



HISTOSONDA MMP9 (MATRIX METALOPROTEINASA 9)

Referencia: CBM-0032-R5

Ensayo para 5 reacciones individuales en un único vial. 65µl por reacción

Clasificación del producto:
"Países miembros de la Unión Europea
"Para Utilización en el Diagnóstico In Vitro"

INTRODUCCIÓN

En la matriz extracelular existen proteínas estructurales (fibronectina, laminina, colágenos fibrilares, etc...) y proteínas no estructurales.

Las Matrix Metaloproteinasas son proteínas no estructurales de la matriz extracelular que tienen función proteínica. Han sido conocidas anteriormente con múltiples nombres tales como colagenasas, gelatinasas, matrilisina, estromelina, etc..

Las Matrix Metaloproteinasas tienen funciones en la remodelación de la matriz extracelular y se ha demostrado su implicación en procesos tales como la reorganización tisular en situaciones de estrés y de heridas y en el desarrollo embrionario en distintas etapas.

Últimamente se está demostrando su implicación en la progresión, infiltración y metástasis de los tumores malignos epiteliales formando parte de la compleja relación tumor/estroma.

Con hibridación "in situ" se comprueba la producción de RNA de distintas metaloproteinasas en células estromales peritumorales con un patrón que es variable dependiendo del tipo tumoral y del tejido implicado salvo la MMP7 que es producida por la célula tumoral epitelial.

FINALIDAD PREVISTA

Para su uso en diagnóstico in Vitro
La Histosonda MMP9 es útil para la detección de células productoras de MMP9 en tejidos no tumorales y tumorales.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

La Histosonda MMP9 ha sido diseñada para su utilización en el diagnóstico in vitro para uso profesional y debe ser manipulado por personal cualificado y debidamente entrenado.
Para la obtención de unos resultados adecuados, deben seguirse fielmente las instrucciones del manual. Cualquier cambio en las temperaturas o tiempos indicados, o en cualquier otro paso del proceso, puede dar lugar a resultados erróneos.

COMPONENTES

1 tubo con el contenido suficiente de la Histosonda MMP9 para 5 reacciones individuales.
La Histosonda MMP9 consiste en tres fragmentos de DNA de una sola cadena complementaria al RNA que se expresa de esta proteína y tienen longitudes de 490, 444 y 475 nucleótidos. Esta sonda ha sido marcada con Digoxigenina.

CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO

Los reactivos suministrados se almacenan a temperatura 3-7°C hasta la fecha de caducidad indicada en su etiqueta. No utilizar el producto después de la fecha de caducidad indicada en su etiqueta.

MUESTRAS

Cualquier corte de un bloque de parafina en el cual se desee estudiar la presencia de RNA de la MMP9. Cortes de 4-6 micrómetros de espesor son adecuados para el estudio.
El corte es preferible que sea reciente (no más de treinta días) aunque los resultados del ensayo no se ven afectados por la antigüedad del bloque. Se han realizado estudios en las instalaciones del fabricante utilizando bloques de parafina de 20 años de antigüedad con óptimos resultados.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Las muestras en las que se observe expresión de la MMP9 deberán mostrar una coloración marrón en el

citoplasma celular que contrastará sobre el fondo azul-violeta que confiere la tinción con hematoxilina. El facultativo valorará los resultados en base a su experiencia a partir de la visualización de las señales observadas en la muestra, en paralelo con las señales observadas en las muestras de control positivo y control negativo para la expresión de este gen.

LIMITACIONES DEL ENSAYO

La Histosonda MMP9 ha sido optimizada para detectar la expresión de su RNA en tejidos fijados en formol e incluidos en parafina. No se recomienda la utilización de otro tipo de muestras o de técnicas de preparación. El funcionamiento del producto ha sido validado utilizando los protocolos indicados en el manual de instrucciones.

La utilización de otros procedimientos o las modificaciones de los protocolos recomendados, pueden conducir a resultados erróneos.
Los resultados de este ensayo deben ser evaluados por el facultativo en combinación con el resto de datos clínicos del paciente de los que se disponga. Para la obtención de unos resultados óptimos y reproducibles es muy importante ajustarse rigurosamente a las condiciones de tiempos y temperaturas indicadas en el procedimiento.

BIBLIOGRAFÍA

1. Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer*. 2002 Mar;2(3):161-74.
2. Kitoh T, Yanai H, Saitoh Y, Nakamura Y, Matsubara Y, Kitoh H, et al. Increased expression of matrix metalloproteinase-7 in invasive early gastric cancer. *J Gastroenterol*. 2004;39(5):434-40.
3. Zeng ZS, Shu WP, Cohen AM, Guillem JG. Matrix metalloproteinase-7 expression in colorectal cancer liver metastases: evidence for involvement of MMP-7 activation in human cancer metastases. *Clin Cancer Res*. 2002 Jan;8(1):144-8.
4. Duffy MJ, Maguire TM, Hill A, McDermott E, O'Higgins N. Metalloproteinases: role in breast carcinogenesis, invasion and metastasis. *Breast Cancer Res*. 2000;2(4):252-7.
5. Overall CM, Lopez-Otin C. Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era. *Nat Rev Cancer*. 2002 Sep;2(9):657-72.

