



## Zyto*Dot* CISH Polymer Detection Kit

40 Anwendungen

Für die CISH-basierte Detektion von Digoxigenin-markierten  
Sonden

Für den Gebrauch als In Vitro Diagnostikum

Produkt Nr.: [C-3005](#)

Herstellung: **ZytoVision GmbH**, Fischkai 1, D-27572 Bremerhaven  
Telefon: +49 (0) 471-4832 300  
Telefax: +49 (0) 471-4832 509  
[info@zytovision.com](mailto:info@zytovision.com), <http://www.zytovision.com>

# 1. Bestimmung der Anwendung

## Für den Gebrauch als In Vitro Diagnostikum bestimmt.

Das *ZytoDot CISH Polymer Detection Kit* dient zur Detektion von Digoxigenin-markierten Sonden in formalinfixierten, paraffineingebetteten Gewebe- oder Zellproben unter Verwendung von primären (nicht-markierten) Anti-Digoxigenin Antikörpern, sekundären polymerisierten HRP-konjugierten Antikörpern und DAB im Rahmen der Chromogenen *in situ* Hybridisierung (CISH).

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

# 2. Sicherheitshinweise und Entsorgung

- ✓ Bedienungsanleitung vor Durchführung der Anwendung lesen!
- ✓ Reagenzien nach Ablauf des Haltbarkeitsdatums nicht mehr benutzen!
- ✓ Kreuzkontaminationen und mikrobielle Kontaminationen der Reagenzien vermeiden!
- ✓ Einige der System-Komponenten enthalten gesundheitsgefährdende Stoffe (Chloralhydrat, Xylol) in geringen Konzentrationen und Volumina. Der direkte Kontakt mit den Reagenzien muss vermieden werden. Entsprechende Schutzmaßnahmen sind zu treffen (Benutzung von Einmalhandschuhen, Schutzbrille und Laborbekleidung)!
- ✓ Bei Kontakt mit den Reagenzien müssen die betroffenen Stellen sofort mit viel Wasser gespült werden!
- ✓ Niemals Lösungen mit dem Mund pipettieren!
- ✓ Die Entsorgung der Reagenzien unterliegt den örtlichen Regularien!
- ✓ Sicherheitsdatenblatt ist auf Anfrage für den berufsmäßigen Verwender erhältlich!

# 3. Das *ZytoDot CISH Polymer Detection Kit*

Das Kit besteht aus den folgenden Komponenten:

Code	Komponente	Menge	Gefäß
1	Blocking Solution	4 ml	Tropfflasche, oranger Deckel
2	Mouse-Anti-DIG	4 ml	Tropfflasche, pinker Deckel
3	Anti-Mouse-HRP-Polymer	4 ml	Tropfflasche, violetter Deckel
4	DAB Solution A	0,3 ml	Tropfflasche, grüner Deckel
5	DAB Solution B	10 ml	Tropfflasche, grauer Deckel
6	Mayer's Hematoxylin Solution	20 ml	Schraubdeckelflasche (schwarz)
7	Mounting Solution	4 ml	Glasflasche (braun)
	Bedienungsanleitung	1	

Alle Komponenten sind ausreichend für 40 Anwendungen.

## 4. Lagerung und Haltbarkeit

Die Bestandteile des [ZytoDot CISH Polymer Detection Kit](#) müssen bei 2-8°C gelagert werden. Unter den angegebenen Lagerungsbedingungen sind die Komponenten des [ZytoDot CISH Polymer Detection Kit](#) bis zu den auf den einzelnen Etiketten angegebenen Haltbarkeitsdaten stabil.

## 5. Untersuchungsmaterial and Vorbereitungen

Das [ZytoDot CISH Polymer Detection Kit](#) ist auf formalinfixierte, paraffineingebettete Gewebe- und Zellproben optimiert. Wir empfehlen folgende Gewebeaufbereitung:

- ✓ *Gewebevorbereitung*: Fixierung in 10% neutralgepuffertem Formalin für 24 h bei RT. Standardmäßige Paraffin-Einbettung und Anfertigung von Mikrotomschnitten mit einer Schnittdicke von 2-5 µm.
- ✓ *Vorbehandlung*: Die Vorbehandlung (Entparaffinieren/Proteolyse) der Zell- und Gewebeschnitte sollte nach Standardprotokollen durchgeführt werden. Generell empfehlen wir die optimale Proteolysezeit in Vortests zu bestimmen.
- ✓ *Hybridisierung*: Die Hybridisierung sollte in einer feuchten Kammer bei 37°C über Nacht durchgeführt werden. Die Objektträger vor der Detektion und Post-Hybridisierung waschen.

