



ZytoDot CISH Implementation Kit

REF C-3018-40

Σ 40

Na použitie pri chromogénnej *in situ* hybridizácii (CISH)

4250380N397Z



Diagnostická zdravotnícka pomôcka in vitro

podľa IVDR (EÚ) 2017/746

1. Zamýšľané použitie

Súprava ZytoDot CISH Implementation Kit je určená na použitie v kombinácii so sondami ZytoDot označenými digoxigenínom na vzorkách fixovaných formalínom a vložených do parafínu pomocou chromogénnej *in situ* hybridizácie (CISH).

Výrobok je určený len na profesionálne použitie. Všetky testy s použitím tohto výrobku by mal vykonávať kvalifikovaný personál v certifikovanom, licencovanom laboratóriu anatomickej patológie pod dohľadom patológa/humánneho genetika.

2. Princíp testu

Technika chromogénnej *in situ* hybridizácie (CISH) umožňuje detekciu a vizualizáciu špecifických sekvencií nukleových kyselín v bunkových preparátoch. Hapténom označené nukleotidové fragmenty, tzv. CISH sondy, a ich komplementárne cieľové sekvencie v preparátoch sú kodenaturované a následne sa nechajú hybridizovať (annealing). Potom sa nešpecifické a nenaviazané fragmenty sond odstránia premytím. Tvorbu *duplexu* značenej sondy možno vizualizovať pomocou primárnych (neoznačených) protilátok, ktoré sa detekujú pomocou sekundárnych polymerizovaných protilátok konjugovaných s enzýmom. Enzymatická reakcia s chromogénnymi substrátmi vedie k tvorbe farebných precipitátov. Po kontrastnom farbení jadra jadrovým farbivom sa hybridizované fragmenty sondy vizualizujú svetelnou mikroskopiou.

3. Poskytnuté činidlá

ZytoDot CISH Implementation Kit je k dispozícii v jednej veľkosti a pozostáva z:

Kód	Komponent	Množstvo	Kontajner
		Σ 40	
PT2	Heat Pretreatment Solution EDTA	500 ml	Fľaša so skrutkovacím uzáverom (veľká)
ES1	Pepsin Solution	4 ml	Fľaštička s kvapkadlom, biela čiapka
WB1	Wash Buffer SSC	560 ml	Fľaša so skrutkovacím uzáverom (veľká)
WB4	PBS/Tween	2x	Hliníkové balenie
BS1	Blocking Solution	4 ml	Fľaštička s kvapkadlom, oranžová čiapka
AB1	Mouse Anti-Dig	4 ml	Fľaštička s kvapkadlom, ružová čiapka
AB2	Anti-Mouse-HRP-Polymer	4 ml	Fľaštička s kvapkadlom, fialová čiapka
SB1a	DAB Solution A	0.3 ml	Fľaštička s kvapkadlom, zelená čiapka
SB1b	DAB Solution B	10 ml	Fľaštička s kvapkadlom, šedá čiapka
CS1	Mayer's Hematoxylin Solution	20 ml	Fľaša so skrutkovacím uzáverom, čierna
MT4	Mounting Solution (alcoholic)	4 ml	Sklenená fľaša, hnedá
	Návod na použitie	1	

C-3018-40 (40 testov): Súčiastky ES1, BS1, AB1, AB2, SB1a-b, CS1, a MT4 postačujú na 40 reakcií. Komponent PT2 postačuje na 7 nádob na farbenie po 70 ml. Komponent WB1 postačuje na 8 farbiacich nádobiek po 70 ml. Komponent WB4 postačuje na 28 farbiacich nádobiek po 70 ml.

