



ZytoDot 2C CISH Implementation Kit

REF C-3044-10 Σ 10

REF C-3044-40 Σ 40

Kromojenik *in situ* hibridizasyon (CISH) prosedürlerinde kullanım için

4250380N717V



İn vitro diagnostik tıbbi cihaz

IVDR (AB) 2017/746'ya göre

1. Kullanım amacı

ZytoDot 2C CISH Implementation Kit, kromojenik *in situ* hibridizasyon (CISH) ile formalinle sabitlenmiş, parafine gömülü numunelerde Digoxigenin/Dinitrophenyl etiketli ZytoDot 2C CISH Problemleri ile birlikte kullanılmak üzere tasarlanmıştır.

Ürün sadece profesyonel kullanım için tasarlanmıştır. Ürünün kullanıldığı tüm testler sertifikalı, lisanslı bir anatomik patoloji laboratuvarında bir patolog/insan genetikçisinin gözetimi altında kalifiye personel tarafından gerçekleştirilmelidir.

2. Test prensibi

Kromojenik *in situ* hibridizasyon (CISH) tekniği, hücre preparatlarında spesifik nükleik asit dizilerinin tespit edilmesini ve görüntülenmesini sağlar. CISH problemleri olarak adlandırılan hapten-işaretli nükleotid fragmanları ve preparatlardaki tamamlayıcı hedef dizileri birlikte denatüre edilir ve daha sonra hibridizasyon sırasında tavlamaına izin verilir. Daha sonra, spesifik olmayan ve bağlanmamış prob parçaları sıkı yıkama adımları ile uzaklaştırılır. İşaretli probun dubleks oluşumu, ikincil polimerize enzim-konjuge antikorlar tarafından tespit edilen birincil (işaretsiz) antikorlar kullanılarak görselleştirilebilir. Kromojenik substratlarla enzimatik reaksiyon, renkli çökeltilerin oluşmasına yol açar. Çekirdeğin bir nükleer boya ile karşı boyanmasından sonra, hibridize prob parçaları ışık mikroskobu ile görselleştirilir.

3. Sağlanan reaktifler

ZytoDot 2C CISH Implementation Kit tek şekilde temin edilir ve şunları içerir:

Kod	Bileşen	Miktar		Ambalaj
		40	10	
PT2	Heat Pretreatment Solution EDTA	500 ml	150 ml	Vidalı kapaklı şişe, (büyük)
ES1	Pepsin Solution	4 ml	1 ml	Damlalıklı şişe, beyaz kapak
WB1	Wash Buffer SSC	560 ml	210 ml	Vidalı kapaklı şişe, (büyük)
WB5	20x Wash Buffer TBS	2x 50 ml	50 ml	Vidalı kapaklı şişe
AB14	Anti-DIG/DNP-Mix	4 ml	1 ml	Damlalıklı şişe, sarı kapaklı
AB13	HRP/AP-Polymer-Mix	4 ml	1 ml	Damlalıklı şişe, mavi kapaklı
SB6a	AP-Red Solution A	0.4 ml	0.1 ml	Damlalıklı şişe, kırmızı kapaklı (küçük)
SB6b	AP-Red Solution B	15 ml	4 ml	Damlalıklı şişe, kırmızı kapaklı
SB7a	HRP-Green Solution A	0.8 ml	0.2 ml	Damlalıklı şişe, yeşil kapaklı (küçük)
SB7b	HRP-Green Solution B	15 ml	4 ml	Damlalıklı şişe, yeşil kapaklı
CS2	Nuclear Blue Solution	20 ml	4 ml	Vidalı kapaklı şişe, siyah
MT4	Mounting Solution (alcoholic)	4 ml	1 ml	Cam şişe, kahverengi
	AP-Red reaksiyon kabı	2	1	Dereceli kap, kırmızı kapaklı
	HRP-Green reaksiyon kabı	2	1	Dereceli kap, yeşil kapaklı
	Kullanma kılavuzu	1	1	

C-3044-10 (10 test): ES1, AB14, AB13, SB6a-b, SB7a-b, CS2 ve MT4 bileşenleri 10 reaksiyon için yeterlidir. PT2 bileşeni her biri 70 ml olan 2 boyama kabı için yeterlidir. WB1 bileşeni her biri 70 ml olan 3 boyama kabı için yeterlidir. WB5 bileşeni her biri 70 ml olan 14 boyama kabı için yeterlidir.

