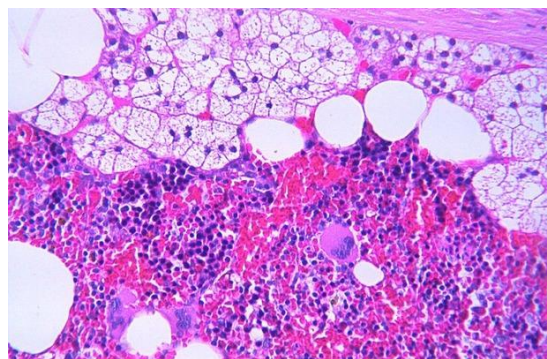
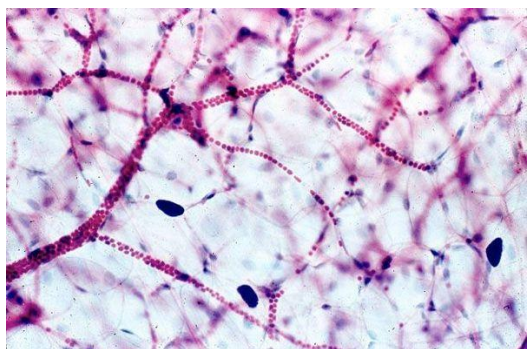
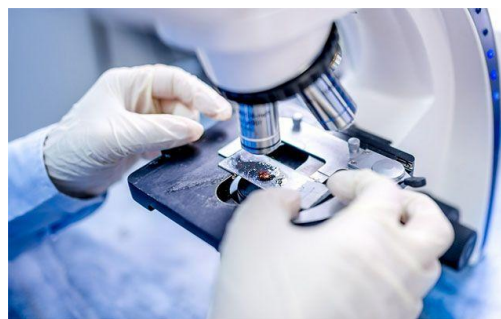
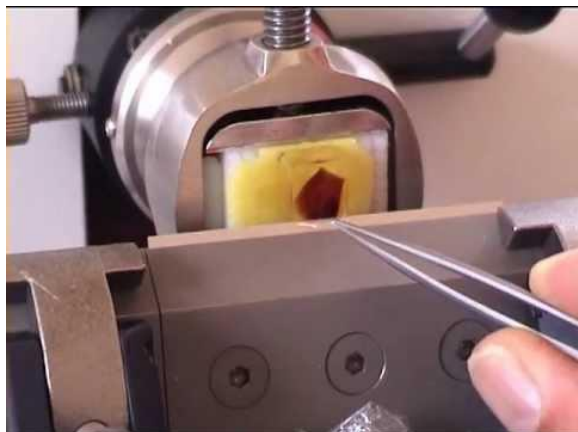


Technovit – Гистотехнология



**Полимеризационные системы
для гистологического применения**

Системы, разработанные компанией Heraeus Kulzer совместно с выдающимися учеными и институтами для заливки ткани в пластический материал для гистологического исследования, показывали себя на практике в течение десятилетий. Они успешно применялись в диагностических и научных целях в медицине, ветеринарии и ботанике. Они также успешно применялись при резке для промышленного применения и биоматериалов.

Системы удовлетворяют важные требования, например, заливку при низких температурах, техники получения тонких и полутонких срезов, а также оптимальные свойства деления и трения. Срезы могут легко растягиваться и под оптическим микроскопом окрашенные препараты показывают отличную морфологию.

Научные и экономические условия для гистологических исследований тканей значительно улучшены при помощи гистологической технологии Heraeus Kulzer

- Простая, рациональная обработка, так как все компоненты сопоставимы друг с другом.
- Благодаря специальным свойствам материалов, стандартные методы окрашивания, ферментная химия и иммуногистохимия, применяемые в гистологических лабораториях применяются, включая гибридизацию по месту.

Почему пластик?

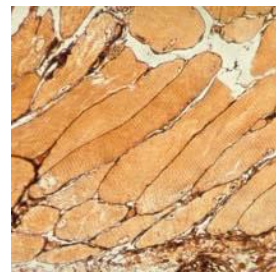
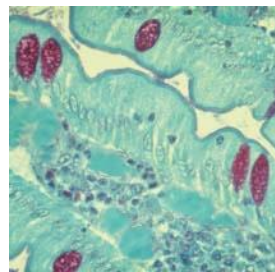
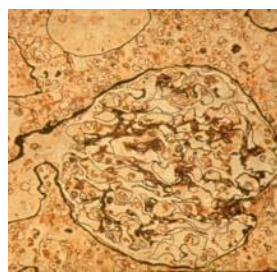
В отличие от всех прочих заливочных материалов, применяемых в оптической микроскопии в гистологической технологии, равномерные тонкие и полутонкие срезы проводятся после завершения заливки пластика. В ходе процесса морфологические детали остаются великолепными. Минерализованные и пористые структуры могут быть лучше определены в образцах без предварительной декальцинации, залитой в пластик. Минеральная матрица и хрящевидные и связочные ткани очень хорошо определены.

Результаты ферментных иммуногистохимических исследований и гибридизации по месту показывают более чувствительную и специфическую работу, потому что весь пластик Technovit затвердевает при низких т минусовых температурах ввиду специального состава полимеризационных систем.



Содержание:

	4	Technovit 7100 – Срезы для гистологического и промышленного применения
Полимеризационные системы	8	Technovit 8100 –Срезы только для иммуногистохимии
	11	Technovit 9100 – Срезы
TECHNOVIT Аксессуары	15	Гистоформы S,Q и N
	15	Заливочная форма для Technovit 9100
	16	Technovit 3040 – блокировка
	16	Гистоблок Trägerteil
	17	Technovit гистологическое лезвие
	17	Объектный держатель, ручной держатель образца
Инструкции по окраске и реагенты	19	Technovit 7100
	22	Technovit 9100



Technovit 7100

Срезы для гистологического и промышленного применения

Technovit 7100 является пластиковой заливочной системой на основе **heMA*** (2-гидроксиэтилметакрилат). Гидрофильная смола применяется в медицине, ботанике, зоологии и в промышленности для заливки тканей в целях дальнейшего проведения исследования с использованием оптического микроскопа. Срезы используются для гистологической окраски и ферментативной индикации.

Система Technovit 7100 служит для прозрачной полимеризации. Однородные тонкие срезы могут быть сделаны из блоков с ротационным микротомом. Нет необходимости, а также возможности извлечь пластик из блока и среза.

Свойства материала

Химическая полимеризация Technovit 7100 инициирована с использованием деривата барбитуровой кислоты во взаимодействии с хлор-ионами и перекисью бензоила. Каталитическая система не имеет каких-либо ароматических аминов по сравнению с традиционными системами.

Обзор преимуществ

- Несложная обработка
- Воспроизводимость и надежность заливки ввиду постоянного, документированного контроля качества индивидуальных компонентов
- Низкая температура полимеризации ввиду применения тефлоновых заливочных форм
- Равномерная обработка блоков, а значит равномерные и тончайшие срезы
- малоусадочные артефакты, а значит отличная морфология ткани
- Кроме того, также возможно традиционное окрашивание, ферментативная индикация
- Менее токсичная ввиду того, что катализатор сделан барбитуровой кислоты
- Полимеризация при комнатной температуре (20°C)
- Герметичная запайка не требуется в ходе затвердевания

➤ Декальцификация не нужна для гематологической биопсии подвздошного гребня.

Применение

Проводите подготовку системы Technovit 7100 согласно поэтапным инструкциям. Сначала разместите фиксированные и дегидрированные образцы в растворе предварительной инфильтрации, а затем в инфильтрационном растворе. Вакуумные интервалы и/или перемешивание в ходе индивидуальных этапов ускоряют заливочный процесс.

Образцы для промышленного применения размещаются прямо в растворе для инфильтрации или затвердевают без предварительной обработки.

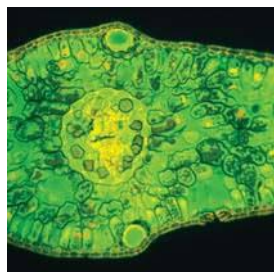
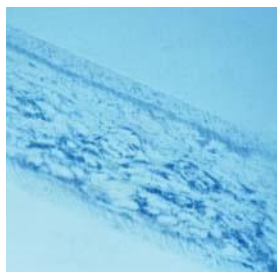
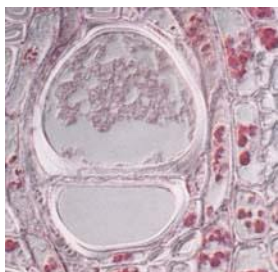
Полимеризация

Подготовьте полимеризационную смесь по инструкциям и затем заполните ей заливочные полости. Сразу же разместите там пропитанные образцы. Полимеризация осуществляется при комнатной температуре.

Температура полимеризации в:

- гистформа S 32 °C – 38 °C
- гистоформа Q 40 °C – 45 °C

Сделайте блоки после отверждения (приб. 1½ ч.) при помощи Histobloc® и Technovit 3040 (см. также с. 15).



Technovit 7100
Применяется во многих
областях. Применение:
органические препараты,
пластик, пленки и бумага,
волокна и многое другое...

Прочие области применения

Система Technovit 7100 является осознанно выбранным материалом для чего-либо, что имеет отношение к образованию срезов из залитого материала. Система Technovit 7100, которая изначально предназначена для гистологии, показывала свою состоятельность в течение многих лет в индустрии благодаря своей универсальности.

Например, сферы применения включают заливку, а срезы, сделанные из:

- пластика
- пленки
- бумаги
- текстиля
- органических препаратов
- волокон



Свойства материалов

В случаях срезания и проверки образцов материалов при помощи оптического микроскопа с заливкой Technovit 7100 это упрощает образование срезов в зоне.

