



ZytoDot 2C CISH Implementation Kit

REF C-3044-10 ∇ 10

REF C-3044-40 ∇ 40

Για χρήση σε διαδραστικές χρωμογόνους *in situ*
υβριδισμού (CISH)

4250380N717V



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 2C CISH Implementation Kit προορίζεται για χρήση σε συνδυασμό με επισημασμένους με διγοξιγενίνη/δινιτροφαινόλη ανιχνευτές ZytoDot 2C CISH 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 απένιο, 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 συζυγμένα με ένζυμα αντισώματα. Η ενζυματική αντίδραση με χρωμογόνα 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 2C CISH Implementation Kit διατίθεται σε δύο μεγέθη και αποτελείται από τα εξής:

Κωδικός	Συστατικό	Ποσότητα		Δοχείο
		40	10	
PT2	Heat Pretreatment Solution EDTA	500 ml	150 ml	Μπουκάλι με βιδωτό καπάκι (μεγάλο)
ES1	Pepsin Solution	4 ml	1 ml	Σταγονομετρικό φιαλίδιο, λευκό πώμα
WB1	Wash Buffer SSC	560 ml	210 ml	Μπουκάλι με βιδωτό καπάκι (μεγάλο)
WB5	20x Wash Buffer TBS	2x 50 ml	50 ml	Μπουκάλι με βιδωτό καπάκι
AB14	Anti-DIG/DNP-Mix	4 ml	1 ml	Σταγονομετρικό φιαλίδιο, κίτρινο πώμα
AB13	HRP/AP-Polymer-Mix	4 ml	1 ml	Σταγονομετρικό φιαλίδιο, μπλε πώμα
SB6a	AP-Red Solution A	0,4 ml	0,1 ml	Σταγονομετρικό φιαλίδιο, κόκκινο πώμα (μικρό)
SB6b	AP-Red Solution B	15 ml	4 ml	Σταγονομετρικό φιαλίδιο, κόκκινο πώμα
SB7a	HRP-Green Solution A	0,8 ml	0,2 ml	Σταγονομετρικό φιαλίδιο, πράσινο πώμα (μικρό)
SB7b	HRP-Green Solution B	15 ml	4 ml	Σταγονομετρικό φιαλίδιο, πράσινο πώμα
CS2	Nuclear Blue Solution	20 ml	4 ml	Μπουκάλι με βιδωτό καπάκι, μαύρο
MT4	Mounting Solution (alcoholic)	4 ml	1 ml	Γυάλινο μπουκάλι, καφέ
	Δοχείο αντιδράσεων AP-Red	2	1	Βαθμονομημένη κούπα, κόκκινο πώμα
	Δοχείο αντιδράσεων HRP-Green	2	1	Βαθμονομημένη κούπα, πράσινο πώμα
	Οδηγίες χρήσης	1	1	

C-3044-10 (10 τεστ): Τα συστατικά **ES1, AB14, AB13, SB6a-b, SB7a-b, CS2**, και **MT4** επαρκούν για 10 αντιδράσεις. Το συστατικό **PT2** επαρκεί για 2 δοχεία χρώσης των 70 ml το καθένα. Το συστατικό **WB1** επαρκεί για 3 δοχεία χρώσης των 70 ml το καθένα. Το συστατικό **WB5** επαρκεί για 14 δοχεία χρώσης των 70 ml το καθένα.

C-3044-40 (40 τεστ): Τα συστατικά **ES1, AB14, AB13, SB6a-b, SB7a-b, CS2**, 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 **WB5** επαρκεί για 28 δοχεία χρώσης των 70 ml το καθένα.

