

	Neuroimunologický inštitút n.o., Dvořákovo nábrežie 10, 811 02 Bratislava Tkanivové zariadenie Karloveská 63,84104 Bratislava	
Štandardný pracovný postup: IMUNOHISTOCHEMICKÉ FARBENIE Kód: SOP-LM-1		Strana: 1 / 10 Číslo vydania: 1 Dátum vydania: 11.4.2018

Číslo výtlačku:.....

SOP-LM-1

IMUNOHISTOCHEMICKÉ FARBENIE

	Meno a funkcia	Dátum	Podpis
Vypracoval:	<i>Bc. Patrícia Karkušová</i> pracovník výskumu a vývoja		
Schválil:	<i>Doc. MVDr. Norbert Žilka, DrSc.</i> riaditeľ		

Číslo revízie	Dátum revízie	Súhrn zmien	Podpis QA

	Neuroimunologický inštitút n.o., Dvořákovo nábrežie 10, 811 02 Bratislava Tkanivové zariadenie Karloveská 63,84104 Bratislava
Štandardný pracovný postup: IMUNOHISTOCHEMICKÉ FARBENIE Kód: SOP-LM-1	Strana: 2 / 10 Číslo vydania: 1 Dátum vydania: 11.4.2018

OBSAH

1. Úvod.....	3
1.1 Cieľ.....	3
1.2 Podstata farbenia	3
1.3 Účel	3
1.4 Zaškolenie.....	3
1.5 Definície	3
1.6 Zdravotné a bezpečnostné upozornenia:	3
1.7 Zodpovednosť	4
1.8 Materiál a prístrojové vybavenie.....	4
2. Príprava roztokov a reagensii:	5
2.1 Roztoky a chemikálie použité v tejto procedúre:	5
2.2 Príprava roztokov	5
3. Pracovný postup.....	6
3.1 Problémy ktoré môžu nastať počas procedúry	9
3.2 Vyhodnotenie výsledkov:	10
4. Súvisiace dokumenty	10
5. Zoznam príloh	10

	Neuroimunologický inštitút n.o., Dvořákovo nábrežie 10, 811 02 Bratislava Tkanivové zariadenie Karloveská 63,84104 Bratislava
Štandardný pracovný postup: IMUNOHISTOCHEMICKÉ FARBenIE Kód: SOP-LM-1	Strana: 3 / 10 Číslo vydania: 1 Dátum vydania: 11.4.2018

1. Úvod

1.1 Cieľ

Tento štandardný pracovný postup (skratka SOP z angl. „standard operating procedure“) popisuje postup imunohistochemického farbenia používaného na diagnostiku neurodegeneratívnych ochorení.

1.2 Podstata farbenia

Podstatou skúšky je väzba primárnej protilátky na patologicky zmenený proteín na základe afinity a jeho označenie v nervovom tkanive. Pri pozitívnej diagnostike dosiahneme zafarbenie typických patologických štruktúr charakteristických pre jednotlivé neurologické ochorenia.

1.3 Účel

Tento SOP je záväzným dokumentom pre všetkých zamestnancov organizácie.

1.4 Zaškolenie

Vedúci oddelenia je zodpovedný za riadne zaškolenie všetkých pracovníkov organizácie.

1.5 Definície

MPW: mili power water

1.6 Zdravotné a bezpečnostné upozornenia:

S chemikáliami používanými počas práce podľa protokolu sa musí pracovať bezpečne a s vedomím o ich charaktere a účinku. Potrebne sú laboratórne rukavice, ochranné okuliare a vhodný laboratórny odev.

Peroxid vodíka (30%)(napr. Sigma Aldrich, 216763-500ML-D)

H302 - Zdraviu škodlivý pri požití.

H318 - Spôsobuje vážne poškodenie očí.

Bezpečnostné upozornenia:

P280 - Noste ochranné rukavice/ochranný odev/ochranné okuliare/ochranu tváre

Kyselina mravčia 98%(napr. Sigma Aldrich, 33015-1L)

H226-horľavina, prchavá látka

H302- po prehltnutí dráždivá

H314- poškodzuje oči a leptá pokožku

H331- toxické výpary

Bezpečnostné upozornenia:

P210- zamedziť kontakt s otvoreným ohňom, teplom, horúcimi povrchmi

P280-nosiť bezpečnostný odev pri práci, okuliare, rukavice

P303 + P361 + P353-po kontakte s pokožkou, okamžite miesto opláchnuť pod tečúcou vodou

P304 + P340-po vdýchnutí vyveďte postihnutého na čerstvý vzduch a umožnite mu pohodlne dýchať

P310- vyhľadať lekársku pomoc

P305 + P351 + P338-po kontakte s očami, vyplachovať pod tečúcou vodou

P403 + P233uskladňovať v dobre uzatvorenej nádobe a vetranom priestore

Etanol 96% (napr. Centralchem, L-00274 -1L)

