

# MULTIVIEW® PLUS (миша- HRP/заешка-AP) ИНС комплект (кафяв/зелен)

каталожен #: ENZ-KIT181-0150

150 теста

**ЗАБЕЛЕЖКА:** Тази версия съдържа промяна в инструкциите за приготвяне на HIGHDEF® DAB хромоген/субстрат.

За най-новата информация за продукта, включително документация за поддръжка, посетете ни онлайн:

[www.enzolifesciences.com](http://www.enzolifesciences.com)

Техническа поддръжка (САЩ): 800-942-0430  
Техническа поддръжка (ЕС):



# РЪКОВОДСТВО за продукта

## **Употреба САМО ЗА ИЗСЛЕДОВАТЕЛСКИ ЦЕЛИ**

Освен ако изрично не е посочено друго на опаковката, всички продукти, продавани по-долу, са предназначени и могат да бъдат използвани само за изследователска употреба. Да не се използва в диагностични процедури. Покупката не включва никакви права или лиценз за използване, разработване или използване по друг начин на тези продукти с търговска цел. Всяка търговска употреба, разработване или експлоатация на тези продукти или разработка с помощта на тези продукти без изричното писмено разрешение на Enzo Life Sciences, Inc. е строго забранено. Купувачът поема всички рискове и отговорност за използването и/или резултатите, получени от използването на продуктите, обхванати от тази фактура, независимо дали се използват самостоятелно или в комбинация с други продукти.

## **ОГРАНИЧЕНА ГАРАНЦИЯ; ОТКАЗ ОТ ГАРАНЦИИ**

Тези продукти се предлагат с ограничена гаранция. Продуктите са гарантирани, че отговарят на всички спецификации, описани в листовката към момента на изпращане. Единственото задължение на Enzo Life Sciences е да замени продукта до размера на покупната цена. Всички претенции трябва да бъдат направени на Enzo Life Sciences, Inc., в рамките на пет (5) дни от получаване на поръчката.

ТАЗИ ГАРАНЦИЯ ИЗРИЧНО ЗАМЕСТВА ВСЯКАКВИ ДРУГИ ГАРАНЦИИ ИЛИ ОТГОВОРНОСТИ, ИЗРИЧНИ ИЛИ КОСВЕНИ СЕ, ВКЛЮЧИТЕЛНО ГАРАНЦИИ ЗА ПРОДАВАЕМОСТ, ГОДНОСТ ЗА ОПРЕДЕЛЕНА ЦЕЛ И НЕНАРУШАВАНЕ НА ПАТЕНТ ИЛИ ДРУГИ ПРАВА НА ИНТЕЛЕКТУАЛНА СОБСТВЕНОСТ НА ВСИЧКИ ТАКИВА ГАРАНЦИИ (И ВСЯКАКВИ ГАРАНЦИИ ДРУГИ ГАРАНЦИИ, ПОДРАЗБИРАЩИ СЕ ОТ ЗАКОНА) ИЗРИЧНО СЕ ОТХВЪРЛЯТ.

## **ТЪРГОВСКИ МАРКИ И ПАТЕНТИ**

Няколко продукта и продуктови приложения на Enzo Life Sciences са обхванати от американски и чуждестранни патенти и патенти. Enzo и MULTIVIEW са търговски марки на Enzo Life Sciences, Inc.

**САМО ЗА ИЗСЛЕДОВАТЕЛСКА УПОТРЕБА.  
ДА НЕ СЕ ИЗПОЛЗВА ПРИ ДИАГНОСТИЧНИ  
ПРОЦЕДУРИ.**



Моля,  
прочетете  
цялата  
брошура,  
преди да



Внимателно  
отбележете  
условията на  
работа и  
съхранение  
на всеки



Моля,  
свържете се с  
техническата  
поддръжка на  
Enzo Life  
Sciences, ако

## СЪДЪРЖАНИЕ

Въведение .....	1
Доставени материали .....	1
Съхранение .....	2
Стабилност .....	2
Допълнителни материали, които се изискват, но не се предоставят .....	2
Предпазни мерки.....	3
Подготовка на реактива .....	3
Протокол за оцветяване – мултиплексна	
А Подготовка и предварителна обработка на образеца .....	4
II. Блокиране на антитела и първично оцветяване на антитела ....	
III. Откриване	
Отстраняване на неизправности.....	8
Информация за контакт .....	9

## ВЪВЕДЕНИЕ

**MULTIVIEW® PLUS** (mouse-HRP/rabbit-AP) IHC Kit (Brown/Green) осигурява реактиви и материали за ултрачувствително мултиплексно откриване на миши и заешки антитела, използвани при оцветяване с имунохистохимия (IHC). Комплектът е небиотинова система за откриване, подходяща за идентифициране на антигени в тъкани, вградени във формалин, вградени в парафин. Този комплект може да се използва и с намазки от кръв, цитосмивки и клетъчни препарати.

