



ZytoDot 2C  
CISH Implementation Kit

REF	C-3044-10	Σ 10
REF	C-3044-40	Σ 40

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

4250380N717V



Diagnostická zdravotnícka pomôcka in vitro  
podľa IVDR (EÚ) 2017/746

1. Zamýšľané použitie

Súprava ZytoDot 2C CISH Implementation Kit je určená na použitie v kombinácii so sondami ZytoDot 2C CISH označenými digoxigenínom/dinitrofenylom na vzorkách fixovaných formalínom a zaliatych v parafíne 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 2C CISH Implementation Kit je k dispozícii v dvoch veľkostiach a skladá sa z:

Kód	Komponent	Množstvo		Kontajner
		40	10	
PT2	Heat Pretreatment Solution EDTA	500 ml	150 ml	Fľaša so skrutkovacím uzáverom (veľká)
ES1	Pepsin Solution	4 ml	1 ml	Fľaštička s kvapkadlom, biela čiapka
WB1	Wash Buffer SSC	560 ml	210 ml	Fľaša so skrutkovacím uzáverom (veľká)
WB5	20x Wash Buffer TBS	2x 50 ml	50 ml	Fľaša so skrutkovacím uzáverom
AB14	Anti-DIG/DNP-Mix	4 ml	1 ml	Fľaštička s kvapkadlom, žltá čiapka
AB13	HRP/AP-Polymer-Mix	4 ml	1 ml	Fľaštička s kvapkadlom, modrá čiapka
SB6a	AP-Red Solution A	0.4 ml	0.1 ml	Fľaštička s kvapkadlom, červená čiapka (malé)
SB6b	AP-Red Solution B	15 ml	4 ml	Fľaštička s kvapkadlom, červená čiapka
SB7a	HRP-Green Solution A	0.8 ml	0.2 ml	Fľaštička s kvapkadlom, zelená čiapka (malé)
SB7b	HRP-Green Solution B	15 ml	4 ml	Fľaštička s kvapkadlom, zelená čiapka
CS2	Nuclear Blue Solution	20 ml	4 ml	Fľaša so skrutkovacím uzáverom, čierna
MT4	Mounting Solution (alcoholic)	4 ml	1 ml	Sklenená fľaša, hnedá
	AP-Red reaction vessel	2	1	Odmerný pohár, červené večo
	HRP-Green reaction vessel	2	1	Odmerný pohár, zelené večo
	Návod na použitie	1	1	

**C-3044-10 (10 testov):** Komponenty **ES1, AB14, AB13, SB6a-b, SB7a-b, CS2** a **MT4** postačujú na 10 reakcií. Komponent **PT2** postačuje na 2 nádoby na farbenie s objemom 70 ml každá. Komponent **WB1** postačuje na 3 farbiace nádoby po 70 ml. Komponent **WB5** postačuje na 14 farbiacich nádobiek po 70 ml.  
**C-3044-40 (40 testov):** Komponenty **ES1, AB14, AB13, SB6a-b, SB7a-b, CS2** a **MT4** postačujú na 40 reakcií. Komponent **PT2** postačuje na 7 nádob na farbenie po 70 ml. Komponent **WB1** vystačí na 8 farbiacich nádobiek po 70 ml. Komponent **WB5** postačuje na 28 farbiacich nádobiek po 70 ml.

4. Požadované, ale neposkytované materiály

- ZytoDot 2C CISH Probe
- Pozitívne a negatívne kontrolné vzorky
- Mikroskopické sklíčka, kladne nabité
- Vodný kúpeľ (80 °C, 98 °C)
- Hybridizér alebo horúca platňa
- Hybridizér 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 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 30%
- Deionizovaná alebo destilovaná voda
- Krycie sklíčka (22 mm x 22 mm, 24 mm x 32 mm)
- Gumové lepidlo, napr. Fixogum Rubber Cement (výrobné číslo 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!
- Vyhnite sa krížovej kontaminácii vzoriek, pretože to môže viesť k chybným výsledkom.
- Počas hybridizácie a premývania sa vzorky nesmú nechať vyschnúť.

