

Anti-FITC-AP CISH Accessory Kit (Dako Omnis)

Part number / N° de pièce / Artikelnummer K589911-2

English



Intended Use Anti-FITC-AP CISH Accessory Kit (Dako Omnis) is intended for the detection of FITC-labeled in situ hybridization (ISH) probes following hybridization to formalin-fixed, paraffin-embedded tissue specimens onboard Dako Omnis.

Summary Anti-FITC-AP CISH Accessory Kit (Dako Omnis) provides all the reagents necessary for the detection of FITC-labeled probes onboard Dako Omnis. Following hybridization with a suitable probe (not included), the CISH Endogenous Enzyme block (K589911-21510) is added to suppress endogenous enzyme activity followed by incubation with the Anti-FITC-AP primary antibody (K589911-21511). The Anti-FITC-AP antibody binds to the FITC molecules on the probe with the conjugated Alkaline Phosphatase acting to catalyze the deposition of the BCIP-NBT substrate chromogen (K589911-21512). The result is crisp dark blue/purple staining at the sites where the probe is bound. Following staining, samples are counterstained using Nuclear Fast Red (K589911-22510). It is recommended that Agilent CISH probes formulated for use on Dako Omnis be used in conjunction with the kit.

Kit Components

| Component | Part Number | Quantity | Storage |
|---|---------------|----------|--------------|
| CISH Endogenous Enzyme block (Dako Omnis) | K589911-21510 | 40 Tests | 2°C to 8°C |
| Anti-FITC-AP (Dako Omnis) | K589911-21511 | 40 Tests | 2°C to 8°C |
| BCIP-NBT Substrate (Dako Omnis) | K589911-21512 | 40 Tests | 2°C to 8°C |
| Nuclear Fast Red (Dako Omnis) | K589911-22510 | 40 Tests | 15°C to 30°C |

Keep Anti-FITC-AP CISH Accessory Kit (Dako Omnis) components protected from light whenever possible. A certificate of analysis is shipped with the kit.

Warnings and Precautions

- 1 For In Vitro Diagnostic Use.
- 2 Avoid microbial contamination, which may cause erroneous results.
- 3 All biological specimens and materials with which they come into contact should be handled as if capable of transmitting infection and disposed of with proper precautions in accordance with federal, state and local regulations. Refer to the appropriate blood borne pathogen precautions indicated by your facility or local regulations. Never pipet by mouth. Avoid specimen contact with skin and mucous membranes.
- 4 Exercise standard precautions when obtaining, handling and disposing of potentially carcinogenic reagents.
- 5 Exercise care to avoid cross-contamination of samples during all steps of this procedure, as this may lead to erroneous results.



Agilent Technologies

- 6 Do not shake the vial of BCIP-NBT Substrate (Dako Omnis) before use. Under recommended storage conditions BCIP-NBT Substrate (Dako Omnis) may form a precipitate. The presence of the precipitate should not impair staining.
- 7 Use powder-free gloves whenever possible to minimize introduction of powder particles into sample or kit materials.
- 8 The Anti-FITC-AP CISH Accessory Kit (Dako Omnis) kit components are stable for 80 hours when stored in the Reagent Storage Module onboard the Dako Omnis instrument. Onboard time is tracked by the Dako Omnis software. When the Omnis run is finished, immediately transfer the kit components to their recommended storage conditions to preserve onboard stability time.
- 9 The performance of the Anti-FITC-AP CISH Accessory Kit (Dako Omnis) kit components have been shown to be unaffected by up to 20 transfers from the recommended storage conditions to the Reagent Storage Module onboard the Dako Omnis instrument.
- 10 The clinical interpretation of any test results should be evaluated within the context of the patient's medical history and other diagnostic laboratory test results by qualified personnel.
- 11 Use of control slides is recommended.

Use of Control Slides It is recommended to run control slides concurrently with patient slides, using the same protocol, to monitor assay performance and to assess the accuracy of signal enumeration.

Safety Information Safety Data Sheets (SDS) for the kit components are available at www.agilent.com.

Indications of Instability or Deterioration Inspect packages upon arrival. If the tamper-evident label is opened at the perforations do not use the contents of the package. The functionality of the product is supported through the labeled use-by date. However, there are no obvious signs to indicate instability or deterioration of this product that may have occurred during mishandling or shipment. Therefore, it is important to run appropriate controls along with the test specimens. For customer service or technical support, please contact Agilent Genomics.

Materials Required but not Provided The procedure described in this document uses the following additional materials. Consult the Instructions for Use for each device for further information.

- Dako Omnis advanced staining system platform; Dako Code G1100
- Dako Omnis Mixing Device; Dako p/n GC11630
- Agilent CISH probe (Dako Omnis)
- ISH Lid, for Dako Omnis; Dako p/n GC10230
- ISH Ethanol Solution, 96% (Dako Omnis); Dako p/n GM30011-2 (ready-to-use)
- ISH Pre-Treatment Solution (20×) (Dako Omnis); Dako Code GM30111-2
- ISH Pepsin (Dako Omnis); Dako p/n GM30211-2 (ready-to-use)
- ISH Stringent Wash Buffer (20×) (Dako Omnis); Dako p/n GM30311-2
- Clarify (clearing agent); Dako p/n GC81030-2
- Wash Buffer (20×) (Dako Omnis); Dako p/n GC80711-2
- ISH Cleaning Solution (Dako Omnis); Dako p/n GC20730-2 (ready-to-use)
- Light microscope (4×–40× objective magnification)
- Permanent mounting medium and ancillary reagents required for mounting coverslips
- Glass coverslips for mounting (24 mm × 50 mm)

Workflow Procedure Anti-FITC-AP CISH Accessory Kit (Dako Omnis) has been developed for use on the Dako Omnis instrument in combination with Agilent CISH probes. The automated CISH staining procedure on Dako Omnis includes: 1) Sample Pre-treatment: Deparaffinization of tissue sections, target retrieval, and pepsin digestion; 2) Probe hybridization: Denaturation, hybridization, and stringent washing; 3) Chromogenic conversion of bound probe: Enzyme blocking, antibody binding, chromogen addition, and nuclear counterstaining.

The CISH protocol is pre-programmed in the Dako Omnis software. Please refer to Dako Omnis Basic User Guide for detailed instructions on preparing the instrument for staining and Dako Omnis Advanced User Guide for detailed instructions on protocols.

The settings for the protocol steps depends on the CISH probe. Please refer to the package insert for the individual Agilent CISH probes.

Table 1 Simplified overview of the automated staining protocols for Agilent CISH probes performed onboard Dako Omnis

| Step | Reagent | Time and Temperature |
|----------------------------|---|----------------------|
| Dewaxing | Clarify | 10 minutes |
| Target retrieval | ISH Pre-Treatment Solution (Dako Omnis) | 3 minutes*, 70°C* |
| Wash | ISH Ethanol Solution, 96% (Dako Omnis) | 2 × 3 minutes |
| Digestion | ISH Pepsin (Dako Omnis) | 15 minutes* |
| Drying | — | 15 minutes, 45°C |
| Denaturation | — | 10 minutes, 66°C |
| Hybridization | CISH (Dako Omnis) probe | 60 minutes, 45°C |
| Stringent wash | ISH Stringent Wash Buffer (Dako Omnis) | 3 minutes*, 55°C* |
| Endogenous enzyme blocking | CISH Endogenous Enzyme Block (Dako Omnis) | 3 minutes* |
| Antibody binding | Anti-FITC-AP (Dako Omnis) | 30 minutes* |
| Chromogen addition | BCIP-NBT Substrate (Dako Omnis) | 2 × 20 minutes* |
| Counterstaining | Nuclear Fast Red (Dako Omnis) | 10 minutes* |

* Step is customizable

[Table 2](#) describes the procedures for using CISH (Dako Omnis) probes with the automated Dako Omnis staining protocols. Consult the Dako Omnis User Guides for instructions on loading slides, ISH Lids, and reagents.

