



ZytoDot 2C SPEC ALK Break Apart Probe

| | | |
|-----------------------|----------|-------------|
| REF C-3055-100 | Σ | 10 (0,1 ml) |
| REF C-3055-400 | Σ | 40 (0,4 ml) |

Für den qualitativen Nachweis von Translokationen des humanen ALK-Gens bei 2p23.2 mittels chromogener *in-situ*-Hybridisierung (CISH)



IVD

In-vitro-Diagnostikum
gemäß EU Richtlinie 98/79/EC

1. Verwendungszweck

Die ZytoDot 2C SPEC ALK Break Apart Probe (PD35) ist für den qualitativen Nachweis von Translokationen des humanen ALK-Gens bei 2p23.2 in Formalin-fixierten, Paraffin-eingebetteten Geweben mittels chromogener *in-situ*-Hybridisierung (CISH) bestimmt. Die Sonde ist für die Verwendung in Kombination mit dem ZytoDot 2C CISH Implementation Kit (Prod. Nr. C-3044-10/-40) vorgesehen.

Die Interpretation der Ergebnisse muss im Kontext mit der klinischen Anamnese unter Berücksichtigung weiterer klinischer und pathologischer Daten des Patienten durch einen qualifizierten Pathologen erfolgen.

2. Klinische Relevanz

Das ALK (anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase, aka CD246) Gen codiert eine transmembrane Rezeptor-Tyrosinkinase. Dieses Gen entfaltet seine charakteristische onkogene Wirkung durch Fusion mit mehreren Genpartnern oder Mutationen sowohl bei hämatopoetischen als auch bei nicht-hämatopoetischen soliden Tumoren. Translokationen, die den ALK-Genlocus betreffen, treten häufig beim anaplastisch-großzelligem Lymphom (ALCL) auf, einem aggressiven T-Zell-Lymphom, welches zu den Non-Hodgkin-Lymphomen zählt. Die häufigste Translokation t(2;5) führt zu einer Fusion mit dem NPM1-Gen (Nucleophosmin, aka nucleolar phospho-protein B23, Numatrin) auf dem Chromosom 5q35. Diese Inversion führt zur Bildung eines NPM1-ALK Fusionsproteins, das durch Autophosphorylierung konstitutiv aktiviert wird und wiederum die maligne Zelltransformation durch Aktivierung nachgeschalteter Effektoren wie z.B. STAT3 vermittelt. Darüber hinaus wurden beim nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom (NSCLC) häufig Inversionen des ALK-Gens am kurzen Arm des Chromosoms 2 [inv(2)(p21p23)] detektiert, die zur Bildung von EML4-ALK-Fusionstranskripten führen. ALK-Kinase-spezifische Therapien können bei NSCLC-Patienten mit EML4-ALK-Inversionen eine sehr effektive therapeutische Strategie darstellen.

3. Prinzip der Methode

Die chromogene *in-situ*-Hybridisierung (CISH) erlaubt den Nachweis und die Visualisierung von spezifischen Nukleinsäuresequenzen in Zellpräparationen. Haptenmarkierte Nukleotid-Fragmente, sogenannte CISH-Sonden, und deren komplementäre Zielsequenzen in den Präparationen werden co-denaturiert und können anschließend während der Hybridisierung binden. Danach werden unspezifische und ungebundene Sondenfragmente durch Stringenzwaschschritte entfernt. Die Duplex-Bildung der markierten Sonde wird mittels primärer (nicht markierter) Antikörper sichtbar gemacht, welche von sekundären polymerisierten Enzym-konjugierten Antikörpern detektiert werden. Die enzymatische Reaktion mit den chromogenen Substraten führt zur Bildung von Farbpräzipitaten. Nach der Gegenfärbung des Zellkerns mit einer Zellkern-Färbung können die hybridisierten Sondenfragmente mit einem Lichtmikroskop visualisiert werden.

