



ZytoDot 2C CISH Implementation Kit

REF C-3044-10 Σ 10

REF C-3044-40 Σ 40

Pro použití při chromogenní in situ hybridizaci (CISH)

4250380N717V



Diagnostický zdravotnický prostředek in vitro

podle IVDR (EU) 2017/746

1. Zamýšlené použití

ZytoDot 2C CISH Implementation Kit je určen k použití v kombinaci s digoxigeninem/dinitrofenylem značenými sondami *ZytoDot 2C CISH* na formalínem fixovaných, do parafínu vložených vzorcích pomocí chromogenní *in situ* hybridizace (CISH).

Výrobek je určen pouze pro profesionální použití. Všechny testy s použitím výrobku by měly být prováděny v certifikované, licencované laboratoři anatomické patologie pod dohledem patologa/humánního genetika kvalifikovaným personálem.

2. Princip testu

Technika chromogenní *in situ* hybridizace (CISH) umožňuje detekci a vizualizaci specifických sekvencí nukleových kyselin v buněčných preparátech. Nukleotidové fragmenty značené hapténem, tzv. sondy CISH, a jejich komplementární cílové sekvence v preparátech jsou při hybridizaci společně denaturovány a následně se nechají annealovat. Poté se nespecifické a nenávané fragmenty sond odstraní pomocí promývacích kroků. Tvorbu duplexu značené sondy lze vizualizovat pomocí primárních (neznačených) protilátek, které jsou detekovány sekundárními polymerizovanými protilátkami konjugovanými s enzymem. Enzymatická reakce s chromogenními substráty vede k tvorbě barevných precipitátů. Po protibarvení jádra jaderným barvivem se hybridizované fragmenty sondy vizualizují světelnou mikroskopií.

3. Dodaná činidla

Sada *ZytoDot 2C CISH Implementation Kit* je k dispozici ve dvou velikostech a skládá se z:

Kód	Komponenta	Množství		Kontejner
		40	10	
PT2	Heat Pretreatment Solution EDTA	500 ml	150 ml	Láhev se šroubovacím uzávěrem (velká)
ES1	Pepsin Solution	4 ml	1 ml	Lahvička s kapátkem, bílý uzávěr
WB1	Wash Buffer SSC	560 ml	210 ml	Láhev se šroubovacím uzávěrem (velká)
WB5	20x Wash Buffer TBS	2x 50 ml	50 ml	Láhev se šroubovacím uzávěrem
AB14	Anti-DIG/DNP-Mix	4 ml	1 ml	Lahvička s kapátkem, žlutý uzávěr
AB13	HRP/AP-Polymer-Mix	4 ml	1 ml	Lahvička s kapátkem, modrý uzávěr
SB6a	AP-Red Solution A	0.4 ml	0.1 ml	Lahvička s kapátkem, červený uzávěr (malá)
SB6b	AP-Red Solution B	15 ml	4 ml	Lahvička s kapátkem, červený uzávěr
SB7a	HRP-Green Solution A	0.8 ml	0.2 ml	Lahvička s kapátkem, zelený uzávěr (malá)
SB7b	HRP-Green Solution B	15 ml	4 ml	Lahvička s kapátkem, zelený uzávěr
CS2	Nuclear Blue Solution	20 ml	4 ml	Láhev se šroubovacím uzávěrem, černá
MT4	Mounting Solution (alcoholic)	4 ml	1 ml	Skleněná láhev, hnědá
	AP-Red reaction vessel	2	1	Odměrka, červené víčko
	HRP-Green reaction vessel	2	1	Odměrka, zelené víčko
	Návod k použití	1	1	

C-3044-10 (10 testů): Složky **ES1**, **AB14**, **AB13**, **SB6a-b**, **SB7a-b**, **CS2** a **MT4** postačují pro 10 reakcí. Složka **PT2** vystačí na 2 barvicí nádoby po 70 ml. Složka **WB1** vystačí na 3 barvicí nádoby po 70 ml. Složka **WB5** vystačí na 14 barvicích sklenic po 70 ml.

