



ZytoFast PLUS CISH Implementation Kit HRP-DAB

REF T-1063-40

Σ 40

För användning i kromogena *in situ*-
hybridiseringsprocedurer (CISH)

4250380N567Z



Medicinteknisk produkt för in vitro diagnostik
i enlighet med IVDR (EU) 2017/746

1. Avsedd användning

ZytoFast PLUS CISH Implementation Kit HRP-DAB är avsedd för användning i kombination med digoxigenin-märkta ZytoFast Probes på formalinfixerade, paraffin-märkta specimen genom kromogen *in situ*-hybridisering (CISH).

Produkten är endast avsedd för professionell användning. Alla tester där produkten används ska genomföras i ett certifierat, licensierat laboratorium av kvalificerad personal under överinseende av en patolog/humangenetiker.

2. Testprincip

Tekniken för kromogen *in situ*-hybridisering (CISH) tillåter detektion och visualisering av specifika nukleinsyrasekvenser i cellberedningar. Hapten-märkta nukleotidfragment, så kallade CISH-prober, och deras komplementära målsekvenser i preparaten samdenatureras och tillåts därefter härda under hybridisering. Efteråt avlägsnas ospecifika och obundna probfragment genom tvättsteg för stringens. Duplexbildning av den märkta proben kan visualiseras med hjälp av primära (omärkta) antikroppar, som detekteras av sekundära polymeriserade enzymkonjugerade antikroppar. Den enzymatiska reaktionen med kromogena substrat leder därefter till bildandet av färgade utfällningar. Efter mottfärgning av cellkärnan med ett nukleärt färgämne visualiseras hybridiserade probfragment med ljusmikroskopi.

3. Tillhandahållen reagens

ZytoFast PLUS CISH Implementation Kit HRP-DAB finns i en storlek och består av:

Kod	Komponent	Kvantitet Σ 40	Behållare
PT2	Heat Pretreatment Solution EDTA	500 ml	Flaska med skruvlock (stor)
ES1	Pepsin Solution	4 ml	Droppflaska, vitt lock
WB5	20x Wash Buffer TBS	4x 50 ml	Flaska med skruvlock
AB1	Mouse-Anti-Dig	4 ml	Droppflaska, rosa lock
AB2	Anti-Mouse-HRP-Polymer	4 ml	Droppflaska, lila lock
SB1a	DAB Solution A	0,3 ml	Droppflaska, grönt lock (liten)
SB1b	DAB Solution B	10 ml	Droppflaska, grått lock
CS2	Nuclear Blue Solution	20 ml	Flaska med skruvlock, svart
MT4	Mounting Solution (alcoholic)	4 ml	Glasflaska, brun
	Bruksanvisning	1	

T-1063-40 (40 tester): Komponenterna **ES1**, **AB1**, **AB2**, **SB1a-b**, **CS2**, och **MT4** räcker till 40 reaktioner. Komponent **PT2** räcker till 7 färgningsburkar på 70 ml vardera. Komponent **WB5** räcker till 57 färgningsburkar på 70 ml vardera.

4. Material som krävs, men inte tillhandahålls

- Digoxigenin-märkt ZytoFast CISH Probe
- Positiv och negativ kontrollvävnad
- Objektglas för mikroskopering, positivt laddade
- Vattenbad (55 °C, 98 °C)
- Hybridiserare eller varm platta
- Hybridiserare eller fuktkammare i hybridiseringsugn
- Justerbara kalibrerade pipetter (10 µl, 1000 µl)
- Färgningsburkar eller -bad
- Timer
- Kalibrerad termometer
- Etanol eller reagensalkohol
- Xylen
- Metanol 100 %
- Väteperoxid (H₂O₂) 30 %
- Avjoniserat eller destillerat vatten
- Täckglas (22 mm x 22 mm, 24 mm x 32 mm)
- Gummiment, t.ex. Fixogum Rubber Cement (art. nr E-4005-50/-125) eller dylikt
- Adekvat underhållet ljusmikroskop (100-200x)

5. Förvaring och hantering

Förvaras vid 2-8 °C i upprätt läge. Återgå till förvaringsförhållanden omedelbart efter användning. Använd inte reagens efter det utgångsdatum som anges på etiketten. Produkten är stabil fram till det utgångsdatum som anges på etiketten om den hanteras i enlighet med denna.