H225 - Vysoko horľavá kvapalina a pary

H302 - Zdraviu škodlivý pri požití

H371 - Môže spôsobiť poškodenie orgánov

	Neuroimunologický inštitút n.o., Dvořákovo nábrežie 10, 811 02 Bratislava Tkanivové zariadenie Karloveská 63,84104 Bratislava	
Štandardný pracovný postup: IMUNOHISTOCHEMICKÉ FARBENIE Kód: SOP-LM-1		Strana: 4 / 10 Číslo vydania: 1 Dátum vydania: 11.4.2018

Bezpečnostné upozornenia:

P210 - Uchovávať mimo dosahu tepla/iskier/otvoreného ohňa/horúcich povrchov. Nefajčite
 P260 - Nevdychujte prach/dym/plyn/hmlu/pary/aerosóly

Xylén čistý (napr. Centralchem, L-00395)

H226 - Horľavá kvapalina a pary
 H312 - Škodlivý pri kontakte s pokožkou
 H315 - Dráždi kožu
 H332 - Škodlivý pri vdýchnutí

Bezpečnostné upozornenia:

P280 - Noste ochranné rukavice/ochranný odev/ochranné okuliare/ochranu tváre

Izopropylalkohol čistý (napr. Centralchem L-00301)

H225 - Vysoko horľavá kvapalina a pary.
 H319 - Spôsobuje vážne podráždenie očí.
 H336 - Môže spôsobiť ospalosť alebo závraty.

Bezpečnostné upozornenia

P210 - Uchovávať mimo dosahu tepla/iskier/otvoreného ohňa/horúcich povrchov. Nefajčite.
 P261 - Zabráňte vdychovaniu prachu/dymu/plynu/hmly/pár/aerosólov.
 P305+351+338 - PO ZASIAHNUTÍ OČÍ: Niekoľko minút ich opatrne vyplachujte vodou. Ak používate kontaktné šošovky a je to možné, odstráňte ich. Pokračujte vo vyplachovaní.

Triton-X100 (napr. Sigma Aldrich, T9284-500ML)

H302 Škodlivý po požití.
 H315 Dráždi kožu.
 H318 Spôsobuje vážne poškodenie očí.
 H410 Veľmi toxický pre vodné organizmy, s dlhodobými účinkami.

Bezpečnostné upozornenia:

P280 Noste ochranné okuliare/ ochranu tváre.
 P301 + P312 + P330 PO POŽITÍ: Pri zdravotných problémoch volajte TOXIKOLOGICKÉ INFORMAČNÉ CENTRUM/ lekára. Vypláchnite ústa.
 P305 + P351 + P338 + P310 PO ZASIAHNUTÍ OČÍ: Niekoľko minút ich opatrne vyplachujte vodou. Ak používate kontaktné šošovky a ak je to možné, odstráňte ich. Pokračujte vo vyplachovaní. Okamžite volajte TOXIKOLOGICKÉ INFORMAČNÉ CENTRUM/lekára

1.7 Zodpovednosť

Vedenie Neuroimunologického inštitútu je zodpovedné za to, že každý užívateľ tohto SOP je poučený o jednotlivých krokoch procedúry a kritických miestach.

1.8 Materiál a prístrojové vybavenie

Sklenené vamičky
 Kovové stojany
 Histologický tlakový hrniec Retriever 2100 (APTUM, #R2100EU)
 PAP pen (Sigma, Z377821-1EA)
 Cover glasses (marienfild)
 Microscope slides Histobond S+ (Marienfeld, 0810501)
 Automaticke pipety (Pipetman, Gilson)
 Termostat (Binder, #BD115)
 Vortex (Ika vortex genius 3)
 Magnetické miešadlo
 Váhy (napr. KERN-PLJ)
 Sklenené kadičky

Neuroimunologický inštitút n.o., Dvořákovo nábrežie 10, 811 02 Bratislava Tkanivové zariadenie Karloveská 63,84104 Bratislava	
Štandardný pracovný postup: IMUNOHISTOCHEMICKÉ FARBY Kód: SOP-LM-1	Strana: 5 / 10 Číslo vydania: 1 Dátum vydania: 11.4.2018

Sklenené odmerné valce (napr. 892/18)
 Anatomické pinzety (napr. 2688.1)
 Stereolupa (Nikon, SMZ645)
 Pipetové špičky (napr. Eppendorf, 10µl, 300µl and 1000µl)
 Polypropylénové centrifugačné skúmavky 15 a 50ml (napr. Sarstedt, #62.554.502 – 15ml, #62.547.254 – 50ml)
 Mikroskúmavky polypropylénové, objem 1,5 ml a 2 ml (napr. Sarstedt, #72.690.001)
 Bottle-Top filter, 500 ml objem (napr. Millipore, 595-4520)
 Laboratórne rukavice (napr. Vasco Sensitive, Braun)
 pH indikátory (Merck, 1.09532.0001)

2. **Príprava roztokov a reagensii:**

2.1 **Roztoky a chemikálie použité v tejto procedúre:**

Entellan (napr. Merck,1079610)

-montovacie médium

VECTASTAIN Elite ABC Kit, (napr. Vector lab.)

-kit so sekundárnymi protilátkami špecifickými pre jednotlivé druhy zvierat (myš, potkan,koza)

Metylénová zelená (napr. Vector lab. H-3402)

-,ready to use“ pre zafarbenie bunkových jadier.

Antigen unmasking roztok (napr. Vektor lab., H3300)

-na prípravu citrátového roztoku podľa tabuľky (

Tabuľka č. 3 - Riedenie citrátového pufru)

1M Tris-HCl roztok (napr. AXON Neuroscience R&D Services.)

50mM Tris-HCl roztok

20x PBS roztok (napr. AXON Neuroscience. R&D Services)

1x PBS roztok

Aptum section block (napr. Aptum, RAP0471500)

VIP peroxidase substrate kit (napr. Vector lab. SK-4600)

xylén čistý (napr. Mikrochem)

isopropylalkohol čistý (napr. Mikrochem)

30% peroxid vodíka (napr. Sigma Aldrich)

96,5 % Etanol (napr. Mikrochem)

70 % Etanol (napr. Mikrochem)

98% kyselina mravčia (napr. Sigma Aldrich) – upozornenie – roztok nerecyklujeme

2.2 **Príprava roztokov**

1M Tris-HCl roztok:

- pripravovaný firmou AXON Neuroscience R&D Services SE, oddelenie imunohistochemie a dodávaný s výrobným certifikátom podľa zloženia v tabuľke č. 1

Tabuľka č.1 - 1 M Tris-HCl roztok zloženie:

Chemikália	Množstvo na 1L
Tris base	121,1g
Milli-Q voda	800 ml
HCl	podľa pH

50mM Tris-HCl

- 50mM roztok pripravíme zmiešaním 50ml 1M Tris-HCl roztoku s 950ml Mili-Q-vody v 1L fľaši

Neuroimunologický inštitút n.o., Dvořákovo nábrežie 10, 811 02 Bratislava Tkanivové zariadenie Karloveská 63,84104 Bratislava	
Štandardný pracovný postup: IMUNOHISTOCHEMICKÉ FARBENIE Kód: SOP-LM-1	Strana: 6 / 10 Číslo vydania: 1 Dátum vydania: 11.4.2018

50mM Tris-HCl + 0,2% Triton-X 100

- roztok pripravíme zmiešaním 50ml z 1M Tris-HCl roztoku s 950 ml Mili- Q- vody v 1L fľaši a pridaním 2ml Triton-X 100. Miešame na magnetickom miešadle, kým sa triton-X 100 nerozpustí.

20x PBS roztok

- prípravovaný firmou AXON Neuroscience R&D Services SE, oddelenie imunohistochemie a dodávaný s výrobným certifikátom podľa zloženia v tabuľke č. 2

Tabuľka č.2 - 20x PBS roztok zloženie:

• Chemikálie	Množstvo na 1L
KH ₂ PO ₄	4 g
Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O	58 g
KCl	4 g
NaCl (napr. Sigma)	160 g

1x PBS roztok:

- 1 x PBS sa pripraví zmiešaním 50 ml 20x PBS pufru s 950 ml Milli-Q vody v 1L fľaši. Roztok je stabilný pri laboratórnej teplote 5 dní

70 % Etanol:

- do odmerného valca s objemom 500 ml zmiešaj 210ml 96% Etanolu s 90 ml Milli-Q vody.

1% peroxid vodíka

- prípravíme podľa tabuľky:

Reagent	Množstvo (400 ml)
30% peroxid vodíka	13,4 ml
50mM Tris- HCl	386,6 ml

3. Pracovný postup

Vzorky sú pripravené podľa protokolu SOP-V-4 a označené na sklíčkach ID číselnými kódmi vzoriek aby nedošlo k zámene tkaniva. Na sklíčka je možné napísať aj doplnujúce informácie. Takto pripravené preparáty je potrebné umiestniť do špeciálneho kovového stojanu podľa (Obrázok 1).



Obrázok 1

- Deparafinizácia tkaniva- sklíčka s tkanivom sú umiestnené do roztokov s rozpúšťadlami, ktoré postupne odstránia parafín z tkaniva.
Umiestni pripravený stojan so sklíčkami do sklenených nádobiek s látkami podľa nasledujúcej postupnosti:
 - 5 min xylén čistý

Neuroimunologický inštitút n.o., Dvořákovo nábrežie 10, 811 02 Bratislava Tkanivové zariadenie Karloveská 63,84104 Bratislava	
Štandardný pracovný postup: IMUNOHISTOCHEMICKÉ FARBENIE Kód: SOP-LM-1	Strana: 7 / 10 Číslo vydania: 1 Dátum vydania: 11.4.2018

