



ZytoFast PLUS

CISH Implementation Kit HRP-DAB

REF T-1063-40

Σ 40

Για χρήση σε διαδραστικές χρωμογόνους *in situ*
υβριδισμού (CISH)

4250380N567Z



In vitro διαγνωστικό ιατροτεχνολογικό προϊόν

σύμφωνα με τον Κανονισμό IVDR (κανονισμό για τα in vitro
διαγνωστικά ιατροτεχνολογικά προϊόντα) (ΕΕ) 2017/746

1. Προβλεπόμενη χρήση

Το **ZytoFast PLUS CISH Implementation Kit HRP-DAB** προορίζεται για χρήση σε συνδυασμό με επισημασμένους με διγοξιγενίνη ανιχνευτές **ZytoFast** σε σταθεροποιημένα με φορμαλίνη και ενσωματωμένα σε παραφίνη δείγματα μέσω χρωμογόνου *in situ* υβριδισμού (CISH).

Το προϊόν προορίζεται μόνο για επαγγελματική χρήση. Όλες οι δοκιμές που χρησιμοποιούν το προϊόν πρέπει να εκτελούνται σε πιστοποιημένο, αδειοδοτημένο εργαστήριο παθολογικής ανατομικής από εξειδικευμένο προσωπικό, υπό την επίβλεψη παθολογοανατόμου/γενετιστή.

2. Αρχή της δοκιμής

Η τεχνική χρωμογόνου *in situ* υβριδισμού (CISH) επιτρέπει την ανίχνευση και την οπτικοποίηση συγκεκριμένων αλληλουχιών νουκλεϊκών οξέων σε κυτταρικά παρασκευάσματα. Θραύσματα νουκλεοτιδίων επισημασμένα με απτένιο, οι λεγόμενοι ανιχνευτές CISH (χρωμογόνου *in situ* υβριδισμού), και οι συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στόχου στα παρασκευάσματα συν-μετουσιώνονται και στη συνέχεια αφήνονται να ανόπτονται κατά τη διάρκεια του υβριδισμού. Κατόπιν, τα μη ειδικά και μη δεσμευμένα θραύσματα ανιχνευτή αφαιρούνται με αυστηρά βήματα πλύσης. Ο σχηματισμός διπλής όψης του επισημασμένου ανιχνευτή μπορεί να οπτικοποιηθεί, χρησιμοποιώντας πρωτεύοντα (μη μαρκαρισμένα) αντισώματα, τα οποία ανιχνεύονται από δευτερογενή πολυμερισμένα συζευγμένα με ένζυμα αντισώματα. Η ενζυματική αντίδραση με χρωμογόνα υποστρώματα οδηγεί στη συνέχεια στον σχηματισμό έγχρωμων ιζημάτων. Μετά την αντιχρώση του πυρήνα με μια πυρηνική χρωστική, τα υβριδισμένα θραύσματα ανιχνευτή οπτικοποιούνται με μικροσκοπία φωτός.

3. Παρεχόμενα αντιδραστήρια

Το **ZytoFast PLUS CISH Implementation Kit HRP-DAB** διτίθεται σε ένα μέγεθος και αποτελείται από τα εξής:

Κωδικός	Συστατικό	Ποσότητα Σ 40	Δοχείο
PT2	Heat Pretreatment Solution EDTA	500 ml	Μπουκάλι με βιδωτό καπάκι (μεγάλο)
ES1	Pepsin Solution	4 ml	Σταγονομετρικό φιαλίδιο, λευκό πώμα
WB5	20x Wash Buffer TBS	4x 50 ml	Μπουκάλι με βιδωτό καπάκι
AB1	Mouse-Anti-Dig	4 ml	Σταγονομετρικό φιαλίδιο, ροζ πώμα
AB2	Anti-Mouse-HRP-Polymer	4 ml	Σταγονομετρικό φιαλίδιο, βιολέ πώμα
SB1a	DAB Solution A	0,3 ml	Σταγονομετρικό φιαλίδιο, πράσινο πώμα (μικρό)
SB1b	DAB Solution B	10 ml	Σταγονομετρικό φιαλίδιο, γκριζό πώμα
CS2	Nuclear Blue Solution	20 ml	Μπουκάλι με βιδωτό καπάκι, μαύρο
MT4	Mounting Solution (alcoholic)	4 ml	Γυάλινο μπουκάλι, καφέ
	Οδηγίες χρήσης	1	

T-1063-40 (40 τεστ): Τα συστατικά **ES1, AB1, AB2, SB1a-b, CS2**, και **MT4** επαρκούν για 40 αντιδράσεις. Το συστατικό **PT2** επαρκεί για 7 δοχεία χρώσης των 70 ml το καθένα. Το συστατικό **WB5** επαρκεί για 57 δοχεία χρώσης των 70 ml το καθένα.