6. Varningar och försiktighetsåtgärder

- Läs instruktionerna före användning!
- Använd inte reagenserna efter utgångsdatumet!
- Produkten innehåller ämnen (i låga koncentrationer och volymer) som är hälsovådliga. Undvik varje direktkontakt med reagens. Vidta lämpliga skyddsåtgärder (använd engångshandskar, skyddsglasögon och labbkläder)!
- Rapportera alla allvarliga incidenter som inträffat i samband med produkten till tillverkaren och den behöriga myndigheten enligt lokala bestämmelser!
- Om reagens kommer i kontakt med huden, skölj genast huden med rikliga mängder vatten!

- Ett materialsäkerhetsdatablad finns tillgängligt för den professionella användaren på begäran.
- Återanvänd inte reagens, såvida inte återanvändning uttryckligen tillåts!
- Undvik korskontaminering av prov eftersom detta kan leda till felaktiga resultat.
- Specimen får inte tillåtas torka under hybridiserings- och torkningsstegen.

Faro- och skyddsangivelser för AB1, AB2, PT2, och WB5:

Den farobestämmande komponenten är en reaktionsblandning av: 5-kloro-2-metyl-4-isotiazolin-3-on [EG-nr 247-500-7] och 2-metyl-2H-isotiazol-3-on [EG-nr 220-239-6] (3:1).



Varning

H317	Kan orsaka en allergisk hudreaktion.
P261	Undvik att inandas damm/rök/gaser/mist/ångor/sprej.
P272	Kontaminerade arbetskläder får inte avlägsnas från arbetsplatsen.
P280	Använd skyddshandskar/skyddskläder/ögonskydd/ansiktsskydd.
P302+P352	VID HUDKONTAKT: Tvätta med mycket tvål och vatten.
P333+P313	Vid hudirritation eller utslag: Sök läkarhjälp.
P362+P364	Kontaminerade kläder tas av och tvättas innan de används igen.

Faro- och skyddsangivelser för CS2:

Den farobestämmande komponenten är etandiol, etylenglykol.



Varning

H373	Kan orsaka njurskador genom långvarig eller upprepad exponering genom sväljning.
P260	Inandas inte damm/rök/gaser/dimma/ångor/sprej.
P314	Sök läkarhjälp vid obehag.

Faro- och skyddsangivelser för MT4:

Den farobestämmande komponenten är xilen.



Varning

H226	Brandfarlig vätska och ånga.
H312+H332	Giftigt vid hudkontakt eller inandning.
H315	Irriterar huden.
H319	Orsakar allvarlig ögonirritation.
H335	Kan orsaka irritation i andningsvägarna.
H373	Kan orsaka organskador genom långvarig eller upprepad exponering.
P210	Får inte utsättas för värme, heta ytor, gnistor, öppen låga eller andra antändningskällor. Rökning förbjuden.
P260	Inandas inte damm/rök/gaser/dimma/ångor/sprej.
P280	Använd skyddshandskar/skyddskläder/ögonskydd/ansiktsskydd.
P305+P351+P338	VID KONTAKT MED ÖGONEN: Skölj försiktigt med vatten i flera minuter. Ta ur eventuella kontaktlinser om det går lätt. Fortsätt att skölja.
P337+P313	Vid bestående ögonirritation: Sök läkarhjälp.
P403+P235	Förvaras på en väl ventilerad plats. Förvaras svalt.
EUH208	Innehåller metyl-2-metylprop-2-enoat; metyl-2-metylpropenoat; metylmetakrylat. Kan orsaka en allergisk reaktion.