4. Požadované, ale neposkytované materiály

- ZytoDot CISH Probe
- Pozitívne a negatívne kontrolné vzorky
- Mikroskopické sklíčka, kladne nabité
- Vodný kúpeľ (80 °C, 98 °C)
- Hybridizér alebo horúca platňa
- Hybridizátor alebo komora na udržiavanie vlhkosti v hybridizačnej peci
- Nastaviteľné pipety (10 µl, 1000 µl)
- Farbiace nádoby alebo kúpele
- Časovač
- Kalibrovaný teplomer
- Etanol alebo reagenčný alkohol
- Xylén
- Metanol 100%
- Peroxid vodíka (H₂O₂) 30%
- Deionizovaná alebo destilovaná voda
- Krycie sklíčka (22 mm x 22 mm, 24 mm x 32 mm)
- Gumové lepidlo, napr. Fixogum Rubber Cement (č. E-4005-50/-125) alebo podobné
- Primerane udržiavaný svetelný mikroskop (400-630x)

5. Skladovanie a manipulácia

Uchovávať pri teplote 2-8 °C vo zvislej polohe. Okamžite po použití vráťte do skladovacích podmienok. Nepoužívajte činidlá po dátume expirácie uvedenom na etikete. Produkt je stabilný do dátumu expirácie uvedeného na etikete, ak sa s ním zaobchádza primeraným spôsobom.

6. Upozornenia a bezpečnostné opatrenia

- Pred použitím si prečítajte návod na použitie!
- Nepoužívajte činidlá po uplynutí dátumu expirácie!
- Tento výrobok obsahuje látky (v nízkych koncentráciách a objemoch), ktoré sú zdraviu škodlivé. Vyhnite sa akémukoľvek priamemu kontaktu s činidlami. Prijmite vhodné ochranné opatrenia (používajte jednorazové rukavice, ochranné okuliare a laboratórny odev)!
- Každý závažný incident, ku ktorému došlo v súvislosti s výrobkom, nahláste výrobcovi a príslušnému orgánu podľa miestnych predpisov!

- Ak sa činidlá dostanú do kontaktu s pokožkou, okamžite ju opláchnite veľkým množstvom vody!
- Pre profesionálnych používateľov je na požiadanie k dispozícii karta bezpečnostných údajov.
- Reagencie nepoužívajte opakovane, pokiaľ nie je opakované použitie výslovne povolené!
- Vyhňte sa krížovej kontaminácii vzoriek, pretože to môže viesť k chybným výsledkom.
- Počas hybridizácie a premývania sa vzorky nesmú nechať vyschnúť.

Výstražné a bezpečnostné upozornenia BS1, AB1, AB2, PT2, a WB1:

Zložka určujúca nebezpečenstvo je zmesou: 5-chlór-2-metyl-4-izotiazolín-3-ón [ES č. 247-500-7] a 2-metyl-2H-izotiazol-3-ón [ES č. 220-239-6] (3:1).



Pozor

H317	Môže vyvolať alergickú kožnú reakciu.
P261	Zabráňte vdychovaniu prachu/dymu/plynu/hmly/pár/aerosólov.
P272	Je zakázané vyniesť kontaminovaný pracovný odev z pracoviska.
P280	Noste ochranné rukavice/ochranný odev/ochranné okuliare/ochranu tváre/prostriedky na ochranu sluchu.
P302+P352	PRI KONTAKTE S POKOŽKOU: umyte veľkým množstvom vody.
P333+P313	Ak sa prejaví podráždenie pokožky alebo sa vytvoria vyrážky: vyhľadajte lekársku pomoc/starostlivosť.
P362+P364	Kontaminovaný odev vyzlečte a pred ďalším použitím vyperte.

Výstražné a bezpečnostné upozornenia pre SB1a:

Zložkou určujúcou nebezpečnosť je bifenyľ 3,3',4,4'-tetraýltetraamín; diaminobenzidín.



