



ZytoFast PLUS CISH Implementation Kit HRP-DAB

REF T-1063-40

40

A utiliser dans les procédures d'hybridation chromogénique in situ (CISH)

4250380N567Z



Dispositif médical de diagnostic *in vitro*
conformément à l'IVDR (UE) 2017/746

1. Utilisation prévue

Le ZytoFast PLUS CISH Implementation Kit HRP- est destiné à être utilisé en association avec les sondes ZytoFast marquées à la digoxigénine sur des échantillons fixés au formol et inclus en paraffine par hybridation *in situ* chromogénique (CISH).

Ce produit est destiné à un usage professionnel uniquement. Tous les tests utilisant le produit doivent être réalisés dans un laboratoire d'anatomie pathologique certifié et agréé, sous la supervision d'un médecin pathologiste/généticien, par du personnel qualifié.

2. Principe du test

La technique d'hybridation chromogénique in situ (CISH) permet la détection et la visualisation de séquences d'acides nucléiques spécifiques dans des préparations cellulaires. Les fragments de nucléotides marqués par des haptènes, appelés sondes CISH, et leurs séquences cibles complémentaires dans les préparations sont codénaturés et ensuite hybridés pendant l'hybridation. Les fragments de sondes non spécifiques et non liés sont éliminés par des étapes de lavage stringent. La formation de duplex de la sonde marquée peut être visualisée en utilisant des anticorps primaires (non marqués), qui sont détectés par des anticorps secondaires polymérisés conjugués à une enzyme. La réaction enzymatique avec les substrats chromogènes conduit à la formation de précipités colorés. Après avoir contre-coloré le noyau avec un colorant nucléaire, les fragments de sonde hybridés sont visualisés au microscope optique.

3. Réactifs fournis

Le ZytoFast PLUS CISH Implementation Kit HRP-DAB est disponible en une seule taille et se compose de:

Code	Composant	Quantité 40	Conteneur
PT2	Heat Pretreatment Solution EDTA	500 ml	Flacon avec bouchon à visser (grand)
ES1	Pepsin Solution	4 ml	Flacon compte-gouttes, bouchon blanc
WB5	20x Wash Buffer TBS	4x 50 ml	Flacon avec bouchon à visser
AB1	Mouse-Anti-Dig	4 ml	Flacon compte-gouttes,, bouchon rose
AB2	Anti-Mouse-HRP-Polymer	4 ml	Flacon compte-gouttes,, bouchon violet
SB1a	DAB Solution A	0.3 ml	Flacon compte-gouttes, bouchon vert (petit)
SB1b	DAB Solution B	10 ml	Flacon compte-gouttes,, bouchon gris
CS2	Nuclear Blue Solution	20 ml	Flacon avec bouchon à visser, noir
MT4	Mounting Solution (alcoholic)	4 ml	Bouteille en verre, marron
	Mode d'emploi	1	

T-1063-40 (40 tests): Les composants **ES1**, **AB1**, **AB2**, **SB1a-b**, **CS2** et **MT4** sont suffisants pour 40 réactions. Le composant **PT2** est suffisant pour 7 pots de coloration de 70 ml chacun. Le composant **WB5** est suffisant pour 57 pots de coloration de 70 ml chacun.

4. Matériel requis mais non fourni

- Sonde ZytoFast CISH marquée à la digoxigénine
- Échantillons de contrôle positifs et négatifs
- Lames pour microscope, chargées positivement
- Bain-marie (80°C, 98°C)
- Appareil à hybridation ou plaque chauffante
- Appareil à hybridation ou chamber humide
- Pipettes ajustable (10 µl, 1000 µl)
- Bocaux ou bains de coloration
- Minuteur
- Thermomètre calibré
- Ethanol ou alcool
- Xylène
- Méthanol 100%
- Peroxide d'hydrogène (H₂O₂) 30%
- Eau dionisée ou distillée
- Lamelles (22 mm x 22 mm, 24 mm x 32 mm)
- Ciment caoutchouc, par exemple, Fixogum Rubber Cement (Prod. No. E-4005-50/-125) ou similaire
- Microscope lumineux correctement entretenu (400-630x)

5. Stockage et manipulation

Conserver entre 2 et 8 °C dans une position verticale. Remettre dans les conditions de stockage immédiatement après utilisation. Ne pas utiliser les réactifs après leur date de péremption indiquée sur l'étiquette. Le produit est stable jusqu'à sa date de péremption indiquée sur l'étiquette lorsqu'il est utilisé dans les bonnes conditions.

6. Avertissements et précautions

- Lire les instructions avant utilisation !
- Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption.
- Ce produit contient des substances (en faibles concentrations et volumes) nocifs pour la santé et potentiellement infectieux. Eviter le contact direct avec ces réactifs. Prenez les mesures de protection appropriées (utilisez des gants jetables, des lunettes de protection et des vêtements de laboratoire) !

Mentions de danger et conseils de prudence pour SB1b:

Le composant dangereux déterminant est un mélange de 5-chloro-2-méthyl-4-isothiazoline-3-one [EC n° 247-500-7] et 2-méthyl-2H-isothiazol-3-one [EC n° 220-239-6] (3:1).



Danger

H317	Peut provoquer une allergie cutanée.
H360D	Peut nuire au fœtus.
P201	Se procurer les instructions avant utilisation.
P202	Ne pas manipuler avant d'avoir lu et compris toutes les précautions de sécurité.
P261	Éviter de respirer les poussières/ fumées/ gaz/ brouillards/ vapeurs/ aérosols.
P280	Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage.
P302+P352	EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU: laver abondamment à l'eau.
P362+P364	Enlever les vêtements contaminés et les laver avant réutilisation.
P308+P313	EN CAS d'exposition prouvée ou suspectée: consulter un médecin.

Étiquetage particulier de ES1:

EUH208	Contient de la pepsine A. Peut produire une réaction allergique.
EUH210	Fiche de données de sécurité disponible sur demande.

7. Restrictions

- Destiné à une utilisation en diagnostic *in vitro*.
- Destiné à un usage professionnel uniquement.
- Pour une utilisation non automatisée uniquement.
- L'interprétation clinique de toute coloration positive, ou de son absence, doit prendre en compte le contexte l'historique clinique, de la morphologie, d'autres critères histopathologiques ainsi que d'autres tests de diagnostic. Il est de la responsabilité d'un médecin pathologiste/généticien qualifié de se familiariser avec les sondes HIS, les réactifs, les panels de diagnostic et les méthodes utilisées pour le marquage des échantillons. Le marquage doit être effectué dans un laboratoire certifié et agréé, sous la supervision d'un pathologiste/généticien qui est responsable de l'examen des lames colorées et de la vérification de l'adéquation des contrôles positifs et négatifs.
- La coloration de l'échantillon, en particulier l'intensité du signal et le bruit de fond, dépend de la manipulation et de la préparation de l'échantillon avant marquage. Une mauvaise fixation, congélation, décongélation, un mauvais lavage, séchage, chauffage, de mauvaises coupes, ou une contamination avec d'autres échantillons ou fluides peut produire des artefacts et de faux résultats. Des résultats incohérents peuvent résulter des variations des méthodes de fixation et d'inclusion, ainsi que des irrégularités inhérentes à l'échantillon.
- Les performances ont été validées en utilisant les procédures décrites dans le mode d'emploi de la sonde ZytoVision et du kit d'implémentation) respectifs. Des modifications de ces procédures peuvent altérer les performances et doivent être validées par l'utilisateur. Ce produit IVD est uniquement certifié CE lorsqu'il est utilisé comme décrit dans ce mode d'emploi pour une utilisation dans le cadre de l'utilisation prévue.

8. Substances interférentes

Les fixateurs suivants sont incompatibles avec l'ISH:

- Fixateur de Bouin
- Fixateur B5
- Fixateurs acides (par exemple, l'acide picrique)
- Fixateur de Zenker
- Alcools (lorsqu'ils sont utilisés seuls)
- Chlorure mercurique
- Fixateur de formaldéhyde/zinc
- Fixateur de Hollande
- Formol non tamponné

9. Préparation des échantillons

Recommandations:

- Évitez la contamination croisée des échantillons, car elle peut entraîner des résultats erronés.
- Fixation dans de la formaldéhyde à 10% tamponnée de manière neutre pendant 24 h à température ambiante (RT, 18°C-25°C).
- Taille de l'échantillon $\leq 0,5 \text{ cm}^3$.
- Utiliser de la paraffine de première qualité.
- L'incorporation doit être effectuée à des températures inférieures à 65°C.
- Préparer des sections de microtome de 3 à 5 μm .
- Utiliser des lames de microscope à charge positive.
- Fixez les coupes de tissu pendant 2 à 16 heures à 50-60°C.

10. Traitement préparatoire du produit

20x Wash Buffer TBS (WB5) doit être préparé selon les instructions de la section 12. "Procédure d'essai". Tous les autres réactifs du kit sont prêts à l'emploi. Aucune reconstitution, mélange ou dilution n'est nécessaire.

11. Protocole

Étapes préparatoires

- (1) (*Facultatif*) Préparer une série d'éthanol (solutions à 70 %, 90 % et 100 % d'éthanol) : Diluer l'éthanol à 100 % avec de l'eau déionisée ou distillée. Ces solutions peuvent être stockées dans des récipients appropriés et peuvent être réutilisées.
 - (2) Heat Pretreatment Solution EDTA (PT2) : chauffer à 98°C dans un bocal de coloration couvert.
 - (3) Préparation de 1x Wash Buffer TBS : Diluer 1 partie de 20x Wash Buffer TBS (WB5) dans 19 parties d'eau déionisée ou distillée.
- Le 1x Wash Buffer TBS dilué est stable pendant une semaine lorsqu'il est stocké à 2-8°C.*
- (4) 1x Wash Buffer TBS : Pour un lavage rigoureux, chauffer à 55°C dans un bocal à coloration couvert.
 - (5) Sonde ZytoFast CISH : Avant utilisation, amener à la température d'hybridation et bien mélanger.
 - (6) Préparation de 3 % d'H₂O₂ : Diluer 1 partie de 30 % d'H₂O₂ dans 9 parties de 100 % de méthanol.
 - (7) Mouse-Anti-DIG (AB1), Anti-Mouse-HRP-Polymer (AB2), DAB Solution A (SB1a), DAB Solution B (SB1b), Nuclear Blue Solution (CS2), Mounting Solution (alcoholic) (MT4) Amener à température ambiante (18°C-25°C) avant utilisation

Prétraitement (déparaffinage / protéolyse)

- (1) Incuber les lames pendant 10 minutes à 70°C (par exemple sur une plaque chauffante).
- (2) Incuber les lames pendant 2x 5 min dans du xylène.
- (3) Incuber les lames pendant 3x 3 min dans de l'éthanol à 100 %.
- (4) Incuber les lames pendant 5 min dans de l'H₂O₂ à 3 %.
- (5) Laver les lames pendant 2x 1 min dans de l'eau déionisée ou distillée à la température ambiante.
- (6) Incuber pendant 15 minutes dans une solution de Heat Pretreatment Solution EDTA (PT2) à 98°C

Utiliser huit lames par pot de coloration (ajouter des lames factices si nécessaire).

- (7) Transférer immédiatement les lames dans de l'eau désionisée ou distillée et laver pendant 2 fois 2 minutes
 - (8) Appliquer (goutte à goutte) la Pepsin Solution (ES1) à l'échantillon et incubé pendant 10 à 30 min à 37°C dans une chambre humide.
- ES1 peut former des précipités qui n'affectent pas la qualité du produit.**
En règle générale, nous recommandons de déterminer le moment optimal pour la protéolyse lors des pré-tests.
- (9) Immerger les lames dans de l'eau déionisée ou distillée à la température ambiante.
 - (10) Déshydratation dans : 70 %, 90 % et 100 % d'éthanol, pendant 1 minute chacun.
 - (11) Sections séchées à l'air.

Note : Veillez à sécher complètement les sections avant l'application de la sonde.

Dénaturation et hybridation

- (1) Pipeter 10 µl de la sonde ZytoFast CISH sur chaque échantillon pré-traité.
- (2) Recouvrir les échantillons d'une lamelle de 22 mm x 22 mm (éviter de piéger des bulles) et sceller la lamelle.

Nous recommandons d'utiliser du ciment caoutchouc (par exemple, Fixogum) pour l'étanchéité.

- (3) Placer les lames sur une plaque chauffante ou un Système d'hybridation et dénaturer les spécimens pendant 5 min à 75°C.
- (4) Transférer les lames dans une chambre d'humidité et les hybrider (par exemple dans un four d'hybridation) pendant 1 h à 37°C pour les sondes de ciblage de l'ADN* ou à 55°C pour les sondes de ciblage de l'ARN*.

**Veillez vous référer au mode d'emploi qui accompagne la sonde.*

Il est essentiel que les spécimens ne se dessèchent pas pendant l'étape d'hybridation.

Post-hybridation et détection

- (1) Enlevez soigneusement le ciment ou la colle à base de caoutchouc.
- (2) Enlever la lamelle de couverture en immergeant les lames dans 1x Wash Buffer TBS à RT pendant 5 min.
- (3) Laver les lames pendant 5 min dans 1x Wash Buffer TBS à 55°C.
Utiliser huit lames par bocal de coloration (ajouter des fausses lames si nécessaire).
- (4) Laver les lames pendant 5 min dans 1x Wash Buffer TBS à la RT.
- (5) Appliquer Mouse-Anti-DIG (AB1) (1-2 gouttes par lame) sur les lames et incubé pendant 30 min à 37°C dans une chambre humide.
- (6) Laver les lames 3x 1 min dans 1x Wash Buffer TBS à la température ambiante.
- (7) Appliquer un Anti-Mouse-HRP-Polymer (AB2) (1-2 gouttes par lame) sur les lames et incubé pendant 30 min à 37°C dans une chambre humide.
- (8) Laver les lames 3x 1 min dans 1x Wash Buffer TBS à la température ambiante.
- (9) Préparer la DAB Solution (solution de travail) : remplir 1 ml de DAB Solution B (SB1b) dans une tasse graduée et ajouter une goutte (30 µl) de DAB Solution A (SB1a). Bien mélanger.
- (10) Appliquer la DAB Solution (1-2 gouttes par lame) sur les lames et incubé pendant 20 minutes à 37°C dans une chambre humide.
- (11) Laver les lames 3x 1 min dans de l'eau déionisée ou distillée à la température ambiante.
- (12) Contre-colorer les échantillons pendant 2 5 min avec la Nuclear Blue Solution (CS2).
- (13) Transférer les lames dans un bocal de coloration et laver 2 min sous l'eau froide du robinet.
- (14) Déshydrater 3x 30 s dans de l'éthanol à 100% (utiliser de l'éthanol très pur).
- (15) Incuber les lames pendant 2x 30 s dans du xylène (utiliser du xylène très pur).
- (16) Sécher à l'air pendant environ 2 min.

- (17) En évitant d'emprisonner des bulles, recouvrir les échantillons d'une lamelle (22 mm x 22 mm ; 24 mm x 32 mm) en utilisant la Mounting Solution (alcoholic) (MT4). Laisser 20-30 min pour que la lamelle s'immobilise.

L'utilisation d'un embout de pipette qui a été coupé afin d'augmenter la taille de l'ouverture peut simplifier le processus de pipetage.

- (18) Évaluez les échantillons colorés au microscope optique.

12. Interprétation des résultats

En utilisant le ZytoFast PLUS CISH Implementation Kit HRP-DAB, l'hybridation des oligonucléotides marqués à la digoxigénine apparaît sous forme de précipités de couleur marron. La contre-coloration des échantillons avec la Nuclear Blue Solution (CS2) donnera des noyaux colorés en bleu-violet clair.

Selon la sonde ZytoFast appliquée, une réactivité positive dans les cellules cibles se trouve soit dans le cytoplasme, soit dans le noyau, respectivement. Pour une description plus détaillée du modèle de signal attendu, veuillez vous référer au mode d'emploi accompagnant la sonde ZytoFast.

13. Procédures de contrôle qualité recommandées

Reportez-vous aux instructions d'utilisation de la sonde ZytoVision correspondante.

14. Caractéristiques de performances

Reportez-vous aux instructions d'utilisation de la sonde ZytoVision correspondante.

15. Élimination

L'élimination des réactifs doit être effectuée conformément à la réglementation locale.

16. Assistance

Tout écart par rapport au mode d'emploi peut conduire à des résultats de coloration inférieurs ou à aucune coloration du tout. Pour plus d'informations, veuillez consulter le site www.zytovision.com.

Signaux faibles ou pas de signal

Cause possible	Action
Le prétraitement protéolytique n'est pas effectué correctement	Optimiser le temps d'incubation de la pepsine, l'augmenter ou le diminuer si nécessaire.
Évaporation des sondes	En cas d'utilisation d'un appareil d'hybridation, l'utilisation des bandes humides/réservoirs remplis d'eau est obligatoire. Lors de l'utilisation d'un four d'hybridation, l'utilisation d'une chambre humide est obligatoire. En outre, la lamelle de couverture doit être complètement scellée, par exemple avec du Fixogum, pour éviter que l'échantillon ne sèche pendant l'hybridation
Préparation insuffisante du substrat chromogène	Au lieu de préparer les substrats colorés par goutte à goutte, utiliser une pipette.
Temps de contre coloration trop long	Évitez la contre-coloration sombre, car elle peut masquer les signaux de coloration positive
Le bleuissement de la contre-coloration n'a pas été effectué correctement	Utilisez l'eau courante froide du robinet ; n'utilisez pas d'eau chaude ou tiède, ni de réactifs

Les signaux s'estompent ou fusionnent

Cause possible	Action
Une solution de montage inadaptée a été utilisée	Utilisez uniquement la solution de montage fournie avec le kit ou des solutions de montage à base de xylène exemptes de toute impureté ; n'utilisez pas de ruban adhésif pour couvre-objet

Taches irrégulières ou très légères à certains endroits

Cause possible	Action
Décirage incomplet	Utiliser des solutions fraîches ; vérifier la durée des temps de déparaffinage
Volume de réactif trop faible	S'assurer que le volume de réactif est suffisant pour couvrir la zone de tissu

Des résultats incohérents

Cause possible	Action
Séchage insuffisant avant l'application de la sonde	Prolonger le séchage à l'air libre
Trop d'eau/tampon de lavage sur les tissus avant l'application de pepsine, d'anticorps et/ou de substrats colorés	Veillez à ce que l'excès de liquide soit retiré de la section de tissu en l'essuyant ou en le secouant sur la lame. De petites quantités d'eau résiduelle/tampon de lavage n'interfèrent pas avec l'essai
Variations des méthodes de fixation et d'inclusion des tissus	Optimiser les méthodes de fixation et d'inclusion
Variations de l'épaisseur de la coupe de tissu	Optimiser la coupe des sections

La morphologie dégradée

Cause possible	Action
L'échantillon de cellules ou de tissu n'a pas été correctement fixé	Optimiser le temps de fixation et le fixateur
Le prétraitement protéolytique n'est pas effectué correctement	Optimiser le temps d'incubation de la pepsine

Bruit de fond

Cause possible	Action
Sections desséchées à tout moment pendant ou après l'hybridation	Éviter que les sections ne s'assèchent ; utiliser une chambre d'humidité ; sceller correctement les lamelles
Temps d'incubation prolongé du substrat	Réduire la durée d'incubation du substrat
Déparaffinage incomplet	Utiliser des solutions fraîches ; vérifier la durée du déparaffinage
Prétraitement protéolytique trop fort	Optimiser le temps d'incubation de la pepsine
Lames refroidies à température ambiante avant l'hybridation	Transférer rapidement les lames à la température d'hybridation

Chevauchement des signaux

Cause possible	Action
Épaisseur inappropriée des coupes de tissus	Préparer des sections de microtome de 3 à 5 μm

Le spécimen flotte sur la lame

Cause possible	Action
Prétraitement protéolytique trop fort	Réduire le temps d'incubation de la pepsine

17. Bibliographie

- 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	Description du changement
1.2.1	11. Protocole es étapes du prétraitement doivent maintenant être effectuées dans l'ordre inverse : Désormais, l'incubation dans la <u>Heat Pretreatment Solution EDTA</u> doit être effectuée avant l'application de la <u>Pepsin Solution</u> . n outre, la déshydratation des lames dans une série d'éthanol après le prétraitement est désormais obligatoire afin de réduire le temps de séchage.



www.zytovision.com

Veillez consulter le site www.zytovision.com pour obtenir le mode d'emploi le plus récent ainsi que des instructions d'utilisation dans différentes langues.

Nos experts sont disponibles pour répondre à vos questions. Merci de nous contacter à helptech@zytovision.com



ZytoVision GmbH
Fischkai 1
27572 Bremerhaven/Allemagne
Téléphone : +49 471 4832-300
Fax : +49 471 4832-509
www.zytovision.com
Courriel : info@zytovision.com

Marques déposées :

ZytoVision® et ZytoFast® sont des marques déposées de ZytoVision GmbH.