Table 2 Procedures

| Reagent Preparation Procedures |
|---|
| <p>1 Prepare CISH (Dako Omnis) probe. The provided vial contains a gold-coated magnetic ball used for mixing. Prior to loading the vial onto Dako Omnis, the reagent must be thawed and thoroughly mixed as it phase-separates during freezing.</p> <p>Use the Dako Omnis Mixing Device for probe mixing as described below. Consult the Mixing Device User Guide for further details. Always mix the vial contents of the CISH (Dako Omnis) probe just prior to loading onto the instrument. Do not shake the vial.</p> <ul style="list-style-type: none"> Remove the CISH (Dako Omnis) probe vial from the freezer and load onto the Dako Omnis Mixing Device. Connect the Mixing Device and ensure the green status light is on. Select the program <i>Thaw + Mix</i> to begin mixing the vial contents. After completing the <i>Thaw + Mix</i> program, remove the probe vial from the Mixing Device. Once thawed and mixed, maintain the vial in the upright position to prevent probe solution from collecting in the vial cap. Open the flip top cap, flick it backward and click it into the cut-out position (consult the Dako Omnis Basic User Guide for details). Immediately load the vial into the Reagent Storage Module on the Dako Omnis instrument. If the continuous reagent loading feature is used during the staining run, ensure that the time from mixing to aspiration of the vial at Dako Omnis is at least 10 minutes. After the run is complete, immediately transfer the CISH (Dako Omnis) probe to storage at –25°C to –15°C. <p>NOTE: If the vial is being used immediately after receipt on dry ice, thaw the vial prior to loading onto the Mixing Device, then use the program <i>Mix only</i> to mix the vial contents (do not use the <i>Thaw + Mix</i> program).</p> |

Table 2 Procedures

-
- 2 Prepare ISH Pre-Treatment Solution.** Prepare a working solution by diluting the ISH Pre-Treatment Solution (20×) (Dako Omnis) 1:20 as follows:
- Fill a Dako Omnis 3.5 L bulk bottle, marked PTB (blue label, Code GC109), to the fill line with deionized water (3.325 L). Ensure the bulk bottle is placed on a horizontal surface before filling.
 - Empty one 175 mL ISH Pre-Treatment Solution (20×) (Dako Omnis) concentrate bottle into the bulk bottle. The concentrate contains an antimicrobial agent and an inert green color for easy identification.
 - Transfer the detachable label from the concentrate bottle to the bulk bottle. Fasten the bulk bottle lid and gently invert the bulk bottle 2 to 3 times.
 - Use the handheld Dako Omnis barcode scanner to identify the reagent (scan the detachable label and the bulk bottle).
 - Immediately load the Bulk bottle onto the Dako Omnis instrument.

The diluted solution can be used within 7 days when stored onboard Dako Omnis. Onboard time is tracked by the Dako Omnis software. Unused diluted solution may be stored at 2–8°C for 30 days. After cold storage ensure that the diluted solution is equilibrated to at least 18°C before loading onto Dako Omnis.

NOTE: Discard diluted solution if cloudy in appearance.

-
- 3 Prepare ISH Stringent Wash Buffer.** Prepare a working solution by diluting the ISH Stringent Wash Buffer (20×) (Dako Omnis) 1:20 as follows:
- Fill a Dako Omnis 3.5 L bulk bottle, marked PTB (blue label, Code GC109), to the fill line with deionized water (3.325 L). Ensure the bulk bottle is placed on a horizontal surface before filling.
 - Empty one 175 mL ISH Stringent Wash Buffer (20×) (Dako Omnis) concentrate bottle into the bulk bottle. The concentrate contains an antimicrobial agent, a detergent, and an inert yellow color for easy identification.
 - Transfer the detachable label from the concentrate bottle to the bulk bottle. Fasten the bulk bottle lid and gently invert the bulk bottle 2 to 3 times.
 - Use the handheld Dako Omnis barcode scanner to identify the reagent (scan the detachable label and the bulk bottle).
 - Immediately load the Bulk bottle onto the Dako Omnis instrument.

The diluted solution can be used within 7 days when stored onboard Dako Omnis. Onboard time is tracked by the Dako Omnis software. Unused diluted solution may be stored at 2–8°C for 30 days. After cold storage ensure that the diluted solution is equilibrated to at least 18°C before loading onto Dako Omnis.

NOTE: Discard diluted solution if cloudy in appearance.

-
- 4 Load ISH Ethanol Solution, 96% (Dako Omnis).** ISH Ethanol Solution, 96% (Dako Omnis) is a ready-to-use reagent. Before loading onto Dako Omnis, open the vial's flip top cap, flick it backward and click it into the cut-out.

The total onboard stability of ISH Ethanol Solution, 96% (Dako Omnis) is **80 hours** when stored in the Reagent Storage Module on Dako Omnis. Onboard time is tracked by the Dako Omnis software. After the run is complete, ISH Ethanol Solution, 96% (Dako Omnis) can be transferred to storage temperature (2–8°C) to preserve onboard stability time.

-
- 5 Load ISH Pepsin (Dako Omnis).** ISH Pepsin (Dako Omnis) is a ready-to-use reagent. Before loading onto Dako Omnis, ensure the reagent is thawed, then open the vial's flip top cap, flick it backward and click it into the cut-out.

The total onboard stability of ISH Pepsin (Dako Omnis) is **80 hours** when stored in the Reagent Storage Module on Dako Omnis. Onboard time is tracked by the Dako Omnis software. After the run is complete, ISH Pepsin (Dako Omnis) can be transferred to storage temperature (–18°C to 8°C) to preserve onboard stability time.

-
- 6 Load CISH Endogenous Enzyme Block (Dako Omnis), Anti-FITC-AP (Dako Omnis), BCIP-NBT Substrate (Dako Omnis), and Nuclear Fast Red (Dako Omnis).** These reagents are supplied in a ready-to-use format. Do not shake the vial of BCIP-NBT Substrate (Dako Omnis) before use. Please refer to [Warnings and Precautions](#). Before loading onto Dako Omnis, open the vial's flip top cap, flick it backwards and click it into the cut-out.

The total onboard stability of CISH Endogenous Enzyme Block (Dako Omnis), Anti-FITC-AP (Dako Omnis), BCIP-NBT Substrate (Dako Omnis), and Nuclear Fast Red (Dako Omnis) is **80 hours** when stored in the Reagent Storage Module on Dako Omnis. Onboard time is tracked by the Dako Omnis software. After the run is complete, vials can be transferred to storage temperature: 2–8°C for CISH Endogenous Enzyme Block (Dako Omnis), Anti-FITC-AP (Dako Omnis) and BCIP-NBT Substrate (Dako Omnis), or 15–30°C for Nuclear Fast Red (Dako Omnis) to preserve onboard stability time.

Table 2 Procedures

- 7 Load additional Dako Omnis accessories.** Load the accessories listed below onboard Dako Omnis as specified in the Dako Omnis User Guide:
- Deionized water
 - Working solution of Wash Buffer, diluted from Wash Buffer (20×) (Dako Omnis), Code GC807
 - Clearify (clearing agent), Code GC810
 - ISH Cleaning Solution (Dako Omnis), Code GC207
 - ISH Lid, Code GC102

Pre-Staining Procedures

- 1 In the Dako Link Omnis Workstation software, assign the protocol to be applied to each slide. Under **CISH protocols** select the appropriate CISH protocol.
- 2 Print slide labels and attach them to the glass slides.
- 3 Place the slides in the Slide Rack. Consult the Dako Omnis Basic User Guide for details. A Slide Rack can hold from one to five slides. To maximize reagent usage, it is recommended that at least two slides are stained in a CISH staining run. A maximum of three Slide Racks may be processed together.
- 4 Load the Slide Rack onto Dako Omnis.
- 5 Load ISH Lid(s) onto Dako Omnis (one ISH Lid per Slide Rack).
- 6 Verify that bulk bottles with fluids are onboard and registered by the Dako Omnis instrument. The required bulk fluids include: Clearify, diluted ISH Pre-Treatment Solution (Dako Omnis), diluted ISH Stringent Wash Buffer (Dako Omnis), diluted Wash Buffer (Dako Omnis), and distilled or deionized water. Preparation of these solutions is described in [Reagent Preparation Procedures](#), above.
- 7 Verify that the Reagent Storage Module has been loaded with vials containing ISH Ethanol Solution, 96% (Dako Omnis), ISH Pepsin (Dako Omnis), CISH Endogenous Enzyme Block (Dako Omnis), Anti-FITC-AP (Dako Omnis), BCIP-NBT Substrate (Dako Omnis), Nuclear Fast Red (Dako Omnis), and the freshly mixed CISH (Dako Omnis) probe. Verify that all flip top vial caps are open. Preparation of these solutions is described in [Reagent Preparation Procedures](#), above.
- 8 Verify that the bulk waste bottles are empty and dispose of waste as needed. Follow all local regulations for disposal of hazardous and non-hazardous waste.
- 9 To start the run, follow the instructions on the Dako Omnis touchscreen and tap *Done* to initiate the staining procedure. You can monitor the progress of the staining protocol on the Dako Link Omnis Workstation. When the run is complete, if no further CISH staining runs are imminent, transfer all reagents to the recommended storage temperatures.

Post-Staining Procedures

- 1 When the staining protocol is complete, remove the slides from the Dry Unloading Station of the Dako Omnis.
- 2 Dehydrate slides by dipping the slides in 70%, 85%, and 100% ethanol for 30 seconds each.
- 3 Clear slides by dipping into fresh xylene for 30 seconds.
- 4 Add non-aqueous permanent mounting medium to sample and apply coverslip. Allow mounting medium to harden.
- 5 View the slides using a light microscope fitted with 4× to 40× objective.
- 6 Store slides at room temperature.

