



ZytoDot SPEC ERBB2 Probe Kit

REF C-3003-40

Σ 40

Pro kvalitativní detekci amplifikací lidského genu ERBB2 pomocí chromogenní *in situ* hybridizace (CISH)

4250380N297W



Diagnostický zdravotnický prostředek in vitro
podle IVDR (EU) 2017/746

1. Zamýšlený účel

ZytoDot SPEC ERBB2 Probe Kit je určena ke kvalitativní detekci amplifikací lidského genu ERBB2 ve formalínem fixovaných, do parafínu vložených vzorcích, jako je například karcinom prsu, pomocí chromogenní *in situ* hybridizace (CISH).

Výrobek je určen pouze pro profesionální použití. Všechny testy s použitím výrobku by měly být prováděny v certifikované, licencované laboratoři anatomické patologie pod dohledem patologa/humánního genetika kvalifikovaným personálem.

Sonda je určena jako pomůcka pro diferenciální diagnostiku karcinomu prsu a léčebná opatření by neměla být zahájena pouze na základě výsledku testu.

2. Princip testu

Technika chromogenní *in situ* hybridizace (CISH) umožňuje detekci a vizualizaci specifických sekvencí nukleových kyselin v buněčných preparátech. Nukleotidové fragmenty značené hapténem, tzv. sondy CISH, a jejich komplementární cílové sekvence v preparátech jsou při hybridizaci společně denaturovány a následně se nechají annealizovat. Poté se nespecifické a nenavázané fragmenty sond odstraní pomocí promývacích kroků. Tvorbu duplexu značené sondy lze vizualizovat pomocí primárních (neznačených) protilátek, které jsou detekovány sekundárními polymerizovanými protilátkami konjugovanými s enzymem. Enzymatická reakce s chromogenními substráty vede k tvorbě barevných precipitátů. Po protibarvení jádra jaderným barvivem se hybridizované fragmenty sondy vizualizují světelnou mikroskopií.

3. Dodaná činidla

ZytoDot SPEC ERBB2 Probe Kit je k dispozici v jedné velikosti a skládá se z:

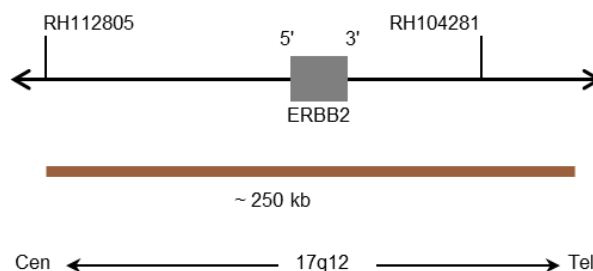
Kód	Komponenta	Množství	Kontejner
		Σ 40	
PT2	Heat Pretreatment Solution EDTA	500 ml	Láhev se šroubovacím uzávěrem (velká)
ES1	Pepsin Solution	4 ml	Lahvička s kapátkem, bílý uzávěr
PD1	<u>ZytoDot SPEC ERBB2 Probe</u>	0.4 ml	Reakční nádoba, hnědé víko
WB1	Wash Buffer SSC	560 ml	Láhev se šroubovacím uzávěrem (velká)
WB4	PBS/Tween	2x	Hliníkové balení
BS1	Blocking Solution	4 ml	Lahvička s kapátkem, oranžový uzávěr
AB1	Mouse_Anti-Dig	4 ml	Lahvička s kapátkem, růžový uzávěr
AB2	Anti-Mouse-HRP-Polymer	4 ml	Lahvička s kapátkem, fialový uzávěr
SB1a	DAB Solution A	0.3 ml	Lahvička s kapátkem, zelený uzávěr
SB1b	DAB Solution B	10 ml	Lahvička s kapátkem, šedý uzávěr
CS1	Mayer's Hematoxylin Solution	20 ml	Láhev se šroubovacím uzávěrem, černá
MT4	Mounting Solution (alcoholic)	4 ml	Skleněná láhev, hnědá
	Návod k použití	1	

C-3003-40 (40 testů): Složky **PD1**, **ES1**, **BS1**, **AB1**, **AB2**, **SB1a-b**, **CS1**, a **MT4** postačují pro 40 reakcí. Složka **PT2** vystačí na 7 barvicích nádobek po 70 ml. Složka **WB1** vystačí na 8 barvicích sklenic po 70 ml. Složka **WB4** vystačí na 28 barvicích sklenic po 70 ml.