4. Υλικά που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται

- Επισημασμένος με διγοξιγενίνη ανιχνευτής **ZytoFast** χρωμογόνου *in situ* υβριδισμού (CISH)
- Δείγματα θετικών και αρνητικών ιστών
- Πλακίδια μικροσκοπίου, θετικά φορτισμένα
- Υδατόλουτρο (55°C, 98°C)
- Υβριδιστής ή θερμαινόμενη πλάκα
- Υβριδιστής ή θάλαμος υγρασίας σε φούρνο υβριδισμού
- Ρυθμιζόμενες βαθμονομημένες πιπέτες (10 μl, 1000 μl)
- Δοχεία ή λουτρά χρώσης
- Χρονόμετρο
- Βαθμονομημένο θερμόμετρο
- Αιθανόλη ή αλκοόλη αντιδραστήριου
- Ξυλένιο
- Μεθανόλη 100%
- Υπεροξειδιο του υδρογόνου (H₂O₂) 30%
- Απιονισμένο ή απεσταγμένο νερό
- Καλυπτρίδες (22 mm x 22 mm, 24 mm x 32 mm)
- Ελαστικό τσιμεντοειδές, π.χ., **Fixogum Rubber Cement** (Αρ. Προϊόντος E-4005-50/-125) ή παρόμοιο
- Επαρκώς συντηρημένο μικροσκοπίο φωτός (100-200x)

5. Αποθήκευση και χειρισμός

Φυλάσσεται στους 2-8 °C σε όρθια θέση. Επαναφέρετε στις συνθήκες αποθήκευσης αμέσως μετά τη χρήση. Μη χρησιμοποιείτε αντιδραστήρια μετά την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στην ετικέτα. Το προϊόν είναι σταθερό μέχρι την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στην ετικέτα, εφόσον γίνεται ανάλογος χειρισμός.

6. Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις

- Διαβάστε τις οδηγίες χρήσης πριν από τη χρήση!
- Μη χρησιμοποιείτε τα αντιδραστήρια μετά την ημερομηνία λήξης!
- Αυτό το προϊόν περιέχει ουσίες (σε χαμηλές συγκεντρώσεις και όγκους) που είναι επιβλαβείς για την υγεία. Αποφύγετε οποιαδήποτε άμεση επαφή με τα αντιδραστήρια. Λάβετε κατάλληλα προστατευτικά μέτρα (χρησιμοποιήστε γάντια μίας χρήσης, προστατευτικά γυαλιά και ρούχα εργαστηρίου)!

- Αναφέρετε κάθε σοβαρό περιστατικό που έχει συμβεί σχετικά με το προϊόν στον κατασκευαστή και την αρμόδια αρχή σύμφωνα με τους τοπικούς κανονισμούς!
- Εάν τα αντιδραστήρια έρθουν σε επαφή με το δέρμα, ξεπλύνετε αμέσως το δέρμα με άφθονο ποσό νερού!
- Κατόπιν αιτήματος διατίθεται για τον επαγγελματία χρήστη ένα δελτίο δεδομένων ασφαλείας υλικού.
- Μην επαναχρησιμοποιείτε αντιδραστήρια, εκτός εάν η επαναχρησιμοποίηση επιτρέπεται ρητά!
- Αποφύγετε τη διασταυρούμενη μόλυνση των δειγμάτων, καθώς αυτό μπορεί να οδηγήσει σε λανθασμένα αποτελέσματα.
- Τα δείγματα δεν πρέπει να αφήνονται να στεγνώσουν κατά τη διάρκεια των βημάτων υβριδισμού και πλύσης.

Δηλώσεις επικινδυνότητας και προφύλαξης για τα AB1, AB2, PT2, και WB5:

Το συστατικό που προσδιορίζει τον κίνδυνο είναι μια μάζα αντίδρασης των εξής: 5-χλωρο-2-μεθυλο-4-ισοθειαζολίνη-3-όνη [ΕΚ αρ. 247-500-7] και 2-μεθυλο-2H-ισοθειαζόλ-3-όνη [ΕΚ αρ. 220-239-6] (3:1).



Προειδοποίηση

- H317 Μπορεί να προκαλέσει αλλεργική δερματική αντίδραση.
- P261 Αποφύγετε να αναπνέετε σκόνη/αναθυμιάσεις/αέρι α/σταγονίδια/ατμούς/εκνεφώματα.
- P272 Τα μολυσμένα ενδύματα εργασίας δεν πρέπει να βγαίνουν από τον χώρο εργασίας.
- P280 Φοράτε προστατευτικά γάντια/προστατευτικά ενδύματα/μέσα προστασίας ματιών/προσώπου.
- P302+P352 ΣΕ ΠΕΡΙ ΠΤΩΣΗ ΕΠΑΦΗΣ ΜΕ ΤΟ ΔΕΡΜΑ: Πλύνετε με άφθονο νερό.
- P333+P313 Εάν παρατηρηθεί ερεθισμός του δέρματος ή εμφανιστεί εξάνθημα: Λάβετε ιατρική συμβουλή/προσοχή.
- P362+P364 Βγάλτε τα μολυσμένα ρούχα και πλύνετε τα πριν τα επαναχρησιμοποιήσετε.