C-3044-40 (40 test): ES1, AB14, AB13, SB6a-b, SB7a-b, CS2 ve MT4 bileşenleri 40 reaksiyon için yeterlidir. PT2 bileşeni her biri 70 ml olan 7 boyama kabı için yeterlidir. WB1 bileşeni her biri 70 ml olan 8 boyama kabı için yeterlidir. WB5 bileşeni her biri 70 ml olan 28 boyama kabı için yeterlidir.

4. Gerekli ancak sağlanmayan malzemeler

- ZytoDot 2C CISH probu
- Pozitif ve negatif kontrol numuneleri
- Mikroskop lamaları, pozitif yükü
- Su banyosu (80 °C, 98 °C)
- Hibridizatör veya sıcak plaka
- Hibridizasyon fırınında hibridizatör veya nem odası
- Ayarlanabilir pipetler (10 µl, 1000 µl)
- Boyama kavanozları veya banyoları
- Zamanlayıcı
- Kalibre edilmiş termometre
- Etanol veya reaktif alkol
- Ksilen
- Metanol %100
- Hidrojen peroksit (H₂O₂) %30
- Deiyonize veya damıtılmış su
- Kapaklı Klipsler (22 mm x 22 mm, 24 mm x 32 mm)
- Kauçuk çimento, örneğin Fixoquum Rubber Cement (Ürün No. E-4005-50/-125) veya benzeri
- Yeterince bakımı yapılmış ışık mikroskobu (400-630x)

5. Depolama ve taşıma

2-8 °C'de dik konumda saklayın. Kullanımdan hemen sonra saklama koşullarına geri döndürün. Etiket üzerinde belirtilen son kullanma tarihinden sonra reaktifleri kullanmayın. Ürün, uygun şekilde kullanıldığında etikette belirtilen son kullanma tarihine kadar stabildir.

6. Uyarılar ve önlemler

- Kullanmadan önce kullanım talimatlarını okuyun!
- Reaktifleri son kullanma tarihi geçtikten sonra kullanmayın!
- Bu ürün sağlığa zararlı maddeler (düşük konsantrasyonlarda ve hacimlerde) içerir. Reaktiflerle doğrudan temastan kaçının. Uygun koruyucu önlemleri alın (tek kullanımlık eldivenler, koruyucu gözlükler ve laboratuvar giysileri kullanın)!
- Ürünle ilgili olarak meydana gelen her türlü ciddi olayı yerel yetkililere uygun olarak üreticiye ve yetkili makama bildirin!
- Reaktifler ciltle temas ederse, cildi derhal bol miktarda suyla yıkayın!
- Profesyonel kullanıcılar için talep üzerine bir malzeme güvenlik bilgi formu temin edilebilir.
- Yeniden kullanıma açıkça izin verilmediği sürece reaktifleri yeniden kullanmayın!
- Hatalı sonuçlara yol açabileceğinden numunelerin çapraz kontaminasyonundan kaçının.
- Hibridizasyon ve yıkama adımları sırasında numunelerin kurumasına izin verilmemelidir.

AB13, AB14, PT2, SB7b, WB1, ve WB5 için zararlılık ve önlem ifadeleri:

Zararlılık belirleyici bileşen 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 247-500-7] ve 2-methyl-2H-isothiazol-3-one [EC no. 220-239-6] (3:1) maddelerinin karışımıdır.