### Výstražné a bezpečnostné upozornenia pre AB13, AB14, PT2, SB7b, WB1 a WB5:

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.
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 SB7a:

Nebezpečné zložky sú metanol a 30 % roztok peroxidu vodíka.



#### Nebezpečenstvo

H225	Veľmi horľavá kvapalina a pary.
H301+H311+H331	Toxický pri požití, styku s kožou alebo pri vdýchnutí.
H370	Spôsobuje poškodenie orgánov.
P210	Uchovávať mimo dosahu tepla, horúcich povrchov, iskier, otvoreného ohňa a iných zdrojov zapálenia. Nefajčite.
P233	Nádobu uchovávať tesne uzavretú.
P260	Nevdychujte prach/dym/plyn/hmlu/pary/aerosóly.
P280	Noste ochranné rukavice/ochranný odev/ochranné okuliare/ochranu tváre/prostriedky na ochranu sluchu.
P308+P311	PO expozícii alebo podozrení z nej: Volajte TOXIKOLOGICKÉ INFORMAČNÉ CENTRUM/lekára.
P403+P235	Uchovávať na dobre vetranom mieste. Uchovávať v chlade.

### Výstražné a bezpečnostné upozornenia pre CS2:

Nebezpečné zložky sú etandiol a etylénglykol.



#### Pozor

H373	Pri dlhšej alebo opakovanej expozícii sa po prehltnutí môžu poškodiť obličky.
P260	Nevdychujte prach/dym/plyn/hmlu/pary/aerosóly.
P314	Ak pociťujete zdravotné problémy, vyhľadajte lekársku pomoc/starostlivosť.

### 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 methyl 2-methylprop-2-enoate; methyl 2-methylpropenoate; methyl methacrylate, n-butyl methacrylate. Môže vyvolať alergickú reakciu.

### Výstražné a bezpečnostné upozornenia pre SB6a:

H412	Škodlivý pre vodné organizmy, s dlhodobými účinkami
P273	Zabráňte uvoľneniu do životného prostredia.

### Špeciálne označenie E51:

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
- Formálín bez pufru

## 9. Príprava vzoriek

Odporúčania:

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

## 10. Prípravné ošetrovanie zariadenia

**20x Wash Buffer TBS (WB5)** sa pripraví podľa pokynov v časti 11. „Postup analýzy“. Všetky ostatné činidlá súpravy sú pripravené na použitie. Nie je potrebná rekonštitúcia, miešanie ani riedenie.

Pred použitím sondu uveďte do izbovej teploty (RT) a krátko premiešajte.

## 11. Postup analýzy

### 11.1 Deň 1

#### Prípravné kroky

1. **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.
2. **Heat Pretreatment Solution EDTA (PT2):** Zahrejte na 98 °C v zakrytej nádobe na farbenie.
3. **Príprava 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** Zriedte 1 diel 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> v 9 dieloch 100% metanolu.
4. **ZytoDot 2C CISH Probe:** Pred použitím ju uveďte do izbovej teploty (RT).

#### Predúprava (odvoskovanie/proteolýza)

1. Sklíčka inkubujte 10 minút pri teplote 70 °C (napr. na horúcej platni).
2. Sklíčka inkubujte 2x 5 minút v xyléne.
3. Sklíčka inkubujte 3x 3 minút v 100 % etanole.
4. Sklíčka inkubujte 5 min v 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
5. Premyte sklíčka 2x 1 min v deionizovanej alebo destilovanej vode.
6. Inkubujte 15 minút vo vopred zahriatom **Heat Pretreatment Solution EDTA (PT2)** pri 98°C.