МУЛТИВЮ Plus (мишка-HRP/rabbit-AP) IHC Kit (кафяво/зелено) съдържа както MULTIVIEW PLUS HRP (Анти-миши) Реагент, така и MULTIVIEW® PlusAP (Анти-заешки) Реагент, които са разработени чрез директно белязване на анти-миши или анти-заешки имуноглобулини с ензими използващи собствена технология за етикетиране в готов за употреба формат. Това осигурява последователно и възпроизводимо имунооткриване на миши и заешки антитела срещу ядрени, цитоплазмени и мембранни антигени в различни видове тъкани и Клетки. Реагентът MULTIVIEW® PLUS HRP (Anti-Mouse) и реагентът MULTIVIEW® PLUS AP (Анти-заек) позволяват по-бързи процедури на оцветяване в сравнение с традиционните двуетапни методи, използващи биотин и авидин / стрептавидин конюгаци.

HIGHDEF DAB Chromogen на Enzo, HIGHDEF® Green AP хромоген и хематоксилин, съчетани с пероксидазата и блокерут на Антитела, включени в комплекта, осигуряват силен сигнал с минимален фон.

MULTIVIEW®PLUS (мишка-HRP/rabbit-AP) IHC Kit (Brown/Green) е подходяща за употреба с всички миши и заешки IgG антитела, както моноклонални, така и поликлонални. Реагентите от този комплект могат да се използват за мануално оцветяване или с автоматизирани системи за ИХХ.

## ДОСТАВЕНИ

Предоставени реагенти	опаковка
Реактив за извличане на антиген, pH 9 (10X)	100 мл
ISH/IHC пероксидазен блокер	22,5 мл
Блокер на антитела/разредител	45 мл
МУЛТИВЮ® PLUS HRP (Анти-мишка) Реагент	11.25 мл
МУЛТИВЮ® PLUS AP (Anti-заек) Реагент	11.25 мл
HIGHDEF® DAB хромоген	1 мл
HIGHDEF® DAB субстрат	22,5 мл
HIGHDEF® Зелен AP хромоген	2 мл
HIGHDEF® зелен AP субстрат	22,5 мл

Хематоксилин	22,5 мл
Празна смесителна бутилка	1 бутилка
ИНС промиващ буфер	2 опаковки

## СЪХРАНЕНИЕ

Съхранявайте всички компоненти на комплекта при 2-8°C. Да не се замразява. Хематоксилинът може да се съхранява при стайна температура далеч от директна ярка светлина.

## СТАБИЛНОСТ

Когато се използва и съхранява според указанията, комплектът е стабилен в продължение на 1 година от датата на получаване.

## ДОПЪЛНИТЕЛНИ МАТЕРИАЛИ СЕ ИЗИСКВАТ, НО НЕ СЕ

- ИНС PAP писалка (Продукт No. АДИ-950-233)
- Държач за слайдове
- Ксилен (или заместител на ксилена) за депарафиниране
- Ксилен заместител за изчистване преди монтиране (или Shandon Xylene Substitute, ThermoFisher Scientific Cat. No. 9990505 или Citrus Clearing Solvent, ThermoFisher Scientific. No 8301)
- 50%, 70%, 90% и 100% етанол ((Reagent Grade)
- Дестилирана или дейонизиранавода (дХ2О)
- Туин-20<sup>®</sup>
- Предметни стъкла и покривни, клипсове
- HIGHDEF<sup>®</sup> Mount (Продукт No. ADI-950-261) Инкубатор
- сушилня, настроена на  $\geq 60^{\circ}\text{C}$
- Тенджера под налягане, настроена на  $\geq 100^{\circ}\text{C}$
- Нагревателни блокове за стъклата Абсорбиращи
- кърпички
- Таймер
- Също така на разположение са: Реагент за извличане на антиген, pH 6 (10X) (Продукт No. ENZ- ACC112)
- Допълнителни ИНС измиващи буферни соли, ако е необходимо

## ПРЕДПАЗНИ МЕРКИ

1. **Само за изследователска употреба.** Да не се използва за *in vitro* диагностични цели.
2. Използвайте предпазно пипетно устройство за всички пипетиране. Никога не пипетирайте през устата.
3. Тълкуването на резултатите е отговорност единствено на потребителя.
4. Носете подходящо лично защитно облекло. Избягвайте контакт с дрехи и открита кожа. В случай на случайно излагане на кожата, незабавно изплакнете с вода. Консултирайте се с лекар, ако е необходимо.

## ПОДГОТОВКА НА РЕАГЕНТ

### 1X разтвор за извличане на антиген :

За да пригответе 100 ml 1X разтвор за извличане на антиген , добавете 10 ml реагент за извличане на антиген ( 10X ) към 90 ml дейонизирана вода. Разбъркайте добре и пазете от директна ярка светлина. За най-добри резултати използвайте незабавно.

**Забележка:** Наличен е и реагент за извличане на антиген, pH 6 (10X) (Продукт No. ENZ-ACC112).

### Буфер за измиване:

За да репликират един литър буфер за измиване , добавете 1 опаковка IXX буфер за измиване към 1 литър дейонизирана вода. Разбърква се добре и се добавят 500 µL Туин-20<sup>®</sup>. Съхранявайте буферите при 4°C.

### HIGHDEF<sup>®</sup> DAB хромоген/субстрат:

Този реактив трябва да се приготви малко преди употреба. При 1 ml HIGHDEF субстратен буфер се добавят 40 µL HIGHDEF<sup>®</sup> DAB хромоген. Разбъркайте добре и пазете от директна ярка светлина. На стайна температура този разтвор е стабилен за един ден. Когато се съхранява в хладилник и се предпазва от светлина, този разтвор е стабилен до седем дни.

### HIGHDEF<sup>®</sup> Green AP хромоген/субстрат:

Този реактив трябва да се приготви малко преди употреба. На 920 µL HIGHDEF Green AP Субстрат Реагент, добавете 80 µL HIGHDEF<sup>®</sup> Green AP хромоген, за да направите 1 ml разтвор. Разбъркайте добре и пазете от ярка светлина. При стайна температура този разтвор е стабилен до 6 часа. Когато се съхранява в хладилник и се предпазва от светлина, този разтвор е стабилен до 1 ден.

## ПРОТОКОЛ ЗА ОЦВЕТЯВАНЕ – МУЛТИПЛЕКС

### БЕЛЕЖКА:

(1) Не позволявайте на предметните стъкла да изсъхнат между стъпките по време на цялата процедура. Добавят се достатъчно количество реактиви към пробите по време на инкубационните стъпки и се покриват предметните стъкла, докато се инкубират, за да се предотврати изсъхването им.

(2) Ако се забележи слаб сигнал, увеличете времето за инкубация за първични антитела и реагентите MULTIVIEW PLUS HRP (Anti-Mouse) и MULTIVIEW<sup>®</sup> PLUS AP (анти-заек).

### А ПОДГОТОВКА И ПРЕДВАРИТЕЛНА ОБРАБОТКА НА ОБРАЗЕЦА

MULTIVIEW PLUS (мишка-HRP/rabbit-AP) IHC Kit (кафяво/зелено) може да се използва върху секции за Биопсия с фиксиран с формалин, парафин (FFPE)<sup>®</sup>. Може да се използва и върху фиксирани клетки. Не се изискват специални подготвителни материали за използване на системата върху фиксирани Клетки.

### Е БИОПСИЧНИ СЛАЙДОВЕ

**Бележка:** Парафин-вграден Биопсични проби трябва да бъдат депарафинизирани и третирани с реагент за извличане на антиген преди имунохистохимична процедура.

1. Прилагат се една до три FFPE секции (с дебелина 4-6 микрона) от всеки образец за биопсия върху зареден образец за предметно стъкло.

Сушете вертикално монтираните на тъкан предметни стъкла в продължение на най-малко 2 часа (до 18 часа) при 60-80°C, за да фиксирате предметните стъкла.

- 2 Съхранявайте фиксираните слайдове при стайна температура.

· Поставете тъканния образец, монтиран на предметни стъкла, в държач с плъзгачи.

**Забележка:** (1) Ако слайдовете ще се използва веднага след като секциите са фиксирани върху тях чрез нагряване, преминете към стъпка 4.

(2) Ако парафина върху предметните стъкла се е втвърдил при съхранение, преминете към стъпка 3.

