

**Dako
Mayer's Hematoxylin
(Lillie's Modification)
Histological Staining Reagent**

Code S3309

Ready-to-use

Intended use

For In Vitro diagnostic use.

This histological staining reagent is suitable for visualization of nuclei in tissue sections and cell preparations. This reagent does not contain alcohol and is suitable for use with all chromogens commonly used in immunohistochemical (IHC) applications. It may also be used for routine Hematoxylin and Eosin staining.

Refer to Dako's *General Instructions for Immunohistochemical Staining* for: 1) Principle of Procedure, 2) Materials Required, Not Supplied, 3) Storage, 4) Specimen Preparation, 5) Staining Procedure, 6) Quality Control, 7) Troubleshooting, 8) Interpretation of Staining, 9) General Limitations.

Summary and explanation

Hematoxylin is extracted from the heartwood of the logwood tree, Haemotoxylon campechianum, a species native to Central America. Some 300 years ago, Robert Hooke mentioned using logwood as a coloring material for fluids, but it was not until the 1860s that hematoxylin solutions were used for histologic staining.¹

Hematoxylin solutions contain hematein and a metal mordant. The mordant provides the stain color. In the case of Mayer's Hematoxylin (Lillie's modification), the hematoxylin contains aluminum, giving a blue color.

Hematoxylin may be used as a progressive or as a regressive stain. For histochemical purposes, the progressive staining is commonly used. Slides are left in the hematoxylin solution only long enough to stain the nuclei. After staining, tissues are blued in water that has been slightly alkalinized.

Reagent provided

500 mL of Mayer's Hematoxylin (Lillie's Modification) provided ready-to-use. Mayer's Hematoxylin (Lillie's Modification) contains hematoxylin (5 g/L), aluminum ammonium sulfate (45 g/L), glycerin (30%), sodium iodate (0.2 g/L), pH2.4 in an aqueous solution.

Materials required, but not supplied

Nuclear counterstain for IHC stains

1. Bluing reagent (NH₄OH, 0.08% in deionized water)
2. Aqueous mounting medium (Faramount, code S3025; Ultramount, code S1964; or permanent mounting media)
3. Microscope
4. Microscope slides
5. Coverslips
6. Staining apparatus

Hematoxylin and eosin stains

1. Eosin solution counterstain
2. Reagent alcohol
3. Scott's tap water substitute
4. Xylene or xylene substitute
5. Microscope
6. Microscope slides
7. Coverslips
8. Staining apparatus

Precautions

1. For professional users.
2. Incubation times or temperatures other than those specified may give erroneous results.
3. The user must validate any changes made to the factory-released procedure.
4. Wear appropriate Personal Protective Equipment to avoid contact with eyes and skin.
5. Unused solution should be disposed of according to local, State and Federal regulations.

Specimen preparation

Filter before each use. No additional preparation is required.

Note: Lillie's Modification contains 5x concentration of Hematoxylin found in Mayer's Hematoxylin. Each laboratory should optimize the concentration of Hematoxylin for their system.

Storage

Store Mayer's Hematoxylin (Lillie's Modification) in original container at room temperature. If the staining power is in question, add a few drops of hematoxylin to 50 mL of tap water. When the hematoxylin is good, the water will turn a bright, clear purple or blue-violet color. Exhausted solutions will not be clear and bright. The color will be rusty or green.

Do not use after expiration date stamped on vial. If reagents are stored under any conditions other than those specified, the conditions must be verified by the user.² There are no obvious signs to indicate instability of this product. Therefore, positive and negative controls should be run simultaneously with patient specimens. If unexpected staining is observed which cannot be explained by variations in laboratory procedures and a problem with the product is suspected, contact Dako Technical Support.

Staining procedure*Nuclear counterstain for IHC stains*

1. Complete individual staining procedure. Rinse slide(s) with deionized water.
2. Stain tissue sections or cell preparations for 30–60 seconds with hematoxylin.
3. Rinse with water to remove excess reagent.
4. Place in bluing reagent (alkaline solution such as a weak ammonia solution, 0.08% in water) until stain is blue (approximately 30 seconds).
5. Rinse in deionized water.
6. Sections can be mounted in aqueous mounting media (Faramount, code S3025; Ultramount, code S1964; or permanent mounting media). For permanent mounting, dehydrate, clear and mount.

Hematoxylin and eosin stains

1. Prepare 95% alcohol solution by adding 5 mL deionized water to 95 mL reagent alcohol.
2. Deparaffinize to water or fix and hydrate frozen sections.
3. Stain tissue section(s) or cell preparation(s) for 30–60 seconds with hematoxylin.
4. Rinse with water to remove excess reagent.
5. Place in bluing reagent (alkaline solution such as a weak ammonia solution, 0.08% in water) until stain is blue (approximately 30 seconds).
6. Rinse in deionized water.
7. If alcoholic eosin is used, place slide(s) in reagent alcohol, 95% for 30 seconds.
8. Place in eosin counterstain for 30–60 seconds.
9. Dehydrate in two changes each of reagent alcohol, 95%, absolute ethanol and xylene for 1 to 2 minutes each.
10. Mount with synthetic mounting medium.

Staining interpretation

Nuclei of cells are blue.

Français

Réf. S3309

Prêt à l'emploi

Utilisation prévue

Pour utilisation diagnostique in vitro.

Ce réactif de coloration histologique convient à la visualisation des noyaux dans les coupes de tissus et les préparations cellulaires. Ce réactif ne contient pas d'alcool et est donc adapté à tous les chromogènes couramment utilisés dans les applications immunohistochimiques (IHC). Il peut également être employé pour la coloration de routine par hématoxyline et éosine.

Consulter le document *General Instructions for Immunohistochemical Staining (Instructions générales de coloration immunohistochimique)* de Dako pour : (1) Principe de procédure, (2) Matériels requis mais non fournis, (3) Conservation, (4) Préparation des échantillons, (5) Procédure de coloration, (6) Contrôle qualité, (7) Dépannage, (8) Interprétation de la coloration, (9) Limites générales.

Résumé et explication

Hematoxylin est un produit extrait du duramen de bois de campêche, *Haemotoxylon campechianum*, essence originaire d'Amérique centrale. Il y a environ 300 ans, Robert Hooke mentionnait l'utilisation de bois de campêche comme produit de coloration pour les liquides mais ce n'est que depuis les années 1860 que des solutions d'hématoxyline sont utilisées pour la coloration histologique.¹

Les solutions d'hématoxyline contiennent de l'hématéine et un mordant métallique. Ce mordant est responsable de la coloration. Dans le cas du produit Mayer's Hematoxylin (Lillie's modification), l'hématoxyline contient de l'aluminium, ce qui donne une couleur bleue.

L'hématoxyline peut être utilisée comme colorant progressif ou régressif. Il est courant d'utiliser la coloration progressive à des fins histochimiques. Les lames sont mises à tremper dans la solution d'hématoxyline assez longtemps pour colorer le noyau. Après coloration, les tissus sont bleus dans de l'eau qui a été légèrement alcalinisée.

Réactifs fournis

500 mL de Mayer's Hematoxylin (Lillie's Modification) fournis prêt à l'emploi. Mayer's Hematoxylin (Lillie's Modification) contient de l'hématoxyline (5 g/L), du sulfate d'aluminium et d'ammonium tétracosahydrate (45 g/L), de la glycérine (30 %), du iodate de sodium (0,2 g/L), de pH 2,4 dans une solution aqueuse.

Matériels requis mais non fournis

Contre-colorant nucléaire pour colorations IHC

1. Réactif de bleuissement (NH₄OH, 0,08 % dans de l'eau déionisée)
2. Milieu de montage aqueux (Faramount, réf. S3025 ou Ultramount, réf. S1964) ou milieu de montage permanent
3. Microscope
4. Lames de microscope
5. Lamelles de protection
6. Appareil de coloration

Colorants hématoxyline et éosine

1. Contre-colorant : solution d'éosine
2. Alcool réactif
3. Substitut d'eau du robinet de Scott
4. Xylène ou substitut de xylène
5. Microscope
6. Lames de microscope
7. Lamelles de protection
8. Appareil de coloration

Précautions

1. Pour utilisateurs professionnels.
2. Des temps ou températures d'incubation autres que ceux indiqués peuvent produire des résultats erronés.
3. L'utilisateur doit valider tout changement apporté à la procédure d'usine.
4. Porter un vêtement de protection approprié pour éviter le contact avec les yeux et la peau.
5. Les solutions non utilisées doivent être éliminées conformément aux réglementations locales et nationales.

Préparation des échantillons

Filtrer avant chaque utilisation. Aucune préparation supplémentaire n'est requise.

Remarque : Lillie's Modification contient 5x la concentration de l'hématoxyline présente dans Mayer's Hematoxylin. Chaque laboratoire doit optimiser la concentration d'hématoxyline pour son système.

Conservation

Conserver Mayer's Hematoxylin (Lillie's Modification) dans son conteneur d'origine à température ambiante. Si la puissance de la coloration est en cause, ajouter quelques gouttes d'hématoxyline à 50 mL d'eau du robinet. Lorsque l'hématoxyline est prête à être utilisée, l'eau prend une couleur bleu-violet à violet clair et limpide. Les solutions épuisées ne sont ni claires ni limpides. La couleur est alors rouille ou verte.

Ne pas utiliser après la date de péremption imprimée sur le flacon. Si les réactifs sont conservés dans des conditions autres que celles indiquées, celles-ci doivent être validées par l'utilisateur.² Il n'y a aucun signe évident indiquant l'instabilité de ce produit. Par conséquent, les contrôles positifs et négatifs doivent être testés en même temps que des échantillons de patient. Si une coloration inattendue est observée, ne pouvant être expliquée par des changements de procédures du laboratoire et en cas de suspicion d'un problème dans le kit, contacter l'assistance technique Dako.

Procédure de coloration*Contre-colorant nucléaire pour colorations IHC*

1. Procéder à chaque procédure de coloration. Rincer la ou les lame(s) à l'eau déionisée.
2. Colorer les coupes de tissus ou les préparations cellulaires pendant 30 à 60 secondes avec de l'hématoxyline.
3. Rincer à l'eau pour éliminer l'excès de réactif.
4. Placer dans un réactif de bleuissement (solution alcaline telle une solution d'ammoniaque peu concentrée, 0,08 % dans de l'eau) jusqu'à coloration en bleu (environ 30 secondes).
5. Rincer à l'eau déionisée.
6. Les coupes peuvent être montées dans un milieu de montage aqueux (Faramount, réf. S3025 ou Ultramount, réf. S1964) ou dans un milieu de montage permanent. Pour le montage permanent, déshydrater, laver et monter.

Colorants hématoxyline et éosine

1. Préparer une solution d'alcool à 95 % en ajoutant 5 mL d'eau déionisée à 95 mL d'alcool réactif.
2. Déparaffiner à l'eau ou fixer et hydrater les coupes congelées.
3. Colorer la ou les coupe(s) de tissus ou la ou les préparation(s) cellulaire(s) pendant 30 à 60 secondes avec de l'hématoxyline.
4. Rincer à l'eau pour éliminer l'excès de réactif.
5. Placer dans un réactif de bleuissement (solution alcaline telle une solution d'ammoniaque peu concentrée, 0,08 % dans de l'eau) jusqu'à coloration en bleu (environ 30 secondes).
6. Rincer à l'eau déionisée.
7. Si de l'éosine alcoolique est utilisée, placer la ou les lame(s) dans l'alcool réactif à 95 % pendant 30 secondes.
8. Placer dans le contre-colorant éosine pendant 30 à 60 secondes.
9. Déshydrater dans deux bains d'alcool réactif à 95 %, dans deux bains d'éthanol absolu et dans deux bains de xylène pendant 1 à 2 minutes à chaque fois.
10. Monter avec un milieu de montage de synthèse.

Interprétation de la coloration

Les noyaux des cellules se colorent en bleu.

Deutsch**Code-Nr. S3309**
Gebrauchsfertig**Verwendungszweck**

Zur In-vitro-Diagnostik.

Dieses histologische Färbereagens eignet sich für die Darstellung von Zellkernen in Gewebeschnitten und Zellpräparaten. Das Reagens ist alkoholfrei und daher für die Verwendung mit allen bei immunhistochemischen (IHC) Anwendungen üblicherweise gebrauchten Chromogenen geeignet. Es eignet sich auch für routinemäßige Färbungen mit Hämatoxylin und Eosin.