4. Enthaltene Komponenten

Die ZytoDot 2C SPEC ALK Break Apart Probe besteht aus:

- Digoxigenin-markierten Polynukleotiden ($\sim 0,5 \text{ ng}/\mu\text{l}$), die gegen Sequenzen in 2p23.2* (chr2:29,460,144-29,681,581) gerichtet sind, welche proximal zur ALK-Bruchpunktregion lokalisiert sind (siehe Abb. 1).
- Dinitrophenyl-markierten Polynukleotiden ($\sim 0,75 \text{ ng}/\mu\text{l}$), die gegen Sequenzen in 2p23.2* (chr2:29,174,204-29,383,335) gerichtet sind, welche distal zur ALK-Bruchpunktregion lokalisiert sind (siehe Abb. 1).
- Hybridisierungsbuffer auf Basis von Formamid

*nach Human Genome Assembly GRCh37/hg19

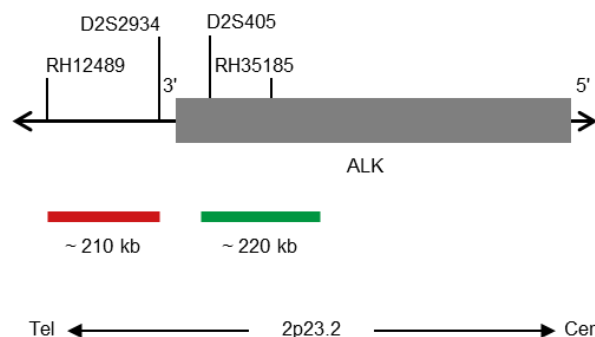


Abb. 1: SPEC ALK Sondenlokalisierung (nicht maßstabsgetreu)

Die ZytoDot 2C SPEC ALK Break Apart Probe ist verfügbar in zwei Größen:

- C-3055-100: 0,1 ml (10 Reaktionen von je 10 μl)
- C-3055-400: 0,4 ml (40 Reaktionen von je 10 μl)

5. Benötigte, aber nicht bereitgestellte Materialien

- ZytoDot 2C CISH Implementation Kit (Prod. Nr. C-3044-10/-40)
- Positive und negative Kontrollproben
- Objektträger, positiv geladen
- Wasserbad (80°C, 98°C)
- Hybridizer oder Wärmeplatte
- Hybridizer oder Feuchtekammer im Hybridisierungssofen
- Verstellbare Pipetten (10 μl , 1000 μl)
- Küvetten oder Färbetröge
- Stoppuhr
- Kalibriertes Thermometer
- Ethanol oder denaturierter Alkohol
- Xylol
- Methanol 100%
- Wasserstoffperoxid (H₂O₂) 30%
- Deionisiertes oder destilliertes Wasser
- Deckgläser (22 mm x 22 mm, 24 mm x 32 mm)
- Naturkautschuk-Klebstoff, z.B. Fixogum Rubber Cement (Prod. Nr. E-4005-50/-125) oder Ähnliches
- Regelmäßig gewartetes Lichtmikroskop (400-630x)

6. Lagerung und Handhabung

Bei 2-8°C in aufrechter Position lagern. Unmittelbar nach Gebrauch wieder unter Lagerbedingungen aufbewahren. Keine Reagenzien nach Ablauf des auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatums verwenden. Das Produkt ist bei sachgemäßer Handhabung bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum stabil.

7. Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

- Gebrauchsanweisung vor der Verwendung lesen!
- Reagenzien nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwenden!
- Dieses Produkt enthält Substanzen (in geringen Konzentrationen und Volumina), welche gesundheitsschädlich und potentiell infektiös sind. Jeder direkte Kontakt mit den Reagenzien muss vermieden werden. Entsprechende Schutzmaßnahmen (Verwendung von Einmalhandschuhen, Schutzbrille und Laborbekleidung) sind zu ergreifen!
- Schwerwiegende Vorfälle, die im Zusammenhang mit dem Produkt aufgetreten sind, in Übereinstimmung mit den örtlichen Vorschriften dem Hersteller sowie den zuständigen Behörden melden!
- Sollten Reagenzien mit der Haut in Kontakt kommen, die betroffenen Stellen sofort mit viel Wasser abspülen!
- Ein Sicherheitsdatenblatt ist auf der Website verfügbar (www.zytovision.com).
- Die Reagenzien nicht wiederverwenden, außer die Wiederverwendung ist explizit erlaubt!
- Kreuzkontaminationen und mikrobielle Kontamination der Reagenzien vermeiden!
- Die Präparate dürfen während der Hybridisierungs- und Waschstschritte nicht austrocknen!

Gefahren- und Sicherheitshinweise:

Die gefahrbestimmende Komponente ist Formamid.



Gefahr

| | |
|-----------|---|
| H351 | Kann vermutlich Krebs erzeugen. |
| H360FD | Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen. Kann das Kind im Mutterleib schädigen. |
| H373 | Kann die Organe schädigen bei längerer oder wiederholter Exposition. |
| P201 | Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen. |
| P202 | Vor Gebrauch alle Sicherheitshinweise lesen und verstehen. |
| P260 | Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol nicht einatmen. |
| P280 | Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen. |
| P308+P313 | BEI Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen. |
| P405 | Unter Verschluss aufbewahren. |

8. Einschränkungen

- Für die Verwendung als In-vitro-Diagnostikum.
- Nur für die professionelle Anwendung.
- Nur für den nicht-automatisierten Gebrauch
- Die klinische Interpretation jeglicher positiven Färbung bzw. deren Abwesenheit muss im Kontext mit der klinischen Anamnese, Morphologie, anderer histopathologischer Kriterien sowie weiterer diagnostischer Tests erfolgen. Es obliegt der Verantwortung eines qualifizierten Pathologen, mit CISH Sonden, Reagenzien, Diagnose-Panels und den zur Erstellung von gefärbten Präparaten verwendeten Methoden vertraut zu sein. Die Färbung ist in einem zertifizierten, lizenzierten Labor unter Aufsicht eines Pathologen durchzuführen, der für die Auswertung der Färbepreparate und für die Sicherstellung der Eignung von positiven und negativen Kontrollen verantwortlich ist.

- Die Färbung der Präparate, insbesondere die Signalintensität und die Hintergrundfärbung, ist abhängig von der Behandlung und Prozessierung der Präparate vor der Färbung. Unsachgemäßes Fixieren, Einfrieren, Auftauen, Waschen, Trocknen, Erhitzen, Schneiden oder Kontamination mit anderen Präparaten oder Flüssigkeiten können Artefakte oder falsche Ergebnisse verursachen. Inkonsistente Ergebnisse können von Variationen bei Fixierungs- und Einbettungsverfahren sowie von inhärenten Unregelmäßigkeiten innerhalb des Präparates resultieren.
- Die Sonde ist nur für den Nachweis der Loci, die in Kapitel 4. „Enthaltene Komponenten“ beschrieben werden, zu verwenden.
- Die Leistung wurde unter Verwendung der in dieser Gebrauchsanweisung beschriebenen Verfahren validiert. Abweichungen von diesen Verfahren können die Leistung beeinflussen und müssen vom Anwender validiert werden.

9. Störsubstanzen

Folgende Fixierungen sind nicht kompatibel mit ISH:

- Bouin Fixierung
- B5 Fixierung
- Saure Fixiermittel (z.B. Pikrinsäure)
- Zenker Fixierung
- Alkohole (bei alleiniger Verwendung)
- Quecksilberchlorid
- Formaldehyd/Zink Fixiermittel
- Hollande Fixierung
- Ungepuffertes Formalin

10. Vorbereitung der Präparate

Empfehlungen:

- Kreuzkontaminationen der Präparate vermeiden, da diese zu fehlerhaften Ergebnissen führen können.
- Fixierung in 10% neutral gepuffertem Formalin für 24h bei Raumtemperatur (18-25°C).
- Probengröße $\leq 0,5 \text{ cm}^3$.
- Qualitativ hochwertiges Paraffin verwenden.
- Das Einbetten sollte bei Temperaturen unter 65°C erfolgen.
- 3-5 μm dicke Mikrotomschnitte anfertigen.
- Positiv geladene Objektträger verwenden.
- Für 2-16h bei 50-60°C fixieren.

11. Vorbereitung der Reagenzien

Das Produkt ist gebrauchsfertig. Kein Rekonstituieren, Mischen oder Verdünnen ist notwendig. Die Sonde vor der Anwendung auf Raumtemperatur (18-25°C) bringen und kurz mischen.

12. Durchführung

Vorbereitung der Präparate

Die Präparatvorbereitung (wie Entparaffinierung, Proteolyse) ist wie in der Gebrauchsanweisung des [ZytoDot 2C CISH Implementation Kits](#) beschrieben durchzuführen.

Denaturierung und Hybridisierung

1. 10 μl der Sonde auf jedes der vorbehandelten Präparate pipettieren.
2. Die Präparate mit 22 mm x 22 mm Deckgläsern abdecken (Einschluss von Luftbläschen vermeiden) und das Deckglas versiegeln.
Wir empfehlen die Verwendung von Naturkautschuk-Klebstoff (z.B. Fixogum) zum Versiegeln.
3. Die Objektträger auf einer Wärmeplatte oder in einem Hybridizer platzieren und die Proben für 5 min bei 79°C denaturieren.
4. Die Objektträger in eine Feuchteammer überführen und über Nacht bei 37°C hybridisieren (z.B. in einem Hybridisierungssofen).

Es ist essentiell, dass die Präparate während des Hybridisierungsschritts nicht austrocknen.

Post-Hybridisierung

Die Post-Hybridisierung (Waschen, Detektion, Gegenfärbung, Eindecken, Mikroskopie) gemäß der Gebrauchsanweisung des [ZytoDot 2C CISH Implementation Kits](#) durchführen.

13. Interpretation der Ergebnisse

Bei Verwendung des ZytoDot 2C CISH Implementation Kits erscheinen die Hybridisierungssignale der Digoxigenin-markierten Polynukleotide als dunkelgrün gefärbte eindeutige Punkte (proximal zur ALK-Bruchpunktregion) und Dinitrophenyl-markierte Polynukleotide erscheinen als hellrot gefärbte eindeutige Punkte (distal zur ALK-Bruchpunktregion).

Normale Situation: In Interphasen von normalen Zellen oder Zellen ohne eine Translokation der ALK-Genregion erscheinen zwei grün/rote Fusionssignale (siehe Abb. 2).

Aberrante Situation: Eine von einer Translokation betroffene ALK-Genregion wird durch ein separates grünes eindeutig punktförmiges Signal und ein separates rotes eindeutig punktförmiges Signal gekennzeichnet. Eine EML4-ALK-Inversion mit Deletion von 5'-ALK-Sequenzen ist gekennzeichnet durch ein oder mehrere einzelne rote Signale (siehe Abb. 2).

Sich überlagernde Signale können als braune Signale erscheinen.

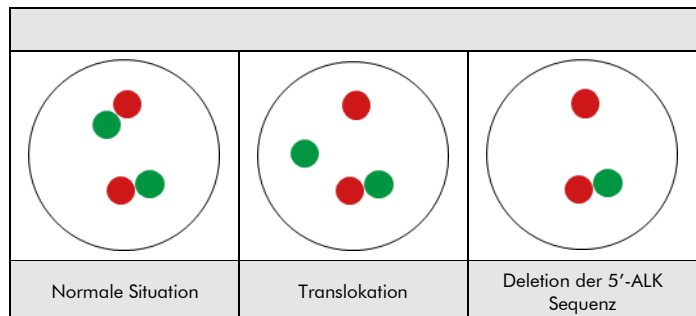


Abb. 2: Zu erwartende Ergebnisse in normalen und aberranten Zellkernen

Genomische Aberrationen aufgrund kleinerer Deletionen, Duplikationen oder Inversionen können zu unauffälligen Signalmustern führen. Abweichende Signalmuster als die beschriebenen können bei einigen aberranten Präparaten beobachtet werden. Diese unerwarteten Signalmuster sollten näher untersucht werden.

Bitte beachten:

- Aufgrund von dekondensiertem Chromatin können einzelne CISH-Signale als kleine Signal-Cluster erscheinen. Daher sollten zwei oder drei Signale der gleichen Größe mit einer Distanz von ≤ 1 Signaldurchmesser als ein Signal gewertet werden.
- Vor Auszählung der Signale sollte das Präparat auf jegliche mögliche intratumorale Heterogenität bei einer 100-200fachen Vergrößerung untersucht werden.
- Die Signale sollten mindestens mit einer 400fachen Vergrößerung visualisiert werden, sodass die Signale gut zu erkennen sind. Eine 630fache Vergrößerung wird für Sonden empfohlen, welche chromosomale Bruchpunkte detektieren. Keine kontrastverstärkenden Filterlinsen verwenden, da diese die Signalfarbe verzerren könnten. Aperturblende öffnen, um leuchtende Signalfarben zu erhalten. Bei der Auswertung des Zellkerns auf und ab fokussieren, da rote und grüne Signale aufeinanderliegen könnten.
- Keine nekrotischen Bereiche, sich überlagernde Zellkerne, überverdaute Zellkerne oder Zellkerne mit schwacher Signalintensität auswerten.
- Zusätzliche Signale können aufgrund von Mitose auch in einem kleinen Prozentsatz von nicht-neoplastischen Zellen auftreten. Aufgrund von Schnitt-Artefakten können bei Paraffin-eingebetteten Geweben gelegentlich Zellkerne mit fehlenden Signalen beobachtet werden.
- Ein negatives oder unspezifisches Ergebnis kann durch verschiedene Faktoren verursacht werden (siehe Kapitel 17. „Fehlerbehebung“).
- Um die Ergebnisse korrekt zu interpretieren, muss der Anwender das Produkt vor der Anwendung in diagnostischen Verfahren unter Berücksichtigung nationaler und/oder internationaler Richtlinien validieren.

14. Empfohlene Qualitätskontrollverfahren

Um die korrekte Leistung der verwendeten Präparate und Testreagenzien zu überwachen, sollte jeder Test von internen und externen Kontrollen begleitet werden. Falls interne und/oder externe Kontrollen keine adäquate Färbung zeigen, müssen die Ergebnisse der Patientenproben als ungültig angesehen werden.

Interne Kontrolle: Nicht-neoplastische Zellen innerhalb des Präparates, die ein normales Signalmuster aufweisen, z.B. Fibroblasten.

Externe Kontrolle: Validierte positive und negative Kontrollproben.

15. Leistungsmerkmale

Die Leistung der Sonde wurde durch den Vergleich mit der entsprechenden IVD-zugelassenen FISH-Sonde bestimmt. Die Konkordanz betrug 100%.

Genauigkeit: Es wurde eine Genauigkeit von 100% berechnet.

Analytische Sensitivität: Es wurde eine analytische Sensitivität von 100% berechnet.

Analytische Spezifität: Es wurde eine analytische Spezifität von 100% berechnet.

16. Entsorgung

Die Entsorgung der Reagenzien muss in Übereinstimmung mit den örtlichen Vorschriften erfolgen.

17. Fehlerbehebung

Jede Abweichung von der Gebrauchsanweisung kann zu schwachen bis gar keinen Färbungen führen.

Schwache oder keine Signale

| Mögliche Ursache | Lösung |
|---|---|
| Zell- oder Gewebeprobe sind nicht korrekt fixiert | Die Fixierzeit und das Fixiermittel optimieren |
| Temperatur der Hitze-Vorbehandlung, Proteolyse, Hybridisierung, Denaturierung, Stringenzwäscherung oder der Antikörper-Inkubation nicht korrekt | Die Temperatur aller technischen Geräte mit einem kalibrierten Thermometer überprüfen. Bei Lösungen mit einer kritischen Temperatur immer die gleiche Anzahl an Objektträgern verwenden |
| Proteolytische Vorbehandlung nicht optimal | Abhängig von verschiedenen Faktoren, wie z.B. Art und Dauer der Fixierung, Dicke der Schnitte und Art des Gewebes/der Zellen, können unterschiedliche Inkubationszeiten notwendig sein. Die optimale Dauer der Pepsin-Inkubation in Vortests bestimmen |
| Hybridisierungszeit zu kurz | Für mindestens 12h hybridisieren, falls notwendig, Hybridisierungszeit verlängern |
| Alte Dehydrierungslösungen | Frische Dehydrierungslösungen ansetzen |
| Verdunstung der Sonde | Bei der Nutzung eines Hybridizers ist die Verwendung von feuchten Vliesstreifen/Wassertanks erforderlich. Bei der Nutzung eines Hybridisierungsofens muss eine Feuchtekammer verwendet werden. Zusätzlich sollte das Deckglas, z.B. mit Fixogum, vollständig versiegelt werden, um ein Austrocknen der Präparate während der Hybridisierung zu verhindern |
| Inkubation mit chromogenem Substrat zu kurz | Inkubationszeit verlängern |

| | |
|--|---|
| Dauer der Gegenfärbung zu lang | Die Dauer der Gegenfärbung ist abhängig von der Art des Präparats und sollte dementsprechend optimiert werden. Dunkle Gegenfärbungen vermeiden, da diese positive Signale verdecken könnten |
| Bläuen der Gegenfärbung nicht ausreichend durchgeführt | Für das Bläuen kaltes Leitungswasser verwenden; kein warmes bzw. heißes Wasser oder Bläuungsreagenzien verwenden |

Signale sind zu stark

| Mögliche Ursache | Lösung |
|--|--|
| Dauer der proteolytischen Vorbehandlung zu lang | Abhängig von verschiedenen Faktoren, wie z.B. Art und Dauer der Fixierung, Dicke der Schnitte und Art des Gewebes/der Zellen, können unterschiedliche Inkubationszeiten notwendig sein. Die optimale Dauer der Pepsin-Inkubation in Vortests bestimmen |
| Inkubationszeit mit AP-Red Solution nicht korrekt | Falls erforderlich kann die Inkubationszeit bis auf 5 min verkürzt werden; die Substratlösung nicht über 25°C erhitzen; nur bei Raumtemperatur inkubieren |
| Inkubationszeit mit HRP-Green Solution nicht korrekt | Falls erforderlich, kann die Inkubationszeit bis auf 7 min verkürzt werden; die Substratlösung nicht über 25°C erhitzen; nur bei Raumtemperatur inkubieren |

Rote Signale zu schwach

| Mögliche Ursache | Lösung |
|---|--|
| AP-Red Solution wurde starkem direktem Licht ausgesetzt | AP-Red Solution vor starkem direktem Licht geschützt vorbereiten und verwenden |
| AP-Red Solution wurde zu früh vorbereitet | Vor der sofortigen Verwendung vorbereiten |
| Inkubationszeit mit AP-Red Solution nicht korrekt | Falls erforderlich kann die Inkubationszeit bis zu 15 min verlängert werden |
| Unzureichende Vorbereitung des chromogenen Substrates | Das Volumen von Solution A nicht erhöhen |

Grüne Signale zu schwach

| Mögliche Ursache | Lösung |
|--|---|
| Inkubationszeit der Waschschritte nach der Färbung mit HRP-Green zu lang | Die angegebenen Inkubationszeiten nicht überschreiten |
| Inkubationszeit mit HRP-Green Solution nicht korrekt | Falls erforderlich kann die Inkubationszeit bis zu 15 min verlängert werden |
| Unzureichende Vorbereitung des chromogenen Substrates | Das Volumen von Solution A nicht erhöhen |

Signale verblassen oder verschmelzen

| Mögliche Ursache | Lösung |
|--|---|
| Verwendung eines ungeeigneten Eindeckmediums | Nur das Eindeckmedium, welches mit dem Kit zur Verfügung gestellt wird, oder XyloI-basierte Eindeckmedien frei von Unreinheiten verwenden; keine Eindeckfolie verwenden |
| Schnitte wurden nicht ausreichend dehydriert | FrISChe Ethanol- und XyloI-Lösungen verwenden, nur XyloI mit „reiner“ Qualität verwenden |

Ungleichmäßige oder teils nur sehr leichte Färbung

| Mögliche Ursache | Lösung |
|--|---|
| Unvollständiges Entparaffinieren | FrISChe Lösungen verwenden, Dauer des Entparaffinierens überprüfen |
| Volumen der Reagenzien zu gering | Sicherstellen, dass das Volumen der Reagenzien groß genug ist, um den Bereich des Gewebes zu bedecken |
| Luftbläschen vor der Hybridisierung oder während des Eindeckens eingeschlossen | Luftbläschen vermeiden |

Inkonsistente Ergebnisse

| Mögliche Ursache | Lösung |
|---|---|
| Unzureichende Trocknung vor Applikation der Sonde | Lufttrocknung verlängern |
| Zu viel Wasser/Waschpuffer auf dem Gewebe vor Applikation von Pepsin, Antikörpern und/oder Farbsubstraten | Überschüssige Flüssigkeit durch Abklopfen oder Abschütteln des Objektträgers von dem Gewebeschnitt entfernen. Kleinere Mengen an restlichem Wasser/Waschpuffer beeinträchtigen nicht den Test |
| Variierende Methoden der Gewebefixierung oder Einbettung | Methoden der Fixierung und Einbettung optimieren |
| Variierende Gewebedicke | Schneiden optimieren |

Degradierte Morphologie

| Mögliche Ursache | Lösung |
|---|---|
| Zell- oder Gewebeprobe sind nicht optimal fixiert | Die Fixierzeit und das Fixiermittel optimieren |
| Proteolytische Vorbehandlung nicht optimal ausgeführt | Die Inkubationszeit mit Pepsin optimieren, falls notwendig reduzieren |

Kreuzhybridisierungssignale, Hintergrundsignale

| Mögliche Ursache | Lösung |
|---|---|
| Temperatur der Stringenzwaschung nicht korrekt | Die Temperatur aller technischen Geräte mit einem kalibrierten Thermometer überprüfen. Immer die gleiche Anzahl an Objektträgern verwenden. Bei Hitze-Inkubationsschritten nicht mehr als acht Objektträger pro Küvette verwenden |
| Objektträger nicht ausreichend gespült | Wenn angegeben, ausreichend und frischen Waschpuffer bzw. deionisiertes oder destilliertes Wasser verwenden |
| Schnitte sind irgendwann während oder nach der Hybridisierung ausgetrocknet | Das Austrocknen der Schnitte vermeiden; Feuchtekkammern verwenden; Deckglas sorgfältig abdichten |
| Verlängerte Inkubationszeit des Substrates | Inkubationszeit des Substrates verkürzen |
| Unvollständiges Entparaffinieren | FrISChe Lösungen verwenden, Dauer des Entparaffinierens überprüfen |
| Proteolytische Vorbehandlung zu stark | Inkubationszeit von Pepsin optimieren |
| Objektträger sind vor der Hybridisierung auf Raumtemperatur abgekühlt | Die Objektträger zügig auf Hybridisierungstemperatur überführen |

Überlagernde Zellkerne

| Mögliche Ursache | Lösung |
|--------------------------------------|--|
| Ungeeignete Dicke der Gewebeschnitte | 3-5 µm dicke Mikrotomschnitte anfertigen |

Präparat löst sich vom Objektträger

| Mögliche Ursache | Lösung |
|---|--|
| Ungeeignete Beschichtung der Objektträger | Geeignete Objektträger (positiv geladen) verwenden |
| Proteolytische Vorbehandlung ist zu stark | Inkubationszeit mit Pepsin reduzieren |

18. Literatur

- Inamura K, et al. (2009) *Mod Pathol* 22: 508-15.
- Koivunen JP, et al. (2008) *Clin Cancer Res* 14: 4275-83.
- Martelli MP, et al. (2009) *Am J Pathol* 174: 661-70.
- Palmer RH, et al. (2009) *Biochem J* 420: 345-61.
- Perner S, et al. (2008) *Neoplasia* 10: 298-302.
- Rodig SJ, et al. (2009) *Clin Cancer Res* 15: 5216-23.
- Sasaki T, et al. (2010) *Eur J Cancer* 46: 1773-80.
- Schildhaus HU, et al. (2013) *Mod Pathol* 26: 1468-77.
- von Laffert M, et al. (2014) *J Thorac Oncol* 9: 1464-9.
- Wagner F, et al. (2014) *J Clin Pathol* 67: 403-7.
- Zhang Q, et al. (2007) *Nat Med* 11:1341-8.
- Wilkinson DG: In Situ Hybridization, A Practical Approach, *Oxford University Press* (1992) ISBN 0 19 963327 4.

19.Revision

Die aktuellste Version der Gebrauchsanleitungen sowie Gebrauchsanleitungen in verschiedenen Sprachen sind auf www.zytovision.com verfügbar.

Unsere Experten stehen Ihnen für Ihre Fragen zur Verfügung.
Bitte kontaktieren Sie helptech@zytovision.com



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

Warenzeichen:

ZytoVision® und ZytoDot® sind Warenzeichen der ZytoVision GmbH.