3. Прехвърлете предметните стъкла в сушилня 55-60°C за 20 минути, за да се стопи парафина.
4. Образците се депатрофизират, като се накисват последователно в следните разтвори за посоченото време:

Номер на накисване	реагент	продължителност
1	Ксилен (или заместител на ксилена)	2 x 5 минути
2	100% етанол	2 x 3 минути
3	90% етанол	1 минута
4	70% етанол	1 минута
5	50% етанол	1 минута
6	Дейонизирана вода	1 минута

**Внимание:** Ксилолът се насища бързо с парафин. Подменяйте разтвора за всяка партида слайдове.

5. След окончателното наkisване избършете излишната течност около секцията върху стъкления слайд.
6. Извлекете антигена с 1X разтвор за извличане на антиген (вижте раздела ПОДГОТОВКА НА РЕАКТИВА) за 20 минути при 99°C.

**Забележка:** Методите за извличане на антиген могат да варират в зависимост от използваното антитяло. Потребителят трябва да опита различни Решения Пъти и температури, за да определи оптималния метод за избраното от него антитяло.

7. Измийте предметните стъкла с дН<sub>2</sub>O в продължение на 5 минути.
8. Избършете излишната течност около секцията върху стъкления слайд и обградете тъканната секция с PAP писалка. Изсушете за 10 секунди.
9. Всеки образец се инкубира в достатъчно количество IHC/ISH пероксидазен блок, за да се покрие тъканната секция (~150 µL) за 5 минути на стайна температура. Измийте предметните стъкла с буфер за измиване (вижте раздела ПОДГОТОВКА НА РЕАКТИВА) два пъти в продължение на 2 минути, като между всяко измиване се отстранява излишният буфер за измиване.

## II. БЛОКИРАНЕ НА АНТИТЕЛА И ОЦВЕТЯВАНЕ НА ПЪРВИЧНИ АНТИТЕЛА

**Забележка:** Ако е необходимо блокиране преди инкубация с първично антитяло, използвайте *Antibody Blocker/Diluent* на антителата, предоставен

1. Всеки образец се покрива с достатъчно блокер/разредител на антителата, за да покрие тъканната част (~150 µL) и се инкубира в продължение на 10 минути. Това ще предотврати неспецифичното свързване на реагентите MULTIVIEW PLUS HRP (Anti-Mouse) и MULTIVIEW<sup>®</sup> PLUS AP (анти-заек).
2. Измийте предметните стъкла два пъти в буфер за 2 минути. Потупайте излишния разтвор за измиване между измиванията.
3. Добавете достатъчно количество оптимална концентрация на първични Миши и заешки Антитела, за да покриете пробата и Инкубирайте в продължение на 20-30 минути при стайна температура.

**Забележка:** Обърнете се към препоръките на производителя на първични антители за оптимални условия на инкубация и разреждане. Разрежете първичното антитяло в блокера на антителата/разредителя (както е предвидено в комплекта, но може да се намери и отделно No. ENZ-ACC108-0100).

4. Измийте предметните стъкла в буфер за 5 минути. Потупайте излишния разтвор за измиване. Преминете към секцията IHC откриване.



### III. ИНС ОТКРИВАНЕ

**Забележка** Смесете равни обеми (използвайте ~ 75 µL от всеки реактив на слайд)

**MULTIVIEW PLUS** HRP (Anti-Mouse) и MULTIVIEW<sup>®</sup> Plus AP (Анти-заек) Реагенти в смесителна бутилка или епруветка Епендорф преди употреба. НЕ използвайте нормален серум от зайци или мишки като блокиращ Реагент.

1. Към всеки образец се добавя смес от MULTIVIEW PLUS HRP (Anti-Mouse) и MULTIVIEW<sup>®</sup> PLUS AP (Anti-Rabbit) реагент за покриване на тъканта (~150 µL). Инкубира се в продължение на 30 минути при стайна температура.
2. Измийте предметните стъкла два пъти в пресен буфер за 5 минути. Потупайте излишния разтвор за измиване между измиванията.

