



ZytoDot 2C CISH Implementation Kit

REF C-3044-10 Σ 10

REF C-3044-40 Σ 40

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

4250380N717V



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

1. Verwendungszweck

ZytoDot 2C CISH Implementation Kit ist für die Verwendung in Kombination mit Digoxigenin/Dinitrophenyl-markierten ZytoDot 2C CISH 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 2C CISH Implementation Kit ist verfügbar in zwei Größen und besteht aus:

Code	Komponente	Menge		Gefäß
		40	10	
PT2	<u>Heat Pretreatment Solution EDTA</u>	500 ml	150 ml	Schraubverschlussflasche (groß)
ES1	<u>Pepsin Solution</u>	4 ml	1 ml	Tropfflasche, weißer Deckel
WB1	<u>Wash Buffer SSC</u>	560 ml	210 ml	Schraubverschlussflasche (groß)
WB5	<u>20x Wash Buffer TBS</u>	2x 50 ml	50 ml	Schraubverschlussflasche
AB14	<u>Anti-DIG/DNP-Mix</u>	4 ml	1 ml	Tropfflasche, gelber Deckel
AB13	<u>HRP/AP-Polymer-Mix</u>	4 ml	1 ml	Tropfflasche, blauer Deckel
SB6a	<u>AP-Red Solution A</u>	0,4 ml	0,1 ml	Tropfflasche, roter Deckel (klein)
SB6b	<u>AP-Red Solution B</u>	15 ml	4 ml	Tropfflasche, roter Deckel
SB7a	<u>HRP-Green Solution A</u>	0,8 ml	0,2 ml	Tropfflasche, grüner Deckel (klein)
SB7b	<u>HRP-Green Solution B</u>	15 ml	4 ml	Tropfflasche, grüner Deckel
CS2	<u>Nuclear Blue Solution</u>	20 ml	4 ml	Schraubverschlussflasche, schwarz
MT4	<u>Mounting Solution (alcoholic)</u>	4 ml	1 ml	Glasflasche, braun
	AP-Red Reaktionsgefäß	2	1	Graduiertes Reaktionsgefäß, roter Deckel
	HRP-Green Reaktionsgefäß	2	1	Graduiertes Reaktionsgefäß, grüner Deckel
	Gebrauchsanweisung	1	1	

C-3044-10 (10 Reaktionen): Komponenten **ES1**, **AB14**, **AB13**, **SB6a-b**, **SB7a-b**, **CS2** und **MT4** sind ausreichend für 10 Reaktionen. Komponente **PT2** ist ausreichend für 2 Küvetten à 70 ml. Komponente **WB1** ist ausreichend für 3 Küvetten à 70 ml. Komponente **WB5** ist ausreichend für 14 Küvetten à 70 ml.

C-3044-40 (40 Reaktionen): Komponenten **ES1**, **AB14**, **AB13**, **SB6a-b**, **SB7a-b**, **CS2** 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 **WB5** ist ausreichend für 28 Küvetten à 70 ml.

4. Benötigte, aber nicht bereitgestellte Materialien

- ZytoDot 2C CISH Sonde
- Positive und negative Kontrollproben
- Objektträger, positiv geladen
- Wasserbad (80°C, 98°C)
- Hybridizer oder Wärmeplatte
- Hybridizer oder Feuchtekommer 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 Waschstreps nicht austrocknen.

Gefahren- und Sicherheitshinweise für AB13, AB14, PT2, SB7b, WB1 und WB5:

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).



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 SB7a:

Die gefahrbestimmende Komponenten sind Methanol und 30 % Wasserstoffperoxid in Lösung.



Gefahr

- H225 Flüssigkeit und Dampf leicht entzündbar.
- H301+H311 Giftig bei Verschlucken, Hautkontakt oder Einatmen. +H331
- H370 Schädigt die Organe.
- P210 Von Hitze, heißen Oberflächen, Funken, offenen Flammen und anderen Zündquellen fernhalten. Nicht rauchen.
- P233 Behälter dicht verschlossen halten.
- P260 Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol nicht einatmen.
- P280 Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen.
- P308+P311 BEI Exposition oder falls betroffen: GIFTINFORMATIONSZENTRUM/Arzt anrufen.
- P403+P235 An einem gut belüfteten Ort aufbewahren. Behälter dicht verschlossen halten.

Gefahren- und Sicherheitshinweise für CS2:

Die gefahrbestimmende Komponenten sind Ethandiol (vgl. Glykol).



Achtung

- H373 Kann die Organe schädigen bei längerer oder wiederholter Exposition.
- P260 Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol nicht einatmen.
- P314 Bei Unwohlsein ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.

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 SB6a:

- H412 Schädlich für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.
- P273 Freisetzung in die Umwelt vermeiden.

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/Humangenetikers 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 $\leq 0,5 \text{ cm}^3$.
- 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

20x Wash Buffer TBS (WB5) 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

- 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.
- Heat Pretreatment Solution EDTA (PT2): In einer abgedeckten Küvette auf 98°C erwärmen.
- Vorbereitung von 3% H_2O_2 : 1 Teil 30% H_2O_2 mit 9 Teilen 100% Methanol verdünnen.
- ZytoDot 2C CISH Probe: Vor der Verwendung auf Raumtemperatur bringen.

Vorbehandlung (Entparaffinierung/Proteolyse)

- Die Objektträger für 10 min bei 70°C inkubieren (z.B. auf einer Wärmeplatte).
- Die Objektträger für 2x 5 min in Xylol inkubieren.
- Die Objektträger für 3x 3 min in 100% Ethanol inkubieren.
- Die Objektträger für 5 min in 3% H_2O_2 inkubieren.
- 2x 1 min in deionisiertem oder destilliertem Wasser waschen.
- 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).

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

ES1 kann Präzipitate bilden, welche nicht die Qualität beeinflussen.

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

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

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

Denaturierung und Hybridisierung

- 10 μl der Sonde auf jedes der vorbehandelten Präparate pipettieren.
- 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.

- Die Objektträger auf einer Wärmeplatte oder in einem Hybridizer platzieren und die Proben für 5 min bei 79°C denaturieren.
- Die Objektträger in eine Feuchtekammer überführen und über Nacht bei 37°C hybridisieren (z.B. in einem Hybridisierungssofen).

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

11.2 Tag 2

Vorbereitende Schritte

- 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.
- Vorbereitung von 1x Wash Buffer TBS: 1 Teil 20x Wash Buffer TBS (WB5) mit 19 Teilen deionisiertem oder destilliertem Wasser verdünnen.

Der verdünnte 1x Wash Buffer TBS ist bei 2-8°C eine Woche lang haltbar.

- 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): Vor der Verwendung auf Raumtemperatur bringen.

*Die Komponenten **SB7a** und **SB7b** können Präzipitate bilden, welche nicht die Qualität der Färbung beeinflussen.*

Post-Hybridisierung und Detektion

- Vorsichtig den Naturkautschuk-Klebstoff oder Kleber entfernen.
- 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.

- 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).

- Die Objektträger 2x 1 min in deionisiertem oder destilliertem Wasser waschen.
- Die Objektträger in 1x Wash Buffer TBS eintauchen.
- Anti-DIG/DNP-Mix (AB14) (1-2 Tropfen pro Objektträger) auf die Objektträger geben und für 15 min bei 37°C in einer Feuchtekammer inkubieren.
- Die Objektträger 3x 1 min in 1x Wash Buffer TBS waschen.
- HRP/AP-Polymer-Mix (AB13) (1-2 Tropfen pro Objektträger) auf die Objektträger geben und für 15 min bei 37°C in einer Feuchtekammer inkubieren.
- Die Objektträger 3x 1 min in 1x Wash Buffer TBS waschen.
- AP-Red Solution (working solution) vorbereiten: 1 ml AP-Red Solution B (**SB6b**) in ein graduiertes Reaktionsgefäß geben und



einen Tropfen (30 µl) AP-Red Solution A (**SB6a**) hinzufügen. Gut mischen.

11. AP-Red Solution (1-2 Tropfen pro Objektträger) auf die Objektträger geben und für 10 min bei Raumtemperatur (RT) lichtgeschützt inkubieren.
12. Während der Inkubation HRP-Green Solution (working solution) vorbereiten: 1 ml HRP-Green Solution B (**SB7b**) in ein graduiertes Reaktionsgefäß geben und zwei Tropfen (2x 20 µl) HRP-Green Solution A (SB7a) hinzufügen. Gut mischen.
13. Die Objektträger für 2 min in deionisiertem oder destilliertem Wasser waschen.
14. HRP-Green Solution tropfenweise (1-2 Tropfen pro Objektträger) auf die Objektträger geben und für 10 min bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubieren.
15. Die Objektträger für 2 min in deionisiertem oder destilliertem Wasser waschen.
16. Die Präparate für 2 min mit Nuclear Blue Solution (CS2) gegenfärben.
17. Die Objektträger in eine Küvette überführen und 2 min unter kaltem fließendem Leitungswasser waschen.
18. 3x 30 s in 100% Ethanol dehydrieren (sehr reines Ethanol verwenden).
19. Die Objektträger für 2x 30 s in Xylol inkubieren (sehr reines Xylol verwenden).

Die Inkubationszeit nicht verlängern oder verkürzen, da dies zum Verlust der Signale führen könnte!

20. 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.

21. Die gefärbten Präparate mit einem Lichtmikroskop auswerten.

12. Interpretation der Ergebnisse

Bei Verwendung des ZytoDot 2C CISH Implementation Kits erscheinen die Hybridisierungssignale der Digoxigenin-markierten Polynukleotide als dunkelgrün gefärbte eindeutige Punkte und Dinitrophenyl-markierte Polynukleotide erscheinen als hellrot 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 2C 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
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
Inkubationszeit mit AP-Red Solution nicht korrekt	Falls erforderlich kann die Inkubationszeit bis auf 5 min verkürzt werden; die Substratlösung nicht über 25°C erhitzen; nur bei Raumtemperatur inkubieren
Inkubationszeit mit HRP-Green Solution nicht korrekt	Falls erforderlich, kann die Inkubationszeit bis auf 7 min verkürzt werden; die Substratlösung nicht über 25°C erhitzen; nur bei Raumtemperatur inkubieren

Rote Signale zu schwach

Mögliche Ursache	Lösung
AP-Red Solution wurde starkem direktem Licht ausgesetzt	AP-Red Solution vor starkem direktem Licht geschützt vorbereiten und verwenden
AP-Red Solution wurde zu früh vorbereitet	Vor der sofortigen Verwendung vorbereiten
Inkubationszeit mit AP-Red Solution nicht korrekt	Falls erforderlich kann die Inkubationszeit bis zu 15 min verlängert werden
Unzureichende Vorbereitung des chromogenen Substrates	Das Volumen von Solution A nicht erhöhen

Grüne Signale zu schwach

Mögliche Ursache	Lösung
Inkubationszeit der Waschschritte nach der Färbung mit HRP-Green zu lang	Die angegebenen Inkubationszeiten nicht überschreiten
Inkubationszeit mit HRP-Green Solution nicht korrekt	Falls erforderlich kann die Inkubationszeit bis zu 15 min verlängert werden
Unzureichende Vorbereitung des chromogenen Substrates	Das Volumen von Solution A nicht erhöhen

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

Schnitte wurden nicht ausreichend dehydriert	Frische Ethanol- und Xylol-Lösungen verwenden, nur Xylol mit „reiner“ Qualität 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

Degradierte 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.
- 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. Revision

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.