



## ZytoDot CISH Implementation Kit

REF C-3018-40

Για χρήση σε διαδικασίες χρωμογόνου *in situ*  
υβριδισμού (CISH)

4250380N397Z



In vitro διαγνωστικό ιατροτεχνολογικό προϊόν  
σύμφωνα με τον Κανονισμό IVDR (κανονισμό για τα in vitro  
διαγνωστικά ιατροτεχνολογικά προϊόντα) (ΕΕ) 2017/746

### 1. Προβλεπόμενη χρήση

Το ZytoDot CISH Implementation Kit προορίζεται για χρήση σε συνδυασμό με επισημασμένους με διγοξιγενίνη ανιχνευτές ZytoDot σε σταθεροποιημένα με φορμαλίνη και ενσωματωμένα σε παραφίνη δείγματα μέσω χρωμογόνου *in situ* υβριδισμού (CISH).

Το προϊόν προορίζεται μόνο για επαγγελματική χρήση. Όλες οι δοκιμές που χρησιμοποιούν το προϊόν πρέπει να εκτελούνται σε πιστοποιημένο, αδειοδοτημένο εργαστήριο παθολογικής ανατομικής από εξειδικευμένο προσωπικό, υπό την επίβλεψη παθολογοανατόμου/γενετιστή.

### 2. Αρχή της δοκιμής

Η τεχνική χρωμογόνου *in situ* υβριδισμού (CISH) επιτρέπει την ανίχνευση και την οπτικοποίηση συγκεκριμένων αλληλουχιών νουκλεϊκών οξέων σε κυτταρικά παρασκευάσματα. Θραύσματα νουκλεοτιδίων επισημασμένα με απτένιο, οι λεγόμενοι ανιχνευτές CISH (χρωμογόνου *in situ* υβριδισμού), και οι συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στόχου στα παρασκευάσματα συν-μετουσιώνονται και στη συνέχεια αφήνονται να ανόπτονται κατά τη διάρκεια του υβριδισμού. Κατόπιν, τα μη ειδικά και μη δεσμευμένα θραύσματα ανιχνευτή αφαιρούνται με αυστηρά βήματα πλύσης. Ο σχηματισμός διπλής όψης του επισημασμένου ανιχνευτή μπορεί να οπτικοποιηθεί, χρησιμοποιώντας πρωτεύοντα (μη μαρκαρισμένα) αντισώματα, τα οποία ανιχνεύονται από δευτερογενή πολυμερισμένα συζευγμένα με ένζυμα αντισώματα. Η ενζυματική αντίδραση με χρωμόνα υποστρώματα οδηγεί στον σχηματισμό έγχρωμων ιζημάτων. Μετά την αντιχρώση του πυρήνα με μια πυρηνική χρωστική, τα υβριδισμένα θραύσματα ανιχνευτή οπτικοποιούνται με μικροσκοπία φωτός.

### 3. Παρεχόμενα αντιδραστήρια

Το ZytoDot CISH Implementation Kit διатиθεται σε ένα μέγεθος και αποτελείται από τα εξής:

Κωδικός	Συστατικό	Ποσότητα	Δοχείο
		Σ 40	
PT2	Heat Pretreatment Solution EDTA	500 ml	Μπουκάλι με βιδωτό καπάκι (μεγάλο)
ES1	Pepsin Solution	4 ml	Σταγονομετρικό φιαλίδιο, λευκό πώμα
WB1	Wash Buffer SSC	560 ml	Μπουκάλι με βιδωτό καπάκι (μεγάλο)
WB4	PBS/Tween	2x	Συσκευασία από αλουμίνιο
BS1	Blocking Solution	4 ml	Σταγονομετρικό φιαλίδιο, πορτοκαλί πώμα
AB1	Mouse Anti-Dig	4 ml	Σταγονομετρικό φιαλίδιο, ροζ πώμα
AB2	Anti-Mouse-HRP-Polymer	4 ml	Σταγονομετρικό φιαλίδιο, βιολέ πώμα
SB1a	DAB Solution A	0,3 ml	Σταγονομετρικό φιαλίδιο, πράσινο πώμα
SB1b	DAB Solution B	10 ml	Σταγονομετρικό φιαλίδιο, γκριζό πώμα
CS1	Mayer's Hematoxylin Solution	20 ml	Μπουκάλι με βιδωτό καπάκι, μαύρο
MT4	Mounting Solution (alcoholic)	4 ml	Γυάλινο μπουκάλι, καφέ
	Οδηγίες χρήσης	1	

**C-3018-40 (40 τεστ):** Τα συστατικά **ES1, BS1, AB1, AB2, SB1a-b, CS1,** και **MT4** επαρκούν για 40 αντιδράσεις. Το συστατικό **PT2** επαρκεί για 7 δοχεία χρώσης των 70 ml το καθένα. Το συστατικό **WB1** επαρκεί για 8 δοχεία χρώσης των 70 ml το καθένα. Το συστατικό **WB4** επαρκεί για 28 δοχεία χρώσης των 70 ml το καθένα.