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

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

**ES1** môže tvoriť zrazeniny, ktoré nemajú vplyv na kvalitu.

*Vo všeobecnosti odporúčame zistiť optimálny čas proteolýzy v predbežných testoch.*

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

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

#### Denaturácia a hybridizácia

1. Pipetujte 10 µl sondy na každú vopred upravenú vzorku.
2. 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).*

3. Umiestnite sklíčka na horúcu platňu alebo hybridizátor a vzorky denaturujte 5 minút pri teplote 79°C.
4. 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

1. **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.
2. **Príprava 1x Wash Buffer TBS:** Zriedte 1 diel 20x Wash Buffer TBS (**WB5**) v 19 dieloch deionizovanej alebo destilovanej vody.

*Zriedený 1x Wash Buffer TBS je stabilný jeden týždeň, ak sa skladuje pri teplote 2 - 8 °C.*

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):** Pred použitím sa upraví na izbovú teplotu.

*Zložky **SB7a** a **SB7b** môžu tvoriť zrazeniny, ktoré nemajú vplyv na kvalitu farbenia.*

#### Posthybridizácia a detekcia

1. Opatrne odstráňte gumový cement alebo lepidlo.
2. 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.*

3. 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).*

4. Premyte sklíčka 2x 1 min v deionizovanej alebo destilovanej vode.
5. Sklíčka ponorte do 1x Wash Buffer TBS.
6. Na sklíčka naneste Anti-DIG/DNP-Mix (AB14) (1-2 drops per slide) to the slides and incubate for 15 min at 37°C in a humidity chamber.
7. Premývajte sklíčka 3x 1 min v 1x Wash Buffer TBS.
8. Na sklíčka naneste HRP/AP-Polymer-Mix (AB13) (1-2 kvapky na sklíčko) a inkubujte 15 min pri 37 °C vo vlhkej komore.
9. Premývajte sklíčka 3x 1 min. v 1x Wash Buffer TBS.
10. Pripravte AP-Red Solution (pracovný roztok): naplňte 1 ml AP-Red Solution B (**SB6b**) do odmerného pohára a pridajte jednu kvapku (30 µl) AP-Red Solution A (**SB6a**). Dobre premiešajte.
11. Naneste AP-Red Solution (1 - 2 kvapky na sklíčko) na sklíčka a inkubujte v tme 10 min pri RT.
12. Počas inkubácie pripravte HRP-Green Solution (pracovný roztok): do odmerného pohára naplňte 1 ml HRP-Green Solution B (SB7b) a pridajte dve kvapky (2x 20 µl) HRP-Green Solution A (SB7a). Dobre premiešajte.
13. Sklíčka premývajte 2 min v deionizovanej alebo destilovanej vode.
14. HRP-Green Solution naneste po kvapkách (1 - 2 kvapky na sklíčko) na sklíčka a inkubujte v tme 10 min pri izbovej teplote.
15. Premývajte sklíčka 2 min v deionizovanej alebo destilovanej vode.
16. Vzorky kontrastujte 2 min Nuclear Blue Solution (CS2).
17. Preložte preparáty do nádoby na farbenie a premyte ich 2 min pod studenou tečúcou vodou z vodovodu.
18. Dehydratujte 3x 30 s v 100 % etanole (použite veľmi čistý etanol).
19. Inkubujte preparáty 2x 30 s v xyléne (použite veľmi čistý xylén).

*Inkubačný čas nepredlžujte ani neskracujte, pretože by to mohlo viesť k strate signálov!*

20. 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.*

21. Vyhodnoťte zafarbené vzorky pomocou svetelnej mikroskopie.

## 12. Interpretácia výsledkov

Pri použití súpravy ZytoDot 2C CISH Implementation Kit sa hybridizačné signály polynukleotidov označených digoxigenínom zobrazia ako tmavozelené výrazné bodky a polynukleotidy označené dinitrofenylom sa zobrazia ako jasne červené výrazné bodky. V interfázach alebo metafázach normálnych buniek alebo buniek bez aberácií skúmaných chromozómov sa objavujú dva signály na sondu/značku hapténu, s výnimkou sond zameraných na chromozómy X a/alebo Y, v dôsledku čoho sa v závislosti od pohlavia neobjaví žiadny až dva signály na sondu/značku hapténu. V bunkách s chromozómovými aberáciami môže byť v interfázach alebo metafázach viditeľný iný vzor signálu. Podrobnejšie informácie o interpretácii výsledkov nájdete v návode na použitie príslušnej sondy ZytoDot 2C CISH Probe.

