



## ZytoDot Pretreatment Kit

REF C-3004-40

40

Für die Vorbehandlung vor der chromogenen *in-situ*-Hybridisierung (CISH)



IVD

In-vitro-Diagnostikum  
gemäß EU Richtlinie 98/79/EC

### 1. Verwendungszweck

Das ZytoDot Pretreatment Kit ist für die Hitze-Vorbehandlung und den Enzymverdau von Formalin-fixierten, Paraffin-eingebetteten Geweben vor der chromogenen *in-situ*-Hybridisierung (CISH) bestimmt. Das Kit ist für die Verwendung in Kombination mit einem ZytoDot Implementation Kit (Prod. Nr. C-3044-40 oder Prod. Nr. C-3018-40) sowie einer entsprechenden ZytoDot CISH Sonde vorgesehen.

Die Interpretation der Ergebnisse muss im Kontext mit der klinischen Anamnese unter Berücksichtigung weiterer klinischer und pathologischer Daten des Patienten durch einen qualifizierten Pathologen erfolgen.

### 2. Klinische Relevanz

Genetische Aberrationen wie z.B. Deletionen und/oder Amplifikationen werden mit verschiedenen humanen Neoplasmen in Verbindung gebracht. Chromosomale Aneuploidien sind in vielen kongenitalen Erkrankungen zu beobachten.

### 3. Prinzip der Methode

Die chromogene *in-situ*-Hybridisierung (CISH) erlaubt den Nachweis und die Visualisierung von spezifischen Nukleinsäuresequenzen in Zellpräparationen. Haptenmarkierte Nukleotid-Fragmente, sogenannte CISH-Sonden, und deren komplementäre Zielsequenzen in den Präparationen werden co-denaturiert und können anschließend während der Hybridisierung binden. Danach werden unspezifische und ungebundene Sondenfragmente durch Stringenzwaschschritte entfernt. Die Duplex-Bildung der markierten Sonde wird mittels primärer (nicht markierter) Antikörper sichtbar gemacht, welche von sekundären polymerisierten Enzym-konjugierten Antikörpern detektiert werden. Die enzymatische Reaktion mit den chromogenen Substraten führt zur Bildung von Farbpräzipitaten. Nach der Gegenfärbung des Zellkerns mit einer Zellkern-Färbung können die hybridisierten Sondenfragmente mit einem Lichtmikroskop visualisiert werden.

### 4. Enthaltene Komponenten

Das ZytoDot Pretreatment Kit ist verfügbar in einer Größe und besteht aus:

Code	Komponente	Menge	Gefäß
		40	
PT2	<u>Heat Pretreatment Solution</u> <u>EDTA</u>	500 ml	Schraubverschlussflasche (groß)
ES1	<u>Pepsin Solution</u>	4 ml	Tropfflasche, weißer Deckel
	Gebrauchsanweisung	1	

**C-3004-40 (40 Reaktionen):** Komponente **ES1** ist ausreichend für 40 Reaktionen. Komponente **PT2** ist ausreichend für 7 Küvetten à 70 ml.

### 5. Benötigte, aber nicht bereitgestellte Materialien

- ZytoDot CISH Probe
- ZytoDot CISH Implementation Kit (Prod. Nr.-C-3018-40) oder ZytoDot 2C CISH Implementation Kit (Prod. Nr. C-3044-10/-40)
- Positive und negative Kontrollproben
- Objektträger, positiv geladen
- Wasserbad (80°C, 98°C)
- Hybridizer oder Wärmeplatte
- Hybridizer oder Feuchtekkammer im Hybridisierungssofen
- Verstellbare Pipetten (10 µl, 1000 µl)
- Küvetten oder Färbetröge
- Stoppuhr
- Kalibriertes Thermometer
- Ethanol oder denaturierter Alkohol
- Xylol
- Methanol 100%
- Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 30%
- Deionisiertes oder destilliertes Wasser
- Deckgläser (22 mm x 22 mm, 24 mm x 32 mm)
- Naturkautschuk-Klebstoff, z.B. Fixogum Rubber Cement (Prod. Nr. E-4005-50/-125) oder Ähnliches
- Regelmäßig gewartetes Lichtmikroskop (400-630x)

ZytoDot Pretreatment Kit ist für die Verwendung bei CISH-Protokollen mit ZytoVision Sonden und -Kits bestimmt. Für Informationen zu den für die CISH-Anwendungen benötigten Materialien bitte die Gebrauchsanweisungen der jeweiligen ZytoVision Sonde und des Implementation Kits beachten.