### 4. Υλικά που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται

- Ανιχνευτής χρωμογόνου *in situ* υβριδισμού (CISH) ZytoDot
- Δείγματα θετικών και αρνητικών ιστών
- Πλακίδια μικροσκοπίου, θετικά φορτισμένα
- Υδατόλουτρο (80°C, 98°C)
- Υβριδιστής ή θερμαινόμενη πλάκα
- Υβριδιστής ή θάλαμος υγρασίας σε φούρνο υβριδισμού
- Ρυθμιζόμενες πιπέττες (10 µl, 1000 µl)
- Δοχεία ή λουτρά χρώσης
- Χρονόμετρο
- Βαθμονομημένο θερμόμετρο
- Αιθανόλη ή αλκοόλη αντιδραστήριου
- Ξυλένιο
- Μεθανόλη 100%
- Υπεροξείδιο του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 30%
- Απιονισμένο ή απεσταγμένο νερό
- Καλυπτήρες (22 mm x 22 mm, 24 mm x 32 mm)
- Ελαστικό τσιμεντοειδές, π.χ., Fixogum Rubber Cement (Αρ. Προϊόντος E-4005-50/-125) ή παρόμοιο
- Επαρκώς συντηρημένο μικροσκοπιοφωτός (400-630x)

### 5. Αποθήκευση και χειρισμός

Φυλάσσεται στους 2-8 °C σε όρθια θέση. Επαναφέρετε στις συνθήκες αποθήκευσης αμέσως μετά τη χρήση. Μη χρησιμοποιείτε αντιδραστήρια μετά την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στην ετικέτα. Το προϊόν είναι σταθερό μέχρι την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στην ετικέτα, εφόσον γίνεται ανάλογος χειρισμός.

## 6. Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις

- Διαβάστε τις οδηγίες χρήσης πριν από τη χρήση!
- Μη χρησιμοποιείτε τα αντιδραστήρια μετά την ημερομηνία λήξης!
- Αυτό το προϊόν περιέχει ουσίες (σε χαμηλές συγκεντρώσεις και όγκους) που είναι επιβλαβείς για την υγεία. Αποφύγετε οποιαδήποτε άμεση επαφή με τα αντιδραστήρια. Λάβετε κατάλληλα προστατευτικά μέτρα (χρησιμοποιήστε γάντια μίας χρήσης, προστατευτικά γυαλιά και ρούχα εργαστηρίου)!
- Αναφέρετε κάθε σοβαρό περιστατικό που έχει συμβεί σχετικά με το προϊόν στον κατασκευαστή και την αρμόδια αρχή σύμφωνα με τους τοπικούς κανονισμούς!
- Εάν τα αντιδραστήρια έρθουν σε επαφή με το δέρμα, ξεπλύνετε αμέσως το δέρμα με άφθονη ποσότητα νερού!
- Κατόπιν αιτήματος διατίθεται για τον επαγγελματία χρήστη ένα δελτίο δεδομένων ασφαλείας υλικού.
- Μην επαναχρησιμοποιείτε αντιδραστήρια, εκτός εάν η επαναχρησιμοποίηση επιτρέπεται ρητά!
- Αποφύγετε τη διασταυρούμενη μόλυνση των δειγμάτων, καθώς αυτό μπορεί να οδηγήσει σε λανθασμένα αποτελέσματα.
- Τα δείγματα δεν πρέπει να αφήνονται να στεγνώσουν κατά τη διάρκεια των βημάτων υβριδισμού και πλήσης.

### Δηλώσεις επικινδυνότητας και προφύλαξης για τα BS1, AB1, AB2, PT2, and WB1:

Το συστατικό που προσδιορίζει τον κίνδυνο είναι μείγμα των εξής: 5-χλωρο-2-μεθυλο-4-ισοθειοαζολίνη-3-όνη [ΕΚ αρ. 247-500-7] και 2-μεθυλο-2Η-ισοθειοαζολίνη-3-όνη [ΕΚ αρ. 220-239-6] (3:1).



#### Προειδοποίηση

- H317 Μπορεί να προκαλέσει αλλεργική δερματική αντίδραση.
- P261 Αποφεύγετε να αναπνέετε σκόνη/αναθυμιάσεις/αέρια/σταγονίδια/ατμούς/εκνεφώματα.
- P272 Τα μολυσμένα ενδύματα εργασίας δεν πρέπει να βγαίνουν από τον χώρο εργασίας.
- P280 Φοράτε προστατευτικά γάντια/προστατευτικά ενδύματα/μέσα προστασίας ματιών/προσώπου.
- P302+P352 ΣΕ ΠΕΡΙ ΠΤΩΣΗΣ ΕΠΑΦΗΣ ΜΕ ΤΟ ΔΕΡΜΑ: Πλύνετε με άφθονο νερό.
- P333+P313 Εάν παρατηρηθεί ερεθισμός του δέρματος ή εμφανιστεί εξάνθημα: Λάβετε ιατρική συμβουλή/προσοχή.
- P362+P364 Βγάλτε τα μολυσμένα ρούχα και πλύνετε τα πριν τα επαναχρησιμοποιήσετε.

### Δηλώσεις επικινδυνότητας και προφύλαξης για το SB1a:

Το συστατικό που καθορίζει τον κίνδυνο είναι η διφαινυλο-3,3',4,4'-τετραϋλοτετραμίνη διαμινοβενζινίνη.



#### Κίνδυνος

- H350 Μπορεί να προκαλέσει καρκίνο.
- P201 Εφοδιαστείτε με τις ειδικές οδηγίες πριν από τη χρήση.
- P202 Μην το χειρίζεστε, έως ότου διαβάσετε και κατανοήσετε όλες τις προφυλάξεις ασφαλείας.
- P280 Φοράτε προστατευτικά γάντια/προστατευτικά ενδύματα/μέσα προστασίας ματιών/προσώπου.
- P308+P313 Σε περίπτωση έκθεσης ή ανησυχίας: Λάβετε ιατρική συμβουλή/προσοχή.
- P405 Φυλάσσεται κλειδωμένο.

### Δηλώσεις επικινδυνότητας και προφύλαξης για το SB1b:

Το συστατικό που προσδιορίζει τον κίνδυνο είναι το ιμιδαζόλιο, μια μάζα αντίδρασης των: 5-χλωρο-2-μεθυλο-4-ισοθειοαζολίνη-3-όνη [ΕΚ αρ. 247-500-7] και 2-μεθυλο-2Η-ισοθειοαζολίνη-3-όνη [ΕΚ αρ. 220-239-6] (3:1).



#### Κίνδυνοι

- H317 Μπορεί να προκαλέσει αλλεργική δερματική αντίδραση.
- H360D Μπορεί να βλάψει το έμβρυο.
- P201 Εφοδιαστείτε με τις ειδικές οδηγίες πριν από τη χρήση.
- P261 Αποφεύγετε να αναπνέετε σκόνη/αναθυμιάσεις/αέρια/σταγονίδια/ατμούς/εκνεφώματα.
- P280 Φοράτε προστατευτικά γάντια/προστατευτικά ενδύματα/μέσα προστασίας ματιών/προσώπου.
- P302+P352 ΣΕ ΠΕΡΙ ΠΤΩΣΗΣ ΕΠΑΦΗΣ ΜΕ ΤΟ ΔΕΡΜΑ: Πλύνετε με άφθονο νερό.
- P308+P313 Σε περίπτωση έκθεσης ή ανησυχίας: Λάβετε ιατρική συμβουλή/προσοχή.
- P362+P364 Βγάλτε τα μολυσμένα ρούχα και πλύνετε τα πριν τα επαναχρησιμοποιήσετε.

### Δηλώσεις επικινδυνότητας και προφύλαξης για το MT4:

Το συστατικό που προσδιορίζει τον κίνδυνο είναι το ζυλένιο.



#### Προειδοποίηση

- H226 Υγρό και ατμοί πολύ εύφλεκτα.
- H312+H332 Επιβλαβές σε επαφή με το δέρμα ή σε περίπτωση εισπνοής.
- H315 Προκαλεί ερεθισμό του δέρματος.
- H319 Προκαλεί σοβαρό οφθαλμικό ερεθισμό.
- H335 Μπορεί να προκαλέσει ερεθισμό της αναπνευστικής οδού.
- H373 Μπορεί να προκαλέσει βλάβη στα όργανα λόγω παρατεταμένης ή επανειλημμένης έκθεσης.
- P210 Μακριά από θερμότητα, θερμές επιφάνειες, σπινθήρες, γυμνές φλόγες και άλλες πηγές ανάφλεξης. Μην καπνίζετε.
- P260 Μην αναπνέετε σκόνη/αναθυμιάσεις/αέρια/αιθάλη/ατμούς/σπέρμα.
- P280 Φοράτε προστατευτικά γάντια/προστατευτικά ενδύματα/μέσα προστασίας ματιών/προσώπου.
- P305+P351+P338 ΣΕ ΠΕΡΙ ΠΤΩΣΗΣ ΕΠΑΦΗΣ ΜΕ ΤΑ ΜΑΤΙΑ: Ξεπλύνετε προσεκτικά με νερό για αρκετά λεπτά. Αφαιρέστε τους φακούς επαφής, εάν υπάρχουν και είναι εύκολο να το κάνετε. Συνεχίστε το ξέπλυμα.
- P337+P313 Εάν ο ερεθισμός των ματιών επιμένει: Λάβετε ιατρική συμβουλή/προσοχή.
- P403+P235 Αποθηκεύεται σε καλά αεριζόμενο χώρο. Διατηρείται δροσερό.
- EUH208 Περιέχει 2-μεθυλοπροπ-2-ενοϊκό μεθυλεστέρα, 2-μεθυλοπροπ-2-ενοϊκό μεθυλεστέρα, μεθακρυλικό μεθυλεστέρα. Μπορεί να προκαλέσει αλλεργική αντίδραση.

