



A Sysmex Group Company



REF: RU-LPS 047-S/RU-LPS 047

1p36/1q25 and 19p13/19q13 Deletion Probe Kit

Research Use Only

Further information available at www.ogt.com

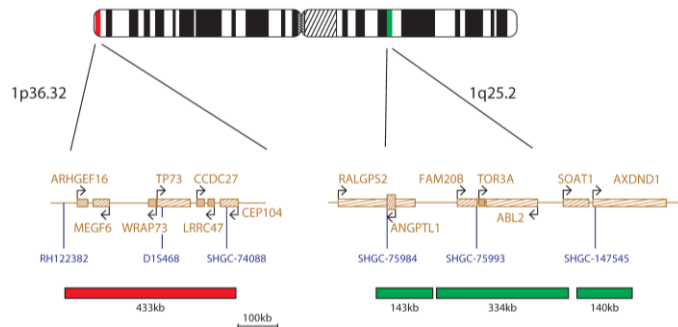
Fluorescence *In Situ* Hybridisation (FISH) is a technique that allows the visualisation of DNA sequences upon chromosomes. The technique uses DNA probes that hybridise to entire chromosomes or single unique sequences, and serves as a powerful adjunct to classic cytogenetics. Recent developments have meant that this valuable technique can now be applied as an essential tool in prenatal, haematological and pathological chromosomal analysis. Target DNA, after fixation and denaturation, is available for annealing to a similarly denatured, fluorescently labelled DNA probe, which has a complementary sequence. Following hybridisation, unbound and non-specifically bound DNA probe is removed and the DNA is counterstained for visualisation. Fluorescence microscopy then allows the visualisation of the hybridised probe on the target material.

Intended Use

This product is intended to be used for research use only and is not for use in diagnostic procedures.

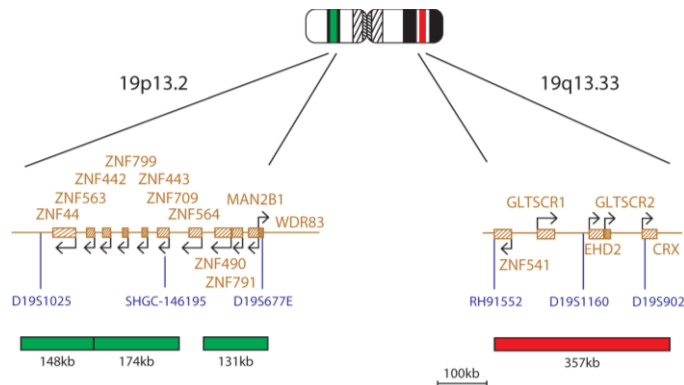
Probe Specification

Probe 1:
1p36.32, Red
1q25.2 Green



The 1p36.32 probe, labelled in red, is 433kb in size and covers the region between markers RH122382 and SHGC-74088. The 1q25.2 probe, labelled in green, consists of three probes (143kb, 334kb and 140kb) that cover regions including markers SHGC-75984 and SHGC-147545.

Probe 2:
19p13.2 Green
19q13.33 Red



The 19p13.2 probe, labelled in green, consists of three probes (148kb, 174kb and 131kb) that cover regions including markers D19S1025 and D19S677E. The

19q13.33 probe, labelled in red, is 357kb in size and covers the region between markers RH91552 and D19S902.

Materials Provided

Probe: 50µl per vial or 100µl per vial

Probe 1

Probe concentration 1p36.32, Red probe 8-10ng/µl

Probe concentration 1q25.2 Green probe 24-30ng/µl

Probe 2

Probe concentration 19p13.2 Green probe 26-33ng/µl

Probe concentration 19q13.33 Red probe 6-7.5ng/µl

The probes are provided premixed in hybridisation solution (Formamide; Dextran Sulphate; SSC) and are ready to use.

Counterstain:

150µl per vial or 300µl per vial
The counterstain is DAPI antifade (ES: 0.125µg/ml DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole)).

Warnings and Precautions

1. For research use only. Not for use in diagnostic procedures. For professional use only.
2. Wear gloves when handling DNA probes and DAPI counterstain.
3. Probe mixtures contain formamide, which is a teratogen; do not breathe fumes or allow skin contact. Wear gloves, a lab coat, and handle in a fume hood. Upon disposal, flush with a large volume of water.
4. DAPI is a potential carcinogen. Handle with care; wear gloves and a lab coat. Upon disposal, flush with a large volume of water.
5. Dispose of all hazardous materials according to your institution's guidelines for hazardous waste disposal.
6. Operators must be capable of visually distinguishing between red, blue and green.