ZytoDot SPEC ERBB2 Probe se skládá z:

- Polynukleotidy značené digoxigeninem (~1,8 ng/μl), které jsou zaměřeny na sekvence mapující oblast 17q12* (chr17:37,725,661-37,973,541), v níž se nachází oblast genu ERBB2 (viz obr. 1).
- Formamidový hybridizační pufr

*podle sestavy lidského genomu GRCh37/hg19



Obr. 1: SPEC ERBB2 Mapa sondy (bez měřítka)

4. Požadované, ale neposkytované materiály

- Pozitivní a negativní kontrolní vzorky
- Mikroskopická sklíčka, kladně nabitá
- Vodní lázeň (80 °C, 98 °C)
- Hybridizér nebo horká deska
- Hybridizátor nebo vlhkostní komora v hybridizační peci
- Nastavitelné pipety (10 μl, 1000 μl)
- Barvicí nádoby nebo lázně
- Časovač
- Kalibrovaný teploměr
- Etanol nebo reagenční alkohol
- Xylen
- Metanol 100%
- Peroxid vodíku (H₂O₂) 30 %.

- Deionizovaná nebo destilovaná voda
- Krycí skříčka (22 mm x 22 mm, 24 mm x 32 mm)
- Pryžový cement, např. Fixogum Rubber Cement (prod. č. E-4005-50/-125) -nebo podobný.
- Vhodně udržovaný světelný mikroskop (400-630x)

5. Skladování a manipulace

Skladujte při teplotě 2-8 °C ve svislé poloze. Ihned po použití vraťte do skladovacích podmínek. Nepoužívejte činidla po uplynutí doby použitelnosti uvedené na štítku. Při odpovídajícím zacházení je přípravek stabilní do data použitelnosti uvedeného na štítku.

6. Upozornění a bezpečnostní opatření

- Před použitím si přečtěte návod k použití!
- Nepoužívejte činidla po uplynutí doby použitelnosti!
- Tento výrobek obsahuje látky (v nízkých koncentracích a objemech), které jsou zdraví škodlivé a potenciálně infekční. Vyvarujte se jakéhokoli přímého kontaktu s činidly. Přijměte vhodná ochranná opatření (používejte jednorázové rukavice, ochranné brýle a laboratorní oděv)!
- Jakoukoli závažnou událost, ke které došlo v souvislosti s výrobkem, nahlase výrobcí a příslušnému úřadu v souladu s místními předpisy!
- Pokud se činidla dostanou do kontaktu s kůží, okamžitě ji opláchněte velkým množstvím vody!
- Pro profesionální uživatele je na vyžádání k dispozici bezpečnostní list materiálu.
- Reagencie nepoužívejte opakovaně, pokud není opakované použití výslovně povoleno!
- Vyvarujte se křížové kontaminace vzorků, protože to může vést k chybným výsledkům.
- Během hybridizace a promývání se vzorky nesmí nechat zaschnout.

Zvláštní značení u ES1:

- EUH208 Obsahuje pepsin A. Může vyvolat alergickou reakci.
- EUH210 Na vyžádání je k dispozici bezpečnostní list.

Standardní věty o nebezpečnosti a pokyny pro bezpečné zacházení pro CS1 a WB4:

Směs není klasifikována jako nebezpečná podle nařízení (ES) č. 1272/2008.

Standardní věty o nebezpečnosti a pokyny pro bezpečné zacházení pro BS1, AB1, AB2, PT2, a WB1:

Složka určující nebezpečí je směsici: 5-chlor-2-methylisothiazol-3(2H)-on [číslo ES 247-500-7] a 2-methylisothiazol-3(2H)-on [číslo ES 220-239-6] (3:1).