Образцы могут экономично срезаться гистологическим лезвием Technovit, сменным лезвием, координируемым системой с сохранением высокого качества.

Указанные типы препаратов только слегка отличаются от медицинских образцов.

Во многих случаях нет необходимости размещать их в растворе, т.к. это относится к пленке и пластику.

Инструкции для заливки немедицинских образцов ткани

Инфильтрация в растворе препарата с вакуумом рекомендуется при применении бумаги и текстиля. Биологические препараты медицинским образом обработаны (зафиксированы, дегидрированы и следовательно инфильтрованы).

Материалы, которые менее чувствительны к температуре, могут также быть залиты в качестве крупных образцов (Гистоформа S и Q или аналог).

No.	Обозначение	Упаковка
64709003	Technovit 7100 комбиупаковка	1 x 500 мл осн.раствор 5 x 1г отвердитель 1 1 x 40 мл отвердитель 2
	Цвет	Прозрачный
	Плотность = спец. вес г/см ³	1,07
	Рефракционный индекс Мономер	1,4540 1,5050
	Температура хранения	макс. 25 °C
	Срок службы	2 года

Подборная инструкция

В зависимости от качества промышленных образцов, например, непористые материалы такие как пленка и т.д, этапы 1-4 можно опустить (фиксация для инфильтрации) Полимеризация может начинаться напрямую.

Фиксация

Зафиксируйте и повторно обработайте куски ткани при необходимости.

Дегидратация

Дегидратация осуществляется в этаноле или ацетоне; постепенная дегидратация возможна при помощи НЕМА в буфере (+4°C). Альтернативный вакуум и смешивание полезны для более лучшего проникновения в ходе заливки. Переходные связующие звенья не нужны до проведения предварительной инфильтрации.

Предварительная инфильтрация

Приготовьте окончательную концентрацию дегидратации равными частями с основным раствором Technovit 7100.

Приб. 2 часа при комнатной температуре (20°C), например, 50 мл 96% этанола: 50 мл основного раствора Technovit 7100.

Инфильтрация

Приготовление инфильтрационного раствора:

- Technovit 7100 осн. раствор 100 мл.
- + Technovit 7100 отвердитель 1 1 г (1 пакет).

Растворите в чистом (без очищающих средств) стеклянном или полиэтиленовом контейнере в течение приб. 10 мин. После запайки, инфильтрационный раствор стабилен в течение максимум четырех недель при 4°C. Проводите инфильтрацию образцов в течение до 24 часов (комнатная температура) или дольше при 4°C в достаточно крупном объеме раствора для инфильтрации в зависимости от размера образцов. Непродолжительный вакуум (струйный насос) и смешивание полезны.

Полимеризация

Приготовление раствора для полимеризации:

- смешивайте инфильтрационную среду (неиспользованную) 15 мл
- + Technovit 7100 отвердитель 2 1 мл в течение приб. 3–5 мин.

Используйте обычную пипетку и одноразовый

контейнер!

Заполните углубление для заливки гистотомы наполовину полимеризационным раствором (одноразовой пипеткой), разместите там подготовленный образец и заполните форму (предупреждение: только углубление, а не весь отсек). Полимеризация осуществляется либо полностью (2 ч.) при комнатной температуре, либо 1 час при комнатной температуре и следовательно, 1 час при 37°C в термобаке.

Слегка вязкая поверхность (тормозящий слой) удаляется при помощи одноразовой безворсовой ткани.

Слишком высокая влажность повышает сопротивляемость тормозящего слоя!

Максимальная полимеризационная температурная зависимость от окружающей температуры.

Окруж. Температура		Гистотомы Q
Комн. темп. приб. 20 °C	32	37
Холодильник +4	16	23
Холодильник 0 °C	10	18

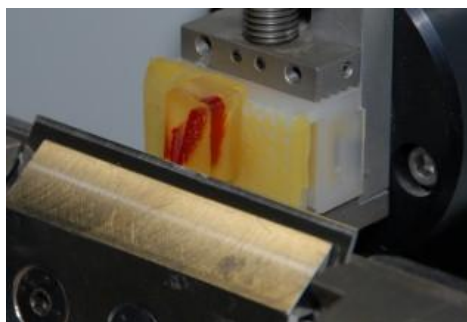
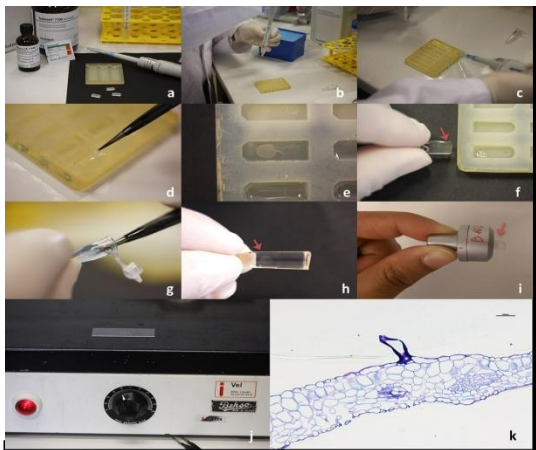
Блокировка и архивирование

Образец блокируется при помощи Histobloc® и Technovit® 3040 таким образом, чтобы их можно было удалить из тефлоновой формы (см. стр. 15).

Обработка

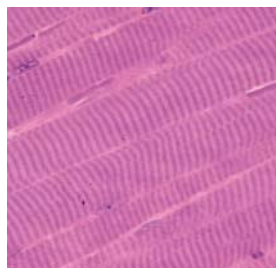
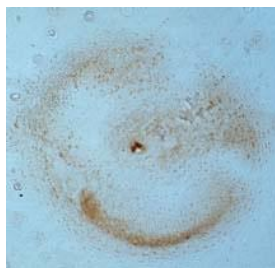
Плотно зажмите блоки в устройствах totum cam на ротационном микротоме. Используйте Technovit Histoblade (вместе с держателем лезвия Heraeus) или нож из твердого металла (учтите угол ножа) для резки. Насухо вытрите срез щипцами и положите в ванночку (водяной удалитель)

Положите на чистый лакированный держатель без жира. Дайте высохнуть до окрашивания в течение как минимум 15 минут или в течение ночи при 60°C. Поместите непластифицированные участки прямо в раствор для окраски. Участок 1мк должен быть окрашен длиннее, чем 5мк участок для получения желаемой интенсивности окрашивания.



Обзор метода приготовления раствора

Раствор	Этанол	Осн. раствор Technovit 7100	Отвердитель 1 Technovit 7100	Infі раств.	Отвердитель 2 Techovit 7100	Примене ние темп.
Пред. инфильтрация	Напр. 50 мл	Напр. 50 мл				Комнатная температура
Инфильтрация		100 мл	1 г (1 пакет)			Комнатная температура/ 4 °C
Полимеризация				15 мл 30 мл	1 мл 1,5 мл	Комнатная температура / 37 °C Комнатная температура /37°C



Участки, обработанные Technovit 8100 предназначены для большего применения, нежели обычное гистологическое окрашивание; они также предназначены для ферментной химии и ИГХ.

Technovit 8100

Участки для иммуногистохимии

Technovit 8100 является системой заливки пластика, основанной на **heMA** для проведения исследований под оптическим микроскопом. Она подходит для заливки всех тканей в медицине, зоологии и ботанике. Участки декальцифицированной или кратко декальцифицированной биопсии подвздошного гребня и вживленные биоматериалы предназначены для большего, чем просто гистологическая окраска; они также предназначены для ферментной химии и ИГХ.

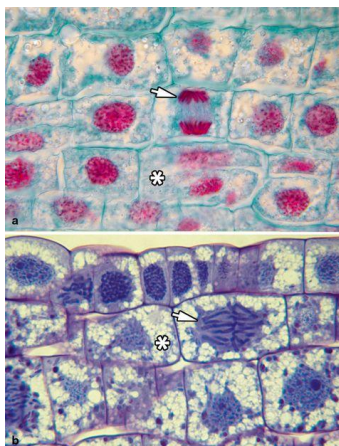
Свойства материала

Technovit 8100 является сочетанием смягчителя практически без запаха и гидрофильного пластика. Система Technovit 8100 была специально разработана для холодной полимеризации (+4°C).

В процессе отверждения форма для заливки должна быть герметично запаяна, потому что полимеризационная система является чувствительной к кислороду.

Обзор преимуществ

- Воспроизводимость и надежность заливки ввиду постоянного, документированного контроля качества индивидуальных компонентов
- Низкая температура полимеризации 10°C до 0°C ввиду особой каталитической системы и тефлоновых форм
- Равномерное отверждение блока, а значит равномерные и тончайшие срезы
- Малоусадочные артефакты, а значит отличная морфология ткани
- Обычное окрашивание, ферментативная индикация и возможна ИГХ
- Гематологическую биопсию подвздошного гребня можно не декальцифицировать
- Малая токсичность ввиду особой комбинации смягчителя и каталитической системы



Применение

Приготовьте Technovit 8100 согласно поэтапным инструкциям. Разместите фиксированные и дегидрированные образцы в растворе для инфильтрации. Низкая температура и смешение образцов являются полезными в ходе всего процесса заливки.

Полимеризация

Приготовьте полимеризационную смесь согласно инструкциям и затем заполните заливочные углубления. Поместите туда образцы для инфильтрации. Герметично закройте указанные углубления пленкой. Наложите предварительно охлажденную гелиевую пластину или тонкий слой льда при 4°C для затвердевания.

Пленка снимается после завершения полимеризации и блокируется при помощи Histobloc® и Technovit® 3040.

Невозможно извлечь пластик до окраски или реакции.