Nebezpečenstvo

H350	Môže spôsobiť rakovinu.
P201	Pred použitím sa oboznámte s osobitnými pokynmi.
P202	Nepoužívajte, kým si neprečítate a nepochopíte všetky bezpečnostné opatrenia.
P280	Noste ochranné rukavice/ochranný odev/ochranné okuliare/ochranu tváre/prostriedky na ochranu sluchu.
P308+P313	Po expozícii alebo podozrení z nej: Vyhľadajte lekársku pomoc/starostlivosť.
P405	Uchovávať uzamknuté.

Výstražné a bezpečnostné upozornenia pre SB1b:

Zložkou určujúcou nebezpečenstvo je imidazol;

reakčná hmotnosť: (3:1): 5-chlór-2-metyl-4-izotiazolín-3-ón [ES č. 247-500-7] a 2-metyl-2H-izotiazol-3-ón [ES č. 220-239-6].



Nebezpečenstvo

H317	Môže vyvolať alergickú kožnú reakciu.
H360D	Môže poškodiť nenarodené dieťa.
P201	Pred použitím sa oboznámte s osobitnými pokynmi.
P261	Zabráňte vdychovaniu prachu/dymu/plynu/hmly/pár/aerosólov.
P280	Noste ochranné rukavice/ochranný odev/ochranné okuliare/ochranu tváre/prostriedky na ochranu sluchu.
P302+P352	PRI KONTAKTE S POKOŽKOU: umyte veľkým množstvom vody.
P308+P313	Po expozícii alebo podozrení z nej: Vyhľadajte lekársku pomoc/starostlivosť.
P362+P364	Kontaminovaný odev vyzlečte a pred ďalším použitím vyperte.

Výstražné a bezpečnostné upozornenia pre MT4:

Nebezpečnou zložkou je xylén.



Pozor

H226	Horľavá kvapalina a pary.
H312+H332	Zdraviu škodlivý pri styku s kožou alebo pri vdýchnutí.
H315	Dráždi kožu.
H319	Spôsobuje vážne podráždenie očí.
H335	Môže spôsobiť podráždenie dýchacích ciest.
H373	Môže spôsobiť poškodenie orgánov pri dlhšej alebo opakovanej expozícii.
P210	Uchovávať mimo dosahu tepla, horúcich povrchov, iskier, otvoreného ohňa a iných zdrojov zapálenia. Nefajčite.
P260	Nevdychujte prach/dym/plyn/hmlu/pary/aerosóly.
P280	Noste ochranné rukavice/ochranný odev/ochranné okuliare/ochranu tváre.
P305+P351+P338	PO ZASIAHNUTÍ OČÍ: Niekoľko minút ich opatrne vyplachujte vodou. Ak používate kontaktné šošovky a je to možné, odstráňte ich. Pokračujte vo vyplachovaní.
P337+P313	Ak podráždenie očí pretrváva: vyhľadajte lekársku pomoc/starostlivosť.
P403+P235	Uchovávať na dobre vetranom mieste. Uchovávať v chlade.
EUH208	Obsahuje metyl 2-methylprop-2-enoate; metyl 2-methylpropenoate; metyl methacrylate, n-butyl methacrylate. Môže vyvolať alergickú reakciu.

Výstražné a bezpečnostné upozornenia pre CS1 a WB4:

Zmes nie je klasifikovaná ako nebezpečná podľa nariadenia (ES) č. 1272/2008.

Špeciálne označenie ES1:

EUH208	Obsahuje pepsin A. Môže vyvolať alergickú reakciu.
EUH210	Na požiadanie možno poskytnúť kartu bezpečnostných údajov.

