



ZytoFast PLUS CISH Implementation Kit HRP-DAB

REF T-1063-40

40

Til procedurer med kromogen *in situ*-hybridisering (CISH)

4250380N567Z



Medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik

i henhold til IVDR (EU) 2017/746

1. Anvendelsesformål

ZytoFast PLUS CISH Implementation Kit HRP-DAB er beregnet til brug i kombination med digoxigeninmærkede ZytoFast-prober til formalinfikserede, paraffinindstøbte prøver med kromogen *in situ*-hybridisering (CISH).

Produktet må kun anvendes af faguddannet personale. Alle test med produktet skal udføres af faguddannet personale på et certificeret, godkendt patolog-anatomisk laboratorium under supervision af en patolog/humangenetiker.

2. Testprincip

Med CISH-teknikken (kromogen *in situ*-hybridisering) kan specifikke nukleinsyressekvenser i cellepræparater påvises og visualiseres. Haptenmærkede nukleotidfragmenter, såkaldte CISH-prober, og deres komplementære målsekvenser i præparaterne co-denatureres og renatureres efterfølgende under hybridisering. Derefter fjernes uspecifikke og ubundne probefragmenter med stringente vasketrin. Duplexdannelse af den mærkede probe kan visualiseres med primære (umærkede) antistoffer, der påvises med sekundære polymeriserede enzymkonjugerede antistoffer. Den enzymatiske reaktion med kromogene substrater fører efterfølgende til dannelse af farvede præcipitater. Efter kontrastfarvning af kernen med en kernefarve visualiseres hybridiserede probefragmenter med lysmikroskopi.

3. Leverede reagenser

ZytoFast PLUS CISH Implementation Kit HRP-DAB fås i én størrelse og består af:

Kode	Komponent	Mængde 40	Beholder
PT2	Heat Pretreatment Solution EDTA	500 ml	Flaske med skruelåg (stor)
ES1	Pepsin Solution	4 ml	Pipetteflaske, hvidt låg
WB5	20x Wash Buffer TBS	4x 50 ml	Flaske med skruelåg
AB1	Mouse-Anti-Dig	4 ml	Pipetteflaske, pink låg
AB2	Anti-Mouse-HRP-Polymer	4 ml	Pipetteflaske, violet låg
SB1a	DAB Solution A	0,3 ml	Pipetteflaske, grønt låg (lille)
SB1b	DAB Solution B	10 ml	Pipetteflaske, gråt låg
CS2	Nuclear Blue Solution	20 ml	Flaske med skruelåg, sort
MT4	Mounting Solution (alcoholic)	4 ml	Glasflaske, brun
	Brugsanvisning	1	

T-1063-40 (40 test): Komponenterne **ES1**, **AB1**, **AB2**, **SB1a-b**, **CS2** og **MT4** er tilstrækkelige til 40 reaktioner. Komponent **PT2** er tilstrækkelig til 7 farvebeholdere af 70 ml hver. Komponent **WB5** er tilstrækkelig til 57 farvebeholdere af 70 ml hver.

4. Nødvendige materialer, der ikke medfølger

- Digoxigeninmærket ZytoFast CISH-probe
- Positivt og negativt kontrolvæv
- Objektglas, positivt ladet
- Vandbad (55 °C, 98 °C)
- Hybridizer eller varmeplade
- Hybridizer eller fugtighedskammer i hybridiseringsovn
- Justerbare, kalibrerede pipetter (10 µl, 1000 µl)
- Farvebeholdere eller -bade
- Timerur
- Kalibreret termometer
- Ethanol eller reagensalkohol
- Xylen
- Methanol 100 %
- Hydrogenperoxid (H₂O₂) 30 %
- Afioniseret eller destilleret vand
- Coverslips (22 mm x 22 mm, 24 mm x 32 mm)
- Gummiment, f.eks. Fixogum Rubber Cement (prod. nr. E-4005-50/-125) eller tilsvarende
- Tilstrækkeligt vedligeholdt lysmikroskop (100-200x)

5. Opbevaring og håndtering

Opbevares lodret ved 2-8 °C. Returneres til opbevaring umiddelbart efter brug. Reagenserne må ikke anvendes efter udløbsdatoen, som er angivet på etiketten. Produktet er stabilt indtil udløbsdatoen, som er angivet på etiketten, når det behandles korrekt.

6. Advarsler og forsigtighedsregler

- Læs brugsanvisningen før brug!
- Brug ikke reagenserne efter udløbsdatoen!
- Dette produkt indeholder stoffer (i lave koncentrationer og små mængder), som er sundhedsskadelige. Undgå direkte kontakt med reagenserne. Tag de nødvendige forholdsregler (brug engangshandsker, sikkerhedsbriller og laboratoriekitter!).
- Rapportér alle alvorlige hændelser i forhold til produktet til producenten og den kompetente myndighed i henhold til lokale regler!
- Hvis reagenserne kommer i kontakt med huden, skal der straks skylles med rigelige mængder vand!
- Der kan rekvireres et sikkerhedsdatablad til faguddannede brugere.
- Reagenserne må ikke genbruges, medmindre det udtrykkeligt er tilladt!
- Undgå krydskontaminering af prøver, da det kan føre til forkerte resultater.
- Prøverne må ikke tørre ud under hybridiserings- og vasketrinene.

Fare- og sikkerhedssætninger for AB1, AB2, PT2 og WB5:

Den farebestemmende komponent er en reaktionsmasse af: 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EF nr. 247-500-7] og 2-methyl-2H-isothiazol-3-one [EF nr. 220-239-6] (3:1).

**Advarsel**

H317	Kan forårsage allergisk hudreaktion.
P261	Undgå indånding af pulver/røg/gas/tåge/damp/spray.
P272	Tilsmudset arbejdstøj bør ikke fjernes fra arbejdspladsen.
P280	Bær beskyttelseshandsker/beskyttelsestøj/øjensbeskyttelse/ansigtsbeskyttelse.
P302+P352	VED KONTAKT MED HUDEN: Vask med rigeligt vand.
P333+P313	Ved hudirritation eller udslet: Søg lægehjælp.
P362+P364	Forurenet tøj tages af og vaskes, før det bruges igen.

Fare- og sikkerhedssætninger for CS2:

Den farebestemmende komponent er ethandiol, ethylenglycol.

**Advarsel**

H373	Kan forårsage nyreskader ved længerevarende eller gentagen eksponering ved indtagelse.
P260	Indånd ikke pulver/røg/gas/tåge/damp/spray.
P314	Søg lægehjælp ved ubehag.

Fare- og sikkerhedssætninger for MT4:

Den farebestemmende komponent er xylen.

**Advarsel**

H226	Brandfarlig væske og damp.
H312+H332	Farlig ved indånding og ved hudkontakt.
H315	Forårsager hudirritation.
H319	Forårsager alvorlig øjenirritation.
H335	Kan forårsage irritation af luftvejene.
H373	Kan forårsage organskader ved længerevarende eller gentagen eksponering.
P210	Holdes væk fra varme/gnister/åben ild/varme overflader og andre antændelseskilder. Rygning forbudt.
P260	Indånd ikke pulver/røg/gas/tåge/damp/spray.
P280	Bær beskyttelseshandsker/beskyttelsestøj/øjensbeskyttelse/ansigtsbeskyttelse.
P305+P351+P338	VED KONTAKT MED ØJNE: Skyl forsigtigt med vand i flere minutter. Fjern eventuelle kontaktlinser, hvis dette kan gøres let. Fortsæt skylning.
P337+P313	Ved vedvarende øjenirritation: Søg lægehjælp.
P403+P235	Opbevares på et godt ventileret sted. Opbevares køligt.
EUH208	Indeholder methyl 2-methylprop-2-enoat; methyl 2-methylpropenoat; methylmethacrylat. Kan udløse en allergisk reaktion.

Fare- og sikkerhedssætninger for SB1a:

Den farebestemmende komponent er biphenyl-3,3',4,4'-tetraayltetraamine; diaminobenzidine.

**Fare**

H350	Kan være kræftfremkaldende.
P201	Indhent særlige anvisninger før brug.
P202	Anvend ikke produktet, før alle advarsler er læst og forstået.
P280	Bær beskyttelseshandsker/beskyttelsestøj/øjensbeskyttelse/ansigtsbeskyttelse.
P308+P313	VED eksponering eller mistanke om eksponering: Søg lægehjælp.
P405	Opbevares under lås.

Fare- og sikkerhedssætninger for SB1b:

Den farebestemmende komponent er imidazol; en reaktionsmasse af: 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EF nr. 247-500-7] og 2-methyl-2H-isothiazol-3-one [EF nr. 220-239-6] (3:1).

**Fare**

H317	Kan forårsage allergisk hudreaktion.
H360D	Kan skade det ufødte barn.
P201	Indhent særlige anvisninger før brug.
P261	Undgå indånding af pulver/røg/gas/tåge/damp/spray.
P280	Bær beskyttelseshandsker/beskyttelsestøj/øjensbeskyttelse/ansigtsbeskyttelse.
P302+P352	VED KONTAKT MED HUDEN: Vask med rigeligt vand.
P308+P313	VED eksponering eller mistanke om eksponering: Søg lægehjælp.
P362+P364	Forurenet tøj tages af og vaskes, før det bruges igen.

Specialmærkning af ES1:

EUH208	Indeholder Pepsin A. Kan udløse en allergisk reaktion.
EUH210	Der kan rekvireres et sikkerhedsdatablad.

7. Begrænsninger

- Til *in vitro*-diagnostisk brug.
- Må kun anvendes af faguddannet personale.
- Kun til ikke-automatisk brug.
- Den kliniske fortolkning af positiv farvning eller fravær af positiv farvning skal udføres på baggrund af klinisk anamnese, morfologi, andre histopatologiske kriterier samt andre diagnostiske test. Det er en kvalificeret patolog/humangenetikers ansvar at være bekendt med de ISH-prober, reagenser, diagnostikpaneler og metoder, som anvendes til at producere det farvede præparat. Farvning skal udføres på et certificeret, godkendt laboratorium under supervision af en patolog/humangenetik, som er ansvarlig for at gennemgå de farvede objektglas og sikre, at der er tilstrækkeligt med positive og negative kontroller.
- Farvningen af prøver, især signalintensitet og baggrundsfarvning, er afhængig af håndteringen og behandlingen af prøven før farvning. Forkert fiksering, nedfrysning, optøning, vask, tørring, opvarmning, snit eller kontaminering med andre prøver eller væsker kan give artefakter eller falske resultater. Inkonsekvente resultater kan skyldes variationer i fikserings- og indstøbningsmetoder samt uregelmæssigheder i selve prøven.
- Ydeevnen blev valideret med de procedurer, som er beskrevet i brugsanvisningen til den respektive ZytoVision-probe og -implementeringskit. Ændringer i disse procedurer kan ændre ydeevnen og skal valideres af brugeren. Dette *in vitro*-diagnostiske udstyr er kun certificeret som CE, når det anvendes som beskrevet i denne brugsanvisning og inden for anvendelsesformålet.

8. Interfererende stoffer

Følgende fikseringsmidler er uforligelige med ISH:

- Bouin-fikseringsmiddel
- B5-fikseringsmiddel
- Sure fikseringsmidler (f.eks. pikrinsyre)
- Zenker-fikseringsmiddel
- Alkoholer (anvendt alene)
- Kviksølvchlorid
- Formaldehyd/zink-fikseringsmiddel
- Hollande-fikseringsmiddel
- Ikke-bufferet formalin

9. Præparering af prøver

Anbefalinger:

- Undgå krydskontaminering af prøver, da det kan føre til forkerte resultater.
- Fiksering i 10 % neutralt bufferet formalin i 24 timer ved stuetemperatur (18-25 °C).
- Prøvestørrelse $\leq 0,5 \text{ cm}^3$.
- Brug paraffin af bedste kvalitet.
- Indstøbning skal udføres ved temperaturer under 65 °C.
- Præparer mikrotomsnit på 3-5 μm .
- Brug positivt ladede mikroskopobjektglas.
- Fiksér vævssnit i 2-16 timer ved 50-60 °C.

10. Forberedende behandling af produktet

20x Wash Buffer TBS (WB5) skal præpareres i henhold til anvisningerne i 11. "Analyseprocedure". Alle andre kitreagenser er klar til brug. Rekonstitution, blanding eller fortynding er ikke nødvendig.

11. Analyseprocedure

Forberedende trin

- (1) *(Valgfrit) Præparer en ethanolserie (70 %, 90 % og 100 % ethanolopløsninger):* Fortynd 100 % ethanol med afioniseret eller destilleret vand. Disse opløsninger kan opbevares i passende beholdere og kan genbruges.
- (2) *Heat Pretreatment Solution EDTA (PT2):* Opvarm til 98 °C i en tildækket farvebeholder.
- (3) *Præparering af 1x Wash Buffer TBS:* Fortynd 1 del 20x Wash Buffer TBS (WB5) i 19 dele afioniseret eller destilleret vand.
Fortyndet 1x Wash Buffer TBS er stabil i én uge ved opbevaring ved 2-8 °C.
- (4) *1x Wash Buffer TBS:* Opvarm til 55 °C i en tildækket farvebeholder i forbindelse med stringent vask.
- (5) *ZytoFast CISH-probe:* Bringes til hybridiseringstemperatur før brug, og bland omhyggeligt.
- (6) *Præparering af 3 % H_2O_2 :* Fortynd 1 del 30 % H_2O_2 i 9 dele 100 % metanol.
- (7) *Mouse-Anti-DIG (AB1), Anti-Mouse-HRP-Polymer (AB2), DAB Solution A (SB1a), DAB Solution B (SB1b), Nuclear Blue Solution (CS2), Mounting Solution (alcoholic) (MT4):* Bringes til stuetemperatur (18-25 °C) før brug.

Forbehandling (afvoksning/proteolyse)

- (1) Inkuber objektglassene i 10 min. ved 70 °C (f.eks. på en varmeplade).
- (2) Inkuber objektglassene til 2x i 5 min. i xylene.
- (3) Inkuber objektglassene til 3x i 3 min. i 100 % ethanol.
- (4) Inkuber objektglassene i 5 min. i 3 % H_2O_2 .
- (5) Vask objektglassene 2x i 1 min. i afioniseret eller destilleret vand ved stuetemperatur.
- (6) Anvend (drypvis) Pepsin Solution (ES1) til prøven, og inkuber i 10-30 min. ved 37 °C i et fugtighedskammer.

ES1 kan danne præcipitater, hvilket ikke påvirker kvaliteten.

Generelt anbefaler vi, at der fastslås et optimalt tidspunkt til proteolyse i forprøver.

- (7) Nedsenk objektglassene i afioniseret eller destilleret vand ved stuetemperatur.
- (8) Inkuber i 15 min. i forvarmet Heat Pretreatment Solution EDTA (PT2) ved 98 °C.

Brug otte objektglas pr. farvebeholder (tilføj dummyobjektglas om nødvendigt).

- (9) Nedsenk objektglassene i afioniseret eller destilleret vand ved stuetemperatur.
- (10) *(Valgfrit) Dehydrering i:* 70 %, 90 % og 100 % ethanol, hver i 1 min.
- (11) Lufttør snittene.

Bemærk: Sørg for at tørre snittene helt før probeapplikation.

Denaturering og hybridisering

- (1) Pipetter 10 μl af ZytoFast CISH-proben på hver forbehandlede prøve.
 - (2) Tildæk prøverne med en 22 mm x 22 mm coverslip (undgå luftbobler), og forsegl coverslip.
- Vi anbefaler gummiment (f.eks. Fixogum) til forsegling.*
- (3) Anbring objektglassene på en varmeplade eller en hybridizer, og denaturer prøverne i 5 min. ved 75 °C.
 - (4) Overfør objektglassene til et fugtighedskammer, og hybridiser (f.eks. i en hybridiseringsovn) i 1 time ved 37 °C for prober målrettet DNA* eller 55°C for prober målrettet RNA*.

** Se brugsanvisningerne, der følger med proben. Det er ekstremt vigtigt, at prøverne ikke tørrer ud under hybridiseringstrinnet.*

Posthybridisering og påvisning

- (1) Fjern forsigtigt gummimenten eller limen.
- (2) Fjern coverslip ved at nedsænke objektglassene i 1x Wash Buffer TBS ved stuetemperatur i 5 min.
- (3) Vask objektglassene i 5 min. i 1x Wash Buffer TBS ved 55 °C.
Brug otte objektglas pr. farvebeholder (tilføj dummyobjektglas om nødvendigt).
- (4) Vask objektglassene i 5 min. i 1x Wash Buffer TBS ved stuetemperatur.
- (5) Anvend Mouse-anti-DIG (AB1) (1-2 dråber pr. objektglas) på objektglassene, og inkuber i 30 min. ved 37 °C i et fugtighedskammer.
- (6) Vask objektglassene 3x i 1 min. i 1x Wash Buffer TBS ved stuetemperatur.
- (7) Anvend Anti-Mouse-HRP-Polymer (AB2) (1-2 dråber pr. objektglas) på objektglassene, og inkuber i 30 min. ved 37 °C i et fugtighedskammer.
- (8) Vask objektglassene 3x i 1 min. i 1x Wash Buffer TBS ved stuetemperatur.
- (9) Præparer DAB Solution (brugsopløsning): Fyld 1 ml DAB Solution B (SB1b) i et måleglas, og tilføj én dråbe (30 μl) DAB Solution A (SB1a). Bland godt.
- (10) Anvend DAB Solution (1-2 dråber pr. objektglas) på objektglassene, og inkuber i 20 min. ved 37 °C i et fugtighedskammer.
- (11) Vask objektglassene 3x i 1 min. i afioniseret eller destilleret vand ved stuetemperatur.
- (12) Brug Nuclear Blue Solution (CS2) til at kontrastfarve prøverne i 2-5 min.
- (13) Overfør objektglassene til en farvebeholder, og vask i 2 min. under rindende koldt vand fra hanen.
- (14) Dehydrer 3x i 30 sek. i 100 % ethanol (brug meget rent ethanol).
- (15) Inkuber objektglassene til 2x i 30 sek. i xylene (brug meget ren xylene).
- (16) Lufttør i ca. 2 min.
- (17) Undgå luftbobler, og tildæk prøverne med en coverslip (22 mm x 22 mm; 24 mm x 32 mm) ved hjælp af Mounting Solution (alcoholic) (MT4). Lad der gå 20-30 min., så coverslip kan blive immobiliseret.

Pipetteringsprocessen kan llettes ved at bruge en pipettespids, som er klippet af for at gøre åbningen større.

- (18) Evaluer farveprøverne ved hjælp af lysmikroskopi.

12. Fortolkning af resultater

Ved hjælp af ZytoFast PLUS CISH Implementation Kit HRP-DAB vises hybridisering af digoxigeninmærkede oligonukleotider som brune præcipitater. Brug af Nuclear Blue Solution (CS2) til at kontrastfarve prøverne vil resultere i, at kerner farves en lys violet-blå.

Afhængigt af hvilken ZytoFast-probe der anvendes, bliver der fundet en positiv reaktivitet i målcellerne i enten cytoplasmaen eller i kernen. Du kan finde en mere detaljeret beskrivelse af det forventede signalmønster i den brugsanvisning, der følger med ZytoFast-proben.

13. Anbefalede kvalitetskontrolprocedurer

Se brugsanvisningen til den relevante ZytoVision-probe.

14. Ydeevnekaraktistika

Se brugsanvisningen til den relevante ZytoVision-probe.

15. Bortskaffelse

Reagenserne skal bortskaffes i henhold til lokale regler.

16. Fejlfinding

Enhver afvigelse fra brugsanvisningen kan føre til dårligere farvningsresultater eller slet ingen farvning. Se www.zytovision.com for yderligere oplysninger.

Svage eller slet ingen signaler

Mulig årsag	Handling
Proteolytisk forbehandling ikke udført korrekt	Optimer pepsininkubationstid, øg eller reducer om nødvendigt
Probefordampning	Når der anvendes en hybridizer, er brug af våde streger/vandfyldte tanke obligatorisk. Når der anvendes en hybridiseringsovn, kræves der brug af fugtighedskammer. Desuden skal coverslip forsegles fuldstændigt, f.eks. med Fixogum, for at forhindre udtørring af prøven under hybridisering
Utilstrækkelig præparering af kromogent substrat	Brug en pipette i stedet for at præparere farvesubstrater med drypning
Kontrastfarvningstid for lang	Undgå mørk kontrastfarvning, da det kan skjule positive farvnings signaler
Bluing af kontrastfarvning ikke udført korrekt	Brug koldt vand fra hanen til bluing; brug ikke lunkent eller varmt vand eller bluing-reagenser

Signaler bliver svagere eller smelter sammen

Mulig årsag	Handling
Der er anvendt en uegnet monteringsopløsning	Brug kun den monteringsopløsning, som følger med kittet eller anbefales i brugsanvisningen. Brug opløsninger, som er fri for urenheder; brug ikke coverslip-tape

Ujævn eller visse steder meget let farvning

Mulig årsag	Handling
Ufuldstændig afvoksning	Brug friske opløsninger; kontrollér afvoksningstider
Reagensvolumen for lille	Sørg for, at reagensvolumen er stort nok til at dække vævsområdet

Uensartede resultater

Mulig årsag	Handling
Utilstrækkelig tørring før probeapplikation	Forlæng lufttørring
For meget vand/vaskebuffer på væv før applicering af pepsin, antistoffer og/eller farvesubstrater	Sørg for, at overskydende væske fjernes fra vævssnittet ved at duppe eller ryste den af objektglasset. Små mængder overskydende vand/vaskebuffer interfererer ikke med testen
Variationer i vævsfikserings- og indstøbningsmetoder	Optimer fikserings- og indstøbningsmetoder

Variationer i vævssnits tykkelse	Optimer snittene
----------------------------------	------------------

Morfologi nedbrudt

Mulig årsag	Handling
Celle- eller vævsprøve er ikke korrekt fikseret	Optimer fikseringstid og fikseringsmiddel
Proteolytisk forbehandling ikke udført korrekt	Optimer pepsininkubationstid

Støjende baggrund

Mulig årsag	Handling
Snit tørret ud på et tidspunkt under eller efter hybridisering	Undgå, at snittene tørrer ud; brug fugtighedskammer; forsegl coverslip korrekt
Lang substratinkubationstid	Forkort substratinkubationstid
Ufuldstændig afvoksning	Brug friske opløsninger; kontrollér varighed af afvoksning
Proteolytisk forbehandling ikke udført korrekt	Optimer pepsininkubationstid
Objektglas nedkølet til stuetemperatur før hybridisering	Overfør objektglassene hurtigt til hybridiseringstemperatur

Overlappende signaler

Mulig årsag	Handling
Upassende tykkelse af vævssnit	Præparer mikrotomsnit på 3-5 µm

Prøver glider af objektglasset

Mulig årsag	Handling
Proteolytisk forbehandling for stærk	Forkert pepsininkubationstid

17. Litteratur

- Isola J, Tanner M (2004) *Methods Mol Med* 97: 133-44.
- Speel EJ, et al. (1994) *J Histochem Cytochem* 42: 1299-307.
- Tsukamoto T, et al. (1991) *Int J Dev Biol* 35: 25-32.
- Wilkinson DG: In Situ Hybridization, A Practical Approach, Oxford University Press (1992) ISBN 0 19 963327 4.

18. Revision



www.zytovision.com

Se www.zytovision.com for de nyeste brugsanvisninger samt brugsanvisninger på forskellige sprog.

Vores eksperter kan besvare dine spørgsmål.

Kontakt help@zytovision.com



ZytoVision GmbH
Fischkai 1
27572 Bremerhaven/Tyskland
Telefon: +49 471 4832-300
Fax: +49 471 4832-509
www.zytovision.com
E-mail: info@zytovision.com

Varemærker:

ZytoVision® og ZytoFast® er varemærker tilhørende ZytoVision GmbH.