



ZytoDot 2C CISH Implementation Kit

REF	C-3044-10	Σ	10
REF	C-3044-40	Σ	40

За използване при процедури за хромогенна *in situ*
хбридизация (CISH)

4250380N717V



Ин витро диагностично медицинско устройство
в съответствие с IVDR (ЕС) 2017/746

1. Предвидена употреба

ZytoDot 2C CISH Implementation Kit е предназначен да се използва в комбинация с маркирани с дигоксигенин/динитрофенил ZytoDot 2C CISH сонди върху фиксирани във формалин и вградени в парафин образци чрез хромогенна *in situ* хбридизация (CISH).

Продуктът е предназначен само за професионална употреба. Всички тестове, при които се използва продуктът, трябва да се извършват в сертифицирана, лицензирана патологоанатомична лаборатория, под наблюдението на патолог/ генетик квалифициран за съответната дейност.

2. Принцип на изпитване

Техниката на хромогенната *in situ* хбридизация (CISH) позволява откриването и визуализирането на специфични последователности от нуклеинови киселини в клетъчни препарати. Маркираните с хаптен нуклеотидни фрагменти, т.нар. сонди CISH, и техните комплементарни целеви последователности в препаратите се ко-денатурират и впоследствие се оставят да се отгряват по време на хбридизацията. След това неспецифичните и несвързани сондови фрагменти се отстраняват чрез стриктно измиване. Дуплексното образуване на маркираната сонда може да се визуализира с помощта на първични (немаркирани) антитела, които се откриват с вторични полимеризирани ензимно конюгирани антитела. Ензимната реакция с хромогенни субстрати впоследствие води до образуване на цветни утайки. След контраоцветяване на ядрото с ядрено багрило хбридизираните фрагменти на сондата се визуализират чрез светлинна микроскопия.

3. Предоставени реактиви

Комплекта ZytoDot 2C CISH Implementation Kit се предлага в два размера и се състои от:

код	Компонент	Количество		Количество
		40	10	
PT2	<u>Heat Pretreatment Solution EDTA</u>	500 ml	150 ml	Бутилка с винтова капачка (голяма)
ES1	<u>Pepsin Solution</u>	4 ml	1 ml	Бутилка с капкомер, бяла капачка
WB1	<u>Wash Buffer SSC</u>	560 ml	210 ml	Бутилка с винтова капачка (голяма)
WB5	<u>20x Wash Buffer TBS</u>	2x 50 ml	50 ml	Бутилка с винтова капачка
AB14	<u>Anti-DIG/DNP-Mix</u>	4 ml	1 ml	Бутилка с капкомер, жълта капачка
AB13	<u>HRP/AP-Polymer-Mix</u>	4 ml	1 ml	Бутилка с капкомер, синя шапка
SB6a	<u>AP-Red Solution A</u>	0.4 ml	0.1 ml	Бутилка с капкомер, червена капачка (малка)
SB6b	<u>AP-Red Solution B</u>	15 ml	4 ml	Бутилка с капкомер, червена капачка
SB7a	<u>HRP-Green Solution A</u>	0.8 ml	0.2 ml	Бутилка с капкомер, зелена капачка (малка)
SB7b	<u>HRP-Green Solution B</u>	15 ml	4 ml	Бутилка с капкомер, зелена капачка
CS2	<u>Nuclear Blue Solution</u>	20 ml	4 ml	Бутилка с винтова капачка, черен
MT4	<u>Mounting Solution (alcoholic)</u>	4 ml	1 ml	Бутилка с капкомер, кафяво
	AP-Red reaction vessel	2	1	Градуирана чаша, червен капак
	HRP-Green reaction vessel	2	1	Градуирана чаша, зелен капак
	Инструкции за употреба	1	1	

C-3044-10 (10 tests): Компонентите **ES1**, **AB14**, **AB13**, **SB6a-b**, **SB7a-b**, **CS2**, и **MT4** са достатъчни за 40 реакции. Компонентът **PT2** е достатъчен за 2 буркана за оцветяване от 70 ml всеки. Компонентът **WB1** е достатъчен за 3 буркана за оцветяване от по 70 ml всеки. Компонентът **WB5** е достатъчен за 14 буркана за оцветяване от по 70 ml.