### 6. Lagerung und Handhabung

Bei 2-8°C in aufrechter Position lagern. Unmittelbar nach Gebrauch wieder unter Lagerbedingungen aufbewahren. Keine Reagenzien nach Ablauf des auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatums verwenden. Das Produkt ist bei sachgemäßer Handhabung bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum stabil.

### 7. Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

- Gebrauchsanweisung vor der Verwendung lesen!
- Reagenzien nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwenden!
- Dieses Produkt enthält Substanzen (in geringen Konzentrationen und Volumina), welche gesundheitsschädlich und potentiell infektiös sind. Jeder direkte Kontakt mit den Reagenzien muss vermieden werden. Entsprechende Schutzmaßnahmen (Verwendung von Einmalhandschuhen, Schutzbrille und Laborbekleidung) sind zu ergreifen!
- Sollten Reagenzien mit der Haut in Kontakt kommen, die betroffenen Stellen sofort mit viel Wasser abspülen!
- Ein Sicherheitsdatenblatt ist auf der Website verfügbar ([www.zytovision.com](http://www.zytovision.com)).
- Die Reagenzien nicht wiederverwenden, außer die Wiederverwendung ist explizit erlaubt!
- Kreuzkontaminationen und mikrobielle Kontamination der Reagenzien vermeiden!
- Die Präparate dürfen während der Hybridisierungs- und Waschschritte nicht austrocknen!

**Besondere Kennzeichnung von ES1**

EUH208	Enthält Pepsin A. Kann allergische Reaktionen hervorrufen.
EUH210	Sicherheitsdatenblatt auf Anfrage erhältlich. < 20 Prozent des Gemisches bestehen aus einem oder mehreren Bestandteilen unbekannter akuter Toxizität (inhalativ).

**Gefahren- und Sicherheitshinweise für PT2**

Die gefahrbestimmende Komponente ist ein Gemisch aus: 5-Chlor-2-methyl-2H-isothiazol-3-on [EG-Nr. 247-500-7] und 2-Methyl-2H-isothiazol-3-on [EG-Nr. 220-239-6] (3:1).

**Achtung**

H317	Kann allergische Hautreaktionen verursachen.
P261	Einatmen von Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol vermeiden.
P272	Kontaminierte Arbeitskleidung nicht außerhalb des Arbeitsplatzes tragen.
P280	Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen.
P302+P352	BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT: Mit viel Wasser waschen.
P333+P313	Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P362+P364	Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen.

Für weitere Informationen die Gebrauchsanweisungen der jeweiligen ZytoVision Sonde und Implementation Kits beachten.

**8. Einschränkungen**

- Für die Verwendung als In-vitro-Diagnostikum.
- Nur für die professionelle Anwendung.
- Die klinische Interpretation jeglicher positiven Färbung bzw. deren Abwesenheit muss im Kontext mit der klinischen Anamnese, Morphologie, anderer histopathologischer Kriterien sowie weiterer diagnostischer Tests erfolgen. Es obliegt der Verantwortung eines qualifizierten Pathologen, mit CISH Sonden, Reagenzien, Diagnose-Panels und den zur Erstellung von gefärbten Präparaten verwendeten Methoden vertraut zu sein. Die Färbung ist in einem zertifizierten, lizenzierten Labor unter Aufsicht eines Pathologen durchzuführen, der für die Auswertung der Färbepreparate und für die Sicherstellung der Eignung von positiven und negativen Kontrollen verantwortlich ist.
- Die Färbung der Präparate, insbesondere die Signalintensität und die Hintergrundfärbung, ist abhängig von der Behandlung und Prozessierung der Präparate vor der Färbung. Unsachgemäßes Fixieren, Einfrieren, Auftauen, Waschen, Trocknen, Erhitzen, Schneiden oder Kontamination mit anderen Präparaten oder Flüssigkeiten können Artefakte oder falsche Ergebnisse verursachen. Inkonsistente Ergebnisse können von Variationen bei Fixierungs- und Einbettungsverfahren sowie von inhärenten Unregelmäßigkeiten innerhalb des Präparates resultieren.
- Die Leistung wurde unter Verwendung der in dieser Gebrauchsanweisung beschriebenen Verfahren validiert. Abweichungen von diesen Verfahren können die Leistung beeinflussen und müssen vom Anwender validiert werden.

**9. Störsubstanzen**

Die Gebrauchsanweisungen des jeweiligen Implementation Kits beachten.

**10. Vorbereitung der Präparate**

Die Gebrauchsanweisungen des jeweiligen Implementation Kits beachten.

**11. Vorbereitung der Reagenzien**

Das Produkt ist gebrauchsfertig. Kein Rekonstituieren, Mischen oder Verdünnen ist notwendig.

**12. Durchführung**

Für detaillierte Informationen zur Durchführung einer CISH mit den ZytoDot-Produkten, einschließlich der Hitze-Vorbehandlung und Proteolyse mit dem ZytoDot Pretreatment Kit, bitte die Gebrauchsanweisung des jeweiligen Implementation Kits beachten.

**Vorbereitende Schritte**

- (1) Heat Pretreatment Solution EDTA (PT2): In einer abgedeckten Küvette auf 98°C erwärmen.
- (2) Vorbereitung von 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 1 Teil 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mit 9 Teilen 100% Methanol verdünnen.

**Vorbehandlung (Entparaffinierung/Proteolyse)**

- (1) Die Objektträger für 10 min bei 70°C inkubieren (z.B., auf einer Wärmeplatte).
- (2) Die Objektträger für 2x 5 min in Xylol inkubieren.
- (3) Die Objektträger für 3x 3 min in 100% Ethanol inkubieren.
- (4) Die Objektträger für 5 min in 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inkubieren.
- (5) 2x 1 min in deionisiertem oder destilliertem Wasser waschen.
- (6) Für 15 min in vorgewärmter Heat Pretreatment Solution EDTA (PT2) bei 98°C inkubieren.

*Wir empfehlen, acht Objektträger pro Färbetrog zu verwenden (falls notwendig, Dummy-Objektträger hinzufügen).*

- (7) Die Objektträger sofort in destilliertes oder deionisiertes Wasser überführen und für 2x 1 min waschen.
- (8) Pepsin Solution (ES1) (tropfenweise) auf die Präparate auftragen und für 5-15 min bei 37°C in einer Feuchtekammer inkubieren.

*Generell wird eine Bestimmung der optimalen Dauer der Proteolyse in Vortests empfohlen.*

- (9) Die Objektträger in deionisiertes oder destilliertes Wasser eintauchen.
- (10) Dehydrierung für jeweils 1 min in 70%, 90% und 100% Ethanol.
- (11) Schnitte an der Luft trocknen.

Die Applikation der ZytoDot CISH Sonde und die Post-Hybridisierung (Waschen, Detektion, Gegenfärbung, Eindecken, Mikroskopie) gemäß der Gebrauchsanweisung des jeweiligen Implementation Kits durchführen.

**13. Interpretation der Ergebnisse**

Die Gebrauchsanweisung der jeweiligen ZytoDot CISH Sonde beachten.

**14. Empfohlene Qualitätskontrollverfahren**

Die Gebrauchsanweisung der jeweiligen ZytoDot CISH Sonde beachten.

**15. Leistungsmerkmale**

Die Gebrauchsanweisung der jeweiligen ZytoDot CISH Sonde beachten.

**16. Entsorgung**

Die Entsorgung der Reagenzien muss in Übereinstimmung mit den örtlichen Vorschriften erfolgen.

**17. Fehlerbehebung**

Jede Abweichung von der Gebrauchsanweisung kann zu schwachen bis gar keinen Färbungen führen. Die Gebrauchsanweisung der jeweiligen ZytoDot CISH Sonde und des Implementation Kits beachten.

## 18. Literatur

- 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.

Unsere Experten stehen Ihnen für Ihre Fragen zur Verfügung.  
Bitte kontaktieren Sie [helptech@zytovision.com](mailto:helptech@zytovision.com)



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

### Warenzeichen:

ZytoVision® und ZytoDot® sind Warenzeichen der ZytoVision GmbH.