

POUŽITÍ

Reagenty Periodic Acid Schiff (PAS) jsou určeny k použití "v diagnostice in vitro".

Barvicí postup Sigma-Aldrich PAS nabízí standardní a mikrovlnný postup pro demonstraci lymfocytů a mukopolysacharidů. Barvicí vzor lymfocytů je užitečný při terapeutickém rozhodování v daných případech lymfocytické leukémie. Reakce PAS v tkáňových řezech je užitečná pro prokázání mukopolysacharidů. Postup trávení diastázou (α -amylázou) následující po barvení PAS je užitečnou pomůckou při diagnostifikování poruch ukládání glykogenu.

Barvicí postup PAS lze rovněž použít pro prokázání organizmů plísni v tkáňových řezech.²

Glykoly se při úpravě kyselinou jodistou oxidují na aldehydy. Po reakci s Schiffovým reagentem (směs pararosanilinu a metabisulfitu siidného), se uvolňuje pararosanilinový addukt, který barví buněčné komponenty obsahující glykol.¹ Reakci lze provést na krevních filmech nebo filmech kostní dřevě, tkáňových preparátech nebo tkáňových řezech.^{2,3} Pokud se používá na filmech krve nebo kostní dřevě, může být tento test užitečný v rozpoznání některých případů erytroleukémie a akutní lymfoblastické leukémie.⁴

Trávení diastázou (α -amylázou) lze využít jako pomůcky při diagnóze poruch ukládání glykogenu. Diastáza hydrolyzuje škrob, glykogen a degradační produkty vytvářené v polysacharidech přítomných v tkáni. Vedlejší produkty trávicího procesu se před barvením PAS smyjí.⁵

Sigma-Aldrich postupy včetně technik s PAS techniques se urychlují v mikrovlnných troubách.⁶⁻⁸

REAGENCIE

ROZTOK KYSELINY JODISTÉ, katalogové č. 395-1

Kyselina jodistá, 1 g/dl.

SCHIFFOVO REAGENS, katalogové č. 395-2

Pararosanilin HCl, 1 % a metabisulfit sodný, 4 %, v kyselině chlorovodíkové, 0,25 mol/l.

ROZTOK HEMATOXYLINU, GILL Č. 3, Katalogové č. GHS-3

Certifikovaný hematoxylin, 6 g/l, jodičitan sodný, 0,6 g/l, síran hlinitý, 52,8 g/l a stabilizační prostředek.

ULOŽENÍ A STABILITA:

Skladujte Periodic Acid Solution, a Schiff's Reagent v lednici (2-8 °C). Hematoxylin Solution, Gill No. 3 skladujte při pokojové teplotě (18-26 °C). Reagencie jsou stabilní po dobu použitelnosti uvedené na štítcích.

ZHORŠENÍ:

Hematoxylin Solution, Gill No. 3 zlikvidujte, pokud roztok zhedne (okysličevo vlivem vzduchu) nebo pokud zčervená (ztráta kyselosti), nebo když doba požadovaná pro vhodně zbarvení překročí dobu doporučenou v postupu o více než 5 minut.

PŘÍPRAVA:

Periodic Acid Solution, Schiff's Reagent a Hematoxylin Solution, Gill No. 3 jsou dodávány k okamžitému použití.

FORMALIN-ETHANOL FIXATIVE SOLUTION se připravuje smícháním 5 ml formaldehydu s 45 ml 95 % etanolem (reagenční alkohol). Připravujte denně čerstvé a uchovávejte těsně uzavřené.

BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ:

Je třeba dodržovat běžná bezpečnostní opatření při manipulaci s laboratorními reagenty. Odpad likvidujte v souladu se všemi místními, státními a oblastními předpisy. Viz Bezpečnostní list k materiálu, který uvádí aktuální informace o riziku, nebezpečí a bezpečnosti.

Kontrolní sklíčka PAS TISSUE-TROL jsou lidské tkáňové řezy zalité v parafínu obsahující PAS a je třeba s nimi zacházet jako s potencionálně infekčními.