C-3044-40 (40 tests): Компонентите **ES1**, **AB14**, **AB13**, **SB6a-b**, **SB7a-b**, **CS2**, и **MT4** са достатъчни за 40 реакции. Компонентът **PT2** е достатъчен за 7 буркана за оцветяване от 70 ml всеки. Компонентът **WB1** е достатъчен за 8 буркана за оцветяване от по 70 ml всеки. Компонент **WB5** е достатъчен за 28 буркана за оцветяване от по 70 ml.

4. Необходими материали, които не са осигурени

- ZytoDot 2C CISH Probe
- Положителни и отрицателни контролни образци
- Микроскопски стъкла, положително заредени
- Водна баня (80 °C, 98 °C)
- Хбридизатор или гореща плоча
- Хбридизатор или камера за влажност в пещта за хбридизация
- Регулируеми пипети (10 µl, 1000 µl)
- Оцветяване на буркани или вани
- Таймер
- Калибриран термометър
- Етанол или реактивен алкохол
- Ксилол
- Метанол 100%
- Водороден пероксид (H₂O₂) 30%
- Дейониизирана или дестилирана вода
- Покривни стъкла (22 mm x 22 mm, 24 mm x 32 mm)
- Каучуков цимент, напр. Fixogum Rubber Cement (Prod. No. E-4005-50/-125) или подобен
- Подходящо поддържан светлинен микроскоп (400-630x)

5. Съхранение и обработка

Съхранявайте при температура 2-8 °C в изправено положение. Върнете при условията на съхранение веднага след употреба. Не използвайте реагентите след изтичане на срока на годност, посочен на етикета. Продуктът е стабилен до датата на изтичане на срока на годност, посочена на етикета, когато се третира по подходящ начин.

6. Предупреждения и предпазни мерки

- Прочетете инструкциите за употреба преди да ги използвате!
- Не използвайте реагентите след изтичане на срока на годност!
- Този продукт съдържа вещества (в ниски концентрации и обеми), които са вредни за здравето. Избягвайте всякакъв пряк контакт с реагентите. Вземете подходящи мерки за защита (използвайте ръкавици за еднократна употреба, защитни очила и лабораторно облекло)!
- Докладвайте за всеки сериозен инцидент, възникнал във връзка с продукта, на производителя и на компетентния орган съгласно местните разпоредби!
- Ако реагентите попаднат върху кожата, незабавно я изплакнете с голямо количество вода!
- При поискване за професионалния потребител се предоставя информационен лист за безопасност на материала.
- Не използвайте повторно реагентите, освен ако повторната употреба не е изрично разрешена!
- Избягвайте кръстосано замърсяване на пробите, тъй като това може да доведе до грешни резултати.
- Не трябва да се допуска изсъхване на образците по време на хибридизацията и промиването.

Предупреждения за опасност и предпазни мерки за AB13, AB14, PT2, SB7b, WB1 и WB5:

Компонентът, определящ опасността, е смес от: 5-хлоро-2-метил-4-изотиазолин-3-он [EC № 247-500-7] и 2-метил-2Н-изотиазол-3-он [EC № 220-239-6] (3:1).



Предупреждение

H317	Може да причини алергична кожна реакция.
P261	Избягвайте вдишване на прах/пушек/газ/дим/изпарения/аерозоли
P272	Да не се изнася замърсено работно облекло извън работното помещение.
P280	Използвайте предпазни ръкавици/предпазно облекло/предпазни очила/предпазна маска за лице.
P302+P352	ПРИ КОНТАКТ С КОЖАТА: Измийте обилно с вода/...
P333+P313	При поява на кожно дразнене или обрив на кожата: Потърсете медицински съвет/помощ.
P362+P364	Свалете замърсеното облекло и го изперете преди повторна употреба.

Предупреждения за опасност и предпазни мерки за SB7a:

Компонентите, определящи опасността, са метанол и 30 % разтвор на водороден пероксид.