INSTRUCCIONES DE USO

Para la utilización de las sondas marcadas con Digoxigenina.

PRINCIPIO DEL MÉTODO

La Hibridación In Situ Cromogénica (CISH), es una técnica utilizada para determinar la presencia de una secuencia de ADN o ARN, o estudiar la expresión de un gen así como la evaluación simultánea de la morfología del tejido mediante el uso de microscopía de campo claro.

La sonda marcada, de secuencia conocida, se hibrida con su diana en el tejido problema. Esta unión se detecta mediante un proceso inmunohistoquímico. Las histosondas, cuya diana es el RNA mensajero, están destinadas a hacer visibles los genes que se expresan detectando la expresión génica.

Protocolo de HistoSonda

Para mayor información incluyendo Preguntas más Frecuentes y Apoyo Técnico por favor consulte el Manual Técnico completo de HistoSonda.

Antes de comenzar, precaliente la cámara húmeda a 62°C.

1. Desparafinación

1. Caliente los portaobjetos a 62°C durante 10mins utilizando una placa caliente o un incubador.
2. Introduzca los portaobjetos en el siguiente orden en:
 - a. Xileno: 10 mins
 - b. Xileno: 5mins
 - c. Alcohol absoluto (etanol o isopropanol): 1min X 2 veces
 - d. Alcohol 96%: 1min X 3 veces
 - e. Metanol con 0.3% H₂O₂ o 3% H₂O₂ solo : 5mins
3. Lave energicamente los portaobjetos con agua (destilada o corriente), manténgalos en agua 1min.

1b. Inhibición de uniones inespecíficas de DNA (opcional)

Por lo general este paso no es necesario, a menos que el tejido que vaya a hibridar contenga una gran cantidad de leucocitos polimorfonucleares eosinófilos (generalmente médula ósea y tejidos gástricos).

1. Introducir los portaobjetos en agua destilada hirviendo durante **30 segundos** e inmediatamente transfíralos a agua destilada a temperatura ambiente.

¡ Importante: un tratamiento térmico excesivo puede provocar una tinción de fondo. Saque los portaobjetos de manera inmediata. !

2. Desproteinización

1. Preparar una dilución de Proteinasa K comercial a una concentración de 0,033 mg/ml en PBS pH 7.4.
2. Retire el exceso de agua de cada portaobjetos con un pañuelo de papel.
3. Cubra el tejido con 200µl de Proteinasa K e incube en una cámara húmeda exactamente 10mins a temperatura ambiente.
4. Lave energicamente con agua.
5. Introduzca los portaobjetos en PBS pH 7.4 durante 2mins.

¡ (Importante): si los cortes han sido tratados previamente con calor en microondas, use la Proteinasa K sólo durante 5 minutos, ya que este tratamiento sensibiliza mucho los tejidos para esta enzima. **Las médulas óseas requieren una digestión de 20 min a 55°C con Proteinasa K tras su tratamiento con calor. !**

3. Incubación con la sonda

1. Retire el exceso de buffer del portaobjetos con un pañuelo de papel.
2. Añada 65µl de la sonda al corte asegurándose de que todo el tejido queda cubierto y de que no quedan burbujas de aire.
3. Coloque los cristales en posición horizontal en una cámara húmeda y cierre bien.
4. Incube a 62°C durante 1 h.
5. Si no dispone de una cámara húmeda apropiada, ponga una gota (65µl) de sonda sobre un cubreobjetos de 24x50 mm y colóquelo sobre el tejido. Selle los bordes del cubreobjetos con pegamento. Incube en una estufa a 62°C o en una placa caliente durante una hora. Después de la incubación, retire con cuidado el pegamento y el cubreobjetos y continúe con el protocolo.

4. Lavado de la sonda

¡ La solución de la sonda es muy viscosa debido a las grandes cantidades de dextrano que contiene. Es **muy importante** lavar bien los cristales para asegurarse de que la solución de la sonda es completamente retirada. !

1. Lave la superficie del tejido vigorosamente con PBS pH 7.4 para retirar toda la sonda.
2. Agite en PBS durante 5mins.

5. Revelado de la sonda

Protocolo para el revelado manual de la sonda. Como alternativa puede utilizar un aparato automático de inmunohistoquímica.

