



## Zyto*Dot* Pretreatment Kit

50 reazioni

Per il pretrattamento dei campioni da analizzare mediante  
Ibridazione In Situ Cromogenica (CISH)

Per uso diagnostico in vitro

Codice Prodotto: [C-3004](#)

Produttore: **ZytoVision GmbH**, Fischkai 1, D-27572 Bremerhaven

Phone: +49 (0) 471-4832 300

Fax: +49 (0) 471-4832 509

info@zytovision.com, <http://www.zytovision.com>

## 1. Finalità d'uso

### Per uso diagnostico in vitro.

Il kit *ZytoDot Pretreatment Kit* è indicato per il pretrattamento al calore e per la digestione enzimatica di cellule o tessuti fissati in formalina ed inclusi in paraffina da analizzare mediante Ibridazione In Situ Cromogenica (CISH).

L'interpretazione dei risultati deve essere effettuata da un patologo qualificato tenendo conto degli altri dati clinici e patologici del paziente nel contesto dell'anamnesi clinica.

## 2. Sicurezza e smaltimento

- ✓ Leggere le istruzioni prima dell'uso!
- ✓ Non utilizzare i reagenti dopo la data di scadenza
- ✓ Evitare contaminazioni incrociate e microbatteriche dei reagenti!
- ✓ Alcuni componenti del sistema contengono (a basse concentrazioni e volumi ridotti) sostanze nocive per la salute (EDTA, Pepsin Solution). Evitare il contatto diretto con i reagenti. Adottare adeguate misure protettive (utilizzo di guanti monouso, occhiali protettivi e indumenti da laboratorio)!
- ✓ In caso di contatto con i reagenti, risciacquare immediatamente la pelle con acqua corrente!
- ✓ Non mettere in bocca le pipette per le soluzioni!
- ✓ Smaltire i reagenti in base alle disposizioni locali!
- ✓ seguenti frasi di rischio e di sicurezza sono applicabili al componente 1 (Pretreatment Solution) contenente EDTA: R22 Dannoso per ingestione!
- ✓ La scheda di sicurezza è disponibile su richiesta per l'utilizzatore professionista!

## 3. Il kit *ZytoDot Pretreatment Kit*

Il kit è costituito dai seguenti componenti:

Codice	Componenti	Quantità	Contenitori
1	Pretreatment Solution	1000 ml	Bottiglia con tappo a vite
2	Pepsin Solution	8 ml	Bottiglietta contagocce con tappo bianco
	Istruzioni	1	

Il componente 1 è sufficiente per 12 staining jars da 80 ml. Il componente 2 è sufficiente per circa 50 reazioni

#### 4. Conservazione e validità

I componenti del kit [ZytoDot Pretreatment Kit](#) devono essere conservati a 2-8°C. Osservando tali condizioni di conservazione, è possibile utilizzare il kit [ZytoDot Pretreatment Kit](#) almeno fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta.

#### 5. Campioni

Il kit [ZytoDot Pretreatment Kit](#) è stato ottimizzato per l'utilizzo su cellule e tessuti fissati in formalina ed inclusi in paraffina. Si consiglia di preparare il tessuto nel modo seguente:

- ✓ Fissazione in formalina neutra tamponata al 10% per 24 ore a RT  
*Per ottenere una fissazione ed un'inclusione in paraffina ottimali ed uniformi, la grandezza del campione non deve essere superiore a 0,5 cm<sup>3</sup>.*
- ✓ Procedimento standard e inclusione in paraffina  
*Utilizzare paraffina di alta qualità. L'infiltrazione e l'inclusione devono avvenire ad una temperatura inferiore a 65°C*
- ✓ Preparare sezioni con spessore di 2-5 µm  
*Utilizzare vetrini rivestiti di silano oppure altre sostanze (ad esempio HistoBond®), fissare per 2-16 ore a 50°C-60°C.*

#### 6. Pretrattamento

- 1.** Incubare per 10 min a 70°C (es. su piastra riscaldante)
- 2.** Incubare i vetrini 2 x 5 min in xilolo
- 3.** Incubare 3 x 3 min in 100% etanolo
- 4.** Lavare 3 x 2 min in acqua deionizzata o distillata
- 5.** Riscaldare la Pretreatment Solution (**1**) immergendo lo staining jar in acqua bollente fino a raggiungere almeno 95°C
- 6.** Immergere i vetrini nella Pretreatment Solution (**1**) e incubare per 15 min
- 7.** Trasferire immediatamente i vetrini in acqua distillate o deionizzata e lavare 3 volte x 2 minuti
- 8.** Portare la Pepsin Solution (**2**) a temperatura ambiente prima dell'uso

**9.** Applicare (a gocce) la Pepsin Solution (**2**) sulla sezione asciutta e incubare per 10 minuti a RT in cameretta umida

*Il tempo d'incubazione dipende dal tipo di campione, dallo spessore della sezione e dal relativo tempo di fissazione. Come valore indicativo, si può considerare un'incubazione di 10-30 min. per campioni di tessuto e 5-10 min. per campioni di cellule. In generale, si consiglia di determinare il tempo di proteolisi ottimale eseguendo un test preventivo.*

**10.** Lavare 3x 2 min in acqua deionizzata o distillata

**11.** Disidratare in: 70%, 85%, 95% e 2x 100% etanolo ciascuno per 2 min

Asciugare all'aria.

**12.** Procedere con il protocollo CISH: applicazione della sonda, ibridazione e rilevazione

## **7. Risultati**

Utilizzando apposite sonde su specifiche cellule è possibile ottenere segnali positivi (es. 2 segnali puntiformi di HER2 in nuclei di cellule normali).

Segnali deboli o assenti in cellule non controcolorate possono essere dovuti ad un eccesso di digestione enzimatica con la Pepsin Solution (perdita dell'architettura nucleare e della struttura cromosomica). Segnali deboli o assenti in cellule ben controcolorate possono essere dovuti ad un'insufficiente digestione enzimatica.

I risultati finali sono inoltre fortemente influenzati dai passaggi successivi: denaturazione della sonda, ibridazione, lavaggi e rivelazione. Per risultati ottimali si raccomanda l'utilizzo dei sistemi di ibridazione *ZytoDot* forniti dalla ZytoVision.

**I nostri esperti sono a disposizione per rispondere alle Vostre domande.**

### **Bibliografia:**

Ezaki T. (1996) Kaibogaku Zasshi 71: 615-28.

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

Wilkinson D.G. (1992) Oxford University Press; ISBN 0 19 963327 4

### **Marchi di fabbrica:**

ZytoVision® e ZytoDot® sono marchi degli ZytoVision GmbH.

*20 Gennaio 2006 (1.2)*