Опасност

H225	Силно запалими течност и пари.
H301+H311+H331	оксичен при поглъщане, при контакт с кожата или при вдишване
H370	Причинява увреждане на органите.
P210	Да се пази от топлина, нагорещени повърхности, искри, открит пламък, и други източници на запалване. Тютюнопушенето забранено.
P233	Съдът да се съхранява плътно затворен.
P260	Не вдишвайте прах/пушек/газ/дим/изпарения/аерозоли.
P280	Използвайте предпазни ръкавици/предпазно облекло/предпазни очила/предпазна маска за лице/предпазни средства за защита на слуха.
P308+P311	ПРИ явна или предполагаема експозиция: Обадете се в ЦЕНТЪР ПО ТОКСИКОЛОГИЯ/на лекар.
P403+P235	Да се съхранява на добре проветриво място. Да се съхранява на хладно.

Предупреждения за опасност и предпазни мерки за CS2:

Компонентът, определящ опасността, е етанедиол, етиленгликол.



Предупреждение

H373	Може да причини увреждане на бъбреците при продължителна или многократна експозиция при поглъщане.
P260	Не вдишвайте прах/пушек/газ/дим/изпарения/аерозоли.
P314	При неразположение потърсете медицински съвет/помощ.

Предупреждения за опасност и предпазни мерки за MT4:

Компонентът, определящ опасността, е ксилон..



Предупреждение

H226	Запалими течност и пари.
H312+H332	Вреден при контакт с кожата или при вдишване.
H315	Предизвиква дразнене на кожата.
H319	Предизвиква сериозно дразнене на очите.
H335	Може да предизвика дразнене на дихателните пътища.
H373	Може да причини увреждане на органите при продължителна или повтаряща се експозиция
P210	Да се пази от топлина, нагорещени повърхности, искри, открит пламък, и други източници на запалване. Тютюнопушенето забранено.
P260	Не вдишвайте прах/пушек/газ/дим/изпарения/аерозоли
P280	Използвайте предпазни ръкавици/предпазно облекло/предпазни очила/предпазна маска за лице/предпазни средства за защита на слуха.
P305+P351+P338	ПРИ КОНТАКТ С ОЧИТЕ: промивайте внимателно с вода в продължение на няколко минути. Свалете контактните лещи, ако има такива и доколкото това е възможно. Продължете с изплакването.
P337+P313	При продължително дразнене на очите: Потърсете медицински съвет/помощ.

P403+P235	Да се съхранява на добре проветриво място. Да се съхранява на хладно.
EUN208	Съдържа methyl 2-methylprop-2-enoate; methyl 2-methylpropenoate; methyl methacrylate. Може да предизвика алергична реакция.

Предупреждения за опасност и предпазни мерки за SB6a:

H412	Вреден за водните организми, с дълготраен ефект.
P273	Да се избягва изпускане в околната среда.

Специално етикетирание на ES1:

EUN208	Съдържа Pepsin A. Може да предизвика алергична реакция.
EUN210	Информационен лист за безопасност ще бъде представен при поискване.

7. Ограничения

- За *in vitro* диагностична употреба.
- Само за професионална употреба.
- Само за неавтоматизирана употреба.
- Клиничната интерпретация на всяко положително оцветяване или липсата на такова трябва да се направи в контекста на клиничната анамнеза, морфологията, други хистопатологични критерии, както и други диагностични тестове. Отговорност на квалифицирания патолог/човешки генетик квалифициран за съответната дейност.е да познава ISH сондите, реагентите, диагностичните панели и методите, използвани за получаване на оцветения препарат. Оцветяването трябва да се извършва в сертифицирана, лицензирана лаборатория под надзора на патолог/ генетик квалифициран за съответната дейност., който отговаря за прегледа на оцветените препарати и за осигуряване на адекватността на положителните и отрицателните контроли.
- Оцветяването на образеца, особено интензивността на сигнала и фоновото оцветяване, зависи от обработката на образеца преди оцветяването. Неправилното фиксиране, замразяване, размразяване, измиване, сушене, нагряване, рязане или замърсяване с други проби или течности може да доведе до артефакти или фалшиви резултати. Несъответстващите резултати могат да се дължат на разлики в методите на фиксиране и вграждане, както и на присъщи на образеца нередности.
- Изпълнението беше валидирано, като бяха използвани процедурите, описани в инструкцията за употреба на съответната сонда ZytoVision и комплекта за изпълнение. Модификациите на тези процедури могат да променят ефективността и трябва да бъдат потвърдени от потребителя. Този IVD е сертифициран като CE само когато се използва, както е описано в тази инструкция за употреба в рамките на предвидената употреба.