Uyarı

H317	Alerjik cilt reaksiyonlarına yol açar.
P261	Tozunu/dumanını/gazını/sisini/buharını/spreyini solumaktan kaçının.
P272	Kirlenmiş kıyafetleri işyeri dışına çıkarmayın.
P280	Koruyucu eldiven/koruyucu kıyafet/göz koruyucu/yüz koruyucu kullanın.
P302+P352	DERİ İLE TEMAS HALİNDE İSE: Bol sabun ve su ile yıkayın.
P333+P313	Ciltte tahriş veya kaşıntı söz konusu ise: Tıbbi yardım/müdahale alın.
P362+P364	Kirlenmiş giysilerinizi çıkarın ve yeniden kullanmadan önce yıkayın.

SB7a için zararlılık ve önlem ifadeleri:

Zararlılık belirleyici bileşenler metanol ve %30 hidrojen peroksit çözeltisidir.



Tehlike

H225	Kolay alevlenir sıvı ve buhar
H301+H311	Yutulduğunda, ciltle temas ettiğinde veya solunduğunda toksiktir.
H370	Organlarda hasara yol açar
P210	Isıdan/kıvılcımdan/alevden/sıcak yüzeylerden uzak tutun. – Sigara içilmez.
P233	Şiddetli tepkime ve alevlenme olasılığından dolayı, su ile herhangi olası temasından kaçının.
P260	Tozunu/dumanını/gazını/sisini/buharını/spreyini solumayın.
P280	Koruyucu eldiven/koruyucu kıyafet/göz koruyucu/yüz koruyucu kullanın.
P308+P311	Maruz kalınma halinde: ULUSAL ZEHİR DANIŞMA MERKEZİNİN 114 NOLU TELEFONUNU veya doktoru/hekimi arayın
P403+P235	İyi havalandırılmış bir alanda depolayan. Soğuk tutun.

CS2 için zararlılık ve önlem ifadeleri:

Zararlılık belirleyici bileşenler ethandiol ve ethylene glycol'dür.



Uyarı

H373	Uzun süreli veya tekrarlı maruz kalma sonucu organlarda hasara yol açabilir.
P260	Tozunu/dumanını/gazını/sisini/buharını/spreyini solumayın.
P314	Kendinizi iyi hissetmezseniz, tıbbi tavsiye/müdahale alınız.

MT4 için zararlılık ve önlem ifadeleri:

Zararlılık belirleyici bileşen Ksilendir.



Uyarı

H226	Alevlenir sıvı ve buhar.
H312+H332	Ciltle temas ettiğinde veya solunduğunda zararlıdır.
H315	Cilt tahrişine yol açar.
H319	Ciddi göz tahrişine yol açar.
H335	Solumun yolu tahrişine yol açabilir.
H373	Uzun süreli veya tekrarlı maruz kalma sonucu organlarda hasara yol açabilir.
P210	Isıdan/kıvılcımdan/alevden/sıcak yüzeylerden uzak tutun. – Sigara içilmez.
P260	Tozunu/dumanını/gazını/sisini/buharını/spreyini solumayın.
P280	Koruyucu eldiven/koruyucu kıyafet/göz koruyucu/yüz koruyucu kullanın.
P305+P351+P338	GÖZ İLE TEMASI HALİNDE: Su ile birkaç dakika dikkatlice durulayın. Takılı ve yapması kolaysa, kontak lensleri çıkartın. Durulamaya devam edin.
P337+P313	Göz tahrişi kalıcı ise: Tıbbi yardım/bakım alın.
P403+P235	İyi havalandırılmış bir alanda depolayan. Soğuk tutun.
EUH208	methyl 2-methylprop-2-enoate; methyl 2-methylpropenoate; methyl methacrylate içerir. Alerjik reaksiyona yol açabilir.