Limitations of the Procedure

Proper storage and handling of reagents and samples are essential for the performance. All laboratory equipment used to prepare the target during this procedure should be calibrated and maintained to ensure accuracy. Incorrect measurement of reagents may affect the outcome of the procedure.



Utilisation prévue L'Anti-FITC-AP CISH Accessory Kit (Dako Omnis) est destiné à la détection des sondes d'hybridation in situ (HIS) marquées à la FITC, à la suite d'une hybridation réalisée sur Dako Omnis avec des échantillons de tissus fixés au formol et inclus en paraffine.

Résumé L'Anti-FITC-AP CISH Accessory Kit (Dako Omnis) contient tous les réactifs nécessaires pour détecter les sondes marquées à l'isothiocyanate de fluorescéine sur Dako Omnis. Après avoir réalisé l'hybridation à l'aide d'une sonde appropriée (non incluse), le CISH Endogenous Enzyme block (K589911-21510) est rajouté pour supprimer l'activité des enzymes endogènes, avant de procéder à l'incubation avec l'Anti-FITC-AP primary antibody (K589911-21511). L'anticorps Anti-FITC-AP se lie aux molécules de FITC présentes sur la sonde et la phosphatase alcaline conjuguée catalyse le dépôt de substrat chromogène BCIP-NBT substrate (K589911-21512). Le résultat est une coloration vive bleu foncé/violette sur les sites de liaison de la sonde. À l'issue de la coloration, les échantillons sont contre-colorés à l'aide de Nuclear Fast Red (K589911-22510). Il est conseillé d'utiliser les sondes CISH Agilent formulées pour être utilisées sur Dako Omnis conjointement avec le kit.

Composants du kit

| Composant | Référence | Quantité | Conservation |
|---|---------------|----------|---------------|
| CISH Endogenous Enzyme block (Dako Omnis) | K589911-21510 | 40 tests | 2 °C à 8 °C |
| Anti-FITC-AP (Dako Omnis) | K589911-21511 | 40 tests | 2 °C à 8 °C |
| BCIP-NBT Substrate (Dako Omnis) | K589911-21512 | 40 tests | 2 °C à 8 °C |
| Nuclear Fast Red (Dako Omnis) | K589911-22510 | 40 tests | 15 °C à 30 °C |

Dans la mesure du possible, conserver les composants d'Anti-FITC-AP CISH Accessory Kit (Dako Omnis) à l'abri de la lumière. Un certificat d'analyse est expédié avec le kit.

Avertissements et précautions

- 1 Pour une utilisation diagnostique in vitro.
- 2 Éviter toute contamination microbienne, cela pourrait entraîner des résultats erronés.
- 3 Tous les échantillons biologiques et les matériels en contact avec ceux-ci doivent être manipulés comme s'ils étaient susceptibles de transmettre une infection et jetés en prenant les précautions appropriées, conformément aux règlements locaux, régionaux et nationaux en vigueur. Consulter les précautions adéquates à prendre contre les agents pathogènes transmissibles par le sang, indiquées par l'établissement ou la réglementation locale. Ne jamais pipetter par la bouche. Éviter tout contact des échantillons avec la peau et les muqueuses.
- 4 Prendre les précautions types lors de l'obtention, de la manipulation et de l'élimination de réactifs potentiellement cancérogènes.
- 5 Prendre des précautions à toutes les étapes de cette procédure pour éviter une contamination croisée entre les échantillons, car cela pourrait produire des résultats erronés.
- 6 Ne pas secouer le flacon de BCIP-NBT Substrate (Dako Omnis) avant l'utilisation. Dans des conditions de conservation normales, le BCIP-NBT Substrate (Dako Omnis) peut former un précipité. La présence de précipité ne doit pas affecter la coloration.
- 7 Si possible, utiliser des gants non poudrés pour minimiser l'introduction de particules de poudre dans l'échantillon ou les matériaux du kit.
- 8 Les composants de l'Anti-FITC-AP CISH Accessory Kit (Dako Omnis) sont stables pendant 80 heures lorsqu'ils sont conservés dans le Reagent Storage Module chargé sur l'instrument Dako Omnis. La durée sur l'instrument est suivie par le logiciel Dako Omnis. Lorsque le cycle Omnis est terminé, amener immédiatement les composants du kit à leurs conditions de conservation recommandées afin de préserver la durée de stabilité sur l'instrument.
- 9 Il a été démontré que la performance des composants de l'Anti-FITC-AP CISH Accessory Kit (Dako Omnis) n'était pas altérée après un maximum de 20 transferts depuis les conditions de conservation recommandées vers le Reagent Storage Module chargé sur l'instrument Dako Omnis.
- 10 L'interprétation clinique des résultats de tests doit être évaluée par du personnel qualifié en tenant compte des antécédents médicaux du patient et des autres résultats de tests diagnostiques de laboratoire.
- 11 L'utilisation de lames de contrôle est recommandée.

| | |
|--|---|
| Utilisation de lames de contrôle | Il est recommandé d'analyser des lames de contrôle parallèlement aux lames du patient, en utilisant le même protocole, pour contrôler les performances du dosage et évaluer la précision du nombre de signaux. |
| Informations sur la sécurité | Des Fiches techniques de sécurité (MSDS) sont disponibles pour les composants du kit sur www.agilent.com . |
| Indications d'instabilité ou de détérioration | Inspecter l'emballage à l'arrivée. Si l'étiquette de garantie d'inviolabilité est ouverte au niveau des perforations, ne pas utiliser le contenu de l'emballage. La fonctionnalité du produit est garantie jusqu'à la date de péremption indiquée. Il n'existe toutefois pas de signes visibles indiquant l'instabilité ou la détérioration de ce produit susceptible de s'être produite au cours d'une mauvaise manipulation ou du transport. Il est donc important de procéder aux contrôles appropriés conjointement avec les échantillons à analyser. Pour joindre le service clientèle ou l'assistance technique, contacter Agilent Genomics. |
| Matériels requis mais non fournis | <p>La procédure décrite dans le présent document utilise les matériaux supplémentaires suivants. Consulter les instructions d'utilisation de chaque dispositif pour de plus amples informations.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Dako Omnis advanced staining system platform ; Dako Code GI100 • Dako Omnis Mixing Device ; Dako p/n GC11630 • Agilent CISH probe (Dako Omnis) • ISH Lid, for Dako Omnis ; Dako p/n GC10230 • ISH Ethanol Solution, 96 % (Dako Omnis) ; Dako p/n GM30011-2 (ready-to-use) • ISH Pre-Treatment Solution (20×) (Dako Omnis) ; Dako Code GM30111-2 • ISH Pepsin (Dako Omnis) ; Dako p/n GM30211-2 (ready-to-use) • ISH Stringent Wash Buffer (20×) (Dako Omnis) ; Dako p/n GM30311-2 • Clarify (clearing agent) ; Dako p/n GC81030-2 • Wash Buffer (20×) (Dako Omnis) ; Dako p/n GC80711-2 • ISH Cleaning Solution (Dako Omnis) ; Dako p/n GC20730-2 (ready-to-use) • Microscope optique (grossissement de 4x à 40x) • Milieu de montage permanent et réactifs secondaires requis pour le montage des lamelles de protection • Lamelles de protection en verre pour le montage (24 mm x 50 mm) |
| Procédure relative au flux de travail | <p>L'Anti-FITC-AP CISH Accessory Kit (Dako Omnis) a été conçu pour être utilisé sur l'instrument Dako Omnis conjointement avec les sondes CISH Agilent. La procédure de coloration CISH automatique sur Dako Omnis inclut : 1) le prétraitement des échantillons : déparaffinage des coupes de tissus, démasquage des cibles et digestion par la pepsine ; 2) l'hybridation des sondes : dénaturation, hybridation et lavage stringent ; 3) la conversion chromogénique de la sonde liée : blocage des enzymes, liaison de l'anticorps, ajout de chromogène et contre-coloration nucléaire.</p> <p>Le protocole CISH est préprogrammé dans le logiciel Dako Omnis. Se reporter au Dako Omnis Basic User Guide pour obtenir des instructions détaillées sur la préparation de l'instrument pour la coloration et au Dako Omnis Advanced User Guide pour obtenir des instructions détaillées sur les protocoles.</p> <p>Le paramétrage des étapes du protocole dépend de la sonde CISH. Consulter la notice de chaque sonde CISH Agilent.</p> |