## 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

Akákoľvek 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](http://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 hybridizéru je používanie vlhkých pásov/nádrží naplnených vodou povinné. Pri používaní hybridizačnej pece je potrebné používať komoru s vlhkosťou. Okrem toho by malo byť krycie sklíčko úplne utesnené, napr. pomocou Fixogumu, aby sa zabránilo vysychaniu vzorky počas hybridizácie
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
Čas inkubácie roztoku AP-Red nie je správny	V prípade potreby možno inkubačný čas skrátiť na 5 minút. Roztok substrátu nezahrievajte nad 25 °C; inkubujte len pri izbovej teplote
Čas inkubácie roztoku HRP-Green nie je správny	V prípade potreby možno inkubačný čas skrátiť na 7 minút. Roztok substrátu nezahrievajte nad 25 °C; inkubujte len pri izbovej teplote

### Príliš slabé červené signály

Možná příčina	Akcia
Roztok AP-Red bol vystavený silnému priamemu svetlu	Roztok AP-Red pripravujte a používajte chránený pred silným priamym svetlom
Roztok AP-Red bol pripravený príliš skoro	Pripravte pred okamžitým použitím
Čas inkubácie roztoku AP-Red nie je správny	V prípade potreby je možné inkubáciu predĺžiť až na 15 min.
Nedostatočná príprava chromogénneho substrátu	Nezvyšujte objem roztoku A

### Príliš slabé zelené signály

Možná příčina	Akcia
Príliš dlhý čas inkubácie pri každom kroku premývania po farbení pomocou HRP-Green	Neprekračujte uvedený inkubačný čas
Čas inkubácie roztoku HRP-Green nie je správny	V prípade potreby je možné inkubáciu predĺžiť až na 15 min.
Nedostatočná príprava chromogénneho substrátu	Nezvyšujte objem roztoku A

### Signály zanikajú alebo sa spájajú

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

rezy neboli správne dehydrované	Používajte čerstvé roztoky etanolu a xylénu; používajte iba xylén "čistej" kvality
---------------------------------	--

**Nerovnomerné alebo v niektorých častiach len veľmi ľahké zafarbenie**

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

**Nekonzistentné výsledky**

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

**Zhoršená morfológia**

Možná príčina	Akcia
Vzorka buniek alebo tkaniva nebola správne fixovaná	Optimalizácia času fixácie a fixačného prostriedku
Proteolytická predúprava sa uskutočnila príliš dlho	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 na; riadne utesnite krycie sklíčko
Predĺžený čas inkubácie substrátu	Skrátenie času inkubácie substrátu
Neúplné odparafinovanie	Používajte čerstvé roztoky; skontrolujte trvanie odparafinovania
Príliš silná proteolytická predúprava	Optimalizujte čas inkubácie pepsínu
Sklíčka pred hybridizáciou ochladené na izbovú teplotu	Rýchlo presuňte sklíčka na hybridizačnú teplotu

**Prekrývajúce sa signály**

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

**Vzorka vypláva zo sklíčka**

Možná příčina	Akcia
Príliš silná proteolytická predúprava	Skrátenie inkubačného času pepsínu

**17. Literatúra**

- 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. Revízia**
[www.zytovision.com](http://www.zytovision.com)

Najnovší návod na použitie, ako aj návod na použitie v rôznych jazykoch nájdete na stránke [www.zytovision.com](http://www.zytovision.com).

Naši odborníci sú pripravení odpovedať na vaše otázky. Obráťte sa na [help@zytovision.com](mailto:help@zytovision.com)



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

**Ochranné známky:**

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