SB6a için zararlılık ve önlem ifadeleri:

H412	Sucul ortamda uzun süre kalıcı, zararlı etki.
P273	Çevreye verilmesinden kaçının.

ES1 için özel etiket ifadeleri:

EUH208	Pepsin A içerir. Alerjik reaksiyona yol açabilir.
EUH210	Talep halinde güvenlik bilgi formu sağlanabilir.

7. Sınırlamalar

- In vitro* diagnostik kullanım için.
- Sadece profesyonel kullanım içindir.
- Yalnızca otomatik olmayan kullanım içindir.
- Herhangi bir pozitif boyamanın klinik yorumu veya yokluğu, klinik öykü, morfoloji, diğer histopatolojik kriterler ve diğer tanı testleri bağlamında yapılmalıdır. ISH problemleri, reaktifleri, tanı panelleri ve boyalı preparatı üretmek için kullanılan yöntemler hakkında bilgi sahibi olmak kalifiye bir patolog/insan genetikçisinin sorumluluğundadır. Boyama, boyanmış slaytları gözden geçirmekten ve pozitif ve negatif kontrollerin yeterliliğini sağlamaktan sorumlu olan bir patolog/insan genetikçisinin gözetimi altında sertifikalı, lisanslı bir laboratuvarda yapılmalıdır.
- Numune boyaması, özellikle sinyal yoğunluğu ve arka plan boyaması, boyamadan önce numunenin kullanımına ve işlenmesine bağlıdır. Uygun olmayan fiksasyon, dondurma, çözündürme, yıkama, kurutma, ısıtma, kesit alma veya diğer numuneler veya sıvılarla kontaminasyon artefaktlara veya yanlış sonuçlara neden olabilir.

Tutarsız sonuçlar, fiksasyon ve gömme yöntemlerindeki farklılıkların yanı sıra numune içindeki doğal düzensizliklerden de kaynaklanabilir.

- Performans, ilgili ZytoVision probu ve uygulama kitinin kullanım talimatlarında açıklanan prosedürler kullanılarak doğrulanmıştır. Bu prosedürlerde yapılacak değişiklikler performansı değiştirebilir ve kullanıcı tarafından doğrulanmalıdır. Bu IVD, yalnızca bu talimatta açıklandığı şekilde amaçlanan kullanım kapsamında kullanıldığında CE sertifikasına sahiptir.

8. Müdahale eden maddeler

Aşağıdaki fiksatifler ISH ile uyumlu değildir:

- Bouin's fiksatifi
- B5 fiksatifi
- Asidik fiksatifler (örn., pikrik asit)
- Zenker's fiksatifi
- Alkoller (tek başına kullanıldığında)
- Civa klorür
- Formaldehit/çinko fiksatifi
- Hollande's fiksatifi
- Tamponsuz formalin

9. Numunelerin hazırlanması

Öneriler:

- Herhangi bir hazırlık adımında örnekler arasında çapraz kontaminasyon olmasından sakının çünkü bu durum hatalı sonuçlara yol açabilir.
- Oda sıcaklığında (18-25°C) 24 saat %10 nötral tamponlu formalin ile fiksasyon.
- Örnek büyüklüğü $\leq 0.5 \text{ cm}^3$.
- En üst kalitede parafin kullanın.
- Gömme işlemi 65°C'den daha düşük sıcaklıklarda yapılmalıdır.
- Mikrotom ile 3-5 μm kalınlığında kesitler alın.
- Pozitif yüklü mikroskop lamaları kullanın.
- 50-60°C'de 2-16 saat fikse edin.

10. Cihazın hazırlık işlemi

20x Wash Buffer TBS (WB5) 11. "Tahlil prosedürü" bölümündeki talimatlara göre hazırlanmalıdır. Kitin tüm diğer bileşenleri kullanıma hazırdır. Yeniden sulandırmaya, karıştırmaya veya dilüsyon yapmaya gerek yoktur. Probu oda sıcaklığına (RT) getirin ve kullanmadan önce kısaca karıştırın.