Storage and Handling

The kit should be stored between -25°C to -15°C in a freezer until the expiry date indicated on the kit label. Store the probe and counterstain vials in the dark.

Protocol Recommendations

For use on FFPE or TMA.

Equipment Necessary but not Supplied

1. Hotplate (with a solid plate and accurate temperature control up to 80°C).
2. Variable volume micropipettes and tips range 1µl - 200µl.
3. Water bath with accurate temperature control at 72°C.
4. Microcentrifuge tubes (0.5ml).
5. Fluorescence microscope (Please see Fluorescence Microscope Recommendation section).
6. Plastic or glass coplin jars.
7. Forceps.
8. Fluorescence grade microscope lens immersion oil.
9. Bench-top centrifuge.
10. Microscope slides.
11. 24x24mm coverslips.
12. Timer.
13. 37°C incubator.
14. Rubber solution glue.
15. Tissue Pretreatment Kit (LPS 100).

Fluorescence Microscope Recommendation

Use a 100-watt mercury lamp and plan apochromat objectives x63 or x100 for optimal visualisation. Use a triple bandpass filter DAPI/FITC/TRITC for optimal visualisation of the green and red fluorophores and DAPI simultaneously. Alternatively for viewing red and green fluorophores use dual bandpass filter FITC/Texas Red.

Check the fluorescence microscope before use to ensure it is operating correctly. Use immersion oil that is suitable for fluorescence microscopy and formulated for low autofluorescence. Follow manufacturers' recommendations in regards to the life of the lamp and the age of the filters.

Sample Preparation

Prepare all samples according to the laboratory or institution guidelines. For FISH, 4µm - 6µm thick FFPE tissue sections should be used.

Tissue Sample Pretreatment

Tissue sample pretreatment should be done according to the laboratory or institution guideline. For optimal results use the Tissue Pretreatment Kit (LPS 100).

FISH Protocol

(Note: Ensure that exposure of the probe to laboratory lights is limited at all times).

Pre-Denaturation

1. Remove the probe from the freezer and allow it to warm to room temperature (RT). Briefly centrifuge tubes before use.
2. Ensure that the probe solution is uniformly mixed with a pipette.
3. Remove 10µl - 15µl (depending on the size of the tissue) of probe per test, and transfer it to a microcentrifuge tube. Quickly return the remaining probe to the freezer.
4. Place the probe and the sample slide to prewarm on a 37°C (+/- 1°C) hotplate for 5 minutes.
5. Spot 10µl - 15µl of probe mixture onto the sample and carefully apply a coverslip. Seal with rubber solution glue and allow the glue to dry completely.

Denaturation

DS281/RUO V004.00/2020-12-01 (S064 v1 / S069 v1)

- Denature the sample and probe simultaneously by heating the slide on a hotplate at 75°C (+/- 1°C) for 5 minutes.

Hybridisation

- Place the slide in a humid, lightproof container at 37°C (+/- 1°C) overnight.

Post-Hybridisation Washes

- Remove the coverslip and all traces of glue carefully.
- Immerse the slide in 0.4xSSC (pH 7.0) at 72°C (+/- 1°C) for 2 minutes without agitation.
- Drain the slide and immerse it in 2xSSC, 0.05% Tween-20 at RT (pH 7.0) for 30 seconds without agitation.
- Drain the slide and apply 10µl - 15µl of DAPI antifade onto each sample.
- Cover with a coverslip, remove any bubbles and allow the colour to develop in the dark for 10 minutes.
- View with a fluorescence microscope.

Comments

Hybridisation efficiency and tissue morphology are usually negatively correlated. Aggressive pretreatment procedures improving hybridisation efficiency (e.g. an extended enzyme digestion time) tend to destroy cell structure and tissue morphology. However, mild pretreatment saving tissue structures may not be sufficient for probe penetration and successful FISH results. The optimal length of heat pretreatment and enzyme digestion time will depend on the age of the block, the tissue composition, and quality of tissue fixation. Enzyme digestion should be decreased for core biopsies and any sections that contain few tumour cells or have large areas of necrosis. These samples need to be handled particularly carefully to avoid over-digestion.

Stability of Finished Slides

FISHed slides remain analysable for up to 1 month if stored in the dark below 4°C.