Faro- och skyddsangivelser för SB1a:

Den farobestämmande komponenten är bifenyl-3,3',4,4'-tetrayltetraamin; diaminobensidin.



Fara

H350	Kan orsaka cancer.
P201	Inhämta särskilda instruktioner före användning.
P202	Använd inte förrän du läst och förstått säkerhetsanvisningarna.
P280	Använd skyddshandskar/skyddskläder/ögonskydd/ansiktsskydd.
P308+P313	Vid exponering eller misstanke om exponering: Sök läkarhjälp.
P405	Förvaras inlåst.

Faro- och skyddsangivelser för SB1b:

Den farobestämmande komponenten är imidazol; en reaktionsblandning av: 5-kloro-2-metyl-4-isotiazolin-3-on [EG-nr 247-500-7] och 2-metyl-2H-isotiazol-3-on [EG-nr 220-239-6] (3:1).



Fara

H317	Kan orsaka en allergisk hudreaktion.
H360D	Kan skada det födda barnet.
P201	Inhämta särskilda instruktioner före användning.
P261	Undvik att inandas damm/rök/gaser/mist/ångor/sprej.
P280	Använd skyddshandskar/skyddskläder/ögonskydd/ansiktsskydd.
P302+P352	VID HUDKONTAKT: Tvätta med mycket tvål och vatten.
P308+P313	Vid exponering eller misstanke om exponering: Sök läkarhjälp.
P362+P364	Kontaminerade kläder tas av och tvättas innan de används igen.

Specialmärkning av ES1:

EUH208	Innehåller Pepsin A. Kan orsaka en allergisk reaktion.
EUH210	Säkerhetsdatablad finns tillgängligt på förfrågan.

7. Begränsningar

- För *in vitro* diagnostisk användning.
- Endast för professionell användning.
- Endast för icke-automatiserad användning.
- Den kliniska tolkningen av varje positiv färgning, eller dess frånvaro, måste göras inom ramen för klinisk historia, morfologi, andra histopatologiska kriterier samt andra diagnostiska tester. Det är en kvalificerad patolog/humangenetikers ansvar att vara förtrogen med ISH-proberna, reagensen, diagnostikpanelerna och metoderna som används för att framställa det färgade preparatet. Färgning måste utföras i ett certifierat, licensierat laboratorium under överinseende av en patolog/humangenetiker som ansvarar för att granska de färgade objektglasen och säkerställa att positiva och negativa kontroller är tillräckliga.
- Specimenfärgning, särskilt signalintensitet och bakgrundsfärgning, är beroende av hantering och bearbetning av specimen före färgning. Felaktig fixering, frysning, upptining, tvättning, torkning, uppvärmning, snittning eller kontaminering med andra specimen eller vätskor kan resultera i artefakter eller falska resultat. Inkonsekventa resultat kan orsakas av variationer i fixerings- och inbäddningsmetoder, såväl som från inneboende oregelbundenheter i specimen.

- Prestandan validerades med de procedurer som beskrivs i respektive ZytoVision-probs och -implementeringskits bruksanvisning. Ändringar av dessa procedurer kan förändra effekten, och måste valideras av användaren. Denna IVD är endast certifierad som CE när den används enligt beskrivningen i denna bruksanvisning för användning inom ramen för den avsedda användningen.

8. Störande ämnen

Följande fixativ är inkompatibla med ISH:

- Bouins fixativ
- B5-fixativ
- Sura fixativ (t.ex. pikrinsyra)
- Zenkers fixativ
- Alkoholer (vid användning ensamt)
- Kvicksilverklorid
- Formaldehyd/zinkfixativ
- Hollandes fixativ
- Obuffrad formalin

9. Förberedelse av specimen

Rekommendationer:

- Undvik korskontaminering av prov eftersom detta kan leda till felaktiga resultat.
- Fixation i 10 % neutralt buffrad formalin i 24 h vid rumstemperatur (RT, 18-25 °C).
- Provstorlek $\leq 0,5 \text{ cm}^3$.
- Använd paraffin av premiumkvalitet.
- Inbäddning ska utföras vid temperaturer under 65 °C.
- Förbered 3-5 μm mikrotomsnitt.
- Använd positivt laddade objektglas för mikroskopering.
- Fixera vävnadssnitt i 2-16 h vid 50-60 °C.