Δηλώσεις επικινδυνότητας και προφύλαξης για το CS2:

Το συστατικό που προσδιορίζει τον κίνδυνο είναι η αιθανοδιόλη και η αιθυλενογλυκόλη.



Προειδοποίηση

- H373 Μπορεί να προκαλέσει βλάβη στα νεφρά λόγω παρατεταμένης ή επανειλημμένης έκθεσης σε περίπτωση κατάποσης.
- P260 Μην αναπνέετε σκόνη/αναθυμιάσεις/αέρι α/αιθάλη/ατμούς/σπρέυ.
- P314 Συμβουλευθείτε/επισκεφθείτε γιατρό, εάν αισθανθείτε αδιαθεσία.

Δηλώσεις επικινδυνότητας και προφύλαξης για το MT4:

Το συστατικό που προσδιορίζει τον κίνδυνο είναι το ξυλένιο.



Προειδοποίηση

- H226 Υγρό και ατμοί πολύ εύφλεκτα.
- H312+H332 Επιβλαβές σε επαφή με το δέρμα ή σε περίπτωση εισπνοής.
- H315 Προκαλεί ερεθισμό του δέρματος.
- H319 Προκαλεί σοβαρό οφθαλμικό ερεθισμό.
- H335 Μπορεί να προκαλέσει ερεθισμό της αναπνευστικής οδού.
- H373 Μπορεί να προκαλέσει βλάβη στα όργανα λόγω παρατεταμένης ή επανειλημμένης έκθεσης.
- P210 Μακριά από θερμότητα, θερμές επιφάνειες, σπινθήρες, γυμνές φλόγες και άλλες πηγές ανάφλεξης. Μην καπνίζετε.
- P260 Μην αναπνέετε σκόνη/αναθυμιάσεις/αέρι α/αιθάλη/ατμούς/σπρέυ.
- P280 Φοράτε προστατευτικά γάντια/προστατευτικά ενδύματα/μέσα προστασίας ματιών/προσώπου.
- P305+P351+P338 ΣΕ ΠΕΡΙ ΠΤΩΣΗ ΕΠΑΦΗΣ ΜΕ ΤΑ ΜΑΤΙΑ: Ξεπλύνετε προσεκτικά με νερό για αρκετά λεπτά. Αφαιρέστε τους φακούς επαφής, εάν υπάρχουν και είναι εύκολο να το κάνετε. Συνεχίστε το ξέπλυμα.
- P337+P313 Εάν ο ερεθισμός των ματιών επιμένει: Λάβετε ιατρική συμβουλή/προσοχή.
- P403+P235 Αποθηκεύεται σε καλά αεριζόμενο χώρο. Διατηρείται δροσερό.
- EUH208 Περιέχει 2-μεθυλοπροπ-2-ενοϊκό μεθυλεστέρα, 2-μεθυλοπροπ-2-ενοϊκό μεθυλεστέρα, μεθακρυλικό μεθυλεστέρα. Μπορεί να προκαλέσει αλλεργική αντίδραση.

Δηλώσεις επικινδυνότητας και προφύλαξης για το SB1α:

Το συστατικό που καθορίζει τον κίνδυνο είναι η διφαινυλο-3,3'-4,4'-τετραυλοτετραμίνη διαιμινοβενζιλίνη.



Κίνδυνος

- H350 Μπορεί να προκαλέσει καρκίνο.
- P201 Εφοδιαστείτε με τις ειδικές οδηγίες πριν από τη χρήση.
- P202 Μην το χειρίζεστε, έως ότου διαβάσετε και κατανοήσετε όλες τις προφυλάξεις ασφαλείας.
- P280 Φοράτε προστατευτικά γάντια/προστατευτικά ενδύματα/μέσα προστασίας ματιών/προσώπου.
- P308+P313 Σε περίπτωση έκθεσης ή ανησυχίας: Λάβετε ιατρική συμβουλή/προσοχή.
- P405 Φυλάσσεται κλειδωμένο.

Δηλώσεις επικινδυνότητας και προφύλαξης για το SB1b:

Το συστατικό που προσδιορίζει τον κίνδυνο είναι το ιμιδαζόλιο, μια μάζα αντίδρασης των: 5-χλωρο-2-μεθυλο-4-ισοθειαζολίνη-3-όνη [ΕΚ αρ. 247-500-7] και 2-μεθυλο-2H-ισοθειαζόλ-3-όνη [ΕΚ αρ. 220-239-6] (3:1).

