



ZytoLight

SPEC ERBB2/CEN 17 Dual Color Probe Kit

REF Z-2020-5 Σ 5

REF Z-2020-20 Σ 20

Do jakości ciowej detekcji amplifikacji ludzkiego genu ERBB2 i alfa satelit chromosomu 17 metodą fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH)



Wyrób medyczny do diagnostyki *in vitro*
zgodnie z dyrektywą 98/79/WE

1. Przeznaczenie

ZytoLight SPEC ERBB2/CEN 17 Dual Color Probe Kit jest przeznaczony do jakości ciowej detekcji amplifikacji ludzkiego genu ERBB2 jak również alfa satelit chromosomu 17 w próbkach utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie takich jak tkanki z ludzkim rakiem piersi lub rakiem z ołądka metodą fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH).

Interpretacja wyników musi być wykonana przez wykwalifikowanego patologa w kontekście klinicznej historii pacjenta w odniesieniu do pozostałych klinicznych i patologicznych danych pacjenta.

2. Znaczenie kliniczne

Gen ERBB2 (znany także jako HER2 i NEU) znajduje się w regionie chromosomalnym 17q12 i koduje transbłonową glikoproteinę 185-190 kDa, p185, działającą, jako receptor komórkowego czynnika wzrostu. Białko p185 należy do podgrupy EGFR (receptorowa kinaza tyrozynowa) zawierającej również EGFR (ERBB1), ERBB3 (HER3) i ERBB4 (HER4). Amplifikacja protoonkogenu ERBB2, obserwowana w ok. 20% próbek wszystkich raków piersi, jest skorelowana ze złym rokowaniem choroby. Podobne wyniki uzyskano dla szeregu innych nowotworów złośliwych, np. raków jajnika, raków z ołądka i raków gruczoła ślinowego.

3. Zasada testu

Technika fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH) umożliwia wykrywanie i wizualizację określonych sekwencji kwasów nukleinowych w preparatach komórkowych. Fluorescencyjnie oznakowane fragmenty DNA, nazwane sondami, i ich komplementarne docelowe nici DNA w preparatach są wspólnie denaturowane, a następnie łączą się podczas hybrydyzacji. Niespecyficzne i niezwiązane fragmenty sondy są usuwane przez stopniowe przemywanie. Po barwieniu kontrastowym DNA za pomocą DAPI, zhybrydyzowane fragmenty sondy są zwizualizowane za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego wyposażonego w filtry wzbudzenia i emisji specyficzne dla fluorochromów, którymi fragmenty sondy FISH zostały oznakowane.

4. Dostarczone odczynniki

Zestaw ZytoLight SPEC ERBB2/CEN 17 Dual Color Probe Kit jest dostępny w dwóch rozmiarach i zawiera:

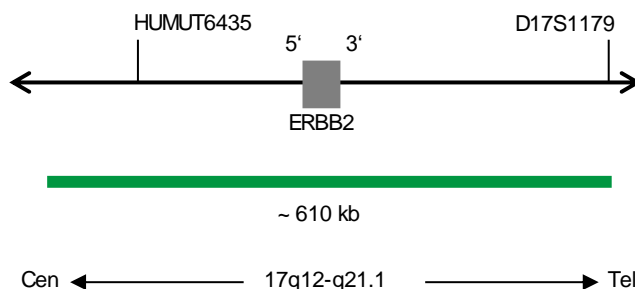
Kod	Składnik	Ilość		Pojemnik
		5	20	
PT1	Heat Pretreatment Solution Citric	150 ml	500 ml	Butelka z zakrętką (dużo a)
ES1	Pepsin Solution	1 ml	4 ml	Butelka z zakraplaczem i z zakrętką
WB1	Wash Buffer SSC	210 ml	560 ml	Butelka z zakrętką (dużo a)
PL8	ZytoLight SPEC ERBB2/CEN 17 Dual Color Probe	0.05 ml	0.2 ml	Fiolka reakcyjna z czerwoną zakrętką
WB2	25x Wash Buffer A	50 ml	2x50 ml	Butelka z zakrętką (średnia)
MT7	DAPI/DuraTect-Solution	0.2 ml	0.8 ml	Fiolka reakcyjna z niebieską zakrętką
	Instrukcja użycia	1	1	

Z-2020-5 (5 testów): Składniki **ES1**, **PL8** i **MT7** są wystarczające na 5 reakcji. Składnik **WB2** jest wystarczający na 5x po 3 barwiacze po 70 ml każdy. Składnik **PT1** jest wystarczający na 2 barwiacze po 70 ml każdy. Składnik **WB1** jest wystarczający na 3 barwiacze po 70 ml każdy.

Z-2020-20 (20 testów): Składniki **ES1**, **PL8** i **MT7** są wystarczające na 20 reakcji. Składnik **WB2** jest wystarczający na 11x po 3 barwiacze po 70 ml każdy. Składnik **PT1** jest wystarczający na 7 barwiaczy po 70 ml każdy. Składnik **WB1** jest wystarczający na 8 barwiaczy po 70 ml każdy.

ZytoLight SPEC ERBB2/CEN 17 Dual Color Probe (PL8) składa się z:

- ZyGreen (wzbudzenie 503 nm/emisja 528 nm) wyznakowane polinukleotydy (~10.0 ng/μl), których docelowe sekwencje są zmapowane w 17q12-q21.1* (chr17:37,572,531-38,181,308) zajmującej region genu ERBB2 (patrz Rys. 1).
 - ZyOrange (wzbudzenie 547 nm/emisja 572 nm) wyznakowane polinukleotydy (~1.5 ng/μl), których docelowe sekwencje są zmapowane w 17p11.1-q11. specyficzne dla alfa-satelitarnego regionu centromerowego D17Z1 chromosomu 17.
 - Bufor do hybrydyzacji oparty na formamidzie
- * zgodnie z Human Genome Assembly GRCh37/hg19



Rys. 1: SPEC ERBB2 Mapa sondy (bez skali)

5. Materiały wymagane, ale nie dostarczane

- Pozytywny i negatywny preparat kontrolny
- Szkiełka mikroskopowe, pozytywnie naładowane
- Łaźnia wodna (37°C, 98°C)
- Hybrydyzator lub płyta grzewcza
- Hybrydyzator lub komora wilgotnościowa w cieplarni do hybrydyzacji
- Regulowane pipety (10 μl, 25 μl)
- Barwiacze
- Timer
- Skalibrowany termometr
- Etanol lub odczynnik alkoholowy
- Ksylen
- Dejonizowana lub destylowana woda
- Szkiełka nakrywkowe (22 mm x 22 mm, 24 mm x 60 mm)
- Rubber cement, np. Fixogum Rubber Cement (Nr. kat. E-4005-50/-125) lub podobny
- Odpowiednio utrzymany mikroskop fluorescencyjny (400-1000x)

- Olejek immersyjny zatwierdzony do mikroskopii fluorescencyjnej
- Odpowiedni zestaw filtrów

6. Przechowywanie i obsługa

Składniki zestawu muszą być przechowywane w 2-8°C. Dodatkowo, **DAPI/DuraTect-Solution (MT7)** i sonda (**PL8**) muszą być chronione przed światłem. Natychmiast po użyciu przenieść składniki do warunków przechowywania. Jeśli warunki przechowywania będą przestrzegane, zestaw będzie funkcjonalny, bez utraty wydajności, przynajmniej do daty ważności wydrukowanej na etykiecie. Nie używać odczynników po upływie terminu ważności podanym na etykiecie.

