



ZytoFast

human Ig-kappa/Ig-lambda CISH Kit

REF T-1005-400



40 (0,4 ml)

Für den simultanen qualitativen Nachweis von humaner Ig-kappa (κ) und Ig-lambda (λ) mRNA mittels chromogener *in-situ*-Hybridisierung (CISH)



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

1. Verwendungszweck

Das ZytoFast human Ig-kappa/Ig-lambda CISH Kit ist für den simultanen qualitativen Nachweis von humaner Ig-kappa (κ) und Ig-lambda (λ) Leichtketten-mRNA in Formalin-fixierten, Paraffin-eingebetteten Geweben wie beispielsweise Lymphomgeweben mittels chromogener *in-situ*-Hybridisierung (CISH) bestimmt.

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

B-Zellen (aka B-Lymphozyten) entwickeln sich aus lymphatischen Stammzellen im Knochenmark. Jeder B-Zellklon exprimiert ein einzigartiges Antikörper-Molekül, welches aus zwei identischen schweren und zwei identischen leichten Ketten besteht, wobei letztere entweder vom κ - oder λ -Typ sind. Die Bestimmung des Kappa/Lambda-Quotienten ist zur Unterscheidung zwischen neoplastischen und reaktiven lymphatischen Proliferationen von Nutzen. Im Gegensatz zur monoklonalen Expression bei malignen Lymphomen, einer der häufigsten hämatologischen Erkrankungen der westlichen Bevölkerung, spiegelt die polyklonale Expression von κ - oder λ -Leichtketten eine reaktive Hyperplasie wieder. Während der Nachweis von Ig- κ und Ig- λ mittels Immunhistochemie häufig zu starker Hintergrundfärbung führt, erlaubt die *in-situ*-Hybridisierung durch nahezu Hintergrund-freie Signale eine sichere und einfache Analyse der Klonalität einer Lymphozyten-Population.

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 Enzym-konjugierter Antikörper, welche gegen die Sonde gerichtet sind, sichtbar gemacht. Die enzymatische Reaktion mit den chromogenen Substraten führt anschließend 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

Das ZytoFast human Ig-kappa/Ig-lambda CISH Kit ist verfügbar in einer Größe und besteht aus:

| Code | Komponente | Menge Σ 40 | Gefäß |
|------|--|----------------------|------------------------------------|
| PF22 | <u>ZytoFast human Ig-kappa/Ig-lambda Probe</u> | 0,4 ml | Reaktionsgefäß, roter Deckel |
| ES1 | <u>Pepsin Solution</u> | 04 ml | Tropfflasche, weißer Deckel |
| WB5 | <u>20x Wash Buffer TBS</u> | 2x 50 ml | Schraubverschlussflasche |
| AB15 | <u>Anti-Biotin/DIG-Mix</u> | 4 ml | Tropfflasche, gelber Deckel |
| SB4 | <u>NBT/BCIP Solution</u> | 4 ml | Tropfflasche, blauer Deckel |
| SB5 | <u>AEC Solution</u> | 4 ml | Tropfflasche, roter Deckel |
| CS4 | <u>Nuclear Green Solution</u> | 20 ml | Schraubverschlussflasche, schwarz |
| MT5 | <u>Mounting Solution (aqueous)</u> | 4 ml | Tropfflasche, transparenter Deckel |
| | Gebrauchsanweisung | 1 | |

T-1005-40 (40 Reaktionen): Komponenten **ES1**, **PF22**, **AB15**, **SB4**, **SB5**, **CS4** und **MT5** sind ausreichend für 40 Reaktionen. Komponente **WB5** ist ausreichend für 28 Küvetten à 70 ml.

Die ZytoFast human Ig-kappa/Ig-lambda Probe (PF22) besteht aus:

- Digoxigenin-markierten Polynukleotiden ($\sim 1 \text{ ng}/\mu\text{l}$), die gegen mRNA, welche die konstanten Regionen der Ig-kappa Leichtketten codieren, gerichtet sind.
- Biotin-markierten Polynukleotiden ($\sim 1 \text{ ng}/\mu\text{l}$), die gegen mRNA, welche die konstanten Regionen der Ig-lambda Leichtketten codieren, gerichtet sind.

5. Benötigte, aber nicht bereitgestellte Materialien

- Positive und negative Kontrollproben
- Objektträger, positiv geladen
- Wasserbad (55°C, 98°C)
- Hybridizer oder Wärmeplatte
- Hybridizer oder Feuchtekkammer im Hybridisierungssofen
- Verstellbare Pipetten (10 μl , 100 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 (100-200x)

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!
- 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!
- Kreuzkontaminationen und mikrobielle Kontamination der Reagenzien vermeiden!
- Die Präparate dürfen während der Hybridisierungs- und Waschschrte nicht austrocknen!

Besondere Kennzeichnung von ES1:

| | |
|--------|--|
| EUH208 | Enthält Pepsin A. Kann allergische Reaktionen hervorrufen. |
| EUH210 | Sicherheitsdatenblatt auf Anfrage erhältlich. < 20 Prozent des Gemisches bestehen aus einem oder mehreren Bestandteilen unbekannter akuter Toxizität (inhalativ). |

Besondere Kennzeichnung von SB4:

| | |
|--------|---|
| EUH210 | Sicherheitsdatenblatt auf Anfrage erhältlich. |
|--------|---|

Gefahren- und Sicherheitshinweise für AB15, CS4 und WB5:

Die gefahrbestimmende Komponente ist ein Gemisch aus: 5-Chlor-2-methyl-2H-isothiazol-3-on [EG-Nr. 247-500-7] und 2-Methyl-2H-isothiazol-3-on [EG-Nr. 220-239-6] (3:1).



Achtung

| | |
|-----------|---|
| H317 | Kann allergische Hautreaktionen verursachen. |
| P261 | Einatmen von Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol vermeiden. |
| P272 | Kontaminierte Arbeitskleidung nicht außerhalb des Arbeitsplatzes tragen. |
| P280 | Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen. |
| P302+P352 | BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT: Mit viel Wasser waschen. |
| P333+P313 | Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen. |
| P362+P364 | Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen. |

Gefahren- und Sicherheitshinweise für SB5:

Die gefahrbestimmende Komponente: N,N-Dimethylformamid, Dimethylformamid.



| | |
|----------------|--|
| H226 | Flüssigkeit und Dampf entzündbar. |
| H319 | Verursacht schwere Augenreizung. |
| H332 | Gesundheitsschädlich bei Einatmen. |
| H360D | Kann das Kind im Mutterleib schädigen. |
| P201 | Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen. |
| P210 | Von Hitze, heißen Oberflächen, Funken, offenen Flammen und anderen Zündquellen fernhalten. Nicht rauchen. |
| P308+P313 | BEI Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen. |
| P305+P351+P338 | BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen. |
| P337+P313 | Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen. |
| P403+P235 | An einem gut belüfteten Ort aufbewahren. Kühl halten. |

8. Einschränkungen

- Für die Verwendung als In-vitro-Diagnostikum.
- Nur für die professionelle Anwendung.
- 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 Zielsequenzen, die in der Gebrauchsanweisung der entsprechenden Sonde 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:

- Bei jedem Vorbereitungsschritt 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

20x Wash Buffer TBS (WB5) ist wie in der Gebrauchsanweisung unter 12. „Durchführung“ beschrieben vorzubereiten. Alle anderen Reagenzien des Produkts sind gebrauchsfertig. Kein Rekonstituieren, Mischen oder Verdünnen ist notwendig.

12. Durchführung

Vorbereitende Schritte

- (1) *(Optional) Eine Ethanolreihe (70%, 90% und 100% Ethanol) vorbereiten:* 100% Ethanol mit deionisiertem oder destilliertem Wasser verdünnen. Diese Lösungen können in geeigneten Gefäßen aufbewahrt und wiederverwendet werden.
- (2) *Vorbereitung von 1x Wash Buffer TBS:* 1 Teil 20x Wash Buffer TBS (WB5) mit 19 Teilen deionisiertem oder destilliertem Wasser verdünnen.

Der verdünnte 1x Wash Buffer TBS ist bei 2-8°C eine Woche lang haltbar.

- (3) *1x Wash Buffer TBS:* Für die Stringenzwaschung in einer abgedeckten Küvette auf 55°C erwärmen.
- (4) *Vorbereitung von 3% H₂O₂:* 1 Teil 30% H₂O₂ mit 9 Teilen 100% Methanol verdünnen.
- (5) *ZytoFast CISH Sonde:* Vor der Anwendung auf Hybridisierungstemperatur bringen und gründlich mischen.
- (6) *Anti-Biotin/DIG-Mix (AB15), NBT/BCIP Solution (SB4), AEC Solution (SB5), Nuclear Green Solution (CS4), Mounting Solution (aqueous) (MT5):* Vor der Verwendung auf Raumtemperatur (18°C-25°C) bringen.

Vorbehandlung (Entparaffinierung/Proteolyse)

- (1) Die Objektträger für 10 min bei 70°C inkubieren (z.B. auf einer Wärmeplatte).
- (2) Die Objektträger für 2x 5 min in Xylol inkubieren.
- (3) Die Objektträger für 3x 3 min in 100% Ethanol inkubieren.
- (4) Die Objektträger für 5 min in 3% H₂O₂ inkubieren
- (5) Die Objektträger für 2x 1 min in deionisiertem oder destilliertem Wasser waschen.
- (6) Pepsin Solution (ES1) (tropfenweise) auf die Präparate auftragen und für 20-50 min bei 37°C in einer Feuchtekammer inkubieren.

ES1 kann Präzipitate bilden, welche nicht die Qualität beeinflussen.

Generell wird eine Bestimmung der optimalen Dauer der Proteolyse in Vortests empfohlen.

- (7) Die Objektträger in destilliertes oder deionisiertes Wasser bei RT eintauchen.
- (8) *(Optional) Dehydrierung* für jeweils 1 min in 70%, 90% und 100% Ethanol.
- (9) Schnitte an der Luft trocknen.

Bitte beachten: Die Schnitte vollständig trocknen lassen, bevor die Sonde aufgetragen wird.

Denaturierung und Hybridisierung

1. 10 μl der ZytoFast CISH 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 75°C denaturieren.
4. Die Objektträger in eine Feuchtekammer überführen und für 2 h bei 55°C hybridisieren (z.B. in einem Hybridisierungsöfen).

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

Post-Hybridisierung und Detektion

- (1) Vorsichtig den Naturkautschuk-Klebstoff oder Kleber entfernen.
- (2) Durch das Eintauchen der Objektträger in 1x Wash Buffer TBS für 5 min bei RT das Deckglas entfernen.
- (3) Die Objektträger für 5 min bei 55°C in 1x Wash Buffer TBS waschen.
- (4) Die Objektträger für 5 min bei RT in 1x Wash Buffer TBS waschen.
- (5) Anti-Biotin/DIG-Mix (AB15) (1-2 Tropfen pro Objektträger) auf die Objektträger geben und für 30 min bei 37°C in einer Feuchtekammer inkubieren.
- (6) Die Objektträger für 3x 1 min bei RT in 1x Wash Buffer TBS waschen.
- (7) AEC Solution (SB5) (1-2 Tropfen pro Objektträger) auf die Objektträger geben und für 15 min bei RT in einer Feuchtekammer inkubieren.

Keinem starken, direkten Licht aussetzen.

- (8) Die Objektträger für 3x 1 min bei RT in deionisiertem oder destilliertem Wasser waschen.
- (9) NBT/BCIP Solution (SB4) (1-2 Tropfen pro Objektträger) auf die Objektträger geben und für 30 min bei 37°C in einer Feuchtekammer inkubieren.
- (10) Die Objektträger für 3x 1 min bei RT in deionisiertem oder destilliertem Wasser waschen.
- (11) Die Präparate für 2-5 min mit Nuclear Green Solution (CS4) gegenfärben.
- (12) Die Objektträger für 3x 1 min bei RT in deionisiertem oder destilliertem Wasser waschen und das Wasser abtropfen lassen oder abtupfen.
- (13) Die Präparate mit einem Deckglas (22 mm x 22 mm; 24 mm x 32 mm) mit Hilfe von Mounting Solution (aqueous) (MT5) abdecken, dabei den Einschluss von Luftbläschen vermeiden. 20-30 min warten, bis das Deckgläschen nicht mehr beweglich ist.
- (14) Die gefärbten Präparate mit einem Lichtmikroskop auswerten.

13. Interpretation der Ergebnisse

Bei Verwendung des ZytoFast human Ig-kappa/Ig-lambda CISH Kits erscheinen die Hybridisierungssignale der Digoxigenin-markierten κ -Polynukleotide als hellrote Signale (AEC), Biotin-markierte λ -Polynukleotide erscheinen als blau-violette Signale (NBT/BCIP).

Eine positive Reaktivität für Ig-kappa (κ) mRNA in B-Plasmazellen wird durch eine rote zytoplasmatische Färbung angezeigt.

Eine positive Reaktivität für Ig-lambda (λ) mRNA in B-Plasmazellen wird durch eine blau-violette zytoplasmatische Färbung angezeigt.

Die Gegenfärbung der Proben mit Nuclear Green Solution (**CS4**) führt zu einer hellgrünen Zellkernfärbung.

Der normale Kappa/Lambda-Quotient in lymphatischen Geweben ist in etwa 2:1, ein Kappa/Lambda-Quotient $>3:1$ oder $<0,3:1$ ist ein Indikator für Monoklonalität.

Bitte beachten:

- Die Signale sollten mindestens mit einer 100fachen Vergrößerung visualisiert werden, sodass die Signale gut zu erkennen sind.
- Keine nekrotischen Bereiche, sich überlagernde Zellkerne, überverdauete Zellkerne oder Zellkerne mit schwacher Signalintensität auswerten.

- 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: Eine B-Plasmazelle innerhalb des Präparats sollte entweder ein Ig-Kappa- oder ein Ig-Lambda-Signalmuster aufweisen. Zellen innerhalb des Präparats, welche keine B-Zellen sind, wie beispielsweise Fibroblasten sollten keine Färbung aufweisen.

Externe Kontrolle: Validierte positive und negative Kontrollproben.

15. Leistungsmerkmale

Die Leistung der ZytoFast human Ig-kappa/Ig-lambda Probe wurde mittels der Durchführung von chromogenen *in situ* Hybridisierungen (CISH) mit Leichtketten-Restriktion-positivem und negativem Gewebepreparaten beurteilt. Der Leichtketten-Restriktionsstatus der untersuchten Präparate wurde zuvor durch eine Referenzmethode bestimmt.

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 Gewebeproben sind nicht korrekt fixiert | Die Fixierzeit und das Fixiermittel optimieren |
| Temperatur der Proteolyse, Hybridisierung, Denaturierung, Stringenzwaschung 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 2h hybridisieren, falls notwendig, Hybridisierungszeit verlängern |
| Zu gering konzentrierter Wash Buffer | Die Konzentration des Wash Buffers überprüfen |
| 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 Feuchtekommer verwendet werden. Zusätzlich sollte das Deckglas, z.B. mit Fixogum, vollständig versiegelt werden, um ein Austrocknen der Präparate während der Hybridisierung zu verhindern |
| Inkubationstemperatur der Farbsubstrate nicht korrekt | Die Temperatur aller verwendeten technischen Geräte mit einem kalibrierten Thermometer überprüfen |
| 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 |
| Keine Zielsequenz vorhanden | Verifiziertes positives Gewebe verwenden, um die Leistung des Tests zu bestätigen |

Signale 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 |
| Substratreaktion ist zu stark | Inkubationszeit des Substrates verkürzen; die Substratlösung nicht über die in der Gebrauchsanweisung beschriebenen Temperatur hinaus erhitzen |

Signale verblassen oder verschmelzen

| Mögliche Ursache | Lösung |
|--|---|
| Verwendung eines ungeeigneten Eindeckmediums | Nur das mit dem Kit zur Verfügung gestellte oder wässrige Eindeckmedium frei von Unreinheiten verwenden; keine Eindeckfolie 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 den Test nicht |
| Variierende Methoden der Gewebefixierung oder Einbettung | Methoden der Fixierung und Einbettung optimieren |
| Variierende Gewebedicke | Schneiden optimieren |

Degradierte Morphologie

| Mögliche Ursache | Lösung |
|---|--|
| Zell- oder Gewebeproben sind nicht optimal fixiert | Die Fixierzeit und das Fixiermittel optimieren |
| Proteolytische Vorbehandlung nicht optimal ausgeführt | Die Inkubationszeit mit Pepsin optimieren |

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 während oder nach der Hybridisierung ausgetrocknet | Das Austrocknen der Schnitte vermeiden; Feuchtekammern 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

- Erber WN, et al. (1993) *Pathology* 25: 63-7.
- Hieter PA, et al. (1980) *Cell* 22: 197-207.
- Hieter PA, et al. (1981) *Nature* 294: 536-40.
- Marti GE, et al. (2005) *Br J Haematol* 130: 325-32.
- McNicol AM, Farquharson MA (1997) *J Pathol* 182: 250-61.
- Pringle JH, et al. (1990) *J Pathol* 162: 197-207.
- Wilkinson DG: *In Situ Hybridization, A Practical Approach*, Oxford University Press (1992) ISBN 0 19 963327 4.

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 ZytoFast® sind Warenzeichen der ZytoVision GmbH.