- 5 min xylén čistý
 - 5 min isopropylalkohol čistý
 - 5 min 96,5 % etanol
 - 5 min 70 % etanol
 - 5 min MPW
2. Chemické opracovanie tkaniva- stojan so sklíčkami ponor do 98% kyseliny mravčej na 1 min. *(Je potrebné si odsledovať správanie tkaniva na sklíčku, ak by sa tkanivo začalo odliepať od podložného sklíčka, je nutné tkanivo vybrať z kyseliny skôr a časovú zmenu zaznamenať v protokole z farbenia.)*
 3. Bezprostredne prepláchni 2x v MPW a následne vzorky prelož 2x do roztoku 50mM Tris-HCl, obe prepláchnutia po dobu 5 min. v sklenených nádobách na to určených.
 4. Tepelné opracovanie tkaniva na sklíčku - v histologickom tlakovom hrnci Retriever 2100 sa autoklavujú pri teplote 121°C po dobu 20min. Po skončení cyklu sa odporúča ponechať nádobu uzatvorenú najmenej 2h. Vzorky sú uložené do špeciálnych stojanov dodávaných k prístroju Retriever 2100 a v roztoku citrátového roztoku nariadeného podľa tabuľky (Stojan napln nariadeným roztokom citrátového pufru a naskladaj do stojanu prepláchnuté sklíčka (obrázok 3). Následne bezpečne uzavri tlakový hrniec podľa manuálu.
 5. Tabuľka č. 3 - Riedenie citrátového pufru) na zníženie pH roztoku. Stojan napln nariadeným roztokom citrátového pufru a naskladaj do stojanu prepláchnuté sklíčka (obrázok 3). Následne bezpečne uzavri tlakový hrniec podľa manuálu.

Tabuľka č. 3 - Riedenie citrátového pufru

Reagent	Množstvo
Antigen unmasking	656µl
Destilovaná voda	70ml



Obrázok 2



Obrázok 3



Obrázok 4

6. Premývanie v roztoku 50mM Tris-HCl – premiestni sklíčka opäť do špeciálneho kovového stojanu a premývaj sklíčka 2x v roztoku po dobu 5 min.
7. Blokovanie endogénnej peroxidázy- endogénnu peroxidázu blokujeme pomocou 1% roztoku peroxidu vodíka zmiešaného s roztokom 50mM Tris-HCl podľa nasledujúcej tabuľky:

Reagent	Množstvo (400 ml)
30% peroxid vodíka	13,4 ml
50mM Tris-HCl	386,6 ml

- Premiestni stojan so sklíčkami do roztoku 1% peroxidu na dobu 25 min.
8. Premývanie v roztoku 50 mM Tris-HCl + 0.2 % Triton X-100 – premiestni stojan so sklíčkami 2x do roztoku 50 mM Tris-HCl + 0.2 % Triton X-100, oba na dobu 5min.
9. Blokovanie nešpecifického signálu- blokujeme pomocou Aptum Sekcion block po dobu 10min. Postupne vyberaj sklíčko po sklíčku zo stojanu a na každé tkanivo napipetuj množstvo 200- 500µl blokovacieho média (podľa veľkosti tkaniva) a umiestňuj sklíčka na rovnú podložku. Postupuj rýchlo, blokovanie na každom tkanive nesmie presiahnuť čas 10 min.

Neuroimunologický inštitút n.o., Dvořákovo nábrežie 10, 811 02 Bratislava Tkanivové zariadenie Karloveská 63,84104 Bratislava	
Štandardný pracovný postup: IMUNOHISTOCHEMICKÉ FARBENIE Kód: SOP-LM-1	Strana: 8 / 10 Číslo vydania: 1 Dátum vydania: 11.4.2018

10. Aplikácia primárnej protilátky- primárnu protilátku vyberáme podľa typu diagnózy, typy primárnych protilátok sú v prílohe č. 1. Primárna protilátka je rozriedená v 1x PBS podľa stanoveného riedenia a aplikovaná postupným pipetovaním množstva 200-500 500µl (podľa veľkosti tkaniva) jednotlivu na každé tkanivo rovnako ako blokovacie médium. Sklíčka s aplikovanou protilátkou poukladaj do inkubačného boxu tak, aby sa nachádzali nad navlhčenou utierkou (viď obrázok 5), ktorá zabezpečí vlhkejšie prostredie počas dlhej inkubácie. Protilátku inkubuj po dobu 12-20h pri teplote 4°C.
11. V tomto bode je ukončený prvý deň.



Obrázok 5

12. Nasledujúci deň začína premývaním v roztoku 50 mM Tris-HCl s 0.2 % Triton X-100 - stojan so sklíčkami umiestni 2x do roztoku 50 mM Tris-HCl s 0.2 % Triton X-100, oba po dobu 5 min.
13. Aplikácia sekundárnej protilátky z VECTASTAIN Elite ABC Kitu - sekundárna protilátka je rozriedená v 1x PBS (pozri príkladovú tabuľku riedenia) a aplikovaná je na každý rez na sklíčku zvlášť, rovnakým spôsobom ako blokovacie médium a primárna protilátka. Sekundárnu protilátku inkubuj po dobu 1h v inkubačnom boxe (môže byť použitý rovnaký box ako na inkubáciu primárnej protilátky).