1. Retire el exceso de buffer de los cortes como anteriormente.
2. Cubra el tejido con 100 µl de Anti-Digoxina (no suministrado con este producto) e incube en una cámara húmeda durante 30mins a temperatura ambiente.
3. Lave energicamente con PBS, y agite en PBS pH 7.4 y agite en PBS durante 1min.
4. Retire el exceso de buffer de los cortes.
5. Ponga una gota de un polímero comercial HRP (no suministrado con este producto) que reconozca el anticuerpo primario utilizado sobre el tejido (suficiente para cubrir todo el tejido 50-100µl) e incube en una cámara húmeda siguiendo las instrucciones del fabricante.
6. Lave vigorosamente con PBS, agite en PBS durante 1min.
7. Retire el exceso de buffer de los tejidos y aplique una dilución de Diaminobenzidina (DAB) comercial siguiendo las instrucciones del fabricante.
8. Lave con agua.
9. Tiña los cortes brevemente (2-3secs) con hematoxilina Harris diluida al 50% en agua.
10. Lave con agua, deshidrate y haga el montaje de los cristales siguiendo los protocolos habituales del laboratorio.

Fecha de emisión: 23/08/2016



HISTOSONDA MATRIX METALLOPROTEINASE 9 (MMP9)

Reference: CBM-0032-R5

Assay of one vial for 5 individual reactions. 65µl for reaction.

Product classification:

*EU countries
"For In Vitro Diagnostics"

INTRODUCTION

The extracellular matrix is composed of structural proteins (fibronectin, laminin, fibrous collagens etc) and non-structural proteins.

The Matrix Metalloproteinases are non-structural extracellular matrix proteins that function as proteases. They have been previously known by many names such as collagenases, gelatinases, matrilysin, stromelysin etc.

The Matrix Metalloproteinases function in remodelling of the extracellular matrix and have been implicated in processes such as the tissular reorganisation in stress or injury and also in different phases of embryonic development.

Recently the Matrix Metalloproteinases have been implicated in progression, infiltration and metastasis of malignant epithelial tumours, forming part of the complex tumoural-stromal relationship.

In situ hybridisation allows RNA production of various metalloproteinases to be visualised in peritumoural stromal cells whose pattern is dependent on tumoural type and tissue (apart from MMP7 which is produced by tumoural epithelial cells).

INTENDED USE

For use in In Vitro Diagnosis.
HistoSonda MMP9 is useful for the detection of cells producing MMP9 in tumoural and non-tumoural tissues.

WARNINGS AND PRECAUTIONS

HistoSonda MMP9 has been designed for professional use in In Vitro Diagnosis and must be manipulated by qualified and accordingly trained personnel. In order to obtain the best results, the instructions contained in the manual must be followed. Any change to the indicated temperatures, times or any other step of the process can lead to poor results.

COMPONENTS

1tube with the necessary amount of HistoSonda MMP9 for developing 5 single reactions.
HistoSonda MMP9 consists of fragments of single-stranded DNA complementary to expressed RNA with a lengths of 490, 444 and 475 nucleotides. This probe has been labeled with Digoxigenin.

STORAGE CONDITIONS

Supplied reagents are stored at 3-7°C until expiration date. Do not use after expiration date.

SAMPLES

Any paraffin block section in which MMP9 RNA presence is to be studied. Sections of 4-6 micrometers in width are sufficient to conduct the study. Preferably, the cut should be recent (no more than thirty days old). Assay results are not affected by block age. Studies have been carried out in the manufacturers' laboratories using 20 year old paraffin blocks with optimal results.

INTERPRETATION OF RESULTS

Samples in which MMP9 expression is observed will show a brownish color in the cell cytoplasm, which will contrast over the blue-violet background given by hematoxylin staining. The pathologist will evaluate the results according to their experience, drawing conclusions from the staining of the sample, in parallel with the staining observed in the positive and negative controls.

ASSAY LIMITATIONS

HistoSonda MMP9 has been optimized to detect RNA expression in formalin-fixed, paraffin-embedded

tissues. Its use is not recommended for other types of samples or preparation techniques.

The correct operation of this product has been validated using the protocols indicated in the instructions manual. The use of other procedures or the modification of the recommended protocols may lead to erroneous results.

The results from this assay must be evaluated by the pathologist in combination with the rest of available patient clinical data.

In order to obtain optimal and reproducible results it is important to rigorously maintain the time and temperature conditions indicated in the procedure.

BIBLIOGRAPHY

1. Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer*. 2002 Mar;2(3):161-74.
2. Kitoh T, Yanai H, Saitoh Y, Nakamura Y, Matsubara Y, Kitoh H, et al. Increased expression of matrix metalloproteinase-7 in invasive early gastric cancer. *J Gastroenterol*. 2004;39(5):434-40.
3. Zeng ZS, Shu WP, Cohen AM, Guillem JG. Matrix metalloproteinase-7 expression in colorectal cancer liver metastases: evidence for involvement of MMP-7 activation in human cancer metastases. *Clin Cancer Res*. 2002 Jan;8(1):144-8.
4. Duffy MJ, Maguire TM, Hill A, McDermott E, O'Higgins N. Metalloproteinases: role in breast carcinogenesis, invasion and metastasis. *Breast Cancer Res*. 2000;2(4):252-7.
5. Overall CM, Lopez-Otin C. Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era. *Nat Rev Cancer*. 2002 Sep;2(9):657-72.

