

<b>Prvá slovenská mozgová banka,</b> <b>Neuroimunologický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, 845 10 Bratislava</b>	
<b>Tkanivové zariadenie</b>	
Štandardný pracovný postup <b>HEMATOXYLÍN - EOSÍN FARBENIE</b> Kód: <b>SOP-M-002</b>	Strana: 1 / 6 Číslo vydania: Dátum vydania:

**Číslo výtlačku:.....**

**SOP-M-002**

## **HEMATOXYLÍN - EOSÍN FARBENIE**

	Meno a funkcia	Dátum	Podpis
<b>Vypracoval:</b>	<b>XXX</b> pracovník výskumu a vývoja		
<b>Schválil:</b>	<b>XXX</b> riaditeľ		

Číslo revízie	Dátum revízie	Súhrn zmien	Podpis QA

## OBSAH

<b>1. Úvod</b> .....	<b>3</b>
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
<b>2. Pufre a chemikálie použité v tejto procedúre:</b> .....	<b>4</b>
<b>3. Pracovný postup</b> .....	<b>5</b>
3.1 Vyhodnotenie výsledkov:.....	6
<b>4. Súvisiace dokumenty</b> .....	<b>6</b>
<b>5. Zoznam príloh</b> .....	<b>6</b>

<b>Prvá slovenská mozgová banka,</b> <b>Neuroimunologický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, 845 10 Bratislava</b>	
<b>Tkanivové zariadenie</b>	
Štandardný pracovný postup <b>HEMATOXYLÍN - EOSÍN FARBENIE</b> Kód: SOP-M-002	Strana: 3 / 6 Číslo vydania: Dátum vydania:

## 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. Potrebne 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

<b>Prvá slovenská mozgová banka,</b> <b>Neuroimunologický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, 845 10 Bratislava</b>	
<b>Tkanivové zariadenie</b>	
Štandardný pracovný postup <b>HEMATOXYLÍN - EOSÍN FARBENIE</b> Kód: <b>SOP-M-002</b>	Strana: 4 / 6 Číslo vydania: Dátum vydania:

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 - Uchovávajte 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.

### **1.7 Zodpovednosť**

XXX je zodpovedný 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 (marienfeld)

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 hematoxylín (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.

<b>Prvá slovenská mozgová banka,</b> <b>Neuroimunologický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, 845 10 Bratislava</b>	
<b>Tkanivové zariadenie</b>	
Štandardný pracovný postup <b>HEMATOXYLÍN - EOSÍN FARBENIE</b> Kód: <b>SOP-M-002</b>	Strana: 5 / 6 Číslo vydania: Dátum vydania:

*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 odstránia 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.

<b>Prvá slovenská mozgová banka,</b> <b>Neuroimunologický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, 845 10 Bratislava</b>	
<b>Tkanivové zariadenie</b>	
Štandardný pracovný postup <b>HEMATOXYLÍN - EOSÍN FARBENIE</b> Kód: <b>SOP-M-002</b>	Strana: 6 / 6 Číslo vydania: Dátum vydania:

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>
- F1-SOP-M-002- Protokol o výsledku

## 5. Zoznam príloh

1. F1-SOP-M-002 – protokol z histochemického farbenia

**Príloha č. 1 - F1-SOP-M-002 – protokol z histochemického farbenia**

<b>Prvá slovenská mozgová banka,          Neuroimunologický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, 845 10 Bratislava</b>	
<b>Tkanivové zariadenie</b>	
Formulár F1-SOP-M-002	Strana: 1 / 1 Vydanie: 1 Dátum vydania: 11.4.2018
<b>Protokol z histochemického farbenia</b>	

<b>PROTOKOL Z HISTOCHEMICKÉHO FARBENIA</b>	
<b>Dátum:</b>	
<b>Metóda:</b>	
<b>Metódu vykonal:</b>	

<b>Testované tkanivo:</b>							
<b>ID číslo pacienta:</b>							
<b>Testované oblasti:</b>							
<i>oblasť</i>	*	<i>oblasť</i>	*	<i>oblasť</i>	*	<i>oblasť</i>	*
1		5		9		13	
2		6		10		14	
3		7		11		15	
4		8		12		16	
*označ krížikom							

<b>Použité roztoky:</b>			
<b>Roztok</b>	*	<b>číslo šarže</b>	Poznámky:
70 % Etanol			
Mayersov hematoxyln			
Eosin- Phloxine B pracovný roztok			
Phloxine B roztok			
Eosin Y roztok			
*označ krížikom			

<b>Výsledky:</b>
<b>Poznámky:</b>
Doba vyvolávania signálu:

<b>Záver:</b>
<b>Schválil:</b>