Riedenie sekundárnej protilátky z kitu: otvor fľašku so sekundárnou protilátkou a napipetuj požadované množstvo podľa riedenia (50:10 000) znázornené v príkladovej tabuľke do 1x PBS pufra. Za pomoci vortexu premiešaj a nechaj reagovať pri izbovej teplote 20 min.

Tabuľka riedení sekundárnej protilátky z ABC kitu - príklad:

Reagent	1x PBS (5 ml)
sekundár	25 µl

14. Premývanie v roztoku 50 mM Tris-HCl + 0.2 % Triton X-100.- umiestni sklíčka do špeciálneho stojanu a stojan so sklíčkami umiestni 2x do roztoku 50 mM Tris-HCl s 0.2 % Triton X-100, oba po dobu 5 min.
15. AB-komplex kit- VECTASTAIN Elite ABC Kit, pozostáva z dvoch aktívnych zložiek- avidínu a biotínu, ktoré sú spolu nariedené do 1x PBS podľa návodu, ktorý je uvedený v kite (pozri príkladovú tabuľku riedenia). Aplikácia nariedeného roztoku je rovnaká ako pri sekundárnej protilátke. Inkubuj po dobu 1h.

Riedenie ABC kitu: otvor fľašku s reagentom A resp. B a napipetuj požadované množstvo z oboch reagentov podľa riedenia (100:5000) znázornené v príkladovej tabuľke do 1x PBS pufra. Za pomoci vortexu premiešaj a nechaj reagovať pri izbovej teplote 20 min.

Tabuľka riedení ABC kitu:

Reagent	1x PBS (5 ml)	1x PBS (10 ml)
A	100µl	200µl
B	100µl	200µl

Neuroimunologický inštitút n.o., Dvořákovo nábrežie 10, 811 02 Bratislava Tkanivové zariadenie Karloveská 63,84104 Bratislava		
Štandardný pracovný postup: IMUNOHISTOCHEMICKÉ FARBENIE Kód: SOP-LM-1		Strana: 9 / 10 Číslo vydania: 1 Dátum vydania: 11.4.2018

16. Premývanie v roztoku 50 mM Tris-HCl- premiestni sklička opäť do špeciálneho kovového stojanu a premývaj sklička 2x v roztoku po dobu 5 min.
17. Vyvolávanie signálu systémom VIP peroxidase substrate kit – pomocou peroxidázového kitu nariadeného v 1x PBS podľa predpísaného riedenia uvedeného v príkladovej tabuľke nariadime roztok do falkóny obalenej v alobale, aby roztok ostal chránený pred svetlom. Do falkóny naber požadované množstvo roztoku 1x PBS, ktoré je závislé od počtu sklíčok s tkanivami. Následne kvapkaj postupne reagenty, pričom postupuj od reagentu 1 až 3 a hydrogen peroxid je posledný. Po každom reagente roztok premiešaj za pomoci vortexu.

Tabuľka riedení - príklad:

Reagent	1x PBS (5ml)	1x PBS (10ml)
1	3 kvapky	6 kvapiek
2	3 kvapky	6 kvapiek
3	3 kvapky	6 kvapiek
hydrogen peroxid	3 kvapky	6 kvapiek

Signál následne detegujeme pod stereolupou (stereomikroskopom) a dobu, počas ktorej sa tkanivo zafarbí, je nutné zaznačiť do protokolu z farbenia. Postupne napipetuj množstvo 200-500μl (podľa veľkosti tkaniva) VIP roztoku na tkanivo pod stereolupou (stereomikroskopom) a nechaj reagovať kým sa zreteľne nezafarbia štruktúry charakteristické pre ten daný typ protilátky, ktorá bola na tkanive inkubovaná. Postupuj jednotlivo skličko po skličku. Zafarbené tkanivá na sklíčkach po vyvolaní umiestňuj do stojanu v roztoku 50 mM Tris-HCl na zastavenie vyvolávacieho procesu.

18. Premývanie v roztoku 50 mM Tris-HCl 2x po 10min.- stojan so sklíčkami umiestni do roztoku 50 mM Tris-HCl po dobu 10 min.
19. Premývanie v MPW - stojan so sklíčkami umiestni do MPW na dobu 5 min.
20. Podfarbovanie bunkových jadier pomocou metylénovej zelenej- metylénová zelená musí byť nahriata na teplotu min. 55°C a viac v termostate. Po dosiahnutí potrebnej teploty, vlož do nádoby stojan so sklíčkami a umiestni nádobu naspäť do termostatu s nastavenou teplotou. Po 5 min. skontroluj kvalitu zafarbenia. V prípade, že požadované štruktúry sú dobre viditeľné, ukonči proces farbenia. V opačnom prípade pokračuj vo farbení až pokiaľ nie je tkanivo dostatočne zafarbené do zelena. Po zafarbení sklička vyber a preplachuj v destilovanej vode, kým voda nebude číra.
21. Proces dehydratácie tkaniva- prebieha v nasledujúcich rozpúšťadlách v presne stanovenom poradí.
 - 5 min 70 % etanol
 - 5 min 96,5 % etanol
 - 5 min isopropylalkohol
 - 5 min xylén
 - 5 min xylén
22. Proces montovania - tkanivo na skličku zalej montovacím médiom a prikry krycím sklíčkom dostatočne dlhým podľa veľkosti tkaniva tak, aby sa pod krycím sklíčkom nevytvorili vzduchové bubliny a aby žiadna časť tkaniva nevyschla.