7. Ostrzeżenie i środki ostrożności

- Przeczytaj instrukcję użytkowania przed użyciem!
- Nie stosować odczynników po przekroczeniu daty ważności!
- Produkt ten zawiera substancje (w małym stężeniu i objętości), które są szkodliwe dla zdrowia i potencjalnie zakaźne. Unikać jakiegokolwiek bezpośredniego kontaktu z odczynnikami. Podejmij odpowiednie środki ochronne (stosuj rękawiczki ochronne, okulary ochronne i odzież laboratoryjną)!
- Jeśli odczynniki wejdą w kontakt ze skórą, natychmiast opłucz skórę dużą ilością wody!
- Karta charakterystyki substancji niebezpiecznej jest dostępna na żądanie profesjonalnego użytkownika.
- Nie używaj ponownie odczynników.
- Unikaj krzyżowego zanieczyszczenia próbek, które może prowadzić do błędnych wyników.
- Sonda nie powinna być ekspozycja na światło, zwłaszcza silne światło, przez dłuższy okres czasu, np. wszystkie kroki powinny zostać wykonane, jeśli to możliwe, w ciemności i/lub używając pojemników odpornych na światło!
- Sonda (**PL8**) i **DAPI/DuraTect-Solution (MT7)** nie powinny być ekspozycja na światło, zwłaszcza silne, przez dłuższy okres czasu, tj. wszystkie kroki należy wykonać, w miarę możliwości, w ciemności i / lub używając pojemników odpornych na światło!

Zwroty wskazujące rodzaj zagrożenia i określające środki ostrożności dla PL8:

Składnik determinujący zagrożenie to formamid.



Niebezpieczeństwo

H351	Podrażnia skórę, może powodować raka.
H360FD	Może działać szkodliwie na płodność. Może działać szkodliwie na dziecko w łonie matki.
H373	Może powodować uszkodzenie narządów poprzez długotrwałe lub powtarzane narażenie.
P201	Przed użyciem zapoznać się ze specjalnymi środkami ostrożności.
P202	Nie używać przed zapoznaniem się i zrozumieniem wszystkich środków bezpieczeństwa.
P260	Nie wdychać pyłu/dymu/gazu/mgły/par/rozpylonej cieczy.
P280	Stosować rękawice ochronne/odzież ochronną/ochronę oczu/ochronę twarzy.
P308+P313	W przypadku narażenia lub styczności: Zasięgnąć porady/zgłosić się pod opiekę lekarza.
P405	Przechowywać pod zamknięciem.

Zwroty wskazujące rodzaj zagrożenia i określające środki ostrożności dla PT1, WB1 i WB2:

Składnikiem określającym zagrożenie jest mieszanina: 5-chloro-2-metylo-4-izotiazolin-3-onu [nr WE. 247-500-7] i 2-metylo-2H-izotiazol-3-on [nr EC. 220-239-6] (3:1).



Uwaga

H317	Może powodować reakcję alergiczną skóry.
P261	Unikać wdychania pyłu/dymu/gazu/mgły/par/rozpylonej cieczy.
P272	Zanieczyszczonej odzieży ochronnej nie wносить poza miejsce pracy.
P280	Stosować rękawice ochronne/odzież ochronną/ochronę oczu/ochronę twarzy.
P302+P352	W PRZYPADKU KONTAKTU ZE SKÓRĄ: Umyć dużą ilością wody.
P333+P313	W przypadku wystąpienia podrażnienia skóry lub wysypki: Zasięgnąć porady/zgłosić się pod opiekę lekarza.
P362+P364	Zanieczyszczoną odzież zdjąć i wyprać przed ponownym użyciem.

8. Ograniczenia

- Do zastosowań w diagnostyce *in vitro*.
- Tylko do użytku profesjonalnego.
- Interpretacja kliniczna jakiegokolwiek pozytywnego zabarwienia lub jego braku musi być wykonana w kontekście historii klinicznej, morfologii, innych kryteriów histopatologicznych, a także innych badań diagnostycznych. Obowiązkiem wykwalifikowanego patologa jest zaznajomienie się z sondami FISH, odczynnikami, panelami diagnostycznymi i metodami stosowanymi do wytwarzania barwionego preparatu. Barwienie musi być wykonane w certyfikowanym, licencjonowanym laboratorium pod nadzorem patologa, który jest odpowiedzialny za przeglądanie wybarwionych preparatów i zapewnienie odpowiedniej kontroli pozytywnej i negatywnej.
- Wybarwienie preparatów, szczególnie intensywność sygnału i barwienie łańcuchów, zależy od obróbki i przetwarzania próbki przed barwieniem. Nieodpowiednie utrwalenie, zamrażanie, rozmrażanie, płukanie, suszenie, podgrzewanie, krojenie lub zanieczyszczenie innym preparatem lub płynami może być źródłem artefaktów lub fałszywych wyników. Niepójne wyniki mogą być wynikiem różnych odmian metod utrwalania i zatapiania, a także obecności nieprawidłowości w próbce.
- Sonda powinna być użyta do detekcji loci opisanej w części 4 „Dostarczone odczynniki”.
- Wydajność została zatwierdzona przy użyciu procedur opisanych w niniejszej instrukcji użytkowania. Modyfikacje tych procedur mogą zmienić wydajność i muszą zostać zatwierdzone przez użytkownika.

