

Neuroimunologický inštitút n.o., Dvořákovo nábrežie 10, 811 02 Bratislava Tkanivové zariadenie Karloveská 63,84104 Bratislava	
Štandardný pracovný postup HEMATOXYLÍN - EOSÍN FARBENIE Kód: SOP-LM-2	Strana: 1 / 6 Číslo vydania: 1 Dátum vydania: 11.4.2018

Číslo výtlačku:.....

SOP-LM-2

HEMATOXYLÍN - EOSÍN FARBENIE

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

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 HEMATOXYLÍN - EOSÍN FARBENIE Kód: SOP-LM-2	Strana: 2 / 6 Číslo vydania: 1 Dátum vydania: 11.4.2018

OBSAH

1. Úvod.....	3
1.1 Cieľ.....	3
1.2 Podstata skúšky	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. Pufre a chemikálie použité v tejto procedúre:.....	4
3. Pracovný postup.....	5
3.1 Vyhodnotenie výsledkov:	6
4. Súvisiace dokumenty	6
5. Zoznam príloh	6

Neuroimunologický inštitút n.o., Dvořákovo nábrežie 10, 811 02 Bratislava Tkanivové zariadenie Karloveská 63,84104 Bratislava	
Štandardný pracovný postup HEMATOXYLÍN - EOSÍN FARBENIE Kód: SOP-LM-2	Strana: 3 / 6 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 histochemického farbenia používaného v rutinej praxi pri diagnostike neurodegeneračných ochorení.

1.2 Podstata skúšky

Podstatou farbenia je väzba dvoch zložiek (hematoxylínu a eosínu) na špecifické oblasti v bunke. Konkrétne sa na zásaditú cytoplazmu viaže eosín a kyslé jadro bunky zase naviaže hematoxylín. Takýmto zafarbením dosiahneme kontrast medzi jednotlivými štruktúrami čím sa zreteľne vykreslí povrch tkaniva.

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. Potrebné sú laboratórne rukavice, ochranné okuliare a vhodný laboratórny odev.

Kyselina octová (napr. Centralchem, L-00713)

H226 - Horľavá kvapalina a pary.

H314 - Spôsobuje ťažké poleptanie kože a poškodenie očí.

Bezpečnostné upozornenia

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

P310 - Okamžite volajte NÁRODNÉ TOXIKOLOGICKÉ INFORMAČNÉ CENTRUM alebo lekára.

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

H225 - Vysoko horľavá kvapalina a pary

H302 - Zdraviu škodlivý pri požití

H371 - Môže spôsobiť poškodenie orgánov

Bezpečnostné upozornenia:

P210 - Uchovávať mimo dosahu tepla/iskier/otvoreného ohňa/horúcich povrchov. Nefajčite

P260 - Nevdychujte prach/dym/plyn/hmlu/pary/aerosóly

Xylén čistý (Centralchem, L-00395)

H226 - Horľavá kvapalina a pary

H312 - Škodlivý pri kontakte s pokožkou

H315 - Dráždi kožu

H332 - Škodlivý pri vdýchnutí

Neuroimunologický inštitút n.o., Dvořákovo nábrežie 10, 811 02 Bratislava Tkanivové zariadenie Karloveská 63,84104 Bratislava	
Štandardný pracovný postup HEMATOXYLÍN - EOSÍN FARBENIE Kód: SOP-LM-2	Strana: 4 / 6 Číslo vydania: 1 Dátum vydania: 11.4.2018

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. Nefajčiť.

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.

1.7 Zodpovednosť

Bc Patrícia Karkušová je zodpovedná za to, že každý užívateľ tohto SOP je poučený o jednotlivých krokoch procedúry a kritických miestach.

1.8 Materiál a prístrojové vybavenie

Sklenené vaničky

Kovové stojany

Cover glasses (mariefeld)

Microscope slides Histobond S+ (Marienfeld, 0810501)

Vortex (Ika vortex genius 3)

Magnetické miešadlo

Sklenené kadičky

Váhy (napr. Kern PLJ)

Sklenené odmerné valce

Anatomické pinzety

Laboratórne rukavice (napr. Vasco Sensitive, Braun)

2. Pufre a chemikálie použité v tejto procedúre:

Entelan (napr. Merck Merck 1.07961.0500)

-montovacie médium

Xylén (napr. Centralchem, L-00395)

-zmes izomérov

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

-dodávaný ako 96%.

Mayersov hematoxylin (napr. Dako):

-„ready to use“ bez ďalšieho naried'ovania.