Tableau 1 Aperçu simplifié des protocoles de coloration automatique pour les sondes CISH Agilent exécutés sur Dako Omnis

| Étape | Réactif | Durée et température |
|-------------------------|---|----------------------|
| Déparaffinage | Clarify | 10 minutes |
| Restauration des cibles | ISH Pre-Treatment Solution (Dako Omnis) | 3 minutes*, à 70 °C* |
| Lavage | ISH Ethanol Solution, 96 % (Dako Omnis) | 2 × 3 minutes |
| Digestion | ISH Pepsin (Dako Omnis) | 15 minutes* |
| Séchage | — | 15 minutes, à 45 °C |
| Dénaturation | — | 10 minutes, à 66 °C |
| Hybridation | Sonde CISH (Dako Omnis) | 60 minutes, à 45 °C |

Tableau 1 Aperçu simplifié des protocoles de coloration automatique pour les sondes CISH Agilent exécutés sur Dako Omnis

| | | |
|-------------------------------|---|----------------------|
| Lavage stringent | ISH Stringent Wash Buffer (Dako Omnis) | 3 minutes*, à 55 °C* |
| Blocage des enzymes endogènes | CISH Endogenous Enzyme Block (Dako Omnis) | 3 minutes* |
| Liaison de l'anticorps | Anti-FITC-AP (Dako Omnis) | 30 minutes* |
| Ajout de substrat chromogène | BCIP-NBT Substrate (Dako Omnis) | 2 × 20 minutes* |
| Contre-coloration | Nuclear Fast Red (Dako Omnis) | 10 minutes* |

* Étape personnalisable

Le [Tableau 2](#) décrit les procédures d'utilisation des sondes CISH (Dako Omnis) avec les protocoles de coloration automatique Dako Omnis. Consulter les Dako Omnis User Guides pour obtenir des instructions sur le chargement des lames, les couvercles HIS et les réactifs.

Tableau 2 Procédures

Procédures de préparation des réactifs

1 Préparer la sonde CISH (Dako Omnis). Le flacon fourni contient une bille magnétique plaqué or qui sert au mélange. Avant de charger le flacon sur Dako Omnis, le réactif doit être décongelé et soigneusement mélangé car ses phases se séparent lors de la congélation.

Utiliser le Dako Omnis Mixing Device pour mélanger le contenu de la sonde, en suivant la description ci-dessous. Consulter le Mixing Device User Guide pour plus d'informations. Veiller à toujours mélanger le contenu du flacon de la sonde CISH (Dako Omnis) juste avant son chargement sur l'instrument. Ne pas secouer le flacon.

- Retirer le flacon de sonde CISH (Dako Omnis) du congélateur et le placer sur le Dako Omnis Mixing Device.
- Brancher le Mixing Device et s'assurer que le voyant d'état vert est allumé. Sélectionner le programme *Thaw + Mix* pour démarrer le mélange du contenu du flacon.
- Après la phase de *Thaw + Mix*, retirer le flacon de sonde du Mixing Device.
- Une fois décongelé et mélangé, maintenir le flacon en position verticale afin d'éviter que la solution de la sonde ne se dépose sur le capuchon du flacon.
- Ouvrir le bouchon à charnière, le pousser vers l'arrière et l'enclencher dans l'encoche (consulter le Dako Omnis Basic User Guide pour plus d'informations).
- Charger immédiatement le flacon sur le Reagent Storage Module de l'instrument Dako Omnis. Si la fonction de chargement du réactif en continu est utilisée au cours du cycle de coloration, s'assurer que le temps entre le mélange et l'aspiration du flacon sur l'instrument Dako Omnis est d'au moins 10 minutes.
- Une fois le cycle terminé, amener immédiatement la sonde CISH (Dako Omnis) à une température de stockage entre –25 °C et –15 °C.

REMARQUE : si le flacon est utilisé immédiatement après sa réception dans de la neige carbonique, décongeler le flacon avant de le placer sur le Mixing Device, puis utiliser le programme *Mix only* pour mélanger le contenu du flacon (ne pas utiliser le programme *Thaw + Mix*).

2 Préparer l'ISH Pre-Treatment Solution. Préparer une solution de travail en diluant au 1/20e l'ISH Pre-Treatment Solution (20x) (Dako Omnis) comme suit :

- Remplir une bouteille à gros volume Dako Omnis de 3,5 L, portant la mention PTB (étiquette bleue, code GC109), jusqu'à la ligne de remplissage avec de l'eau déionisée (3,325 L). Veiller à bien placer la bouteille à gros volume sur une surface horizontale avant le remplissage.
- Vider un flacon de 175 mL de concentré d'ISH Pre-Treatment Solution (20x) (Dako Omnis) dans la bouteille à gros volume. Ce concentré contient un agent antimicrobien et une teinte verte inerte pour en faciliter l'identification.
- Transférer l'étiquette détachable depuis le flacon de concentré sur la bouteille à gros volume. Fermer le couvercle de la bouteille à gros volume et la retourner délicatement deux à trois fois.
- Utiliser le lecteur portatif de code à barres Dako Omnis pour identifier le réactif (scanner l'étiquette détachable et la bouteille à gros volume).
- Charger immédiatement la bouteille à gros volume sur l'instrument Dako Omnis.

Une fois chargée et stockée sur Dako Omnis, la solution diluée peut être utilisée pendant sept jours. La durée sur l'instrument est suivie par le logiciel Dako Omnis. La solution diluée inutilisée peut être conservée entre 2 et 8 °C pendant 30 jours. Après sortie du réfrigérateur, s'assurer que la solution diluée est équilibrée à au moins 18 °C avant le chargement sur Dako Omnis.

REMARQUE : jeter la solution diluée si elle semble trouble.

Tableau 2 Procédures

3 Préparer l'ISH Stringent Wash Buffer. Préparer une solution de travail en diluant au 1/20e l'ISH Stringent Wash Buffer (20x) (Dako Omnis) comme suit :

- Remplir une bouteille à gros volume Dako Omnis de 3,5 L, portant la mention PTB (étiquette bleue, code GC109), jusqu'à la ligne de remplissage avec de l'eau déionisée (3,325 L). Veiller à bien placer la bouteille à gros volume sur une surface horizontale avant le remplissage.
- Vider un flacon de 175 mL de concentré d'ISH Stringent Wash Buffer (20x) (Dako Omnis) dans la bouteille à gros volume. Ce concentré contient un agent antimicrobien, un détergent et une teinte jaune inerte pour en faciliter l'identification.
- Transférer l'étiquette détachable depuis le flacon de concentré sur la bouteille à gros volume. Fermer le couvercle de la bouteille à gros volume et la retourner délicatement deux à trois fois.
- Utiliser le lecteur portatif de code à barres Dako Omnis pour identifier le réactif (scanner l'étiquette détachable et la bouteille à gros volume).
- Charger immédiatement la bouteille à gros volume sur l'instrument Dako Omnis.

Une fois chargée et stockée sur Dako Omnis, la solution diluée peut être utilisée pendant sept jours. La durée sur l'instrument est suivie par le logiciel Dako Omnis. La solution diluée inutilisée peut être conservée entre 2 et 8 °C pendant 30 jours. Après sortie du réfrigérateur, s'assurer que la solution diluée est équilibrée à au moins 18 °C avant le chargement sur Dako Omnis.

REMARQUE: jeter la solution diluée si elle semble trouble.

4 Charger l'ISH Ethanol Solution, 96 % (Dako Omnis). L'ISH Ethanol Solution, 96 % (Dako Omnis) est un réactif prêt à l'emploi. Avant le chargement sur Dako Omnis, ouvrir le bouchon à charnière du flacon, le pousser vers l'arrière et l'enclencher dans l'encoche.

La stabilité totale de l'ISH Ethanol Solution, 96 % (Dako Omnis) sur l'instrument est de **80 heures** lorsque cette solution est conservée dans le Reagent Storage Module du Dako Omnis. La durée sur l'instrument est suivie par le logiciel Dako Omnis. Une fois le cycle terminé, l'ISH Ethanol Solution, 96 % (Dako Omnis) peut être amenée à une température de stockage (entre 2 et 8 °C) afin de préserver la durée de stabilité sur l'instrument.

5 Charger l'ISH Pepsin (Dako Omnis). La solution ISH Pepsin (Dako Omnis) est un réactif prêt à l'emploi. Avant le chargement sur Dako Omnis, s'assurer que le réactif est décongelé et ouvrir le bouchon à charnière du flacon, le pousser vers l'arrière et l'enclencher dans l'encoche.

La stabilité totale de l'ISH Pepsin (Dako Omnis) sur l'instrument est de **80 heures** lorsque cette solution est conservée dans le Reagent Storage Module du Dako Omnis. La durée sur l'instrument est suivie par le logiciel Dako Omnis. Une fois le cycle terminé, l'ISH Pepsin (Dako Omnis) peut être amenée à une température de stockage (entre -18 et 8 °C) afin de préserver la durée de stabilité sur l'instrument.

6 Charger CISH Endogenous Enzyme Block (Dako Omnis), Anti-FITC-AP (Dako Omnis), BCIP-NBT Substrate (Dako Omnis) et Nuclear Fast Red (Dako Omnis). Ces réactifs sont fournis prêts à l'emploi. Ne pas secouer le flacon de BCIP-NBT Substrate (Dako Omnis) avant l'utilisation. Se reporter à la section [Avertissements et précautions](#). Avant le chargement sur Dako Omnis, ouvrir le bouchon à charnière du flacon, le pousser vers l'arrière et l'enclencher dans l'encoche.

La stabilité totale de CISH Endogenous Enzyme Block (Dako Omnis), Anti-FITC-AP (Dako Omnis), BCIP-NBT Substrate (Dako Omnis) et Nuclear Fast Red (Dako Omnis) sur l'instrument est de 80 heures lorsque ces réactifs sont conservés dans le Reagent Storage Module du Dako Omnis. La durée sur l'instrument est suivie par le logiciel Dako Omnis. Une fois le cycle terminé, les flacons peuvent être amenés à une température de stockage : entre 2 et 8 °C pour CISH Endogenous Enzyme Block (Dako Omnis), Anti-FITC-AP (Dako Omnis) et BCIP-NBT Substrate (Dako Omnis) ou entre 15 et 30 °C pour Nuclear Fast Red (Dako Omnis) afin de préserver la durée de stabilité sur l'instrument.

7 Charger des accessoires Dako Omnis supplémentaires. Charger les accessoires indiqués ci-dessous sur Dako Omnis, en suivant les instructions spécifiées dans le Dako Omnis User Guide :

- Eau déionisée
- Solution de travail du Wash Buffer, diluée à partir du Wash Buffer (20x) (Dako Omnis), Code GC807
- Clearify (agent clarifiant), Code GC810
- ISH Cleaning Solution (Dako Omnis), Code GC207
- ISH Lid, Code GC102

Procédures de précoloration

1 Choisir le protocole à appliquer à chaque lame à partir du logiciel de la Dako Link Omnis Workstation. Sous **CISH protocols** sélectionner le protocole CISH adéquat.

2 Imprimer les étiquettes des lames et les apposer sur les lames de verre.

3 Placer les lames dans le Slide Rack. Consulter le Dako Omnis Basic User Guide pour plus d'informations. Un Slide Rack peut contenir une à cinq lames. Afin d'optimiser l'utilisation des réactifs, il est recommandé de colorer au moins deux lames lors d'un cycle de coloration CISH. Trois Slide Racks maximum peuvent être traités conjointement.

Tableau 2 Procédures

- 4 Charger le Slide Rack sur Dako Omnis.
- 5 Charger l'ISH Lid(s) sur Dako Omnis (un ISH Lid par Slide Rack).
- 6 Vérifier que les bouteilles de liquide en gros volume sont chargées et enregistrées par l'instrument Dako Omnis. Les liquides de rinçage requis incluent : Clearify, solution diluée ISH Pre-Treatment Solution (Dako Omnis), solution diluée ISH Stringent Wash Buffer (Dako Omnis), solution diluée Wash Buffer (Dako Omnis) ainsi que de l'eau distillée ou déionisée. La préparation de ces solutions est décrite dans la rubrique [Procédures de préparation des réactifs](#), ci-dessus.
- 7 Vérifier que le Reagent Storage Module a été chargé de flacons contenant les solutions ISH Ethanol Solution, 96 % (Dako Omnis), ISH Pepsin (Dako Omnis), CISH Endogenous Enzyme Block (Dako Omnis), Anti-FITC-AP (Dako Omnis), BCIP-NBT Substrate (Dako Omnis), Nuclear Fast Red (Dako Omnis) et la sonde CISH (Dako Omnis) qui vient d'être mélangée. Vérifier que tous les bouchons à charnière sont ouverts. La préparation de ces solutions est décrite dans la rubrique [Procédures de préparation des réactifs](#), ci-dessus.
- 8 Vérifier que les bouteilles à déchets sont vides et éliminer les déchets le cas échéant. Respecter tous les règlements locaux en matière d'élimination des déchets dangereux et non-dangereux.
- 9 Pour lancer le cycle, suivre les instructions qui apparaissent sur l'écran tactile de Dako Omnis et appuyer sur *Done* pour lancer la procédure de coloration. Vous pouvez contrôler la progression du protocole de coloration sur la Dako Link Omnis Workstation. Lorsque le cycle est terminé, si aucune autre coloration CISH n'est prévue dans l'immédiat, rétablir la température de conservation recommandée pour tous les réactifs.

Procédures de postcoloration

- 1 Lorsque le protocole de coloration est terminé, retirer les lames de la Dry Unloading Station de Dako Omnis.
- 2 Déshydrater les lames en plongeant chacune d'entre elles dans de l'éthanol à 70 %, à 85 % et à 100 % pendant 30 secondes.
- 3 Rincer les lames en les plongeant dans du xylène fraîchement renouvelé pendant 30 secondes.
- 4 Ajouter un milieu de montage permanent non aqueux à l'échantillon et appliquer la lamelle de protection. Laisser durcir le milieu de montage.
- 5 Examiner les lames à l'aide d'un microscope optique avec grossissement de 4× à 40×.
- 6 Conserver les lames à température ambiante.

Limites de la procédure

De bonnes pratiques de conservation et de manipulation des réactifs et des échantillons sont essentielles pour garantir leur performance. Tous les équipements de laboratoire utilisés pour préparer la cible au cours de cette procédure doivent être étalonnés et entretenus pour assurer leur précision. Une mesure incorrecte des réactifs peut altérer le résultat de la procédure.

Deutsch



Verwendungszweck

Das Anti-FITC-AP CISH Accessory Kit (Dako Omnis) ist für die Erkennung von FITC-markierten Sonden bei der In-situ Hybridisierung (ISH) im Anschluss an die Hybridisierung der formalinfixierten, paraffineingebetteten Gewebeproben im Dako Omnis Gerät gedacht.

Zusammenfassung

Das Anti-FITC-AP CISH Accessory Kit (Dako Omnis) enthält alle notwendigen Reagenzien für die Erkennung von FITC-markierten Sonden im Dako Omnis Gerät. Im Anschluss an die Hybridisierung mit einer geeigneten Sonde (nicht enthalten) wird der CISH Endogenous Enzyme Block (K589911-21510) hinzugefügt, um die endogene Enzymaktivität zu unterdrücken; anschließend erfolgt die Inkubation mit dem Anti-FITC-AP Primary Antibody (K589911-21511). Der Anti-FITC-AP Antikörper bindet an die FITC-Moleküle an der Sonde, wobei die konjugierte alkalische Phosphatase als Katalysator für die Ablagerung des BCIP-NBT Substrate Chromogens (K589911-21512) agiert. Das Ergebnis ist eine deutliche dunkelblaue/violette Färbung an den Stellen, an denen die Sonde gebunden ist. Im Anschluss an die Färbung werden die Proben mit Nuclear Fast Red (K589911-22510) gegengefärbt. Es wird empfohlen, die Agilent CISH-Sonden, die für die Verwendung im Dako Omnis formuliert wurden, zusammen mit dem Kit zu verwenden.

Kit-Komponenten

| Komponente | Teile-Nr. | Menge | Lagerung |
|---|---------------|----------|-----------------|
| CISH Endogenous Enzyme Block (Dako Omnis) | K589911-21510 | 40 Tests | 2 °C bis 8 °C |
| Anti-FITC-AP (Dako Omnis) | K589911-21511 | 40 Tests | 2 °C bis 8 °C |
| BCIP-NBT Substrate (Dako Omnis) | K589911-21512 | 40 Tests | 2 °C bis 8 °C |
| Nuclear Fast Red (Dako Omnis) | K589911-22510 | 40 Tests | 15 °C bis 30 °C |

Die Komponenten des Anti-FITC-AP CISH Accessory Kit (Dako Omnis) nach Möglichkeit immer vor Licht schützen. Ein Analysezertifikat wird mit dem Kit geliefert.

Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

- 1 Zur In-vitro-Diagnostik.
- 2 Mikrobielle Verunreinigung vermeiden, da diese zu inkorrekten Ergebnissen führen kann.
- 3 Mit allen biologischen Proben und allen Materialien, die damit in Berührung kommen, ist so umzugehen, als könnten sie Krankheiten übertragen. Bei der Entsorgung sind angemessene Vorsichtsmaßnahmen sowie kommunale, einzel- bzw. bundesstaatliche Richtlinien zu beachten. Es sind die jeweiligen Vorsichtsmaßnahmen für durch Blut übertragene Krankheitserreger zu beachten, die durch Ihre Einrichtung oder lokale Vorschriften vorgegeben sind. Niemals mit dem Mund pipettieren. Haut- und Schleimhautkontakt mit Proben vermeiden.
- 4 Bei der Entgegennahme, der Handhabung und der Entsorgung von potenziell krebserregenden Reagenzien sind die Standard-Vorsichtsmaßnahmen anzuwenden.
- 5 Bei allen Schritten dieses Vorgangs vorsichtig vorgehen, um eine Kreuzkontamination der Proben zu vermeiden, da dies zu inkorrekten Ergebnissen führen kann.
- 6 Das Fläschchen mit BCIP-NBT Substrate (Dako Omnis) nicht vor der Verwendung schütteln. BCIP-NBT Substrate (Dako Omnis) kann bei den empfohlenen Lagerbedingungen ein Präzipitat bilden. Das Vorhandensein des Präzipitats sollte die Qualität der Färbung nicht beeinträchtigen.
- 7 Nach Möglichkeit immer puderfreie Handschuhe verwenden, damit keine Puderpartikel in die Proben- oder Kit-Materialien gelangen.
- 8 Die Stabilität der Komponenten des Anti-FITC-AP CISH Accessory Kit (Dako Omnis) beträgt 80 Stunden bei Aufbewahrung im Reagent Storage Module des Dako Omnis Geräts. Die Zeitdauer im Gerät wird durch die Dako Omnis Software erfasst. Wenn der Omnis-Durchlauf komplett ist, müssen die Kit-Komponenten sofort bei den empfohlenen Lagerungsbedingungen aufbewahrt werden, um die Stabilitätszeit im Gerät zu erhalten.
- 9 Die Leistung der Kit-Komponenten des Anti-FITC-AP CISH Accessory Kit (Dako Omnis) wird nachweislich durch bis zu 20 Wechsel von der Aufbewahrung unter den empfohlenen Lagerungsbedingungen zum Reagent Storage Module des Dako Omnis Geräts nicht beeinträchtigt.
- 10 Die klinische Auswertung und Interpretation der Testergebnisse muss von qualifiziertem Personal unter Berücksichtigung der Krankengeschichte des Patienten und anderer Diagnostik-Labortests vorgenommen werden.
- 11 Die Verwendung von Kontrollobjektträgern wird empfohlen.

Verwendung von Kontrollobjektträgern

Es wird empfohlen, Kontrollobjektträger und Patientenobjektträger gleichzeitig zu untersuchen, um die Leistung des Assay zu beobachten und die Genauigkeit der Auszählung der Signale zu bewerten.

Sicherheitsinfor- mationen

Sicherheitsdatenblätter (SDS) für die Kit-Komponenten sind unter www.agilent.com verfügbar.

Hinweise auf Instabilität oder Produktzerfall

Verpackung beim Eingang überprüfen. Wenn das manipulationssichere Etikett an den Perforierungen geöffnet ist, den Packungsinhalt nicht verwenden. Die Funktionalität des Produkts wird bis zum Haltbarkeitsdatum auf dem Etikett gewährleistet. Es gibt jedoch keine offensichtlichen Anzeichen für eine Produktinstabilität oder -verschlechterung, die eventuell durch unsachgemäße Handhabung oder während des Versands aufgetreten sein kann. Daher ist es wichtig, zusammen mit den zu prüfenden Proben geeignete Kontrollproben laufen zu lassen. Für Kundendienst und technischen Support ist Agilent Genomics zu kontaktieren.

Benötigte, nicht mitgelieferte Materialien

Die in diesem Dokument beschriebenen Verfahren verwenden die folgenden Zusatzmaterialien. Bitte die Gebrauchsanweisung für jedes Produkt für weitere Informationen beachten.

- Dako Omnis Advanced Staining System Platform; Dako Code GI100
- Dako Omnis Mixing Device; Dako p/n GC11630
- Agilent CISH Probe (Dako Omnis)
- ISH Lid, für Dako Omnis; Dako p/n GC10230
- ISH Ethanol Solution, 96 % (Dako Omnis); Dako p/n GM30011-2 (ready to use)
- ISH Pre-Treatment Solution (20×) (Dako Omnis); Dako Code GM30111-2
- ISH Pepsin (Dako Omnis); Dako p/n GM30211-2 (ready to use)
- ISH Stringent Wash Buffer (20×) (Dako Omnis); Dako p/n GM30311-2
- Clarify (Intermedium); Dako p/n GC81030-2
- Wash Buffer (20×) (Dako Omnis); Dako p/n GC80711-2
- ISH Cleaning Solution (Dako Omnis); Dako p/n GC20730-2 (ready to use)
- Lichtmikroskop (Objektvergrößerung 4- bis 40-fach)
- Permanentes Eindeckmedium und für die Eindeckung von Deckgläsern erforderliche Hilfsreagenzien
- Deckgläser für die Eindeckung (24 mm x 50 mm)

Arbeitsablauf

Das Anti-FITC-AP CISH Accessory Kit (Dako Omnis) wurde zur Verwendung im Dako Omnis Gerät in Kombination mit Agilent CISH Sonden entwickelt. Das automatische CISH-Färbeverfahren auf dem Dako Omnis umfasst 1) Probenvorbehandlung: Entparaffinierung von Gewebeschnitten, Demaskierung und Pepsinandaunung; 2) Sondenhybridisierung: Denaturierung, Hybridisierung und stringentes Waschen; 3) chromogene Konvertierung der gebundenen Sonde: Enzymblockierung, Antikörper-Bindung, Chromogen-Zugabe und nukleare Gegenfärbung.

Das CISH-Protokoll ist in der Dako Omnis Software vorprogrammiert. Detaillierte Anweisungen zur Vorbereitung des Geräts für die Färbung sind dem Dako Omnis Basic User Guide zu entnehmen; detaillierte Anweisungen zu Protokollen sind dem Dako Omnis Advanced User Guide zu entnehmen.

Die Einstellungen für die Protokollschritte sind von der CISH-Sonde abhängig. Angaben sind der Packungsbeilage der jeweiligen Agilent CISH-Sonde zu entnehmen.

Tabelle 1 Vereinfachte Übersicht über die automatisierten Färbeprotokolle für Agilent CISH-Sonden im Dako Omnis Gerät

| Schritt | Reagenz | Zeit und Temperatur |
|----------------------|---|---------------------|
| Wachsentfernung | Clarify | 10 Minuten |
| Demaskierung | ISH Pre-Treatment Solution (Dako Omnis) | 3 Minuten*, 70 °C* |
| Waschen | ISH Ethanol Solution, 96 % (Dako Omnis) | 2 × 3 Minuten |
| Andauung | ISH Pepsin (Dako Omnis) | 15 Minuten* |
| Trockengang | – | 15 Minuten, 45 °C |
| Denaturierung | – | 10 Minuten, 66 °C |
| Hybridisierung | CISH-Sonde (Dako Omnis) | 60 Minuten, 45 °C |
| Stringenzwaschung | ISH Stringent Wash Buffer (Dako Omnis) | 3 Minuten*, 55 °C* |
| Endogener Enzymblock | CISH Endogenous Enzyme Block (Dako Omnis) | 3 Minuten* |
| Antikörper-Bindung | Anti-FITC-AP (Dako Omnis) | 30 Minuten* |
| Chromogen-Zugabe | BCIP-NBT Substrate (Dako Omnis) | 2 × 20 Minuten* |
| Gegenfärbung | Nuclear Fast Red (Dako Omnis) | 10 Minuten* |

* Schritt ist benutzerdefinierbar

Tabelle 2 beschreibt die Verfahren für die Anwendung der CISH-Sonden (Dako Omnis) mit den automatisierten Dako Omnis Färbeprotokollen. Anweisungen zum Laden von Objektträgern, ISH Lids und Reagenzien siehe Dako Omnis User Guides.

Tabelle 2 Verfahren

Verfahren zur Vorbereitung der Reagenzien

1 Vorbereitung der CISH-Sonde (Dako Omnis). Das mitgelieferte Fläschchen enthält ein goldbeschichtetes magnetisches Kügelchen für das Mischen. Bevor das Fläschchen in das Dako Omnis Gerät geladen werden kann, muss das Reagenz aufgetaut und gründlich gemischt werden, da beim Einfrieren eine Phasentrennung stattfindet.

Für das Mischen der Sonde dient das Dako Omnis Mixing Device, wie unten beschrieben. Für weitere Einzelheiten im Mixing Device User Guide nachlesen. Der Fläschcheninhalt der CISH-Sonde (Dako Omnis) muss immer kurz vor dem Laden ins Gerät gemischt werden. Das Fläschchen nicht schütteln.

- Das Sondenfläschchen mit der CISH-Sonde (Dako Omnis) aus dem Gefrierschrank entnehmen und in das Dako Omnis Mixing Device laden.
- Das Mixing Device anschließen und darauf achten, dass die grüne Statusleuchte leuchtet. Das Programm *Thaw + Mix* (Auftauen und Mischen) auswählen, um mit dem Mischen des Fläschcheninhalts zu beginnen.
- Nach Beendigung des Programms *Thaw + Mix* (Auftauen und Mischen) das Sondenfläschchen aus dem Mixing Device nehmen.
- Aufgetaut und gemischt sollte das Fläschchen in der aufrechten Position stehen, damit sich keine Sondenlösung im Deckel sammelt.
- Den Klappdeckel nach hinten klappen und im ausgesparten Bereich einrasten (siehe Dako Omnis Basic User Guide für Einzelheiten).
- Das Fläschchen dann umgehend in das Reagent Storage Module des Dako Omnis Geräts laden. Wenn während des Färbelaufs die Funktion für das kontinuierliche Laden von Reagenzien verwendet wird, muss die Zeit zwischen Mischen und Aspiration des Fläschchen im Dako Omnis mindestens 10 Minuten betragen.
- Nach dem Durchlauf muss die CISH-Sonde (Dako Omnis) sofort bei -25 °C bis -15 °C gelagert werden.

HINWEIS: Wenn das Fläschchen unmittelbar nach Erhalt auf Trockeneis verwendet werden soll, muss es vor dem Laden in das Mixing Device aufgetaut werden, dann muss das Programm *Mix only* (Nur mischen) verwendet werden, um die Fläschcheninhalte zu mischen (nicht das Programm *Thaw + Mix* (Auftauen und Mischen) verwenden).

2 Vorbereitung der ISH Pre-Treatment Solution. Eine Arbeitslösung durch Verdünnen der ISH Pre-Treatment Solution (20×) (Dako Omnis) im Verhältnis 1:20 wie folgt zubereiten:

- Eine Dako Omnis 3,5-l-Spülflasche mit PTB-Kennzeichnung (blaues Etikett Code-Nr. GC109) bis zur Fülllinie mit entionisiertem Wasser füllen (3,325 Liter). Dabei muss die Spülflasche auf eine gerade Oberfläche gestellt werden, bevor sie gefüllt wird.
- Eine 175-ml-Flasche mit konzentrierter ISH Pre-Treatment Solution (20x) (Dako Omnis) in die Spülflasche leeren. Das Konzentrat enthält einen antimikrobiellen Wirkstoff und einen inerten grünen Farbstoff, damit es einfacher erkennbar ist.
- Das abnehmbare Etikett von der Konzentratflasche auf die Spülflasche kleben. Den Deckel der Spülflasche festdrehen und die Spülflasche vorsichtig 2 bis 3 Mal umdrehen.
- Mit dem tragbaren Dako Omnis Barcode-Lesegerät das Reagenz ermitteln (das abnehmbare Etikett und die Spülflasche scannen).
- Die Spülflasche sofort in das Dako Omnis Gerät laden.

Die verdünnte Lösung ist 7 Tage lang verwendbar, wenn sie im Dako Omnis aufbewahrt wird. Die Zeitdauer im Gerät wird durch die Dako Omnis Software erfasst. Unverbrauchte verdünnte Lösung kann bei $2-8\text{ °C}$ 30 Tage lang aufbewahrt werden. Nach der Kaltlagerung muss die verdünnte Lösung mindestens auf 18 °C äquilibriert werden, bevor sie in das Dako Omnis geladen werden kann.

HINWEIS: Getrübe verdünnte Lösung entsorgen.

3 ISH Stringent Wash Buffer zubereiten. Eine Arbeitslösung durch Verdünnen des konzentrierten ISH Stringent Wash Buffer (20×) (Dako Omnis) im Verhältnis 1:20 wie folgt zubereiten:

- Eine Dako Omnis 3,5-l-Spülflasche mit PTB-Kennzeichnung (blaues Etikett Code-Nr. GC109) bis zur Fülllinie mit entionisiertem Wasser füllen (3,325 Liter). Dabei muss die Spülflasche auf eine gerade Oberfläche gestellt werden, bevor sie gefüllt wird.
- Eine 175-ml-Flasche mit konzentriertem ISH Stringent Wash Buffer (20x) (Dako Omnis) in die Spülflasche leeren. Das Konzentrat enthält einen antimikrobiellen Wirkstoff, ein Reinigungsmittel und einen inerten gelben Farbstoff, damit es einfacher erkennbar ist.
- Das abnehmbare Etikett von der Konzentratflasche auf die Spülflasche kleben. Den Deckel der Spülflasche festdrehen und die Spülflasche vorsichtig 2 bis 3 Mal umdrehen.
- Mit dem tragbaren Dako Omnis Barcode-Lesegerät das Reagenz ermitteln (das abnehmbare Etikett und die Spülflasche scannen).
- Die Spülflasche sofort in das Dako Omnis Gerät laden.

Die verdünnte Lösung ist 7 Tage lang verwendbar, wenn sie im Dako Omnis aufbewahrt wird. Die Zeitdauer im Gerät wird durch die Dako Omnis Software erfasst. Unverbrauchte verdünnte Lösung kann bei $2-8\text{ °C}$ 30 Tage lang aufbewahrt werden. Nach der Kaltlagerung muss die verdünnte Lösung mindestens auf 18 °C äquilibriert werden, bevor sie in das Dako Omnis geladen werden kann.

HINWEIS: Getrübe verdünnte Lösung entsorgen.

Tabelle 2 Verfahren

-
- 4 ISH Ethanol Solution, 96 % (Dako Omnis) laden.** ISH Ethanol Solution, 96 % (Dako Omnis) ist ein gebrauchsfertiges Reagenz. Den Klappdeckel des Fläschchens nach hinten klappen und im ausgesparten Bereich einrasten, bevor es in das Dako Omnis geladen wird.
- Die Stabilität von ISH Ethanol Solution, 96 % (Dako Omnis) beträgt im Gerät insgesamt **80 Stunden** bei Aufbewahrung im Reagent Storage Module des Dako Omnis. Die Zeitdauer im Gerät wird durch die Dako Omnis Software erfasst. Nach dem Durchlauf kann die ISH Ethanol Solution, 96 % (Dako Omnis) auf Lagertemperatur (2–8 °C) gebracht werden, damit die Stabilität im Gerät gewährleistet ist.
-
- 5 ISH Pepsin (Dako Omnis) laden.** ISH Pepsin (Dako Omnis) ist ein gebrauchsfertiges Reagenz. Reagenz zuerst auftauen und den Deckel des Fläschchens nach hinten klappen und im ausgesparten Bereich einrasten, bevor es in das Dako Omnis geladen wird.
- Die Stabilität von ISH Pepsin (Dako Omnis) beträgt im Gerät insgesamt **80 Stunden** bei Aufbewahrung im Reagent Storage Module des Dako Omnis. Die Zeitdauer im Gerät wird durch die Dako Omnis Software erfasst. Nach dem Durchlauf kann das ISH Pepsin (Dako Omnis) auf Lagertemperatur (-18 °C bis 8 °C) gebracht werden, damit die Stabilität im Gerät gewährleistet ist.
-
- 6 CISH Endogenous Enzyme Block (Dako Omnis), Anti-FITC-AP (Dako Omnis), BCIP-NBT Substrate (Dako Omnis) und Nuclear Fast Red (Dako Omnis) laden.** Diese Reagenzien werden in gebrauchsfertiger Form bereitgestellt. Das Fläschchen mit BCIP-NBT Substrate (Dako Omnis) nicht vor der Verwendung schütteln. Weitere Informationen sind im Abschnitt [Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen](#) zu finden. Den Klappdeckel des Fläschchens nach hinten klappen und im ausgesparten Bereich einrasten, bevor es in das Dako Omnis geladen wird.
- Die Stabilität von CISH Endogenous Enzyme Block (Dako Omnis), Anti-FITC-AP (Dako Omnis), BCIP-NBT Substrate (Dako Omnis) und Nuclear Fast Red (Dako Omnis) beträgt im Gerät insgesamt 80 Stunden bei Aufbewahrung im Reagent Storage Module des Dako Omnis. Die Zeitdauer im Gerät wird durch die Dako Omnis Software erfasst. Nach dem Durchlauf können die Fläschchen auf Lagertemperatur gebracht werden (2–8 °C für CISH Endogenous Enzyme Block (Dako Omnis), Anti-FITC-AP (Dako Omnis) und BCIP-NBT Substrate (Dako Omnis) oder 15–30 °C für Nuclear Fast Red (Dako Omnis)), damit die Stabilitätsdauer im Gerät gewährleistet ist.
-
- 7 Zusätzliches Dako Omnis Zubehör laden.** Das unten aufgeführte Zubehör in das Dako Omnis laden, wie im Dako Omnis User Guide aufgeführt:
- Entionisiertes Wasser
 - Die Wash Buffer Arbeitslösung, verdünnt aus Wash Buffer (20×) (Dako Omnis), Code-Nr. GC807
 - Clearify (Intermedium), Code-Nr. GC810
 - ISH Cleaning Solution (Dako Omnis), Code-Nr. GC207
 - ISH Lid, Code-Nr. GC102

Vor dem Färbeverfahren

-
- 1** In der Dako Link Omnis Workstation-Software ein Protokoll für jeden Objektträger zuordnen. Unter **CISH Protocols** das geeignete CISH-Protokoll wählen.
-
- 2** Etiketten für Objektträger ausdrucken und auf den Glasobjektträgern befestigen.
-
- 3** Die Objektträger dann in den Objektträgerhalter setzen. Einzelheiten können im Dako Omnis Basic User Guide nachgelesen werden. Der Objektträgerhalter ist groß genug für einen bis fünf Objektträger. Für eine optimale Nutzung des Reagenz ist es ratsam, mindestens zwei Objektträger in einem CISH-Färbelauf zu färben. Es dürfen maximal drei Objektträgerhalter gleichzeitig verarbeitet werden.
-
- 4** Den Objektträgerhalter in das Dako Omnis laden.
-
- 5** Das/die ISH Lid(s) (ein ISH Lid pro Objektträgerhalter) in das Dako Omnis laden.
-
- 6** Sicherstellen, dass sich Spülflaschen mit Flüssigkeit im Gerät befinden, die durch das Dako Omnis Gerät registriert wurden. Die benötigten Spülflüssigkeiten beinhalten: verdünnte Clearify ISH Pre-Treatment Solution (Dako Omnis), verdünnter ISH Stringent Wash Buffer (Dako Omnis), verdünnter Wash Buffer (Dako Omnis) und destilliertes oder deionisiertes Wasser. Die Zubereitung dieser Lösungen ist unter [Verfahren zur Vorbereitung der Reagenzien](#) weiter oben beschrieben.
-
- 7** Sicherstellen, dass Fläschchen mit ISH Ethanol Solution, 96 % (Dako Omnis), ISH Pepsin (Dako Omnis), CISH Endogenous Enzyme Block (Dako Omnis), Anti-FITC-AP (Dako Omnis), BCIP-NBT Substrate (Dako Omnis), Nuclear Fast Red (Dako Omnis), sowie die frisch gemischte CISH-Sonde (Dako Omnis) in das Reagent Storage Module geladen wurden. Sicherstellen, dass alle Klappdeckel der Fläschchen offen sind. Die Zubereitung dieser Lösungen ist unter [Verfahren zur Vorbereitung der Reagenzien](#) weiter oben beschrieben.
-
- 8** Überprüfen, dass die Flaschen für verbrauchte Lösung leer sind, und Abfall nach Bedarf entsorgen. Alle örtlichen Vorschriften für die Entsorgung gefährlicher und nicht gefährlicher Abfälle beachten.
-

Tabelle 2 Verfahren

- 9** Um den Durchlauf zu starten, die Anweisungen auf dem Dako Omnis Touchscreen befolgen und *Done* (Fertig) antippen, um das Färbeverfahren zu beginnen. Der Fortschritt des Färbeprotokolls kann auf dem Touchscreen der Dako Link Omnis Workstation verfolgt werden.
Wenn der Durchlauf beendet ist und keine weiteren CISH-Färbungen anstehen, müssen alle Reagenzien im empfohlenen Temperaturbereich aufbewahrt werden.

Nach den Färbeverfahren

- 1** Die Objektträgerhalter nach Beenden des Färbeprotokolls aus der Dry Unloading Station des Dako Omnis entnehmen.
- 2** Die Objektträger durch Eintauchen in 70%iges, 85%iges und 100%iges Ethanol für jeweils 30 Sekunden dehydrieren.
- 3** Die Objektträger durch Eintauchen in frisches Xylol für 30 Sekunden löschen.
- 4** Ein nicht wässriges, permanentes Fixiermittel zur Probe hinzufügen und ein Deckglas anbringen. Das Fixiermittel aushärten lassen.
- 5** Die Objektträger mithilfe eines Lichtmikroskops mit einem Objektiv mit 4- bis 40-facher Vergrößerung betrachten.
- 6** Objektträger bei Raumtemperatur lagern.

Beschränkungen des Verfahrens

Die ordnungsgemäße Aufbewahrung und Handhabung der Reagenzien und Proben ist entscheidend für die Leistung. Alle Laborgeräte, die bei diesem Verfahren zur Vorbereitung der Zielsequenz eingesetzt werden, müssen kalibriert und gewartet sein, um eine optimale Genauigkeit zu gewährleisten. Eine inkorrekte Messung der Reagenzien kann das Ergebnis des Verfahrens beeinflussen.

Technical Support Assistance technique Technischer Kundendienst
















| Country Pays Land | E-mail Adresse électronique E-Mail | Telephone (Local toll-free) Téléphone (local gratuit) Telefon (gebührenfreie Nummer im jeweiligen Land) |
|-------------------------|--|---|
| Austria | customercare_Austria@agilent.com | 01 25125 6800 |
| Belgium | customercare_Belgium@agilent.com | 02 404 92 22 |
| Denmark | customercare_Denmark@agilent.com | 45 70 13 00 30 |
| Finland | customercare_Finland@agilent.com | 010 802 220 |
| France | customercare_France@agilent.com | 0810 446 446 |
| Germany | customercare_Germany@agilent.com | 0800 603 1000 |
| Italy | customercare_Italy@agilent.com | 800 012575 |
| Netherlands | customercare_Netherlands@agilent.com | 020 547 2600 |
| Spain | customercare_Spain@agilent.com | 901 11 68 90 |
| Sweden | customercare_Sweden@agilent.com | 08 506 4 8960 |
| Switzerland | customercare_Switzerland@agilent.com | 0848 8035 60 |
| UK/Ireland | customercare_UK@agilent.com | 0845 712 5292 |

All other countries / Tous les autres pays / Alle anderen Länder

Agilent Worldwide Technical Support / Assistance technique mondiale Agilent / Agilent Technischer Kundendienst
Visit / Consulter / Besuchen Sie www.agilent.com/genomics/contactus


Any serious incident that has occurred in relation to the device shall be reported to the manufacturer and the competent authority of the country in which the user and/or the patient is established.
Tout incident grave en rapport avec le dispositif doit être rapporté au fabricant et aux autorités compétentes du pays dans lequel l'utilisateur et/ou le patient est établi.
Jeder schwerwiegende Vorfall im Zusammenhang mit dem Produkt ist dem Hersteller und der zuständigen Behörde des Landes, in dem der Anwender und/oder der Patient niedergelassen ist, zu melden.

Symbol Table
Tableau des
symboles
Symboltabelle

| | | | |
|---|--|--|--|
|  | Catalogue number Référence du catalogue Bestellnummer |  | European Conformity Conformité européenne Europäische Konformität |
|  | Batch code Code du lot Chargenbezeichnung |  | Use-by date Date de péremption Haltbarkeitsdatum |
|  | Temperature limit Limite de température Temperaturbegrenzung |  | Manufacturer Fabricant Hersteller |
|  | Contains sufficient for <n> tests Contenance suffisante pour <n> tests Ausreichend für <n> Tests |  | <i>In vitro</i> diagnostic medical device Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i> <i>In-vitro</i> -Diagnostikum |
|  | Health hazard Danger pour la santé Gesundheitsschädlich |  | Corrosive Corrosif Korrosiv |
|  | Unique Device Identifier Identifiant unique des dispositifs Eindeutige Gerätekennung |  | Consult instructions for use Consulter le mode d'emploi Gebrauchsanweisung beachten |
|  | Authorized representative in the European Community Représentant agréé de la Communauté européenne Bevollmächtigter in der Europäischen Gemeinschaft |  | UK Responsible Person Personne responsable au R.-U. Verantwortliche Person in UK |
|  | UK Conformity Assessed Marquage UKCA UK-Konformität geprüft | | |

 Agilent Technologies, Inc.
 5301 Stevens Creek Blvd, Santa Clara, CA 95051, USA
 Manufactured at / Fabriqué à / Hergestellt in:
 1834 State Hwy 71 W, Cedar Creek, TX 78612, USA
www.agilent.com

 Agilent Technologies Denmark ApS
 Produktionsvej 42
 2600 Glostrup, Denmark

 Agilent Technologies LDA UK Limited
 5500 Lakeside, Cheadle Royal Business Park
 Cheadle, Cheshire, SK8 3GR, UK

Australia Sponsor
 Agilent Technologies Australia Pty Ltd
 679 Springvale Rd, Mulgrave VIC 3170
 Australia

© Agilent Technologies, Inc. 2017, 2019, 2022



Revision E0, May 2022



5991-9789