## 6. Detektion

1. Objektträger 10 min in 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in absolutem Methanol inkubieren
2. Jeweils 3x 2 min in einem PBS/Tween Puffer waschen (nicht enthalten)
3. Blocking Solution (1) tropfenweise (2-3 Tropfen/Objektträger) auf die Objektträger aufträufeln und Inkubation für 10 min bei RT
4. Vorsichtiges Abtupfen der Blocking Solution; **nicht abspülen!**
5. Mouse-Anti-DIG (2) tropfenweise (2-3 Tropfen/Objektträger) auf die Objektträger aufträufeln und Inkubation für 30 min bei RT
6. Jeweils 3x 2 min in einem PBS/Tween Puffer waschen (nicht enthalten)
7. Anti-Mouse-HRP-Polymer (3) tropfenweise (2-3 Tropfen/Objektträger) auf die Objektträger aufträufeln und Inkubation für 30 min bei RT
8. Jeweils 3x 2 min in einem PBS/Tween Puffer waschen (nicht enthalten)
9. Während der Waschschritte DAB Solution ansetzen durch Vorlage von 1 ml DAB Solution B (5) in einem graduierten Reaktionsgefäß und Zugabe von einem Tropfen DAB Solution A (4)
10. Die angesetzte DAB Solution tropfenweise (2-3 Tropfen/Objektträger) auf die Objektträger aufträufeln und Inkubation für 30 min bei RT
11. Objektträger in eine Küvette überführen und 2 min mit laufendem Leitungswasser waschen

**12.** Gegenfärbung der Gewebe/Zellproben für 8-10 sec mit Mayer's Hematoxylin Solution (**6**)

**13.** Objektträger in eine Küvette überführen und 2 min mit laufendem Leitungswasser waschen

**14.** Dehydrierung: in 70%, 85%, 95% and 2x 100% Ethanol für jeweils 2 min

**15.** Inkubation für 2x 2 min in Xylol

Anschließend die Schnitte für etwa 15 min lufttrocknen lassen

**16.** Schnitte mit einem Deckgläschen (22 x 22 mm, 24 x 32 mm) luftblasenfrei unter Verwendung der Mounting Solution (**7**) eindecken und ca. 30 min lufttrocknen lassen

**17.** Die Auswertung der Untersuchungsgegenstände erfolgt durch ein Lichtmikroskop

## **7. Ergebnisse**

Bei Verwendung geeigneter Sonden kann in geeigneten Zellen eine positive Färbung erzielt werden, z.B. zwei punktförmige HER2-Signale im Zellkern einer normalen Zelle.

Die Gegenfärbungszeit ist abhängig von den verwendeten Gewebe/Zellproben und sollte daher optimiert werden. Zu dunkle Gegenfärbung sollte vermieden werden, da dies positive Signale überdecken könnte. Schwache oder fehlende Signale könnten auf eine zu kurze Inkubation mit Mayer's Hematoxylin Solution zurückzuführen sein.

Das endgültige Ergebnis ist stark von den vorgeschalteten experimentellen Schritten abhängig, wie z.B. Fixierung des Gewebes, Vorbehandlung, Denaturierung der DNA-Sonde, Hybridisierung und Waschschrte. Für eine anwenderfreundliche Durchführung empfehlen wir das ZytoVision [ZytoDot](#) Hybridisierungssystem.

**Ihre Fragen beantworten unsere Experten gerne.**

### **Literatur:**

Bhargava R, et al. (2005) Am J Clin Pathol 123: 237-43.

Tsakamoto T, et al. (1991) Int J Dev Biol 35: 25-32.

Wilkinson DG (1992) Oxford University Press; ISBN 0 19 963327 4

### **Warenzeichen:**

ZytoVision<sup>®</sup> und ZytoDot<sup>®</sup> sind Warenzeichen der ZytoVision GmbH.