PROCEDURE

For Digoxigenin- labeled probes

BASIS OF THE METHOD

Chromogenic In Situ Hybridization (CISH) is a technique used to determine the presence of a DNA or RNA sequence or to study gene expression, as well as for the simultaneous evaluation of tissue morphology by white light microscopy. A labeled probe of known sequence hybridizes with its target in the tissue being studied. This hybridization is then detected by an immunohistochemical process. The HistoSondas targets are messenger RNA and they are therefore designed to detect and visualise gene expression.

HistoSonda Protocol

For further important details including FAQs and Troubleshooting please refer to the complete HistoSonda Technical Manual.

Before starting pre-heat the humid chamber to 62°C.

1. Deparaffinization

1. Heat slides at 62°C for 10mins using a hot plate or incubator.
2. Immerse slides in:
 - a. Xylene: 10 mins
 - b. Xylene: 5mins
 - c. Absolute alcohol (ethanol or isopropanol): 1min X 2
 - d. Alcohol 96%: 1min X 3
 - e. Methanol containing 0.3% H₂O₂ or 3% H₂O₂ only: 5mins
3. Wash well with distilled water, leave standing in water.

1b. Inhibition of unspecific DNA binding (optional)

Generally this step is not necessary unless the tissue to be hybridized contains a great quantity of polymorphonuclear eosinophil leukocytes (generally **bone marrow and gastric tissues**).

1. Place slides in boiling distilled water for **30 seconds** and immediately transfer to distilled water at room temp.

! Important: excess heat treatment will result in background staining. Remove slides immediately. !

2. Deproteinization

1. Prepare a dilution of any commercial Proteinase K at a work concentration of 0,033mg/ml in PBS pH 7,4.
2. Remove excess water from individual slides with tissue paper.
3. Cover tissue sections with the 200µl of Proteinase K and incubate in a humid chamber for exactly 10mins at room temp.
4. Wash well with water.
5. Transfer to PBS pH 7,4 for 2mins.

! (Important: if the slides have been boiled in the microwave previously only use Proteinase K for 5

minutes as the heat treatment will have significantly sensitized the tissue sections. **Bone marrows require a Proteinase K digestion of 20min at 55°C after heat treatment) !**

3. Incubation with the probe

1. Remove excess buffer from sections as described previously.
2. Add 65µl of probe to the tissue section ensuring the entire section is completely covered and avoiding air bubbles.
3. Place the slides in a horizontal position in a humid chamber and close well.
4. Incubate at 62°C for 1hr.
5. If no suitable humid chamber is available drop the 65µl of probe over a 24 X 50mm coverslip and place over the tissue section. Seal the edges of the coverslip with rubber cement. Incubate in a 62°C incubator or over a hot plate for 1 hour. After incubation carefully remove the rubber cement and coverslip and continue the protocol.

4. Washing the probe

! The probe solution is very viscous due to large quantities of dextran. It is very important to wash the slides well to ensure the probe solution is completely removed.!

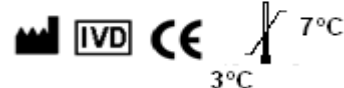
1. Wash the surface of the section vigorously with PBS pH 7.4 to remove the probe.
2. Agitate in PBS for 5mins.

5. Revealing the probe

Protocol for manual revealing of the probe. Alternatively, an automatic immunohistochemistry apparatus may be used.

1. Remove excess buffer from sections as before.
2. Cover sections with 100µl of Anti-Digoxin (not provided with this product) and incubate in a humid chamber for 30mins at room temp.
3. Wash vigorously with PBS, pH 7.4 agitate in PBS for 1min.
4. Remove excess buffer from sections.
5. Drop commercial HRP polymer (not provided with this product) that binds the primary antibody used before over the sections (enough to cover the tissue 50-100µl) and incubate in a humid chamber following the manufacturer's instructions.
6. Wash vigorously with PBS, agitate in PBS 1min.
7. Remove excess buffer from sections and apply commercial Diaminobenzidine (DAB) following the manufacturer's instructions.
8. Wash with water.
9. Counter stain the sections briefly (2-3secs) with Harris hematoxylin diluted 50% in water.
10. Wash with water, dehydrate and cover slip following normal laboratory protocols.

Emission date: 23/08/2016



Manufacturer: CENBIMO S.L.
C/Doctor Iglesias Otero s-n
27004-Lugo, Spain