**Κίνδυνος**

H317	Μπορεί να προκαλέσει αλλεργική δερματική αντίδραση.
H360D	Μπορεί να βλάψει το έμβρυο.
P201	Εφοδιαστείτε με τις ειδικές οδηγίες πριν από τη χρήση.
P261	Αποφεύγετε να αναπνέετε σκόνη/αναθυμιάσεις/αέρι α/σταγονίδια/ατμούς/εκνεφώματα.
P280	Φοράτε προστατευτικά γάντια/προστατευτικά ενδύματα/μέσα προστασίας ματιών/προσώπου.
P302+P352	ΣΕ ΠΕΡΙ ΠΤΩΣΗΣ ΕΠΑΦΗΣ ΜΕ ΤΟ ΔΕΡΜΑ: Πλύνετε με άφθονο νερό.
P308+P313	Σε περίπτωση έκθεσης ή ανησυχίας: Λάβετε ιατρική συμβουλή/προσοχή.
P362+P364	Βγάλτε τα μολυσμένα ρούχα και πλύνετε τα πριν τα επαναχρησιμοποιήσετε.

Ειδική επίσήμανση του ES1:

EUH208	Περιέχει πεψίνη Α. Μπορεί να προκαλέσει αλλεργική αντίδραση.
EUH210	Δελτίο δεδομένων ασφαλείας παρέχεται εφόσον ζητηθεί.

7. Περιορισμοί

- Για *in vitro* διαγνωστική χρήση.
- Μόνο για επαγγελματική χρήση.
- Μόνο για μη αυτοματοποιημένη χρήση.
- Η κλινική ερμηνεία οποιασδήποτε θετικής χρώσης ή απουσίας της πρέπει να γίνεται στο πλαίσιο του κλινικού ιστορικού, της μορφολογίας, άλλων ιστοπαθολογικών κριτηρίων καθώς και άλλων διαγνωστικών εξετάσεων. Είναι ευθύνη ενός ειδικευμένου παθολογοανατόμου/γενετιστή να είναι εξοικειωμένος με τους ανιχνευτές υβριδισμού *in situ* (ISH), τα αντιδραστήρια, τα διαγνωστικά πάνελ και τις μεθόδους που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή του χρωματισμένου παρασκευάσματος. Η χρώση πρέπει να πραγματοποιείται σε πιστοποιημένο, αδειοδοτημένο εργαστήριο υπό την επίβλεψη παθολογοανατόμου/γενετιστή που είναι υπεύθυνος για την επισκόπηση των χρωματισμένων πλακιδίων και τη διασφάλιση της επάρκειας των θετικών και αρνητικών μαρτύρων.
- Η χρώση του δείγματος, ειδικότερα η ένταση του σήματος και η χρώση του υποβάθρου, εξαρτώνται από τον χειρισμό και την επεξεργασία του δείγματος πριν από τη χρώση. Η ακατάλληλη στερέωση, ψύξη, απόψυξη, το πλύσιμο, στέγνωμα, η θέρμανση, τμήση ή μόλυνση με άλλα δείγματα ή υγρά μπορεί να προκαλέσουν τεχνουργήματα ή ψευδή αποτελέσματα. Ασυμπτωτικά αποτελέσματα μπορεί να προκύψουν από διακυμάνσεις στις μεθόδους στερέωσης και ενσωμάτωσης, καθώς και από εγγενείς ανωμαλίες εντός του δείγματος.

- Η απόδοση επικυρώθηκε, χρησιμοποιώντας τις διαδικασίες που περιγράφονται στις οδηγίες χρήσης του αντίστοιχου ανιχνευτή και κιτ εφαρμογής ZytoVision. Τροποποιήσεις σε αυτές τις διαδικασίες ενδέχεται να αλλάξουν την απόδοση και πρέπει να επικυρωθούν από τον χρήστη. Αυτό το IVD (*in vitro* διαγνωστικό) προϊόν είναι πιστοποιημένο ως CE, μόνον όταν χρησιμοποιείται όπως περιγράφεται σε αυτές τις οδηγίες χρήσης εντός του πεδίου της προβλεπόμενης χρήσης.

8. Παρεμβάλλουσες ουσίες

Τα ακόλουθα σταθεροποιητικά δεν είναι συμβατά με το ISH (*in situ* υβριδισμό):

- Σταθεροποιητικό Bouin
- B5 σταθεροποιητικό
- Όξινα σταθεροποιητικά (π.χ. πικρικό οξύ)
- Σταθεροποιητικό Zenker
- Αλκοόλες (όταν χρησιμοποιούνται μόνες τους)
- Χλωριούχος υδράργυρος
- Σταθεροποιητικό φορμαλδεϋδης/ψευδαργύρου
- Σταθεροποιητικό Hollande
- Μη ρυθμισμένη φορμαλίνη

9. Προετοιμασία δειγμάτων

Συστάσεις:

- Αποφύγετε τη διασταυρούμενη μόλυνση των δειγμάτων, καθώς αυτό μπορεί να οδηγήσει σε λανθασμένα αποτελέσματα.
- Σταθεροποίηση σε 10% ουδέτερα ρυθμισμένη φορμαλίνη για 24 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου (18-25°C).
- Μέγεθος δείγματος $\leq 0,5 \text{ cm}^3$.
- Χρησιμοποιήστε παραφίνη εξαιρετικής ποιότητας.
- Η ενσωμάτωση πρέπει να πραγματοποιείται σε θερμοκρασίες χαμηλότερες από 65°C.
- Προετοιμάστε τομές μικροτόμου 3-5 μm .
- Χρησιμοποιήστε θετικά φορτισμένα πλακίδια μικροσκοπίου.
- Σταθεροποιήστε τα αποκόμματα ιστών για 2-16 ώρες στους 50-60°C.