7. Obmedzenia

- Na diagnostické použitie *in vitro*.
- Len na profesionálne použitie.
- Len na neautomatizované použitie.
- Klinická interpretácia akéhokoľvek pozitívneho farbenia alebo jeho neprítomnosti sa musí vykonať v kontexte klinickej anamnézy, morfológie, iných histopatologických kritérií, ako aj iných diagnostických testov. Je zodpovednosťou kvalifikovaného patológa/humánneho genetika, aby poznal ISH sondy, reagenty, diagnostické panely a metódy použité na výrobu farbeného preparátu. Farbenie sa musí vykonávať v certifikovanom, licencovanom laboratóriu pod dohľadom patológa/ humánneho genetika, ktorý je zodpovedný za preskúmanie farbených preparátov a zabezpečenie primeranosti pozitívnych a negatívnych kontrol.
- Zafarbenie vzorky, najmä intenzita signálu a zafarbenie pozadia, závisí od manipulácie so vzorkou a jej spracovania pred zafarbením. Nesprávna fixácia, zmrazenie, rozmrazenie, umývanie, sušenie, zahrievanie, rezanie alebo kontaminácia inými vzorkami alebo tekutinami môže spôsobiť artefakty alebo falošné výsledky. Nekonzistentné výsledky môžu byť dôsledkom rozdielov v metódach fixácie a vkladania, ako aj vnútorných nepravidielností vo vzorke.
- Výkon bol overený pomocou postupov opísaných v návode na použitie príslušnej sondy ZytoVision a implementačnej súpravy. Úpravy týchto postupov môžu zmeniť výkon a musí ich overiť používateľ. Tento IVD je certifikovaný ako CE len v prípade, že sa používa tak, ako je opísané v tomto návode na použitie v rozsahu určeného použitia.

8. Rušivé látky

Nasledujúce fixatíva sú nekompatibilné s ISH:

- Bouinovo fixačné činidlo
- Fixačné činidlo B5
- Kyslé fixačné prostriedky (napr. kyselina pikrová)
- Zenkerov fixatív
- Alkoholy (ak sa používajú samostatne)
- Chlorid ortuťnatý
- Formaldehydové/zinkové fixačné činidlo
- Hollandova fixácia
- Formalín bez pufru

9. Príprava vzoriek

Odporúčania:

- Vyhňte sa krížovej kontaminácii vzoriek v ktoromkoľvek kroku prípravy, pretože to môže viesť k chybným výsledkom.
- Fixácia v 10 % neutrálne pufrovanom formalíne počas 24 hodín pri izbovej teplote (18 - 25 °C).
- Veľkosť vzorky ≤ 0.5 cm³.
- Používajte parafrín prvotriednej kvality.
- Vkladanie by sa malo vykonávať pri teplotách nižších ako 65 °C.
- Prípravte rezy s veľkosťou 3 - 5 µm z mikrotomu.
- Použite pozitívne nabité mikroskopické sklíčka.
- Fixujte tkanivové rezy 2 - 16 hodín pri 50-60°C.

10. Prípravné ošetrenie zariadenia

PBS/Tween (WB4) sa má vopred upraviť podľa pokynov v časti 11. "Postup analýzy". Všetky ostatné činidlá súpravy sú pripravené na použitie. Nie je potrebná žiadna rekonštitúcia, miešanie ani riedenie .

11. Postup analýzy

11.1 Deň 1

Prípravné kroky

- Prípravte sériu etanolu (70 %, 90 % a 100 % roztok etanolu): Zriedte 100% etanol deionizovanou alebo destilovanou vodou. Tieto roztoky sa môžu uchovávať vo vhodných nádobách a môžu sa použiť opakovane.
- Heat Pretreatment Solution EDTA (PT2): Zahrejte na 98 °C v zakrytej nádobe na farbenie.
- Príprava 3% H₂O₂: Zriedte 1 diel 30% H₂O₂ v 9 dieloch 100% metanolu.
- ZytoDot CISH Probe: Pred použitím ju uveďte do izbovej teploty (RT).

Predúprava (odvoskovanie/proteolýza)

- Sklíčka inkubujte 10 minút pri teplote 70 °C (napr. na horúcej platni).
- Sklíčka inkubujte 2x 5 minút v xyléne.
- Sklíčka inkubujte 3x 3 minút v 100 % etanole.
- Sklíčka inkubujte 5 min v 3% H₂O₂.
- Premyte sklíčka 2x 1 min v deionizovanej alebo destilovanej vode.
- Inkubujte 15 pri 98°C.