11. Tahlil prosedürü

11.1 Birinci Gün

Hazırlık adımları

- Bir etanol serisi hazırlayın (%70, %90 ve %100 etanol solüsyonları): %100 etanolü deiyonize veya distile su ile seyreltin. Bu solüsyonlar uygun kaplarda saklanabilir ve yeniden kullanılabilir.
- Heat Pretreatment Solution EDTA (PT2): Üstü kapalı bir boyama kabında 98°C'ye ısıtın.
- 3% H₂O₂ hazırlanması: 1 birim %30 H₂O₂'i 9 birim %100 metanol ile karıştırın.
- ZytoDot 2 CCISH Prob: Kullanmadan önce oda sıcaklığına ulaştırın.

Ön işlemler (parafin giderme/roteoliz)

- Lamları 70°C'de (örn: bir sıcak levha üzerinde) 10 dakika inkübe edin.
- Lamları ksilen içinde 2x 5 dakika inkübe edin.
- Lamları %100 etanol içinde 3x 3 dakika inkübe edin.
- Lamları 3% H₂O₂ içinde 5 dakika inkübe edin.
- Lamları oda sıcaklığında deiyonize veya distile su ile 2x 1 dakika yıkayın.
- Önceden 98°C'ye ısıtılmış Heat Pretreatment Solution EDTA (PT2) içinde 15 dakika inkübe edin.

Bir boyama kabında 8 lam kullanın (gerekirse boş lam ekleyin).

- Lamları hemen deiyonize veya distile su içine aktarın ve 2x 2 dakika yıkayın.
- Örneğin üzerinde Pepsin Solution'ı (ES1) damlatarak uygulayın ve bir nemli kutu içinde 37°C'de 5-15 dakika inkübe edin.

ES1, kaliteyi etkilemeyen çöktirler oluşturabilir.

Genel kural olarak proteoliz için en uygun süreyi denemeler yaparak belirlemenizi öneriyoruz.

- Lamları deiyonize veya distile su içine yerleştirin.
- Dehidrasyon yapın: %70, %90 ve %100 etanol ile her birinde 1 dakika.
- Kesitleri havada kurutun.

Not: Prob uygulamasından önce lamları tamamen kuruttuğunuzdan emin olun.

Denatürasyon ve hibridizasyon

- Ön işlemde geçirilmiş her numuneye 10 μl prob pipetleyin.
- Örnekleri 22 mm x 22 mm lamel ile kaplayın (sıkışmışı kabarcıklardan kaçının) ve lameli kapatın.

Sızdırmazlık için kauçuk çimento (örn. Fixogum) kullanmanızı öneririz.

- Lamları sıcak bir plakaya veya hibridizatöre yerleştirin ve örnekleri 79 °C'de 5 dakika boyunca denatüre edin.
- Lamları bir nem odasına aktarın ve gece boyunca 37 °C'de hibridize edin (örn. bir hibridizasyon fırınında).

Hibridizasyon adımı sırasında numunelerin kurumaması çok önemlidir.

11.2 İkinci Gün

Hazırlık adımları

- Wash Buffer SSC (WB1): Güçlü yıkama işlemi için üstü kapalı bir boyama kabında 80°C'ye ısıtın. WB1 2-8°C'de kaliteyi etkilemeyen ve ısıtıldığında çözünmesi gereken çöktirler oluşturabilir.
- 1x Wash Buffer TBS hazırlanması: 1 birim 20x Wash Buffer TBS'i (WB5) 19 birim deiyonize veya distile su ile seyreltin.

Seyreltilmiş 1x Wash Buffer TBS 2-8°C'de saklandığında bir hafta boyunca stabildir.

- 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): Kullanmadan önce oda sıcaklığına ulaştırın.

SB7a ve SB7B bileşenleri, boyama kalitesini etkilemeyen çöktirler oluşturabilir.