10. Förbehandling av enheten

20x Wash Buffer TBS (WB5) ska förberedas enligt instruktionerna i 11. "Provförfarande". Alla andra satsreagenser är klara att använda. Det krävs ingen rekonstitution, blandning eller spädning.

11. Provförfarande

Förberedande steg

- (1) (Valfritt) förbered en etanolserie (70 %, 90 % och 100 % etanol) (lösningar): Späd 100 % etanol med avjoniserat eller destillerat vatten. Lösningarna kan förvaras i lämpliga behållare och återanvändas.
- (2) Heat Pretreatment Solution EDTA (PT2): Värm till 98 °C i en täckt färgningsburk.
- (3) Förberedelse av 1x Wash Buffer TBS: Späd 1 del 20x Wash Buffer TBS (WB5) i 19 delar avjoniserat eller destillerat vatten.

Spädd 1x Wash Buffer TBS är stabilt i en vecka vid förvaring vid 2-8 °C.

- (4) 1x Wash Buffer TBS: För stringenstätt, värm till 55 °C i en täckt färgningsburk.
- (5) ZytoFast CISH Probe: Försätt till hybridiseringsstemperatur och blanda ordentligt före användning.
- (6) Förberedelse av 3 % H₂O₂: Späd 1 del 30 % H₂O₂ i 9 delar 100 % metanol.
- (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): Försätt i RT (18 °C-25 °C) före användning.

Förbehandling (avvaxning/proteolys)

- (1) Placera objektglasen i 10 min vid 70 °C (t.ex. på en varm platta).
- (2) Inkubera objektglasen i 2x 5 minuter i xylene.
- (3) Inkubera objektglasen i 3x 3 minuter i 100 % etanol.
- (4) Inkubera objektglasen i 5 min i 3 % H₂O₂.
- (5) Tvätta objektglasen 2x 1 min i avjoniserat eller destillerat vatten.
- (6) Applicera (droppvis) Pepsin Solution (ES1) till provet och inkubera i 10-30 minuter vid 37 °C i en fukt-kammare.

ES1 kan bilda fällningar som inte påverkar kvaliteten.

Som en allmän regel rekommenderar vi att fastställa den optimala tiden för proteolys i förtester.

- (7) Sänk ned objektglasen i avjoniserat eller destillerat vatten vid RT.

- (8) Inkubera i 15 minuter i förvärmad Heat Pretreatment Solution EDTA (PT2) vid 98 °C.

Använd åtta objektglas per färgningsburk (lägg till dummy-objektglas vid behov).

- (9) Sänk ned objektglasen i avjoniserat eller destillerat vatten vid RT.
- (10) (Valfritt) dehydrering i: 70 %, 90 %, och 100 % etanol, i 1 min vardera.
- (11) Lufttorka snitten.

Notera: Se till att snitten är helt torra innan proven appliceras.

Denaturering och hybridisering

- (1) Pipettera 10 μl av ZytoFast CISH Probe på varje förbehandlat specimen.
 - (2) Täck specimen med ett täckglas på 22 mm x 22 mm (undvik fångade bubblor) och tillslut täckglaset.
- Vi rekommenderar att gummiment (t.ex. Fixogum) används för tillslutningen.*
- (3) Placera objektglasen på en varm platta eller hybridiserare och denaturera specimen i 5 min vid 75 °C.
 - (4) Överför objektglasen till en fukt-kammare och hybridisera i 1 h (t.ex. i en hybridiseringsugn) vid
37 °C för DNA targeting* probes eller vid
55 °C för RNA targeting* probes.

