



İÜ
ONKOLOJİ ENSTİTÜSÜ
PATOLOJİ LABORATUVARI
İMMÜNHİSTOKİMYASAL BOYAMA
TALİMATI

Doküman No: OE-PAT-PR-002/ TL-011
İlk Yayın Tarihi :03.10.2017
Revizyon No :00
Revizyon Tarihi :
Sayfa No : 1 / 2

1. Amaç

Hazırlanan kesitlerdeki özel madde, hücre, doku ve yapıları göstermeye yönelik özgün immunfenotipik yapılarına göre belirlenecek primer antikolar uygulanarak ışık mikroskopunda görünür hale getirilmesi

2. Kapsam

Patoloji laboratuvarı

3. Sorumlular

Laborant, Patolog/Patoloji Asistanı

4. Uygulamalar

- 4.1. Bütün primer antikolar, üretici firma tarafından hazırlanmış olan bilgi formlarına göre işleme tabi tutulur.
- 4.2. Çalışılacak her antikor için veri sayfasında önerilen pozitif kontrol bloğu bulunur.
- 4.3. Çalışılacak blok ve pozitif kontrol bloğundan yaklaşık 5 mikron kalınlığında kesitler alınır.
- 4.4. Pozitif kontrol kesiti lamın bizotajlı kısmına gelecek şekilde, çalışma kesiti ise lamın üst kısmına gelecek şekilde sudan lama alınır.
- 4.5. Kesitlerin deparafinizasyonu için etüvde 30 dk. bekletilir.
- 4.6. Boyama işlemine başlamadan önce lamlar sırasıyla ksilol'de 3 kere 10'ar dakika, 96°'lik etil alkolde 2 kere 5 dakika bekletilerek distile suya alınır.
- 4.7. Formalin fiksasyonu ile oluşan gizlenmiş antijenik bölgelerin açığa çıkarılması amacıyla Antijen Retrieval Reagent ile ön muamele yapılır. Bu işlem için Citrat Buffer solüsyonu ya da EDTA Buffer solüsyonu kullanılır. Eğer pepsin uygulaması varsa antijen retrieval reagent ile muameleden önce, tripsin uygulaması varsa antijen retrieval reagent ile muameleden sonra yapılır.
- 4.8. Antijen retrieval işlemi mikrodalga fırında 5 dakika yüksek ısı, 10 dakika orta ısı, 10 dakika düşük ısı uygulanır ve daha sonra yaklaşık 20-25 dakika oda ısısında soğumaya bırakılır.
- 4.9. Soğuyan lamlar distile suya alınır ve kesitlerin etrafı pappen kalemi ile çizilerek 5 dakika Fosfatla Tamponlanmış Solüsyon'da (FTS) (Phosphate Buffer Solution- PBS) bekletilir.

HAZIRLAYAN:

GÖZDEN GEÇİREN:

ONAYLAYAN:

SÜREÇ SORUMLUSU

KALİTE TEMSİLCİSİ

BAŞHEKİM



İÜ
ONKOLOJİ ENSTİTÜSÜ
PATOLOJİ LABORATUVARI
İMMÜNHİSTOKİMYASAL BOYAMA
TALİMATI

Doküman No: OE-PAT-PR-002/ TL-011
İlk Yayın Tarihi :03.10.2017
Revizyon No :00
Revizyon Tarihi :
Sayfa No : 2 / 2

- 4.10.** Endojen peroksidaz aktivitesinin önlenmesi için kesitler 10 dakika %3'lük hidrojen peroksit (H_2O_2) solüsyonu ile inkübe edilir. Süre sonunda lamlar 2 dakika FTS'de bekletilir.
- 4.11.** Zemin boyasını önlemek için kesitler 15 dakika blokaj solüsyonu ile inkübe edilir. Süre sonunda lamlar FTS'de 2 dakika bekletilir.
- 4.12.** Primer antikolar damlatılır. Belirlenen süre sonunda lamlar 2 dakika FTS'de bekletilir.
- 4.13.** Primer antikora bağlanacak olan sekonder antikor solüsyonu damlatılır ve 20 dakika inkübe edilir. Süre sonunda lamlar 2 dakika FTS'de bekletilir.
- 4.14.** Sekonder antikora bağlanacak olan peroksidaz-streptavidin solüsyonu damlatılır ve 20 dakika inkübe edilir. Süre sonunda lamlar 2 dakika FTS'de bekletilir.
- 4.15.** 2 ml. AEC (Amino Ethyl Carvasol) solüsyonu ve orijinal ambalajındaki damlalığı ile 1 damla kromojen solüsyonu damlatılarak ile hazırlanan karışım lamlarının üzerine damlatılır. En az 5 dakika , en fazla 10 dakika inkübasyon yapılır ve kesitlerin boyanma oranı gözlemlenir, boyanma görünür hale geldiğinde işlem sonlandırılır.
- 4.16.** Lamlar distile su ile yıkanır.
- 4.17.** Lamlar 3 dakika Mayer Hematoksilen'inde bekletildikten sonra distile su ile yıkanır.
- 4.18.** 5 dakika distile suda bekletilir.
- 4.19.** Lamlar filtre kağıdının üzerine alınır. Kuruması beklenir.
- 4.20.** Tüm preparatlar su bazlı kapatma malzemesiyle kapatılır.
- 4.21.** 5 dakika kurutma kağıdı üzerinde kurutulur.

HAZIRLAYAN:	GÖZDEN GEÇİREN:	ONAYLAYAN:
SÜREÇ SORUMLUSU	KALİTE TEMSİLCİSİ	BAŞHEKİM