Hibridizasyon sonrası ve tespit

- Lastik solüsyonunu veya yapıştırıcıyı dikkatlice sökün.
- Lamları oda sıcaklığındaki Wash Buffer SSC (WB1) içinde 5 dakika tutup lameli çıkarın.

WB1 bir kez daha kullanılabilir. 2-8°C'de en fazla bir hafta muhafaza edin.

- Lamları 80°C'deki Wash Buffer SSC (WB1) içinde 5 dakika yıkayın.

Bir boyama kabında sekiz lam kullanın (gerekirse boş lam ekleyin).

- Lamları deiyonize veya distile su içinde 2x 1 dakika yıkayın.
- Lamları 1x Wash Buffer TBS içine yerleştirin.
- Anti-DIG/DNP-Mix (AB14) (lam başına 1-2 damla) lamlara uygulayın ve nem odasında 37°C'de 15 dakika inkübe edin.
- Lamları 1x Wash Buffer TBS içinde 3x 1 dakika yıkayın.
- HRP/AP-Polymer-Mix (AB13) (lam başına 1-2 damla) lamlara uygulayın ve nem odasında 37°C'de 15 dakika inkübe edin.
- Lamları 1x Wash Buffer TBS içinde 3x 1 dakika yıkayın.
- AP-Red Solution (çalışma solüsyonu) hazırlayın: Ölçekli bir tüpe 1 ml AP-Red Solution B (SB6b) koyun ve bir damla (30 μl) AP-Red Solution A (SB6a) ekleyin. İyice karıştırın.
- Lamlara damlatarak AP-Red Solution uygulayın (her lama 1-2 damla) ve oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edin.
- Inkübasyon sırasında HRP-Green Solution (çalışma çözeltisi) hazırlayın: 1 ml HRP-Green Solution B'yi (SB7b) dereceli bir kaba doldurun ve iki damla (2x 20 μl) HRP-Green Solution A (SB7a) ekleyin. İyice karıştırın.
- Lamları oda sıcaklığında deiyonize veya distile su ile 2 dakika yıkayın.
- HRP-Green Solution slaytlara damla damla (slayt başına 1-2 damla) uygulayın ve oda sıcaklığında 10 dakika karanlıkta inkübe edin.
- Lamları oda sıcaklığında deiyonize veya distile su ile 2 dakika yıkayın.
- Örnekleri 2 dakika boyunca Nuclear Blue Solution (CS2) ile karşıt boyayın.
- Lamları bir boyama kavanozuna aktarın ve akan soğuk musluk suyu altında 2 dakika yıkayın.
- 100 etanol içinde 3x 30 sn kurutun (çok saf etanol kullanın).
- Lamları ksilen içinde 2x 30 sn inkübe edin (çok saf ksilen kullanın).

Sinyal kaybına neden olabileceğinden inkübasyon süresini uzatmayın veya kısaltmayın!

20. Mounting Solution (alcoholic) (MT4) kullanarak hava kabarcığı bırakmadan örnekleri bir lamel (22 mm x 22 mm; 24 mm x 32 mm) ile kapatın. Lamelin tamamen sabitlenmesi için 20-30 dakika bekleyin

Açıklığın boyutunu artırmak için kesilmiş bir pipet ucu kullanmak pipetleme işlemini kolaylaştırabilir.