US prohlášení o rizicích a bezpečnosti

Roztok kyseliny jodisté je ŽÍRAVINA. Způsobuje popáleniny. V případě kontaktu s očima, ihned promyjte velkým množstvím vody a vyhledejte lékařskou pomoc. Odstraňte okamžitě kontaminovaný oděv. Používejte vhodné ochranné oděvy, rukavice a ochranu obličeje / očí.

Schiff's Reagent je TOXICKÉ. Škodlivý při požití. Způsobuje popáleniny. Může způsobit rakovinu. V případě kontaktu s očima, ihned promyjte velkým množstvím vody a vyhledejte lékařskou pomoc. Používejte vhodné ochranné oděvy, rukavice a ochranu obličeje / očí. V případě nehody nebo pokud se necítíte dobře, vyhledejte ihned lékařskou službu (pokud možno, ukažte tento štítek). Pouze pro profesionální uživatele. Zabraňte expozici - před použitím se seznáme se zvláštními pokyny.

Roztok Hematoxylin Gill 3 je ŠKODLIVÝ. Při vdechnutí velmi jedovatý. Dráždí oči, dýchací systém a pokožku. V případě kontaktu s očima, ihned promyjte velkým množstvím vody a vyhledejte lékařskou pomoc. Používejte vhodný ochranný oděv. Zasažené orgány: Játra a ledviny.

Reagenční alkohol je HOŘLAVÝ a DRÁŽDIVÝ. Dráždí oči, dýchací systém a pokožku. Nádobu uchovávejte těsně uzavřenou. Udržujte mimo zdrojů zapálení - zákaz kouření. V případě kontaktu s očima, ihned promyjte velkým množstvím vody a vyhledejte lékařskou pomoc. Používejte vhodné ochranné oděvy.

Xylen je HOŘLAVÝ a ŠKODLIVÝ. Možné riziko poruch plodnosti. Může poškodit nenarozené dítě. Škodlivý je vdechnutím a v kontaktu s pokožkou. Dráždí dýchací systém a pokožku. Riziko vážného poškození očí. Udržujte mimo zdrojů zapálení - zákaz kouření. V případě kontaktu s očima, ihned promyjte velkým množstvím vody a vyhledejte lékařskou pomoc. Používejte vhodné ochranné oděvy, rukavice a ochranu obličeje / očí. V případě nehody nebo pokud se necítíte dobře, vyhledejte ihned lékařskou službu (pokud možno, ukažte tento štítek).

EU prohlášení o rizicích a bezpečnosti

Roztok kyseliny jodisté je ŽÍRAVINA. Způsobuje popáleniny. V případě kontaktu s očima, ihned promyjte velkým množstvím vody a vyhledejte lékařskou pomoc. Odstraňte okamžitě kontaminovaný oděv. Používejte vhodné ochranné oděvy, rukavice a ochranu obličeje / očí.

Schiff's Reagent je TOXICKÉ. Způsobuje popáleniny. Může způsobit rakovinu. V případě kontaktu s očima, ihned promyjte velkým množstvím vody a vyhledejte lékařskou pomoc. Používejte vhodné ochranné oděvy, rukavice a ochranu obličeje / očí. V případě nehody nebo pokud se necítíte dobře, vyhledejte ihned lékařskou službu (pokud možno, ukažte tento štítek). Pouze pro profesionální uživatele. Zabraňte expozici - před použitím se seznáme se zvláštními pokyny.

Roztok Hematoxylin Gill 3 je ŠKODLIVÝ. Při vdechnutí velmi jedovatý. Dráždí oči, dýchací systém a pokožku. V případě kontaktu s očima, ihned promyjte velkým množstvím vody a vyhledejte lékařskou pomoc. Používejte vhodný ochranný oděv.

Reagenční alkohol je VYSOCE HOŘLAVÝ a DRÁŽDIVÝ. Vysoce hořlavý. Dráždí oči, dýchací systém a pokožku. Nádobu uchovávejte těsně uzavřenou. Udržujte mimo zdrojů zapálení - zákaz kouření. V případě kontaktu s očima, ihned promyjte velkým množstvím vody a vyhledejte lékařskou pomoc. Používejte vhodné ochranné oděvy.

Xylen je ŠKODLIVÝ. Hořlavý. Škodlivý je vdechnutím a v kontaktu s pokožkou. Dráždí oči. Zamezte kontaktu s očima.

POSTUP

ODBĚR VZORKU:

Doporučuje se provádět odběr vzorků v souladu s dokumentem M29-A2 směrnice NCCLS. Žádná známá zkušební metoda nemůže nabídnout úplné zajištění, že krevní vzorky nebo tkáň nebudou přenášet infekci. Proto všechny krevní deriváty nebo tkáňové vzorky by měly být považovány za potenciálně infekční.

Použity mohou být čerstvě připravené celé, EDTA nebo heparinované filmy krve nebo kostní dřevě. Fixovat co nejdříve.⁴

Pro polysacharidy lze použít tkáň fixovanou v 10 % neutrálním pufovaném formalínu, Zenkera nebo Bouinův.² Je třeba upozornit na to, že karbohydráty jsou rozpustné ve vodě.³ Pro demonstraci glykogenu se doporučuje Carnoyův roztok, Gendreh roztok nebo kyselá alkoholový formalín.² Čas potřebný pro extrakci diastázy lze prodloužit, pokud je tkáň fixovaná v kyselině pikrátové s obsahem fixativa.² Tkáň je třeba nařezat na tloušťku 5 mikronů.

POTŘEBNÉ SPECIÁLNÍ MATERIÁLY, KTERÉ NEJSOU SOUČÁSTÍ DODÁVKY:

37 % roztok formaldehydu

Reagenční alkohol

Filtrovací papír Whatman č. 4

Kontrolní sklíčka PAS, například Sigma PAS TISSUE-TROL, katalogové č. P8814, je třeba je zařadit do každého cyklu

POUZE PRO POSTUP S MIKROVLNNOU TROUBOU:

Mikrovlnná trouba ACCUMATE™ H2100, katalogová č. A 9084 (110 v) nebo A 9209 (220 v)

Nádoba Coplin s ventilem ve víku

Scottův koncentrát jako náhrada vodovodní vody

α -Amyláza, typu VI-B, z pankreatu prasete (pouze pro postup extrakce diastázy)

POZNÁMKY:

Před použitím mikrovlnné trouby Sigma-Aldrich H2100 Microwave se prosím seznáme s Návodem k použití výrobce.

Krevní filmy připravené v klinicky zdravého jedince lze zahrnout pro účely kontroly. Polymorfonukleární leukocyty vykazují intenzivní červené cytoplazmatické zbarvení. Do každé prováděné barvicí sekvence je třeba zařadit tkáňové řezy, o nichž je známo, že jsou na PAS pozitivní nebo řezy obsahující glykogen. Sigma-Aldrich nabízí pro tento účel PAS TISSUE-TROL™, katalogové č. P 8814.

Údaje získané z tohoto postupu slouží pouze jako diagnostická pomůcka a měly by se prověřit ve spojení s jinými klinickými diagnostickými testy nebo informacemi.

POSTUP:

I. PREPARÁTY KRVE, KOSTNÍ DŘENĚ NEBO OTISKOVÉ TKÁŇOVÉ PREPARÁTY

Standardní postup:

1. Fixovat na vzduchu usušené krevní filmy na **1 minutu** při **pokojevé teplotě** ve fixačním roztoku formalínu a etanolu.
 2. Oplachovat sklíčka **1 minutu** v pomalu tekoucí vodě z vodovodu.
 3. Ponořit sklíčka do roztoku Periodic Acid Solution, katalogové č. 395-1, na **5 minut** při **pokojevé teplotě**.
 4. Opláchnout sklíčka v několika lázních destilované vody.
 5. Ponořit sklíčka do Schiff's Reagent, katalogové č. 395-2, na **15 minut** při **pokojevé teplotě**.
- POZNÁMKA: Ihned po použití Schiff's Reagent uzavřete a vraťte do lednice (2-8 °C).
6. Promýt sklíčka v tekoucí vodě po dobu **5 minut**.
 7. Obarvit sklíčka kontrastním barvením v roztoku Hematoxylin Solution, Gill No. 3, katalogové č. GHS-3, na **90 sekund**.
 8. Opláchnout sklíčka pod tekoucí vodou na **15-30 sekund**, usušit na vzduchu a vyhodnotit mikroskopicky pod olejovým (900x) objektivem. Sklíčka lze montovat montážním médiem na bázi toluenu nebo xylenu.