Eosin Y roztok (napr. Sigma aldrich):

je pripravovaný firmou AXON Neuroscience R&D Services SE, oddelenie imunohistochemie a dodávaný s výrobným certifikátom. Zloženie roztoku je uvedené v tabuľke 1.

Neuroimunologický inštitút n.o., Dvořákovo nábrežie 10, 811 02 Bratislava Tkanivové zariadenie Karloveská 63,84104 Bratislava	
Štandardný pracovný postup HEMATOXYLÍN - EOSÍN FARBENIE Kód: SOP-LM-2	Strana: 5 / 6 Číslo vydania: 1 Dátum vydania: 11.4.2018

Tabuľka 1. Eosin Y roztok

Reagent	Množstvo
Eosin Y	1g
Milli-Q-voda	100ml

Phloxine B roztok:

je pripravovaný firmou AXON Neuroscience R&D Services SE, oddelenie imunohistochemie a dodávaný s výrobným certifikátom. Zloženie roztoku je uvedené v tabuľke 2.

Tabuľka 2 Phloxine B roztok - zloženie

Reagent	Množstvo
Phloxine B	1g
Milli-Q-voda	100ml

Eosin- Phloxine B pracovný roztok:

Zmiešaj v dostatočne veľkej sklenenej kadičke množstvá roztokov podľa tabuľky (Tabuľka 3 Eosin-Phloxine pracovný roztok).

Tabuľka 3 Eosin-Phloxine pracovný roztok

Reagent	Množstvo
Eosin Y roztok	100ml
Phloxine B roztok	10ml
Etanol (96%)	780ml
Kyselina octová	4ml

3. Pracovný postup

1. Deparafinizácia tkaniva- sklíčka s tkanivom sú umiestnené do roztokov s rozpúšťadlami, ktoré postupne odstraňujú parafín z tkaniva.
Postup: umiestni pripravený stojan so sklíčkami do sklenených nádobiek s látkami podľa nasledujúcej postupnosti:
 - 5 min xylén čistý
 - 5 min xylén čistý
 - 5 min isopropylalkohol čistý
 - 5 min 96,5 % etanol
 - 5 min 70 % etanol
 - 5 min MPW
1. vzorky rýchlo premy v Milli-Q-vode.
2. zafarbenie jadier - ponor vzorky do Mayersovho hematoxylínu na 6-18 min podľa odporúčania výrobcu.
3. nechaj vzorky vymývať pod teplou tečúcou vodou po dobu 10 min.
4. rýchlo premy v Milli-Q-vode.
5. 10x ponor do 96% etanolu.
6. zafarbenie cytoplazmy-ponor vzorky do eosin –phloxinB pracovného roztoku na 3 minúty
7. ponor vzorky do 96% etanolu na 3 min.

Neuroimunologický inštitút n.o., Dvořákovo nábrežie 10, 811 02 Bratislava Tkanivové zariadenie Karloveská 63,84104 Bratislava	
Štandardný pracovný postup HEMATOXYLÍN - EOSÍN FARBENIE Kód: SOP-LM-2	Strana: 6 / 6 Číslo vydania: 1 Dátum vydania: 11.4.2018

2. 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

8. Montovanie tkaniva po zafarbení- tkanivo na sklíčku zalejeme montovacím médiom a prikryjeme krycím sklíčkom dostatočne dlhým podľa veľkosti tkaniva tak, aby sa pod krycím sklíčkom nevytvorili vzduchové bubliny a aby žiadna časť tkaniva nevyschla.

3.1 Vyhodnotenie výsledkov:

Preparáty pozorujeme pod mikroskopom a podľa vopred určeného zámeru sa snažíme identifikovať špecifické patologické zmeny na tkanive .

4. Súvisiace dokumenty

- <http://www.aptum-bio.com>
- <http://www.ihcworld.com>
- F3-SOP-LM- Protokol o výsledku

5. Zoznam príloh

1. F1-SOP-LM-2 – protokol z histochemického farbenia

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

Príloha č. 1 - F1-SOP-LM-1 – protokol z histochemického farbenia

PROTOKOL Z HISTOCHEMICKÉHO 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 roztoky:

Roztok	*	číslo šarže	Poznámky:
70 % Etanol			
Mayersov hematoxylin			
Eosin- Phloxine B pracovný roztok			
Phloxine B roztok			
Eosin Y roztok			
*označ krížikom			

Výsledky:

Poznámky:

Doba vyvolávania signálu:

Záver:

Schválil: