



## ZytoDot 2C

### SPEC NTRK1 Break Apart Probe

REF C-3078-100

Σ 10 (0.1 ml)

Kromojenik *in situ* hibridizasyon (CISH) ile 1q23.1'deki insan NTRK1 genini içeren translokasyonların kalitatif tespiti için



Vücut dışında kullanılan (*in vitro*) tıbbi tanı cihazı  
98/79/EC AB Yönetmeliğine göre

#### 1. Kullanım amacı

ZytoDot 2C SPEC NTRK1 Break Apart Probe (PD57) formalin-fikse, parafine gömülü örneklerde 1q23.1'deki insan NTRK1 genini içeren translokasyonların kromojenik *in situ* hibridizasyon (CISH) ile kalitatif tespitinde kullanılmak içindir. Bu prob ZytoDot 2C CISH Implementation Kit (Ürün No. C-3044-10/-40) ile birlikte kullanılmak içindir.

Sonuçların yorumlanması hastanın diğer klinik ve patolojik verileri dikkate alınarak hastanın klinik geçmişi kapsamında yetkin bir patoloj tarafından yapılmalıdır.

#### 2. Klinik bağlantısı

Nerotrofik tirozin reseptör kinaz genleri (NTRK1, NTRK2 ve NTRK3) sağlıklı insan hücrelerinde hücrenin sağkalımında, proliferasyonunda ve hücresel başkalaşımda önemli roller oynayan bir reseptör tirozin kinaz ailesini kodlar. NTRK geni yeniden düzenlenmelerinin çok farklı tümör tiplerinde meydana geldiği bulunmuştur. NTRK geninin, NTRK kinaz bölgesini kodlayan 3' ucu ile çeşitli aktive edici genlerin 5' ucunun füzyonu gerçekleşir. Bu füzyonun ürünü NTRK kinazın ligand-bağımsız konstitütif aktivasyonu ile karakterize edilen bir kimerik onkoproteindir. NTRK1 için papillar tiroid kansinomu (PTC), akciğer kanseri, sarkomlar ve spitzoid neoplazmlar dahil olmak üzere çok çeşitli insan tümör tiplerinde 40'ın üzerinde 5' gen partneri tanımlanmıştır. NTRK1 yeniden düzenlenmelerinin tiroid kansinogenezinde yer aldığı gösterilmiştir. Birçok çalışma, NTRK1 yeniden düzenlenmesi bakımından negatif olan PTC'ler ile karşılaştırıldığında NTRK1 yeniden düzenlenmelerini daha kötü bir klinik seyir ile ilişkilendirmiştir. NTRK füzyonu-pozitif onal kanser hastalarının FDA onaylı larotrectinib ve entrectinib gibi NTRK inhibitörleri ile tedavisi NTRK geninden, füzyon partnerinden ve tümör tipinden bağımsız olarak yüksek yanıt oranları ile ilişkilendirilmiştir. Bu nedenle, NTRK1 yeniden düzenlenmelerinin *in situ* hibridizasyon ile tespit edilmesi prognostik ve terapötik öneme sahip olabilir.

#### 3. Test prensibi

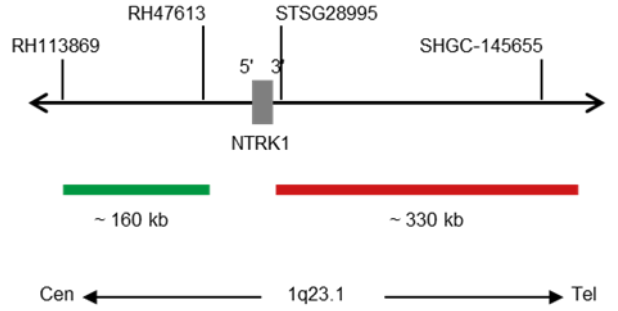
Kromojenik *in situ* hibridizasyon (CISH) tekniği hücre preparatlarında spesifik nükleik asit dizilerinin tespit edilmesine ve görüntülenmesine imkan verir. CISH problemleri denenen hapten-işaretili nükleotid fragmentleri ve preparatlardaki komplementer hedef dizileri birlikte denatüre edilirler ve sonrada hibridizasyon ile birbirine kaynamaları sağlanır. Daha sonra, spesifik olmayan ve bağlanma yapmamış prob fragmentleri güçlü yıkama adımları ile ortamdan uzaklaştırılır. İşaretili probun dupleks oluşumu sekonder polimerize enzim-konjuge antikorlar tarafından tespit edilen primer (işaretsiz) antikorlar kullanılarak görüntülenebilir. Kromojenik substratlar ile meydana gelen enzimatik reaksiyon renkli çöktürmelerin oluşmasına yol açar. Hibridize olmuş problemler hücre çekirdeğinin bir çekirdek boyası ile zıt boyanmasından sonra ışık mikroskopunda görüntülenebilir.

#### 4. Sağlanan reaktifler

ZytoDot 2C SPEC NTRK1 Break Apart Probe şunları içerir:

- Digoksinjenin-işaretili polinükleotidler (~0,50 ng/μl), 1q23.1\* (chr1:156,621,188-156,781,745) konumunda bulunan NTRK1 kırılma noktası bölgesinin proksimalindeki dizileri hedef alır (bknz. Şekil 1).
- Dinitrofenil-işaretili polinükleotidler (~0,75 ng/μl), 1q23.1\* (chr1:156,854,527-157,186,293) konumunda bulunan NTRK1 kırılma noktası bölgesinin distalindeki dizileri hedef alır (bknz. Şekil 1).
- Formamid tabanlı hibridizasyon tamponu

\*Human Genome Assembly GRCh37/hg19'a göre



Şekil 1: SPEC NTRK1 Prob yapısı (ölçekli değildir)

ZytoDot 2C SPEC NTRK1 Break Apart Probe tek şekilde temin edilir:

- C-3078-100: 0.1 ml (10 reaksiyon, her biri 10 μl)

#### 5. Gerekli diğer malzemeler

- ZytoDot 2C CISH Implementation Kit (Ürün No. C-3044-10/-40)
- Pozitif ve negatif kontrol örnekleri
- Mikroskop lamaları, pozitif yüklü
- Su banyosu (80°C, 98°C)
- Hibridizasyon cihazı veya sıcak levha
- Hibridizasyon cihazı veya hibridizasyon etüvünde nemli kutu
- Ayarlanabilir pipetler (10 μl, 1000 μl)
- Boyama kapları veya banyoları
- Zaman Sayacı
- Kalibre edilmiş termometre
- Etanol veya reaktif dereceli alkol
- Ksilen
- Metanol %100
- Hidrojen Peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) %30
- Deiyonize veya distile su
- Lamel (22 mm x 22 mm, 24 mm x 32 mm)
- Lastik yalıtım solüsyonu, örn., Fixogum Rubber Cement (Ürün No. E-4005-50/-125) veya benzeri
- Uygun donanımlı ışık mikroskobu (400-630x)

## 6. Saklama ve kullanma koşulları

2-8°C'de dik olarak saklayın. Kullandıktan sonra hemen saklama koşullarına ulaştırın. Reaktifleri etiketleri üzerinde belirtilen son kullanma tarihlerinden sonra kullanmayın. Ürün, uygun şekilde kullanıldığında ve saklandığında etiketi üzerinde belirtilen son kullanma tarihine kadar kullanılabilir.

## 7. Uyarılar ve önlemler

- Kullanmadan önce kullanma kılavuzunu okuyun!
- Son kullanma tarihi gelen ürünleri kullanmayın!
- Bu ürün sağlığa zararlı ve potansiyel olarak enfeksiyöz maddeler içerir (düşük konsantrasyonlarda ve hacimlerde). Reaktiflere doğrudan temas etmekten sakının. Uygun önlemleri alın (tek kullanımlık eldiven, koruyucu gözlük ve laboratuvar giysisi giyin)!
- Ürün ile ilgili meydana gelen herhangi bir ciddi kazayı üreticisine ve yerel düzenlemelere uygun olarak yetkililere bildirin!
- Reaktifler cilt ile temas ederse cildi derhal bol miktarda su ile yıkayın!
- Web sitemizde ([www.zytovision.com](http://www.zytovision.com)) bir güvenlik bilgi formu bulunmaktadır!
- Aksi açıkça belirtilmemişse reaktifleri tekrar kullanmayın!
- Örnekler arasında çapraz kontaminasyon olmasından ve mikrobakteriyel kontaminasyon olmasından sakının!
- Hibridizasyon ve yıkama aşamaları sırasında örneklerin kurumasına izin verilmemelidir!

## Zararlılık ve önlem ifadeleri:

Zararlılık belirleyici bileşen Formamid'tir.



### Tehlike

|           |  |
|-----------|--|
| H351      | Kansere yol açma şüphesi var.  |
| H360FD    | Üremeye zarar verebilir. Doğmamış çocukta hasara yol açabilir.               |
| H373      | Uzun süreli veya tekrarlı maruz kalma sonucu organlarda hasara yol açabilir. |
| P201      | Kullanmadan önce özel talimatları okuyun.                                    |
| P202      | Bütün önlem ifadeleri okunup anlaşılmadan elleçlemeyin.                      |
| P260      | Tozunu/dumanını/gazını/sisini/buharını/spreyini solumayın.                   |
| P280      | Koruyucu eldiven/koruyucu kıyafet/göz koruyucu/yüz koruyucu kullanın.        |
| P308+P313 | Maruz kalınma veya etkileşme halinde İSE: Tıbbi yardım/bakım alın.           |
| P405      | Kilit altında saklayın.  |

## 8. Sınırlamalar

- Yalnızca vücut dışı (*in vitro*) tıbbi tanı amaçlı kullanım içindir.
- Yalnızca profesyonel kullanım içindir.
- Yalnızca otomatik olmayan çalışmalarda kullanım içindir.
- Herhangi bir pozitif boyanmanın veya boyanma olmamasının klinik yorumlaması başka tanı testleri ile birlikte klinik geçmiş, morfoloji ve diğer histopatolojik kriterler kapsamında yapılmalıdır. Preparatın boyanmasında kullanılan CISH problemleri, reaktifler, tanı panelleri ve yöntemleri hakkında bilgi sahibi olmak yetkin bir patoloğun sorumluluğudur. Boyama işlemi onaylı ve lisanslı bir laboratuvar, boyanmış lamaların incelenmesinden sorumlu olan ve pozitif ve negatif kontrollerin yeterliliğini garanti eden bir patoloğun gözetiminde yapılmalıdır.
- Örneğin boyanması, özellikle de sinyalin yoğunluğu ve zemin boyanması, örneğin boyamadan önce geçtiği işlem ve hazırlık süreçlerine bağlıdır. Kötü fiksasyon, dondurma, çözme, yıkama, kurutma, ısıtma, kesit alma veya diğer örneklerle ya da sıvılarla kontamine etme artefaktlara veya yanlış sonuçlara yol açabilir. Tutarsız sonuçlar fiksasyon ve gömme yöntemlerindeki

değişkenliklerden ve de örneğin kendi içinde olan düzensizliklerden meydana gelebilir.

- Prob yalnızca 4. "Sağlanan reaktifler" bölümünde tanımlanan lokusların tespit edilmesi için kullanılmalıdır.
- Ürünün performansı bu kullanma kılavuzunda tanımlanan prosedürler kullanılarak doğrulanmıştır. Bu prosedürlerde yapılan değişiklikler performansı değiştirebilir ve doğrulaması kullanıcı tarafından yapılmalıdır.

## 9. Etkileşimli maddeler

Aşağıdaki fiksatifler ISH ile uyumlu değildir:

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

## 10. Örneklerin 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  $\mu\text{m}$  kalınlığında kesitler alın.
- Pozitif yüklü mikroskop lamaları kullanın.
- 50-60°C'de 2-16 saat fikse edin.

## 11. Ürünün kullanıma hazırlanması

Ürün kullanıma hazırdır. Yeniden sulandırmaya, karıştırmaya veya dilüsyon yapmaya gerek yoktur. Kullanmadan önce probun oda sıcaklığına (18-25°C) ulaşmasına izin verin ve hafifçe karıştırın.

## 12. Çalışma prosedürü

### Örneğin ön işlemi

Örneğin ön işlemini (parafin giderme, proteoliz) [ZytoDot 2C CISH Implementation Kit](#) kullanma kılavuzuna göre yapın.

### Denatürasyon ve hibridizasyon

1. Ön işlemi yapılmış her bir örneğin üzerine 10  $\mu\text{l}$  prob pipetleyin.
2. Örnekleri 22 mm x 22 mm boyutlarında bir lamel ile kapatın (hava kabarcığı bırakmadan) ve lamelin yalıtımını sağlayın.
3. Lamaları bir sıcak levha üzerine ya da bir hibridizasyon cihazına yerleştirin ve örnekleri 79°C'de 5 dakika denatüre edin.
4. Lamaları bir nemli kutuya aktarın ve 37°C'de (örn. bir hibridizasyon etüvünde) gece boyu hibridize edin.

*Yalıtım için lastik solüsyonu (örn., Fixogum) kullanılmasını öneririz.*

*Hibridizasyon aşamasında örneklerin kurumaması gerekir.*

### Hibridizasyon sonrası

Hibridizasyon sonrası işlemleri (yıkama, deteksiyon, zıt boyama, kapama, mikroskop incelemesi) [ZytoDot 2C CISH Implementation Kit](#) kullanma kılavuzuna göre yapın.

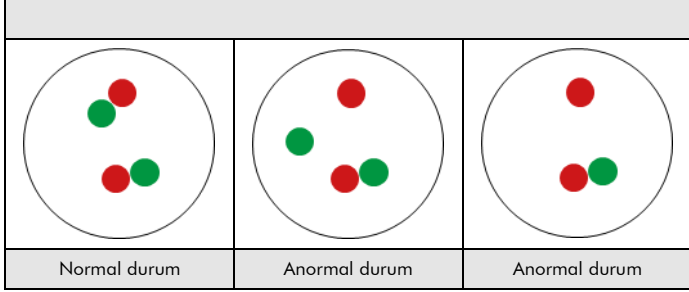
## 13. Sonuçların yorumlanması

[ZytoDot 2C CISH Implementation Kit](#) kullanıldığında Digoksijenin-işaretleli polinükleotidlerin hibridizasyon sinyalleri koyu yeşil renkli belirgin noktalar (NTRK1 kırılma noktası bölgesinin proksimali), Dinitrofenil-işaretleli polinükleotidlerin hibridizasyon sinyalleri parlak kırmızı renkli belirgin noktalar (NTRK1 kırılma noktası bölgesinin distali) şeklinde gözlenir.

**Normal durum:** Normal hücrelerin veya NTRK1 gen bölgesini içeren bir translokasyonu olmayan hücrelerin interfazlarında iki adet kırmızı/yeşil birleşik sinyal görülür (bkz. Şekil 2).

**Anormal durum:** Bir translokasyondan etkilenmiş bir NTRK1 gen bölgesi ayrı bir nokta şeklinde yeşil sinyal ve ayrı bir nokta şeklinde kırmızı sinyal olarak görülür. İzole kırmızı sinyaller NTRK1 kırılma noktası bölgesinin proksimalindeki delesyonlar ya da bu kromozom bölgesini etkileyen dengesiz translokasyonlar nedeniyle olabilir (bkz. Şekil 2).

*Üst üste gelen sinyaller kahverengi görünebilir.*



**Şekil 2: Normal ve anormal hücre çekirdeklerinde beklenen sonuçlar**

Küçük delesyonlar, duplikasyonlar veya inversiyonlardan kaynaklanan genomik anormallikler sonucunda dikkat çekmeyen sinyal modelleri meydana gelebilir.

Bazı anormal örneklerde yukarıda belirtilenden farklı sinyal modelleri gözlemlenebilir. Bu beklenmeyen sinyal modelleri daha fazla araştırılmalıdır.

#### Lütfen dikkat edin:

- Kromatinin yoğunluğunu kaybetmesinden dolayı tek CISH sinyalleri küçük kümeler gibi görünebilir. Bu yüzden, aralarında 1 sinyal çapından daha düşük veya ona eşit mesafe bulunan aynı büyüklükteki iki veya üç sinyal tek sinyal sayılmalıdır.
- Sinyal sayımından önce, herhangi bir olası intratümöral heterojenlik bakımından örnek 100 ila 200 büyütmede taranmalıdır.
- Sinyallerin görüntülenmesi en az 400 büyütmede yapılmalıdır, böylece sinyaller daha kolay görüntülenebilir. Kromozom kırılmalarını tespit eden problemler için 630 büyütme önerilir. Kontrast yükseltici filtreler kullanmayın çünkü sinyal renginde bozulma olabilir. Parlak renkli sinyaller elde etmek için apertür diyaframını açın. Bir hücre çekirdeğini değerlendirirken mutlaka odağı yukarıya ve aşağıya doğru değiştirin çünkü kırmızı ve yeşil sinyaller birbirinin üzerinde bulunabilir.
- Nekroz, üst üste gelmiş hücre çekirdekleri, aşırı sindirilmiş hücre çekirdekleri ve sinyal yoğunluğu zayıf olan hücre çekirdekleri bulunan bölgeleri değerlendirmeyin.
- Neoplastik olmayan hücrelerin küçük bir yüzdesinde bile mitoz nedeniyle ilave sinyaller görülebilir. Parafine gömülü örneklerde kesit artefaktları nedeniyle zaman zaman sinyal vermeyen hücre çekirdekleri gözlemlenebilir.
- Negatif veya spesifik olmayan bir sonuç çok sayıda etken sebebiyle meydana gelebilir (17. Bölüme bakınız).
- Sonuçları doğru yorumlamak için kullanıcı bu ürünü tanı prosedürlerinde kullanmadan önce ulusal ve/veya uluslararası yönergelerle göre doğrulanmalıdır.

#### 14. Önerilen kalite kontrol prosedürleri

İşlenen örneklerin ve test reaktiflerinin doğru performans gösterdiklerini izlemek için her deneye iç ve dış kontroller dahil edilmelidir. İç ve/veya dış kontroller uygun boyanma göstermezse hasta örnekleri ile alınan sonuçlar geçersiz kabul edilmelidir.

**İç kontrol:** Örnek içindeki normal sinyal modeli gösteren neoplastik olmayan hücreler, örn., fibroblastlar.

**Dış kontrol:** Doğrulanmış pozitif ve negatif kontrol örnekleri.

#### 15. Performans özellikleri

Proben performansı dengi olan IVD onaylı FISH probu ile karşılaştırılarak belirlenmiştir. Uyum %100'dür.

**Doğruluk:** Doğruluk %100 olarak hesaplanmıştır.

**Analitik duyarlılık:** Analitik duyarlılık %100 olarak hesaplanmıştır.

**Analitik özgüllük:** Analitik özgüllük %100 olarak hesaplanmıştır.

#### 16. Atık bertarafı

Reaktiflerin bertarafı yerel düzenlemelere uygun olarak yapılmalıdır.

#### 17. Sorun giderme

Çalışma talimatlarına uyulmaması hatalı sonuçların alınmasına veya sonuç alınamamasına sebep olabilir.

#### Zayıf sinyaller veya hiç sinyal bulunmaması

| Olası sebep  | Önlem  |
|--|--|
| Hücre veya doku örneği doğru fikse olmamış   | Fiksasyon süresini ve fiksatifi optimize edin  |
| Isı ön işlemi, proteoliz, hibridizasyon, denatürasyon, güçlü yıkama veya antikor inkübasyonu sıcaklığı doğru değil | Kullanılan tüm teknik araçların sıcaklığını kalibre edilmiş bir termometre ile kontrol edin. Sıcaklığı kritik olan solüsyonlarda her zaman aynı sayıda lam kullanın.   |
| Proteolitik ön işlem doğru yapılmamış  | Fiksasyonun yapısı ve süresi, kesitlerin kalınlığı ve dokunun/hücrelerin yapısı gibi çok sayıda faktöre bağlı olarak farklı inkübasyon süreleri gerekebilir. Ön denemeler yaparak pepsin inkübasyonu için optimum süreyi belirleyin.   |
| Hibridizasyon süresi çok kısa  | Hibridizasyonu en az 12 saat yapın; gerekirse hibridizasyon süresini uzatın.   |
| Dehidrasyon solüsyonları eski  | Taze dehidrasyon solüsyonları hazırlayın.  |
| Prob buharlaşması  | Bir hibridizasyon cihazı kullanırken ıslak şeritlerin / su dolu haznelerin kullanılması zorunludur. Bir hibridizasyon etüvü kullanırken bir nemli kutunun kullanılması gerekir. Ayrıca, hibridizasyon sırasında örneğin kurummasını önlemek için lamel iyice yalıtılmalıdır (örn. Fixogum ile) |
| Kromojenik substratların hazırlanması yeterli değil  | Bir damla AP-Red Solution A damlatmak yerine 30 µl uygulayın. İki damla HRP-Green Solution A damlatmak yerine 40 µl uygulayın.   |
| Kromojenik substrat inkübasyon süresi çok kısa   | İnkübasyon süresini uzatın   |
| Zıt boyama süresi çok uzun   | Zıt boyama süresi örneğin yapısına bağlıdır ve buna göre optimize edilmelidir. Koyu zıt boyanma olmasından kaçının çünkü pozitif boyanma sinyallerini engelleyebilir.  |
| Zıt boyamada mavileştirme düzgün yapılmamış  | Mavileştirme için soğuk akan çeşme suyu kullanın; ılık veya sıcak su ya da mavileştirme reaktifleri kullanmayın  |

#### Sinyaller çok kuvvetli

| Olası sebep                                   | Önlem  |
|---|--|
| Yapılan proteoliz ön işlemi çok uzun          | Fiksasyonun yapısı ve süresi, kesitlerin kalınlığı ve dokunun/hücrelerin yapısı gibi çok sayıda faktöre bağlı olarak farklı inkübasyon süreleri gerekebilir. Ön denemeler yaparak pepsin inkübasyonu için optimum süreyi belirleyin. |
| AP-Red Solution inkübasyon süresi doğru değil | Gerekirse inkübasyon süresi 5 dakikaya düşürülebilir. Substrat solüsyonunu 25°C'nin üzerine ısıtmayın; yalnızca oda sıcaklığında inkübe edin.  |

|  |   |
|--|---|
| HRP-Green Solution inkübasyon süresi doğru değil | Gerekirse inkübasyon süresi 7 dakikaya düşürülebilir. Substrat solüsyonunu 25°C'nin üzerine ısıtmayın; yalnızca oda sıcaklığında inkübe edin. |
|--|---|

**Kırmızı sinyaller çok zayıf**

| Olası sebep                                      | Önlem  |
|--|--|
| AP-Red Solution güçlü direkt ışığa maruz kalmış  | AP-Red Solution'ı güçlü direkt ışıktan korunaklı bir şekilde hazırlayın ve kullanın          |
| AP-Red Solution çok erken hazırlanmış            | Kullanmadan hemen önce hazırlayın  |
| AP-Red Solution inkübasyon süresi doğru değil    | Gerekirse inkübasyon süresi 15 dakikaya kadar uzatılabilir                                   |
| Kromojenik substratın hazırlanması yeterli değil | Bir damla AP-Red Solution A damlatmak yerine 30 µl uygulayın. Solution A hacmini artırmayın. |

**Yeşil sinyaller çok zayıf**

| Olası sebep   | Önlem   |
|---|---|
| HRP-Green ile boyamadan sonraki herhangi bir yıkama adımının inkübasyon süresi çok uzun | Belirtilen inkübasyon sürelerini aşmayın  |
| HRP-Green Solution inkübasyon süresi doğru değil  | Gerekirse inkübasyon süresi 15 dakikaya kadar uzatılabilir                                      |
| Kromojenik substratın hazırlanması yeterli değil  | İki damla HRP-Green Solution A damlatmak yerine 40 µl uygulayın. Solution A hacmini artırmayın. |

**Sinyaller soluk veya birbirine girmiş**

| Olası sebep                                | Önlem  |
|--|--|
| Uygun olmayan kapama solüsyonu kullanılmış | Yalnızca kit ile birlikte verilen kapama maddesini veya yabancı madde içermeyen ksilen bazlı kapama solüsyonu kullanın; kapama bandı kullanmayın |
| Kesitlerin dehidrasyonu düzgün olmamış     | Taze etanol ve ksilen solüsyonları kullanın; yalnızca "saf" kalitede ksilen kullanın.  |

**Düzensiz veya yalnızca bazı kısımlarda çok hafif boyanma**

| Olası sebep  | Önlem  |
|--|--|
| Parafin giderme tamamlanmamış  | Taze solüsyonlar kullanın; parafin giderme işleminin süresini kontrol edin |
| Reaktif hacmi çok düşük  | Reaktif hacminin doku alanını kaplamaya yetecek miktarda olmasını sağlayın |
| Hibridizasyon öncesinde veya kapama sırasında hava kapama sırasında hava kabarcıkları kalmış | Hava kabarcığı bırakmayın  |

**Tutarsız sonuçlar**

| Olası sebep   | Önlem   |
|---|---|
| Proben uygulanmasından önce yeterli kurutma yapılmamış  | Havada kuruma süresini uzatın   |
| Pepsinin, antikorların ve/veya renk substratlarının uygulanmasından önce doku üzerinde çok fazla su/yıkama tamponu kalmış | Doku kesiti üzerindeki fazla sıvının emdirilerek veya lamı sallayarak giderilmesini sağlayın. Küçük miktardaki su/yıkama tamponu kalıntısı teste etki etmez |

|   |   |
|---|---|
| Dokunun fiksasyon ve gömme yöntemlerinde değişkenlikler var | Fiksasyon ve gömme yöntemlerini optimize edin |
| Doku kesiti kalınlığında değişiklikler var                  | Kesit almayı optimize edin                    |

**Doku morfolojisi bozulmuş**

| Olası sebep                                | Önlem   |
|--|---|
| Hücre veya doku örneği doğru fikse olmamış | Fiksasyon süresini ve fiksatifini optimize edin                           |
| Proteolitik ön işlem doğru yapılmamış      | Pepsin inkübasyon süresini optimize edin; gerekirse artırın veya düşürün. |

**Çapraz hibridizasyon sinyalleri, kötü zemin**

| Olası sebep  | Önlem   |
|--|---|
| Güçlü yıkama sıcaklığı doğru değil                                 | Kullanılan tüm teknik araçların sıcaklığını kalibre edilmiş bir termometre ile kontrol edin. Sıcaklığı kritik olan solüsyonlarda her zaman aynı sayıda lam kullanın. Sıcaklık inkübasyonu olan adımlarda sekizden fazla lam kullanılmamasını öneririz |
| Lamlar iyice yıkanmamış  | Belirtilen adımlarda taze ve yeterli miktarda yıkama tamponu ve deiyonize veya distile su kullanın.   |
| Kesitler hibridizasyon sırasında veya sonrasında bir zaman kurumuş | Kesitlerin kurumasını önleyin; nemli kutu kullanın; lameli düzgün şekilde yalıtın   |
| Substrat inkübasyon süresi uzun                                    | Substrat inkübasyon süresini düşürün  |
| Parafin giderme tamamlanmamış                                      | Taze solüsyonlar kullanın; parafin giderme işleminin süresini kontrol edin  |
| Proteolitik ön işlem çok güçlü                                     | Pepsin inkübasyon süresini optimize edin  |
| Lamlar hibridizasyondan önce oda sıcaklığına soğutulmuş            | Lamları çabucak hibridizasyon sıcaklığına aktarın   |

**Sinyaller üst üste gelmiş**

| Olası sebep                                | Önlem                                       |
|--|---|
| Doku kesitlerinin kalınlıkları uygun değil | 3-5 µm kalınlığında mikrotom kesitleri alın |

**Örnek lama iyi yapışmamış**

| Olası sebep                    | Önlem                                 |
|--------------------------------|---------------------------------------|
| Lamın kaplaması uygun değil    | Uygun lamlar (pozitif yüklü) kullanın |
| Proteolitik ön işlem çok güçlü | Pepsin inkübasyon süresini düşürün    |

**18. Literatür**

- Cocco E, et al. (2018) *Nat Rev Clin Oncol* 15: 731-47.
- Farago AF, et al. (2015) *J Thorac Oncol* 10: 1670-4.
- Greco A, et al. (2010) *Mol Cell Endocrinol* 321: 44-9.
- Haller F, et al. (2016) *J Pathol* 238: 700-10.
- Hsiao SJ, et al. (2019) *J Mol Diagn* 21: 553-71.
- Marchiò C, et al. (2019) *Ann Oncol* 30: 1417-27.
- Martin-Zanca D, et al. (1986) *Nature* 319: 743-8.
- Musholt TJ (2000) *Surgery* 128: 984-93.
- Russell JP, et al. (2000) *Oncogene* 19: 5729-35.
- Solomon JP & Hechtman JF (2019) *Cancer Res* 79: 3163-8.
- Vaishnavi A, et al. (2013) *Nat Med* 19: 1469-72.
- Wilkinson DG: *In Situ Hybridization, A Practical Approach, Oxford University Press* (1992) ISBN 0 19 963327 4.

## 19. Revizyon

Kullanma kılavuzlarının en g¼ncel ve farklı dillerdeki versiyonlarına ulaşmak için [www.zytovision.com](http://www.zytovision.com) sitesine bakın.

Uzmanlarımız sorularınızı yanıtlamaya hazırdır.  
Lütfen [helptech@zytovision.com](mailto:helptech@zytovision.com) adresine yazınız.



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

### Ticari markalar:

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