



## ZytoDot 2C CISH Implementation Kit

**REF** C-3044-10  $\Sigma$  10

**REF** C-3044-40  $\Sigma$  40

Pour la détection qualitative des sondes CISH ZytoDot 2C marquées à la digoxigénine et au dinitrophényle par hybridation *in situ* chromogénique (CISH)



Dispositif médical de diagnostic *in vitro*  
En accord avec la directive européenne 98/79/CE

### 1. Utilisation prévue

ZytoDot 2C CISH Implementation Kit est destinée à être utilisée en combinaison avec le Digoxigenin/Dinitrophenyl-labelled ZytoDot 2C CISH. Sondes pour la détection qualitative des aberrations génétiques, par exemple les translocations, les délétions, les amplifications et les aneuploïdies chromosomiques, dans des échantillons fixés au formol et enrobés de paraffine par hybridation chromogène *in situ* (CISH).

L'interprétation des résultats doit être faite dans le contexte de l'histoire clinique du patient par rapport aux autres données cliniques et pathologiques du patient par un pathologiste qualifié.

### 2. Pertinence clinique

Les aberrations génétiques, par exemple, les translocations chromosomiques, les suppressions et/ou les amplifications, sont associées à diverses tumeurs chez l'homme. On observe des aneuploïdies chromosomiques dans de nombreux troubles congénitaux.

### 3. Principe du test

La technique d'hybridation chromogénique *in situ* (CISH) permet la détection et la visualisation de séquences d'acides nucléiques spécifiques dans des préparations cellulaires. Les fragments de nucléotides marqués par des haptènes, appelés sondes CISH, et leurs séquences cibles complémentaires dans les préparations sont codénaturés et ensuite hybridés pendant l'hybridation. Les fragments de sondes non spécifiques et non liés sont éliminés par des étapes de lavage stringent. La formation de duplex de la sonde marquée peut être visualisée en utilisant des anticorps primaires (non marqués), qui sont détectés par des anticorps secondaires polymérisés conjugués à une enzyme. La réaction enzymatique avec les substrats chromogènes conduit à la formation de précipités colorés. Après avoir contre-coloré le noyau avec un colorant nucléaire, les fragments de sonde hybridés sont visualisés au microscope optique.

### 4. Réactifs fournis

ZytoDot 2C CISH Implementation Kit est disponible en deux tailles et est composé de:

Code	Component	Quantité		Contenant
		40	10	
PT2	<u>Heat Pretreatment Solution EDTA</u>	500 ml	150 ml	Flacon avec bouchon à visser (grand)
ES1	<u>Pepsin Solution</u>	4 ml	1 ml	Flacon compte-gouttes, bouchon transparent
WB1	<u>Wash Buffer SSC</u>	560 ml	210 ml	Flacon avec bouchon à visser (grand)
WB5	<u>20x Wash Buffer TBS</u>	2x 50 ml	50 ml	Flacon avec bouchon à visser
AB14	<u>Anti-DIG/DNP-Mix</u>	4 ml	1 ml	Flacon compte-gouttes, bouchon jaune
AB13	<u>HRP/AP-Polymer-Mix</u>	4 ml	1 ml	Flacon compte-gouttes, bouchon bleu
SB6a	<u>AP-Red Solution A</u>	0.4 ml	0,1 ml	Flacon compte-gouttes, bouchon rouge (petit)
SB6b	<u>AP-Red Solution B</u>	15 ml	4 ml	Flacon compte-gouttes, bouchon rouge
SB7a	<u>HRP-Green Solution A</u>	0.8 ml	0,2 ml	Flacon compte-gouttes, bouchon vert (petit)
SB7b	<u>HRP-Green Solution B</u>	15 ml	4 ml	Flacon compte-gouttes, bouchon vert
CS2	<u>Nuclear Blue Solution</u>	20 ml	4 ml	Flacon avec bouchon à visser, noir
MT4	<u>Mounting Solution (alcoholic)</u>	4 ml	1 ml	Bouteille en verre, marron
	AP-Red reaction vessel	2	1	Tasse graduée, couvercle rouge
	HRP-Green reaction vessel	2	1	Tasse graduée, couvercle vert
	Mode d'emploi	1	1	

**C-3044-10 (10 tests):** Les composants **ES1**, **AB14**, **AB13**, **SB6a-b**, **SB7a-b**, **CS2** et **MT4** suffisent pour 10 réactions. Le composant **PT2** suffit pour 2 cuves à coloration de 70 ml chacune. Le composant **WB1** suffit pour 3 cuves à coloration de 70 ml chacune. Le composant **WB5** suffit pour 14 cuves à coloration de 70 ml chacune.

**C-3044-40 (40 tests):** Les composants **ES1**, **AB14**, **AB13**, **SB6a-b**, **SB7a-b**, **CS2** et **MT4** suffisent pour 40 réactions. Le composant **PT2** suffit pour 7 cuves à coloration de 70 ml chacune. Le composant **WB1** suffit pour 8 cuves à coloration de 70 ml chacune. Le composant **WB5** suffit pour 28 cuves à coloration de 70 ml chacune.

### 5. Matériel requis mais non fourni

- Sonde ZytoDot 2C CISH
- Échantillons de contrôle positifs et négatifs
- Lames pour microscope, chargées positivement
- Bain-marie (80°C, 98°C)
- Appareil à hybridation ou plaque chauffante
- Appareil à hybridation ou chambre humide
- Pipettes ajustable (10  $\mu$ l, 1000  $\mu$ l)
- Bocaux ou bains de coloration
- Minuteur
- Thermomètre calibré
- Ethanol ou alcool
- Xylène
- Méthanol 100%
- Peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 30%
- Eau dionisée ou distillée
- Lamelles (22 mm x 22 mm, 24 mm x 32 mm)
- Ciment caoutchouc, par exemple, Fixogum Rubber Cement (Prod. No. E-4005-50/-125) ou similaire
- Microscope lumineux correctement entretenu (400-630x)

## 6. Stockage et manipulation

Conserver à 2-8°C en position verticale. Remettre en conditions de stockage immédiatement après utilisation. Ne pas utiliser les réactifs au-delà de la date de péremption indiquée sur l'étiquette. Le produit est stable jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette lorsqu'il est manipulé en conséquence.

## 7. Avertissements et précautions

- Lisez le mode d'emploi avant utilisation !
- N'utilisez pas les réactifs après que la date d'expiration a été atteinte !
- Ce produit contient des substances (en faibles concentrations et volumes) qui sont nocives pour la santé et potentiellement infectieuses. Évitez tout contact direct avec les réactifs. Prenez les mesures de protection appropriées (utilisez des gants jetables, des lunettes de protection et des vêtements de laboratoire) !
- Signalez tout incident grave survenu en rapport avec le produit au fabricant et à l'autorité compétente conformément à la réglementation locale !
- Si les réactifs entrent en contact avec la peau, rincez immédiatement la peau avec de grandes quantités d'eau !
- Une fiche de données de sécurité est disponible sur notre site internet ([www.zytovision.com](http://www.zytovision.com)).
- Ne pas réutiliser les réactifs, à moins que la réutilisation ne soit explicitement autorisée !
- Évitez toute contamination croisée et toute contamination microbactérienne des réactifs !
- Les spécimens ne doivent pas être laissés sécher pendant les étapes d'hybridation et de lavage !

### Étiquetage particulier de ES1:

EUH208	Contient pepsine A. Peut produire une réaction allergique.
EUH210	EUH210 Fiche de données de sécurité disponible sur demande.

### Étiquetage particulier de SB6b:

EUH210	Fiche de données de sécurité disponible sur demande.
--------	------------------------------------------------------

### Mentions de danger et conseils de prudence pour AB13, AB14, PT2, SB7b, WB1 et WB5 :

Le composant dangereux déterminant est un mélange de 5-chloro-2-méthyl-4-isothiazoline-3-one [EC n° 247-500-7] et 2-méthyl-2H-isothiazol-3-one [EC n° 220-239-6] (3:1).



#### Avertissement

H317	Peut provoquer une allergie cutanée.
P261	Éviter de respirer les poussières/fumées/gaz/brouillards/vapeurs/aérosols.
P272	Les vêtements de travail contaminés ne devraient pas sortir du lieu de travail.
P280	Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage.
P302+P352	EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU: Laver abondamment à l'eau.
P333+P313	En cas d'irritation ou d'éruption cutanée: Demander un avis médical/Consulter un médecin.
P362+P364	Enlever les vêtements contaminés et les laver avant réutilisation.

### Mentions de danger et conseils de prudence pour SB7a:

Les composants déterminant le danger sont le méthanol et une solution de peroxyde d'hydrogène à 30 %.



#### Danger

H225	Liquide et vapeurs très inflammables.
H301+H311+H331	Toxique par ingestion, par contact cutané ou par inhalation.
H370	Risque avéré d'effets graves pour les organes.
P210	Tenir à l'écart de la chaleur, des surfaces chaudes, des étincelles, des flammes nues et de toute autre source d'inflammation. Ne pas fumer.
P233	Maintenir le récipient fermé de manière étanche.
P260	Ne pas respirer les poussières/fumées/gaz/brouillards/vapeurs/aérosols.
P280	Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage.
P308+P311	EN CAS d'exposition prouvée ou suspectée: Appeler un CENTRE ANTIPOISON/un médecin.
P403+P235	Stocker dans un endroit bien ventilé. Maintenir le récipient fermé de manière étanche.

### Mentions de danger et conseils de prudence pour CS2:

Le composant dangereux déterminant est éthylène-glycol.



#### Attention

H373	Risque présumé d'effets graves pour les organes à la suite d'expositions répétées ou d'une exposition prolongée.
P260	Ne pas respirer les poussières/fumées/gaz/brouillards/vapeurs/aérosols.
P314	Consulter un médecin en cas de malaise.

**Mentions de danger et conseils de prudence pour MT4:**

Le composant dangereux déterminant est xylène.



H226	Liquide et vapeurs inflammables.
H312+H332	Nocif en cas de contact cutané ou d'inhalation.
H315	Provoque une irritation cutanée.
H319	Provoque une sévère irritation des yeux.
H335	Peut irriter les voies respiratoires.
H373	Risque présumé d'effets graves pour les organes à la suite d'expositions répétées ou d'une exposition prolongée.
P210	Tenir à l'écart de la chaleur, des surfaces chaudes, des étincelles, des flammes nues et de toute autre source d'inflammation. Ne pas fumer.
P260	Ne pas respirer les poussières/fumées/gaz/brouillards/vapeurs/aérosols.
P280	Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage.
P305+P351+P338	EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX: Rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer.
P337+P313	Si l'irritation oculaire persiste: Consulter un médecin.
P403+P235	Stocker dans un endroit bien ventilé. Tenir au frais.
EUH208	Contient méthacrylate de méthyle. Peut produire une réaction allergique.

**8. Restrictions**

- Pour le diagnostic *in vitro*.
- Pour un usage professionnel uniquement.
- Pour usage non automatisé uniquement.
- L'interprétation clinique de toute coloration positive, ou de son absence, doit être faite dans le contexte de l'histoire clinique, de la morphologie, d'autres critères histopathologiques ainsi que d'autres tests de diagnostic. Il incombe à un pathologiste qualifié de se familiariser avec les sondes, les réactifs, les panels de diagnostic et les méthodes utilisées pour produire la préparation colorée de CISH. La coloration doit être effectuée dans un laboratoire agréé et certifié, sous la supervision d'un pathologiste qui est chargé d'examiner les lames colorées et de s'assurer de la pertinence des contrôles positifs et négatifs
- La coloration de l'échantillon, en particulier l'intensité du signal et la coloration de fond, dépend de la manipulation et du traitement de l'échantillon avant la coloration. Une mauvaise fixation, congélation, décongélation, lavage, séchage, chauffage, sectionnement ou contamination par d'autres spécimens ou fluides peut produire des artefacts ou de faux résultats. Des résultats incohérents peuvent résulter de variations dans les méthodes de fixation et d'enrobage, ainsi que d'irrégularités inhérentes au spécimen.
- La performance a été validée selon les procédures décrites dans ce mode d'emploi. Les modifications apportées à ces procédures peuvent altérer les performances et doivent être validées par l'utilisateur.

**9. Substances interférentes**

Les fixateurs suivants sont incompatibles avec l'hybridation in situ :

- Fixateur de Bouin
- Fixateur B5
- Fixateurs acides (comme l'acide picrique)
- Fixateur de Zenker
- Alcools (lorsqu'ils sont utilisés seuls)
- Chlorure de mercure
- Fixateur de formaldéhyde/zinc
- Fixateur de Hollande
- Formol non tamponné

**10. Préparation des échantillons**

Recommandations:

- Évitez la contamination croisée des échantillons à toutes les étapes de la préparation, car elle peut entraîner des résultats erronés.
- Fixation dans du formol à 10% tamponné de manière neutre pendant 24 h à température ambiante (18-25°C).
- Taille de l'échantillon  $\leq 0.5 \text{ cm}^3$ .
- Utiliser de la paraffine de qualité supérieure.
- L'enrobage doit être effectué à des températures inférieures à 65°C.
- Préparer des sections au microtome de 3 à 5  $\mu\text{m}$ .
- Utilisez des lames de microscope à charge positive.
- Fixer les coupes de tissu pendant 2 à 16 h à 50-60°C.

**11. Traitement préparatoire du produit**

20x Wash Buffer TBS (WB5) doit être préparé conformément aux instructions du point 12. "Procédure d'essai". Tous les autres réactifs du kit sont prêts à l'emploi. Aucune reconstitution, mélange ou dilution n'est nécessaire.

**12. Protocole****12.1 Premier jour****Étapes préparatoires**

1. Préparer une série d'éthanol (solutions d'éthanol à 70 %, 90 % et 100 %) : Diluer l'éthanol à 100 % avec de l'eau déionisée ou distillée. Ces solutions peuvent être stockées dans des récipients appropriés et peuvent être réutilisées.
2. Heat Pretreatment Solution EDTA (PT2): chauffer à 98°C dans un bocal de coloration couvert.
3. Préparation de 3 % d'H2O2 : Diluer 1 partie de 30 % d'H2O2 dans 9 parties de 100 % de méthanol..
4. Sonde CISH ZytoDot 2C : Amener à température ambiante (18-25°C, RT) avant utilisation

**Prétraitement (déparaffinage / protéolyse)**

1. Incuber les lames pendant 10 minutes à 70°C (par exemple sur une plaque chauffante).
2. Incuber les lames pendant 2x 5 min dans du xylène.
3. Incuber les lames pendant 3x 3 min dans de l'éthanol à 100 %.
4. Incuber les lames pendant 5 min dans de l'H2O2 à 3 %.
5. Laver les lames pendant 2x 1 min dans de l'eau déionisée ou distillée.
6. Incuber pendant 15 min dans une solution de Heat Pretreatment Solution EDTA (PT2) à 98°C.

Utiliser huit lames par bocal de coloration (ajouter des lames factices si nécessaire).

7. Transférer immédiatement les lames dans de l'eau déionisée ou distillée et laver pendant 2x 2 min.
8. Appliquer (goutte à goutte) la Pepsin Solution (ES1) à l'échantillon et incubé pendant 5-15 min à 37°C dans une chambre humide.

*En règle générale, nous recommandons de déterminer le moment optimal pour la protéolyse lors des pré-tests.*

9. Immerger les lames dans de l'eau déionisée ou distillée.
10. Déshydratation dans : 70 %, 90 % et 100 % d'éthanol, pendant 1 minute chacun.
11. Séchage à l'air des coupes.

*Note : Veiller à sécher complètement les sections avant l'application de la sonde.*

#### Dénaturation et hybridation

- (1) Pipeter 10 µl de la sonde sur chaque spécimen prétraité.
- (2) Recouvrir les spécimens d'une lamelle de 22 mm x 22 mm (éviter de piéger des bulles) et sceller la lamelle.

*Nous recommandons d'utiliser du ciment caoutchouc (par exemple, Fixogum) pour l'étanchéité.*

- (3) Placer les lames sur une plaque chauffante ou un hybrideur et dénaturer les spécimens pendant 5 min à 79°C.
- (4) Transférer les lames dans une chambre humide et les hybrider pendant la nuit à 37°C (par exemple, dans un four d'hybridation).

*Il est essentiel que les spécimens ne se dessèchent pas pendant l'étape d'hybridation.*

## 12.2 Deuxième jour

### Étapes préparatoires

1. Wash Buffer SSC (WB1) : Pour un lavage rigoureux, chauffer à 80°C dans un bocal à coloration couvert. **WB1** peut former des précipités à 2-8°C, qui n'affectent pas la qualité et doivent se dissoudre lorsqu'ils sont chauffés
2. *Préparation de 1x tampon de lavage TBS* : Diluer 1 partie de 20x Wash Buffer TBS (WB5) dans 19 parties d'eau déionisée ou distillée.

*Le tampon de lavage TBS 1x dilué est stable pendant une semaine lorsqu'il est conservé à 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): Amener à température ambiante avant utilisation.

*Les composants **SB7a** et **SB7b** peuvent former des précipités, qui n'affectent pas la qualité de la coloration.*

### Post-hybridation et détection

1. Enlevez soigneusement le ciment ou la colle à base de caoutchouc.
2. Enlever la lamelle de couverture en immergeant les lames dans le Wash Buffer SSC (WB1) à température ambiante pendant 5 min.

*Le WB1 peut être réutilisé une fois. Conserver à 2-8°C pendant une semaine au maximum..*

3. Laver les lames pendant 5 min dans le Wash Buffer SSC (WB1) à 80°C.

*Utiliser huit lames par bocal de coloration (ajouter des lames factices si nécessaire).*

4. Laver les lames pendant 2x 1 min dans de l'eau déionisée ou distillée.
5. Immerger les lames dans 1x Wash Buffer TBS.
6. Appliquer un mélange Anti-DIG/DNP-Mix (AB14) (1-2 gouttes par lame) sur les lames et incubé pendant 15 min à 37°C dans une chambre humide..
7. Laver les lames 3x 1 min dans 1x Wash Buffer TBS..
8. Appliquer le HRP/AP-Polymer-Mix (AB13) (1-2 gouttes par lame) sur les lames et incubé pendant 15 min à 37°C dans une chambre humide..
9. Laver les lames 3x 1 min dans 1x tampon de lavage TBS.
10. Préparer la solution AP-Red (solution de travail) : remplir 1 ml de AP-Red Solution B (**SB6b**) dans une tasse graduée et ajouter une goutte (30 µl) de AP-Red Solution A (**SB6a**). Bien mélanger.
11. Appliquer la AP-Red Solution (1-2 gouttes par lame) sur les lames et incubé pendant 10 min à température ambiante.
12. Pendant l'incubation, préparer la HRP-Green Solution (solution de travail) : remplir 1 ml de HRP-Green Solution B (SB7b) dans une tasse graduée et ajouter deux gouttes (2x 20 µl) de HRP-Green Solution A (SB7a). Bien mélanger.
13. Laver les lames pendant 2 min dans de l'eau déionisée ou distillée.

14. Appliquer la HRP-Green Solution goutte à goutte (1-2 gouttes par lame) sur les lames et incubé pendant 10 min à température ambiante.
  15. Laver les lames pendant 2 minutes dans de l'eau déionisée ou distillée.
  16. Contre-colorer les échantillons pendant 2 min avec la Nuclear Blue Solution (CS2).
  17. Transférer les lames dans un bocal de coloration et les laver pendant 2 min sous l'eau froide du robinet.
  18. Déshydrater 3x 30 s dans de l'éthanol à 100 % (utiliser de l'éthanol très pur).
  19. Incuber les lames pendant 2x 30 s dans du xylène (utiliser du xylène très pur).
- Ne pas prolonger ou raccourcir le temps d'incubation car cela pourrait entraîner une perte de signaux !*
20. En évitant d'emprisonner des bulles, recouvrez les échantillons d'une lamelle (22 mm x 22 mm ; 24 mm x 32 mm) en utilisant une Mounting Solution (alcoholic) (MT4). Attendez 20 à 30 minutes pour que la lamelle soit immobilisée.
  21. Évaluez les échantillons colorés en utilisant la microscopie optique.

## 13. Interprétation des résultats

En utilisant le kit ZytoDot 2C CISH Implementation Kit, les signaux d'hybridation des polynucléotides marqués à la Digoxigénine apparaissent sous forme de points distincts de couleur vert foncé, et les polynucléotides marqués au Dinitrophényle apparaissent sous forme de points distincts de couleur rouge vif. En interphase ou en métaphase de cellules normales ou de cellules sans aberrations des chromosomes examinés, deux signaux par sonde/aptène apparaissent, sauf pour les sondes ciblant les chromosomes X et/ou Y, ce qui fait qu'il n'y a pas ou qu'il y a deux signaux par sonde/aptène, selon le sexe. Dans les cellules présentant des aberrations chromosomiques, un schéma de signaux différent peut être visible en interphase ou en métaphase. Pour plus de détails sur l'interprétation des résultats, veuillez vous référer au mode d'emploi de la sonde CISH ZytoDot 2C correspondante.

### Veillez noter :

- En raison de la chromatine décondensée, les signaux CISH individuels peuvent apparaître sous forme de petits groupes de signaux. Ainsi, deux ou trois signaux de même taille, séparés par une distance ≤ 1 diamètre de signal, doivent être comptés comme un seul signal.
- Avant le dénombrement des signaux, l'échantillon doit être scanné pour détecter toute hétérogénéité intratumorale éventuelle à un grossissement de 100 à 200 fois.
- La visualisation des signaux doit être effectuée avec un grossissement d'au moins 400 fois, afin que les signaux soient facilement visibles. Un grossissement de 630 fois est recommandé pour les sondes détectant des cassures chromosomiques. N'utilisez pas de lentilles à filtre améliorant le contraste, car cela pourrait déformer la couleur du signal. Pour obtenir des signaux de couleurs vives, ouvrez le diaphragme d'ouverture. Veillez à faire la mise au point de haut en bas lorsque vous évaluez un noyau, car les signaux rouge et vert peuvent être superposés.
- Ne pas évaluer les zones de nécrose, les noyaux chevauchants, les noyaux surdigérés et les noyaux à faible intensité de signal.
- En raison de la mitose, des signaux supplémentaires peuvent être visibles même dans un faible pourcentage de cellules non néoplasiques. Parfois, des noyaux avec des signaux manquants peuvent être observés dans des spécimens enrobés de paraffine en raison d'artefacts de coupe.
- Un résultat négatif ou non spécifique peut être causé par de multiples facteurs (voir chapitre 17 "Assistance").
- Afin d'interpréter correctement les résultats, l'utilisateur doit valider ce produit avant de l'utiliser dans des procédures de diagnostic conformément aux directives nationales et/ou internationales.

## 14. Procédures de contrôle qualité recommandées

Afin de contrôler la bonne performance des échantillons traités et des réactifs d'essai, chaque essai doit être accompagné de contrôles internes et externes. Si les contrôles internes et/ou externes ne parviennent pas à

démontrer une coloration appropriée, les résultats obtenus avec les échantillons des patients doivent être considérés comme non valables.

## 15. Caractéristiques de performances

Reportez-vous aux instructions d'utilisation de la sonde CISH ZytoDot 2C correspondante.

## 16. Elimination

L'élimination des réactifs doit être effectuée conformément à la réglementation locale.

## 17. Assistance

Tout écart par rapport au mode d'emploi peut conduire à des résultats de coloration inférieurs ou à l'absence totale de coloration.

### Signaux faibles ou pas de signal

Cause possible	Action
L'échantillon de cellule ou de tissu n'a pas été correctement fixé	Optimiser le temps de fixation et le fixatif
Prétraitement thermique, protéolyse, hybridation, dénaturation, lavage de stringence ou température d'incubation des anticorps incorrecte	Vérifiez la température de tous les appareils techniques utilisés, à l'aide d'un thermomètre étalonné. Utiliser toujours le même nombre de lames dans les solutions à température critique
Le prétraitement protéolytique n'est pas effectué correctement	En fonction de multiples facteurs, par exemple la nature et la durée de la fixation, l'épaisseur des coupes et la nature des tissus/cellules, différentes durées d'incubation peuvent être nécessaires. Déterminer le moment optimal d'incubation de la pepsine lors des tests préliminaires
Temps d'hybridation trop court	Hybridation pendant au moins 12 h ; prolonger le temps d'hybridation si nécessaire
Anciennes solutions de déshydratation	Préparer des solutions de déshydratation fraîches
Évaporation des sondes	En cas d'utilisation d'un appareil d'hybridation, l'utilisation des bandes humides/réservoirs remplis d'eau est obligatoire. Lors de l'utilisation d'un four d'hybridation, l'utilisation d'une chambre humide est obligatoire. En outre, la lamelle de couverture doit être complètement scellée, par exemple avec du Fixogum, pour éviter que l'échantillon ne sèche pendant l'hybridation
Incubation avec un substrat chromogène trop courte	Prolonger la durée d'incubation
Temps de contre coloration trop long	Le temps de contre-coloration dépend de la nature du spécimen et doit être optimisé en conséquence. Évitez la contre-coloration sombre, car elle peut masquer les signaux de coloration positive
Le bleuissement de la contre-coloration n'a pas été effectué correctement	Utilisez l'eau courante froide du robinet ; n'utilisez pas d'eau chaude ou tiède, ni de réactifs

### Des signaux trop forts

Cause possible	Action
Prétraitement protéolytique effectué trop longtemps	En fonction de multiples facteurs, par exemple la nature et la durée de la fixation, l'épaisseur des coupes et la nature des tissus/cellules, différentes durées d'incubation peuvent être nécessaires. Déterminer le moment optimal d'incubation de la pepsine lors des tests préliminaires
La durée d'incubation de AP-Red Solution n'est pas correcte	Si nécessaire, la durée d'incubation peut être réduite à 5 min. Ne pas chauffer la solution de substrat à plus de 25°C ; incubé uniquement à température ambiante
Le temps d'incubation de HRP-Green solution n'est pas correct	Si nécessaire, la durée d'incubation peut être réduite à 7 min. Ne pas chauffer la solution de substrat à plus de 25°C ; incubé uniquement à température ambiante

### Seuls les signaux rouges sont trop faibles

Cause possible	Action
AP-Red Solution a été exposée à une forte lumière directe	Préparer et utiliser AP-Red Solution à l'abri d'une forte lumière directe
AP-Red Solution a été préparée trop tôt	Préparer avant l'utilisation immédiate
La durée d'incubation de AP-Red Solution n'est pas correcte	Si nécessaire, la durée d'incubation peut être prolongée jusqu'à 15 min
Préparation insuffisante du substrat chromogène	Ne pas augmenter le volume de la solution A

### Seuls les signaux verts sont trop faibles

Cause possible	Action
Temps d'incubation des étapes de lavage après une coloration trop longue avec le HRP-Green	Ne pas dépasser les temps d'incubation donnés
Le temps d'incubation de HRP-Green solution n'est pas correct	Si nécessaire, la durée d'incubation peut être prolongée jusqu'à 15 min
Insuffisante préparation of chromogenic substrate	Do not increase volume of Solution A

### Les signaux s'estompent ou fusionnent

Cause possible	Action
Une solution de montage inadaptée a été utilisée	Utilisez uniquement la solution de montage fournie avec le kit ou des solutions de montage à base de xylène exemptes de toute impureté ; n'utilisez pas de ruban adhésif pour couvre-objet
Les sections n'ont pas été correctement déshydratées	Utiliser des solutions d'éthanol et de xylène frais ; n'utiliser que du xylène de qualité "pure".

### Coloration inégale ou, dans certaines parties, très légère

Cause possible	Action
Déparaffinage incomplet	Utiliser des solutions fraîches ; vérifier la durée des temps de déparaffinage
Volume de réactifs trop faible	Veiller à ce que le volume du réactif soit suffisamment important pour couvrir la zone du tissu
Bulles d'air capturées avant l'hybridation ou pendant le montage	Éviter les bulles d'air

**Des résultats incohérents**

Cause possible	Action
Séchage insuffisant avant l'application de la sonde	Prolonger le séchage à l'air libre
Trop d'eau/tampon de lavage sur les tissus avant l'application de pepsine, d'anticorps et/ou de substrats colorés	Veillez à ce que l'excès de liquide soit retiré de la section de tissu en l'essuyant ou en le secouant sur la lame. De petites quantités d'eau résiduelle/tampon de lavage n'interfèrent pas avec l'essai
Variations des méthodes de fixation et d'incrustation des tissus	Optimiser les méthodes de fixation et d'encastrement
Variations de l'épaisseur de la coupe de tissu	Optimiser le découpage en sections

**La morphologie s'est dégradée**

Cause possible	Action
L'échantillon de cellule ou de tissu n'a pas été correctement fixé	Optimiser le temps de fixation et le fixateur
Le prétraitement protéolytique n'est pas effectué correctement	Optimiser la durée d'incubation de la pepsine ; l'augmenter ou la diminuer si nécessaire

**Signaux d'hybridation croisée ; bruit de fond**

Cause possible	Action
La température de lavage n'est pas correcte	Vérifiez la température des appareils techniques utilisés, à l'aide d'un thermomètre étalonné. Utilisez toujours le même nombre de lames dans le bocal. Nous recommandons de ne pas utiliser plus de huit lames par bocal pour les étapes d'incubation à la chaleur
Les lames ne sont pas bien rincées	Utiliser un tampon de lavage frais et suffisant et de l'eau déionisée ou distillée lorsque cela est indiqué
Sections desséchées à tout moment pendant ou après l'hybridation	Éviter que les sections ne s'assèchent ; utiliser une chambre d'humidité ; sceller correctement les couvercles
Temps d'incubation prolongé du substrat	Réduire la durée d'incubation du substrat
Déparaffinage incomplet	Utiliser des solutions fraîches ; vérifier la durée du déparaffinage
Prétraitement protéolytique trop fort	Optimiser le temps d'incubation de la pepsine
Lames refroidies à température ambiante avant l'hybridation	Transférer rapidement les lames à la température d'hybridation

**Des signaux qui se chevauchent**

Cause possible	Action
Épaisseur inappropriée des coupes de tissus	Préparer des sections de microtome de 3 à 5 $\mu$ m

**Le spécimen flotte sur la lame**

Cause possible	Action
Couche de glissement de la lame inappropriée	Utiliser des lames appropriées (à charge positive)
Prétraitement protéolytique trop fort	Réduire le temps d'incubation de la pepsine

**18. Bibliographie**

- 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.

**19. Révision**

Veillez consulter le site [www.zytovision.com](http://www.zytovision.com) pour les instructions d'utilisation les plus récentes ainsi que pour les instructions d'utilisation dans les différentes langues.

Nos experts sont disponibles pour répondre à vos questions. Merci de nous contacter à [help@zytovision.com](mailto:help@zytovision.com)



ZytoVision GmbH  
Fischkai 1  
27572 Bremerhaven/Allemagne  
Téléphone: +49 471 4832-300  
Fax: +49 471 4832-509  
[www.zytovision.com](http://www.zytovision.com)  
Courriel: [info@zytovision.com](mailto:info@zytovision.com)

**Marques déposées :**

ZytoVision® et ZytoDot® sont des marques déposées de ZytoVision GmbH.