10. Προπαρασκευαστική επεξεργασία της συσκευής

Το 20x Wash Buffer TBS (WB5) πρέπει να προετοιμάζεται σύμφωνα με τις οδηγίες στο κεφάλαιο 11. "Διαδικασία ανάλυσης". Όλα τα άλλα αντιδραστήρια του κιτ είναι έτοιμα για χρήση. Δεν απαιτείται ανασύσταση, ανάμειξη ή αραιώση.

11. Διαδικασία ανάλυσης**Προπαρασκευαστικά βήματα**

- (1) *(Προαίρετη)* Προετοιμάστε μια σειρά με αιθανόλη (διαλύματα αιθανόλης 70%, 90% και 100%). Αραιώστε 100% αιθανόλη με απιονισμένο ή αποσταγμένο νερό. Τα διαλύματα αυτά μπορούν να αποθηκευτούν στους κατ'αλληλους περιέκτες και να επαναχρησιμοποιηθούν.
- (2) Heat Pretreatment Solution EDTA (PT2): Θερμάνετε σε θερμοκρασία έως 98°C σε καλυμμένο δοχείο χρώσης.
- (3) Προετοιμάστε ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης 1x Wash Buffer TBS: Αραιώστε 1 μέρος 20x Wash Buffer TBS (WB5) σε 19 μέρη απιονισμένο ή αποσταγμένο νερό.

Το αραιωμένο ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης 1x Wash Buffer TBS είναι σταθερό για μία εβδομάδα όταν αποθηκεύεται στους 2-8°C.

- (4) Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης 1x Wash Buffer TBS: Για έκπλυση με αυστηρά βήματα, θερμάνετε σε θερμοκρασία έως και 55°C σε καλυμμένο δοχείο χρώσης.
- (5) Ανιχνευτής χρωμογόνου *in situ* υβριδισμού (CISH) ZytoFast: Πριν από τη χρήση, φέρτε τον ανιχνευτή σε θερμοκρασία υβριδισμού και αναμείξτε καλά.
- (6) Προετοιμάστε το 3% H_2O_2 : Αραιώστε 1 μέρος 30% H_2O_2 σε 9 μέρη μεθανόλης 100%.

- (7) Mouse-Anti-DIG (AB1), Anti-Mouse-HRP-Polymer (AB2), DAB Solution A (SB1a), DAB Solution B (SB1b), Nuclear Blue Solution (CS2), Mounting Solution (alcoholic) (MT4): Πριν από τη χρήση, φέρτε το σε θερμοκρασία δωματίου (18°C-25°C).

Προεπεξεργασία (αποκλήρωση/πρωτεόλυση)

- (1) Επώστε τα πλακίδια για 10 λεπτά στους 70°C (π.χ. επάνω σε μια καυτή πλάκα).
- (2) Επώστε τα πλακίδια 2 φορές από 5 λεπτά μέσα σε ξυλένιο.
- (3) Επώστε τα πλακίδια 3 φορές από 3 λεπτά σε αιθανόλη 100%.
- (4) Επώστε τα πλακίδια για 5 λεπτά σε 3% H₂O₂.
- (5) Πλύνετε τα πλακίδια 2 φορές από 1 λεπτό σε απιονισμένο ή αποσταγμένο νερό σε θερμοκρασία δωματίου.
- (6) Εφαρμόστε (στάγδην) Pepsin Solution (ES1) στο δείγμα και επώστε για 10-30 λεπτά στους 37°C σε θάλαμο υγρασίας.

Το **ES1** ενδέχεται να σχηματίσει ιζήματα, τα οποία, ωστόσο, δεν επηρεάζουν την ποιότητα.

Ως γενικό κανόνα, συνιστούμε να εξακριβώνεται ο βέλτιστος χρόνος για απρωτεόλυση σε προδοκίμες.

- (7) Βυθίστε τα πλακίδια σε απιονισμένο ή αποσταγμένο νερό σε θερμοκρασία δωματίου.
- (8) Επώστε για 15 λεπτά σε προθερμασμένο Heat Pretreatment Solution EDTA (PT2) στους 98°C.

Χρησιμοποιείτε οκτώ πλακίδια ανά δοχείο χρώσης (προσθέστε ομοίωμα πλακιδίων εάν χρειαστεί).