**Se probens medföljande bruksanvisning. Det är viktigt att specimen inte torkar ut under hybridiseringssteget.*

Efterhybridisering och detektion

- (1) Ta försiktigt bort gummimentet eller limmet.
 - (2) Ta bort täckglaset genom att sänka ned objektglasen i 1x Wash Buffer TBS vid RT i 5 min.
 - (3) Tvätta objektglasen 5 min i 1x Wash Buffer TBS i 55 °C.
- Använd åtta objektglas per färgningsburk (lägg till dummy-objektglas vid behov).
- (4) Tvätta objektglasen 5 min i 1x Wash Buffer TBS i RT.
 - (5) Applicera Mouse-Anti-DIG (AB1) (1-2 droppar per objektglas) till objektglasen och inkubera i 30 minuter vid 37 °C i en fukt-kammare.
 - (6) Tvätta objektglasen 3x 1 min i 1x Wash Buffer TBS vid RT.
 - (7) Applicera Anti-Mouse-HRP-Polymer (AB2) (1-2 droppar per objektglas) till objektglasen och inkubera i 30 minuter vid 37 °C i en fukt-kammare.
 - (8) Tvätta objektglasen 3x 1 min i 1x Wash Buffer TBS vid RT.
 - (9) Förbered DAB Solution (arbetslösning): fyll i 1 ml DAB Solution B (SB1b) i en graderad kopp och tillsätt en droppe (30 μl) DAB Solution A (SB1a). Blanda ordentligt.
 - (10) Applicera DAB Solution (1-2 droppar per objektglas) till objektglasen och inkubera i 20 minuter vid 37 °C i en fukt-kammare.
 - (11) Tvätta objektglasen 3x 1 min i avjoniserat eller destillerat vatten vid RT.
 - (12) Motfärga specimen i 2-5 min med Nuclear Blue Solution (CS2).
 - (13) Överför objektglasen i en färgningsburk och tvätta 2 minuter under kallt rinnande kranvatten.
 - (14) Dehydrera 3x 30 s i 100 % etanol (använd mycket ren etanol).
 - (15) Inkubera objektglas i 2x 30 s i xylene (använd mycket ren xylene).
 - (16) Lufttorka i ungefär 2 min.
 - (17) Undvik instängda bubblor, täck proven med ett täckglas (22 mm x 22 mm; 24 mm x 32 mm) genom användning av Mounting Solution (alcoholic) (MT4). Lägg 20-30 min så att täckglaset immobiliseras.

Användning av en pipettspets som skurits av för att öka storleken på öppningen kan förenkla pipetteringsprocessen.

- (18) Utvärdera färgade specimen med ljusmikroskopi.

12. Tolkning av resultaten

Vid användning av ZytoFast PLUS CISH Implementation Kit HRP-DAB, syns hybridisering av dioxigenin-märkta oligonukleotider som brunfärgade utfällningar. Motfärgning av specimen med Nuclear Blue Solution (CS2) ger ljust färgade lila-blå cellkärnor.

Beroende på den applicerade ZytoFast proben, finns en positiv reaktivitet i målcellerna i cytoplasman eller i cellkärnan. För en mer detaljerad beskrivning av det förväntade signalmönstret, se den medföljande bruksanvisningen för ZytoFast probe.

13. Rekommenderade procedurer för kvalitetskontroll

Se bruksanvisningen för respektive ZytoVision-prob.

14. Prestandaegenskaper

Se bruksanvisningen för respektive ZytoVision-prob.

15. Kassering

Reagensen måste avfallshanteras enligt lokala bestämmelser.

16. Felsökning

Eventuella avvikelser från instruktionerna för användning kan leda till osäkra färgningsresultat eller till att färgningen uteblir helt. Se www.zytovision.com för mer information.

