

VERWENDUNGSZWECK

Die Mayer Hämatoxylin-Lösung wird allgemein nach der immunhistochemischen oder zytochemischen Färbung als nukleäres Gegenfärbemittel verwendet. Sie kann auch als Standard-Hämatoxylin- und Eosin-(H&E) Färbemittel verwendet werden, wird aber häufiger verwendet, wenn eine saure Alkoholdifferenzierung oder Alkohol-Exposition die gefärbten Bestandteile des Zytoplasmas zerstören könnten.³ Mayers Hämatoxylin-Lösung enthält keinen Alkohol und löst daher kein AEC (3-Amino-9-Ethylcarbazol), alkalische Phosphatase/Fast Red Chromogen oder andere lösliche, gefärbte Produkte heraus. Mayers Hämatoxylin-Lösungen sind für die "In-vitro-Diagnostik" bestimmt.

Hämatoxylin, ein gängiges Zellkernfärbemittel, wird aus einem Blauholzextrakt isoliert (Haematoxylin campechianum).¹ Die erste erfolgreiche biologische Anwendung von Hämatoxylin wurde 1865 von Bohmer¹ beschrieben. Mayer führte seine Formulierung 1903 ein.² Danach erschienen mehrere Formulierungen. Zu den bekanntesten gehören Harris', Gills, Mayers und Weigerts. Bevor Hämatoxylin als Zellkernfärbemittel benutzt werden kann, muss es zu Hämatoxylin oxidiert und mit einem metallischen Ion (Beizmittel) kombiniert werden. Die meisten erfolgreichen Beizmittel sind Aluminium- oder Eisensalze.

Im Allgemeinen werden die Hämatoxylin-Lösungen als progressiv oder regressiv, entsprechend ihrer Färbemittelkonzentration, eingestuft. Progressive Färbemittel (z.B. Mayers Hämatoxylin) haben eine niedrigere Färbemittelkonzentration und färben gezielt Zellkern-Chromatin, ohne die Strukturen des Zytoplasmas zu färben. Die gewünschte Intensität hängt von der Zeit ab. Bei sehr langen Färbungszeiten kann ein progressiver Farbstoff ähnlich wie eine regressive Färbelösung reagieren. Im allgemeinen dauern Färbeverfahren mit progressiven Färbemitteln länger als mit regressiven Färbemitteln. Regressive Färbemittel (z.B. Harris Hämatoxylin) färben alle färbbaren Gewebeteile (nukleär und zytoplasmatisch) intensiv. Um die korrekte Färbereaktion zu erzielen, muss die überschüssige Farbe vom Gewebeschnitt entfernt werden. Nach ausreichender Differenzierung weist ein ordnungsmäßig entfärbter Schnitt eine nukleäre Färbung, aber keine Färbung der zytoplasmatischen Strukturen auf.

Der letzte Schritt der Hämatoxylin-Färbung ist die "Blaufärbung" der Gewebeschnitte. Zu Beginn werden die Schnitte entweder violett oder rötlich-violett gefärbt. Nach Exposition an Alkalilösungen (warmes Leitungswasser [falls leicht alkalisch], verdünntes Ammoniakwasser, Scotts Leitungswasserersatz oder Lithiumkarbonat) nehmen die Gewebeschnitte die charakteristische blaue Farbe eines mit Hämatoxylin gefärbten Objektträgers an.

REAGENZ

MAYERS HÄMATOXYLIN-LÖSUNG, Bestell-Nr. MHS
Zertifiziertes Hämatoxylin (1,0 g/l), Natriumjodat (0,2 g/l), Aluminiumammonium-sulfat-12 H₂O (50 g/l), Chloralhydrat (50 g/l) und Zitronensäure (1 g/l).

AUFBEWAHRUNG UND STABILITÄT:

Reagenz bei Raumtemperatur (18–26 °C) und vor Licht geschützt aufbewahren. Reagenz ist bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum stabil. Gebrauchte Lösung nicht in die Flasche mit Stammlösung zurückgeben.

PRODUKTVERFALL:

Die Lösung entsorgen, falls der Färbeprozess zu lange dauert oder sich die Lösung braun verfärbt.

VORBEREITUNG:

Mayers Hämatoxylin-Lösung vor jeder Verwendung filtern. Die Lösung ist dann gebrauchsfertig.

VORSICHTSMASSNAHMEN:

Bei der Handhabung von Laborreagenzien sollten normale Vorsichtsmaßnahmen eingehalten werden. Bei der Entsorgung von Abfällen alle örtlichen, staatlichen und nationalen Vorschriften befolgen. Aktuelle Hinweise zu Risiken, Gefahren und Sicherheitsmaßnahmen sind dem Sicherheitsdatenblatt zu entnehmen.

US-Gefahren- und Sicherheitsangaben

Mayers Hämatoxylin-Lösung ist TOXISCH. Bei Verschlucken toxisch. Reizt Augen, Atmungssystem und Haut. Bei Kontakt mit den Augen sofort mit reichlich Wasser spülen und ärztlichen Rat einholen. Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe und Schutzkleidung tragen. Bei Unfall oder Unwohlsein sofort einen Arzt zuziehen (wenn möglich dieses Etikett vorzeigen). Zielorgane: Nerven und Leber.

Reagenz-Alkohol ist ENTZÜNDLICH und ein REIZMITTEL. Reizt Augen, Atmungssystem und Haut. Behälter dicht geschlossen halten. Von Zündquellen fernhalten – nicht Rauchen. Bei Kontakt mit den Augen sofort mit reichlich Wasser spülen und ärztlichen Rat einholen. Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung tragen.

Scotts Leitungswasserersatz. Vorsicht: Die Substanz ist noch nicht vollständig geprüft. Alkoholische Eosinlösungen sind ENTZÜNDLICH und SCHÄDLICH. Schädlich bei Einatmen, Hautkontakt und Verschlucken. Schädlich: Irreversible Schäden möglich bei Einatmen, Hautkontakt und Verschlucken. Reizt Augen, Atmungssystem und Haut. Von Zündquellen fernhalten – nicht Rauchen. Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe und Schutzkleidung tragen. Bei Unfall oder Unwohlsein sofort einen Arzt zuziehen (wenn möglich dieses Etikett vorzeigen).

Wässrige Eosinlösung. Vorsicht: Die Substanz ist noch nicht vollständig geprüft. Xylen ist ENTZÜNDLICH und SCHÄDLICH. Mögliches Risiko einer beeinträchtigten Fruchtbarkeit. Schädigungen des ungeborenen Kindes möglich. Schädlich bei Einatmen

und beim Kontakt mit der Haut. Reizt die Atemwege und die Haut. Gefahr erster Augenschäden. Von Zündquellen fernhalten – nicht Rauchen. Bei Kontakt mit den Augen sofort mit reichlich Wasser spülen und ärztlichen Rat einholen. Geeignete Schutzkleidung, Handschuhe und Augen-/Gesichtsschutz tragen. Bei Unfall oder Unwohlsein sofort einen Arzt zuziehen (wenn möglich dieses Etikett vorzeigen).

EU-Gefahren- und Sicherheitsangaben

Mayers Hämatoxylin-Lösung ist SCHÄDLICH. Bei Verschlucken schädlich.

Reagenz-Alkohol ist HOCHENTZÜNDLICH und ein REIZMITTEL. Hochentzündlich. Reizt Augen, Atmungssystem und Haut. Behälter dicht geschlossen halten. Von Zündquellen fernhalten – nicht Rauchen. Bei Kontakt mit den Augen sofort mit reichlich Wasser spülen und ärztlichen Rat einholen. Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung tragen.

Scotts Leitungswasserersatz. Vorsicht: Die Substanz ist noch nicht vollständig geprüft.

Alkoholische Eosinlösungen sind HOCHENTZÜNDLICH und SCHÄDLICH. Hochentzündlich. Schädlich bei Einatmen, Hautkontakt und Verschlucken. Schädlich: Irreversible Schäden möglich bei Einatmen, Hautkontakt und Verschlucken. Von Zündquellen fernhalten – nicht Rauchen. Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe und Schutzkleidung tragen. Bei Unfall oder Unwohlsein sofort einen Arzt zuziehen (wenn möglich dieses Etikett vorzeigen).

Wässrige Eosinlösung. Vorsicht: Die Substanz ist noch nicht vollständig geprüft.