3.1 Problémy ktoré môžu nastať počas procedúry

Počas farbenia môže dôjsť k niekoľkým nedostatkom.

Nasledujúce body sú kritické pre správne vykonanie tejto procedúry:

- dodržanie správnej teploty (121°C) v histologickom tlakovom hrnci - potrebná teplota na opracovanie väzbových miest pre antigén.
- **správne nariadenie protilátok podľa špecifického riedenia-** pri podriadení koncentrácie dosiahneme veľmi slabý alebo žiadny signál

	Neuroimunologický inštitút n.o., Dvořákovo nábrežie 10, 811 02 Bratislava Tkanivové zariadenie Karloveská 63,84104 Bratislava
Štandardný pracovný postup: IMUNOHISTOCHEMICKÉ FARBenIE Kód: SOP-LM-1	Strana: 10 / 10 Číslo vydania: 1 Dátum vydania: 11.4.2018

- **správne nariadenie ABC kitu** - podriadenie roztoku má za následok slabý alebo žiadny signál.
- **správne použitie sekundárnej protilátky podľa pôvodu primárnej protilátky**- pri zámene sekundárnej protilátky (myšacia, zajačia a opačne) nedôjde k naviazaniu sekundárnej na primárnu protilátku.
- **správne nariadenie Tris-HCl + 0,2% triton-X100** - na dosiahnutie dostatočnej permeabilizácie bunkových membrán
- **správne nariadený roztok H_2O_2** – na dostatočné vyblokovanie endogénnej peroxidázy. Roztok je potrebné nariediť vždy čerstvý.

Najčastejšie sa vyskytujú nasledovné problémy:

1. *Popraskané tkanivo na sklíčku:*

Príčina: tkanivo je až príliš presušené. Príliš suchý rez nedrží na podložnom sklíčku a popraskanie sa počas farbenia zväčšuje. Poškodenie tkaniva je viditeľné po opracovaní 98% kyselinou mravčou v bode 2 tohto postupu.

Riešenie: znížiť teplotu dosušovania rezov, skrátiť čas sušenia, zopakovať prípravu sklíčka.

2. *Rezy schádzajú zo sklíčka:*

Príčina: tkanivo bolo nedostatočne narovnané. Zvlnené tkanivo sa nedostatočne uchytiť a neskôr sa počas farbenia postupne odlepuje. Nedostatočné uchytenie tkaniva je viditeľné po opracovaní 98% kyselinou mravčou v bode 2 tohto postupu.

Riešenie: predĺžime čas narovňovania rezu na vodnej hladine a začneme nové farbenie.

3. *Na pozitívnej vzorke nie je pozorovaný signál:*

Príčina: došlo k chybe počas farbenia a nedodržania kritických kontrolných bodov.

Riešenie: opätovne je potrebné skontrolovať kompatibilitu primárnej a sekundárnej protilátky a dátum expirácie kitov. Zopakujeme farbenie.

4. *Slabé kontrastné farbenie jadier buniek s metylénovou zelenou:*

Príčina: metylénová zelená bola nedostatočne ohriata na teplotu vyššiu ako 55°C alebo prekročila svoju životnosť.

Riešenie: Vymeniť za novú a zahriať ho na požadovanú teplotu.

5. *Silné nešpecifické farbenie:*

Príčina: spôsobené drastickým chemickým alebo tepelným opracovaním tkaniva, alebo nedostatočným vyblokováním endogénnej peroxidázy.

Riešenie: skontrolovať kvalitu tkaniva a pripraviť nový roztok peroxidu. Farbenie zopakujeme na novom tkanive.

3.2 Vyhodnotenie výsledkov:

Kvalitatívne posúdenie farbenia vykonávame pod mikroskopom. Vyhodnotenie obrazu zapíšeme do protokolu o farbení - formulára F1-SOP-LM-1 (príloha č. 2). Protokol skontroluje vedúci pracoviska a potvrdí svojím podpisom.