C-3044-40 (40 testů): Složky **ES1**, **AB14**, **AB13**, **SB6a-b**, **SB7a-b**, **CS2** a **MT4** vystačí na 40 reakcí. Složka **PT2** vystačí na 7 barvicích sklenic po 70 ml. Složka **WB1** vystačí na 8 barvicích sklenic po 70 ml. Složka **WB5** vystačí na 28 barvicích sklenic po 70 ml.

4. Požadované, ale neposkytované materiály

- ZytoDot 2C CISH Probe
- Pozitivní a negativní kontrolní vzorky
- Mikroskopická sklíčka, kladně nabitá
- Vodní lázeň (80 °C, 98 °C)
- Hybridizér nebo horká deska
- Hybridizátor nebo vlhkostní komora v hybridizační peci
- Nastavitelné pipety (10 μ l, 1000 μ l)
- Barvicí nádoby nebo lázně
- Časovač
- Kalibrovaný teploměr
- Etanol nebo reagenční alkohol
- Xylen
- Metanol 100%
- Peroxid vodíku (H₂O₂) 30 %
- Deionizovaná nebo destilovaná voda
- Krycí sklíčka (22 mm x 22 mm, 24 mm x 32 mm)
- Pryžový cement, např. *Fixogum Rubber Cement* (prod. č. E-4005-50/-125) -nebo podobný.
- Vhodně udržovaný světelný mikroskop (400-630x).

5. Skladování a manipulace

Skladujte při teplotě 2-8 °C ve svislé poloze. Ihned po použití vraťte do skladovacích podmínek. Nepoužívejte činidla po uplynutí doby použitelnosti uvedené na štítku. Při odpovídajícím zacházení je při ípravku stabilní do data použitelnosti uvedeného na štítku.

6. Upozornění a bezpečnostní opatření

- Před použitím si přečtěte návod k použití!
- Nepoužívejte činidla po uplynutí doby použitelnosti!
- Tento výrobek obsahuje látky (v nízkých koncentracích a objemech), které jsou zdraví škodlivé. Vyvarujte se jakéhokoli přímého kontaktu s činidly. Při ijměte vhodná ochranná opatření (používejte jednorázové rukavice, ochranné brýle a laboratorní oděv)!
- Jakoukoli závažnou událost, ke které došlo v souvislosti s výrobkem, nahláste výrobci a příslušnému úřadu v souladu s místními předpisy!
- Pokud se činidla dostanou do kontaktu s kůží, okamžitě ji opláchněte velkým množstvím vody!
- Pro profesionální uživatele je na vyžádání k dispozici bezpečnostní list materiálu.
- Reagencie nepoužívejte opakovaně, pokud není opakované použití výslovně povoleno!
- Vyvarujte se křížové kontaminace vzorků, protože to může vést k chybným výsledkům.
- Během hybridizace a promývání se vzorky nesmí nechat zaschnout.

Standardní věty o nebezpečnosti a pokyny pro bezpečné zacházení pro AB13, AB14, PT2, SB7b, WB1 a WB5:

Složka určující nebezpečí je směsicí: 5-chlor-2-methylisothiazol-3(2H)-on [číslo ES 247-500-7] a 2-methylisothiazol-3(2H)-on [číslo ES 220-239-6] (3:1).



Varování

H317	Může vyvolat alergickou kožní reakci.
P261	Zamezte vdechování prachu/dýmu/plynu/mlhy/par/aerosolů.
P272	Kontaminovaný pracovní oděv neodnášejte z pracoviště.
P280	Používejte ochranné rukavice/ochranný oděv/ochranné brýle/obličejový štít.
P302+P352	PŘI STYKU S KŮŽÍ: Omyjte velkým množstvím vody.
P333+P313	Při podráždění kůže nebo vyrážce: Vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření.
P362+P364	Kontaminovaný oděv svlékněte a před opětovným použitím vyperte.