	Varování
H317	Může vyvolat alergickou kožní reakci.
P261	Zamezte vdechování prachu/dýmu/plynu/mlhy/par/ aerosolů.
P272	Kontaminovaný pracovní oděv neodnášejte z pracoviště.
P280	Používejte ochranné rukavice/ochranný oděv/ochranné brýle/obličejový štít.
P302+P352	PŘI STYKU S KŮŽÍ: Omyjte velkým množstvím vody.
P333+P313	Při podráždění kůže nebo vyrážce: Vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření.
P362+P364	Kontaminovaný oděv svlékněte a před opětovným použitím vyperte.

Standardní věty o nebezpečnosti a pokyny pro bezpečné zacházení pro SB1a:

Složkou určující nebezpečnost je bifenyl-3,3',4,4'-tetramin; 3,3'-diaminobenzidin.

	Nebezpečí
H350	Může vyvolat rakovinu.
P201	Před použitím si obstarejte speciální instrukce.
P202	Nepoužívejte, dokud jste si nepřečetli všechny bezpečnostní pokyny a neporozuměli jim.
P280	Používejte ochranné rukavice/ochranný oděv/ochranné brýle/obličejový štít/chrániče sluchu.
P308+P313	PŘI expozici nebo podezření na ni: Vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření.
P405	Skladujte uzamčené.

Standardní věty o nebezpečnosti a pokyny pro bezpečné zacházení pro SB1b:

Složkou určující nebezpečnost je imidazol; reakční hmotnost: (3:1): 5-chlor-2-methyl-4-isothiazolin-3-on [č. ES 247-500-7] a 2-methyl-2H-isothiazol-3-on [č. ES 220-239-6].

 	Nebezpečí
H317	Může vyvolat alergickou kožní reakci.
H360D	Může poškodit plod v těle matky.
P201	Před použitím si obstarejte speciální instrukce.
P261	Zamezte vdechování prachu/dýmu/plynu/mlhy/par/ aerosolů.
P280	Používejte ochranné rukavice/ochranný oděv/ochranné brýle/obličejový štít.
P302+P352	PŘI STYKU S KŮŽÍ: Omyjte velkým množstvím vody.
P308+P313	PŘI expozici nebo podezření na ni: Vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření.
P362+P364	Kontaminovaný oděv svlékněte a před opětovným použitím vyperte.

Standardní věty o nebezpečnosti a pokyny pro bezpečné zacházení pro PD1:

Složkou určující nebezpečnost je formamid.

	Nebezpečí
H351	Podezření, že způsobuje rakovinu.
H360FD	Může poškodit plodnost. Může poškodit nenarozené dítě.
H373	Může způsobit poškození orgánů při dlouhodobé nebo opakované expozici.
P201	Před použitím si vyžádejte zvláštní pokyny.
P202	Nemanipulujte s ním, dokud si nepřečtete a neporozumíte všem bezpečnostním pokynům.
P260	Nedýchejte prach/dým/plyn/hmlu/výpary/stříkance.
P280	Používejte ochranné rukavice/ochranný oděv/ochranu očí/ochranu obličeje.
P308+P313	Jste-li vystaveni nebo znepokojeni: Vyhledejte lékařskou pomoc/opatření.
P405	Sklad je uzamčený.

Standardní věty o nebezpečnosti a pokyny pro bezpečné zacházení pro MT4:

Složkou určující nebezpečnost je xylen.



Varování

H226	Hořlavá kapalina a páry.
H312+H332	Zdraví škodlivý při styku s kůží a při vdechování.
H315	Dráždí kůži.
H319	Způsobuje vážné podráždění očí.
H335	Může způsobit podráždění dýchacích cest.
H373	Může způsobit poškození orgánů při prodloužené nebo opakované expozici.
P210	Chraňte před teplem, horkými povrchy, jiskrami, otevřeným ohněm a jinými zdroji zapálení. Zákaz kouření.
P260	Nevdechujte prach/dým/plyn/mlhu/páry/aerosoly.
P280	Používejte ochranné rukavice/ochranný oděv/ochranné brýle/obličejový štít.
P305+P351+P338	PŘI ZASAŽENÍ OČÍ: Několik minut opatrně vyplachujte vodou. Vyjměte kontaktní čočky, jsou-li nasazeny a pokud je lze vyjmout snadno. Pokračujte ve vyplachování.
P337+P313	Přetrvává-li podráždění očí: Vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření.
P403+P235	Skladujte na dobře větraném místě. Uchovávejte v chladu.
EUH208	Obsahuje Methyl-methakrylát, Butyl-methakrylát. Může vyvolat alergickou reakci.

7. Omezení

- Pro diagnostické použití *in vitro*.
- Pouze pro profesionální použití.
- Pouze pro neautomatizované použití.
- Klinická interpretace jakéhokoli pozitivního barvení nebo jeho nepřítomnosti musí být provedena v kontextu klinické anamnézy, morfologie, dalších histopatologických kritérií a také dalších diagnostických testů. Za znalost sond CISH, reagensů, diagnostických panelů a metod používaných k výrobě barveného preparátu odpovídá kvalifikovaný patolog/humánní genetik. Barvení musí být prováděno v certifikované licencované laboratoři pod dohledem patologa/humánního genetika, který je odpovědný za revizi obarvených preparátů a zajištění adekvátnosti pozitivních a negativních kontrol.
- Barvení vzorků, zejména intenzita signálu a barvení pozadí, závisí na manipulaci se vzorkem a jeho zpracování před barvením. Nesprávná fixace, zmrazení, rozmrazení, mytí, sušení, zahřívání, řezání nebo kontaminace jinými vzorky či tekutinami může vést k artefaktům nebo falešným výsledkům. Nekonzistentní výsledky mohou být důsledkem rozdílů v metodách fixace a vkládání, jakož i vrozených nepravidlostí ve vzorku.
- Sonda by se měla používat pouze pro detekci lokusů popsaných v kapitole 3. "Dodávané reagentie".
- Výkon byl ověřen pomocí postupů popsaných v tomto návodu k použití. Úpravy těchto postupů mohou změnit výkon a musí být ověřeny uživatelem. Tento IVD je certifikován jako CE, pouze pokud je používán způsobem popsaným v tomto návodu k použití v rozsahu určeného použití.

8. Rušivé látky

Následující fixativa jsou s ISH neslučitelná:

- Bouinovo fixační činidlo
- fixační prostředek B5
- Kyselé fixační prostředky (např. kyselina pikrová)
- Zenkerův fixativ
- Alkoholy (při samostatném použití)
- Chlorid rtuťnatý
- Formaldehydové/zinkové fixační činidlo
- Hollandův fixativ
- Formalin bez pufru

9. Příprava vzorků

Doporučení:

- Vyvarujte se křížové kontaminace vzorků, protože to může vést k chybným výsledkům.
- Fixace v 10% neutrálně pufovaném formalínu po dobu 24 hodin při pokojové teplotě (18-25 °C).
- Velikost vzorku ≤ 0,5 cm³.
- Používejte parafín prvotřídní kvality.
- Vkládání by se mělo provádět při teplotách nižších než 65 °C.
- Přípravte 3-5 μm řezy mikrotomem.
- Používejte kladně nabitá mikroskopická sklíčka.
- Fixujte 2-16 h při 50-60 °C.

10. Přípravné ošetření zařízení

PBS/Tween (WB4) se připraví podle pokynů v bodě 11. "Postup analýzy". Všechna ostatní činidla soupravy jsou připravena k použití. Není nutná rekonstituce, míchání ani ředění. Před použitím uveďte sondu na pokojovou teplotu (18-25 °C), chraňte před světlem. Před otevřením lahvičky promíchejte vortexováním a krátce roztočte.

11. Postup analýzy

11.1 Den 1

Přípravné kroky

- (1) Přípravte sérii ethanolu (70%, 90% a 100% roztok ethanolu): Zředte 100% ethanol deionizovanou nebo destilovanou vodou. Tyto roztoky lze uchovávat ve vhodných nádobách a lze je opakovaně použít.
- (2) Heat Pretreatment Solution EDTA (PT2): Zahřejte na 98 °C v zakryté barvicí nádobě.
- (3) Příprava 3% H₂O₂: Zředte 1 díl 30% H₂O₂ v 9 dílech 100% metanolu.
- (4) ZytoDot CISH Probe: Před použitím zahřejte na pokojovou teplotu (RT).

Předúprava (odvoskování/proteolýza)

- (1) Inkubujte sklíčka 10 minut při 70 °C (např. na horké desce).
- (2) Inkubujte sklíčka 2x 5 min v xyleny.
- (3) Inkubujte preparáty 3x 3 min ve 100% ethanolu.
- (4) Inkubujte sklíčka 5 min v 3%H₂O₂.
- (5) Promývejte sklíčka 2x 1 min v deionizované nebo destilované vodě.
- (6) Inkubujte 15 min v předehřátém Heat Pretreatment Solution EDTA (PT2) při 98°C.

Použijte osm sklíček na jednu barvicí nádobku (v případě potřeby přidejte fiktivní sklíčka).

- (7) Ihned přeneste sklíčka do deionizované nebo destilované vody a promývejte 2x 2 min.
- (8) Na preparát naneste (po kapkách) Pepsin Solution (ES1) a inkubujte 5-15 min při 37 °C ve vlhké komoře.

ES1 může tvořit precipitáty, které nemají vliv na kvalitu. Obecně doporučujeme zjistit optimální dobu proteolýzy v předběžných testech.

- (9) Ponořte sklíčka do deionizované nebo destilované vody.
- (10) Dehydratace v: 70%, 90% a 100% ethanolu, vždy po dobu 1 min.
- (11) Vysušení řezů na vzduchu.

Poznámka: Před aplikací sondy se ujistěte, že jsou řezy zcela suché.

Denaturace a hybridizace

- (1) Na každý předem ošetřený vzorek napipetujte 10 μl ZytoDot CISH Probe.
- (2) Vzorky zakryjte krycím sklíčkem o rozměrech 22 x 22 mm (zamezte zachycení bublin) a krycí sklíčko utěsněte.

utěsnění doporučujeme použít gumový cement (např. Fixogum).

- (3) Umístěte sklíčka na horkou desku nebo hybridizátor a denaturujte vzorky po dobu 5 minut při 94-95 °C.
- (4) Přeneste sklíčka do vlhké komory a hybridizujte přes noc při 37 °C (např. v hybridizační peci).

Je důležité, aby vzorky během hybridizace nevyschly.

11.2 Den 2

Přípravné kroky

- (1) Wash Buffer SSC (WB1): Pro promývání se strunou zahřejte na 80 °C v zakryté barvicí nádobě. **WB1** může při teplotě 2-8 °C tvořit sraženiny, které nemají vliv na kvalitu a měly by se při zahřátí rozpustit.
- (2) Příprava Wash Buffer PBS/Tween: Přidejte 1 tabletu PBS/Tween (WB4) do 1000 ml deionizované nebo destilované vody a rozpustěte.

Wash Buffer PBS/Tween je stabilní po dobu jednoho týdne při skladování při teplotě 2-8 °C.

- (3) Blocking Solution (BS1), Mouse-Anti-DIG (AB1), Anti-Mouse-HRP-Polymer (AB2), DAB Solution A (SB1a), DAB Solution B (SB1b), Mayer's Hematoxylin Solution (CS1), Mounting Solution (alcoholic) (MT4): Před použitím se uvede do pokojové teploty.

Následná hybridizace a detekce

- (1) Opatrně odstraňte gumový cement nebo lepidlo.
- (2) Odstraňte krycí sklíčko ponořením sklíček do Wash Buffer SSC (WB1) při pokojové teplotě po dobu 5 min.

WB1 lze použít opakovaně. Uchovávejte při teplotě 2-8 °C po dobu maximálně jednoho týdne.

- (3) Promývejte sklíčka po dobu 5 min v Wash Buffer SSC (WB1) při teplotě 80 °C.

Použijte osm sklíček na jednu barvicí nádobku (v případě potřeby přidejte fiktivní sklíčka).

- (4) Promývejte sklíčka 2x 1 min v deionizované nebo destilované vodě.
- (5) Ponořte sklíčka do Wash Buffer PBS/Tween.
- (6) Na sklíčka naneste Blocking Solution (BS1) (1-2 kapky na sklíčko) a inkubujte 10 min při RT.
- (7) Blocking Solution (BS1) smyjte, **ale neoplachujte!**
- (8) Na sklíčka naneste Mouse-Anti-DIG (AB1) ((1-2 kapky na sklíčko) a inkubujte 30 min při RT.
- (9) Promývejte sklíčka 3x 1 min v PBS/Tween.
- (10) Na sklíčka naneste Anti-Mouse-HRP-Polymer (AB2) ((1-2 kapky na sklíčko) a inkubujte 30 min při RT.
- (11) Sklíčka promyjte 3x 1 min v PBS/Tween.
- (12) Připravte DAB Solution (pracovní roztok): do odměrného kalíšku naplňte 1 ml DAB Solution B (SB1b) a přidejte jednu kapku (30 µl) DAB Solution A (SB1a). Dobře promíchejte.
- (13) DAB Solution (1-2 kapky na sklíčko) naneste na sklíčka a inkubujte 30 min při RT.
- (14) Přeneste sklíčka do barvicí nádobky a promývejte 2 min pod tekoucí studenou vodou z vodovodu.
- (15) Vzorky protibarvěte 5-10 s Mayer's Hematoxylin Solution (CS1).
- (16) Přeneste preparáty do barvicí nádobky a 2 min. promývejte pod tekoucí studenou vodou z kohoutku.
- (17) Dehydratace v: 70 %, 90 % a 100 % ethanol, vždy po dobu 1 min.
- (18) Inkubujte preparáty 2x 2 min v xylenu (použijte velmi čistý xylén).
- (19) Vyhněte se zachyceným bublinkám, zakryjte vzorky krycím sklíčkem (22 mm x 22 mm; 24 mm x 32 mm) pomocí Mounting Solution (alcoholic) (MT4). Nechte 20-30 minut, aby se krycí sklíčko znehybnilo.

Použití pipetovací špičky, která byla seřáznuta, aby se zvětšil otvor, může usnadnit pipetování.

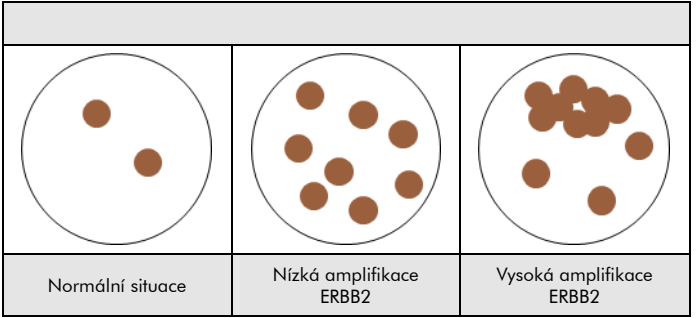
- (20) Vyhodnoťte obarvené vzorky pomocí světelné mikroskopie.

12. Interpretace výsledků

Při použití sady ZytoDot CISH Implementation Kit se hybridizační signály polynukleotidů značených digoxigeninem jeví jako hnědé až tmavě hnědé (oblast genu ERBB2).

Normální situace: V interfázích normálních buněk nebo buněk bez amplifikace zahrnující oblast genu ERBB2 se objevují dva zřetelné hnědé signály ve tvaru teček (viz obr. 2).

Neobvyklá situace: U buněk s amplifikací oblasti genu ERBB2 nebo polysomií chromozomu 17 bude pozorován zvýšený počet hnědých signálů nebo hnědých signálních shluků (viz obr. 2).



Obr. 2: Očekávané výsledky u normálních a aberantních jader

U některých abnormálních vzorků mohou být pozorovány jiné vzorce signálů, než jsou popsány výše. Tyto neočekávané vzorce signálů by měly být dále zkoumány.

Upozornění:

- Vzhledem k dekonzenzovanému chromatinu se jednotlivé signály CISH mohou jevit jako malé shluky signálů. Dva nebo tři signály stejné velikosti, oddělené vzdáleností ≤ 1 průměr signálu, by se tedy měly počítat jako jeden signál.
- Před vyčíslením signálu by měl být vzorek naskenován kvůli případné intratumorální heterogenitě při 100- až 200násobném zvětšení.
- Vizualizace signálů by měla být prováděna při minimálně 400- až 630násobném zvětšení, což vede ke snadno viditelným signálům.
- Nehodnoťte oblasti nekrózy, překrývající se jádra, nadměrně strávená jádra a jádra se slabou intenzitou signálu.
- V důsledku mitózy mohou být další signály viditelné i u malého procenta nenádorových buněk. Občas mohou být v parafinových vzorcích pozorována jádra s chybějícími signály v důsledku artefaktů při řezání.
- Negativní nebo nespecifický výsledek může být způsoben více faktory (viz kapitola 16 "Řešení problémů").
- Pro správnou interpretaci výsledků musí uživatel tento výrobek před použitím v diagnostických postupech validovat v souladu s národními a/nebo mezinárodními pokyny.

13. Doporučené postupy kontroly kvality

Aby bylo možné sledovat správnou funkčnost zpracovávaných vzorků a testovacích činidel, měla by být každá analýza doplněna interními a externími kontrolami. Pokud interní a/nebo externí kontroly neprokáží odpovídající zbarvení, je třeba výsledky se vzorky pacientů považovat za neplatné.

Vnitřní kontrola: Neoplastické buňky ve vzorku, které vykazují normální vzor signálu, např. fibroblasty.

Externí ovládání: Ověřené pozitivní a negativní kontrolní vzorky.

14. Výkonnostní charakteristiky

14.1 Analytický výkon

Výkonnost sondy byla stanovena porovnáním s odpovídající sondou FISH schválenou IVD.

Analytická citlivost:	100% (95% CI 98.5 – 100.0)
Analytická specifčnost:	100% (95% CI 97.0 – 100.0)

14.2 Klinický výkon

Diagnostická citlivost:	100% (95% CI 83.2 – 100.0) vs. FISH, CISH
Diagnostická specifčnost:	100% (95% CI 83.2 – 100.0) vs. FISH, CISH

15. Likvidace

Likvidace činidel musí být prováděna v souladu s místními předpisy.

16. Řešení problémů

Jakákoli odchylka od návodu k obsluze může vést k horším výsledkům barvení nebo k tomu, že barvení nebude vůbec provedeno. Další informace naleznete na www.zytovision.com.

Slabý nebo žádný signál

Možná příčina	Akce
Nesprávně provedená proteolytická předúprava	Optimalizujte dobu inkubace pepsinu, v případě potřeby ji prodlužte nebo zkrátte.
Odpařování sondy	Při použití hybridizátoru je použití mokřých pruhů/nádrží naplněných vodou povinné. Při použití hybridizační pece je nutné použít vlhkou komoru. Kromě toho by měl být krycí list zcela uzavřen, např. pomocí Fixogumu, aby se zabránilo vysychání vzorku během hybridizace.
Nedostatečná příprava chromogenního substrátu	Namísto jedné kapky roztoku DAB A použijte 30 µl.
Příliš dlouhá doba proti barvení	Vyhnete se tmavému protibarvení, protože může zakrýt pozitivní signály barvení.
Nesprávně provedené modření protibarviva	K modření používejte studenou tekoucí vodu z vodovodu; nepoužívejte teplou nebo horkou vodu ani modřicí činidla.

Příliš silné signály

Možná příčina	Akce
Příliš dlouhá proteolytická předúprava	Optimalizujte dobu inkubace pepsinu, v případě potřeby ji prodlužte nebo zkrátte.
Reakce substrátu je příliš intenzivní	Zkrátte dobu inkubace substrátu; nezaehřívajte roztok substrátu nad 25 °C; inkubujte pouze při pokojové teplotě.

Signály slábnou nebo se slučují

Možná příčina	Akce
Bylo použito nevhodné montážní řešení	Používejte pouze montážní roztok dodaný se sadou nebo montážní roztoky na bázi xylenu bez jakýchkoli nečistot; nepoužívejte krycí pásku.

Nerovnoměrné nebo v některých částech jen velmi lehké skvrny

Možná příčina	Akce
Nedokonalé odparařování	Používejte čerstvé roztoky; zkontrolujte dobu trvání odparařování.
Příliš malý objem činidla	Ujistěte se, že objem činidla je dostatečně velký, aby pokryl oblast tkáně.

Nekonzistentní výsledky

Možná příčina	Akce
Nedostatečné vysušení před aplikací sondy	Prodloužení sušení na vzduchu
Příliš velké množství vody/proplachovacího pufru na tkáni před aplikací pepsinu, protilátek a/nebo barevných substrátů.	Ujistěte se, že je přebytečná tekutina z tkáňového řezu odstraněna roztřením nebo setřesením ze sklíčka. Malá množství zbytkové vody/mycího pufru neinterferují s testem.
Rozdíly v metodách fixace a vkládání tkání	Optimalizace metod fixace a vkládání
Změny v tloušťce tkáňového řezu	Optimalizace řezu

Zhoršená morfolgie

Možná příčina	Akce
Vzorek buněk nebo tkáně nebyl řádně fixován	Optimalizace doby fixace a fixačního prostředku
Předběžná proteolytická úprava se neprovádí příliš dlouho	Zkrácení doby inkubace pepsinu

Křížové hybridizační signály; rušivé pozadí

Možná příčina	Akce
Sekce vyschly kdykoli během hybridizace nebo po ní.	Zabraňte vysychání řezů; použijte komoru s vlhkostí; řádně utěsněte krycí sklíčko.
Prodloužená doba inkubace substrátu	Zkrácení doby inkubace substrátu
Nedokonalé odparařování	Používejte čerstvé roztoky; zkontrolujte délku odparařování
Příliš silná proteolytická předúprava	Optimalizace doby inkubace pepsinu
Sklíčka se před hybridizací ochladí na pokojovou teplotu.	Rychle přeneste sklíčka na hybridizační teplotu

Překrývající se signály

Možná příčina	Akce
Nevhodná tloušťka tkáňových řezů	Připravte si řezy mikrotomem o velikosti 3-5 µm

Vzorek vyplave ze sklíčka

Možná příčina	Akce
Příliš silná proteolytická předúprava	Zkrácení inkubační doby pepsinu

17. Literatura

- Nie X, et al. (2013) *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*.
- Wilkinson DG: In Situ Hybridization, A Practical Approach, Oxford University Press (1992) ISBN 0 19 963327 4.

18. Revize



www.zytovision.com

Nejnovější návod k použití a návod k použití v různých jazycích naleznete na adrese www.zytovision.com.

Naši odborníci jsou připraveni zodpovědět vaše dotazy.
Kontaktujte prosím helptech@zytovision.com
Shrnutí bezpečnosti a výkonnosti naleznete na stránce
www.zytovision.com.



ZytoVision GmbH
Fischkai 1
27572 Bremerhaven/ Německo
Telefon: +49 471 4832-300
Fax: +49 471 4832-509
www.zytovision.com
E-mail: info@zytovision.com

Ochranné známky:

ZytoVision® a *ZytoDot*® jsou ochranné známky společnosti ZytoVision GmbH.