8. Пречещи вещества

Следните фиксатори са несъвместими с ISH:

- Фиксатив на Bouin
- Фиксатор B5
- Киселинни фиксатори (напр. пикринова киселина)
- Фиксатив на Zenker
- Алкохоли (когато се използват самостоятелно)
- Живачен хлорид
- Формалдехид/цинков фиксатор
- Фиксаторът на Оланд
- Небуферизиран формалин

9. Подготовка на образци

Препоръки:

- Избягвайте кръстосано замърсяване на пробите, тъй като това може да доведе до грешни резултати.
- Фиксиране в 10% неутрално буферизиран формалин за 24 часа при стайна температура (RT, 18°C-25°C).
- Размер на извадката $\leq 0,5 \text{ cm}^3$.

- Използвайте висококачествен парафин.
- Вграждането трябва да се извършва при температури, по-ниски от 65°C.
- Подгответе 3-5 μm микротомни разрези.
- Използвайте положително заредени микроскопски стъкла.

10. Подготвителна обработка на устройството

20x Wash Buffer TBS (WB5) трябва да се приготви съгласно инструкциите в точка 11. "Процедура за анализ". Всички останали реактиви от комплекта са готови за употреба. Не се изисква възстановяване, смесване или разреждане.

Доведете сондата до стайна температура (RT) и разбъркайте за кратко преди употреба.

11. Процедура за анализ

11.1 Ден 1

Подготвителни стъпки

- (1) *Пригответе серия от етанол (70%, 90% и 100% разтвори на етанол):* Разредете 100% етанол с дейонизирана или дестилирана вода. Тези разтвори могат да се съхраняват в подходящи съдове и да се използват повторно.
- (2) *Heat Pretreatment Solution EDTA (PT2):* Загрейте до 98°C в покрит буркан за оцветяване.
- (3) *Приготвяне на 3% H₂O₂:* Разредете 1 част 30% H₂O₂ в 9 части 100% метанол.
- (4) *ZytoDot 2C CISH Probe:* Доставете на стайна температура (RT) преди употреба.

Предварителна обработка (обезпаразитяване/протеолиза)

- (1) Инкубирайте предметите за 10 минути при 70°C (напр. върху гореща плоча).
- (2) Инкубирайте предметите за 2 пъти по 5 минути в ксилол.
- (3) Инкубирайте предметни стъкла за 3 пъти по 3 минути в 100% етанол.
- (4) Инкубирайте предметите за 5 минути в 3% H₂O₂.
- (5) Измийте предметите 2 пъти по 1 мин. в дейонизирана или дестилирана вода.
- (6) Инкубирайте за 15 минути в предварително затоплен Heat Pretreatment Solution EDTA (PT2) при 98°C.

Използвайте осем предметни стъкла за всеки буркан за оцветяване (ако е необходимо, добавете фиктивни стъкла).

- (7) Незабавно прехвърлете предметни стъкла в дейонизирана или дестилирана вода и ги промийте за 2 пъти по 2 мин.
- (8) Нанесете (на капки) Pepsin Solution (ES1) върху образеца и го инкубирайте за 5-15 минути при 37°C в камера с висока влажност.

ES1 може да образува утайки, които не влияят на качеството. Като общо правило препоръчваме да се определи оптималното време за протеолиза в предварителни тестове.

- (9) Потопете предметни стъкла в дейонизирана или дестилирана вода.
- (10) Дехидратация при: 70%, 90% и 100% етанол, всяка за 1 мин.
- (11) Изсушете участъците на въздух.

Забележка: Уверете се, че участъците са напълно изсъхнали, преди да нанесете сондата.

Денатурация и хибридизация

- (1) Нанесете с пипета 10 μl от сондата върху всеки предварително обработен образец.
- (2) Покрийте образците с покривно стъкло с размери 22 mm x 22 mm (избягвайте образуването на мехурчета) и запечатайте покривното стъкло.

Препоръчваме ви да използвате гумен цимент (напр. Fixogum) за уплътняване

- (3) Поставете предметни стъкла върху гореща плоча или хибридизатор и денатурирайте образците за 5 минути при 79°C.
- (4) Преместете предметите в камера за влажност и хибридизирайте за една нощ при 37°C (напр. в пещ за хибридизация).

Важно е образците да не изсъхват по време на хибридизацията.

11.2 Ден 2

Подготвителни стъпки

- (1) Wash Buffer SSC (WB1): За промиване на стрингенс, загряйте до 80°C в покрит буркан за оцветяване. **WB1** може да образува преципитати при 2-8°C, които не влияят на качеството и трябва да се разтворят при нагряване.
- (2) Приготвяне на 1x Wash Buffer TBS: Разредете 1 част от 20x Wash Buffer TBS (**WB5**) в 19 части дейонизирана или дестилирана вода.

Diluted 1x Wash Buffer TBS е стабилен в продължение на една седмица, когато се съхранява при 2-8°C.

- (3) Anti-DIG/DNP-Mix (AB14), HRP/AP-Polymer-Mix (AB13), AP-Red Solution A (SB6a), AP-Red Solution B (SB6b), HRP-Green Solution A (SB7a), HRP-Green Solution B (SB7b), Nuclear Blue Solution (CS2), Mounting Solution (alcoholic) (MT4): Доставка на стайна температура преди употреба.

*Компонентите **SB7a** и **SB7b** могат да образуват утайки, които не влияят на качеството на оцветяването.*

Последваща хибридизация и откриване

- (1) Внимателно отстранете гумения цимент или лепилото.
- (2) Отстранете покривното стъкло, като потопите предметите в Wash Buffer SSC (WB1) при стайна температура за 5 мин.

WB1 оже да се използва еднократно. Съхранявайте при 2-8°C за максимум една седмица.

- (3) Измийте предметите за 5 минути в Wash Buffer SSC (WB1) при 80°C.
- (4) Промийте предметите 2 пъти по 1 минута в дейонизирана или дестилирана вода.
- (5) Потопете предметите в Wash Buffer PBS/Tween.
- (6) Нанесете Anti-DIG/DNP-Mix (AB14) (1-2 капки на предметно стъкло) върху предметни стъкла и инкубация за 15 минути при 37°C в камера за влажност.
- (7) Промийте предметите 3 пъти по 1 мин. в 1x Wash Buffer TBS.
- (8) Нанесете HRP/AP-Polymer-Mix (AB13) (1-2 капки на предметно стъкло) върху предметни стъкла и инкубирайте за 30 min при RT.
- (9) Промийте предметите 3 пъти по 1 мин. в 1x Wash Buffer TBS.
- (10) Пригответе AP-Red Solution (работен разтвор): напълнете 1 ml DAB Solution B (SB1b) в градуирана чаша и добавете една капка (30 µl) DAB Solution A (SB1a). Разбъркайте добре.
- (11) Нанесете AP-Red Solution (1-2 капки на предметно стъкло) върху предметни стъкла и инкубирайте за 30 min при RT.
- (12) По време на инкубацията пригответе HRP-Green Solution (работен разтвор): напълнете 1 ml ml HRP-Green Solution B (SB7b) в градуирана чаша и добавете две капки (2x 20 µl) HRP-Green Solution A (SB7a). Разбъркайте добре.
- (13) Измийте предметите за 2 минути в дейонизирана или дестилирана вода.
- (14) Нанесете HRP-Green Solution на капки (1-2 капки на предметно стъкло) върху предметни стъкла и инкубирайте на тъмно за 10 минути при стайна температура.
- (15) Измийте предметите за 2 минути в дейонизирана или дестилирана вода.
- (16) Оцветете образците за 5-10 сек. с Nuclear Blue Solution (CS2).
- (17) Прехвърлете предметни стъкла в буркан за оцветяване и измийте 2 мин. под студена течаша чешмяна вода.
- (18) Дехидратирайте в: 70 %, 90 % и 100 % етанол (използвайте много чист етанол).
- (19) Инкубиране на предметни стъкла за 2 пъти по 30 сек. в ксилол (използвайте много чист ксилол).

Не удължавайте и не съкращавайте инкубационното време, тъй като това може да доведе до загуба на сигнали!

- (20) Избягвайки уловените мехурчета, покрийте пробите с покривно стъкло (22 mm x 22 mm; 24 mm x 32 mm), като използвате Mounting Solution (alcoholic) (MT4). Изчакайте 20-30 min, за да се обездвижи покривалото.

Използването на отрязан накрайник на пипета, за да се увеличи размерът на отвора, може да улесни процеса на пипетиране.

- (21) Оценете оцветените проби чрез светлинна микроскопия.

12. Тълкуване на резултатите

При използване на ZytoDot 2C CISH Implementation Kit хибридизационните сигнали на маркирани с дигоксигенин полинуклеотиди се появяват като тъмозелени отделни точки, а маркираните с динитрофенил полинуклеотиди се появяват като яркочервени отделни точки. В интерфази или метафази на нормални клетки или клетки без аберации на изследваните хромозоми се появяват два сигнала на сонда/хаптен-етикет, с изключение на сондите, насочени към X и/или Y хромозоми, в резултат на което няма до два сигнала на сонда/хаптен-етикет, в зависимост от пола. При клетки с хромозомни аберации може да се види различен модел на сигнала в интерфазите или метафазите. За повече подробности относно интерпретацията на резултатите, моля, вижте инструкциите за употреба на съответната ZytoDot 2C CISH Probe.

13. Препоръчителни процедури за контрол на качеството

Вижте инструкциите за употреба на съответната сонда ZytoVision.

14. Работни характеристики

Вижте инструкциите за употреба на съответната сонда ZytoVision.

15. Изхвърляне

Изхвърлянето на реагентите трябва да се извършва в съответствие с местните разпоредби.

16. Отстраняване на неизправности

Всяко отклонение от инструкциите за работа може да доведе до по-лоши резултати при оцветяването или до липса на оцветяване. Моля, вижте www.zytovision.com за повече информация.

Слаби сигнали или липса на такива

Възможна причина	Действие
Протеолитичната предварителна обработка не е извършена правилно	Оптимизирайте времето за инкубиране на пепсин, ако е необходимо, увеличете или намалете
Изпаряване на сондата	Когато използвате хибридизатор, използването на мокрите ленти/напълнените с вода резервоари е задължително. При използване на пещ за хибридизация е задължително използването на камера за влажност. Освен това покривното стъкло трябва да се запечата напълно, напр. с Fixogum, за да се предотврати изсъхването на пробата по време на хибридизацията
Твърде дълго време за оцветяване	Избягвайте тъмно контраоцветяване, защото може да затъмни положителните сигнали от оцветяването.
Синьото покритие на контраста не е извършено правилно	Използвайте студена течаша вода от чешмата за посиняване; не използвайте топла или гореща вода, нито реактиви за посиняване.

Твърде силни сигнали

Възможна причина	Действие
Протеолитична предварителна обработка, провеждана твърде дълго	Оптимизирайте времето за инкубиране на пепсин, ако е необходимо, увеличете или намалете
Неправилно време за инкубиране на разтвора AP-Red	Ако е необходимо, времето за инкубиране може да се съкрати до 5 минути. Не загрявайте разтвора на субстрата над 25 °C; инкубирайте само при стайна температура

Неправилно време за инкубиране на разтвора HRP-Green	Ако е необходимо, времето за инкубиране може да се съкрати до 7 минути. Не загрявайте разтвора на субстрата над 25 °C; инкубирайте само при стайна температура
--	--

Твърде слаби червени сигнали

Възможна причина	Действие
AP-Red Solution е изложен на силна директна светлина	Пригответе и използвайте разтвора AP-Red на място, защитено от силна пряка светлина
AP-Red Solution е приготвен твърде рано	Подгответе преди непосредствена употреба
Неправилно време за инкубиране на разтвора AP-Red	Ако е необходимо, времето за инкубиране може да се удължи до 15 мин.
Недостатъчна подготовка на хромогенния субстрат	Не увеличавайте обема на разтвор А

Твърде слаби зелени сигнали

Възможна причина	Действие
Твърде дълго време за инкубиране на всички етапи на измиване след оцветяване с HRP-Green	Не превишавайте даденото време за инкубация
Неправилно време за инкубиране на разтвора HRP-Green	Ако е необходимо, времето за инкубиране може да се удължи до 15 мин.
Недостатъчна подготовка на хромогенния субстрат	Не увеличавайте обема на разтвор А

Сигналите избледняват или се сливат

Възможна причина	Действие
Използвано е неподходящо решение за монтаж	Използвайте само монтажния разтвор, предоставен в комплекта, или монтажни разтвори на основата на ксилол, които не съдържат никакви примеси; не използвайте тиксо за покрития.
Сеченията не са дехидратирани правилно	Използвайте пресни разтвори на етанол и ксилол; използвайте само ксилол с "чисто" качество.

Неравномерни или само на някои места много леки петна

Възможна причина	Действие
Непълно обезпаразитяване	Използвайте пресни разтвори; проверете продължителността на обезпаразитяването
Твърде малък обем на реагента	Уверете се, че обемът на реактива е достатъчно голям, за да покрие тъканната област

Непоследователни резултати

Възможна причина	Действие
Недостатъчно изсушаване преди нанасяне на сондата	Удължаване на сушенето на въздух
Твърде много вода/буфер за промиване върху тъканта преди нанасянето на пепсин, антитела и/или цветни субстрати	Уверете се, че излишната течност е отстранена от тъканния участък, като я забършете или изтрърскате от предметно стъкло. Малки количества остатъчна вода/буфер за промиване не пречат на теста.
Вариации в методите за фиксиране и вграждане на тъкани	Оптимизиране на методите за фиксиране и вграждане
Вариации в дебелината на тъканния участък	Оптимизиране на разделянето

Разрушена морфология

Възможна причина	Действие
Клетъчната или тъканната проба не е била правилно фиксирана	Оптимизиране на времето за фиксиране и фиксатора
Протеолитична предварителна обработка, която не се извършва твърде дълго	Намаляване на времето за инкубиране на пепсин

Сигнали за кръстосана хибридизация; зашумен фон

Възможна причина	Действие
Изсъхване на секциите по всяко време по време на или след хибридизацията	Избягвайте изсушаването на секциите; използвайте камера за влажност; запечатайте правилно покривното стъкло
Удължено време за инкубиране на субстрата	Съкращаване на времето за инкубиране на субстрата
Непълно обезпаразитяване	Използвайте пресни разтвори; проверете продължителността на депарафинирането
Твърде силна протеолитична предварителна обработка	Оптимизиране на времето за инкубиране на пепсин
Слайдове, охладени до стайна температура преди хибридизация	Прехвърлете бързо предметите за хибридизация на температурата.

Припокриващи се сигнали

Възможна причина	Действие
Неподходяща дебелина на тъканните разрези	Подготвяне на 3-5 µm микротомни разрези

Образците се издигат извън предметно стъкло

Възможна причина	Действие
Твърде силна протеолитична предварителна обработка	Съкращаване на времето за инкубиране на пепсин

17. Литература

- Isola J, Tanner M (2004) *Methods Mol Med* 97: 133-44.
- Kounelis S, et al. (2005) *Anticancer Res* 25: 939-46.
- 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. Ревизия



www.zytovision.com

Моля, вижте www.zytovision.com за най-новите инструкции за употреба, както и за инструкции за употреба на различни езици.

Нашите експерти са на разположение, за да отговорят на въпросите ви.

Моля, свържете се с helptech@zytovision.com



ZytoVision GmbH
Fischkai 1
27572 Bremerhaven/ Германия
Телефон: +49 471 4832-300
Факс: +49 471 4832-509
www.zytovision.com
Имейл: info@zytovision.com

Търговски марки:

ZytoVision® и ZytoDot® са търговски марки на ZytoVision GmbH.