9. Substancje zakłócające

Czerwone krwinki krwi obecne w próbce mogą wykazywać autofluorescencję, która utrudnia rozpoznawanie sygnału.

Następujące utrwalacze są niekompatybilne z FISH:

- Utrwalacz Bouin'a
- Utrwalacz B5
- Utrwalacze kwasne (np. kwas pikrynowy)
- Utrwalacz Zenker'a
- Alkohole (stosowane samodzielnie)
- Chlorek rtęci
- Utrwalacz formaldehyd/cynk
- Utrwalacz Hollande'a
- Niebuforowana formalina

10. Przygotowanie próbek

Zalecenia:

- Utrwalanie w 10% neutralnej buforowanej formalinie przez 24 h w temperaturze pokojowej (18-25°C).
- Rozmiar próbki $\leq 0.5 \text{ cm}^3$.
- Stosuj parafinę jako ci premium.
- Zatapanie powinno się odbywać w temperaturze poniżej 65°C.
- Przygotuj skrawki o grubości 2-4 μm .
- Stosuj szkiełka mikroskopowe pozytywnie naładowane.
- Utrwalaj przez 2-16 h w 50-60°C.

11. Obróbka wstępna produktu

25x Wash Buffer (WB2) należy poddać wstępnej obróbce zgodnie z instrukcją w części 12 "Procedura testu". Wszystkie pozostałe odczynniki są gotowe do użycia. Nie jest wymagana rekonstrukcja, mieszanie czy rozcieńczanie. Przed użyciem przenieść sondę do temperatury pokojowej (18-25°C), chroniąc przed światłem. Przed otwarciem fiolki wymieszać w worteksie i krótko odwirować.

12. Procedura testu

12.1 Dzień 1

Kroki przygotowawcze

- (1) *Przygotuj dwie serie etanolu (70%, 90% i 100%):* Rozcieńcz 100% etanol z dejonizowaną lub destylowaną wodą. Roztwory mogą być przechowywane w odpowiednich pojemnikach i ponownie wykorzystane.
- (2) *Heat Pretreatment Solution Citric (PT1):* Podgrzej do 98°C.
- (3) *Wash Buffer SSC (WB1):* Przenieść do temperatury pokojowej (RT).
- (4) *ZytoLight FISH Probe:* Przenieść do RT przed użyciem, chroniąc przed światłem.

Opcjonalnie, podczas wykonywania dodatkowego etapu utrwalania:

(mocno zalecane, jeśli utrwalanie tkanki nie jest optymalne)

Przygotuj 1% roztwór formaldehydu korzystając z zestawu Formaldehyde Dilution Buffer Set (PT-0006-100)

Etap wstępny (odparafinowanie/proteoliza)

- (1) Inkubowanie szkiełek przez 10 min w 70°C (np. na płycie grzewczej).
- (2) Inkubowanie szkiełek 2x po 10 min w ksylenie.
- (3) Inkubowanie w etanolu 100%, 100%, 90%, i 70%, każde po 5 min.
- (4) Płukanie 2x 2 min w dejonizowanej lub destylowanej wodzie.
- (5) Inkubowanie przez 15 min w podgrzanej do 98°C Heat Pretreatment Solution Citric (PT1).

Nie zalecamy stosowania więcej niż osmiu szkiełek w barwiaczu.

- (6) Natychmiastowe przeniesienie preparatów do wody dejonizowanej lub destylowanej, przemyć 2x po 2 minuty i osuszenie lub osuszenie z wody.
- (7) Nałożenie (kroplami) roztworu pepsyny (**ES1**) na próbki i inkubowanie przez 15 minut w temperaturze 37°C w komorze wilgotnościowej.

W zależności od wielu czynników, np. natury i czasu utrwalania, jak również charakteru komórek, mogą być wymagane różne czasy inkubacji. Zgodnie z wytycznymi inkubacji zalecamy 2 – 30 min inkubacji dla próbek tkankowych i 5 – 15 min dla próbek cytologicznych. Zasadniczo zaleca się ustalenie optymalnego czasu proteolizy w badaniach wstępnych.

- (8) Płukanie przez 5 min w Wash Buffer SSC (WB1).

Opcjonalnie, podczas dodatkowego etapu utrwalania:

Inkubowanie szkiełek przez 15 min w 1% roztworze formaldehydu a następnie przez 5 min w Wash Buffer SSC (WB1)

- (9) Płukanie przez 1 min w dejonizowanej lub destylowanej wodzie
- (10) Odwodnienie: w 70%, 90%, i 100% etanolu, każde przez 1 min
- (11) Wysuszenie preparatów.

Uwaga: Przed zastosowaniem sondy upewnij się, że skrawki są całkowicie suche, ponieważ pozostała wilgoć może zmniejszyć intensywność sygnału i/lub wpłynąć na morfologię tkanki.

Denaturacja i hybridyzacja

- (1) Nanieś pipetą 10 μl sondy ZytoLight SPEC ERBB2/CEN 17 Dual Color Probe (PL8) na każdy przygotowany wstępnie preparat.

Unikaj długiej ekspozycji sondy na światło.

- (2) Nakryj preparat szkiełkiem nakrywkowym 22 mm x 22 mm (unikaj zamknięcia bąbli powietrza) i uszczelnij preparat.

Rekomendujemy stosowanie rubber cement (np., Fixogum) do uszczelniania preparatów.

- (3) Umieść szkiełka na płycie grzewczej lub hybridyzatorze i denaturuj preparaty przez 10 min w 75°C.
- (4) Przenieś szkiełka do komory wilgotnościowej i hybridyzuj przez noc w temperaturze 37°C (np. w cieplarni hybridyzatora).

Istotne jest, aby próbki nie wysychały podczas etapu hybridyzacji.

12.2 Dzień 2

Kroki przygotowawcze

- (1) *Przygotowanie 1x Wash Buffer A:* Rozcieńcz 1 część 25x Wash Buffer A (WB2) z 24 częściami wody dejonizowanej lub destylowanej. Napełnij 3 barwiacze buforem 1x Wash Buffer A i ogrzej do temperatury 37°C.
- (2) DAPI/DuraTect-Solution (MT7): Przed zastosowaniem przenieś do temperatury pokojowej chroniąc przed światłem.

Obróbka po hybridyzacji i detekcja

- (1) Ostrożnie usuń rubber cement lub klej
- (2) Usuń szkiełko nakrywkowe przez zanurzenie w buforze płuczającym 1x Wash Buffer A w 37°C przez 1-3 min.
- (3) Przepłucz przy użyciu buforu do płukania 1x Wash Buffer A 2x po 5 min w 37°C.

Bufor 1x Wash Buffer A powinien być podgrzany. Sprawdź temperaturę jeśli to konieczne.

- (4) Inkubuj szkiełka w 70%, 90% i 100% etanolu każde po 1 min.
- (5) Wsusz próbki na powietrzu chroniąc przed światłem.
- (6) Nanieś pipetą 25 μl DAPI/DuraTect-Solution (MT7) na szkiełka. Unikając zamknięcia bąbli powietrza, przykryj próbki szkiełkiem nakrywkowym (24mm x 60mm). Inkubuj w ciemności przez 15 min.

Korzystanie z obciętej końcówki od pipety w celu zwiększenia wielkości otworu, może ułatwić proces pipetowania. Unikaj długiej ekspozycji na światło.

- (7) Przechowuj szkiełka w ciemności. W przypadku dłuższych okresów przechowywania, powinno się to odbywać w 2-8°C.
- (8) Ocena materiału próbki jest przeprowadzana za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej. Potrzebne są zestawy filtrów dla następujących zakresów długości fal:

Barwnik fluorescencyjny	Wzbudzenie	Emisja
ZyGreen	503 nm	528 nm
ZyOrange	547 nm	572 nm

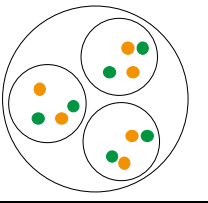
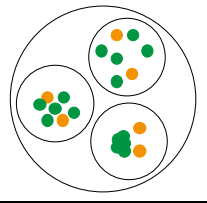
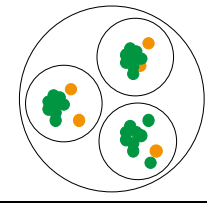
13. Interpretacja wyników

Przy użyciu odpowiednich zestawów filtrów, sygnały hybridyzacji sondy są zielone (region genu ERBB2) i pomarańczowe (CEN 17).

Sytuacja normalna: W interfazach normalnych komórek lub komórek bez amplifikacji z udziałem regionu genu ERBB2 pojawiają się dwa zielone i dwa pomarańczowe sygnały (patrz Rys. 2).

Sytuacja nieprawidłowa: W komórkach z amplifikacją regionu genu ERBB2 obserwuje się zwiększoną liczbę zielonych sygnałów lub zielonych klastrów sygnałowych (patrz Rys. 2).

Nakładają ce się sygnały mogą być wyświetlane jako z ótte sygnały.

Filtr podwójny dla pasma zielonego i pomarańczowego		
		
Komórki normalne	Niski poziom amplifikacji ERBB2	Wysoki poziom amplifikacji ERBB2

Rys. 2: Oczekiwane wyniki w normalnych i nieprawidłowych jądrach komórkowych

Inny rozkład sygnału może być obserwowany w niektórych nieprawidłowych próbkach, co może skutkować innym wzorcem sygnału niż opisany powyżej, wskazując na wariantowe rearanżacje. Nieoczekiwane wzorce sygnału powinny zostać dalej zbadane.

Należy pamiętać:

- Z powodu zdekondensowanej chromatyny pojedyncze sygnały FISH mogą pojawić się jako małe skupienia sygnałów. Zatem, dwa lub trzy sygnały o tym samym rozmiarze, oddzielone odległością ≤ 1 średnicy sygnału, powinny być liczone, jako jeden sygnał.
- Nie należy oceniać jąder komórkowych zachodzących na siebie.
- Nie zliczać jąder komórkowych nadmiernie strawionych (rozpoznane jako ciemne obszary widoczne w jądrze komórkowym).
- Nie zliczać jąder komórkowych z silną autofluorescencją, co utrudnia rozpoznawanie sygnału.
- Negatywne lub nieoczekiwane wyniki mogą być wynikiem wielu czynników (patrz część 17).
- Aby poprawnie zinterpretować wyniki, użytkownik musi zatwierdzić ten produkt przed użyciem w procedurach diagnostycznych zgodnie z wytycznymi krajowymi i/lub międzynarodowymi.

14. Rekomendowane procedury kontroli jakości

W celu monitorowania prawidłowego przygotowania próbek i odczynników testowych do każdego testu należy dołączyć kontrole wewnętrzne i zewnętrzne. Jeśli wewnętrzne i/lub zewnętrzne kontrole nie wykazują odpowiedniego zabarwienia, wyniki z próbkami od pacjentów muszą być uznane za nieważne.

Kontrola wewnętrzna: Nienowotworowe komórki w obrębie próbki, które wykazują normalny wzorec sygnału, np. fibroblasty.

Kontrola zewnętrzna: Walidowane preparaty z kontrolą dodatnią i ujemną.

15. Charakterystyka wydajności

Dokładność: Lokalizacja hybrydyzacji sondy oceniona na metafazowych wymazach kariotypów normalnych samców. We wszystkich badanych próbkach sonda hybrydyzowała wyłącznie z oczekiwanymi loci. Nie zaobserwowano dodatkowych sygnałów ani krzyżowych hybrydyzacji. Dlatego dokładność została obliczona na 100%.

Czułość analityczna: W celu oceny wiarygodności analitycznej sonda była oceniana na podstawie metafazowych wymazach kariotypów normalnych samców. Wszystkie jądra komórkowe wykazały oczekiwany prawidłowy wzorec sygnału we wszystkich badanych próbkach. Dlatego czułość analityczna została obliczona na 100%.

Specyficzność analityczna: W celu oceny specyficzności analitycznej sonda była oceniana na podstawie metafazowych wymazach kariotypów normalnych samców. We wszystkich badanych próbkach sonda hybrydyzowała wyłącznie z oczekiwanymi loci i żadnymi innymi loci. Dlatego specyficzność analityczna została obliczona na 100%.

16. Utylizacja

Utylizacja odczynników musi odbywać się zgodnie z lokalnymi przepisami.

17. Rozwiązywanie problemów

Każde odchylenie od instrukcji obsługi może prowadzić do gorszych wyników barwienia lub braku zabarwienia.

Słabe sygnały lub brak sygnałów

Możliwa przyczyna	Działanie
Niedostępna sekwencja docelowa	Zastosuj odpowiednią kontrolę docelową
Komórka lub tkanka nie została prawidłowo utrwalona	Zoptymalizuj czas utrwalania i utrwalacz lub zastosuj dodatkowy etap utrwalania opisany w części „12. Procedura testu”.
Nieprawidłowa temperatura wstępnej obróbki ciepłej, proteolizy, denaturacji, hybrydyzacji, lub płukania	Sprawdź temperaturę wszystkich wykorzystywanych urządzeń technicznych za pomocą skalibrowanego termometru
Proteolityczna obróbka wstępna nie została przeprowadzona prawidłowo	Zoptymalizuj czas inkubacji pepsyny, wydłuż lub skróć, jeśli to konieczne
Odprowadzenie sondy	Gdy używasz hybrydyzatora obowiązkowe jest stosowanie mokrych pasów / napełnionych wodą zbiorników. Gdy używasz ciepłarki wymagane jest użycie komory wilgotnościowej. W dodatku szkiełko nakrywkowe powinno być dokładnie uszczelnione, np. Fixogumem w celu zabezpieczenia przed wyschnięciem podczas hybrydyzacji
Zbyt niskie stężenie buforu płuczącego	Sprawdź stężenie buforu płuczącego
Stare roztwory do odwadniania	Przygotuj świeże roztwory do odwadniania
Nieprawidłowo ustawiony mikroskop fluorescencyjny	Dostosuj poprawnie
Stosowanie nieodpowiednich zestawów filtrów	Stosuj zestawy filtrów odpowiednich do fluorochromów sondy. <i>Filtry z potrójnym pasmem zapewniają mniej światła w porównaniu z zestawami filtrów jedno lub dwupasmowymi.</i> <i>W konsekwencji sygnały mogą wydawać się słabsze przy użyciu tych zestawów filtrów z potrójnym pasmem.</i>
Obraz sondy/fluorochromu nieprawidłowy	Wykonaj etapy hybrydyzacji i płukania w ciemności

Sygnały krzyżowe hybrydyzacji; wysokie tło

Możliwa przyczyna	Działanie
Niekompletne odparafinowanie	Użyj świeżych odczynników; sprawdź czas usuwania parafiny
Zbyt silna proteolityczna obróbka wstępna	Zredukuj czas inkubacji z pepsyną
Zbyt duża objętość sondy w obszarze	Zredukuj objętość sondy na materiale/obszarze, rozprowadź sondę kroplami w celu uniknięcia lokalnej koncentracji
Szkiełko schłodzone do temperatury pokojowej przed hybrydyzacją	Przenieś szybko szkiełko do temperatury 37°C
Zbyt wysokie stężenie buforu płuczącego	Sprawdź stężenie buforu płuczącego
Zbyt niska temperatura płukania po hybrydyzacji	Sprawdź temperaturę; podnieś ją jeśli to konieczne

Odwodnienie próbek pomiędzy poszczególnymi etapami inkubacji	Zapobiegaj odwodnieniu próbek przez uszczelnienie szkiełek i przeprowadzanie inkubacji w wilgotnym środowisku
--	---

Zdegradowana morfologia tkanki

Możliwa przyczyna	Działanie
Komórka lub tkanka nie zostały utrwalone prawidłowo	Zoptymalizuj czas utrwalania i utrwalcz lub zastosuj dodatkowy etap utrwalania opisany w części „12. Procedura testu”.
Proteolityczna obróbka wstępna nie została przeprowadzona prawidłowo	Zoptymalizuj czas inkubacji pepsyny, wydłuż lub skróć, jeśli to konieczne
Niewystarczające wysuszenie przed aplikacją sondy	Wydłuż suszenie

Zachodzące na siebie jądra komórkowe

Możliwa przyczyna	Działanie
Niewłaściwa grubość ś skrawków tkanek	Przygotuj skrawki o grubości 2-4 μm

Preparat spłynął ze szkiełka

Możliwa przyczyna	Działanie
Szkiełka z nieodpowiednią powłoką	Zastosuj odpowiednie szkiełka
Zbyt silna proteolityczna obróbka wstępna	Zredukuj czas inkubacji z pepsyną

Słabe barwienie kontrastowe

Możliwa przyczyna	Działanie
Niskie stężenie roztworu DAPI	Zamiast tego użyj <u>DAPI/DuraTect-Solution (ultra)</u> (Nr. kat. MT-0008-0.8)
Zbyt krótki czas inkubacji z DAPI	Dostosuj czas inkubacji z DAPI

18. Literatura

- Baselga J, et al. (1999) *Semin Oncol* 26: 78-83.
- Brunello E, et al. (2012) *Histopathology* 60: 482-8.
- Brunner K, et al. (2010) *Anal Quant Cytol Histol* 32: 78-89.
- Cochet A, et al. (2012) *J Nucl Med* 53: 512-20.
- Coussens L, et al. (1985) *Science* 230: 1132-9.
- Ettl T, et al. (2012) *Hum Pathol* 43: 921-31.
- Ettl T, et al. (2012) *Br J Cancer* 106: 719-26.
- Fasching P, et al. (2011) *BMC Cancer* 11: 486.
- Haas M, et al. (2011) *Virchows Arch* 458: 403-11.
- Hillig T, et al. (2012) *APMIS* 120: 1000-7.
- Humbert O, et al. (2012) *Ann Oncol* 23: 2572-7.
- Hwang CC, et al. (2011) *Histopathology* 59: 984-92.
- Hynes NE & Stern DF (1994) *Biochim Biophys Acta* 1198: 165-84.
- Jäger M, et al. (2009) *Cancer Res* 69: 4270-6.
- Lang D, et al. (2008) *Diagn Pathol* 3: 49ff.
- Lehmann-Che L, et al. (2011) *Br J Cancer* 104: 1739-46.
- Ly M, et al. (2012) *Oncology* 83: 257-63.
- Moelans CB, et al. (2011) *Crit Rev Oncol Hematol* 80: 380-92.
- Oliveira-Costa JP, et al. (2011) *Diagn Pathol* 6: 73.
- Park JB, et al. (1989) *Cancer Res* 49: 6605-9.
- Parris TZ, et al. (2010) *Clin Cancer Res* 16: 3860-74.
- Perrone G, et al. (2012) *PLoS One* 7: e43110.
- Popescu NC, et al. (1989) *Genomics* 4: 362-6.
- Sassen A, et al. (2008) *Breast Cancer Res* 10: R2.
- Sassen A, et al. (2009) *Breast Cancer Res* 11: R50.
- Schindlbeck C, et al. (2010) *J Cancer Res Clin Oncol* 136: 1029-37.
- Slamon DJ, et al. (1987) *Science* 235: 177-82.
- Vollmann-Zwerenz A, et al. (2010) *Cytometry Part A* 77: 387-99.
- Voutsas IF, et al. (2013) *Int J Radiat Biol* 89: 319-25.

Nasi eksperci są gotowi odpowiedzieć na Państwa pytania.
Prosimy o kontakt helptech@zytovision.com



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

Znaki towarowe:

ZytoVision® i ZytoLight® to znaki towarowe ZytoVision GmbH.