4. Súvisiace dokumenty

- <http://www.aplum-bio.com>
- <http://www.ihcworld.com>
- knihy o danej problematike
- F1-SOP-LM-1 - Protokol o farbení
- SOP-V-4- Príprava a krájanie v parafíne zaliatých vzoriek

5. Zoznam príloh

1. Zoznam protilátok používaných na diagnostiku
2. F1-SOP-LM-1 – protokol z imunohistochemického farbenia

Neuroimunologický inštitút n.o., Dvořákovo nábrežie 10, 811 02 Bratislava Tkanivové zariadenie Karloveská 63,84104 Bratislava	
Štandardný pracovný postup: IMUNOHISTOCHEMICKÉ FARBENIE Kód: SOP-LM-1	Strana: 1 / 2 Číslo vydania: 1 Dátum vydania: 11.4.2018

Príloha č. 1

Zoznam protilátok používaných na diagnostiku

Protilátka	Epitop protilátky	Riedenie
AT8	viaže sa na fosforylované epitopy TAU proteínu vytvárajúce PHF čím označuje NFT's v mozgovom tkanive ktoré sa vyskytujú u pacientov s Alzheimerovou chorobou.	1:1000
β -amyloid (clon 4G8)	viaže sa na zvyšky aminokyselin 17-24 proteínu β -amyloid. Hromadenie proteínu a vytváranie depozitov je charakteristické pre Alzheimerovu chorobu a Downov syndróm	1:500
α -synuclein (clon 4D6)	protilátka sa viaže na proteín α -synuclein, ktorý vytvára štruktúru tzv Lewieho teliesok v bunke a je charakteristický pre Parkinsonovu chorobu	1:500
Anti-p62 (Lck ligand)	protilátka sa viaže na T- lymfocytárny proteín lck nachádzajúci sa v cytoplazme buniek	1:500
Anti-phospho TDP-43 (pSer.409/410)	protilátka sa viaže na celý nukleárny ribonukleoprotein ktorý je súčasťou ubiquitin- pozitívnych a tau-negatívnych inklúzií charakteristických pre FTDP-U a ALS	1:1000
Anti- FUS	označuje patologický FUS proteín, ktorý sa nachádza v cytosole neurónov a glií.	1:100

Referencie:

Alafuzoff I, Ince PG, Arzberger T, Al-Sarraj S, Bell J, Bodi I, Bogdanovic N, Bugiani O, Ferrer I, Gelpi E, Gentleman S, Giaccone G, Ironside JW, Kavantzias N, King A, Korkolopoulou P, Kovács GG, Meyronet D, Monoranu C, Parchi P, Parkkinen L, Patsouris E, Roggendorf W, Rozemuller A, Stadelmann-Nessler C, Streichenberger N, Thal DR, Kretschmar H. Staging/typing of Lewy body related alpha-synuclein pathology: a study of the BrainNet Europe Consortium. *Acta Neuropathol.* 2009 Jun;117(6):635-52.

Alafuzoff I, Thal DR, Arzberger T, Bogdanovic N, Al-Sarraj S, Bodi I, Boluda S, Bugiani O, Duyckaerts C, Gelpi E, Gentleman S, Giaccone G, Graeber M, Hortobagyi T, Höftberger R, Ince P, Ironside JW, Kavantzias N, King A, Korkolopoulou P, Kovács GG, Meyronet D, Monoranu C, Nilsson T, Parchi P, Patsouris E, Pikkarainen M, Revesz T, Rozemuller A, Seilhean D, Schulz-Schaeffer W, Streichenberger N, Wharton SB, Kretschmar H. Assessment of beta-amyloid deposits in human brain: a study of the BrainNet Europe Consortium. *Acta Neuropathol.* 2009 Mar;117(3):309-20.

Alafuzoff I, Gelpi E, Al-Sarraj S, Arzberger T, Attems J, Bodi I, Bogdanovic N, Budka H, Bugiani O, Englund E, Ferrer I, Gentleman S, Giaccone G, Graeber MB, Hortobagyi T, Höftberger R, Ironside JW, Jellinger K, Kavantzias N, King A, Korkolopoulou P, Kovács GG, Meyronet D, Monoranu C, Parchi P, Patsouris E, Roggendorf W, Rozemuller A, Seilhean D, Streichenberger N, Thal DR, Wharton SB, Kretschmar H. The need to unify neuropathological assessments of vascular alterations in the ageing brain: multicentre survey by the BrainNet Europe consortium. *Exp Gerontol.* 2012 Nov;47(11):825-33.

Kovacs GG, Rozemuller AJ, van Swieten JC, Gelpi E, Majtenyi K, Al-Sarraj S, Troakes C, Bódi I, King A, Hortobágyi T, Esiri MM, Ansorge O, Giaccone G, Ferrer I, Arzberger T, Bogdanovic N, Nilsson T, Leisser I, Alafuzoff I, Ironside JW, Kretschmar H, Budka H. Neuropathology of the hippocampus in FTLTD-Tau with Pick bodies: a study of the BrainNet Europe Consortium. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2013 Feb;39(2):166-78.