Folgende Angaben bitte den *Allgemeinen Richtlinien zur immunhistochemischen Färbung* von Dako entnehmen: 1) Verfahrensprinzipien, 2) Erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien, 3) Aufbewahrung, 4) Vorbereitung der Probe, 5) Färbeverfahren, 6) Qualitätskontrolle, 7) Fehlersuche und -behebung, 8) Auswertung der Färbung, 9) Allgemeine Beschränkungen.

Zusammenfassung und Erklärung

Hematoxylin wird aus dem Kernholz des in Mittelamerika beheimateten Blauholzbaums, *Haematoxylon campechianum*, extrahiert. Schon vor über 300 Jahren erwähnte Robert Hooke Blauholz als Material zum Färben von Flüssigkeiten, in histologischen Färbeverfahren werden Hämatoxylin-Lösungen aber erst seit Mitte des 19. Jahrhunderts eingesetzt.¹

Diese Lösungen enthalten Hämatein und ein metallisches Färbemittel. Letzteres ist für den Farbton der Färbung ausschlaggebend. Bei Mayer's Hematoxylin (Lillie's modification) enthält das Hämatoxylin Aluminium, das eine blaue Färbung hervorruft.

Hämatoxylin kann zur progressiven Färbung ebenso verwendet werden wie zur regressiven. Für histochemische Zwecke werden zumeist progressive Färbeverfahren angewandt. Dabei verbleiben die Objektträger so lange in der Hämatoxylin-Lösung, bis die Zellkerne eingefärbt sind. Nach der Färbung werden die Gewebe in leicht alkalisiertem Wasser gebläut.

Mitgelieferte Reagenzien

500 ml gebrauchsfertiges Mayer's Hematoxylin (Lillie's Modification). Mayer's Hematoxylin (Lillie's Modification) enthält Hämatoxylin (5 g/l), Aluminiumammoniumsulfat (45 g/l), Glycerin (30 %) und Natriumjodat (0,2 g/l), pH 2,4 in wässriger Lösung.

Erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien*Zellkern-Gegenfärbung für IHC-Färbungen*

1. Bläuungsreagenz (NH₄OH, 0,08 % in entionisiertem Wasser)
2. Fixiermittel zur Fixierung im wässrigen Medium (Faramount, Code-Nr. S3025, Ultramount, Code-Nr. S1964 bzw. permanente Fixiermittel)
3. Mikroskop
4. Objektträger
5. Deckgläser
6. Färbungsautomat

Hämatoxylin- und Eosin-Färbungen

1. Gegenfarbstoff Eosinlösung
2. Reagenzalkohol
3. Scott Leitungswasserersatz
4. Xylol oder Xylolersatz
5. Mikroskop
6. Objektträger
7. Deckgläser
8. Färbungsautomat

Vorsichtsmaßnahmen

1. Nur für Fachpersonal bestimmt.
2. Andere als die angegebenen Inkubationszeiten bzw. -temperaturen können zu fehlerhaften Ergebnissen führen.
3. Alle Abweichungen vom unternehmensseitig freigegebenen Verfahren sind vom Anwender zu validieren.
4. Entsprechende Schutzkleidung tragen, um Augen- und Hautkontakt zu vermeiden.
5. Nicht verwendete Lösung ist entsprechend örtlichen, bundesstaatlichen und staatlichen Richtlinien zu entsorgen.

Vorbereitung der Probe

Vor jedem Gebrauch filtrieren. Es ist keine weitere Zubereitung notwendig.

Hinweis: Lillie's Modification enthält das in Mayer's Hematoxylin verwendete Hämatoxylin in 5facher Konzentration. Die optimale Hämatoxylinkonzentration sollte vom jeweiligen Labor selbst ermittelt werden.

Aufbewahrung

Mayer's Hematoxylin (Lillie's Modification) in der Originalverpackung bei Raumtemperatur aufbewahren. Bei Zweifeln hinsichtlich der Färbungskraft einige Tropfen Hämatoxylin zu 50 ml Leitungswasser geben. Ist das Hämatoxylin verwendbar, nimmt das Wasser eine helle, klar violette oder blau-violette Farbe an. Abgelaufene Lösungen sind nicht mehr hell und klar, sondern rostfarben oder grünlich gefärbt.