Standardní věty o nebezpečnosti a pokyny pro bezpečné zacházení pro SB7a:

Složkami určujícími nebezpečnost jsou methanol a peroxid vodíku 30%.



Danger

H225	Highly flammable liquid and vapour.
H301+H311 +H331	Toxic if swallowed, in contact with skin or if inhaled.
H370	Causes damage to organs.
P210	Keep away from heat, hot surfaces, sparks, open flames and other ignition sources. No smoking.
P233	Keep container tightly closed.
P260	Do not breathe dust/fume/gas/mist/vapours/spray.
P280	Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection.
P308+P311	IF exposed or concerned: Call a POISON CENTER/doctor.
P403+P235	Store in a well-ventilated place. Keep cool.

Standardní věty o nebezpečnosti a pokyny pro bezpečné zacházení pro CS2:

Složkami určujícími nebezpečnost jsou ethandiol a ethylenglykol.



Varování

H373	Při prodloužené nebo opakované expozici požitím může poškodit ledviny.
P260	Nevdechujte prach/dým/plyn/mlhu/páry/aerosoly.
P314	Necítíte-li se dobře, vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření.

Standardní věty o nebezpečnosti a pokyny pro bezpečné zacházení pro MT4:

Složkou určující nebezpečnost je xylen.



Varování

H226	Hořlavá kapalina a páry.
H312+H332	Zdraví škodlivý při styku s kůží a při vdechování.
H315	Dráždí kůži.
H319	Způsobuje vážné podráždění očí.
H335	Může způsobit podráždění dýchacích cest.
H373	Může způsobit poškození orgánů při prodloužené nebo opakované expozici.
P210	Chraňte před teplem, horkými povrchy, jiskrami, otevřeným ohněm a jinými zdroji zapálení. Zákaz kouření.
P260	Nevdechujte prach/dým/plyn/mlhu/páry/aerosoly.
P280	Používejte ochranné rukavice/ochranný oděv/ochranné brýle/obličejový štít.
P305+P351+P338	PŘI ZASAŽENÍ OČÍ: Několik minut opatrně vyplachujte vodou. Vyjměte kontaktní čočky, jsou-li nasazeny a pokud je lze vyjmout snadno. Pokračujte ve vyplachování.
P337+P313	Přetrvává-li podráždění očí: Vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření.
P403+P235	Skladujte na dobře větraném místě. Uchovávejte v chladu.
EUH208	Obsahuje Methyl-methakrylát, Butyl-methakrylát. Může vyvolat alergickou reakci.

Standardní věty o nebezpečnosti a pokyny pro bezpečné zacházení pro SB6a:

H412	Škodlivý pro vodní organismy, s dlouhodobými účinky.
P273	Zabraňte uvolnění do životního prostředí.

Zvláštní značení u ESI:

EUH208	Obsahuje pepsin A. Může vyvolat alergickou reakci.
EUH210	Na vyžádání je k dispozici bezpečnostní list.

7. Omezení

- Pro diagnostické použití *in vitro*.
- Pouze pro profesionální použití.
- Pouze pro neautomatizované použití.
- Klinická interpretace jakéhokoli pozitivního barvení nebo jeho nepřítomnosti musí být provedena v kontextu klinické anamnézy, morfologie, dalších histopatologických kritérií a také dalších diagnostických testů. Je odpovědností kvalifikovaného patologa/humánního genetika, aby znal sondy ISH, činidla, diagnostické panely a metody používané k výrobě barveného preparátu. Barvení musí být prováděno v certifikované licencované laboratoři i pod dohledem patologa/humánního genetika, který je odpovědný za revizi obarvených preparátů a zajištění adekvátnosti pozitivních a negativních kontrol.

- Barvení vzorků, zejména intenzita signálu a barvení pozadí, závisí na manipulaci se vzorkem a jeho zpracování před barvením. Nesprávná fixace, zmrazení, rozmrazení, mytí, sušení, zahřívání, řezání nebo kontaminace jinými vzorky či tekutinami může vést k artefaktům nebo falešným výsledkům. Nekonzistentní výsledky mohou být důsledkem rozdílů v metodách fixace a vkládání, jakož i vrozených nepravidelností ve vzorku.
- Výkon byl ověřen pomocí postupů popsaných v návodu k použití příslušné sondy ZytoVision a implementační sady. Úpravy těchto postupů mohou změnit výkonnost a musí být ověřeny uživatelem. Tento IVD je certifikován jako CE pouze v případě, že je používán způsobem popsaným v tomto návodu k použití v rozsahu určeného použití.

8. Rušivé látky

Následující fixativa jsou s ISH neslučitelná:

- Bouinovo fixační činidlo
- fixační prostředek B5
- Kyselé fixační prostředky (např. kyselina pikrová)
- Zenkerův fixativ
- Alkoholy (při samostatném použití)
- Chlorid rtuťnatý
- Formaldehydové/zinkové fixační činidlo
- Hollandův fixativ
- Formalin bez pufru

9. Příprava vzorků

Doporučení:

- Vyvarujte se křížové kontaminace vzorků, protože to může vést k chybným výsledkům.
- Fixace v 10% neutrálně pufovaném formalínu po dobu 24 hodin při pokojové teplotě (18-25 °C).
- Velikost vzorku ≤ 0,5 cm³.
- Používejte parafin prvotřídní kvality.
- Vkládání by se mělo provádět při teplotách nižších než 65 °C.
- Připravte 3-5 μm řezy mikrotomem.
- Používejte kladně nabitá mikroskopická sklíčka.
- Fixujte 2-16 h při 50-60 °C.

10. Přípravné ošetření zařízení

20x Wash Buffer TBS (WB5) je třeba připravit podle pokynů v části 11. "Postup testu". Všechna ostatní činidla soupravy jsou připravena k použití. Není nutná rekonstituce, míchání ani ředění.

Před použitím sondu uveďte do pokojové teploty (RT) a krátce promíchejte.

11. Postup analýzy

11.1 Den 1

Přípravné kroky

- Připravte sérii ethanolu (70%, 90% a 100% roztok ethanolu): Zředte 100% ethanol deionizovanou nebo destilovanou vodou. Tyto roztoky lze uchovávat ve vhodných nádobách a lze je opakovaně použít.
- Heat Pretreatment Solution EDTA (PT2): Zahřejte na 98 °C v zakryté barvicí nádobě.
- Připrava 3% H₂O₂: Zředte 1 díl 30% H₂O₂ v 9 dílech 100% metanolu.
- ZytoDot 2C CISH Probe: Před použitím zahřejte na pokojovou teplotu (RT).

Předúprava (odvoskování/proteolýza)

- Inkubujte sklíčka 10 minut při 70 °C (např. na horké desce).
- Inkubujte sklíčka 2x 5 min v xylenu.
- Inkubujte preparáty 3x 3 min ve 100% ethanolu.
- Inkubujte sklíčka 5 min v 3% H₂O₂.
- Promývejte sklíčka 2x 1 min v deionizované nebo destilované vodě.
- Inkubujte 15 min v předehřátém Heat Pretreatment Solution EDTA (PT2) při 98°C.

Použijte osm sklíček na jednu barvicí nádobku (v případě potřeby přidejte fiktivní sklíčka).

- l)hned přeneste sklíčka do deionizované nebo destilované vody a promývejte 2x 2 min.

- Na preparát naneste (po kapkách) Pepsin Solution (ES1) a inkubujte 5-15 min při 37 °C ve vlhké komoře.

ES1 může tvořit precipitáty, které nemají vliv na kvalitu. Obecně doporučujeme zjistit optimální dobu proteolýzy v předběžných testech.

- Ponořte sklíčka do deionizované nebo destilované vody.
- Dehydratace v: 70%, 90% a 100% ethanolu, vždy po dobu 1 min.
- Vysušení řezů na vzduchu.