	Neuroimunologický inštitút n.o., Dvořákovo nábrežie 10, 811 02 Bratislava Tkanivové zariadenie Karloveská 63,84104 Bratislava
Štandardný pracovný postup: IMUNOHISTOCHEMICKÉ FARBENIE Kód: SOP-LM-1	Strana: 2 / 2 Číslo vydania: 1 Dátum vydania: 11.4.2018

Alafuzoff I, Pikkarainen M, Neumann M, Arzberger T, Al-Sarraj S, Bodi I, Bogdanovic N, Bugiani O, Ferrer I, Gelpi E, Gentleman S, Giaccone G, Graeber MB, Hortobagyi T, Ince PG, Ironside JW, Kavantzias N, King A, Korkolopoulou P, Kovács GG, Meyronet D, Monoranu C, Nilsson T, Parchi P, Patsouris E, Revesz T, Roggendorf W, Rozemuller A, Seilhean D, Streichenberger N, Thal DR, Wharton SB, Kretschmar H. Neuropathological assessments of the pathology in frontotemporal lobar degeneration with TDP43-positive inclusions: an inter-laboratory study by the BrainNet Europe consortium. J Neural Transm (Vienna). 2015 Jul;122(7):957-72

Alafuzoff I, Arzberger T, Al-Sarraj S, Bodi I, Bogdanovic N, Braak H, Bugiani O, Del-Tredici K, Ferrer I, Gelpi E, Giaccone G, Graeber MB, Ince P, Kamphorst W, King A, Korkolopoulou P, Kovács GG, Larionov S, Meyronet D, Monoranu C, Parchi P, Patsouris E, Roggendorf W, Seilhean D, Tagliavini F, Stadelmann C, Streichenberger N, Thal DR, Wharton SB, Kretschmar H. Staging of neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease: a study of the Brain Net Europe Consortium. BrainPathol. 2008;18(4):484-96.

Alafuzoff I, Pikkarainen M, Arzberger T, Thal DR, Al-Sarraj S, Bell J, Bodi I, Budka H, Capetillo-Zarate E, Ferrer I, Gelpi E, Gentleman S, Giaccone G, Kavantzias N, King A, Korkolopoulou P, Kovács GG, Meyronet D, Monoranu C, Parchi P, Patsouris E, Roggendorf W, Stadelmann C, Streichenberger N, Tagliavini F, Kretschmar H. Inter-laboratory comparison of neuropathological assessments of beta-amyloid protein: a study of the BrainNet Europe consortium. Acta Neuropathol. 2008;115(5):533-46.

Alafuzoff I, Parkkinen L, Al-Sarraj S, Arzberger T, Bell J, Bodi I, Bogdanovic N, Budka H, Ferrer I, Gelpi E, Gentleman S, Giaccone G, Kamphorst W, King A, Korkolopoulou P, Kovács GG, Larionov S, Meyronet D, Monoranu C, Morris J, Parchi P, Patsouris E, Roggendorf W, Seilhean D, Streichenberger N, Thal DR, Kretschmar H; BrainNet Europe Consortium. Assessment of alpha-synuclein pathology: a study of the BrainNet Europe Consortium. J Neuropathol Exp Neurol. 2008 Feb;67(2):125-43.

	Neuroimunologický inštitút n.o., Dvořákovo nábrežie 10, 811 02 Bratislava Tkanivové zariadenie Karloveská 63,84104 Bratislava	
Štandardný pracovný postup: IMUNOHISTOCHEMICKÉ FARBENIE Kód: SOP-LM-1		Strana: 1 / 1 Číslo vydania: 1 Dátum vydania: 11.4.2018

Príloha č. 2 – formulár F1-SOP-LM-1 – Protokol z imunohistochemického farbenia

PROTOKOL Z IMUNOHISTOCHEMICKÉHO FARBENIA

Dátum:

Metóda:

Metódu vykonal:

Testované tkanivo:

ID číslo pacienta:

Testované oblasti:

oblasť	*	oblasť	*	oblasť	*	oblasť	*
1		5		9		13	
2		6		10		14	
3		7		11		15	
4		8		12		16	

*označ krížikom

Použité primárne protilátky:

Použité sekundárne protilátky:

Primárna protilátka	*	číslo šarže	Sekundárny kit	*	číslo šarže
AT8			VECTASTAIN Elite ABC Kit HUMAN		
β -amyloid (clon 4G8)			VECTASTAIN Elite ABC Kit MOUSE		
α -synuclein (clon 4D6)			VECTASTAIN Elite ABC Kit RABBIT		
Anti-p62 (Lck ligand)			Poznámky:		
Anti.phospho TDP-43 (pSer.409/410)					
Anti- FUS					
*označ krížikom					

Použité roztoky:

Roztok	*	číslo šarže	Poznámky:
Antigen unmasking roztok			
1M Tris-HCl roztok			
50mM Tris-HCl roztok			
50mM Tris-HCl + 0,2% Triton-X 100			
20x PBS roztok			
1x PBS roztok			
Aptum section block			
70 % Etanol			
1% peroxid vodíka			
*označ krížikom			

Použitý VIP peroxidázový kit:

Typ kitu	číslo šarže	Poznámky:
VIP peroxidase substrate kit		

Výsledky:

Protokol z imunohistochemického farbenia

Poznámky:

Doba vyvolávania signálu:

Záver:

Schválil: