



ZytoLight SPEC ERBB2/CEN 17 Dual Color Probe Kit

REF Z-2020-5 Σ 5

REF Z-2020-20 Σ 20

Für den qualitativen Nachweis von Amplifikationen des humanen ERBB2-Gens und Alpha-Satelliten von Chromosom 17 mittels Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH)



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

1. Verwendungszweck

Das ZytoLight SPEC ERBB2/CEN 17 Dual Color Probe Kit ist für den qualitativen Nachweis von Amplifikationen des humanen ERBB2-Gens sowie von Alpha-Satelliten von Chromosom 17 in Formalin-fixierten, Paraffin-eingebetteten Geweben wie beispielsweise Mammakarzinom- oder Magenkarzinom-Geweben mittels Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) 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

Das ERBB2-Gen (aka HER2 und NEU) ist in der chromosomalen Region 17q12 lokalisiert und codiert ein 185-190 kDa transmembranes Glykoprotein, p185, das als zellulärer Rezeptor für Wachstumsfaktoren fungiert. Das p185-Protein gehört zur EGFR (epidermal growth factor receptor) Untergruppe der RTK (Rezeptor-Tyrosinkinasen) Überfamilie, die auch EGFR (ERBB1), ERBB3 (HER3) und ERBB4 (HER4) umfasst. Die Amplifikation des Proto-Onkogens ERBB2, welche bei etwa 20% aller Mammakarzinome beobachtet wurde, korreliert mit einer schlechten Prognose der Erkrankung. Ähnliche Ergebnisse wurden für eine Vielzahl anderer bösartiger Neoplasien gezeigt, z.B. Ovarialkarzinome, Magenkarzinom und Karzinome der Speicheldrüse.

3. Prinzip der Methode

Die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) erlaubt den Nachweis und die Visualisierung von spezifischen Nukleinsäuresequenzen in Zellpräparationen. Fluoreszenzmarkierte DNA-Fragmente, sogenannte FISH-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. Nach der Gegenfärbung der DNA mit DAPI werden hybridisierte Sondenfragmente mit einem Fluoreszenzmikroskop visualisiert, welches mit für die Fluorochrome spezifischen Anregungs- und Emissionsfiltern

ausgestattet ist, mit denen die FISH-Sondenfragmente direkt markiert wurden.

4. Enthaltene Komponenten

Das ZytoLight SPEC ERBB2/CEN 17 Dual Color Probe Kit ist in zwei Größen verfügbar und besteht aus:

Code	Komponente	Menge		Gefäß
		5	20	
PT1	Heat Pretreatment Solution Citric	150 ml	500 ml	Schraubverschlussflasche (groß)
ES1	Pepsin Solution	1 ml	4 ml	Tropfflasche, weißer Deckel
WB1	Wash Buffer SSC	210 ml	560 ml	Schraubverschlussflasche (groß)
PL8	ZytoLight SPEC ERBB2/CEN 17 Dual Color Probe	0,05 ml	0,2 ml	Reaktionsgefäß, roter Deckel
WB2	25x Wash Buffer A	50 ml	2x50 ml	Schraubverschlussflasche (medium)
MT7	DAPI/DuraTect-Solution	0,2 ml	0,8 ml	Reaktionsgefäß, blauer Deckel
	Gebrauchsanweisung	1	1	

Z-2020-5 (5 Reaktionen): Die Komponenten **ES1**, **PL8** und **MT7** sind ausreichend für 5 Reaktionen. Die Komponente **WB2** ist ausreichend für 5x 3 Küvetten à 70 ml. Die Komponente **PT1** ist ausreichend für 2 Küvetten à 70 ml. Die Komponente **WB1** ist ausreichend für 3 Küvetten à 70 ml.

Z-2020-20 (20 Reaktionen): Die Komponenten **ES1**, **PL8** und **MT7** sind ausreichend für 20 Reaktionen. Die Komponente **WB2** ist ausreichend für 11x 3 Küvetten à 70 ml. Die Komponente **PT1** ist ausreichend für 7 Küvetten à 70 ml. Die Komponente **WB1** ist ausreichend für 8 Küvetten à 70 ml.

Die ZytoLight SPEC ERBB2/CEN 17 Dual Color Probe besteht aus:

- ZyGreen (Anregung 503 nm/Emission 528 nm) markierten Polynukleotiden (~10 ng/μl), die gegen Sequenzen in 17q12-q21.1* (chr17:37,572,531-38,181,308) gerichtet sind, welche die ERBB2-Genregion enthalten (siehe Abb. 1).
- ZyOrange (Anregung 547 nm/Emission 572 nm) markierten Polynukleotiden (~1,5 ng/μl), die gegen Sequenzen in 17p11.1-q11.1 gerichtet sind, die spezifisch für die zentromerische Alpha-Satelliten-Region D17Z1 von Chromosom 17 sind.
- Hybridisierungsbuffer auf Basis von Formamid

*nach Human Genome Assembly GRCh37/hg19

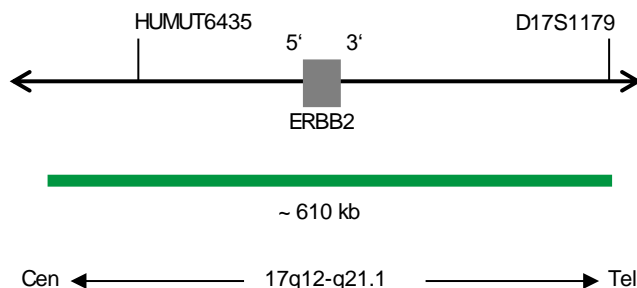


Abb. 1: SPEC ERBB2 Sondenlokalisierung (nicht maßstabgetreu)

5. Benötigte, aber nicht bereitgestellte Materialien

- ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit (Prod. Nr. Z-2028-5/-20)
- Positive und negative Kontrollproben
- Objekträger, positiv geladen
- Wasserbad (37°C, 98°C)
- Hybridizer oder Wärmeplatte
- Hybridizer oder Feuchtekkammer im Hybridisierungssofen
- Verstellbare Pipetten (10 μl, 25 μl)
- Küvetten oder Färbeträge
- Stoppuhr
- Kalibriertes Thermometer
- Ethanol oder denaturierter Alkohol

- Xylol
- Deionisiertes oder destilliertes Wasser
- Deckgläser (22 mm x 22 mm, 24 mm x 60 mm)
- Naturkautschuk-Klebstoff, z.B. Fixogum Rubber Cement (Prod. Nr. E-4005-50/-125) oder Ähnliches
- Regelmäßig gewartetes Fluoreszenzmikroskop (400-1000x)
- Immersionsöl, geeignet für Fluoreszenzmikroskopie
- Entsprechende Filtersätze

6. Lagerung und Handhabung

Die Komponenten des Kits müssen bei 2-8°C lagern. Zusätzlich dazu müssen die DAPI/DuraTect-Solution (MT7) und die Sondenlösung (**PL8**) vor Licht geschützt gelagert werden. 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 Anfrage für den beruflichen Anwender verfügbar.
- Die Reagenzien nicht wiederverwenden.
- Kreuzkontaminationen der Präparate vermeiden, da diese zu fehlerhaften Ergebnissen führen.
- Die Sonde (**PL8**) und die DAPI/DuraTect-Solution (MT7) sollten nicht für längere Zeit dem Licht, insbesondere intensivem Licht, ausgesetzt werden. Das bedeutet, falls möglich sollten alle Arbeitsschritte im Dunkeln und/oder unter Verwendung von lichtundurchlässigen Behältnissen durchgeführt werden!

Gefahren- und Sicherheitshinweise für PL8:

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.

Gefahren- und Sicherheitshinweise für PT1, WB1 und WB2:

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.

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 FISH 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 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

Rote Blutzellen innerhalb des Präparates können Autofluoreszenz verursachen, welche die Signalerkennung behindert.

Folgende Fixierungen sind nicht kompatibel mit FISH:

- 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:

- Fixierung in 10% neutral gepuffertem Formalin für 24h bei Raumtemperatur (18-25°C).
- Probengröße < 0,5 cm³.
- Qualitativ hochwertiges Paraffin verwenden.
- Das Einbetten sollte bei Temperaturen unter 65°C erfolgen.
- 2-4 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 lichtgeschützt auf Raumtemperatur (18-25°C) bringen. Vor dem Öffnen durch Vortexen mischen und kurz herunterzentrifugieren.

12. Durchführung

12.1 Tag 1

Vorbereitende Schritte

- (1) *Zwei Ethanolreihen (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) *Heat Pretreatment Solution Citric (PT1):* Auf 98°C erwärmen.
- (3) *Wash Buffer SSC (WB1):* Auf Raumtemperatur (RT) bringen.
- (4) *ZytoLight FISH Probe:* Vor der Verwendung auf RT bringen, vor Licht schützen.

Optional, wenn Post-Fixierungsschritt durchgeführt wird:

(dringend empfohlen, wenn die Gewebefixierung nicht optimal ist)
1% Formaldehydlösung mittels des Formaldehyde Dilution Buffer Sets (PT-0006-100) vorbereiten

Vorbehandlung (Entparaffinierung/Proteolyse)

- (1) Die Objektträger für 10 min bei 70°C inkubieren (z.B., auf einer Wärmeplatte).
- (2) Die Objektträger für 2x 10 min in Xylol inkubieren.
- (3) In 100%, 100%, 90% und 70% Ethanol jeweils für 5 min inkubieren.
- (4) 2x 2 min in deionisiertem oder destilliertem Wasser waschen.
- (5) Für 15 min in vorgewärmter Heat Pretreatment Solution Citric (PT1) bei 98°C inkubieren.

Wir empfehlen, nicht mehr als acht Objektträger pro Färbetrog zu verwenden.

- (6) Die Objektträger sofort in destilliertes oder deionisiertes Wasser überführen, für 2x 2 min waschen und das Wasser abtropfen lassen oder abtupfen.
- (7) Pepsin Solution (ES1) (tropfenweise) auf die Präparate auftragen und für 15 min bei 37°C in einer Feuchtekammer inkubieren.

ES1 kann Präzipitate bilden, welche nicht die Qualität beeinflussen.

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. Als Richtwert kann eine Inkubationszeit von 2-30 min für Gewebepreparate und 2-15 min für Zellpräparate empfohlen werden. Generell wird eine Bestimmung der optimalen Dauer der Proteolyse in Vortests empfohlen.

- (8) 5 min in Wash Buffer SSC (WB1) waschen.

Optional, wenn Post-Fixierungsschritt durchgeführt wird:

Die Objektträger für 15 min in 1% Formaldehyd-Lösung inkubieren und anschließend für 5 min in Wash Buffer SSC (WB1) waschen

- (9) Für 1 min in deionisiertem oder destilliertem Wasser waschen.
- (10) Dehydrierung jeweils für 1 min in 70%, 90% und 100% Ethanol.
- (11) Schnitte an der Luft trocknen.

Bitte beachten: Die Schnitte vollständig trocknen lassen, bevor die Sonde aufgetragen wird, da zurückbleibende Feuchtigkeit die Signalintensität reduzieren und/oder die Gewebemorphologie beeinflussen kann.

Denaturierung und Hybridisierung

- (1) 10 µl der ZytoLight SPEC ERBB2/CEN 17 Dual Color Probe (PL8) auf jedes der vorbehandelten Präparate pipettieren.

Längere Licht-Exposition der Sonde vermeiden.

- (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 10 min bei 75°C denaturieren.

- (4) Die Objektträger in eine Feuchtekammer überführen und über Nacht bei 37°C hybridisieren (z.B. in einem Hybridisierungssofen).

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

12.2 Tag 2

Vorbereitende Schritte

- (1) *Vorbereitung von 1x Wash Buffer A:* 1 Teil 25x Wash Buffer A (WB2) mit 24 Teilen deionisiertem oder destilliertem Wasser verdünnen. Drei Färbetroge mit dem 1x Wash Buffer A füllen und auf 37°C vorwärmen.
- (2) DAPI/DuraTect-Solution (MT7): Vor der Verwendung auf Raumtemperatur bringen, vor Licht schützen.

Post-Hybridisierung und Detektion

- (1) Vorsichtig den Naturkautschuk-Klebstoff oder Kleber entfernen.
- (2) Durch das Eintauchen in 1x Wash Buffer A für 1-3 min das Deckglas entfernen.
- (3) Mit 1x Wash Buffer A für 2x 5 min bei 37°C waschen.

Der 1x Wash Buffer A sollte vorgewärmt sein. Falls notwendig, die Temperatur mit einem Thermometer überprüfen.

- (4) In 70%, 90% und 100% Ethanol jeweils für 1 min inkubieren.
- (5) Schnitte vor Licht geschützt an der Luft trocknen.
- (6) 25 µl DAPI/DuraTect-Solution (MT7) auf die Objektträger pipettieren. Die Präparate mit einem Deckglas (24 mm x 60 mm) abdecken, dabei den Einschluss von Luftbläschen vermeiden. Im Dunkeln für 15 min inkubieren.

Die Verwendung einer abgeschnittenen Pipettenspitze zur Vergrößerung der Öffnung kann das Pipettieren erleichtern. Nicht lange dem Licht aussetzen.

- (7) Die Objektträger im Dunkeln aufbewahren. Bei längerer Lagerung sollte dies bei 2-8°C erfolgen.
- (8) Die Auswertung des Probenmaterials erfolgt mittels Fluoreszenzmikroskopie. Es werden Filtersätze für folgende Wellenlängenbereiche benötigt:

Fluoreszenzfarbstoff	Anregung	Emission
ZyGreen	503 nm	528 nm
ZyOrange	547 nm	572 nm

13. Interpretation der Ergebnisse

Bei Verwendung von geeigneten Filtersätzen erscheinen die Hybridisierungssignale der Sonde grün (ERBB2-Genregion) und orange (CEN 17).

Normale Situation: In Interphasen von normalen Zellen oder Zellen ohne eine Amplifikation der ERBB2-Genregion erscheinen zwei grüne und zwei orange Signale (siehe Abb. 2).

Aberrante Situation: In Zellen mit einer Amplifikation der ERBB2-Genregion können eine erhöhte Anzahl grüner Signale oder grüne Signalkuster beobachtet werden (siehe Abb. 2).

Sich überlagernde Signale können als gelbe Signale erscheinen.

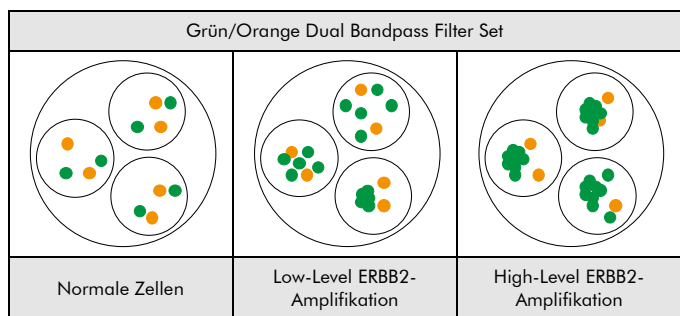


Abb. 2: Zu erwartende Ergebnisse in normalen und aberranten Zellkernen

Bei einigen aberranten Präparaten kann eine abweichende Signalverteilung beobachtet werden, welche zu einem anderen Signalmuster als zuvor beschrieben führen kann. Dies kann auf abweichende Rearrangierungen hinweisen. Unerwartete Signalmuster sollten näher untersucht werden.

Bitte beachten:

- Aufgrund von dekondensiertem Chromatin können einzelne FISH-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.
- Sich überlagernde Zellkerne nicht auswerten.
- Über-verdaute Zellkerne nicht auswerten (erkennbar als dunkle Areale im Zellkern).
- Keine Auswertung von Zellen mit starker Eigenfluoreszenz, welche die Signalerkennung behindert.
- Ein negatives oder unspezifisches Ergebnis kann durch verschiedene Faktoren verursacht werden (siehe Kapitel 17).
- 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

Genauigkeit: Die Lokalisation der Hybridisierung der Sonde wurde auf Metaphasen eines karyotypisch unauffälligen Mannes überprüft. Die Sonde hybridisierte in allen getesteten Präparaten nur an die erwarteten Loci. Es wurden keine zusätzlichen Signale oder Kreuzhybridisierungen beobachtet. Daher wurde eine Genauigkeit von 100% berechnet.

Analytische Sensitivität: Für die Bestimmung der analytischen Sensitivität wurde die Sonde auf Metaphasen von karyotypisch unauffälligen Männern getestet. Sämtliche Zellkerne zeigten das erwartete unauffällige Signalmuster in allen getesteten Präparaten. Daher wurde eine analytische Sensitivität von 100% berechnet.

Analytische Spezifität: Für die Bestimmung der analytischen Spezifität wurde die Sonde auf Metaphasen von karyotypisch unauffälligen Männern getestet. In sämtlichen getesteten Präparaten hybridisierten alle Signale nur an die erwarteten Zielbereiche und an keine weiteren Loci. Daher 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
Es sind keine Zielsequenzen vorhanden	Geeignete Kontrollen verwenden
Zell- oder Gewebeproben sind nicht korrekt fixiert	Die Fixierzeit und das Fixiermittel optimieren oder Post-Fixierungsschritte wie in „Arbeitsanleitung“ der Gebrauchsanweisung des <u>ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kits</u> beschrieben anwenden
Temperatur der Hitze-Vorbehandlung, Proteolyse, Denaturierung, Hybridisierung oder der Stringenzwaschung nicht korrekt	Die Temperatur aller technischen Geräte mit einem kalibrierten Thermometer überprüfen
Proteolytische Vorbehandlung nicht optimal	Die Inkubationszeit mit Pepsin optimieren, falls notwendig erhöhen oder reduzieren
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 Präparat während der Hybridisierung zu verhindern.
Zu gering konzentrierter Stringenzwaschpuffer	Die Konzentration des Stringenzwaschpuffers überprüfen
Alte Dehydrierungslösungen	Frische Dehydrierungslösungen ansetzen
Fluoreszenzmikroskop falsch eingestellt	Einstellungen überprüfen
Ungeeignete Filtersätze verwendet	Für die Fluorochrome der Sonde geeignete Filtersätze verwenden. <i>Triple-Bandpass-Filtersätze liefern im Vergleich zu Single- oder Dual-Bandpass-Filtersätzen weniger Licht. Daher können die Signale unter Verwendung von Triple-Bandpass-Filtersätzen schwächer erscheinen.</i>
Schädigungen der Sonden/Fluorophore durch Licht	Hybridisierung und Waschschrte im Dunkeln durchführen

Kreuzhybridisierungssignale, Hintergrundsignale

Mögliche Ursache	Lösung
Unvollständiges Entparaffinieren	Frische Lösungen verwenden, Dauer des Entparaffinierens überprüfen
Proteolytische Vorbehandlung zu stark	Die Inkubationszeit mit Pepsin reduzieren
Sondenvolumen pro Fläche zu hoch	Das Volumen der Sonde pro Präparat/Fläche reduzieren, Sonde tropfenweise verteilen, um lokale Konzentration zu vermeiden
Objektträger sind vor der Hybridisierung auf Raumtemperatur abgekühlt	Objektträger schnell auf 37°C transferieren
Zu hoch konzentrierter Stringenzwaschpuffer	Die Konzentration des Stringenzwaschpuffers überprüfen

Temperatur der Waschschriffe nach Hybridisierung ist zu gering	Temperatur überprüfen und, wenn nötig, erhöhen
Austrocknung der Präparate zwischen den einzelnen Inkubationsschritten	Austrocknung durch Versiegeln der Objektträger und durch das Durchführen der Inkubation in feuchter Umgebung verhindern

Degradierete Morphologie

Mögliche Ursache	Lösung
Zell- oder Gewebeprobe sind nicht optimal fixiert	Die Fixierzeit und das Fixiermittel optimieren oder Post-Fixierungsschritte wie in „Durchführung“ der Gebrauchsanweisung des <u>ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kits</u> beschrieben anwenden
Proteolytische Vorbehandlung nicht optimal ausgeführt	Die Inkubationszeit mit Pepsin optimieren, falls notwendig erhöhen oder reduzieren
Unzureichende Trocknung vor Applikation der Sonde	Lufttrocknung verlängern

Überlagernde Zellkerne

Mögliche Ursache	Lösung
Ungeeignete Dicke der Gewebeschnitte	2-4 µm dicke Mikrotomschnitte anfertigen

Präparat löst sich vom Objektträger

Mögliche Ursache	Lösung
Ungeeignete Beschichtung der Objektträger	Geeignete Objektträger verwenden
Proteolytische Vorbehandlung ist zu stark	Inkubationszeit mit Pepsin reduzieren

Schwache Gegenfärbung

Mögliche Ursache	Lösung
Gering konzentrierte DAPI-Lösung	<u>DAPI/DuraTect-Solution (ultra)</u> (Prod. Nr. MT-0008-0.8) stattdessen verwenden
Inkubationszeit mit DAPI zu kurz	Inkubationszeit mit DAPI anpassen

18. Literatur

- 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.
- Kievits T, et al. (1990) *Cytogenet Cell Genet* 53: 134-6.
- 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.
- 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 help@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 ZytoLight® sind Warenzeichen der ZytoVision GmbH.