



ZytoDot CISH Implementation Kit

REF C-3018-40

40

Für die Verwendung in
chromogenen *in-situ*-Hybridisierungen (CISH)

4250380N397Z



In-vitro-Diagnostikum
gemäß IVDR (EU) 2017/746

1. Verwendungszweck

ZytoDot CISH Implementation Kit ist für die Verwendung in Kombination mit Digoxigenin-markierten ZytoDot Sonden in chromogenen *in-situ*-Hybridisierungen (CISH) in Formalin-fixierten, Paraffin-eingebetteten Geweben bestimmt.

Das Produkt ist nur für die professionelle Anwendung bestimmt. Alle Tests, bei denen das Produkt verwendet wird, sollten in einem zertifizierten, zugelassenen anatomisch-pathologischen Labor unter der Aufsicht eines Pathologen/Humangenetikers von qualifiziertem Personal durchgeführt werden.

2. Prinzip der Methode

Die chromogene *in-situ*-Hybridisierung (CISH) erlaubt den Nachweis und die Visualisierung von spezifischen Nukleinsäuresequenzen in Zellpräparationen. Haptenmarkierte Nukleotid-Fragmente, sogenannte CISH-Sonden, und deren komplementäre Zielsequenzen in den Präparationen werden co-denaturiert und können anschließend während der Hybridisierung binden. Danach werden unspezifische und ungebundene Sondenfragmente durch Stringenzwaschschritte entfernt. Die Duplex-Bildung der markierten Sonde wird mittels primärer (nicht markierter) Antikörper visualisiert, welche von sekundären polymerisierten Enzym-konjugierten Antikörpern detektiert werden. Die enzymatische Reaktion mit den chromogenen Substraten führt zur Bildung von Farbpräzipitaten. Nach der Gegenfärbung des Zellkerns mit einer Zellkern-Färbung können die hybridisierten Sondenfragmente mit einem Lichtmikroskop visualisiert werden.

3. Enthaltene Komponenten

Das ZytoDot CISH Implementation Kit ist verfügbar in einer Größe und besteht aus:

Code	Komponente	Menge	Gefäß
		40	
PT2	<u>Heat Pretreatment Solution EDTA</u>	500 ml	Schraubverschlussflasche (groß)
ES1	<u>Pepsin Solution</u>	4 ml	Tropfflasche, weißer Deckel
WB1	<u>Wash Buffer SSC</u>	560 ml	Schraubverschlussflasche (groß)
WB4	<u>PBS/Tween</u>	2x	Aluminiumverpackung
BS1	<u>Blocking Solution</u>	4 ml	Tropfflasche, oranger Deckel
AB1	<u>Mouse Anti-Dig</u>	4 ml	Tropfflasche, rosa Deckel
AB2	<u>Anti-Mouse-HRP-Polymer</u>	4 ml	Tropfflasche, violetter Deckel
SB1a	<u>DAB Solution A</u>	0,3 ml	Tropfflasche, grüner Deckel
SB1b	<u>DAB Solution B</u>	10 ml	Tropfflasche, grauer Deckel
CS1	<u>Mayer's Hematoxylin Solution</u>	20 ml	Schraubverschlussflasche, schwarz
MT4	<u>Mounting Solution (alcoholic)</u>	4 ml	Glasflasche, braun
	Gebrauchsanweisung	1	

C-3018-40 (40 Reaktionen): Komponenten **ES1**, **BS1**, **AB1**, **AB2**, **SB1a-b**, **CS1** und **MT4** sind ausreichend für 40 Reaktionen. Komponente **PT2** ist ausreichend für 7 Küvetten à 70 ml. Komponente **WB1** ist ausreichend für 8 Küvetten à 70 ml. Komponente **WB4** ist ausreichend für 28 Küvetten à 70 ml.

4. Benötigte, aber nicht bereitgestellte Materialien

- ZytoDot CISH Probe
- Positive und negative Kontrollproben
- Objektträger, positiv geladen
- Wasserbad (80°C, 98°C)
- Hybridizer oder Wärmeplatte
- Hybridizer oder Feuchtekkammer im Hybridisierungssofen
- Verstellbare Pipetten (10 µl, 1000 µl)
- Küvetten oder Färbetröge
- Stoppuhr
- Kalibriertes Thermometer
- Ethanol oder denaturierter Alkohol
- Xylol
- Methanol 100%
- Wasserstoffperoxid (H₂O₂) 30%
- Deionisiertes oder destilliertes Wasser
- Deckgläser (22 mm x 22 mm, 24 mm x 32 mm)
- Naturkautschuk-Klebstoff, z.B. Fixogum Rubber Cement (Prod. Nr. E-4005-50/-125) oder Ähnliches
- Regelmäßig gewartetes Lichtmikroskop (400-630x)

5. Lagerung und Handhabung

Bei 2-8°C in aufrechter Position lagern. Unmittelbar nach Gebrauch wieder unter Lagerbedingungen aufbewahren. Keine Reagenzien nach Ablauf des auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatums verwenden. Das Produkt ist bei sachgemäßer Handhabung bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum stabil.

6. Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

- Gebrauchsanweisung vor der Verwendung lesen!
- Reagenzien nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwenden!
- Dieses Produkt enthält Substanzen (in geringen Konzentrationen und Volumina), welche gesundheitsschädlich und potentiell infektiös sind. Jeder direkte Kontakt mit den Reagenzien muss vermieden werden. Entsprechende Schutzmaßnahmen (Verwendung von Einmalhandschuhen, Schutzbrille und Laborbekleidung) sind zu ergreifen!

- Schwerwiegende Vorfälle, die im Zusammenhang mit dem Produkt aufgetreten sind, in Übereinstimmung mit den örtlichen Vorschriften dem Hersteller sowie den zuständigen Behörden melden!
- Sollten Reagenzien mit der Haut in Kontakt kommen, die betroffenen Stellen sofort mit viel Wasser abspülen!
- Ein Sicherheitsdatenblatt ist auf Anfrage für den professionellen Anwender verfügbar.
- Die Reagenzien nicht wiederverwenden, außer die Wiederverwendung ist explizit erlaubt!
- Kreuzkontaminationen der Präparate vermeiden, da diese zu fehlerhaften Ergebnissen führen können.
- Die Präparate dürfen während der Hybridisierungs- und Waschschriffe nicht austrocknen.

Gefahren- und Sicherheitshinweise für BS1, AB1, AB2, PT2 und WB1

Die gefahrbestimmende Komponente ist ein Gemisch aus: 5-Chlor-2-methyl-2H-isothiazol-3-on [EG-Nr. 247-500-7] und 2-Methyl-2H-isothiazol-3-on [EG-Nr. 220-239-6] (3:1).



Achtung

H317	Kann allergische Hautreaktionen verursachen.
P261	Einatmen von Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol vermeiden.
P272	Kontaminierte Arbeitskleidung nicht außerhalb des Arbeitsplatzes tragen.
P280	Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen.
P302+P352	BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT: Mit viel Wasser waschen.
P333+P313	Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P362+P364	Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen.

Gefahren- und Sicherheitshinweise für SB1a:

Die gefahrbestimmende Komponente ist Biphenyl-3,3',4,4'tetrayltetraamin; Diaminobenzidin.



Gefahr

H350	Kann Krebs erzeugen.
P201	Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen.
P202	Vor Gebrauch alle Sicherheitshinweise lesen und verstehen.
P280	Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen.
P308+P313	BEI Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P405	Unter Verschluss aufbewahren.

Gefahren- und Sicherheitshinweise für SB1b

Die gefahrbestimmende Komponente ist eine Reaktionsmasse aus: 5-Chlor-2-methyl-2H-isothiazol-3-on [EG-Nr. 247-500-7] und 2-Methyl-2H-isothiazol-3-on [EG-Nr. 220-239-6] (3:1).



Danger

H317	Kann allergische Hautreaktionen verursachen.
H360D	Kann das Kind im Mutterleib schädigen.
P201	Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen.
P261	Einatmen von Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol vermeiden.
P280	Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen.
P302+P352	BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT: Mit viel Wasser waschen.
P308+P313	BEI Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P362+P364	Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen.

Gefahren- und Sicherheitshinweise für MT4:

Die gefahrbestimmende Komponente ist Xylol.



Achtung

H226	Flüssigkeit und Dampf entzündbar.
H312+H332	Gesundheitsschädlich bei Hautkontakt oder Einatmen.
H315	Verursacht Hautreizungen.
H319	Verursacht schwere Augenreizung.
H335	Kann die Atemwege reizen.
H373	Kann die Organe schädigen bei längerer oder wiederholter Exposition.
P210	Von Hitze, heißen Oberflächen, Funken, offenen Flammen und anderen Zündquellen fernhalten. Nicht rauchen.
P260	Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol nicht einatmen.
P280	Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen.
P305+P351+P338	BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser ausspülen. Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter ausspülen.
P337+P313	Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P403+P235	An einem gut belüfteten Ort aufbewahren. Kühl halten.
EUH208	Enthält Methyl-methacrylat; Methyl 2-methylprop-2-enoat; MMA. Kann allergische Reaktionen hervorrufen.

Gefahren- und Sicherheitshinweise für CS1 und WB4:

Das Produkt ist nicht als gefährlich eingestuft im Sinne der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008.

Besondere Kennzeichnung von ES1:

EUH208	Enthält Pepsin A. Kann allergische Reaktionen hervorrufen.
EUH210	Sicherheitsdatenblatt auf Anfrage erhältlich.

7. Einschränkungen

- Für die Verwendung als *In-vitro*-Diagnostikum.
- Nur für die professionelle Anwendung.
- Nur für den nicht-automatisierten Gebrauch.
- Die klinische Interpretation jeglicher positiven Färbung bzw. deren Abwesenheit muss im Kontext mit der klinischen Anamnese, Morphologie, anderer histopathologischer Kriterien sowie weiterer diagnostischer Tests erfolgen. Es obliegt der Verantwortung eines qualifizierten Pathologen, mit ISH Sonden, Reagenzien, Diagnose-Panels und den zur Erstellung von gefärbten Präparaten verwendeten Methoden vertraut zu sein. Die Färbung ist in einem zertifizierten, zugelassenen Labor unter Aufsicht eines unter der Aufsicht eines Pathologen/Humangenetiklers durchzuführen, der für die Auswertung der Färbepreparate und für die Sicherstellung der Eignung von positiven und negativen Kontrollen verantwortlich ist.
- Die Färbung der Präparate, insbesondere die Signalintensität und die Hintergrundfärbung, ist abhängig von der Behandlung und Prozessierung der Präparate vor der Färbung. Unsachgemäßes Fixieren, Einfrieren, Auftauen, Waschen, Trocknen, Erhitzen, Schneiden oder Kontamination mit anderen Präparaten oder Flüssigkeiten können Artefakte oder falsche Ergebnisse verursachen. Inkonsistente Ergebnisse können von Variationen bei Fixierungs- und Einbettungsverfahren sowie von inhärenten Unregelmäßigkeiten innerhalb des Präparates resultieren.
- Die Leistung wurde unter Verwendung der in dieser Gebrauchsanweisung beschriebenen Verfahren validiert. Abweichungen von diesen Verfahren können die Leistung beeinflussen und müssen vom Anwender validiert werden. Dieses IVD ist nur dann CE-zertifiziert, wenn es wie in dieser Gebrauchsanweisung beschrieben im Rahmen des Verwendungszwecks eingesetzt wird.

8. Störsubstanzen

Folgende Fixierungen sind nicht kompatibel mit ISH:

- Bouin Fixierung
- B5 Fixierung
- Saure Fixiermittel (z.B. Pikrinsäure)
- Zenker Fixierung
- Alkohole (bei alleiniger Verwendung)
- Quecksilberchlorid
- Formaldehyd/Zink Fixiermittel
- Hollande Fixierung
- Ungepuffertes Formalin

9. Vorbereitung der Präparate

Empfehlungen:

- Kreuzkontaminationen der Präparate vermeiden, da diese zu fehlerhaften Ergebnissen führen können.
- Fixierung in 10% neutral gepuffertem Formalin für 24h bei Raumtemperatur (18-25°C).
- Probengröße ≤ 0,5 cm³.
- Qualitativ hochwertiges Paraffin verwenden.
- Das Einbetten sollte bei Temperaturen unter 65°C erfolgen.
- 3-5 µm dicke Mikrotomschnitte anfertigen.
- Positiv geladene Objektträger verwenden.
- Für 2-16h bei 50-60°C fixieren.

10. Vorbereitung der Reagenzien

PBS/Tween (WB4) ist wie in der Gebrauchsanweisung unter 11. „Durchführung“ beschrieben vorzubereiten. Alle anderen Reagenzien des Produkts sind gebrauchsfertig. Kein Rekonstituieren, Mischen oder Verdünnen ist notwendig.

11. Durchführung

11.1 Tag 1

Vorbereitende Schritte

- (1) Eine Ethanolreihe (70%, 90% und 100% Ethanol) vorbereiten: 100% Ethanol mit deionisiertem oder destilliertem Wasser verdünnen. Diese Lösungen können in geeigneten Gefäßen aufbewahrt und wiederverwendet werden.

- (2) Heat Pretreatment Solution EDTA (PT2): In einer abgedeckten Küvette auf 98°C erwärmen.
- (3) Vorbereitung von 3% H₂O₂: 1 Teil 30% H₂O₂ mit 9 Teilen 100% Methanol verdünnen.
- (4) ZytoDot CISH Probe: Vor der Verwendung auf Raumtemperatur (RT) bringen.

Vorbehandlung (Entparaffinierung/Proteolyse)

- (1) Die Objektträger für 10 min bei 70°C inkubieren (z.B., auf einer Wärmeplatte).
- (2) Die Objektträger für 2x 5 min in Xylol inkubieren.
- (3) Die Objektträger für 3x 3 min in 100% Ethanol inkubieren.
- (4) Die Objektträger für 5 min in 3% H₂O₂ inkubieren.
- (5) 2x 1 min in deionisiertem oder destilliertem Wasser waschen.
- (6) Für 15 min in vorgewärmter Heat Pretreatment Solution EDTA (PT2) bei 98°C inkubieren.

Wir empfehlen, acht Objektträger pro Färbetrog zu verwenden (falls notwendig, Dummy-Objektträger hinzufügen).

- (7) Die Objektträger sofort in destilliertes oder deionisiertes Wasser überführen und für 2x 2 min waschen.
- (8) Pepsin Solution (ES1) (tropfenweise) auf die Präparate auftragen und für 5-15 min bei 37°C in einer Feuchteammer inkubieren.

ES1 kann Präzipitate bilden, welche nicht die Qualität beeinflussen.

Generell wird eine Bestimmung der optimalen Dauer der Proteolyse in Vortests empfohlen.

- (9) Die Objektträger in deionisiertes oder destilliertes Wasser eintauchen.
- (10) Dehydrierung für jeweils 1 min in 70%, 90% und 100% Ethanol.
- (11) Schnitte an der Luft trocknen.

Bitte beachten: Die Schnitte vollständig trocknen lassen, bevor die Sonde aufgetragen wird.

Denaturierung und Hybridisierung

- (1) 10 µl der Sonde auf jedes der vorbehandelten Präparate pipettieren.
- (2) Die Präparate mit 22 mm x 22 mm Deckgläsern abdecken (Einschluss von Luftbläschen vermeiden) und das Deckglas versiegeln.

Wir empfehlen die Verwendung von Naturkautschuk-Klebstoff (z.B. Fixogum) zum Versiegeln.

- (3) Die Objektträger auf einer Wärmeplatte oder in einem Hybridizer platzieren und die Proben für 5 min bei 94-95°C denaturieren.
- (4) Die Objektträger in eine Feuchteammer überführen und über Nacht bei 37°C hybridisieren (z.B. in einem Hybridisierungsöfen).

Es ist essentiell, dass die Präparate während des Hybridisierungsschritts nicht austrocknen.

11.2 Tag 2

Vorbereitende Schritte

- (1) Wash Buffer SSC (WB1): Für die Stringenzwaschung in einer abgedeckten Küvette auf 80°C erwärmen. **WB1** kann bei 2-8°C Präzipitate bilden, welche nicht die Qualität beeinflussen und sich durchs Erwärmen lösen sollten.
- (2) Vorbereitung von Wash Buffer PBS/Tween: 1 Tablette PBS/Tween (WB4) zu 1000 ml deionisiertem oder destilliertem Wasser geben und lösen.

Der Wash Buffer PBS/Tween ist bei 2-8°C eine Woche lang haltbar.

- (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): Vor der Verwendung auf Raumtemperatur bringen.

Post-Hybridisierung und Detektion

- (1) Vorsichtig den Naturkautschuk-Klebstoff oder Kleber entfernen.
- (2) Durch das Eintauchen der Objektträger in Wash Buffer SSC (WB1) für 5 min bei Raumtemperatur das Deckglas entfernen.

WB1 kann einmal wiederverwendet werden. Maximal für eine Woche bei 2-8°C aufbewahren.

- (3) Die Objektträger mit Wash Buffer SSC (WB1) für 5 min bei 80°C waschen.

Wir empfehlen, acht Objektträger pro Färbetrog zu verwenden (falls notwendig, Dummy-Objektträger hinzufügen).

- (4) Für 2x 1 min in deionisiertem oder destilliertem Wasser waschen.
- (5) Die Objektträger in PBS/Tween eintauchen.
- (6) Blocking Solution (BS1) (1-2 Tropfen pro Objektträger) auftragen und für 10 min bei RT inkubieren.

- (7) Blocking Solution (BS1) abtupfen, **aber nicht abspülen!**
- (8) Mouse-Anti-DIG (AB1) (1-2 Tropfen pro Objektträger) auftragen und für 30 min bei RT inkubieren.
- (9) Die Objektträger 3x 1 min in PBS/Tween waschen.
- (10) Anti-Mouse-HRP-Polymer (AB2) (1-2 Tropfen pro Objektträger) auftragen und für 30 min bei RT inkubieren.
- (11) Die Objektträger 3x 1 min in PBS/Tween waschen.
- (12) DAB Solution (Gebrauchslösung) ansetzen: 1 ml DAB Solution B (SB1b) in ein graduiertes Reaktionsgefäß geben und einen Tropfen (30 µl) DAB Solution A (SB1a) hinzufügen. Gut mischen.
- (13) DAB Solution (1-2 Tropfen pro Objektträger) auftragen und für 30 min bei RT inkubieren.
- (14) Die Objektträger in eine Küvette überführen und für 2 min unter fließendem kaltem Leitungswasser waschen.
- (15) Die Präparate für 5-10 sec mit Mayer's Hematoxylin Solution (CS1) gegenfärben.
- (16) Die Objektträger in eine Küvette überführen und für 2 min unter fließendem kaltem Leitungswasser waschen.
- (17) Dehydrierung für jeweils 1 min in 70%, 90% und 100% Ethanol.
- (18) Die Objektträger 2x 2 min in Xylol (sehr reines Xylol verwenden) inkubieren.
- (19) Die Präparate mit einem Deckglas (22 mm x 22 mm; 24 mm x 32 mm) mit Hilfe von Mounting Solution (alcoholic) (MT4) abdecken, dabei den Einschluss von Luftbläschen vermeiden. 20-30 min warten, bis das Deckgläschen nicht mehr beweglich ist.

Die Verwendung einer abgeschnittenen Pipettenspitze zur Vergrößerung der Öffnung kann das Pipettieren erleichtern.

- (20) Die gefärbten Präparate mit einem Lichtmikroskop auswerten..

12. Interpretation der Ergebnisse

Bei Verwendung des ZytoDot CISH Implementation Kits erscheinen die Hybridisierungssignale der Digoxigenin-markierten Polynukleotide als braun- bis dunkelbraun gefärbte eindeutige Punkte. In Interphasen oder Metaphasen von normalen Zellen oder Zellen ohne eine chromosomale Aberration der untersuchten Chromosomen, erscheinen zwei Signale pro Zielsequenz. Ausnahmen sind Sonden, welche gegen X- und/oder Y-Chromosomen gerichtet sind, was je nach Geschlecht und Sonde in entweder kein bis zwei Signalen resultiert. In Zellen mit chromosomaler Aberration kann ein anderes Signalmuster in Interphasen oder Metaphasen beobachtet werden. Weitere Informationen zur Interpretation der Ergebnisse sind in der Gebrauchsanleitung der jeweiligen ZytoDot CISH Sonde zu finden.

13. Empfohlene Qualitätskontrollverfahren

Die Gebrauchsanweisung der jeweiligen ZytoVision Sonde beachten.

14. Leistungsmerkmale

Die Gebrauchsanweisung der jeweiligen ZytoVision Sonde beachten.

15. Entsorgung

Die Entsorgung der Reagenzien muss in Übereinstimmung mit den örtlichen Vorschriften erfolgen.

16. Fehlerbehebung

Jede Abweichung von der Gebrauchsanweisung kann zu schwachen bis gar keinen Färbungen führen.

Schwache oder keine Signale

Mögliche Ursache	Lösung
Proteolytische Vorbehandlung nicht optimal	Die Inkubationszeit mit Pepsin optimieren, falls notwendig erhöhen oder reduzieren

Verdunstung der Sonde	Bei der Nutzung eines Hybridizers ist die Verwendung von feuchten Vliesstreifen/Wassertanks erforderlich. Bei der Nutzung eines Hybridisierungsofens muss eine Feuchtekammer verwendet werden. Zusätzlich sollte das Deckglas, z.B. mit Fixogum, vollständig versiegelt werden, um ein Austrocknen der Präparate während der Hybridisierung zu verhindern
Unzureichende Vorbereitung des chromogenen Substrates	Anstelle von einem Tropfen der DAB Solution A 30 µl verwenden
Dauer der Gegenfärbung zu lang	Dunkle Gegenfärbungen vermeiden, da diese positive Signale verdecken könnten
Bläuen der Gegenfärbung nicht ausreichend durchgeführt	Für das Bläuen kaltes Leitungswasser verwenden; kein warmes bzw. heißes Wasser oder Bläuungsreagenzien verwenden

Signale sind zu stark

Mögliche Ursache	Lösung
Dauer der proteolytischen Vorbehandlung zu lang	Die Inkubationszeit mit Pepsin optimieren, falls notwendig erhöhen oder reduzieren
Substratreaktion ist zu stark	Inkubationszeit des Substrates verkürzen; die Substratlösung nicht über 25°C erhitzen; nur bei Raumtemperatur inkubieren

Signale verblassen oder verschmelzen

Mögliche Ursache	Lösung
Verwendung eines ungeeigneten Eindeckmediums	Nur das Eindeckmedium, welches mit dem Kit zur Verfügung gestellt wird, oder Xylol-basierte Eindeckmedien frei von Unreinheiten verwenden; keine Eindeckfolie verwenden

Ungleichmäßige oder teils nur sehr leichte Färbung

Mögliche Ursache	Lösung
Unvollständiges Entparaffinieren	Frische Lösungen verwenden, Dauer des Entparaffinierens überprüfen
Volumen der Reagenzien zu gering	Sicherstellen, dass das Volumen der Reagenzien groß genug ist, um den Bereich des Gewebes zu bedecken

Inkonsistente Ergebnisse

Mögliche Ursache	Lösung
Unzureichende Trocknung vor Applikation der Sonde	Lufttrocknung verlängern
Zu viel Wasser/Waschpuffer auf dem Gewebe vor Applikation von Pepsin, Antikörpern und/oder Farbsubstraten	Überschüssige Flüssigkeit durch Abklopfen oder Abschütteln des Objektträgers von dem Gewebeschnitt entfernen. Kleinere Mengen an restlichem Wasser/Waschpuffer beeinträchtigen nicht den Test
Variierende Methoden der Gewebefixierung oder Einbettung	Methoden der Fixierung und Einbettung optimieren
Variierende Gewebedicke	Schneiden optimieren

Degradierete Morphologie

Mögliche Ursache	Lösung
Zell- oder Gewebeproben sind nicht optimal fixiert	Die Fixierzeit und das Fixiermittel optimieren

Proteolytische Vorbehandlung nicht optimal ausgeführt	Die Inkubationszeit mit Pepsin reduzieren
---	---

Kreuzhybridisierungssignale, Hintergrundsignale

Mögliche Ursache	Lösung
Schnitte sind irgendwann während oder nach der Hybridisierung ausgetrocknet	Das Austrocknen der Schnitte vermeiden; Feuchtekammern verwenden; Deckglas sorgfältig abdichten
Verlängerte Inkubationszeit des Substrates	Inkubationszeit des Substrates verkürzen
Unvollständiges Entparaffinieren	Frische Lösungen verwenden, Dauer des Entparaffinierens überprüfen
Proteolytische Vorbehandlung zu stark	Inkubationszeit von Pepsin optimieren
Objektträger sind vor der Hybridisierung auf Raumtemperatur abgekühlt	Die Objektträger zügig auf Hybridisierungstemperatur überführen

Überlagernde Zellkerne

Mögliche Ursache	Lösung
Ungeeignete Dicke der Gewebeschnitte	3-5 μm dicke Mikrotomschnitte anfertigen

Präparat löst sich vom Objektträger

Mögliche Ursache	Lösung
Proteolytische Vorbehandlung ist zu stark	Inkubationszeit mit Pepsin reduzieren

17. Literatur

- 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. Revision

Revision	Beschreibung der Änderung
1.2.1	11. Durchführung Der Wash Buffer PBS/Tween ist bei 2-8°C eine Woche lang haltbar.



www.zytovision.com

Die aktuellste Version der Gebrauchsanleitungen sowie Gebrauchsanleitungen in verschiedenen Sprachen sind auf www.zytovision.com verfügbar.

Unsere Experten stehen Ihnen für Ihre Fragen zur Verfügung.
Bitte kontaktieren Sie helptech@zytovision.com



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

Warenzeichen:

ZytoVision® und ZytoDot® sind Warenzeichen der ZytoVision GmbH.