21. Boyanan örnekleri ışık mikroskobunda değerlendirin.

12. Sonuçların yorumlanması

ZytoDot 2C CISH Implementation Kit kullanıldığında, Digoxigenin etiketli polinükleotidlerin hibridizasyon sinyalleri koyu yeşil renkli farklı noktalar olarak görünür ve Dinitrophenyl etiketli polinükleotidler parlak kırmızı renkli farklı noktalar olarak görünür. Normal hücrelerin veya incelenen kromozomlarda sapma olmayan hücrelerin interfazlarında veya metafazlarında, X ve/veya Y kromozomlarını hedefleyen prob lar hariç, prob/hapten-etiket başına iki sinyal görünecektir, bu da cinsiyete bağlı olarak prob/hapten-etiket başına hiçbir ila iki sinyal ile sonuçlanacaktır. Kromozomal aberasyonları olan hücrelerde, interfazlarda veya metafazlarda farklı bir sinyal modeli görülebilir. Sonuçların yorumlanmasıyla ilgili daha fazla ayrıntı için lütfen ilgili **ZytoDot 2C CISH** Probenun kullanım talimatlarına bakın.

13. Önerilen kalite kontrol prosedürleri

İlgili ZytoVision probunun kullanım talimatlarına bakın.

14. Performans özellikleri

İlgili ZytoVision probunun kullanım talimatlarına bakın.

15. Bertaraf

Reaktiflerin imhası yerel yönetmeliklere uygun olarak gerçekleştirilmelidir.

16. Sorun Giderme

Kullanım talimatlarından herhangi bir sapma, düşük boyama sonuçlarına veya hiç boyama olmamasına neden olabilir. Daha fazla bilgi için lütfen www.zytovision.com adresine bakın.

Zayıf sinyaller veya hiç sinyal yok

Olası neden	Eylem
Proteolitik ön işlem düzgün yapılmamış	Pepsin inkübasyon süresini optimize edin, gerekirse artırın veya azaltın
Buharlaştırma probu	Bir hibridizatör kullanırken, ıslak şeritlerin/su dolu tankların kullanılması zorunludur. Bir hibridizasyon fırını kullanıldığında, bir nem odasının kullanılması gereklidir. Ayrıca, hibridizasyon sırasında numunenin kurumasını önlemek için lamel, örneğin Fixogum ile tamamen kapatılmalıdır
Karşı boyama süresi çok uzun	Koyu karşı boyamadan kaçının, çünkü pozitif boyama sinyallerini gizleyebilir
Karşı lekenin mavileştirilmesi düzgün yapılmamış	Mavileştirme için soğuk akan musluk suyu kullanın; ılık veya sıcak su veya mavileştirme reaktifleri kullanmayın

Sinyaller çok güçlü

Olası neden	Eylem
Proteolitik ön işlemin çok uzun sürmesi	Pepsin inkübasyon süresini optimize edin, gerekirse artırın veya azaltın
AP-Kırmızı Çözelti inkübasyon süresi doğru değil	Gerekirse inkübasyon süresi 5 dakikaya kadar kısaltılabilir. Substrat çözeltisini 25 °C'nin üzerinde ısıtmayın; sadece oda sıcaklığında inkübe edin

HRP-Green çözeltisi inkübasyon süresi doğru değil	Gerekirse inkübasyon süresi 7 dakikaya kadar kısaltılabilir. Substrat çözeltisini 25 °C'nin üzerinde ısıtmayın; sadece oda sıcaklığında inkübe edin
---	---

Kırmızı sinyaller çok zayıf

Olası neden	Eylem
AP-Kırmızı Çözelti güçlü ışığa maruz bırakıldı	AP-Red Solüsyonunu güçlü doğrudan ışıktan koruyarak hazırlayın ve kullanın
AP-Kırmızı Çözelti çok erken hazırlandı	Hemen kullanmadan önce hazırlayın
AP-Kırmızı Çözelti inkübasyon süresi doğru değil	Gerekirse, inkübasyon süresi 15 dakikaya kadar uzatılabilir
Kromojenik substratın yetersiz hazırlanması	Çözelti A'nın hacmini artırmayın

Yeşil sinyaller çok zayıf

Olası neden	Eylem
HRP-Green ile boyamadan sonra herhangi bir yıkama adımının inkübasyon süresi çok uzun	Verilen inkübasyon sürelerini aşmayın
HRP-Green çözeltisi inkübasyon süresi doğru değil	Gerekirse, inkübasyon süresi 15 dakikaya kadar uzatılabilir
Kromojenik substratın yetersiz hazırlanması	Çözelti A'nın hacmini artırmayın