Данные о продукции

№.	Обозначение	Кол-во
64709012	Technovit 8100 Комбиупаковка	1 x 500 мл осн. раствор 5 x 0,6 г отвердитель 1 1 x 30 г отверд. 2

Цвет	Прозрачный
Плотность = спец. вес г/см ³ (DIN 53479)	1,08
Рефракционный индекс	
Мономер	1,4485
Полимер	1,4990
Температура хранения	макс. 25 °C
Срок службы	2 года

Ниже приведенные инструкции для фиксации и дегидрации не являются требуемыми в обязательном порядке. Система Technovit может также быть инфильтрована и полимеризована после прочей предварительной обработки.

Герметичное стекло или одноразовые контейнеры PE (приб. 20 мл) должны использоваться в ходе всего процесса!

Предупреждение:

Образцы должны постоянно перемешиваться в ходе фиксации, дегидрации и инфильтрации!

Фиксация

В целях достижения оптимальных иммуногистохимических результатов, рекомендуется работать при 4°C на протяжении всего процесса заливки и стремиться к непродолжительному времени фиксации. Зафиксируйте мельчайшие части ткани (1мм толщины) в 2% параформальдегиде в фосфатном буфере pH 7,4 при 4°C в течение 3-4 часов. Следовательно, перерабатывать в течение 12 часов (за ночь) в фосфатном буфере pH 7,4 при помощи дополнительной 6,8% сахарозы при 4°C.

Дегидрация

Дегидрируйте ткань в холодном ацетоне 100% в течение минимум одного часа при 4°C. Меняйте как можно чаще в первые минуты до тех пор, пока ацетон остается чистым.



Переместите образец прямо из ацетона в предварительно охлажденный инфильтрационный раствор. Образцы остаются там в течение 6-10 часов при 4°C.

Полимеризация

Приготовление раствора для полимеризации:

- инфильтрационный раствор, 4 °C 15 мл
- + Technovit 8100 отвердитель 2, охлажден 0,5 мл

Измерьте при помощи стандартных пипеточных средств и хорошо перемешайте в PE или стеклянном контейнере. Затем, тщательно перемешивайте инфильтрованный образец в герметичном контейнере в течение приб. пяти минут.

Цвет раствора для полимеризации изменяется сначала на желто-зеленый, но после затвердевания он становится бесцветным.

Полностью заполните углубления гистотомы при помощи одноразовой пипетки, поместите туда ткань и немедленно закрыть прозрачной пленкой PE. Множество пленок могут применяться для герметизации полости. Не нажимайте на пузырьки; лучше применяйте большее количество раствора для полимеризации и добавьте новую пленку. В ходе полимеризации (минимум 3 часа) форма для заливки должна быть помещена на охлаждающую пластину или тонкую ледяную пластину при 4°C. Не позволяйте форме или образцам контактировать с влагой.

Раствор	Этанол	Осн. раствор Technovit 8100	Отвердитель 1 Technovit 8100	Раствор для инфилтрации	Отвердитель 2 Techovit 8100	Применение темп.
Инфильтрация		100 мл	0,6 (1 пакет)			4 °C
Полимеризация				15 мл	0,5 мл	4 °C

Гистоформа Q

Материал	Комн. темп.	Холод-к	Холод-к 0 °C
Technovit 8100 30:1	—	69	48
Technovit 8100 35:1	—	52	42
Technovit 8100 40:1	—	50	41

Гистоформа S

Материал	Комн. Темп.	Холод-к	Холод-к 0 °C
Technovit 8100 30:1	69	21	12
Technovit 8100 35:1	67	19	11
Technovit 8100 40:1	65	—	—

Блокирование и архивирование

Снимите пленку пинцетом сразу после завершения отверждения.

Образцы блокированы Histobloc® и Technovit® 3040 таким образом, что их можно вытащить из тефлоновой формы (см. стр. 15). Сохраняйте блоки, которые сразу же не требуются (для иммуногистохимии) в холодной температуре в пластиковых пакетах или аналогах.

Обработка

Любой может добиться наилучших результатов резки при помощи ротационного микротомы, при помощи Technovit Histoblade во взаимодействии с ножевым держателем Heraeus или ножом из твердого металла (алмазный стеклорез). Плотнo прижмите блоки в системе totum cum на микротоме. Сухо вытрите срезы пинцетом и положите в ванночку (Сушилка воды). Положите прямо на лакированный держатель и позвольте высохнуть в течение 2 часов или более при 37°C. Сухие участки, которые не требуется использовать немедленно (для ИГХ) при комнатной температуре сохраняйте в течение максимум пяти дней при 4°C.

Покрывание держателя

Например, погрузите объектный держатель в раствор 0,5% альциановый голубой (8GXL Sigma) при 65°C на 15 минут или нанесите на держатель 0,1% поли-L-лизин (Sigma). Все обычные покрытые держатели могут использоваться.

Углубления должны сохнуть в течение минимум двух часов при 37°C. Поместите непластифицированные участки прямо в раствор для окраски или начните с предварительной ферментативной обработки.

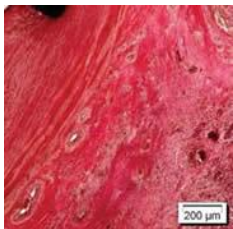
Пример

- Ферментативная предварительная обработка: Выдерживайте участки в течение 5-10 минут в 0,01% трипсине с 0,1% CaCl (хлорид кальция) pH 7,8
- Промойте несколько раз в фосфатном буфере (PBS) в течение пяти минут
- Выдерживайте в течение двух часов при 37°C при помощи первичного антитела, замените много раз
- Блокируйте эндогенную пероксидазу 0,06% пероксидом водорода в фосфатном буфере (PBS) (30 минут при комнатной температуре)
- Промойте много раз в фосфатном буфере (PBS) в течение пяти минут
- Выдерживайте со вторым антителом в течение 30 минут при комнатной температуре
- Промойте много раз в фосфатном буфере (PBS) в течение пяти минут
- Диаминобензидин (DAB) касает участков криостата
- 10-15 секунд контрастного окрашивания гематоксилином
- Синий в течение трех минут под проточной водой
- Накройте глицериновым желатином

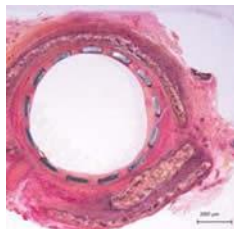
Определение иммуно факторов возможно при помощи AP, RAAP, APAAP, ABC, авидин-биоти́на, стрептавидина и иммунофлюоресцентных методов.

Применение увлажнителя, например, твина в буфере для полоскания не рекомендуется. Пероксидаза должна быть растворена в буфере.

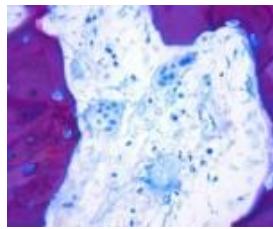
Ввиду постоянно меняющегося диапазона новой продукции для гистохимии и иммуногистохимии, постоянно рекомендуется следовать соответствующим производственным инструкциям.



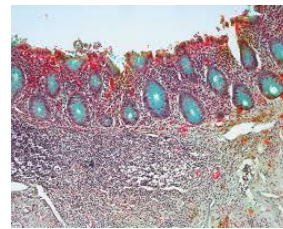
Участок стента
Elastica Van Gieson



Стент
Elastica Van Gieson



Полиядерные
гигантоциты;
основная голубая
окраска



Приложение для
пентахромной
окраски по Мовату

Technovit 9100

Участки

Technovit 9100 является пластиковой заливочной системой на основе ММА (метилметакрилат). Technovit 9100 применяется в медицине, ботанике и зоологии.

Technovit 9100 был специально разработан для заливки минерализованных тканей наряду с мягкими тканями с расширенным спектром исследования в оптической микроскопии. Непластицированные участки подходят для гистологического обзорного окрашивания, ферментативной химии и иммуногистологических исследований, включая гибридизацию по месту.

Тонкие участки для иммуногистологии могут быть налипаты на держатели для стеклянных изделий и не пластицироваться.

Область применения

- Техника крепкой резки для тонких слоев
Примеры: биопсия подвздошного гребня, более мелкие, пористые и компактные костные тканевые образцы.
- Техника деления тонких участков (деление в технологии точечного контакта)
- Примеры: зубные/челюстные зоны с и без имплантов, эндопротезы без цемента с стержневыми костями.
- Комбинированный разделятельно-тонкий срез и техника резки (целевая подготовка)
- Примеры: пограничный слой и экологическая оценка для металлических имплант и бесцементных эндопротезов.

Ткани, которые не могут быть срезаны, являются челюстными углублениями для зубов с пломбировочным материалом, коронками и мостами, толстыми кортикалисами.

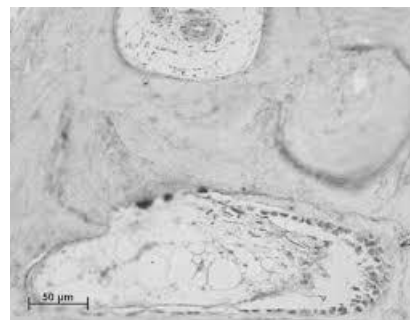
Челюстью с имплантами (металлическими или керамическими) или трубчатыми костями или крошащимися, гиперминерализованными костями.

Свойства материалов

Полимеризация гидрофобного Technovit 9100 происходит за счет исключения кислорода, используя каталитическую систему из пероксида и амина. Дополнительные компоненты, например, РММА порошок и регулятор допускают проведение регулируемой полимеризации в холодных условиях (в диапазоне -2 до -20°C, в зависимости от объема), которые гарантируют полное рассеивание полимеризационного тепла.