Použite osem sklíčok na jednu nádobu na farbenie (v prípade potreby pridajte fiktívne sklíčka)

- Sklíčka okamžite preneste do deionizovanej alebo destilovanej vody a premývajte 2x 2 min.
- Naneste (po kvapkách) Pepsin Solution (ES1) na vzorku a inkubujte 5-15 min pri 37 °C vo vlhkej komore.

ES1 môže tvoriť zrazeniny, ktoré neovplyvňujú kvalitu. Vo všeobecnosti odporúčame zistiť optimálny čas proteolýzy v predbežných testoch.

- Sklíčka ponorte do deionizovanej alebo destilovanej vody.
- Dehydratácia v: 70 %, 90 % a 100 % etanole, vždy po dobu 1 min.
- Vysušenie rezov na vzduchu.

Poznámka: Pred aplikáciou sondy sa uistite, že rezy sú úplne suché.

Denaturácia a hybridizácia

- Na každú vopred upravenú vzorku napipetujte 10 µl sondy ZytoDot CISH Probe.
- Vzorky zakryte krycím sklíčkom s rozmermi 22 x 22 mm (zabráňte zachytávaniu bublín) a krycie sklíčko utesnite.

Na utesnenie odporúčame použiť gumový cement (napr. Fixogum).

- Umiestnite sklíčka na horúcu platňu alebo hybridizátor a vzorky denaturujte 5 minút pri teplote 94 - 95 °C.
- Sklíčka preneste do komory s vlhkosťou a hybridizujte cez noc pri 37 °C (napr. v hybridizačnej peci).

Je dôležité, aby vzorky počas hybridizačného kroku nevyschli.

11.2 Deň 2

Prípravné kroky

- Wash Buffer SSC (WB1) Na premytie s príslym účinkom zahrejte na 80 °C v zakrytej nádobe na farbenie. **WB1** môže pri teplote 2 - 8 °C tvoriť zrazeniny, ktoré nemajú vplyv na kvalitu a mali by sa pri zahrievaní rozpustiť
- Príprava premývacieho pufru PBS/Tween: Pridajte 1 tabletu PBS/Tween (WB4) do 1000 ml deionizovanej alebo destilovanej vody a rozpustite.

Premývací tlmivý roztok PBS/Tween je pri skladovaní pri teplote 2 - 8 °C stabilný jeden týždeň.

- 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): Pred použitím sa upraví na izbovú teplotu.

Posthybridizácia a detekcia

- Opatrne odstráňte gumový cement alebo lepidlo.
- Odstráňte krycie sklíčko ponorením do Wash Buffer SSC (WB1) pri izbovej teplote na 5 min.

WB1 sa môže použiť jedenkrát. Uchovávať pri teplote 2 - 8 °C maximálne jeden týždeň.

- Premývajte sklíčka 5 min v Wash Buffer SSC (WB1) pri teplote 80 °C.
- Na jednu nádobu na farbenie použite osem sklíčok (v prípade potreby pridajte fiktívne sklíčka).*

- Premyte sklíčka 2x 1 min v deionizovanej alebo destilovanej vode.
- Ponorte sklíčka do Wash Buffer PBS/Tween.
- Na sklíčka naneste Blocking Solution (BS1) (1-2 kvapky na sklíčko) a inkubujte 10 min pri RT.
- Blocking Solution (BS1) odstráňte, **ale neoplachujte!**
- Na sklíčka naneste Mouse-Anti-DIG (AB1) (1-2 kvapky na sklíčko) a inkubujte 30 min pri RT.
- Premyte sklíčka 3x 1 min v PBS/Tween.
- Na sklíčka naneste Anti-Mouse-HRP-Polymer (AB2) (1-2 kvapky na sklíčko) a inkubujte 30 min pri RT.
- Premyte sklíčka 3x 1 min v PBS/Tween.
- Prípravte roztok DAB (pracovný roztok): do odmerného pohára naplňte 1 ml DAB Solution B (SB1b) a pridajte jednu kvapku (30 µl) DAB Solution A (SB1a). Dobré premiešajte.
- Roztok DAB (1 - 2 kvapky na sklíčko) naneste na sklíčka a inkubujte 30 min pri RT.
- Preneste sklíčka do nádoby na farbenie a 2 min. ich premývajte pod studenou tečúcou vodou z vodovodu.



- (15) Vzorky na 5-10 sekúnd zafarbíte Mayer's Hematoxylin Solution (CS1).
- (16) Preložte preparáty do nádoby na farbenie a 2 minúty ich premývajte pod studenou tečúcou vodou z vodovodu.
- (17) Dehydratujte v: 70 %, 90 % a 100 % etanole, vždy po dobu 1 min.
- (18) Inkubujte sklíčka 2x 2 min v xyléne (použite veľmi čistý xylén).
- (19) Vyhnite sa zachyteným bublinkám, vzorky zakryte krycím sklíčkom (22 mm x 22 mm; 24 mm x 32 mm) pomocou Mounting Solution (alcoholic) (MT4). Nechajte 20 - 30 min, aby sa krycie sklíčko znehybnilo.

Použitie špičky pipety, ktorá bola odrezaná, aby sa zväčšil otvor, môže uľahčiť proces pipetovania.

- (20) Vyhodnoťte zafarbené vzorky pomocou svetelnej mikroskopie.

12. Interpretácia výsledkov

Pri použitíúpravy ZytoDot CISH Implementation Kisa hybridizačné signály polynukleotidov značených digoxigenínom zobrazujú ako hnedo až tmavohnedo sfarbené výrazné bodky. V interfázach alebo metafázach normálnych buniek alebo buniek bez aberácií skúmaných chromozómov sa objavia dva signály na jeden cieľ, s výnimkou sond zameraných na chromozómy X alebo Y, ktorých výsledkom sú dva, žiadny alebo jeden signál v závislosti od pohlavia a použitej sondy. V bunkách s chromozómovými aberáciami môže byť v interfázach alebo metafázach viditeľný iný vzor signálu. Podrobnejšie informácie o ZytoDot CISH Probe CISH.

13. Odporúčané postupy kontroly kvality

Pozrite si návod na použitie príslušnej sondy ZytoVision.

14. Výkonnostné charakteristiky

Pozrite si návod na použitie príslušnej sondy ZytoVision.

15. Likvidácia

Likvidácia činidiel sa musí vykonávať v súlade s miestnymi predpismi.

16. Riešenie problémov

Akákkoľvek odchýlka od návodu na obsluhu môže viesť k horším výsledkom farbenia alebo k tomu, že sa farbenie vôbec nevyskytne. Viac informácií nájdete na stránke www.zytovision.com.

Slabý signál alebo žiadny signál

Možná příčina	Akcia
Predbežná proteolytická úprava nebola vykonaná správne	Optimalizujte čas inkubácie pepsínu, v prípade potreby ho predĺžte alebo skráťte
Odparovanie sondy	Pri používaní hybridizéra je používanie vlhkých pásov/ nádrží naplnených vodou povinné. Pri používaní hybridizačnej pece je potrebné používať vlhkú komoru. Okrem toho by malo byť krycie sklo úplne utesnené, napr. pomocou Fixogumu, aby sa zabránilo vysychaniu vzorky počas hybridizácie
Nedostatočná príprava chromogénneho substrátu	Namiesto jednej kvapky roztoku DAB A použite 30 µl
Príliš dlhý čas kontrastného farbenia	Vyhnite sa tmavému kontrastnému farbeniu, pretože môže zakryť pozitívne signály farbenia
Nesprávne vykonané modrenie kontrastného farbiva	Na modrenie používajte studenú tečúcu vodu z vodovodu; nepoužívajte teplú alebo horúcu vodu ani modriace činidlá.

Príliš silné signály

Možná příčina	Akcia
Proteolytická predúprava vykonávaná príliš dlho	Optimalizujte čas inkubácie pepsínu, v prípade potreby ho predĺžte alebo skráťte
Reakcia substrátu je príliš intenzívna	Skrátiť čas inkubácie substrátu; roztok substrátu nezahrievať nad 25 °C; inkubovať len pri izbovej teplote

Signály zanikajú alebo sa spájajú

Možná příčina	Akcia
Bolo použité nevhodné montovacie médium	Používajte len montážny roztok dodaný so súpravou alebo montážne roztoky na báze xylénu bez akýchkoľvek nečistôt; nepoužívajte kryciu pásku

Nerovnomerné alebo v niektorých častiach len veľmi ľahké zafarbenie

Možná příčina	Akcia
Neúplné odparafínovanie	Používajte čerstvé roztoky; skontrolujte dĺžku trvania odparafínovania
Príliš malý objem činidla	Uistite sa, že objem činidla je dostatočne veľký na pokrytie plochy tkaniva

Nekonzistentné výsledky

Možná příčina	Akcia
Nedostatočné vysušenie pred aplikáciou sondy	Predĺženie sušenia na vzduchu
Príliš veľa vody/preplachovacieho pufru na tkanive pred aplikáciou pepsínu, profilátok a/alebo farebných substrátov	Uistite sa, že prebytočná tekutina je z tkanivového rezu odstránená odsávaním alebo vytriasaním zo sklíčka. Malé množstvá zvyškovej vody/preplachovacieho pufru neinterferujú s testom
Rozdiely v metódach fixácie a vkladania tkaniva	Optimalizácia metód fixácie a vkladania
Zmeny v hrúbke tkanivového rezu	Optimalizácia rezania vzorky

Zhoršená morfológia

Možná příčina	Akcia
Vzorka buniek alebo tkaniva nebola správne fixovaná	Optimalizácia času fixácie a fixačného prostriedku
Proteolytická predúprava sa nevykonáva vhodný časový interval	Skrátenie času inkubácie pepsínu

Křížové hybridizačné signály; silné pozadie

Možná příčina	Akcia
Sekcie vysušené kedykoľvek počas hybridizácie alebo po nej	Zabráňte vysušeniu rezov; použite vlhkú komoru; riadne utesnite krycie sklíčko
Predĺžený čas inkubácie substrátu	Skrátenie času inkubácie substrátu
Neúplné odparafínovanie	Používajte čerstvé roztoky; skontrolujte trvanie odparafínovania
Príliš silná proteolytická predúprava	Optimalizujte čas inkubácie pepsínu

Sklíčka sú pred hybridizáciou ochladené na izbovú teplotu	Rýchlo presuňte sklíčka na hybridizačnú teplotu
---	---

Prekrývajúce sa signály

Možná príčina	Akcia
Nevhodná hrúbka tkanivových rezov	Pripravte 3-5 µm rezy mikrotomom

Vzorka vypláva zo sklíčka

Možná príčina	Akcia
Príliš silná proteolytická predúprava	Skrátenie inkubačného času pepsínu

17. Literatúra

- 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. Revízia

Revízia	Opis zmeny
1.2.1	11. Postup analýzy <i>Premývací tlmivý roztok PBS/Tween je pri skladovaní pri teplote 2-8 °C stabilný jeden týždeň.</i>


www.zytovision.com

Najnovší návod na použitie, ako aj návod na použitie v rôznych jazykoch nájdete na stránke www.zytovision.com.

Naši odborníci sú pripravení odpovedať na vaše otázky.
Obráťte sa na help@zytovision.com



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

Ochranné známky:

ZytoVision® a ZytoDot® sú ochranné známky spoločnosti ZytoVision GmbH.