4. Υλικά που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται

- Ανιχνευτής ZytoDot 2C CISH
- Δείγματα θετικών και αρνητικών μαρτύρων
- Πλακίδια μικροσκοπίου, θετικά φορτισμένα
- Υδατόλουτρο (80°C, 98°C)
- Υβριδιστής ή θερμάνομη πλάκα
- Υβριδιστής ή θάλαμος υγρασίας σε φούρνο υβριδισμού
- Ρυθμιζόμενες πιπέτες (10 μl, 1000 μl)
- Δοχεία ή λουτρά χρώσης
- Χρονόμετρο
- Βαθμονομημένο θερμόμετρο
- Αιθανόλη ή αλκοόλη αντιδραστήριου
- Ξυλένιο
- Μεθανόλη 100%
- Υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂) 30%
- Απιονισμένο ή απεσταγμένο νερό
- Καλυπτρίδες (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 μικροσκόπιο φωτός (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 γίνονται 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 πλύσης.

Δηλώσεις επικινδυνότητας και προφύλαξης για τα AB13, AB14, PT2, SB7b, WB1 και WB5:

Το συστατικό που προσδιορίζει τον κίνδυνο είναι μια μάζα αντίδρασης των εξής: 5-χλωρο-2-μεθυλο-4-ισοθειοαζολίνη-3-όνη [EK αρ. 247-500-7] και 2-μεθυλο-2H-ισοθειοαζολ-3-όνη [EK αρ. 220-239-6] (3:1).



Προειδοποίηση

- H317 Μπορεί να προκαλέσει αλλεργική δερματική αντίδραση.
- P261 Αποφεύγετε να αναπνέετε σκόνη/αναθυμιάσεις/αέρι α/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 ΠΤΩΣΗ 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 SB7a:

Τα συστατικά που προσδιορίζουν τον κίνδυνο είναι η μεθανόλη και το διάλυμα υπεροξειδίου του υδρογόνου 30%.



Κίνδυνος

- H225 Υγρό και ατμοί πολύ εύφλεκτα.
- H301+H311 +H331 Τοξικό σε περίπτωση κατάποσης, σε επαφή με το δέρμα και σε περίπτωση εισπνοής.
- H370 Προκαλεί βλάβες στα όργανα.
- P210 Μακριά από θερμότητα, θερμές επιφάνειες, σπινθήρες, γυμνές φλόγες και άλλες πηγές ανάφλεξης. Μην καπνίζετε.
- P233 Να διατηρείται ο περιέκτης ερμητικά κλειστός.
- P260 Μην αναπνέετε σκόνη/αναθυμιάσεις/αέρι α/ιθάλη/ατμούς/σπρέυ.
- P280 Φοράτε προστατευτικά γάντια/προστατευτικά ενδύματα/μέσα προστασίας ματιών/προσώπου.
- P308+P311 Σε περίπτωση έκθεσης ή ανησυχίας: Καλέστε το ΚΕΝΤΡΟ ΔΗΛΗΤΗΡΙΑΣΕΩΝ/έναν γιατρό.
- P403+P235 Αποθηκεύεται σε καλά αεριζόμενο χώρο. Διατηρείται δροσερό.

Δηλώσεις επικινδυνότητας και προφύλαξης για το CS2:

Το συστατικό που προσδιορίζει τον κίνδυνο είναι η αιθανοδιόλη και η αιθυλενογλυκόλη.



Προειδοποίηση

- H373 Μπορεί να προκαλέσει βλάβη στα νεφρά λόγω παρατεταμένης ή επανειλημμένης έκθεσης σε περίπτωση κατάποσης.
- P260 Μην αναπνέετε σκόνη/αναθυμιάσεις/αέρι α/ιθάλη/ατμούς/σπρέυ.
- P314 Συμβουλευθείτε/επισκεφθείτε γιατρό, εάν αισθανθείτε αδιαθεσία.

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/αερία/ατμά/ατμούς/σπρέυ.
P280	Φοράτε προστατευτικά γάντια/προστατευτικά ενδύματα/μάσκα προστασίας ματιών/προσώπου.
P305+P351+P338	ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ 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 του SB6α:

H412	Επιβλαβές για τους υδρόβιους οργανισμούς, με μακροχρόνιες επιπτώσεις.
P273	Να αποφεύγεται η απελευθέρωση στο περιβάλλον.

Ειδική επισημάνση του ES1:

EUH208	Περιέχει πεψίνη Α. 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, στένωμα, η θέρμανση, τμήση 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 διαδικασίες που περιγράφονται στις οδηγίες χρήσης του αντίστοιχου ανιχνευτή και kit εφαρμογής ZytoVision. Τροποποιήσεις σε αυτές τις διαδικασίες 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
- Όξινα σταθεροποιητικά (π.χ. πικρικό οξύ)
- Σταθεροποιητικό Zenker
- Αλκοόλες (όταν χρησιμοποιούνται μόνες τους)
- Χλωριούχος υδράργυρος
- Σταθεροποιητικό φορμαλδεΐδης/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% ουδέτερα 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 μικροσκοπία.
- Σταθεροποιήστε τα αποκόμματα ιστών για 2-16 ώρες στους 50-60°C.

10. Προπαρασκευαστική επεξεργασία της συσκευής

Το 20x Wash Buffer TBS (WB5) πρέπει να υποβάλλεται σε προετοιμασία σύμφωνα με τις οδηγίες στο κεφάλαιο 11. "Διαδικασία ανάλυσης". Όλα τα άλλα αντιδραστήρια του kit είναι έτοιμα για χρήση. Δεν απαιτείται ανασύσταση, ανάμειξη ή αραιώση.

Πριν από τη χρήση, φέρτε το σε θερμοκρασία δωματίου και αναμίξτε ελαφρά.

11. Διαδικασία ανάλυσης

11.1 Ημέρα 1

Προπαρασκευαστικά βήματα

1. Προετοιμάστε μια σειρά με αιθανόλη (διαλύματα αιθανόλης 70%, 90% και 100%). Αραιώστε 100% αιθανόλη με απιονισμένο ή αποσταγμένο νερό. Τα διαλύματα αυτά μπορούν να αποθηκευτούν στους κατάλληλους περιέκτες και να επαναχρησιμοποιηθούν.
2. Heat Pretreatment Solution EDTA (PT2): Θερμάνετε σε θερμοκρασία έως και 98°C σε καλυμμένο δοχείο χρώσης.
3. Προετοιμάστε το 3% H_2O_2 : Αραιώστε 1 μέρος 30% H_2O_2 σε 9 μέρη μεθανόλης 100%.
4. Ανιχνευτής χρωμογόνου *in situ* υβριδισμού ZytoDot 2C CISH: Πριν από τη χρήση, φέρτε το σε θερμοκρασία δωματίου.



Προεπεξεργασία (αποκάλυψη/πρωτεύουση)

1. Επλώστε τα πλακίδια για 10 λεπτά στους 70°C (π.χ. επάνω σε μια καυτή πλάκα).
2. Επλώστε τα πλακίδια 2 φορές από 5 λεπτά μέσα σε ξυλένιο.
3. Επλώστε τα πλακίδια 3 φορές από 3 λεπτά σε αιθανόλη 100%.
4. Επλώστε τα πλακίδια για 5 λεπτά σε 3% H₂O₂.
5. Πλύνετε τα πλακίδια 2 φορές από 1 λεπτό σε απιονισμένο ή αποσταγμένο νερό.
6. Επλώστε για 15 λεπτά σε προθερμασμένο Heat Pretreatment Solution EDTA (PT2) στους 98°C.

Χρησιμοποιείτε οκτώ πλακίδια ανά δοχείο χρώσης (προσθέστε μοίωμα 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 επλώστε 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 α πρωτεύουση 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 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 τσιμεντοειδούς (π.χ. Fixogum) για τη σφράγιση.

3. Τοποθετήστε τα πλακίδια σε θερμή πλάκα ή σε υβριδιστή και μετουσίωση τα δείγματα για 5 λεπτά στους 79°C.
4. Μεταφέρετε τα πλακίδια σε θάλαμο υγρασίας και υβριδοποιήστε όλη τη νύχτα στους 37°C (π.χ. σε φούρνο υβριδισμού).

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

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 σχηματίσει ιζήματα, τα οποία, ωστόσο, δεν επηρεάζουν την ποιότητα και διαλύονται όταν θερμαίνονται.
2. Προετοιμάστε ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης 1x Wash Buffer TBS: Αραιώστε 1 μέρος 20x Wash Buffer TBS (WB5) σε 19 μέρη απιονισμένο ή αποσταγμένο νερό.

Το αραιωμένο ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης 1x Wash Buffer TBS είναι σταθερό για μία εβδομάδα όταν αποθηκεύεται στους 2-8°C.

3. Anti-DIG/DNP-Mix (AB14), HRP/AP-Polymer-Mix (AB13), AP-Red Solution A (SB6a), AP-Red Solution B (SB6b), HRP-Green Solution A (SB7a), HRP-Green Solution B (SB7b), Nuclear Blue Solution (CS2), Mounting Solution (alcoholic) (MT4): Πριν από τη χρήση, φέρτε το σε θερμοκρασία δωματίου.

Τα συστατικά **SB7a** και **SB7b** ενδέχεται να σχηματίσουν ιζήματα, τα οποία, ωστόσο, δεν επηρεάζουν την ποιότητα.

Μετα-υβριδισμός και ανιχνευση

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 μοίωμα 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 1x Wash Buffer TBS.
6. Εφαρμόστε Anti-DIG/DNP-Mix (AB14) (1-2 σταγόνες ανά πλακίδιο) στα πλακίδια και επλώστε για 15 λεπτά στους 37°C σε θάλαμο υγρασίας.
7. Πλύνετε τα πλακίδια 3 φορές από 1 λεπτό σε 1x Wash Buffer TBS.
8. Εφαρμόστε HRP/AP-Polymer-Mix (AB13) (1-2 σταγόνες ανά πλακίδιο) στα πλακίδια και επλώστε για 15 λεπτά στους 37°C σε θάλαμο υγρασίας.
9. Πλύνετε τα πλακίδια 3 φορές από 1 λεπτό σε 1x Wash Buffer TBS.
10. Προετοιμάστε το διάλυμα AP-Red (διάλυμα εργασίας): συμπληρώστε 1 ml διαλύματος AP-Red B (**SB6b**) σε μια βαθμονομημένη κούπα και προσθέστε μία σταγόνα (30 μl) διαλύματος AP-Red A (**SB6a**). Ανακατέψτε καλά.
11. Εφαρμόστε διάλυμα AP-Red (1-2 σταγόνες ανά πλακίδιο) στα πλακίδια και επλώστε σε σκοτεινό χώρο για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
12. Στη διάρκεια της επώασης, προετοιμάστε το πράσινο διάλυμα HRP (διάλυμα εργασίας): συμπληρώστε με HRP-Green Solution B 1 ml (**SB7b**) σε μια βαθμονομημένη κούπα και προσθέστε δύο σταγόνες (2 x 20 μl) HRP-Green Solution A (SB7a). Ανακατέψτε καλά.
13. Πλύνετε τα πλακίδια για 2 λεπτά σε απιονισμένο ή αποσταγμένο νερό.
14. Εφαρμόστε διάλυμα HRP-Green (1-2 σταγόνες ανά πλακίδιο) στα πλακίδια και επλώστε σε σκοτεινό χώρο για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
15. Πλύνετε τα πλακίδια για 2 λεπτά σε απιονισμένο ή αποσταγμένο νερό.
16. Εφαρμόστε αντιχρώση στα δείγματα για 2 λεπτά με το Nuclear Blue Solution (CS2).
17. Μεταφέρετε τα πλακίδια σε ένα δοχείο χρώσης και ξεπλύνετε τα για 2 λεπτά κάτω από τρεχούμενο κρύο νερό βρύσης.
18. Αφυδατώστε 3 φορές από 30 δευτερόλεπτα σε αιθανόλη 100% (να χρησιμοποιείτε μόνο εξαιρετικά καθαρή αιθανόλη).
19. Επλώστε τα πλακίδια 2 φορές από 30 δευτερόλεπτα μέσα σε ξυλένιο (να χρησιμοποιείτε μόνο εξαιρετικά καθαρό ξυλένιο).

Μην παρατηρείτε ή συντομεύετε τον χρόνο επώασης, καθώς αυτό ενδέχεται να έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια των σημάτων!

20. 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 πιπέτας που έχει κοπή για να αυξηθεί το μέγεθος του ανοίγματος μπορεί να διευκολυνθεί η διείσδυση της πιπέτας.

21. Αξιολογήστε τη χρώση των δειγμάτων χρησιμοποιώντας μι κροσκόπιο φωτός.

12. Ερμηνεία αποτελεσμάτων

Χρησιμοποιώντας το ZytoDot 2C CISH Implementation Kit, τα σήματα υβριδισμού των σημασμένων με διγοξιγενίνη πολυνουκλεοτιδίων εμφανίζονται ως σκούρες πράσινες διακριτές χρωματισμένες κουκκίδες και τα σημασμένα με δινιτροφαινόλη πολυνουκλεοτιδία εμφανίζονται ως διακριτές, φωτεινές κόκκινες κουκκίδες. Σε ενδιάμεσες φάσεις ή μεταφάσεις φυσιολογικών κυττάρων ή κυττάρων χωρίς παρεκκλίσεις των εξεταζόμενων χρωμοσωμάτων, θα εμφανιστούν δύο σήματα ανά ανιχνευτή/επισημάνση με απένιο, εκτός από τους ανιχνευτές που στοχεύουν στα χρωμοσώματα X ή/και Y, με αποτέλεσμα κανένα έως δύο σήματα ανά ανιχνευτή/επισημάνση με απένιο, ανάλογα με το φύλο. Σε κύτταρα με χρωμοσωμικές παρεκκλίσεις, ενδέχεται να είναι ορατό ένα δι-αφορετικό 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 2C CISH.

13. Συνιστώμενες διαδικασίες ποιότητας 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

Όποι αδήποτε 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.

Αδύναμα σήματα ή καθόλου σήματα

Πιθανή αιτία	Ενέργεια
Η πρωτεολυτική προεπεξεργασία δεν πραγματοποιήθηκε σωστά	Βελτιστοποιήστε τον χρόνο επώασης της πεψίνης, αυξήστε ή μειώστε εάν είναι απαραίτητο
Εξάτμιση ανιχνευτή	Όταν χρησιμοποιείτε υβριδιστή, είναι υποχρεωτική η χρήση των υγρών λωρίδων/γεμάτων με νερό δεξαμενών. Όταν χρησιμοποιείτε φούρνο υβριδισμού, 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 υβριδισμό.
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

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
Ο χρόνος επώασης του διάλυματος AP-Red δεν είναι σωστός	Εάν απαιτείται, ο χρόνος επώασης μπορεί να μειωθεί σε 5 λεπτά. Μη θερμαίνετε το διάλυμα υποστρώματος πάνω από 25 °C· επώαστε μόνον σε θερμοκρασία δωματίου
Ο χρόνος επώασης του διάλυματος HRP-Green δεν είναι σωστός	Εάν απαιτείται, ο χρόνος επώασης μπορεί να μειωθεί σε 7 λεπτά. Μη θερμαίνετε το διάλυμα υποστρώματος πάνω από 25 °C· επώαστε μόνον σε θερμοκρασία δωματίου

Τα κόκκινα σήματα είναι πολύ αδύναμα

Πιθανή αιτία	Ενέργεια
Το διάλυμα AP-Red εκτέθηκε σε έντονο άμεσο φως	Προετοιμάστε και χρησιμοποιήστε το διάλυμα AP-Red προστατευμένο από έντονο άμεσο φως
Το διάλυμα AP-Red παρασκευάστηκε πολύ νωρίς	Προετοιμάστε πριν από την άμεση χρήση
Ο χρόνος επώασης του διάλυματος AP-Red δεν είναι σωστός	Εάν απαιτείται, ο χρόνος επώασης μπορεί να επεκταθεί έως και 15 λεπτά
Ανεπαρκής προετοιμασία χρωμογόνου υποστρώματος	Μην αυξάνετε τον όγκο του διάλυματος A

Τα πράσινα σήματα είναι πολύ αδύναμα

Πιθανή αιτία	Ενέργεια
Ο χρόνος επώασης οποιαδήποτε σταδίων πλήυσης μετά από την χρώση με HRP-Green είναι πολύ μεγάλος	Μην υπερβείτε τους δεδομένους χρόνους επώασης
Ο χρόνος επώασης του διάλυματος HRP-Green δεν είναι σωστός	Εάν απαιτείται, ο χρόνος επώασης μπορεί να επεκταθεί έως και 15 λεπτά
Ανεπαρκής προετοιμασία χρωμογόνου υποστρώματος	Μην αυξάνετε τον όγκο του διάλυματος A

Τα σήματα εξασθενούν ή συγχωεύονται

Πιθανή αιτία	Ενέργεια
Έχει χρησιμοποιηθεί ακατάλληλο διάλυμα στερέωσης	Χρησιμοποιείτε μόνον το διάλυμα στερέωσης που παρέχεται με το κιτ ή διλύματα στερέωσης με βάση το ξυλένιο και χωρίς ακαθαρσίες· μη χρησιμοποιείτε ταινία καλυπτρίδας
Τα τμήματα δεν αφυδατώθηκαν σωστά	Χρησιμοποιήστε φρέσκα διλύματα αιθανόλης και ξυλένιου· χρησιμοποιήστε μόνον ξυλένιο «καθαρής» ποιότητας

Ανώμαλη ή σε ορισμένα σημεία πολύ ελαφριά χρώση

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

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 περιόσεια του υγρού έχει αφαιρεθεί από το τμήμα του ιστού με στύπωμα ή τίναγμα από το πλακίδιο. Μ κρέες ποσότητες υπολειπόμενου 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
Η πρωτεολυτική προεπεξεργασία δεν διεξήχθη για μεγάλο χρονικό διάστημα	Μειώστε τον χρόνο επώασης της πεψίνης

Διασταυρούμενα σήματα υβριδισμού· θορυβώδες υπόβαθρο

Πιθανή αιτία	Ενέργεια
Τα τμήματα στέγνωσαν οποιoδήποτε στιγμή κατά τη διάρκεια ή μετά τον υβριδισμό	Αποφύγετε το στέγνωμα των τμημάτων· χρησιμοποιήστε θάλαμο υγρασίας· σφραγίστε σωστά την καλυπτρίδα
Παρατεταμένος χρόνος επώασης του υποστρώματος	Μειώστε τον χρόνο επώασης του υποστρώματος
Ατελής αποκήρωση	Χρησιμοποιήστε φρέσκα διαλύματα· ελέγξτε τη διάρκεια της αποκήρωσης
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

Αλληλοεπι καλυπτόμενα σήματα

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

Το δείγμα επιπλέει στο πλακίδιο

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

17. Βιβλιογραφία

- Isola J, Tanner M (2004) *Methods Mol Med* 97: 133-44.
- Kounelis S, et al. (2005) *Anticancer Res* 25: 939-46.
- 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

Ανατρέξτε στη διεύθυνση 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



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

Εμπορικά σήματα:

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