Визуальные преимущества системы

- Полимеризация ниже нуля
- Воспроизводимость результатов заливки и надежность ввиду постоянного, документированного контроля качества
- Равномерное отверждение блоков
- Блок РММА остается прозрачным
- Более лучшие результаты с учетом резки и окраски, потому что Technovit 9100 включает гидрофильные вещества
- Предназначен для тонких срезов и техник пиления и резки
- Ферментная гистология и иммуногистология наряду с возможной гибридизацией по месту (срезы)



Компоненты

Technovit 9100 основной раствор -компонент (1)

Technovit 9100 основной раствор состоит из стабилизированного метилметакрилата. Гидрофилия улучшается через добавление подходящего гидролизного средства.

Technovit 9100 основной раствор используется при стабильных и нестабильных условиях.

Technovit 9100 PMMA порошок - компонент (2)

PMMA порошок используется для гарантирования видимого уменьшения полимеризационной усадки, уменьшения выделяемого полимеризационного тепла и проведения более лучшего полимеризационного процесса.

Technovit 9100 отвердитель 1 - компонент(3)

Порошок для затвердения является пероксидным веществом, которое запускает полимеризацию при помощи отвердителя 2

Technovit 9100 отвердитель 2 - компонент (4) Жидкость для затвердения 2 действует как катализатор для отвердителя 1 для упрощения целевой полимеризации даже при низких температурах [$< 0^{\circ}\text{C}$].

Technovit 9100 регулятор - компонент(5)

Он состоит из реактивного органического вещества, упрощающего регулируемую полимеризацию при помощи контроля резких понижений температуры даже для больших объемов полимеризации.

Применение

Фиксация – предварительная обработка ткани

Фиксация длится от 12 до 24 часов при различных фиксационных решениях в зависимости от размера ткани и определения антигена/фермента для определения. Необходимо избегать чрезмерной фиксации.

Нижеприведенные методы фиксации возможны для определения антигенов/ферментов:

- 4% нейтрального раствора буферного формалина (0,1 М фосфата или 0,02 М фосфатного буфера для биопсии подвздошного гребня)
- 10% буферного раствора формалина (0,1 М фосфатного буфера)
- Фиксационные раствор по Шефферу (формалин/спирт)
- 1,4% раствора параформальдегида, холодного (+4 до +8°C) в течение 24 - 28 часов (определение чувствительных ферментов, например, щелочной фосфатазы, антигенов, чувствительных к фиксации).

Дегидратация, переходная среда и погружение (предварительная инфильтрация 1-3, инфильтрация).

Обработка может только проводиться в Ре или стеклянных контейнерах!

Арт.	Наимен.	Объем
64715444	Technovit 9100 комбиупаковка	1 x 1000 мл осн. Раст-р 1 x 120 g PMMA порошок 8 x 1 g отвердитель 1 1 x 10 ml отвердитель 2 1 x 5 мл регулятор
66006735	Technovit 9100 осн.	5000 мл
66010251	Technovit 9100 PMMA	1000 г
64709022	Technovit 9100	100 x 1 г
66039185	Technovit 9100	9 x 10 мл
66039184	Technovit 9100	12 x 5 мл



Дегидратация осуществляется в батарее спиртов восходящей концентрации (машина для дегидратации) при комнатной температуре. Углубления состояли из белых бисерных полимеров, которые негативно влияют на резку и качество формы среза в недостаточно дегидрированной ткани. Ксилол применяется как промежуточное звено.

Погружение (предварительная инфильтрация 1-3, инфильтрация) происходит в 3 этапа (в дегидратационной машине вплоть до предварительной инфильтрации 2). Определенное время и минимальное время основаны на маленьких, губчатых и кортикальных костных тканевых образцах и биопсии подвздошного гребня (время и объем должны быть определены для более крупных образцов ткани).

Дегидратация, промежуточное звено и пред. инфильтрация

Этап	Раствор	Концентрация	время / температур
Дегидратация 1	Этанол	70 %	> 1 ч / RT
Дегидратация 2	Этанол	80 %	> 1 ч / RT
Дегидратация 3	Этанол	96 %	> 1 ч / RT
Дегидратация 4	Этанол	96 %	> 1 ч / RT
Дегидратация 5	Этанол	abs.	> 1 ч / RT
Дегидратация 6	Этанол	abs	> 1 ч / RT
Дегидратация 7	Этанол	abs	> 1 ч / RT
Промеж. звено 1	Ксилол		> 1 ч / RT
Промеж. звено 2	Ксилол		> 1 ч / RT
Пред. инфильтрация 1	Ксилол / Technovit 9100	1 + 1	> 1 ч / RT
Пред. инфильтрация	Technovit 9100 осн.		> 1 h / RT
Пред. инфильтрация	Technovit 9100		> 1 ч / 4 °C
Инфильтрация (Холодильник)	Technovit (дестаб.) + отвердитель РММА порошок		> 1 ч / 4 °C спустя 5 дней, Заменить раств.

Предупреждение:

Обычный РММА гранулят также может применяться для очень больших образцов (эндопротезов). Объем необходимого полимеризационного раствора таким образом уменьшается.

Соотношение компонентов

Компонент No.	1	2	3	4	5		
Обозначение	Основной раствор	РММА порошок	Отвердитель 1	Отвердитель 2	Полимериз-регулятор	Температура обработки	Срок хранения
Пре-инфильтрация 3	200 мл		1 г 1 г / 2 г*			Комн. темп.	1/2 года при – 20 °C
Инфильтрация	ad 250 мл	20 г				4 °C	1/2 года при – 20 °C
Осн. раствор А	ad 500 мл	80 г	3 г / 4 г*			4 °C	1/2 года при – 20 °C
Осн. раствор В	ad 50 м			4 мл	2 мл	4 °C	1/2 года при – 20 °C

Дестабилизация основного раствора – обработка компонентов

Основной раствор Technovit 9100 применяется в стабилизированной и дестабилизированной форме. Применение дестабилизированного основного раствора гарантирует, что результаты для всех иммуногистохимических исследований аналогичны результатам парафиновой гистологии.

Заполните хроматографическую колонку приб. 50гр Al₂O₃ (активный, алкалин 90) и медленно пропустите основной раствор Technovit 9100 (материал № 1) через нее.

Заполненная колонка порошком Al₂O₃ способна дестабилизировать 3-4 литра основного раствора. Дестабилизированный раствор заливается в плотно закрывающиеся бутылки из коричневого стекла и храниться при +4°C для непрерывности процесса (макс. 5 дней) или храниться в аликвотах при -15°C до -20°C. Дестабилизированный основной раствор может взаимодействовать с предварительной инфильтрацией 3. При работе с дестабилизированным основным раствором ММА, более малое количество пероксида используется для раствора и основного раствора.

Приготовление растворов

➤ Рабочий раствор

Проведите растворы для предварительной инфильтрации, инфильтрации и основные растворы по точным инструкциям для Technovit 9100. Учитывайте температуры хранения!

➤ Полимеризационный раствор.

Охлажденные основные растворы А и В должны быть смешаны сразу же до использования в пропорциях 9 частей (об/об) основного раствора А (мерный цилиндр) и 1 часть основного раствора В (пипетка) в химическом стакане с использованием стеклянной мешалки.

Толкование „ad“: В ходе подготовки растворов из твердых веществ, конечный объем определяется только один раз. Все вещества растворяются. Рекомендуется применять мерные колбы.

* При использовании стабилизированного Technovit 9100 NEW нужно применять больший объем отвердителя 1.

Полимеризация

Полимеризационная смесь заливается в заранее охлажденную заливочную форму. Поместите инфильтрационную ткань в форму, залейте полимеризационной смесью до верха и затем вытащите ее. Удаление происходит либо в предварительно охлажденном осушителе при 4°C (легкий вакуум, например, струйный или вакуумный насос при 200 мбар), либо в испарителе при помощи подключенного с внешней стороны вакуумного насоса в течение приб. 10 минут. Герметично закройте форму!

Полимеризация осуществляется при температуре в диапазоне от -2°C до -15°C.

Например:

Форма для заливки 25 мм (10 мл) и секционная заливка:

-2°C - 4°C в течение приб. 24 часов.

Полимеризация проводится в течение приблизительно 24 часов. Время полимеризации зависит от объема для полимеризации и температуры. Чем больше объем заливочной формы, тем меньшей должна быть температура! Таким образом, более крупные образцы должны затвердевать при более низких температурах. В ходе процесса учитывайте холодопроизводительность используемого взрывозащищенного холодильного устройства (испаритель в холодильнике, морозилка, стена фризера) например, для парафиновых блоков с зажимом крышки.

Воспроизводимые результаты для различных образцов достигаются в морозилке при различных температурах от - 2°C до -25°C с учетом постоянной температуры +/- 0.5°C. Не открывайте контейнеры в ходе полимеризации!

Блокировка и архивирование

После того, как температура образцов достигнет комнатной температуры после отверждения, используйте гистоблок N для блокирования при помощи Histobloc® и Technovit® 3040 (см. стр. 15). Сперва ослабьте болты и снимите крышку и пленку. Блок плотно зажат в стандартном зажиме на ротационном микротоме для срезов тяжелой резки.

При применении круглых гистозаливочных форм крышка и дно снимаются, а образец протаскивается. Он может затем быть размещен прямо в круглом держателе образца на ротационном микротоме для срезов тяжелой резки без блокировки.

Обработка полимеров

В зависимости от задач, полимеры обрабатываются с использованием ленточной пилы или отделения тонких секций

предназначенными для резки твердых образцов.

➤ Аналогичный процесс применяется к полутонким срезам с применением стеклянных и алмазных ножей. Сначала блоки подрезаются.

➤ Используйте 16см ножи из твердого металла с секцией D.

➤ Используйте 30% этанола, так называемая смазочно-охлаждающая жидкость, для охлаждения полимеризованных блоков Technovit 9100.

➤ Разместите срезы на лакированных держателях, вытяните при помощи 50% этанола, так называемого смазочно-охлаждающей жидкости и накройте PBX пленкой.