Poznámka: Před aplikací sondy se ujistěte, že jsou řezy zcela suché.

Denaturace a hybridizace

- Na každý předem ošetřený vzorek napipetujte 10 μl sondy.
- Vzorky zakryjte krycím sklíčkem o rozměrech 22 x 22 mm (zamezte zachycení bublin) a krycí sklíčko utěsněte.

uěsnění doporučujeme použít gumový cement (např. Fixogum).

- Umístěte sklíčka na horkou desku nebo hybridizátor a denaturujte vzorky po dobu 5 minut při 79 °C.
- Přeneste sklíčka do vlhké komory a hybridizujte přes noc při 37 °C (např. v hybridizační peci).

Je důležité, aby vzorky během hybridizace nevyschly.

11.2 Den 2

Přípravné kroky

- Wash Buffer SSC (WB1): Pro promývání se strunou zahřejte na 80 °C v zakryté barvicí nádobě. **WB1** může při teplotě 2-8 °C tvořit sraženiny, které nemají vliv na kvalitu a měly by se při zahřátí rozpuštit.
- Připrava 1x Wash Buffer TBS: Zředte 1 díl 20x Wash Buffer TBS (WB5) v 19 dílech deionizované nebo destilované vody.

Zředěný 1x Wash Buffer TBS je stabilní po dobu jednoho týdne při skladování při teplotě 2-8 °C.

- 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): Před použitím se uveďte do pokojové teploty.

Složky SB7a a SB7b mohou tvořit sraženiny, které nemají vliv na kvalitu barvení.

Následná hybridizace a detekce

- Opatrně odstraňte gumový cement nebo lepidlo.
- Odstraňte krycí sklíčko ponořením sklíček do Wash Buffer SSC (WB1) při pokojové teplotě po dobu 5 min.

WB1 lze použít opakovaně. Uchovávejte při teplotě 2-8 °C po dobu maximálně jednoho týdne.

- Promývejte sklíčka po dobu 5 min v Wash Buffer SSC (WB1) při teplotě 80 °C.

Použijte osm sklíček na jednu barvicí nádobku (v případě potřeby přidejte fiktivní sklíčka).

- Promývejte sklíčka 2x 1 min v deionizované nebo destilované vodě.
- Ponořte sklíčka do 1x Wash Buffer TBS.
- Na sklíčka naneste směs Anti-DIG/DNP-Mix (AB14) (1-2 kapky na sklíčko) a inkubujte 15 minut při 37 °C ve vlhké komoře.
- Promývejte sklíčka 3x 1 min v 1x Wash Buffer TBS
- Aplikujte směs HRP/AP-Polymer-Mix (AB13) (1-2 kapky na sklíčko) na sklíčka a inkubujte 15 min při 37 °C ve vlhké komoře.
- Promývejte sklíčka 3x 1 min v 1x Wash Buffer TBS.
- Připravte AP-Red Solution (pracovní roztok): naplňte 1 ml AP-Red Solution B (**SB6b**) do odměrného kalíšku a přidejte jednu kapku (30 μl) AP-Red Solution A (**SB6a**). Dobře promíchejte.
- Naneste AP-Red Solution (1-2 kapky na sklíčko) na sklíčka a inkubujte ve tmě po dobu 10 min při RT.
- Během inkubace připravte "HRP-zelený roztok" (pracovní roztok): do odměrného pohárku naplňte 1 ml HRP-Green Solution B (SB7b) a přidejte dvě kapky (2x 20 μl) HRP-Green Solution A (SB7a). Dobře promíchejte.
- Promývejte sklíčka 2 minuty v deionizované nebo destilované vodě.
- Aplikujte HRP-Green Solution po kapkách (1-2 kapky na sklíčko) na sklíčka a inkubujte ve tmě po dobu 10 min při pokojové teplotě.
- Sklíčka promývejte 2 minuty v deionizované nebo destilované vodě.
- Vzorky barvěte po dobu 2 min Nuclear Blue Solution (CS2).
- Přeneste preparáty do barvicí nádobky a 2 min. promývejte pod tekoucí studenou vodou z kohoutku.
- Dehydratujte 3x 30 s ve 100% ethanolu (použijte velmi čistý ethanol).

(19) Inkubujte sklíčka 2x 30 s v xylenu (použijte velmi čistý xylen).

Neproduzujte ani nezkracujte inkubační dobu, protože by mohlo dojít ke ztrátě signálů.

(20) Vyhněte se zachyceným bublinkám a zakryjte vzorky krycím sklíčkem (22 mm x 22 mm; 24 mm x 32 mm) pomocí Mounting Solution (alcoholic) (MT4). Nechte 20-30 min, aby se krycí sklíčko znehybnilo.

Použití pipetovací špičky, která byla seříznuta, aby se zvětšil otvor, může usnadnit pipetování.

(21) Vyhodnoťte obarvené vzorky pomocí světelné mikroskopie.

12. Interpretace výsledků

Při použití soupravy ZytoDot 2C CISH Implementation Kit se hybridizační signály polynukleotidů značených digoxigeninem zobrazí jako tmavě zelené zřetelné tečky a polynukleotidy značené dinitrofenylem se zobrazí jako jasně červené zřetelné tečky. V interfázích nebo metafázích normálních buněk nebo buněk bez aberací zkoumaných chromozomů se objeví dva signály na jednu sondu/značku haptenu, s výjimkou sond zaměřených na chromozomy X a/nebo Y, u nichž se v závislosti na pohlaví neobjeví žádný až dva signály na jednu sondu/značku haptenu. V buňkách s chromozomálními aberacemi může být v interfázích nebo metafázích patrný jiný vzor signálu. Další podrobnosti o interpretaci výsledků naleznete v návodu k použití příslušné sondy ZytoDot 2C CISH Probe.

13. Doporučené postupy kontroly kvality

Viz návod k použití příslušné sondy ZytoVision.

14. Výkonnostní charakteristiky

Viz návod k použití příslušné sondy ZytoVision.

15. Likvidace

Likvidace činidel musí být prováděna v souladu s místními předpisy.

16. Řešení problémů

Jákákolí odchylka od návodu k obsluze může vést k horším výsledkům barvení nebo k tomu, že barvení nebude vůbec provedeno. Další informace naleznete na www.zytovision.com.

Slabý nebo žádný signál

Možná příčina	Akce
Nesprávně provedená proteolytická předúprava	Optimalizujte dobu inkubace pepsinu, v případě potřeby ji prodlužte nebo zkratěte.
Odpařování sondy	Při použití hybridizátoru je použití mokřých pruhů/nádrží naplněných vodou povinné. Při použití hybridizační pece je nutné použít vlhkou komoru. Kromě toho by měl být krycí list zcela uzavřen, např. pomocí Fixogumu, aby se zabránilo vysychání vzorku během hybridizace.
Příliš dlouhá doba proti barvení	Vyhnete se tmavému protibarvení, protože může zakrýt pozitivní signály barvení.
Nesprávně provedené modření protibarviva	K modření používejte studenou tekoucí vodu z vodovodu; nepoužívejte teplou nebo horkou vodu ani modřicí činidla.

Příliš silné signály

Možná příčina	Akce
Příliš dlouhá proteolytická předúprava	Optimalizujte dobu inkubace pepsinu, v případě potřeby ji prodlužte nebo zkratěte.
Inkubační doba AP-Red Solution není správná	V případě potřeby lze inkubační dobu zkrátit na 5 min. Roztok substrátu nezahřívajte nad 25 °C; inkubujte pouze při pokojové teplotě.
Inkubační doba HRP-Green solution není správná	V případě potřeby lze inkubační dobu zkrátit na 7 min. Roztok substrátu nezahřívajte nad 25 °C; inkubujte pouze při pokojové teplotě.

Příliš slabé červené signály

Možná příčina	Akce
AP-Red Solution byl vystaven silnému přímému světlu	Připravte a použijte AP-Red Solution chráněný před silným přímým světlem
AP-Red Solution byl připraven příliš brzy	Připravte před okamžitým použitím
Doba inkubace AP-Red Solution není správná	V případě potřeby lze inkubační dobu prodloužit až na 15 min.
Nedostatečná příprava chromogenního substrátu	Nezvyšujte objem roztoku A

Příliš slabé zelené signály

Možná příčina	Akce
Příliš dlouhá doba inkubace případných promývacích kroků po barvení pomocí HRP-Green	Nepřekračujte uvedené inkubační doby
Doba inkubace HRP-Green solution není správná	V případě potřeby lze inkubační dobu prodloužit až na 15 min.
Nedostatečná příprava chromogenního substrátu	Nezvyšujte objem roztoku A

Signály slábnou nebo se slučují

Možná příčina	Akce
Bylo použito nevhodné montážní řešení	Používejte pouze montážní roztok dodaný se sadou nebo montážní roztoky na bázi xylenu bez jakýchkoli nečistot; nepoužívejte krycí pásku.
Řezy nebyly řádně dehydratovány	Používejte čerstvé roztoky ethanolu a xylenu; používejte pouze xylen "čistě" kvality

Nerovnoměrné nebo v některých částech jen velmi lehké skvrny

Možná příčina	Akce
Nedokonalé odparafinování	Používejte čerstvé roztoky; zkontrolujte dobu trvání odparafinování.
Příliš malý objem činidla	Ujistěte se, že objem činidla je dostatečně velký, aby pokryl oblast tkáně.

Nekonzistentní výsledky

Možná příčina	Akce
Nedostatečné vysušení před aplikací sondy	Prodloužení sušení na vzduchu
Příliš velké množství vody/proplachovacího pufru na tkáň před aplikací pepsinu, protilátěk a/nebo barevných substrátů.	Ujistěte se, že je přebytečná tekutina z tkáňového řezu odstraněna rozetřením nebo setřesením ze sklíčka. Malá množství zbytkové vody/mycího pufru neinterferují s testem.
Rozdíly v metodách fixace a vkládání tkání	Optimalizace metod fixace a vkládání
Změny v tloušťce tkáňového řezu	Optimalizace řezu

Zhoršená morfologie

Možná příčina	Akce
Vzorek buněk nebo tkáň nebyl řádně fixován	Optimalizace doby fixace a fixačního prostředku
Předběžná proteolytická úprava se neprovádí příliš dlouho	Zkrácení doby inkubace pepsinu

Křížové hybridizační signály; rušivé pozadí

Možná příčina	Akce
Sekce vyschly kdykoli během hybridizace nebo po ní.	Zabraňte vysychání řezů; použijte komoru s vlhkostí; řádně utěsněte krycí sklíčko.
Prodloužená doba inkubace substrátu	Zkrácení doby inkubace substrátu
Nedokonalé odparafinování	Používejte čerstvé roztoky; zkontrolujte délku odparafinování
Příliš silná proteolytická předúprava	Optimalizace doby inkubace pepsinu
Sklíčka se před hybridizací ochladí na pokojovou teplotu.	Rychle přeneste sklíčka na hybridizační teplotu

Překrývající se signály

Možná příčina	Akce
Nevhodná tloušťka tkáňových řezů	Připravte si řezy mikrotomem o velikosti 3-5 μm

Vzorek vyplave ze sklíčka

Možná příčina	Akce
Příliš silná proteolytická předúprava	Zkrácení inkubační doby pepsinu

17. Literatura

- 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. Revize
www.zytovision.com

Nejnovější návod k použití a návod k použití v různých jazycích naleznete na adrese www.zytovision.com.

Naši odborníci jsou připraveni zodpovědět vaše dotazy. Kontaktujte prosím helptech@zytovision.com



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

Ochranné známky:

ZytoVision® a ZytoDot® jsou ochranné známky společnosti ZytoVision GmbH.