## Δηλώσεις επικινδυνότητας και προφύλαξης για τα CS1 και WB4:

Αυτό το προϊόν δεν ταξινομείται ως επικίνδυνο σύμφωνα με τον Κανονισμό (ΕΚ) Αρ. 1272/2008.

### Ειδική επισημάνση του ES1:

- EUH208 Περιέχει πεψίνη A. Μπορεί να προκαλέσει αλλεργική αντίδραση.
- EUH210 Δελτίο δεδομένων ασφαλείας παρέχεται εφόσον ζητηθεί.

## 7. Περιορισμοί

- Για *in vitro* διαγνωστική χρήση.
- Μόνο για επαγγελματική χρήση.
- Μόνο για μη αυτοματοποιημένη χρήση.
- Η κλινική ερμηνεία οποιασδήποτε θετικής χρώσης ή απουσίας της πρέπει να γίνεται στο πλαίσιο του κλινικού ιστορικού, της μορφολογίας, άλλων ιστοπαθολογικών κριτηρίων καθώς και άλλων διαγνωστικών εξετάσεων. Είναι ευθύνη ενός ειδικευμένου παθολογοανατόμου/γενετιστή να είναι εξοικειωμένος με τους ανιχνευτές υβριδισμού *in situ* (ISH), τα αντιδραστήρια, τα διαγνωστικά πάνελ και τις μεθόδους που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή του χρωματισμένου παρασκευάσματος. Η χρώση πρέπει να πραγματοποιείται σε πιστοποιημένο, αδειοδοτημένο εργαστήριο υπό την επίβλεψη παθολογοανατόμου/γενετιστή που είναι υπεύθυνος για την επισκόπηση των χρωματισμένων πλακιδίων και τη διασφάλιση της επάρκειας των θετικών και αρνητικών μαρτύρων.
- Η χρώση του δείγματος, ειδικότερα η ένταση του σήματος και η χρώση του υποβάθρου, εξαρτώνται από τον χειρισμό και την επεξεργασία του δείγματος πριν από τη χρώση. Η ακατάλληλη στερέωση, ψύξη, απόψυξη, το πλύσιμο, στέγνωμα, η θέρμανση, τμύση ή μόλυνση με άλλα δείγματα ή υγρά μπορεί να προκαλέσουν τεχνουργήματα ή ψευδή αποτελέσματα. Ασυνεπή αποτελέσματα μπορεί να προκύψουν από διακυμάνσεις στις μεθόδους στερέωσης και ενσωμάτωσης, καθώς και από εγγενείς ανωμαλίες εντός του δείγματος.
- Η απόδοση επικυρώθηκε, χρησιμοποιώντας τις διαικασίες που περιγράφονται στις οδηγίες χρήσης του αντίστοιχου ανιχνευτή και κιτ εφαρμογής ZytoVision. Τροποποιήσεις σε αυτές τις διαικασίες ενδέχεται να αλλάξουν την απόδοση και πρέπει να επικυρωθούν από τον χρήστη. Αυτό το IVD (*in vitro* διαγνωστικό) προϊόν είναι πιστοποιημένο ως CE, μόνον όταν χρησιμοποιείται όπως περιγράφεται σε αυτές τις οδηγίες χρήσης εντός του πεδίου της προβλεπόμενης χρήσης.

## 8. Παρεμβάλλουσες ουσίες

Τα ακόλουθα σταθεροποιητικά δεν είναι συμβατά με το ISH (*in situ* υβριδισμό):

- Σταθεροποιητικό Bouin
- B5 σταθεροποιητικό
- Ώξινα σταθεροποιητικά (π.χ. πικρικό οξύ)
- Σταθεροποιητικό Zenker
- Αλκοόλες (όταν χρησιμοποιούνται μόνες τους)
- Χλωριούχος υδράργυρος
- Σταθεροποιητικό μορφολδεΐδης/ψευδαργύρου
- Σταθεροποιητικό Hollande
- Μη ρυθμισμένη φορμαλίνη

## 9. Προετοιμασία δειγμάτων

Συστάσεις:

- Σε κάθε βήμα της προετοιμασίας να αποφεύγετε τη διασταυρούμενη μόλυνση των δειγμάτων, καθώς αυτή μπορεί να οδηγήσει σε λανθασμένα αποτελέσματα.
- Σταθεροποίηση σε 10% ουδέτερη ρυθμισμένη φορμαλίνη για 24 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου (18-25°C).
- Μέγεθος δείγματος  $\leq 0,5 \text{ cm}^3$ .
- Χρησιμοποιήστε παραφίνη εξαιρετικής ποιότητας.
- Η ενσωμάτωση πρέπει να πραγματοποιείται σε θερμοκρασίες χαμηλότερες από 65°C.
- Προετοιμάστε τομές μικροτόμου 3-5 μm.
- Χρησιμοποιήστε θετικά φορτισμένα πλακίδια μικροσκοπίου.
- Σταθεροποιήστε τα αποκόμματα ιστών για 2-16 ώρες στους 50-60°C.