➤ Удалите избыток жидкости при помощи бумажного фильтра, держателей объекта типа стек и высушите под давлением (секционный пресс) на ночь при +50°C. Только откройте пресс после охлаждения. Тщательно удалите всю пленку из держателя для холодных объектов.

Депластизация секций

Ксилол	2 – 3 x 20 мин.	Комнатная температура
2-метоксиэтил ацетат	1 x 20 мин.	Комнатная температура
Ацетон высокочистый	2 x 5 мин.	Комнатная температура
Ацетон высокочистый	2 x 2 мин.	Комнатная температура
Дист. вода		
Альтернатива: 2-метоксиэтил ацетат	3 x 20 мин.	Комнатная температура
Снижение спирта		

3. Техника деления тонких секций

Деление при помощи технологии точечного контакта и смазка путем поверхностного контакта или линейного контакта при помощи надлежащих устройств.

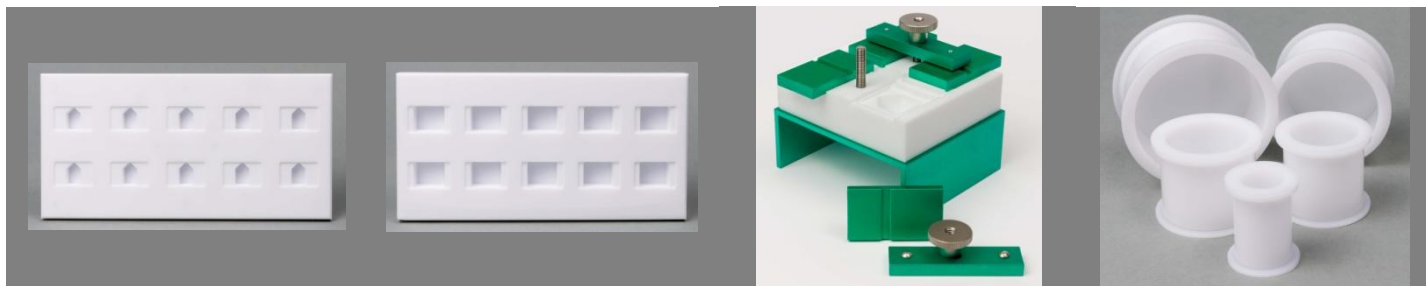
Технические данные

Цвет	Прозрачный
Плотность = спец. вес г/см ³ (DIN 53479)	1,07
Рефракционный индекс	
Мономер	1,4175
Полимер	1,4720
Температура хранения	макс. 25 °C

Рекомендуемое лабораторное оборудование для применения системы Technovit 9100

- Хроматографическая колонка.
- AL2 O3 (активный, щелочной, 90).
- Регулируемый холодильник.
- Стеклянный осушитель.
- Вакуумный насос.
- Магнитная мешалка.

- Проведение срезов микротомом



Аксессуары для гистологии Technovit

Гистоформы

Специальные заливочные формы, сделанные из тефлона с дном из нержавеющей стали для рассеивания тепла были разработаны для сохранения температуры при низких диапазонах в ходе полимеризации. Более того, особый профиль заливочных форм предназначен для заливки, что легко использовать и смазывать.

Обзор преимуществ:

- Материал для заливки- сохранение объема.
- Легок при нарезке форм (S + N).
- Долговечность.
- Легко удалять заливку благодаря конической форме и тфлону.
- Отличное температурное рассеивание посредством дна из нержавеющей стали.
- Точное и легкое крепление элементов опоры гистоблока ввиду особого отверстия.

Заливочная форма для Technovit 9100

Полиэтиленовые заливочные формы 25 мм „гнездо“ гнездо для круглого держателя образцов на ротационном микротоме. Дополнительные размеры: 15 - 30 - 40 - 50 мм (только цилиндр).

Применение:

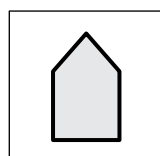
1. Снимите дно формы, соедините гнездо и форму вместе.

2. Заполните гнездо.

3. Положите образец в гнездо.

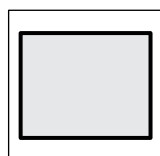
4. Заполните до верха. Включите вакуум (приб. 10 мин. в десикаторе) макс. 200 мбар, отключите вакуум.

5. Наденьте крышку (герметично). Вкл. холодильник при -2°C/-4°C



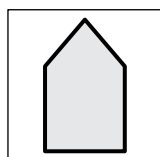
гистоформа S: Technovit 7100/8100

10 углублений Габариты: Ш x В x Г:
приб. 10 x 16 x 6,5 мм



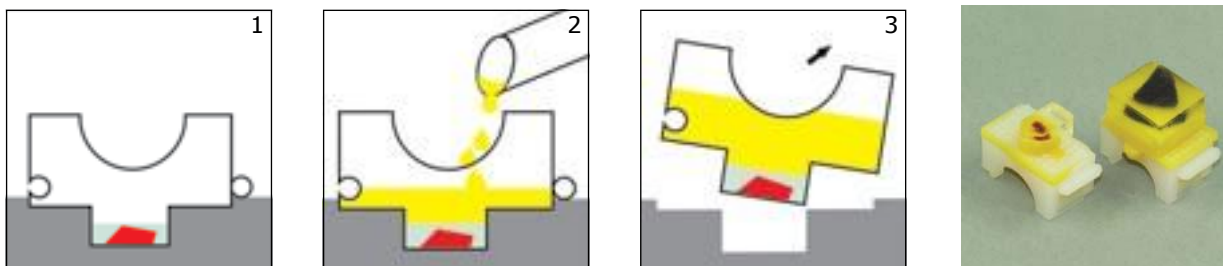
гистоформа Q: Technovit 7100/8100

Для фиксации больших препаратов,
10 углублений
Габариты: Ш x В x Г: приб. 20 x 16 x 10 мм



гистоформа n: Technovit 9100

с 4 накладками 4 полостями
Габариты: Ш x В x Г: приб. 12 x 20 x 10 мм



Technovit 3040 / Гистоблок

Technovit 3040 является быстротвердеющим 2-компонентным пластиком с метакрилатной основой (ММА). Он предназначен для блокировки или крепления залитых пластиковых образцов с гистоблоком или заливкой углублений.

Химический состав предназначен для стабильного, постоянного сцепления с затвердевшим блоком Technovit 7100, Technovit 8100 или Technovit 9100.

Гистоблок – опорные элементы

Опоры гистоблока регулируются по отношению к гистоформам S + Q или N.

Блокировка

После затвердевания Technovit 7100, Technovit 8100 или Technovit 9100 элемент опоры гистоблока помещается в отверстие в тефлоновой форме для заливки, гистформе S/Q или N, предназначенных для указанной цели (Рис. 1).

Если Technovit 8100 предназначен для заливки, то пленку необходимо снять с образца до того, как опорный элемент гистоблока будет положен на место.

Для Гистоформы N, алюминиевая крышка снимается и РЕ пленка удаляется.

Перемешивайте Technovit® 3040 до тех пор, пока он не станет максимально вязким (пропорция смешения 2-3 объемных частей порошка к 1 объемной доли жидкости). Залейте смешанный материал в отверстие в Histobloc®. (Рис. 2)

Пластик Technovit затвердевает и гистоблок плотно прикрепляется к образцу за 5 - 10 минут в зависимости от комнатной температуры.

Теперь образец может быть извлечен из формы и может быть срезан (Рис. 3). Посредством блокировки при помощи очень жесткого материала Technovit® 3040, эластичный Technovit 7100 или Technovit 8100 стабилизируется таким образом, чтобы можно было делать даже тончайшие срезы.

Зажим образца на микротоме.

Прямоугольная форма гистоблока предназначен для того, чтобы образец непосредственно прижимался к системе totum cam ротационного микротомы.

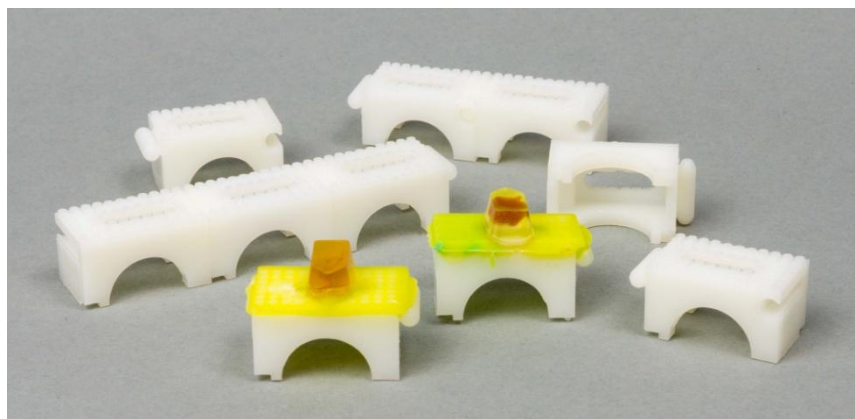
Примечание к Technovit 9100:

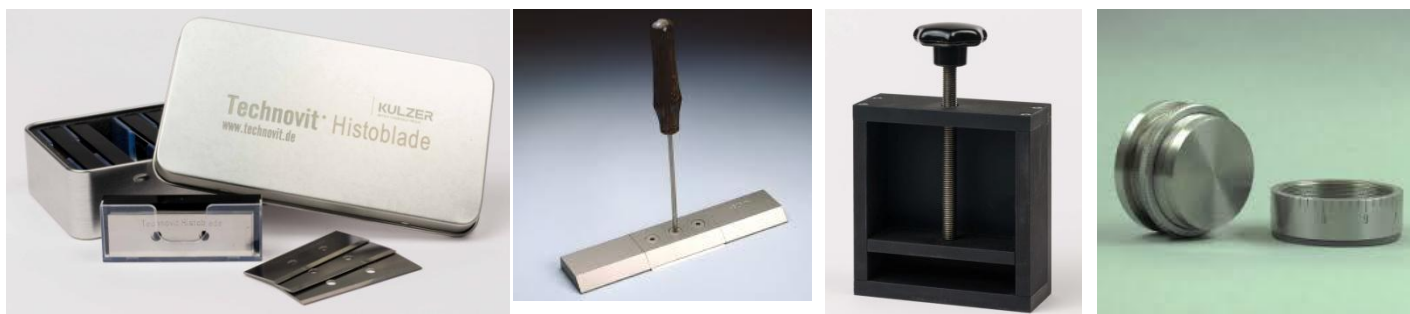
При использовании круглой гисто заливочной формы для Technovit 9100, образец может зажиматься непосредственно в круглом держателе образца; блокировка не нужна.

