidázou ve tkáni. Možná, že roztok peroxidu vodíku použitý pro blokování byl inaktivován.

## Výkonnostní charakteristiky

Firma Zytomed Systems provedla studie k vyhodnocení výkonnosti reagentů. Produkt byl shledán vhodným pro zamýšlené použití.

## Bibliografie

Elias JM "Immunohistopathology – A practical Approach to Diagnosis" ASCP Press 2003  
Nadji M and Morales AR Ann N.Y. Acad Sci 420:134-9, 1983  
Omata M et al. Am J Clin Pathol 73(5): 626-32, 1980

Října 20, 2015

Rev. A1015

Doc: DBCZ\_POLHRP-006\_100

Vysvětlení symbolů na výrobním štítku:

|                                                                                     |                                                                                                                              |                                                                                     |                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                 |
|-------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | Katalogové číslo<br>Catalog Number<br>Reference du catalogue                                                                 |  | Použití podle<br>Use By<br>Utiliser jusque                          |                                                                                                                                                                  | Viz návod k použití<br>Consult Instructions for use<br>Consulter les instructions d'utilisation |
|  | Šarže<br>Batch Code<br>Code du lot                                                                                           |  | Teplotní limity<br>Temperature Limitation<br>Limites de température |                                                                                                                                                                  | Pouze pro výzkumné účely<br>For Research Use Only<br>Pour la recherche uniquement               |
|  | In vitro diagnostický lékařský prostředek<br>In Vitro Diagnostic Medical Device<br>Dispositif médical de diagnostic in vitro |  | Varování/ Nebezpečí<br>Warning/Danger<br>Attention/Danger           |  Výrobce / Manufacturer / Fabricant<br>Zytomed Systems GmbH<br>Anhalterstraße 16<br>14163 Berlin, Germany<br>Tel: (+49) 30-804 984 990<br>www.zytomed-systems.de |                                                                                                 |
|  | Varování/ Nebezpečí<br>Warning/Danger<br>Attention/Danger                                                                    |  | Varování<br>Warning<br>Attention                                    |                                                                                                                                                                    | Nebezpečí<br>Danger<br>Danger                                                                   |