Svaga signaler eller inga signaler alls

Möjlig orsak	Åtgärd
Proteolytisk förbehandling inte utförd ordentligt	Optimera inkubationstiden för pepsin, öka eller minska den efter behov
Provavdunstning	Vid användning av en hybridiserare är det obligatoriskt att använda de våta remsorna/vattenfyllda tankarna. Vid användning av en hybridiseringsugn krävs användning av en fukt-kammare. Dessutom bör täckglaset förslutas helt, t.ex. med Fixogum, för att förhindra att provet torkar ut under hybridisering
Otillräcklig förberedelse av kromogent substrat	Istället för att förbereda färgsubstratet genom droppning, använd en pipett
Motfärgningstiden är för lång	Undvik mörk motfärgning, eftersom det kan skymma positiva färgningssignaler
Blåning av motfärgning inte korrekt utförd	Använd kallt rinnande kranvatten för blåning; använd inte varmt eller hett vatten eller blånande reagenser

Signaler bleknar eller smälter samman

Möjlig orsak	Åtgärd
En olämplig monteringslösning har använts	Använd endast en monteringslösning som medföljer kitet eller som rekommenderas i bruksanvisningen. Använd lösningar som är fria från föroreningar; använd inte täckglastejp

Ojämn eller i vissa delar endast mycket lätt färgning

Möjlig orsak	Åtgärd
Ofullständig avväxning	Använd färsk lösning; kontrollera avväxningens varaktigheter
Reagensvolym för liten	Säkerställ att reagensvolymen är tillräckligt stor för att täcka vävnadsytan

Inkonsekventa resultat

Möjlig orsak	Åtgärd
Otillräcklig torkning före probapplicering	Förläng lufttorkningen
För mycket vatten/tvättbuffert på vävnaden innan applicering av pepsin, antikroppar och/eller färgsubstrat	Säkerställ att överflödigt vätska avlägsnas från vävnadssnittet genom att torka eller skaka av den från objektglaset. Små mängder kvarvarande vatten/tvättbuffert stör inte testet
Variationer i vävnadsfixations- och inbäddningsmetoder	Optimera fixations- och inbäddningsmetoder
Variationer i vävnadssnittstjockleken	Optimera snittningen

Morfologi degraderad

Möjlig orsak	Åtgärd
Cell- eller vävnadsprov har inte fixerats ordentligt	Optimera fixeringstid och fixativ
Proteolytisk förbehandling inte utförd ordentligt	Optimera inkubationstiden för pepsin

Ojämn bakgrund

Möjlig orsak	Åtgärd
Snitten torkade ut när som helst under eller efter hybridisering	Undvik att snitt torkar ut; använd fukt-kammare; tillslut täckglaset ordentligt
Förlängd inkubationstid för substrat	Förkorta inkubationstiden för substrat
Ofullständig avväxning	Använd färsk lösning; kontrollera avväxningens varaktighet
Proteolytisk förbehandling inte utförd ordentligt	Optimera inkubationstiden för pepsin
Objektglaset kyls till rumstemperatur före hybridisering	Överför objektglaset snabbt till hybridiseringstemperatur

Överlappande signaler

Möjlig orsak	Åtgärd
Olämplig tjocklek på vävnadssnitt	Förbered 3-5 µm mikrotomsnitt

Specimen flyter av objektglaset

Möjlig orsak	Åtgärd
Proteolytisk förbehandling för stark	Korta av inkubationstiden för pepsin

17. Litteratur

- 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



www.zytovision.com

Se www.zytovision.com för den senaste bruksanvisningen samt för bruksanvisningar på olika språk.

Våra experter finns där för att svara på dina frågor.
Kontakta help@zytovision.com



ZytoVision GmbH
Fischkai 1
27572 Bremerhaven/Tyskland
Telefonnummer: +49 471 4832-300
Faxnummer: +49 471 4832-509
www.zytovision.com
E-postadress: info@zytovision.com

Varumärken:

ZytoVision® och ZytoFast® är varumärken som tillhör ZytoVision GmbH.