Postup s mikrovlnnou troubou:

1. Fixovat na vzduchu usušené krevní filmy při **pokojevé teplotě** na **1 minutu** ve fixačním roztoku formalínu a etanolu.
2. Oplachovat sklíčka **1 minutu** v pomalu tekoucí vodě z vodovodu.
3. Umístit sklíčka do roztoku **40 ml** kyseliny jodisté umístěné v plastové nádobě Coplin.
4. Spustit mikrovlnnou troubu na **800 wattů** na **10 sekund**.
5. Opláchnout sklíčka v několika lázních deionizované vody.
6. Umístit sklíčka do **40 ml** Schiffova reagens umístěného v plastové nádobě Coplin.

7. Spustte mikrovlnnou troubu na **800 wattů** na **15 sekund**. Smíchejte roztok pipetou nebo tyčinkou aplikátoru a inkubujte **1 minutu**.
8. Opláchněte sklíčka v tekoucí vodě po dobu **5 minut**.
9. Umístěte sklíčka do roztoku **40 ml** Hematoxylin Solution Gill No. 3 umístěné v plastové nádobě Coplin.
10. Spustte mikrovlnnou troubu na **800 wattů** na **10 sekund**.
11. Opláchněte v tekoucí vodě **1–2 minuty**, potom proveďte modření v Working Scott's Tap Water Substitute při **pokojevé teplotě**.
12. Opláchněte pod tekoucí vodou. Usušte na vzduchu.
13. Sklíčka lze montovat montážním médiem na bázi toluenu nebo xylenu.

II. TKÁŇOVÉ ŘEZY

Standardní postup:

1. Odstraňte paraffin a hydratujte řezy deionizovanou vodou.
2. Ponořte sklíčka do roztoku Periodic Acid Solution, katalogové č. 395-1, na **5 minut** při **pokojevé teplotě** (18–26 °C).
3. Opláchnout sklíčka v několika lázních destilované vody.
4. Ponořte sklíčka do Schiff's Reagent, katalogové č. 395-2, na **15 minut** při **pokojevé teplotě** (18–26 °C).
5. Promýt sklíčka v tekoucí vodě po dobu **5 minut**.
6. Proveďte kontrastní barvení sklíček v roztoku Hematoxylin Solution, Gill No. 3, katalogové č. GHS-3, na **90 sekund**.
7. Opláchněte pod tekoucí vodou.
8. Dehydratujte, očistěte a namontujte řezy montážním médiem na bázi toluenu nebo xylenu.

Mikrovlnný postup pro trávení diastázou (α -amylázou):

1. Použijte dvojité testovací sklíčka. Opatřete štítkem vždy jedno sklíčko pro trávení diastázou a jedno pro barvení pomocí PAS.
POZNÁMKA: Doporučuj se potažená sklíčka pro lepší přilnavost tkání.
Pro trávení diastázou neprovádějte celoidinizaci řezů.²
2. Odstraňte paraffin a hydratujte řezy deionizovanou vodou.
3. Připravte roztok Diastase (α -amylase) Working Solution rozpuštěním **0,2 g α -Amylase**, katalogové č. A 3176, v **40 ml** deionizované vody. Dobře promíchejte a umístěte do plastové nádoby Coplin. Připravte těsně před použitím.
4. Spustte mikrovlnnou troubu na **600 wattů** na **25 sekund**.
5. Vyjměte sklíčka z nádoby Coplin a opláchněte natrávená sklíčka v tekoucí vodě **5 minut**.
6. Použijte natrávená i nenatrávená sklíčka a pokračujte postupem s mikrovlnnou troubou, krok 2.

Postup s mikrovlnnou troubou:

1. Odstraňte paraffin a hydratujte řezy deionizovanou vodou.
2. Umístěte sklíčka do roztoku **40 ml** kyseliny jodisté umístěné v plastové nádobě Coplin. Volně přikryjte nádobu víkem nebo použijte víko s otvory.
3. Spustte mikrovlnnou troubu na **800 wattů** na **10 sekund**.
4. Opláchnout sklíčka v několika lázních deionizované vody.
5. Umístěte sklíčka do **40 ml** Schiffova reagens umístěného v plastové nádobě Coplin.
6. Spustte mikrovlnnou troubu na **800 wattů** na **15 sekund**. Smíchejte roztok pipetou nebo tyčinkou aplikátoru a inkubujte **1 minutu**.
7. Opláchněte sklíčka v tekoucí vodě po dobu **5 minut**.
8. Umístěte sklíčka do roztoku Hematoxylin, Gill No. 3 nebo do roztoku Light Green Solution umístěného v plastové nádobě Coplin.
9. Spustte mikrovlnnou troubu na **800 wattů** na **10 sekund**.
10. a. Používáte-li Gill's Hematoxylin, opláchněte sklíčka v tekoucí vodě **1–2 minuty**, potom proveďte modření ve Working Scott's Tap Water Substitute při **pokojevé teplotě**. Opláchněte pod tekoucí vodou. Dehydratujte, očistěte a namontujte.
b. Používáte-li roztok Light Green Solution, rychle opláchněte v deionizované vodě, rychle dehydratujte, očistěte a namontujte.

CHARAKTERISTIKY ÚČINNOSTI

Části pozitivní na PAS se barví růžově až červeně a jádra jsou modrá. Sklíčka upravená diastázou (α -Amylázou) nebudou mít ve srovnání s nenatrávenými glykogenovými kontrolními pozitivními sklíčky viditelně zbarvený glykogen s PAS.

Pokud se zjištěné výsledky liší od očekávaných, kontaktujte prosím technické služby společnosti Sigma-Aldrich za účelem konzultace.

REFERENCE

1. Hotchkiss RD: A microchemical reaction resulting in the staining of polysaccharide structures in fixed tissue preparations. Arch Biochem 16:131, 1948
2. Sheehan DC, Hrapchak BB: Theory and Practice Histotechnology, 2nd ed. CV Mosby, St. Louis, (MO), pp 52, 164–167, 1980
3. Culling CFA, Allison RT, Barr WT: Cellular Pathology Technique, 4th ed. Butterworths, pp 216–220, 1985
4. Davey FR, Nelson DA: Periodic Acid Schiff (PAS) Stain. IN Hematology, 2nd ed. WJ Williams, E Buetler, AJ Erslev, RW Rundles, McGraw-Hill, New York, pp 1630–1632, 1977
5. Thompson SW: Selected Histochemical and Histopathological Methods, CC Thomas, Springfield, (IL), pp 520–539, 1966
6. Leong AS-Y, Milios J: Rapid immunoperoxidase staining of lymphocyte antigens using microwave irradiation. J Pathol 148:183, 1986
7. Brinn NT: Rapid metallic histologic staining using the microwave oven. J Histotechnol 6:125, 1983
8. Valle S: Special stains in the microwave oven. J. Histotechnol 9:237, 1986

Sigma-Aldrich, Inc. garantuje, že její produkty se shodují s informacemi obsaženými v této a jiných publikacích Sigma-Aldrich. Kupující musí stanovit vhodnost produktu(ů) pro dané použití. Mohou platit dodatečné podmínky. Viz zadní strana faktury nebo útržek obalu, kde jsou uvedeny dodatky k prodejním podmínkám.

Postup č. 395
Předchozí revize: 2003-02
Revidováno: 2003-09



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

SIGMA-ALDRICH, INC.
3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103 USA 314-771-5765
Technické služby: 800-325-0250 nebo volat 314-771-3122
nebo poslat e-mail na clintech@sial.com
Objednávky: 800-325-3010 nebo volejte na 314-771-5750
www.sigma-aldrich.com

SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH
P.O. 1120, 89552 Steinheim, Německo 49-7329-970