**Забележка: Първо разработете цвета за MULTIVIEW PLUS AP (Anti-Rabbit) с HIGHDEF Green AP Хромоген/субстрат и след това с MULTIVIEW PLUS HRP (Анти-мишка) с HIGHDEF<sup>®</sup> DAB хромоген/субстрат.**

3. Добавете HIGHDEF<sup>®</sup> Green AP Chromogen/Substrate (виж Раздел РЕАГЕНТ ПОДГОТОВКА), за да покриете тъканната секция (~ 150 µL) и оставете цвета да се развие за 10-15 минути при стайна температура.
4. Отстранете излишния хромоген. Предметните стъкла се измиват с дН<sub>2</sub>O в продължение на 2 минути. Попийте излишната дН<sub>2</sub>O.
5. Добавете DAB хромоген / субстрат (виж раздел ПОДГОТОВКА НА РЕАГЕНТА), за да покриете тъканната секция (~ 150 µL) и оставете цвета да се развие в продължение на 5 минути при стайна температура.
6. Отстранете излишния хромоген. Предметните стъкла се измиват с дН<sub>2</sub>O в продължение на 2 минути. Попийте излишната дН<sub>2</sub>O.

**[По избор]** Всеки образец се оцветява с хематоксилин (~ 150 µL) за 1-2 минути при стайна температура.

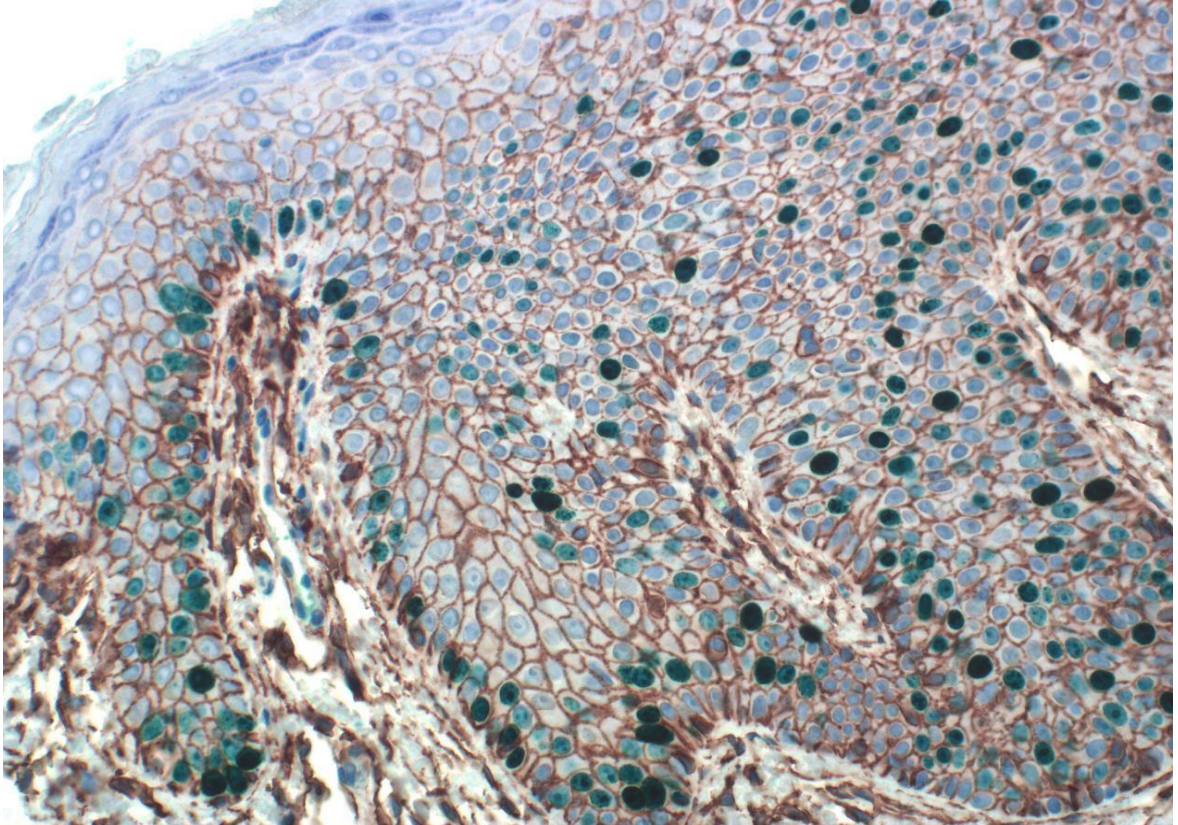
**Забележка:** Ако се очаква слабо ядрено оцветяване, инкубирайте с хематоксилин в продължение на 5 минути.

7. Попийте отработените контрастни оцветявания и изплакнете слайдовете с дН<sub>2</sub>O.
8. Използвайки вода като промиваща среда, вижте слайдовете с помощта на светлинен микроскоп.
9. Ако е необходимо дехидратирайте предметните стъкла в 70% алкохол за 1 минута, последвано от 100% алкохол за 1 минути. След това, почистете секциите в ксилен заместител за 1 минута и след това се промийте с помощта на хистологична промивна среда.