Xylen ist SCHÄDLICH. Entzündlich. Schädlich bei Einatmen und Kontakt mit der Haut. Reizt die Haut. Kontakt mit den Augen vermeiden.

VERFAHREN

PROBENNAHME:

Es wird empfohlen, die Probenahme gemäß NCCLS-Dokument M29-A2 durchzuführen. Keine Testmethode kann eine absolute Gewähr dafür liefern, dass Blut- und Gewebeproben keine Infektionen übertragen. Deshalb müssen alle Blutderivate und Gewebeproben als potenziell infektiös behandelt werden.

Die notwendigen Einzelheiten zur Probenahme und Aufbewahrung sind Standard-Histologiewerken zu entnehmen.^{4,5}

SPEZIELL ERFORDERLICHE, ABER NICHT MITGELIEFERTER MATERIALIEN:

Eosin Y Lösung Gegenfärbemittel:

Alkoholisch, Bestell-Nr. HT110-1, Wässrig, Bestell-Nr. HT110-2 oder Alkoholisch mit Phloxin, Bestell-Nr. HT110-3.

Reagenzalkohol ODER Ethanol, 100 %

Scotts Leitungswasserersatz-Konzentrat, Bestell-Nr. S 5134

Xylen oder Xylenersatz

Mikroskop, mikroskopische Objektträger, Deckgläser und Färbeschalen

HINWEISE:

- Die in der Packungsbeilage angegebenen Zeiten sind Richtwerte. Die persönlichen Vorlieben können unterschiedlich sein und die Zeiten können den persönlichen Vorlieben angepasst werden. Färbelösungen, die oft verwendet werden, verlieren ihre Färbekraft; deshalb sollte die Färbedauer verlängert oder eine neue Lösung verwendet werden.⁶
- Es können verdünnte Alkalilösungen anstelle von warmem Leitungswasser verwendet werden. Damit wird die für das Färbeverfahren benötigte Zeit verkürzt. Bei Verwendung einer verdünnten Alkalilösung die Objektträger zusätzliche 2–3 Minuten unter fließendem Leitungswasser waschen, bevor mit der Eosinfärbung weitergefahren wird.
- Einige Leitungswasserzusätze sind säurehaltig und eignen sich deshalb nicht für die "Blaufärbung" dieses Verfahrens. Falls das Leitungswasser säurehaltig ist, eine verdünnte Alkalilösung verwenden.
- Violette oder rot-braune Kerne weisen auf eine mangelhafte "Blaufärbung" hin.
- Falls die Eosinfärbung übermäßig ausfällt, kann die Zellkernfärbung maskiert sein. Eine korrekte Eosinfärbung weist einen 3-Ton-Effekt auf. Die Eosindifferenzierung kann durch eine Verlängerung der Zeit im Alkohol oder durch die Verwendung eines erstgradigen Alkohols mit einem höheren Wassergehalt erhöht werden. Die Zeiten im Alkohol können angepasst werden, um den entsprechenden Grad der Eosinfärbung zu erreichen.
- Die Arbeitsfärbelösung täglich filtern. Die Alkohole und Xylen/Xylenersatz täglich abwechseln.
- Es wird nicht empfohlen, den Arbeitslösungen von Mayers Hämatoxylin oder Eosin neue Stammlösungen zuzugeben.
- Eine übermäßige Wasserübertragung in Mayers Hämatoxylin-Lösung sollte vermieden werden.
- In jedem Durchlauf sollten positive Objektträger-Kontrollen getestet werden.
- Die aus diesem Verfahren gewonnenen Daten dienen nur als Hilfe zur Diagnose und sollten im Zusammenhang mit anderen klinischen Diagnostiktests und Informationen überprüft werden.

VERFAHREN 1:

HÄMATOXYLIN- UND EOSIN-FÄRBUNG

- Eine 95 % Alkohollösung durch Zugabe von 5 ml entionisiertem Wasser zu 95 ml Reagenzalkohol, Nr. R 8382, oder Ethanol (100 %) zubereiten.
- Zu Wasser deparaffinieren oder die gefrorenen Schnitte fixieren und hydrieren.
- In Mayers Hämatoxylin-Lösung färben. 15 Minuten
- Unter warmem, fließendem Leitungswasser spülen. 15 Minuten
- In destilliertes Wasser stellen. 30 Sekunden
- Bei Verwendung von alkoholischem Eosin:
In Reagenzalkohol, 95 %, stellen. 30 Sekunden
- In ein Eosin Y Lösung Gegenfärbemittel stellen:
Alkoholisch, Bestell-Nr. HT110-1,
Wässrig, Bestell-Nr. HT110-2
oder Alkoholisch mit Phloxin, Bestell-Nr. HT110-3. 30–60 Sekunden

8. Dehydrieren und mit zwei Durchgängen der folgenden Substanzen reinigen:
95 % Reagenzalkohol, absoluter Reagenzalkohol und Xylenje 2 Minuten
9. Mit einem harzhaltigen Fixiermittel fixieren.

VERFAHREN 2:

NUKLEÄRE GEGENFÄRBUNG FÜR BESTIMMTE FÄRBUNGEN

1. Das individuelle Färbeverfahren durchführen.
2. In entionisiertem Wasser spülen.
3. In Mayers Hämatoxylin-Lösung 1–5 Minuten färben.
4. Unter fließendem Leitungswasser oder in verdünnter Alkalilösung spülen, bis die Kerne blau sind.
5. In entionisiertem Wasser spülen.
6. Falls das Färbemittel alkohollösliche Bestandteile aufweist, in einem wässrigen Fixiermittel fixieren. Falls das Färbemittel alkoholunlöslich ist, in Alkohol dehydrieren, in Xylen oder einem Xylenersatz reinigen und in einem harzhaltigen Fixiermittel fixieren.

LEISTUNGSMERKMALE

ERWARTETE ERGEBNISSE

Das Zellkernchromatin sollte blau sein. Die Nukleoli sollten sichtbar sein. Das Zellplasma weist verschiedene Schattierungen von rosa bis rosa-orange auf (je nach verwendeter Gegenfärbung), und die roten Blutzellen erscheinen rot.

Falls sich die beobachteten Ergebnisse von den erwarteten Ergebnissen unterscheiden, bitte den technischen Kundendienst von Sigma-Aldrich verständigen.

LITERATURANGABEN

1. Conn's Biological Stains, 9th ed., RD Lillie, Editor, Williams and Wilkins Co., Baltimore (MD), pp 468, 472, 1977
2. Mayer P. (1903) Notiz über Hämatein und Hämalaun. Zeitschrift für wissenschaftliche Mikroskopie und für mikroskopische Technik, 20, 409
3. Theory and Practice of Histological Techniques, 2nd ed., Bancroft JD and Stevens A, Editors, Churchill Livingstone, New York (NY), page 111, 1982
4. Theory and Practice of Histotechnology, 2nd ed., Sheehan DC, Hrapchak BB, Editors, CV Mosby Co, St Louis (MO) 1980
5. Laboratory Methods in Histotechnology of the Armed Forces Institute of Pathology, 4th ed., Prophet EB, Mills B, Arrington JB and Sobin LH, Editors, American Registry of Pathology, Washington DC 1992
6. Theory and Practice of Histological Techniques, Edited by Bancroft JD and Gamble, M, Churchill Livingstone, New York, 2002, p129

Sigma-Aldrich, Inc. gewährleistet, dass ihre Produkte mit den Angaben in dieser und anderen Sigma-Aldrich-Publikationen übereinstimmen. Der Anwender entscheidet selbst über die Eignung des Produkts für den jeweiligen Einsatzzweck. Es können zusätzliche Geschäftsbedingungen gelten. Weitere Informationen zu den Verkaufsbedingungen finden Sie auf der Rückseite der Rechnung oder des Lieferscheins.

Verfahren Nr. MHS
Vorherige Ausgabe: 2003-05
Revidiert: 2003-09



AR-MED Ltd., Runnymede Malthouse
Egham, TW20 9BD Großbritannien

SIGMA-ALDRICH, INC.

3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103 USA +1 314 771 5765

Technischer Kundendienst: R-Gespräch +1 314 771 3122

oder Email an clintech@sial.com

Bestellungen: R-Gespräch +1 314 771 5750

www.sigma-aldrich.com

SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH

Postfach 1120, 89552 Steinheim, Deutschland 49-7329-970