## 10. Προπαρασκευαστική επεξεργασία της συσκευής

Το PBS/Tween (WB4) πρέπει να υποβάλλεται σε προεπεξεργασία σύμφωνα με τις οδηγίες στο κεφάλαιο 11. "Διαικασία ανάλυσης". Όλα τα άλλα αντιδραστήρια του κιτ είναι έτοιμα για χρήση. Δεν απαιτείται ανασύσταση, ανάμειξη ή αραίωση.

## 11. Διαικασία ανάλυσης

### 11.1 Ημέρα 1

#### Προπαρασκευαστικά βήματα

- (1) Προετοιμάστε μια σειρά με αιθανόλη (διαικασίες αιθανόλης 70%, 90% και 100%). Αραιώστε 100% αιθανόλη με απιονισμένο ή αποσταγμένο νερό. Τα διαικασία αυτά μπορούν να αποθηκευθούν στους κατάλληλους περιέκτες και να επαναχρησιμοποιηθούν.
- (2) Heat Pretreatment Solution EDTA (PT2): Θερμάνετε σε θερμοκρασία έως και 98°C σε καλυμμένο δοχείο ο χρώσης.
- (3) Προετοιμάστε το 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$ : Αραιώστε 1 μέρος 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$  σε 9 μέρη μεθανόλης 100%.
- (4) Ανιχνευτής χρωμογόνου *in situ* υβριδισμού (CISH) ZytoDot: Πριν από τη χρήση, φέρτε το σε θερμοκρασία δωματίου.

#### Προεπεξεργασία (αποκλήρωση/πρωεόλυση)

- (1) Επιάστε τα πλακίδια για 10 λεπτά στους 70°C (π.χ. επάνω σε μια καυτή πλάκα).
- (2) Επιάστε τα πλακίδια 2 φορές από 5 λεπτά μέσα σε ξυλένιο.
- (3) Επιάστε τα πλακίδια 3 φορές από 3 λεπτά σε αιθανόλη 100%.
- (4) Επιάστε τα πλακίδια για 5 λεπτά σε 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$ .
- (5) Πλύνετε τα πλακίδια 2 φορές από 1 λεπτό σε απιονισμένο ή αποσταγμένο νερό.
- (6) Επιάστε για 15 λεπτά σε προθερμασμένο Heat Pretreatment Solution EDTA (PT2) στους 98°C.

Χρησιμοποιείτε οκτώ πλακίδια ανά δοχείο χρώσης (προσθέστε ομοίωμα πλακιδίων εάν χρειαστεί).

- (7) Μεταφέρετε τα πλακίδια αμέσως σε απιονισμένο ή αποσταγμένο νερό και πλύνετε τα 2 φορές από 2 λεπτά.
- (8) Εφαρμόστε (στάγδην) Pepsin Solution (ES1) στο δείγμα και επιάστε για 5 έως 15 λεπτά στους 37°C σε θάλαμο υγρασίας.

Το ES1 ενδέχεται να σχηματίσει ιζήματα, τα οποία, ωστόσο, δεν επηρεάζουν την ποιότητα. Ως γενικό κανόνα, συνιστούμε να εξακριβώνεται ο βέλτιστος χρόνος για πρωεόλυση σε προδοκιμές.

- (9) Βυθίστε τα πλακίδια σε απιονισμένο ή αποσταγμένο νερό.
- (10) Αφυδάτωση σε: αιθανόλη 70%, 90% και 100%, έκαστο για 1 λεπτό.
- (11) Στεγνώστε τα μέρη με στεγνό αέρα.

Σημείωση: Βεβαιωθείτε ότι στεγνώσατε πλήρως τα μέρη προτού χρησιμοποιήσετε τον ανιχνευτή.

#### Μετουσίωση και υβριδισμός

- (1) Μεταφέρετε με πιπέτα 10 μl περιεχομένου του ανιχνευτή ZytoDot CISH σε κάθε προεπεξεργασμένο δείγμα.
- (2) Καλύψτε τα δείγματα με καλυπτρίδα 22 mm x 22 mm (αποφύγετε τις παγιδευμένες φυσαλίδες) και σφραγίστε την καλυπτρίδα.

Συνιστούμε τη χρήση ελαστικού ταιμεντοειδούς (π.χ. Fixogum) για τη σφράγιση.

- (3) Τοποθετήστε τα πλακίδια σε μια καυτή πλάκα ή έναν υβριδοστή και μετουσιώστε τα δείγματα για 5 λεπτά στους 94-95°C.
- (4) Μεταφέρετε τα πλακίδια σε θάλαμο υγρασίας και υβριδοποιήστε όλη τη νύχτα στους 37°C (π.χ. σε φούρνο υβριδοσμού).

Είναι σημαντικό τα δείγματα να μη στεγνώνουν κατά τη διάρκεια του υβριδοσμού.