**ВАЖНО:** Използването на ксилен като разтворител за изчистване ще доведе до разсейване на сигнала. Не забравяйте вместо това да използвате алифатен въглеродород или заместител на ксилен на базата на D-лимонен. Вижте НЕОБХОДИМИ ДОПЪЛНИТЕЛНИ МАТЕРИАЛИ Страница 2)

(

Материали, налични в търговската мрежа заместители на ксилол.

**Мултиплекс ИС – мембранни и ядрени протеини**

. Миши анти-CD44 клон SFF-304 и миши анти-Ki-67 клон MIB-1 със заешки анти-миши Linker (Кат. No. ENZ-ACC116) са използвани с MULTIVIEW® PLUS (миша-HRP/rabbit-AP) Комплект (Прод. No. ENZ-KIT181) за извършване на мултиплексно имунохистохимично оцветяване с хематоксилин, използвано като контрапетно.

## ОТСТРАНЯВАНЕ

Проблеми	Причина	Решение
<b>Не е забелязан сигнал на нито един слайд</b>	Използван грешен реагент	Внимателно следвайте инструкциите, описани в това ръководство. Не замествайте реагентите на комплекта.
	Замърсяване с натриев	Използвайте буфери без натриев азид.
<b>Слаб сигнал</b>	Първичните концентрации на антитела могат да бъдат ниски.	Увеличете концентрацията на първичното антитяло и/или го инкубирайте по-дълго.
	Неефективно отстраняване на излишните разтвори за измиване	Внимателно потупвайте измиващите разтвори след всяко измиване. Избършете излишните измивания около образеца, ако е необходимо.
	Инкубациите с реактивите за откриване може да са твърде кратки.	Увеличете времето за инкубация.
	Парафин или цитонамазка покриват секцията	Когато се забележи парафин на участъци, излагайте предметните стъкла на 100% етанол за 5 минути и измийте с дН <sub>2</sub> O. Опитайте се да не влизате в контакт с тъканта, когато използвате цитонамазката
	Не се наблюдава зелен сигнал	Ксилолът се използва за измиване на предметни стъкла вместо заместител на ксилен
<b>Умерен фон</b>	Секциите се изсушават по време на процедурата.	Обработвайте 4-5 слайда наведнъж (при ръчна обработка). Покриват се предметните стъкла по време на инкубациите, за да се избегне бързото
	Неспецифично свързване на реактиви с тъкани	Увеличете времето за инкубация с блокиращ реагент.
	Първичното използвано антитяло е твърде	Допълнително разрежете първичното антитяло.
	Парафинът не се отстранява напълно.	Инкубира се още 5 минути в 100% етанол, последван от дХ <sub>2</sub> O или. Подменяйте по-често реактивите за обезмасляване.
<b>Висок фон</b>	Пързалките не се измиват правилно.	Използвайте само буфера за измиване, препоръчан в протокола.
	Инкубацията на субстрата е твърде дълга.	Съкратете времето за инкубация в HIGHDEF <sup>®</sup> DAB хромоген/субстрат.
	Концентрацията на антитела е твърде висока.	Разрежете първичното антитяло.
	Високо ниво на ендогенна пероксидаза.	Увеличете инкубацията на пероксидазния блок от 5 минути на 10 минути.
<b>Тъкан, падаща от слайд</b>	Извличането на антиген е твърде сурово.	Използвайте различен метод за извличане на антиген или намалете времето или температурата.
<b>Само кафяво оцветяване</b>	HRP е разработен първо	Първо развийте зелено (AP), след това развийте кафяв цвят (HRP).



# РЪКОВОДСТВО

## **GLOBAL HEADQUARTERS**

**Enzo Life Sciences Inc.  
10 Executive Boulevard  
Farmingdale, NY 11735  
Toll Free: 1.800.942.0430  
Phone: 631.694.7070  
Fax: 631.694.7501  
Info-usa@enzolifesciences.com**

## **EUROPE/ASIA**

**Enzo Life Sciences (ELS) AG  
Industriestrasse 17  
CH-4415 Lausen  
Switzerland  
Phone: +41/0 61 926 89 89  
Fax: +41/0 61 926 89 79  
Info-ch@enzolifesciences.com**

За местни дистрибутори и подробна информация за  
продукта посетете ни онлайн: