



ZytoDot 2C
CISH Implementation Kit

REF	C-3044-10	Σ 10
REF	C-3044-40	Σ 40

Kromogén in situ hibridizációs (CISH) eljárásokban való
használatra

4250380N717V



In vitro diagnosztikai orvosi eszköz
IVDR (EU) 2017/746 szerint

1. Javasolt alkalmazás

A ZytoDot 2C CISH Implementation Kit a Digoxigenin/Dinitrofenil-jelölt ZytoDot 2C CISH próbákkal kombinálva használható formalin-fixált, paraffinba ágyazott mintákon kromogén *in situ* hibridizációval (CISH).

A termék kizárólag professzionális használatra készült. A termékkel végzett valamennyi vizsgálatot minősített, engedéllyel rendelkező anatómiai patológiai laboratóriumban, patológus/humángenetikus felügyelete mellett, szakképzett személyzetnek kell elvégeznie.

2. A vizsgálat elve

A kromogén *in situ* hibridizációs (CISH) technika lehetővé teszi specifikus nukleinsav-szekvenciák kimutatását és vizualizálását sejtkészítményekben. Hapten-jelölt nukleotidfragmentumok, úgynevezett CISH-szondák és a preparátumokban lévő komplementer célszekvenciák együttesen denaturálódnak, majd a hibridizáció során hagyják, hogy egymáshoz kapcsolódjanak. Ezt követően a nem specifikus és nem kötött szondafragmentumokat szigorú mosási lépésekkel távolítják el. A jelölt szonda duplexképződése elsődleges (nem jelölt) antitestekkel láthatóvá tehető, amelyeket másodlagos polimerizált enzimkonjugált antitestekkel detektálunk. Az enzimatis reakció kromogén szubsztátokkal színes csapadékok képződéséhez vezet. A sejtmag nukleáris festékkel történő ellenfestése után a hibridizált szondafragmentumok fénymikroszkópiával láthatóvá válnak.

3. Rendelkezésre bocsátott reagensek

A ZytoDot 2C CISH Implementation Kit két méretben kapható, és a következőkből áll:

Kód:	Komponens	Mennyiség		Konténer
		40	10	
PT2	Heat Pretreatment Solution EDTA	500 ml	150 ml	Csavaros kupakos üveg (nagy)
ES1	Pepsin Solution	4 ml	1 ml	Cseppentős üveg, fehér kupakkal
WB1	Wash Buffer SSC	560 ml	210 ml	Csavaros kupakos üveg (nagy)
WB5	20x Wash Buffer TBS	2x 50 ml	50 ml	Csavaros kupakos üveg
AB14	Anti-DIG/DNP-Mix	4 ml	1 ml	Cseppentős üveg, sárga kupakkal
AB13	HRP/AP-Polymer-Mix	4 ml	1 ml	Cseppentős üveg, kék kupak
SB6a	AP-Red Solution A	0.4 ml	0.1 ml	Cseppentős üveg, piros kupakkal (kicsi)
SB6b	AP-Red Solution B	15 ml	4 ml	Cseppentős üveg, piros kupakkal
SB7a	HRP-Green Solution A	0.8 ml	0.2 ml	Cseppentős üveg, zöld kupakkal (kicsi)
SB7b	HRP-Green Solution B	15 ml	4 ml	Cseppentős üveg, zöld kupakkal
CS2	Nuclear Blue Solution	20 ml	4 ml	Csavaros kupakos üveg, fekete
MT4	Mounting Solution (alcoholic)	4 ml	1 ml	Üvegpalack, barna
	AP-Red reaction vessel	2	1	Méretezett csésze, piros fedéllel
	HRP-Green reaction vessel	2	1	Méretezett csésze, zöld fedéllel
	Használati utasítás	1	1	

C-3044-10 (10 vizsgálat): Az **ES1**, **AB14**, **AB13**, **SB6a-b**, **SB7a-b**, **CS2** és **MT4** komponensek 10 reakcióhoz elegendőek. A **PT2** komponens 2 db, egyenként 70 ml-es festőedényhez elegendő. A **WB1** komponens 3 darab, egyenként 70 ml-es festőedényhez elegendő. A **WB5** komponens 14 darab, egyenként 70 ml-es festőedényhez elegendő.

C-3044-40 (40 vizsgálat): Az **ES1**, **AB14**, **AB13**, **SB6a-b**, **SB7a-b**, **CS2** és **MT4** komponensek 40 reakcióhoz elegendőek. A **PT2** komponens 7 db, egyenként 70 ml-es festőedényhez elegendő. A **WB1** komponens 8 darab, egyenként 70 ml-es festőedényhez elegendő. A **WB5** komponens 28 darab, egyenként 70 ml-es festőedényhez elegendő.

4. Szükséges, de nem biztosított anyagok

- ZytoDot CISH Probe
- Pozitív és negatív kontrollminták
- Mikroszkópos tárgylemezek, pozitív töltésű
- Vízfürdő (80 °C, 98 °C)
- Hibridizáló vagy fűzőlap
- Hibridizáló vagy páraakamra a hibridizációs kemencében
- Állítható pipetták (10 µl, 1000 µl)
- Festőedények vagy fürdők
- Időzítő
- Kalibrált hőmérő
- Etanol vagy reagens alkohol
- Xilol
- Metanol 100%
- Hidrogén-peroxid (H₂O₂) 30%
- Deionizált vagy desztillált víz
- fedőlemezek (22 mm x 22 mm, 24 mm x 32 mm)
- Gumicement, pl. Fixogum Rubber Cement (Prod. No. E-4005-50/-125) vagy hasonló.
- Megfelelően karbantartott fénymikroszkóp (400-630x)

5. Tárolás és kezelés

Tárolása 2-8 °C-on, függőleges helyzetben. Felhasználást követően azonnal a tárolási feltételek alkalmazandóak. Ne használja a reagenseket a címkén feltüntetett lejárati időn túl. A termék a címkén feltüntetett lejárati ideig őrzi meg stabilitását megfelelően kezelés mellett.

6. Figyelmeztetések és óvintézkedések

- Használat előtt olvassa el a használati utasítást!
- Ne használja a reagenseket a lejárati idő letelte után!
- Ez a termék olyan anyagokat tartalmaz (kis koncentrációban és térfogatban), amelyek az egészségre károsak és potenciálisan fertőzőek. Kerülje a közvetlen érintkezést a reagensekkel. Tegyen megfelelő védőintézkedéseket (használgjon eldobható kesztyűt, védőszemüveget és laboratóriumi öltözetet)!
- Jelentsen a gyártónak és az illetékes hatóságnak a termékkel kapcsolatban minden súlyos eseményt a helyi előírásoknak megfelelően!
- Ha a reagens bőrrel érintkezik, azonnal öblítse le bő vízzel!
- Foglalkozásszerű felhasználók részére igény esetén anyagbiztonsági adatlapot biztosítunk.
- Ne használja fel újra a termékeket, kivéve, ha az újrafelhasználás kifejezetten engedélyezett!
- A minták keresztszennyeződését kerülni kell, mert ez hibás eredményhez vezethet.
- A hibridizáció és a mosás során a mintákat nem szabad kiszárítani.

Veszély- és óvintézkedési nyilatkozatok az AB13, AB14, PT2, SB7b, WB1 és WB5 esetében:

A veszélyt meghatározó komponens a reakcióközeg: EK-szám: 247-500-7] és 2-metil-2H-izotiazol-3-on [EK-szám: 220-239-6] (3:1).



Figyelem

H317	Allergiás bőrreakciót válthat ki.
P261	Kerülje a por/füst/gáz/köd/gőzök/permet belélegzését.
P272	Szennyezett munkaruhát tilos kivinni a munkahely területéről.
P280	Védőkesztyű/védőruha/szemvédő/arcvédő/hallásvédelem használata kötelező.
P302+P352	HA BŐRRE KERÜL: Lemosás bő vízzel
P333+P313	Bőrirritáció vagy kiütések megjelenése esetén: orvosi ellátást kell kérni.
P362+P364	A szennyezett ruhadarabot le kell vetni és újbóli használat előtt ki kell mosni.

Veszély- és óvintézkedési nyilatkozatok az SB7a -re vonatkozóan:

A veszélyt meghatározó komponensek a metanol és a 30 %-os hidrogén-peroxid-oldat.



Veszély

H225	Fokozottan tűzveszélyes folyadék és gőz.
H301+H311+H331	Lenyelve, bőrrel érintkezve vagy belélegezve mérgező
H370	Károsítja a szerveket.
P210	Hőtől, forró felületektől, szikrától, nyílt lángtól és más gyújtóforrástól távol tartandó. Tilos a dohányzás
P233	Az edény szorosan lezárva tartandó.
P260	A por/füst/gáz/köd/gőzök/permet belélegzése tilos.
P280	Védőkesztyű/védőruha/szemvédő/arcvédő/hallásvédelem használata kötelező.
P308+P311	Expozíció vagy annak gyanúja esetén: Forduljon TOXIKOLÓGIAI KÖZPONTHOZ/orvoshoz.
P403+P235	Jól szellőző helyen tárolandó. Hűvös helyen tartandó.

Veszély- és óvintézkedési nyilatkozatok az CS2 -re vonatkozóan:

A veszélyt meghatározó összetevő az etándiol, etilénlikol.



Figyelem

H373	Hosszabb vagy ismételt expozíció esetén lenyelése károsíthatja a vesét.
P260	A por/füst/gáz/köd/gőzök/permet belélegzése tilos
P314	Rosszullet esetén orvosi ellátást kell kérni.

Veszély- és óvintézkedési nyilatkozatok az MT4-re vonatkozóan:

A veszélyt meghatározó összetevő a xilol.



Figyelem

H226	Tűzveszélyes folyadék és gőz.
H312+H332	Bőrrel érintkezve vagy belélegezve ártalmas
H315	Bőrirritáló hatású.
H319	Súlyos szemirritációt okoz.
H335	Légúti irritációt okozhat.
H373	Ismétlődő vagy hosszabb expozíció esetén károsíthatja a szerveket.
P210	Hőtől, forró felületektől, szikrától, nyílt lángtól és más gyújtóforrástól távol tartandó. Tilos a dohányzás.
P260	A por/füst/gáz/köd/gőzök/permet belélegzése tilos.
P280	Védőkesztyű/védőruha és szemvédő/arcvédő használata kötelező.
P305+P351+P338	SZEMBE KERÜLÉS ESETÉN: Több percig tartó óvatos öblítés vízzel. Adott esetben a kontaktlencsék eltávolítása, ha könnyen megoldható. Az öblítés folytatása.
P337+P313	Ha a szemirritáció nem múlik el: orvosi ellátást kell kérni.
P403+P235	Jól szellőző helyen tárolandó. Hűvös helyen tartandó.
EUH208	Metil-metakrilát; Metil 2-metilprop-2-enoát; Metil 2-metilpropenoát, Butil-metakrilát-t tartalmaz. Allergiás reakciót válthat ki.

Veszély- és óvintézkedési nyilatkozatok az SB6a -re vonatkozóan:

H412	Ártalmas a vízi élővilágra, hosszan tartó károsodást okoz.
P273	Kerülni kell az anyagnak a környezetbe való kijutását.

Az ES1 speciális címkézése:

EUH208	pepsin A-t tartalmaz. Allergiás reakciót válthat ki.
EUH210	Kérésre biztonsági adatlap kapható..

7. Korlátozások

- *In vitro* diagnosztikai használatra.
- Csak szakképzett felhasználók részére.
- Csak nem-automatizált használatra.
- Bármely pozitív festődés vagy annak hiánya esetén, a klinikai interpretációt a klinikai anamnézis, a morfológia, az egyéb kórszöveti kritériumok, valamint az egyéb diagnosztikai tesztek összefüggésében kell elvégezni. A szakképzett patológus/humángenetikus felelőssége, hogy ismerje az ISH-próbákat, reagenseket, diagnosztikai paneleket és a festett készítmény előállításához használt módszereket. A festést minősített, engedéllyel rendelkező laboratóriumban kell elvégezni patológus/humángenetikus felügyelete mellett, aki a festett tárgylemezek áttekintéséért és a pozitív és negatív kontrollok biztosításáért is felelős.
- A minta festése, különösen a jelintenzitás és a háttérfestés erőssége a festést megelőző mintakezeléstől és feldolgozástól függ. A minta nem megfelelő fixálása, fagyasztása, felolvasztása, mosása, szárítása, melegítése, metszése vagy más mintákkal és folyadékokkal való keresztszennyezése műtermékek vagy hamis eredmények kialakulásához vezethet. Ellentmondó eredmények eredhetnek a minta rögzítési és beágyazási eltéréseiből, valamint magában a mintában rejlő egyenlőtlen feltételekből.
- A teljesítmény érvényesítése a jelen használati útmutatóban leírt eljárásokkal történt. Ezen eljárások módosítása megváltoztathatja a teljesítményt, és ezeket a felhasználónak ellenőriznie kell. Ez az IVD csak akkor rendelkezik CE-tanúsítvánnyal, ha az ebben az útmutatóban leírtak szerint használják, a rendeltetésszerű használat keretein belül.

8. Interferenciát kiváltó anyagok

A következő fixálószer nem kompatibilisek az ISH-val:

- Bouin-fixálószer
- B5 fixálószer
- savas fixálószer (pl. pikrinsav)
- Zenker-fixálószer
- Alkohokok (önmagukban használva)
- Higany-klorid
- Formaldehid/cink fixálószer
- Hollande fixálója
- Nem pufferelt formalin

9. A minták előkészítése

Ajánlások:

- Kerülje a minták keresztszennyeződését, mivel ez hibás eredményekhez vezethet.
- Fixálás 10% semleges pufferelt formalinban 24 órán keresztül szobahőmérsékleten (RT, 18°C-25°C).
- Mintaméret $\leq 0,5 \text{ cm}^3$
- Használjon prémium minőségű paraffint.
- A beágyazást 65 °C-nál alacsonyabb hőmérsékleten kell végezni.
- Készítsen 3-5 μm -es mikrotomos metszeteket.
- Használjon pozitív töltésű tárgylemezeket.
- Fixáljuk a szövetszelvényeket 2-16 órán át 50-60 °C-on.

10. A reagens előkészítése

A 20x Wash Buffer TBS (WB5) puffert a 11. pontban leírtak szerint kell elkészíteni. „Assay procedure” (Vizsgálati eljárás). Az összes többi kit-reagens használatra kész. Nincs szükség rekonstitúcióra, keverésre vagy hígításra.

Használat előtt a szondát hozza szobahőmérsékletre (RT), és rövid ideig keverje meg..

11. Vizsgálati eljárás**11.1 1. nap****Előkészítő lépések**

- (1) Készítsünk etanol-sorozatot (70%-os, 90%-os és 100%-os etanolos oldatok): Hígítsuk fel a 100%-os etanolt ionmentesített vagy desztillált vízzel. Ezek az oldatok megfelelő tartályokban tárolhatók és újra felhasználhatók.
- (2) Heat Pretreatment Solution EDTA (PT2): Melegítse 98 °C-ra egy lefedett festőedénybe.
- (3) 3%-os H_2O_2 előkészítése: Hígítsunk fel 1 rész 30% H_2O_2 -t 9 rész 100%-os metanolban..
- (4) ZytoDot 2C CISH szonda: Használat előtt hozza szobahőmérsékletre.

Előkezelés (viaszmentesítés/proteolízis)

- (1) Inkubáljuk a tárgylemezeket 10 percig 70°C-on (pl. forró lemezen).
- (2) Inkubáljuk a tárgylemezeket 2x 5 percig xilolban.
- (3) Inkubáljuk a tárgylemezeket 3x 3 percig 100%-os etanolban.
- (4) Inkubáljuk a tárgylemezeket 5 percig 3%-os H_2O_2 -ben..
- (5) Mossuk a tárgylemezeket 2x 1 percig deionizált vagy desztillált vízben.
- (6) Inkubáljuk 15 percig 98°C-on előmelegített Heat Pretreatment Solution EDTA (PT2) -ban.

Használjon nyolc tárgylemezt festőedényenként (szükség esetén adjon hozzá műlemezeket).

- (7) Azonnal helyezze át a tárgylemezeket deionizált vagy desztillált vízbe, és mossa 2x 2 percig.
- (8) Vigyen fel (cseppenként) Pepsin Solution (ES1) a mintára, és inkubálja 5-15 percig 37°C-on, pára kamrában.

Az **ES1** csapadékot képezhet, amely nem befolyásolja a minőséget. Általános szabályként javasoljuk, hogy a proteolízis optimális idejét elővizsgálatokban állapítsa meg.

- (9) Merítse a tárgylemezeket deionizált vagy desztillált vízbe.
- (10) Dehidratálás in: 70%-os, 90%-os és 100%-os etanolban, egyenként 1 percig.
- (11) Légszárítás a metszeteken.

Megjegyzés: Ügyeljen arra, hogy a szondák felhelyezése előtt a metszetek teljesen megszáradjanak.

Denaturáció és hibridizáció

- (1) Pipettázzunk 10 μl szondát minden előkezelt mintára.
- (2) Fedje le a mintákat egy 22 mm x 22 mm-es fedőlappal (kerülje a beszorult buborékokat), és zárja le a fedőlapot.

A lezáráshoz gumicement (pl. Fixogum) használatát javasoljuk.

- (3) Helyezze a tárgylemezeket forró lemezre vagy hibridizátorra, és denaturálja a mintákat 5 percig 79°C-on.
- (4) Vigye át a tárgylemezeket egy pára kamrába, és hibridizáljon egy éjszakán át 37°C-on (pl. hibridizációs kemencében)).

Lényeges, hogy a minták ne száradjanak ki a hibridizációs lépés során.

11.2 2. nap**Előkészítő lépések**

- (1) Wash Buffer SSC (WB1): A szigorított mosáshoz melegítse 80 °C-ra egy lefedett festőedényben. A WB1 2-8°C-on csapadékot képezhet, amely nem befolyásolja a minőséget, és melegítéskor fel kell oldódnia.
- (2) Az 1x Wash Buffer TBS elkészítése: Hígítsunk 1 részt 20x Wash Buffer TBS (WB5) 19 rész deionizált vagy desztillált vízben.

A hígított 1x Wash Buffer TBS mosópuffer 2-8°C-on tárolva egy hétig stabil.

- (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): Használat előtt hozza szobahőmérsékletre.

Az **SB7a** és **SB7b** komponensek csapadékot képezhetnek, ami nem befolyásolja a festés minőségét.

Hibridizálás és detektálás

- (1) Óvatosan távolítsa el a gumicementet vagy a ragasztót.
 (2) Távolítsa el a fedőlemezt úgy, hogy a tárgylemezeket 5 percre szobahőmérsékleten Wash Buffer SSC (WB1) mosópufferbe meríti.

A **WB1** egyszer újra felhasználható. Tárolja 2-8 °C-on legfeljebb egy hétig.

- (3) Mossuk a tárgylemezeket 5 percig 80°C-on Wash Buffer SSC (WB1) mosópufferben.

Használjon nyolc tárgylemezt festőedényenként (szükség esetén adjon hozzá műtárgylemezeket).

- (4) Mossuk a tárgylemezeket 2x 1 percig deionizált vagy desztillált vízben.
 (5) Merítse a tárgylemezeket 1x Wash Buffer TBS pufferbe.
 (6) Vigyen fel Anti-DIG/DNP-Mix (AB14) (1-2 cseppet tárgylemezenként) a tárgylemezekre, és inkubálja 15 percig 37°C-on, pára kamrában.
 (7) Mossuk a tárgylemezeket 3x 1 percig 1x Wash Buffer TBS mosópufferben.
 (8) Vigyen fel HRP/AP-Polymer-Mix (AB13) (1-2 cseppet tárgylemezenként) a tárgylemezekre, és inkubálja 15 percig 37°C-on, pára kamrában.
 (9) Mossuk a tárgylemezeket 3x 1 percig 1x Wash Buffer TBS mosópufferben.
 (10) Készítsünk AP-Red Solution (munkaoldat): töltsünk 1 ml AP-Red Solution B (**SB6b**) egy mérőpohárba, és adjunk hozzá egy csepp (30 µl) AP-Red Solution A (**SB6a**). Jól keverjük össze.
 (11) Vigye fel az AP-Red Solution oldatot (1-2 cseppet tárgylemezenként) a tárgylemezekre, és inkubálja sötétben 10 percig RT-nél.
 (12) Az inkubáció alatt készítse el a HRP-Green Solution (munkaoldat): töltsön 1 ml HRP-Green Solution B (SB7b) egy mérőlapos pohárba, és adjon hozzá két csepp (2x 20 µl) „HRP-Green Solution A (SB7a)”. Jól keverjük össze.
 (13) Mossuk a tárgylemezeket 2 percig deionizált vagy desztillált vízben.
 (14) Vigye fel a HRP-Green Solution cseppenként (1-2 cseppet tárgylemezenként) a tárgylemezekre, és inkubálja sötétben 10 percig szobahőmérsékleten.
 (15) Mossuk a tárgylemezeket 2 percig ionmentesített vagy desztillált vízben.
 (16) Ellenfestjük a mintákat 2 percig Nuclear Blue Solution (CS2).
 (17) Tegyük át a tárgylemezeket festőedénybe, és mossuk át 2 percig hideg folyó csapvíz alatt.
 (18) Dehidratáljuk 3x 30 másodpercig 100%-os etanolban (használjunk nagyon tiszta etanolt).
 (19) Inkubáljuk a tárgylemezeket 2x 30 másodpercig xilolban (használjunk nagyon tiszta xilolt).

A pipettázás megkönnyíthető egy olyan pipettahegy használatával, amelyet a nyílás méretének növelése érdekében levágtak.

- (20) Értékelje a festett mintákat fénymikroszkópiával.

12. Az eredmények kiértékelése

A ZytoDot 2C CISH Implementation Kit használatával a Digoxigeninnel jelölt polinukleotidok hibridizációs jelei sötétzöld színű, különálló pontokként, a Dinitrofenillel jelölt polinukleotidok pedig élénkörös színű, különálló pontokként jelennek meg. Normális sejtek vagy a vizsgált kromoszómák aberrációit nem mutató sejtek interfázisaiban vagy metafázisaiban szondáknént/kapten-jelölésenként két jel jelenik meg, kivéve az X és/vagy Y kromoszómákat célzó szondákat, amelyek esetében a nemtől függően szondáknént/kapten-jelölésenként egy-két jelet nem kapunk. A kromoszóma-aberrációkkal rendelkező sejtekben az interfázisokban vagy metafázisokban eltérő jelmintázat lehet látható. Az eredmények értelmezésével kapcsolatos további részletekért kérjük, olvassa el a megfelelő ZytoDot 2C CISH szonda használati utasítását.

13. Ajánlott minőségellenőrzési eljárások

Olvassa el a megfelelő ZytoVision próba használati utasítását.

14. Teljesítményjellemzők

Olvassa el a megfelelő ZytoVision próba használati utasítását.

15. Eltávolítás

A reagensek hulladékként történő elhelyezését az országos szabályozásokkal összhangban kell elvégezni.

16. Hibaelhárítás

A kezelési utasításoktól való bármilyen eltérés rosszabb festési eredményhez vagy egyáltalán nem festéshez vezethet. További információkért kérjük, olvassa el a www.zytovision.com honlapot.

Gyenge jelek vagy egyáltalán nincs jel

Lehetséges ok	Javasolt teendő
Nem megfelelően végzett proteolitikus előkezelés	Optimalizálja a pepszin inkubációs idejét, szükség esetén növelje vagy csökkentse azt.
Szonda párolgás	A hibridizáló használata esetén a nedves csíkok/vízzel töltött tartályok használata kötelező. Hibridizáló kemence használata esetén a pára kamra használata kötelező. Ezenkívül a fedőlemezt teljesen le kell zárni, pl. Fixogummal, hogy megakadályozzuk a minta kiszáradását a hibridizáció során.
Túl hosszú az ellenfestési idő	Kerülje a sötét ellenfestést, mert az elfedheti a pozitív festési jeleket.
Az ellenfesték kékítése nem megfelelően történik	A kékítéshez hideg folyó csapvizet használjon; ne használjon meleg vagy forró vizet vagy kékítő reagenseket.

Túl erős jelek

Lehetséges ok	Javasolt teendő
Túl hosszú ideig végzett proteolitikus előkezelés	Optimalizálja a pepszin inkubációs idejét, szükség esetén növelje vagy csökkentse azt.
AP-Red Solution inkubációs idő nem helyes	Szükség esetén az inkubációs idő 5 percre lerövidíthető. Ne melegítse a szubsztrátoldatot 25 °C fölé; csak szobahőmérsékleten inkubáljon
HRP-Green solution inkubációs idő nem helyes	Szükség esetén az inkubációs idő 7 percre rövidíthető. Ne melegítse a szubsztrátoldatot 25 °C fölé; csak szobahőmérsékleten inkubáljon.

A piros jelek túl gyengék

Lehetséges ok	Javasolt teendő
Az AP-Red Solution -t erős közvetlen fénynek tették ki	Készítse el és használja az „AP-Red Solution” oldatot erős közvetlen fénytől védve
Az AP-Red Solution oldatot túl korán készítették el	Azonnali felhasználás előtt készítse el
Az AP-Red Solution inkubációs ideje nem megfelelő	Szükség esetén az inkubációs idő 15 percig meghosszabbítható
A kromogén szubsztrát előkészítése nem megfelelő	Ne növelje az A oldat térfogatát

A zöld jelek túl gyengék

Lehetséges ok	Javasolt teendő
A HRP-Green festés utáni mosási lépések inkubációs ideje túl hosszú	Ne lépje túl a megadott inkubációs időt
HRP-Green solution inkubációs ideje nem megfelelő	Szükség esetén az inkubációs idő akár 15 percig is meghosszabbítható.

A kromogén szubsztrát nem megfelelő előkészítése	Ne növelje az A oldat térfogatát
--	----------------------------------

A jelek elhalványulnak vagy összeolvadnak

Lehetséges ok	Javasolt teendő
Nem megfelelő szerelési megoldást használtak	Kizárólag a készlethez mellékelt rögzítő oldatot vagy minden szennyeződéstől mentes xilén alapú rögzítő oldatot használjon; ne használjon fedőszalagot.
A metszeteket nem megfelelően szárították ki	Használjon friss etanol- és xiloldatokat; csak „tisztá” minőségű xilolt használjon

Egyenetlen vagy egyes részekben csak nagyon enyhe foltosodás

Lehetséges ok	Javasolt teendő
Nem teljes viaszmentesítés	Használjon friss oldatokat; ellenőrizze a viaszmentesítési időket időtartamát.
Túl kicsi a reagens térfogata	Győződjön meg arról, hogy a reagens térfogata elég nagy ahhoz, hogy a szöveti területet lefedje.

Ellentmondásos eredmények

Lehetséges ok	Javasolt teendő
Elégtelen szárítás a szonda felhelyezése előtt	Légszárítás meghosszabbítása
Túl sok víz/mosópuffer a szöveten a pepszin, az anititestek és/vagy a színezékszubsztrátumok felvitele előtt.	Győződjön meg arról, hogy a felesleges folyadékot a szövetszelvényről a tárgylemezről való leitatással vagy lerázással eltávolítja. A kis mennyiségű maradék víz/mosópuffer nem zavarja a vizsgálatot.
A szövetek rögzítési és beágyazási módszereinek változatai	A rögzítési és beágyazási módszerek optimalizálása
A szövetszelvény vastagságának változása	Optimalizálja a szekcionálást

Morfológia romlott

Lehetséges ok	Javasolt teendő
A sejt- vagy szövetmintát nem rögzítették megfelelően	A rögzítési idő és a fixálószer optimalizálása
Nem túl hosszú ideig végzett proteolitikus előkezelés	Csökkentse a pepszin inkubációs idejét

Kereszt hibridizációs jelek; zajos háttér

Lehetséges ok	Javasolt teendő
A szelvények a hibridizáció során vagy után bármikor kiszáradhattak.	Kerülje a szelvények kiszáradását; használjon pára kamrát; zárja le megfelelően a fedőlapot.
Meghosszabbított szubsztrát inkubációs idő	A szubsztrát inkubációs idejének lerövidítése
Nem teljes viaszmentesítés	Használjon friss oldatokat; ellenőrizze a viaszmentesítési időtartamát.
Túl erős proteolitikus előkezelés	A pepszin inkubációs idejének optimalizálása
A tárgylemezeket hibridizáció előtt szobahőmérsékletre kell hűteni.	A tárgylemezeket gyorsan helyezze át hibridizációs hőmérsékletre

Átfedő jelek

Lehetséges ok	Javasolt teendő
A szöveti metszetek nem megfelelő vastagsága	Készítsünk 3-5 µm-es mikrotomos metszeteket

A minta lebeg a tárgylemezről

Lehetséges ok	Javasolt teendő
Túl erős proteolitikus előkezelés	A pepszin inkubációs idő lerövidítése

17. Irodalom

- 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. Felülvizsgálat
www.zytovision.com

Kérjük, látogasson el www.zytovision.com weboldalra a legfrissebb használati utasításokért, valamint a különböző nyelvű használati utasításokért.

Szakembereink készséggel válaszolnak kérdéseikre. Vegye fel velünk a kapcsolatot a help@zytovision.com címen.



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

Védjegy:

A ZytoVision® és a ZytoDor® a ZytoVision GmbH védjegyei.