## 11.2 Ημέρα 2

### Προπαρασκευαστικά βήματα

- (1) Wash Buffer SSC (WB1): Για αυστηρή έκπλυση θερμάνετε σε θερμοκρασία έως και 80°C σε καλυμμένο δοχείο χρώσης. Το WB1 ενδέχεται να σχηματίζει ιζήματα, τα οποία, ωστόσο, δεν επηρεάζουν την ποιότητα και διαλύονται όταν θερμαίνονται.
- (2) Προετοιμασία του ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης PBS/Tween: Προσθέστε 1 ταμπλέτα με PBS/Tween (WB4) σε 1000 ml απιονισμένου ή αποσταγμένου νερού και αναδεύστε για να διαλυθεί.
- (3) Blocking Solution (BS1), Mouse-Anti-DIG (AB1), Anti-Mouse-HRP-Polymer (AB2), DAB Solution A (SB1a), DAB Solution B (SB1b), Mayer's Hematoxylin Solution (CS1), Mounting Solution (alcoholic) (MT4): Πριν από τη χρήση, φέρτε το σε θερμοκρασία δωματίου.

### Μετα-υβριδοσμός και ανίχνευση

- (1) Αφαιρέστε προσεκτικά το ελαστικό τσιμεντοειδές ή την κόλλα.
- (2) Αφαιρέστε την καλυπτρίδα βυθίζοντας τα πλακίδια σε Wash Buffer SSC (WB1) σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.

Το WB1 μπορεί να επαναχρησιμοποιηθεί για μία ακόμη μόνο φορά (σύνολο 2 φορές). Αποθηκεύστε στους 2-8°C το πολύ για μία εβδομάδα.

- (3) Πλύνετε τα πλακίδια για 5 λεπτά σε Wash Buffer SSC (WB1) σε θερμοκρασία 80°C.

Χρησιμοποιείτε οκτώ πλακίδια ανά δοχείο χρώσης (προσθέστε ομοίωμα πλακιδίων εάν χρειαστεί).

- (4) Πλύνετε τα πλακίδια 2 φορές από 1 λεπτό σε απιονισμένο ή αποσταγμένο νερό.
- (5) Βυθίστε τα πλακίδια σε ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης PBS/Tween.
- (6) Εφαρμόστε Blocking Solution (BS1) (1-2 σταγόνες ανά πλακίδιο) στα πλακίδια και επώστε για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- (7) Σκουπίστε ό,τι περισσεύει από το Blocking Solution (BS1), **αλλά μην το ξεπλένετε!**
- (8) Εφαρμόστε Mouse-Anti-DIG (AB1) (1-2 σταγόνες ανά πλακίδιο) στα πλακίδια και επώστε για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- (9) Πλύνετε τα πλακίδια 3 φορές από 1 λεπτό σε PBS/Tween.
- (10) Εφαρμόστε Anti-Mouse-HRP-Polymer (AB2) (1-2 σταγόνες ανά πλακίδιο) στα πλακίδια και επώστε για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- (11) Πλύνετε τα πλακίδια 3 φορές από 1 λεπτό σε PBS/Tween.
- (12) Προετοιμάστε το διάλυμα διαιμινοβενζιδίνης (DAB) (διάλυμα εργασίας): συμπληρώστε με 1 ml DAB Solution B (SB1b) σε μία βαθμονομημένη κούπα και προσθέστε μία σταγόνα (30 μl) DAB Solution A (SB1a). Ανακατέψτε καλά.
- (13) Εφαρμόστε διάλυμα διαιμινοβενζιδίνης (DAB) (1-2 σταγόνες ανά πλακίδιο) στα πλακίδια και επώστε για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- (14) Μεταφέρετε τα πλακίδια σε ένα δοχείο χρώσης και ξεπλύνετε τα για 2 λεπτά κάτω από τρεχούμενο κρύο νερό βρύσης.
- (15) Εφαρμόστε αντίχρωση στα δείγματα για 5 έως 10 δευτερόλεπτα με το Mayer's Hematoxylin Solution (CS1).
- (16) Μεταφέρετε τα πλακίδια σε ένα δοχείο χρώσης και ξεπλύνετε τα για 2 λεπτά κάτω από τρεχούμενο κρύο νερό βρύσης.
- (17) Αφυδάτωση σε: αιθανόλη 70%, 90% και 100%, έκαστο για 1 λεπτό.
- (18) Επώστε τα πλακίδια 2 φορές από 2 λεπτά μέσα σε ξυλένιο (χρησιμοποιήστε εξαιρετικά καθαρό ξυλένιο).

- (19) Αποφύγετε τυχόν παγιδευμένες φυσαλίδες, καλύψτε τα δείγματα με μια καλυπτρίδα (22 mm x 22 mm, 24 mm x 32 mm) χρησιμοποιώντας το Mounting Solution (alcoholic) (MT4). Περιμένετε περίπου 20 με 30 λεπτά ώσπου να ακινητοποιηθεί η καλυπτρίδα.

Με τη χρήση ενός στόμιου πέττας που έχει κοπή για να αυξηθεί το μέγεθος του ανοίγματος μπορεί να διευκολυνθεί η διαδραστικότητα της πέττας.

- (20) Αξιολογήστε τη χρώση των δειγμάτων χρησιμοποιώντας μι κροσκόπι ο φωτός.

## 12. Ερμηνεία αποτελεσμάτων

Χρησιμοποιώντας το ZytoDot CISH Implementation Kit, τα σήματα υβριδοσμού των σημασμένων με διγοξιγενίνη πολυνουκλεοτιδίων εμφανίζονται ως καφέ έως σκούρες καφέ διακριτές χρωματιστές κουκκίδες. Σε ενδιάμεσες φάσεις ή μεταφάσεις φυσιολογικών κυττάρων ή κυττάρων χωρίς παρεκκλίσεις των εξεταζόμενων χρωμοσωμάτων, θα εμφανιστούν δύο σήματα ανά στόχο, εκτός από τους ανιχνευτές που στοχεύουν στα χρωμοσώματα X ή Y, με αποτέλεσμα δύο, κανένα ή ένα σήμα ανάλογα με το φύλο και τον χρησιμοποιούμενο ανιχνευτή. Σε κύτταρα με χρωμοσωμικές παρεκκλίσεις, ενδέχεται να είναι ορατό ένα διαφορετικό μοτίβο σήματος, σε ενδιάμεσες φάσεις ή μεταφάσεις. Για περισσότερες λεπτομέρειες σχετικά με την ερμηνεία των αποτελεσμάτων, παρακαλούμε να ανατρέξετε στις οδηγίες χρήσης του αντίστοιχου ανιχνευτή ZytoDot CISH.

## 13. Συνιστώμενες διαδραστικές ποιοτικού ελέγχου

Ανατρέξτε στις οδηγίες χρήσης του αντίστοιχου ανιχνευτή ZytoVision.

## 14. Χαρακτηριστικά απόδοσης

Ανατρέξτε στις οδηγίες χρήσης του αντίστοιχου ανιχνευτή ZytoVision.

## 15. Απόρριψη

Η απόρριψη των αντιδραστηρίων πρέπει να πραγματοποιείται σύμφωνα με τους τοπικούς κανονισμούς.

## 16. Αντιμετώπιση προβλημάτων

Οποιαδήποτε απόκλιση από τις οδηγίες λειτουργίας μπορεί να οδηγήσει σε κατώτερα αποτελέσματα χρώσης ή σε καθόλου χρώση. Για περισσότερες πληροφορίες, ανατρέξτε στη διεύθυνση [www.zytovision.com](http://www.zytovision.com).

### Αδύναμα σήματα ή καθόλου σήματα

Πιθανή αιτία	Ενέργεια
Η πρωτεολυτική προεπεξεργασία δεν πραγματοποιήθηκε σωστά	Βελτιστοποιήστε τον χρόνο επώστησης της πεψίνης, αυξήστε ή μειώστε εάν είναι απαραίτητο
Εξάτμιση ανιχνευτή	Όταν χρησιμοποιείτε υβριδοστή, είναι υποχρεωτική η χρήση των υγρών λωρίδων/γυμάτων με νερό δεξαμενών. Όταν χρησιμοποιείτε φούρνο υβριδοσμού, απαιτείται η χρήση ενός θαλάμου υγρασίας. Επιπλέον, η καλυπτρίδα θα πρέπει να σφραγίζεται πλήρως, π.χ. με Fixogum, για να αποφευχθεί η ξήρανση του δείγματος κατά τον υβριδοσμό.
Ανεπαρκής προετοιμασία χρωμογόνου υποστρώματος	Αντί να χρησιμοποιήσετε μία σταγόνα διαλύματος A DAB χρησιμοποιήστε 30 μl
Ο χρόνος αντίχρωσης είναι πολύ μεγάλος	Αποφύγετε τη σκούρα αντίχρωση, γιατί μπορεί να κρύψει τα θετικά σήματα χρώσης

Η κυάνωση της αντίχρωσης δεν έγινε σωστά	Χρησιμοποιήστε κρύο τρεχούμενο νερό βρύσης για κυάνωση· μη χρησιμοποιείτε ζεστό ή καυτό νερό ή αντιδραστήρια κυάνωσης
--	---

Η πρωτεολυτική προεπεξεργασία δεν εξήχθη για μεγάλο χρονικό διάστημα	Μειώστε τον χρόνο επώασης της πεψίνης
--	---------------------------------------

**Τα σήματα είναι πολύ δυνατά**

Πιθανή αιτία	Ενέργεια
Η πρωτεολυτική προεπεξεργασία διεξήχθη για πολύ καιρό	Βελτιστοποιήστε τον χρόνο επώασης της πεψίνης, αυξήστε ή μειώστε εάν είναι απαραίτητο
Η αντίδραση του υποστρώματος είναι πολύ έντονη	Συντομεύστε τον χρόνο επώασης του υποστρώματος· μη θερμαίνετε το διάλυμα υποστρώματος σε θερμοκρασία μεγαλύτερη των 25 °C· επώατε μόνον σε θερμοκρασία δωματίου

**Διασταυρούμενα σήματα υβριδισμού· θορυβώδες υπόβαθρο**

Πιθανή αιτία	Ενέργεια
Τα τμήματα στέγνωσαν	Αποφύγετε το στέγνωμα των τμημάτων· χρησιμοποιήστε κατά τη διάρκεια ή μετά τον υβριδισμό
Παρατεταμένος χρόνος επώασης του υποστρώματος	Μειώστε τον χρόνο επώασης του υποστρώματος
Ατελής αποκλήρωση	Χρησιμοποιήστε φρέσκα διαλύματα· ελέγξτε τη διάρκεια της αποκλήρωσης
Η πρωτεολυτική προεπεξεργασία είναι πολύ ισχυρή	Βελτιστοποιήστε τον χρόνο επώασης της πεψίνης
Τα πλακίδια ψύχονται σε θερμοκρασία δωματίου πριν από τον υβριδισμό	Μεταφέρετε τα πλακίδια γρήγορα σε θερμοκρασία υβριδισμού

**Τα σήματα εξασθενούν ή συγχωεύονται**

Πιθανή αιτία	Ενέργεια
Έχει χρησιμοποιηθεί ακατάλληλο διάλυμα στερέωσης	Χρησιμοποιείτε μόνον το διάλυμα στερέωσης που παρέχεται με το κιτ ή διαλύματα στερέωσης με βάση το ξυλένιο και χωρίς ακαθαρσίες· μη χρησιμοποιείτε ταινία καλυπτήρας

**Αλληλοεπι καλυπτόμενα σήματα**

Πιθανή αιτία	Ενέργεια
Ακατάλληλο πάχος τομών ιστού	Προετοιμάστε τομές μικροτόμου 3-5 μm

**Ανώμαλη ή σε ορισμένα σημεία πολύ ελαφριά χρώση**

Πιθανή αιτία	Ενέργεια
Ατελής αποκλήρωση	Χρησιμοποιήστε φρέσκα διαλύματα· ελέγξτε τη διάρκεια των χρόνων αποκλήρωσης
Ο όγκος του αντιδραστήριου είναι πολύ μικρός	Βεβαιωθείτε ότι ο όγκος του αντιδραστήριου είναι αρκετά μεγάλος, ώστε να καλύπτει την περιοχή του ιστού

**Το δείγμα επιπλέει στο πλακίδι**

Πιθανή αιτία	Ενέργεια
Η πρωτεολυτική προεπεξεργασία είναι πολύ ισχυρή	Συντομεύστε τον χρόνο επώασης πεψίνης

**Ασυνεπή αποτελέσματα**

Πιθανή αιτία	Ενέργεια
Ανεπαρκές στέγνωμα πριν από την εφαρμογή του ανιχνευτή	Επεκτείνετε το στέγνωμα στον αέρα
Πάρα πολύ νερό/ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης στον ιστό πριν από την εφαρμογή πεψίνης, αντισωμάτων ή/και χρωματικών υποστρωμάτων	Βεβαιωθείτε ότι η περιόσσεια του υγρού έχει αφαιρεθεί από το τμήμα του ιστού με σύπωμα ή τίναγμα από το πλακίδιο. Μικρές ποσότητες υπολείπόμενου νερού/ρυθμιστικού διαλύματος δεν παρεμβαίνουν στη δοκιμή
Παραλλαγές στις μεθόδους στερέωσης και ενσωμάτωσης ιστών	Βελτιστοποιήστε τις μεθόδους στερέωσης και ενσωμάτωσης
Διακυμάνσεις στο πάχος τομής ιστού	Βελτιστοποίηση τομής

**Υποβαθμισμένη μορφολογία**

Πιθανή αιτία	Ενέργεια
Το δείγμα κυττάρου ή ιστού δεν έχει στερεωθεί σωστά	Βελτιστοποιήστε τον χρόνο στερέωσης και το σταθεροποιητικό

**17. Βιβλιογραφία**

- 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. Αναθεώρηση**
[www.zytovision.com](http://www.zytovision.com)

Ανατρέξτε στη διεύθυνση [www.zytovision.com](http://www.zytovision.com) για τις πιο πρόσφατες οδηγίες χρήσης καθώς και για οδηγίες χρήσης σε διάφορες γλώσσες.

Οι ειδικοί μας είναι πρόθυμοι να απαντήσουν στις ερωτήσεις σας.

Επικοινωνήστε στη διεύθυνση [help@zytovision.com](mailto:help@zytovision.com)



ZytoVision GmbH  
Fischkai 1  
27572 Bremerhaven / Γερμανία  
Τηλέφωνο: +49 471 4832-300  
Φαξ: +49 471 4832-509  
[www.zytovision.com](http://www.zytovision.com)  
E-Mail: [info@zytovision.com](mailto:info@zytovision.com)

**Εμπορικά σήματα:**

Τα ZytoVision® και ZytoDot® είναι εμπορικά σήματα της ZytoVision GmbH.