Sinyaller kaybolur veya birleşir

Olası neden	Eylem
Uygun olmayan bir montaj çözümü kullanılmıştır	Yalnızca kitle birlikte verilen montaj solüsyonunu veya herhangi bir yabancı madde içermeyen ksilen bazlı montaj solüsyonlarını kullanın; lamel bandı kullanmayın
Kesitler uygun şekilde dehidrate edilmemiş	Taze etanol ve ksilen çözeltileri kullanın; yalnızca "saf" kalitede ksilen kullanın

Düzensiz veya bazı kısımlarda sadece çok hafif lekelenme

Olası neden	Eylem
Eksik mum alma	Taze solüsyonlar kullanın; mum alma sürelerini kontrol edin
Reaktif hacmi çok küçük	Reaktif hacminin doku alanını kaplayacak kadar büyük olduğundan emin olun

Tutarsız sonuçlar

Olası neden	Eylem
Prob uygulamasından önce yetersiz kurutma	Hava ile kurutmayı uzatın
Pepsin, antikorlar ve/veya substratlarının uygulanmasından önce doku üzerinde çok fazla su/yıkama tamponu	Fazla sıvının doku kesitinden lekeleyerek veya lamdan sallayarak uzaklaştırıldığından emin olun. Az miktarda kalan su/yıkama tamponu testi etkilemez

Doku fiksasyonu ve gömme yöntemlerindeki varyasyonlar	Sabitlenme ve gömme yöntemlerini optimize edin
Doku kesit kalınlığındaki değişimler	Kesit almayı optimize edin

Morfoloji bozulmuş

Olası neden	Eylem
Hücre veya doku örneği uygun şekilde sabitlenmemiş	Sabitlenme süresini ve fiksatif optimize edin
Proteolitik ön işlemin çok uzun süre yapılmaması	Pepsin inkübasyon süresini azaltın

Çapraz hibridizasyon sinyalleri; gürültülü arka plan

Olası neden	Eylem
Hibridizasyon sırasında veya sonrasında herhangi bir zamanda kurumuş kesitler	Kesitlerin kurumasını önleyin; nem odası kullanın; lamelleri uygun şekilde kapatın
Uzatılmış substrat inkübasyon süresi	Substrat inkübasyon süresini kısaltın
Eksik mum alma	Taze solüsyonlar kullanın; mum alma süresini kontrol edin
Proteolitik ön işlem çok güçlü	Pepsin inkübasyon süresini optimize edin
Hibridizasyondan önce oda sıcaklığına soğutulmuş slaytlar	Lamları hızlı bir şekilde hibridizasyon sıcaklığına aktarın

Çakışan sinyaller

Olası neden	Eylem
Doku kesitlerinin uygun olmayan kalınlığı	3-5 µm mikrotom kesitleri hazırlayın

Numune lam üzerinde yüzer

Olası neden	Eylem
Proteolitik ön işlem çok güçlü	Pepsin inkübasyon süresini kısaltın

17. Edebiyat

- 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. Revizyon

www.zytovision.com

En güncel kullanım talimatları ve farklı dillerdeki kullanım talimatları için lütfen www.zytovision.com adresine bakın.

Uzmanlarımız sorularınızı yanıtlamak için hazırdır. Lütfen helptech@zytovision.com ile iletişime geçin



ZytoVision GmbH
Fischkai 1
27572 Bremerhaven/ Almanya
Telefon numarası: +49 471 4832-300
Faks: +49 471 4832-509
www.zytovision.com
E-posta: info@zytovision.com

Ticari markalar:

ZytoVision® ve ZytoDot® ZytoVision GmbH'nin ticari markalarıdır.