Хранение и архивирование образцов 7100 и 8100

Гистоблоки могут складываться друг на друга для более лучшего архивирования. Следовательно, последовательная нумерация и хранение экономией места возможно.

Для гистохимического и иммуногистохимического исследования рекомендуется хранить блоки в РЕ пакетах при +4°C или дольше при -20°C





Technovit гистолезвие и держатель лезвия Пленка.

Гистологическое лезвие Technovit специально предназначено для резки образцов ткани, залитых в НЕМА (2-гидроэтилметакрилат) и материалы с промышленным применением с толщиной секции вплоть до 1 мкм.

Следовательно, доступна дешевая альтернатива другим ножам в сочетании с исключительно стабильным держателем лезвия.

Преимущества:

- Тяжелый, стабильный дизайн.
- Легко в эксплуатации.
- Хорошие результаты резки с толщиной среза вплоть до 1 мкм.
- Оптимизированное качество среза.
- Улучшенная долговечность.

Угол ножа при применении гистологического лезвия Technovit должен быть 9° для микромных/термальных ротационных микротомов. Вам необходим держатель лезвия „NR“, „SL“ или „N“ для микротомов Рейхерта-Джунга/Лейка при 0°. Вам необходим держатель лезвия „NZ“. Свяжитесь с местным поставщиком микротомов при возникновении любых вопросов.

Габариты

Гистологическое лезвие: 60 x 19 x 1 мм, 2 4-мм отверстия.

Держатель лезвия: 170 x 34 x 10 мм.

Пресс держателя объекта

Пресс сделан из металла для плоского прессования срезов ММА на объектном держателе в процессе сушки. Минимум 50 - 70 держателей подходят к прессу объектного держателя (поместите бумажный фильтр между каждым объектным держателем).

РЕ Пленка для охвата срезов ММА на объектном держателе после вытягивания (например, Technovit 9100), формат: 25 x 75 мм

Пленка также применяется для чистой запайки гистоформы N с алюминиевой пластиной.

Ручной держатель образцов и заливка

Ручной держатель образцов является важным приспособлением для осуществления плоских параллельных тонких срезов и целевой подготовки для полированных тонких срезов.

Ручной держатель образцов N
Ручной держатель образцов „N“ (= гистология) предназначен для осуществления тонких срезов.

Проведите прессовку либо круглого, либо прямоугольного стекла или РММА объектный держатель, на котором образец (плоскопараллельный) размещается с прозрачным вязким материалом на плоской поверхности из нержавеющей стали ручного держателя образцов.

Капля воды, масла или пихтового бальзама может быть использована. Образцы могут также налипать прямо на металлическую поверхность.

Настройка нониус на ручном регулировочном кольце держателя образца делает возможным достижение определенного удаления материалов. Стопорное кольцо предотвращает изменение определенных габаритов в ходе резки. Керамическое кольцо гарантирует безопасную резку до необходимого уровня и предотвращает чрезмерную резку.

Ручной держатель образцов М плюс вставки

Полированный тонкий срез может быть сделан для целевого препарата из залитого образца. Для этого используется ручной держатель „М“ (= материалаграфия). Стандартный диаметр составляет 40 мм. 32 мм, 30 мм и 25 мм вставки могут применяться в обычном держателе для более малого диаметра.

Если тонкий срез сделан из полированного тонкого сечения, то возможно сделать вставку N в ручной держатель М (стандарт 40 мм). Затем продолжить, как указано в разделе

„Ручной образцовый держатель N“.

No.	Описание/содержани
66038248	Гистоформа N, заливка форм, сделанных из тефлона, 1часть
64708992	Гистоформа Q, заливка форм, сделанных из тефлона, 1часть
64708991	Гистоформа S, заливка форм, сделанных из тефлона, 1часть
64708955	Заливка форм 25мм, 1 рк. (3 цилиндра, 3 крышки)
66009903	Гнездо для заливки форм 25 мм, 1 рк. (3 шт.)
64713126	Залив. форма 15 мм, 1 рк. ((3 цилиндра, 3 крышки)
64708956	Залив. форма 30 мм, 1 рк. ((3 цилиндра, 3 крышки)
64708957	Залив. форма 40 мм, 1 рк. ((3 цилиндра, 3 крышки)
64713127	Залив. форма 50 мм, 1 рк. ((3 цилиндра, 3 крышки)
64708805	Technovit 3040 желтый комбиупаковка, 1 x 100г / 1 x 80 мл
64708806	Technovit 3040 желтый порошок, 1000г
66022678	Technovit универс. жидкость, 500 мл
64712817	Гистоблок для гистоформы N. 50 штук
64708995	Гистоблок для гистоформы S & Q, 100 штук
66021102	Смесительный бак
64701106	Лопатка
64701107	Совок
64708996	Держатель лезвия микротомы. 17 см
66045730	Technovit гистолезвие 1 x 50 штук
66031158	Ручной держатель образцов Н
66031155	Ручной держатель образцов М Ø 40 мм
66031159/60/61	Предназначен для ручного держателя М 25, 30, 32 вставка Н
66031157	
64712819	Пресс для объектного держателя
64712818	Полиэтиленовая пленка 75 x 25 мм, 200 штук

Основная информация по использованию продукции Technovit.

Инструкции по применению

Описанные заливочные системы работают с химическими веществами; следовательно, надлежащие лабораторные нормы и руководства, регулирующие обработку химическими веществами должны быть соблюдены.

- Предотвращайте контакт мономеров с металлическим оборудованием (например, металлической мешалкой или пинцетом).
- Проводите чистку контейнеров без чистящих веществ
- Чистите ММА загрязненные контейнеры ацетоном/спиртом.
- Полимер остается в растворяющем контейнере для отходов или пластиковом мусорном контейнере .
- Далее, применяйте РЕ или стеклянные контейнеры.
- Проводите чистку хроматографической колонки (для дестабилизации основного раствора Technovit 9100) сразу после использования ацетоном/спиртом.
- Удаляйте оксид алюминия стабилизатором: испаряйте на алюминиевой фольге под газопоток, вложите остаточные отходы или удалите их в контейнере для загрязненных веществ
- Используйте магнитную мешалку без плиты для растворения порошка РММА в Technovit 9100.

Technovit 7100

Типичная окраска, ферментная гистохимия по Герритсу

Гематоксилин-эозин	Реактив Шиффа (PAS)
Окраска 1. Проведите окраску срезов гематоксилином по Gill* (фильтруйте краситель) 15 мин. 2. синий в водопроводную воду 10 мин. 3. Ополосните в дист. воде 4. Докрасьте срезы эозином 2–5 мин. 5. Дегидрируйте 96% и 100% этанолом 6. Очистите ксиленом и закройте Eukitt Результат Ядро синее Базофильная протоплазма синяя Ацидофильная протоплазма розовая Мышечная ткань розовая Соединительная ткань розовая Растворы Гематоксилин по Гиллу Гематоксилин (C.I. 75290) - 6 г Йодат натрия - 0,6 г Сульфат алюминия - 52,8 г Дист. вода - 690 мл Этилен гликоль - 250 мл Уксусная кислота ледяная - 60 мл Эозин Эозин Y-(спиртовой) C.I. 45380 0,5 г Этанол 96 % 100 мл Уксусная кислота ледяная 2 капли *После окраски гематоксилином (1) the пластиковая матрица может быть обесцвечена 0,5 мл HCL (36%) в этаноле 70%: быстро погрузите и затем быстро обработайте обычной водой (2).	Окраска 1. 0,4 % йодная кислота 30 мин., 56 °C 2. Ополосните обычной водой 3. 3 раза ополосните дист. водой 4. Реагент Шиффа 15 мин. 5. Тщательно ополосните в водопроводной воде 6. Ополосните в дист. воде 7. Докрасьте срезы гематоксилином по Гиллу 10 мин. 8. Синий в водопроводной воде 10 мин. 9. Дегидрируйте, почистите ксиленом и закройте в Eukitt Примечание: Для предотвращения особого розового блеска любой может ополоснуть сернистокислой водой вместо водопроводной воды (5), см. также Фельген. Результат: Ядро синее Гликоген фиолетовый / красный Базальная мембрана фиолетовый / красный Муцин фиолетовый / красный Растворы: Реактива Шиффа Раствор 1: Парарозанилин (C.I. 42500) - 0,5 г 1 N соляная кислота - 15 мл/ Раствор 2: Пиросульфит калия (K₂ S₂ O₄) - 0,5 г, Дист. вода - 85 мл. Смешайте раствор 2, раствор 1. Спустя 24 часа (в темноте) светло-коричневый раствор обесцвечивается 200 мг костяным углем (приб. 2 мин.) и затем фильтруется. Храните бесцветный реагент (лейко фуксин) в холодильнике. Гематоксилин Гилла: см. гематоксилин-эозин.
Фельген	Гимза
Окраска 1. Гидролизуйте в соляной кислоте 5 N 20 мин. ZT 2. Ополосните в дист. воде 3 х 3. Реактив Шиффа 15 мин. 4. Сульфит гидрида натрия 0,5% 3 х 2 мин. 5. Тщательно сполосните обычной водой 6. Дегидрируйте, почистите ксиленом и закройте в Eukitt Результат DNS - фиолетовый / красный Прочие элементы ткани - бесцветный Растворы Реактив Шиффа Соляная кислота 5 n Наполните 42 мл соляной кислоты 36% до 100 мл гидроген сульфит натрия.NaHSO₃ - 0,5 г. Дист. вода - 100 мл.	Окраска 1. Срезы окраски по Гимза раствор (20 %) 1,5 ч. ZT (Гимза Мерк: Разбавьте 1:5 дист. водой) 2. Быстро в растворе уксусной кислоты: 4 капли до 100 мл дист. воды 2 сек. 3. Погрузите в спирт 96% 4. Погрузите в спирт 96% 5. изопропанол 3 х 2 мин. 6. Очистите ксиленом и закройте малинолом Результаты Ядро фиолетовое Цитоплазма синяя Эритроциты розовые