Nach Ablauf des auf dem Fläschchen aufgedruckten Verfallsdatums nicht mehr verwenden. Werden die Reagenzien nicht entsprechend den angegebenen Bedingungen aufbewahrt, müssen die Bedingungen vom Anwender geprüft werden.² Es gibt keine sichtbaren Anzeichen für eine Instabilität dieses Produkts. Positiv- und Negativkontrollen sollten daher zur gleichen Zeit wie die Patientenproben getestet werden. Falls es zu einer unerwarteten Färbung kommt, die sich nicht aus Unterschieden bei Laborverfahren erklären lässt und auf ein Problem mit dem Kit hindeutet, muss der technische Kundendienst von Dako verständigt werden.

Färbeverfahren

Zellkern-Gegenfärbung für IHC-Färbungen

1. Das jeweilige Färbeverfahren durchführen. Den/die Objektträger mit entionisiertem Wasser spülen.
2. Gewebeschnitte oder Zellpräparate 30–60 Sekunden mit Hämatoxylin einfärben.
3. Reagenzienüberschuss mit Wasser abspülen.
4. Etwa 30 Sekunden bis zur Blaufärbung in Bläuungsreagenz (alkalische Lösung, beispielsweise schwache wässrige Ammoniaklösung, 0,08 %) einlegen.
5. Mit entionisiertem Wasser spülen.
6. Zur Fixierung der Schnitte können sowohl wässrige (Faramount, Code-Nr. S3025 bzw. Ultramount, Code-Nr. S1964) als auch permanente Fixiermittel verwendet werden. Zur permanenten Fixierung dehydrieren, reinigen und fixieren.

Hämatoxylin- und Eosin-Färbungen









1. Durch Zugabe von 5 ml entionisiertem Wasser zu 95 ml Reagenzalkohol eine 95%ige alkoholische Lösung ansetzen.
2. In Wasser entparaffinieren bzw. Gefrierschnitte fixieren und hydrieren.
3. Gewebeschnitt(e) oder Zellpräparat(e) 30–60 Sekunden mit Hämatoxylin einfärben.
4. Reagenzienüberschuss mit Wasser abspülen.
5. Etwa 30 Sekunden bis zur Blaufärbung in Bläuungsreagenz (alkalische Lösung, beispielsweise schwache wässrige Ammoniaklösung, 0,08 %) einlegen.
6. Mit entionisiertem Wasser spülen.
7. Bei Verwendung von alkoholischem Eosin Objektträger 30 Sekunden in 95%igen Reagenzalkohol einlegen.
8. 30–60 Sekunden in Eosin gegenfärbung einlegen.
9. Zweimal je 1–2 Minute(n) in jeweils 95%igem Alkohol, absolutem Ethanol und Xylol dehydrieren.
10. Mit einem synthetischen Fixiermittel fixieren.

Auswertung der Färbung

Die Zellkerne weisen eine Blaufärbung auf.

References Bibliographie Literaturangaben


1. Sheehan DC and Hrapchak BB. Theory and practice of Histotechnology, Second edition. Battelle Press, Columbus, OH 1980
2. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988: Final Rule, 57FR7163. February 28, 1992

 Catalogue number Référence du catalogue Bestellnummer	 Temperature limitation Limites de température Zulässiger Temperaturbereich	 Consult instructions for use Consulter les instructions d'utilisation Gebrauchsanweisung beachten
 Manufacturer Fabricant Hersteller	 Batch code Code du lot Chargenbezeichnung	 Use by Utiliser jusque Verwendbar bis
 Authorized representative in the European Community Représentant Autorisé dans la Communauté Européenne Autorisierter Repräsentant in der EU	 In vitro diagnostic medical device Dispositif médical de diagnostic in vitro In-vitro-Diagnostikum	



Dako North America, Inc.
6392 Via Real
Carpinteria, California 93013 USA

Tel 805 566 6655
Fax 805 566 6688
Technical Support 800 424 0021
Customer Service 800 235 5763



Dako Denmark A/S
Produktionsvej 42
DK-2600 Glostrup Denmark

Tel +45 4485 9500
Fax +45 4485 9595

www.dako.com

PT0039/Rev C

Edition 06/10