- (9) Βυθίστε τα πλακίδια σε απιονισμένο ή αποσταγμένο νερό σε θερμοκρασία δωματίου.
- (10) (Προαιρετικά) Αφυδάτωση σε: αιθανόλη 70%, 90% και 100%, έκαστο για 1 λεπτό.
- (11) Στεγνώστε τα μέρη με στεγνό αέρα.

Σημείωση: Βεβαιωθείτε ότι στεγνώσατε πλήρως τα μέρη προτού χρησιμοποιήσετε τον ανιχνευτή.

Μετουσίωση και υβριδισμός

- (1) Μεταφέρετε με πιπέτα 10 μl περιεχομένου του ανιχνευτή ZytoFast CISH σε κάθε προεπεξεργασμένο δείγμα.
- (2) Καλύψτε τα δείγματα με καλυπτρίδα 22 mm x 22 mm (αποφύγετε τις παγιδευμένες φυσαλίδες) και σφραγίστε την καλυπτρίδα.

Συνιστούμε τη χρήση ελαστικού τσιμεντοειδούς (π.χ. Fixogum) για τη σφράγιση.

- (3) Τοποθετήστε τα πλακίδια σε καυτή πλάκα ή υβριδιστή και μετουσίωση τα δείγματα για 5 λεπτά στους 75°C.
- (4) Μεταφέρετε τα πλακίδια σε θάλαμο υγρασίας και υβριδοποιήστε (π.χ. σε φούρνο υβριδισμού) για 1 ώρα στους 37°C για ανιχνευτές με στόχο το DNA* ή στους 55°C για ανιχνευτές με στόχο το RNA*.

*Παρακαλούμε ανατρέξτε στις οδηγίες χρήσης του αντίστοιχου ανιχνευτή. Είναι σημαντικό τα δείγματα να μη στεγνώνουν κατά τη διάρκεια του υβριδισμού.

Μετα-υβριδισμός και ανιχνευση

- (1) Αφαιρέστε προσεκτικά το ελαστικό τσιμεντοειδές ή την κόλλα.
- (2) Αφαιρέστε την καλυπτρίδα βυθίζοντας τα πλακίδια σε 1x Wash Buffer TBS σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.
- (3) Πλύνετε τα πλακίδια για 5 λεπτά σε 1x Wash Buffer TBS στους 55°C.

Χρησιμοποιείτε οκτώ πλακίδια ανά δοχείο χρώσης (προσθέστε ομοίωμα πλακιδίων εάν χρειαστεί).

- (4) Πλύνετε τα πλακίδια για 5 λεπτά σε 1x Wash Buffer TBS σε θερμοκρασία δωματίου.
- (5) Εφαρμόστε Mouse-Anti-DIG (AB1) (1-2 σταγόνες ανά πλακίδιο) στα πλακίδια και επώστε για 30 λεπτά στους 37°C σε θάλαμο υγρασίας.
- (6) Πλύνετε τα πλακίδια 3 φορές από 1 λεπτό σε 1x Wash Buffer TBS σε θερμοκρασία δωματίου.
- (7) Εφαρμόστε Anti-Mouse-HRP-Polymer (AB2) (1-2 σταγόνες ανά πλακίδιο) στα πλακίδια και επώστε για 30 λεπτά στους 37°C σε θάλαμο υγρασίας.
- (8) Πλύνετε τα πλακίδια 3 φορές από 1 λεπτό σε 1x Wash Buffer TBS σε θερμοκρασία δωματίου.

- (9) Προετοιμάστε το διάλυμα διαιμινοβενζιδίνης (DAB) (διάλυμα εργασίας): συμπληρώστε 1 ml DAB Solution B (SB1b) σε μία βαθμονομημένη κούπα και προσθέστε μία σταγόνα (30 μl) DAB Solution A (SB1a). Ανακατέψτε καλά.
- (10) Εφαρμόστε διάλυμα διαιμινοβενζιδίνης (DAB) (1-2 σταγόνες ανά πλακίδιο) στα πλακίδια και επώστε για 20 λεπτά στους 37°C σε θάλαμο υγρασίας.
- (11) Πλύνετε τα πλακίδια 3 φορές από 1 λεπτό σε απιονισμένο ή αποσταγμένο νερό σε θερμοκρασία δωματίου.
- (12) Εφαρμόστε αντιχρώση στα δείγματα για 2 έως 5 λεπτά με το Nuclear Blue Solution (CS2).
- (13) Μεταφέρετε τα πλακίδια σε ένα δοχείο χρώσης και ξεπλύνετε τα για 2 λεπτά κάτω από τρεχούμενο κρύο νερό βρύσης.
- (14) Αφυδατώστε 3 φορές από 30 δευτερόλεπτα σε αιθανόλη 100% (να χρησιμοποιείτε μόνο εξαιρετικά καθαρή αιθανόλη).
- (15) Επώστε τα πλακίδια για 2 φορές από 30 δευτερόλεπτα μέσα σε ξυλένιο (να χρησιμοποιείτε μόνο εξαιρετικά καθαρό ξυλένιο).
- (16) Στεγνώστε για περίπου 2 λεπτά.
- (17) Αποφύγετε τυχόν παγιδευμένες φυσαλίδες, καλύψτε τα δείγματα με μια καλυπτρίδα (22 mm x 22 mm, 24 mm x 32 mm) χρησιμοποιώντας το Mounting Solution (alcoholic) (MT4). Περιμένετε περίπου 20 με 30 λεπτά ώπου να ακινητοποιηθεί η καλυπτρίδα.

Με τη χρήση ενός στόμιου πιπέτας που έχει κοπεί για να αυξηθεί το μέγεθος του ανοίγματος μπορεί να διευκολυνθεί η διادिकासίας της πιπέτας.

- (18) Αξιολογήστε τη χρώση των δειγμάτων χρησιμοποιώντας μικροσκόπιο φωτός.

12. Ερμηνεία αποτελεσμάτων

Χρησιμοποιώντας το ZytoFast PLUS CISH Implementation Kit HRP-DAB, τα επισημασμένα με διγοξιγενίνη ολιγονουκλεοτίδια εμφανίζονται ως ιζήματα χρώματος καφέ. Η εφαρμογή αντιχρώσης στα δείγματα με το κυανό διάλυμα πυρηνικής χρώσης (**CS2**) θα έχει ως αποτέλεσμα τη χρώση του πυρήνα με ανοιχτό βιολέ-μπλε χρώμα.

Ανάλογα με τον ανιχνευτή ZytoFast που χρησιμοποιείται, μια θετική αντιδραστικότητα στα κύτταρα στόχους μπορεί να βρεθεί είτε εντός του κυτοπλάσματος είτε εντός του πυρήνα, αντίστοιχα. Για μια πιο λεπτομερή περιγραφή των αναμενόμενων μοτίβων σημάτων, παρακαλούμε ανατρέξτε στις συνοδευτικές οδηγίες χρήσης του ανιχνευτή ZytoFast.

13. Συνιστώμενες διαιδικασίες ποιτικού ελέγχου

Ανατρέξτε στις οδηγίες χρήσης του αντίστοιχου ανιχνευτή ZytoVision.

14. Χαρακτηριστικά απόδοσης

Ανατρέξτε στις οδηγίες χρήσης του αντίστοιχου ανιχνευτή ZytoVision.

15. Απόρριψη

Η απόρριψη των αντιδραστηρίων πρέπει να πραγματοποιείται σύμφωνα με τους τοπικούς κανονισμούς.

16. Αντιμετώπιση προβλημάτων

Οποιαδήποτε απόκλιση από τις οδηγίες λειτουργίας μπορεί να οδηγήσει σε κατώτερα αποτελέσματα χρώσης ή σε καθόλου χρώση. Για περισσότερες πληροφορίες, ανατρέξτε στη διεύθυνση www.zytovision.com.

Αδύναμα σήματα ή καθόλου σήματα

Πιθανή αιτία	Ενέργεια
Η πρωτεολυτική προεπεξεργασία δεν πραγματοποιήθηκε σωστά	Βελτιστοποιήστε τον χρόνο επώσης της πεψίνης, αυξήστε ή μειώστε εάν είναι απαραίτητο

Εξάτμιση ανιχνευτή	Όταν χρησιμοποιείτε υβριδιστή, είναι υποχρεωτική η χρήση των υγρών λωρίδων/γεμάτων με νερό δεξαμενών. Όταν χρησιμοποιείτε φούρνο υβριδισμού, απαιτείται η χρήση ενός θαλάμου υγρασίας. Επιπλέον, η καλυπτρίδα θα πρέπει να σφραγίζεται πλήρως, π.χ. με Fixogum, για να αποφευχθεί η ξήρανση του δείγματος κατά τον υβριδισμό.
Ανεπαρκής προετοιμασία χρωμογόνου υποστρώματος	Αντί να προετοιμάσετε τα έγχρωμα υποστρώματα με στάξιμο, χρησιμοποιήστε μια πιπέτα
Ο χρόνος αντίχρωσης είναι πολύ μεγάλος	Αποφύγετε τη σκούρα αντίχρωση, γιατί μπορεί να κρύψει τα θετικά σήματα χρώσης
Η κυάνωση της αντίχρωσης δεν έγινε σωστά	Χρησιμοποιήστε κρύο τρεχούμενο νερό βρύσης για κυάνωση· μη χρησιμοποιείτε ζεστό ή καυτό νερό ή αντιδραστήρια κυάνωσης

Τα σήματα εξασθενούν ή συγχωεύονται

Πιθανή αιτία	Ενέργεια
Έχει χρησιμοποιηθεί ακατάλληλο διάλυμα στερέωσης	Χρησιμοποιείτε μόνον το διάλυμα στερέωσης που παρέχεται με το κιτ ή συνιστάται από τις οδηγίες χρήσης. Χρησιμοποιήστε διλύματα χωρίς ακαθαρσίες· μη χρησιμοποιείτε ταινία καλυπτρίδας

Ανώμαλη ή σε ορισμένα σημεία πολύ ελαφριά χρώση

Πιθανή αιτία	Ενέργεια
Ατελής αποκλήρωση	Χρησιμοποιήστε φρέσκα διλύματα· ελέγξτε τη διάρκεια των χρόνων αποκλήρωσης
Ο όγκος του αντιδραστήριου είναι πολύ μικρός	Βεβαιωθείτε ότι ο όγκος του αντιδραστήριου είναι αρκετά μεγάλος, ώστε να καλύπτει την περιοχή του ιστού

Ασυνεπή αποτελέσματα

Πιθανή αιτία	Ενέργεια
Ανεπαρκές στέγνωμα πριν από την εφαρμογή του ανιχνευτή	Επεκτείνετε το στέγνωμα στον αέρα
Πάρα πολύ νερό/ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης στον ιστό πριν από την εφαρμογή πεψίνης, αντισωμάτων ή/και χρωματικών υποστρωμάτων	Βεβαιωθείτε ότι η περίσσεια του υγρού έχει αφαιρεθεί από το τμήμα του ιστού με στύψιμο ή τσίναγμα από το πλακίδιο. Μερικές ποσότητες υπολείπονται νερού/ρυθμιστικού διαλύματος δεν παρεμβαίνουν στη δοκιμή
Παραλλαγές στις μεθόδους στερέωσης και ενσωμάτωσης ιστών	Βελτιστοποιήστε τις μεθόδους στερέωσης και ενσωμάτωσης
Διακυμάνσεις στο πάχος τομής ιστού	Βελτιστοποίηση τομής

Υποβαθμισμένη μορφολογία

Πιθανή αιτία	Ενέργεια
Το δείγμα κυττάρου ή ιστού δεν έχει στερεωθεί σωστά	Βελτιστοποιήστε τον χρόνο στερέωσης και το σταθεροποιητικό

Η πρωτεολυτική προεπεξεργασία δεν πραγματοποιήθηκε σωστά	Βελτιστοποιήστε τον χρόνο επώασης της πεψίνης
--	---

Θορυβώδες υπόβαθρο

Πιθανή αιτία	Ενέργεια
Τα τμήματα στέγνωσαν· οποιονδήποτε στιγμή κατά τη διάρκεια ή μετά τον υβριδισμό	Αποφύγετε το στέγνωμα των τμημάτων· χρησιμοποιήστε θάλαμο υγρασίας· σφραγίστε σωστά την καλυπτρίδα
Παρατεταμένος χρόνος επώασης του υποστρώματος	Μειώστε τον χρόνο επώασης του υποστρώματος
Ατελής αποκλήρωση	Χρησιμοποιήστε φρέσκα διλύματα· ελέγξτε τη διάρκεια της αποκλήρωσης
Η πρωτεολυτική προεπεξεργασία δεν πραγματοποιήθηκε σωστά	Βελτιστοποιήστε τον χρόνο επώασης της πεψίνης
Τα πλακίδια ψύχονται σε θερμοκρασία δωματίου πριν από τον υβριδισμό	Μεταφέρετε τα πλακίδια γρήγορα σε θερμοκρασία υβριδισμού

Αλληλοεπι καλυπτόμενα σήματα

Πιθανή αιτία	Ενέργεια
Ακατάλληλο πάχος τομών ιστού	Προετοιμάστε τομές μικροτόμου 3-5 μm

Το δείγμα επιπλέει στο πλακίδιο

Πιθανή αιτία	Ενέργεια
Η πρωτεολυτική προεπεξεργασία είναι πολύ ισχυρή	Συντομεύστε τον χρόνο επώασης πεψίνης

17. Βιβλιογραφία

- Isola J, Tanner M (2004) *Methods Mol Med* 97: 133-44.
- Speel EJ, et al. (1994) *J Histochem Cytochem* 42: 1299-307.
- Tsukamoto T, et al. (1991) *Int J Dev Biol* 35: 25-32.
- Wilkinson DG: *In Situ Hybridization, A Practical Approach*, Oxford University Press (1992) ISBN 0 19 963327 4.

18. Αναθεώρηση



www.zytovision.com

Ανατρέξτε στη διεύθυνση www.zytovision.com για τις πιο πρόσφατες οδηγίες χρήσης καθώς και για οδηγίες χρήσης σε διάφορες γλώσσες.

Οι ειδικοί μας είναι πρόθυμοι να απαντήσουν στις ερωτήσεις σας.

Επικοινωνήστε στη διεύθυνση help@zytovision.com



ZytoVision GmbH
Fischkai 1
27572 Bremerhaven / Γερμανία
Τηλέφωνο: +49 471 4832-300
Φαξ: +49 471 4832-509
www.zytovision.com
E-Mail: info@zytovision.com

Εμπορικά σήματα:

Τα ZytoVision® και ZytoFast® είναι εμπορικά σήματα της ZytoVision GmbH.