Синяя реакция по зернам	Определение активности энзима
Окраска 1. Ферроцианид калия 15 мин. 2. Сначала разогрейте раствор до 60°C и затем отфильтруйте 3. Ополосните в дист. воде 4. Сафранин О. 0,2 % 2–5 мин. 5. Ополосните в уксусной кислоте 1 % 5. Дегидрируйте, очистите ксиленом и закройте Eukitt Результаты Ядро красное Гемозидерин синий / зеленый Растворы Раствор ферроцианида калия Ферроцианид калия - 1 г Дист. вода - 50 мл Соляная кислота 2 % - 50 мл Раствор сафранина Сафранин О. (С.І. 50240) - 0,2 г Уксусная кислота 1 % - 100 мл	Определение активности фермента в тканях, которые залиты в 2 гидроксипропанметакрилат (GMA) – в частности Technovit 7100 Только удаленная ткань фиксируется в 4% нейтральном формальдегиде при 4°C в течение двух часов (погружение). Если перфузионная фиксация сделана, то очень краткое время фиксации может быть соблюдено и ферментная активность лучше определяется. Промывочная жидкость 1.1 М каодилатный буфер pH 7.4; материал можно оставить на всю ночь при 4°C. Дегидратация 1. Спирт 70 % ацетон 70 %, 30 мин. при 4 °C 2. Спирт 96 % ацетон 96 %, 30 мин. при 4 °C 3. Спирт 100 % ацетон 100 %, 30 мин. при 4 °C Предварительная инфильтрация 4. Спирт 100 % Technovit 7100 1:1, 2 ч. при 4 °C or Ацетон 100 % Technovit 7100 1:1, 2 ч. при 4 °C
Йодная кислота метенамин серебряный (PAMS) по Джонсу Примечание: рекомендуется прикрепить на пластиковые срезы при помощи альбумина Майера. Окраска 1. Йодная кислота 1 % 30 мин. 2. Ополосните в дист. воде 3х 3. Растворе метенамина серебряный 60 мин., 60 °C 4. Ополосните в дист. воде, микроскопическое испытание. 5. Срезы, которые были слишком слабо окрашены в 3 5. Если срезы не растворяются несмотря на предварительную обработку, сушите их на пластине при 60°C согласно пункту 6. Однохлористое золото 0,2 % 1–2 мин. 7. Ополосните в дист. воде 8. Антихлор 2 % 5 мин. 9. Ополосните в водопроводной воде 10. При необходимости, докрасьте HE или сафранин О 11. Дегидрируйте, очистите ксиленом и закройте Eukitt Результат Базальная мембрана коричневая / черная Растворы Серебряный раствор метенамина а) Метенамин 3 % - 100 мл. б) Нитрат серебра 5 % - 5 мл. а) и б) может храниться отдельно. Раствор серебряного метенамина Осн. раствор - 50 мл. Бура 5 % - 5 мл. Йодная кислота: 1 % (Sigma No. P 7875) Хлористое золото: 0,2 %. Раствор антихлора: 2 % (Na₂ S₂ O₃ .5H₂ O).	Инфильтрация Technovit 7100, 12 ч. при 4 °C Полимеризация 15 частей Technovit 7100 (раствор А) 1 часть Technovit 7100 отвердитель II при 4 °C Ткань может быть залита в гистоморфы S или Q, или в систему Sorvall. Ввиду того, что полимеризация начинается при 4°C, она происходит ниже, чем при комнатной температуре. Время полимеризации, составляющее 12 часов при 4°C, должно быть учтено для обеспечения полимеризации. 2-мкн срезы также высушены при комнатной температуре от дист. воды. Ферментные действия могут быть сделаны без удаления пластиковой матрицы. Примечание: сложно определить дегидрогеназы.

Щелочная фосфатаза по Бурстон	АТР-АЭ (Вохштайн и Мейзел)
Окраска 1. Выдерживайте пластиковые срезы в инкубационной среде 1–3 ч. - Примечание: Во многих случаях достаточно 2-часового инкубационного периода. 2. Ополосните дист. Водой 2 мин. 3. Докрасьте срезы Быстрыми красными атомами 5–10 мин. 4. Ополосните в дист. воде 5. Высушите 6. Закройте малинолом Результат Ядерный красный. Зона ферментной активности синий. Примечание: В указанной реакции выбор среды, предназначенный для закрытия материала значителен, потому что образование кристаллов может произойти в продукте химической реакции. Растворы <u>Буферный раствор</u> 1.2 М трис-(гидроксиметил) - аминметан 2,4 г Дист. вода - 100 мл. Укажите значение pH до 8,9 с разбавленной HCL и храните буфер при 4°C. <u>Инкубационная среда</u> Нафтол AS-MX фосфат, динатриевая соль (Sigma) - 5 гр N,N. диметилформамид - 0,25 мл. После растворения, добавить: Дист. Воду - 25 мл. Буферный раствор (pH 8,9) - 25 мл. MgSO₄·7H₂O 10 % - 2 капли. Быстрый голубой BB (Sigma) - 30 мг. Хорошо потрясите и затем отфильтруйте до применения. Примечание: инкубационная среда должна быть свежей.	Окраска 1. Выдерживайте пластиковые срезы в инкубационной среде (фильтруйте до применения) 1–3 ч., 37 °C. - Примечание: во многих случаях достаточно 2-часовой инкубации. 2. Ополосните дист. Водой 2 мин. 3. Раствор сульфида натрия 30 сек. 4. Ополосните дист. Водой. 5. Докрасьте срезы. - Ядерной прочной красной 5–10 мин. 6. Ополосните дист. Водой. 7. Высушите. 8. Закройте Eukitt или malinol. Результат Ядро красное. Зона ферментной деятельности коричневая . Растворы 1.Трис буфер малеиновой кислоты pH 7.2 раствор А Малеиновая кислота - 29 г. трис-(гидроксиметил)-аминометан - 30,3 г. Дист. Вода - 500 мл. Добавьте 2 г активированного угля, трясите в течение 10 минут и фильтруйте. Затем добавьте 40 мл. основного раствора А, 20 мл - 1N NaOH и заполните дист. водой до 100 мл (pH 7,2). 2.Раствор нитрата свинца Нитрат свинца - 2 г. Дист. вода 100 мл. 3.Раствор сульфата магния MgSO₄ ·7H₂O - 1,2 г. Дист. вода - 100 мл. Инкубационная среда Дист. вода - 22 мл. Двунариевый аденозин-5-трифосфат (Берингер, Мангейм) - 25 мл. Трис буфер малеиновой кислоты pH 7,2 - 20 мл. Раствор сульфата магния - 5 мл. раствор нитрата свинца (добавляйте по капле). Нагрейте до 42°C и фильтруйте) - 3 мл. Раствор сульфида Сульфид натрия - 2 г. Дист. вода - 100 мл. Отрегулируйте значение pH до 7.0-7.5 с 1 N HCL (сверьтесь с лакмусовой бумагой).

Technovit 9100

Типичная окраска, иммунная реакция, ферментная гистохимия, гибридизация по месту.

Нижеприведенная окраска и индикационные реакции являются только важными примерами обработки срезов. Они также применяются к ММА тонким срезам.

Реагенты, антитела, пробы, системы обнаружения являются различными.

1. Типичная окраска

Окраска срезов для иммуногистохимии и ферментной гистохимии	Окраска Гимза
➤ Течение гематоксилина Н. Майер 30 сек./RT. ➤ вода из обычной переходит 10 мин./RT в дист. Воду. ➤ nОполосните ядерный быстрый красный в дист. воде 10 мин./RT. ➤ Метил зеленый (чистый; см. Romeis) 10–20 мин./RT Ополосните дист. Водой.	➤ Диакрилат срезы. ➤ Гимза разб. (смешивайте свежей!) 30–40 мин./RT. ➤ Дифференцируйте и дегидрируйте n ацетон / ксилол (95 : 5) Ацетон / ксилол (70 : 30) n ацетон / ксилол (30 : 70) n Ксилол.
Не окраска	Окраска по Массону Голднеру
➤ Аналогична окраске парафиновых срезов.	➤ Диакрилат срезы. ➤ Гемалаун (Майер) 10 м./RT. ➤ Водопроводная вода. ➤ пунцовый кислый фуксиновый азофлоксин 45 м/RT. ➤ 1% уксусная кислота. ➤ фосфорномолибденовая кислота / оранж Ж 7 м./RT. ➤ 1% уксусная кислота. ➤ светло-зеленый 40 м./RT. ➤ 1% уксусная кислота. ➤ Спирты восходящей концентрации. ➤ Ксилол. ➤ Закрывать Eukitt или аналогом.

2. Полная иммунная реакция

Инкубация с антителами	Индикационная реакция
➤ Погрузите в 0,01M фосфатного буфера (pH 7,4). ➤ Первичное антитело 16 ч/4 °C или разбавленное в DAKO разведенное антитело 30–45 м./RT. ➤ Буфер для ополаскивания. ➤ DDAKO EnVision полимер ➤ (GAM/GAR), AP парный 30 м./RT.	➤ Буфер для ополаскивания. ➤ Раствор хромогена субстрата: ➤ быстрый красный 15–20 м./RT. ➤ Докрашивание гематоксилином по Майеру.

3. Исполнение ферментной гистохимии

Щелочная и кислотная фосфатаза	Нафтол AS-D эстеразы хлорацетата (ASD)
➤ Ополаскивание в 0-1M трис буфере (pH 9.4) 10 мин./RT ➤ Инкубация в реакционном растворе 2 ч/37 °C 0.1M трис буфер (pH 9.4). Реальный кристаллический сернокислый никель. ➤ Нафтол-AS-BI-фосфат. ➤ Ополосните в дист. Воде. ➤ Ополосните в 0-1M буфере ацетата (pH 5.6) 10 мин./RT. ➤ Инкубация в реакционном растворе 1 ч/37 °C 0.1M ацетатный буфер (pH 5,6) раствор гексаний-парарозанилина Нафтол-AS-BI-фосфат. ➤ Ополосните в дист. Воде. ➤ Повторно зафиксируйте в 4% формалине 2–3 ч/RT. ➤ Ополосните в обычной воде. ➤ Докрасьте метилом зеленым.	➤ Погрузите в 0,01M фосфатном 5 мин./RT буфере (pH 7,4). ➤ Инкубация в реакционном растворе 1 ч/RT 0,01M фосфатный буфер (pH 6,5). ➤ Нафтол-AS-D-хлорацетат раствор гексаний-парарозанилин. ➤ Ополосните в дист. Воде. ➤ Докрасьте гематоксилином по Майеру.

*RT = комнатная температура.

Technovit 9100 Краткие инструкции

Гибридизация по месту для срезов

1. Подготовьте толщину срезов приб. 5 мкм
 2. Дегластизация срезов при комнатной температуре
 - Ксилол 2 x 20 мин.
 - 2-метоксиэтил ацетат (2-МЕА) 1 x 20 мин.
 - Очень чистый ацетон 2 x 5 мин.
 - Дист. вода 2 x 5 мин.
- При необходимости, устраняйте пластичность большее количество раз, также без 2.МЕА.
3. Срезы кромок.
 4. Блокируйте эндогенную пероксидазу 3% H₂O в метанол - 30 мин.
 5. Дист. Вода 2 x 5 мин.
 6. Ферментное расщепление.
 - Быстрый фермент - 10 мин. RT.
 - Проназа 0,1%, 37 °C - 10 мин.
 7. Дист. Вода минимум - 10 мин.
 8. Свежая дист. Вода возможно всю ночь.
 9. Позвольте высохнуть срезам.
 10. Примените покрытие к срезам, закройте стеклом и заклейте Fixogum.
 11. Поместите срезы в гибридазаторе и проводите гибридизацию в течение 2 часов при 55°C.
 12. Снимите срезы от устройства, снимите Fixogum.
 13. Разместите срезы в буфере 2 x 2 мин. при RT.

Определение:

1. Поместите AP антибиотин на срезы - 30 мин., 37 °C.
 2. Помойте в буфере 2 x 2 мин., RT.
 3. Поместите субстрат AP на срезы 30 мин., 37 °C.
 4. Помойте в буфере 2 x 2 мин., RT.
 5. Поместите HRP на срезы 30 мин., 37 °C.
 6. Помойте в буфере 2 x 2 мин., RT.
 7. Поместите субстрат HRP на срезы 30 мин., 37 °C .
- HRP субстрат от набора для формалина и зафиксированные подвздошные гребни:

HRP субстрат для Шаффера с фиксью подвздошными гребнями:

- 10,5 мг 3-АЭК (Sigma а 5754)
 - 1 мл DMSO
 - в 50 мл ацетатного буфера pH 5,6 (0,1 моляр)
 - 5 µl H₂O₂
8. Промойте срезы под проточной водой и при необходимости, быстро докрасьте разбавленным раствором Майера.
 9. Залейте водой.

ПРИМЕЧАНИЕ:

Попросите надлежащего производителя пробы для дополнительных инструкций о ISH.

Источник: самостоятельный эксперимент с реагентами завершен компанией Zytomed Systems GmbH

Реагенты

Буфер

2М ОСНОВНОЙ РАСТВОР АЦЕТАТА НАТРИЯ

74,13 г - ацетата натрия; 5,5 мл - ледяной уксусной кислоты
доб. 500 мл дист. Воды.

0,1М НАТРИЙ-АЦЕТАТНЫЙ БУФЕР (pH 5,6)

50 мл - 2М основного раствора ацетата натрия доб. 1000 мл дист. воды (довести pH до 5,6).

1М ФОСФАТНОГО ОСНОВНОГО РАСТВОРА

112,5 г - Na₂HPO₄
30 г - KH₂PO₄
доб. 1000 мл дист. Воды.

0,1М ФОСФАТНОГО БУФЕРА (pH 6,5)

100 мл. 1М основного фосфатного раствора доб. 1000 мл дист. воды (установить pH до 6,5).

0,01М ФОСФАТНЫЙ БУФЕР (pH 7,4)

10 мл. - 1М фосфатного основного раствора
доб. 1000 мл дист. воды (установить pH 7,4).

0,04М ФОСФАТНЫЙ БУФЕР + 10% Сахарозы (pH 7,4)

40 мл 1М фосфатного основного раствора - 100 г сахарозы
10 мл раствора 10% NaN доб. 1000 мл. дист. воды (pH 7,4).

1М ТРИС ОСНОВНОЙ РАСТВОР

121,14 г - трис + доб. 1000 мл дист. воды

0,1М ТРИС БУФЕР (pH 9,4)

100 мл. 1М трис основного раствора
доб. 1000 мл дист. воды (установить pH - 9,4)

Растворы для фиксации

Буферный 4% РАСТВОР ФОРМАЛИНА

100 мл 37% формол 4 г NaH₂PO₄. H₂O
6,5 г Na₂HPO₄ доб. 1000 мл. Дист. воды (pH 7,0)

8% ОСНОВНОГО РАСТВОРА ПАРАФОРМАЛЬДЕГИДА

40 г параформальдегида доб. 500 мл дист. Воды

1,4% РАСТВОР ПАРАФОРМАЛЬДЕГИДА

35 мл 8% основного раствора параформальдегида
65 мл. дист. воды
100 мл. 0,04М фосфатного буфера + 10% сахарозы (pH 7,4)

Реакционные партии

БЫСТРЫЙ КРАСНЫЙ РАСТВОР

Положите 3 мл. субстратного буфера в пластиковую трубку
Положите 1 быструю красную таблетку в раствор и разбавьте. Добавьте 120 мкл левамизола и перемешайте
Раствор имеет срок хранения 1 час.

РЕАКЦИОННЫЙ РАСТВОР: ЩЕЛОЧНАЯ ФОСФАТАЗА

50 мл. - 0,1М трис буфер (pH 9,4) 50 мг. фактического кристаллического сернокислого никел.
25 мг. нафтола-AS-BI фосфата (разбавленного в 0,5мл. DMSO/Triton X 100).

РЕАКЦИОННЫЙ РАСТВОР: КИСЛАЯ ФОСФАТАЗА

50 мл. - 0,1М натрий-ацетатного буфера (pH 5,6) 500 мкл. гекзоний парарозанилин (250 мкл 4 % парарозанилина в 2N HCl + 250 мкл 4 % нитрата соды в дист. воде; мешайте в течение 1 мин. дайте вступить в реакцию 5 мин.).
25 мг. - нафтола-AS-BI-фосфата (растворенного в 0,5 мл DMSO/Triton X 100).

РЕАКЦИОННЫЙ РАСТВОР: ASD-ЭСТЕРАЗА ХЛОРАЦЕТАТА- SE

50 мл. - 0,1М фосфатного буфера (pH 6,5).
15 мг. - нафтола AS-D хлорацетата (разбавленного DMSO/TritonX 100).
250 мкл - гекзоний парарозанилин.

Растворы для окраски

РАСТВОР ГИМЗА

3% раст., используйте основной раствор (Мерк) 1-2 капли
1% уксусной кислоты.

СВЕТЛО-ЗЕЛЕНый

1 г. - светло-зеленый желтоваты.
2 мл. - ледяная уксусная кислота доб. 1000 мл. - дист. Воды.

ФОСФОРНОМОЛИБДЕНОВАЯ КИСЛОТА / ОРАНЖ Ж

30 г - фосфорномолибденовой кислоты доб. 500 мл - дист. Воды. 20 г - Оранж-Ж доб. 500 мл. - дист. Воды.
- смешать оба раствора
- фильтровать

ПУНЦОВЫЙ АЗОФЛОКСИН КИСЛОГО ФУКСИНА

100 мл. - Раствор Масона.
20 мл. – Азофлорсин.
880 мл. 0,2% - уксусной кислоты.

Раствор Масона:

1 часть растворена. А + 2 части растворены. В

Раствор. А:

1 г. Оксид магния (фуксин-С) доб. 100 мл. дист. воды - вскипятить.
1 мл. ледяного уксуса – фильтровать.

Раствор В: 2 г - ксилитина пунцового

доб. 200 мл. дист. воды – вскипятить.
2 мл. ледяного уксуса – фильтровать.

РАСТВОР АЗОФЛОКСИНА

0,5 г - азофлорсин доб. 100 мл. дист. Воды.
2 мл. - ледяной уксусной кислоты.