Procedural Recommendations

- Hybridisation conditions may be adversely affected by the use of reagents other than those provided or recommended by CytoCell Ltd.
- Use a calibrated thermometer for measuring temperatures of solutions, waterbaths and incubators as these temperatures are critical for optimum product performance.
- The wash concentrations, pH and temperatures are important as low stringency can result in non-specific binding of the probe and too high stringency can result in a lack of signal.
- Incomplete denaturation can result in lack of signal and over denaturation can also result in non-specific binding.
- Over hybridisation can result in to additional or unexpected signals.
- Users should optimise the protocol for their own samples prior to use.

Expected Results

Probe 1:

A normal cell should show 2 red and 2 green signals (2R, 2G). Cells carrying a 1p36 deletion should show 1 red and 2 green signals (1R, 2G).

Probe 2:

A normal cell should show 2 red and 2 green signals (2R, 2G). Cells carrying a 19q13 deletion should show 1 red and 2 green signals (1R, 2G).

Known Cross-Reactivity

No known cross-reactivity.

Additional Information

For additional product information please contact the CytoCell Technical Support Department.

T: +44 (0)1223 294048

E: techsupport@cytoCELL.com

W: www.cgt.com

FRANÇAIS

L'hybridation *in situ* par fluorescence (FISH) est une technique qui permet de détecter des séquences ADN sur les chromosomes en métaphase ou sur les noyaux interphasiques d'échantillons cytogénétiques fixés cultivés ou non cultivés. La technique utilise des sondes ADN qui s'hybrident aux chromosomes entiers ou à des séquences spécifiques, et sert de test complémentaire à la cytogénétique classique. De récents développements ont démontré que cette technique informative peut maintenant être utilisée comme un outil essentiel lors de l'analyse des chromosomes en prénatal, hématologie et pathologie. L'ADN cible, après fixation, est traité par la chaleur et à la formamide pour dénaturer la double hélice, la rendant simple hélice. L'ADN cible est alors disponible pour hybridation avec une sonde ADN complémentaire simple brin, dénaturée de la même manière et marquée avec un fluorochrome. Après l'hybridation, l'ADN non hybridé et l'ADN non lié spécifiquement sont éliminés par une série de lavages stringents et l'ADN est ensuite contre-coloré. Un microscope à fluorescence permet ensuite la visualisation de la sonde hybridée sur l'ADN cible.

Utilisation Prévue

Ce produit est destiné à être utilisé à des fins de recherche uniquement et n'est pas destiné à être utilisé dans les procédures de diagnostic.

Caractéristiques de la sonde

Sonde 1

Sonde de la région 1p36.32 en rouge

Sonde de la région 1q25.2 en vert

Sonde 2

Sonde de la région 19p13.2 en vert

Sonde de la région 19q13.33 en rouge

Sonde 1

La sonde 1p36.32, étiquetée en rouge, est de taille 433kb et couvre la région située entre les marqueurs RH122382 et SHGC-74088. La sonde 1q25.2, étiquetée en vert, comprend trois sondes (143kb, 334kb et 140kb) qui couvrent les régions comprenant les marqueurs SHGC-75984 et SHGC-147545.

Sonde 2

La sonde 19p13.2, étiquetée en vert, comprend trois sondes (148kb, 174kb et 131kb) qui couvrent les régions comprenant les marqueurs D19S1025 et D19S677E. La sonde 19q13.33,

étiquetée en rouge, est de taille 357kb et couvre la région située entre les marqueurs RH91552 et D19S902.

Conditionnement

Sonde: 50µl par tube ou 100µl par tube

Sonde 1

Concentration de sonde 1p36.32 rouge 8-10ng/µl

Concentration de sonde 1q25.2 vert 24-30ng/µl

Sonde 2

Concentration de sonde 19p13.2 vert 26-33ng/µl

Concentration de sonde 19q13.33 rouge 6-7.5ng/µl

La sonde est fournie prémélangée prête-à-l'emploi dans le tampon d'hybridation (formamide, sulfate de dextran, SSC).

Contre-colorant: 150µl par tube ou 300µl par tube

Le contre-colorant est le DAPI antifade (ES: 0,125µg/ml DAPI (4,6-diamidino-2-phénylindole)).

Avertissements et précautions

- Pour la recherche uniquement. Pas destiné à être utilisé dans les procédures de diagnostic. Pour usage professionnel uniquement.
- Porter des gants lors de la manipulation des sondes ADN et du contre-colorant DAPI.
- La sonde contient de la formamide qui est un tératogène. Ne pas respirer les vapeurs. Ne pas mettre en contact avec la peau. Porter des gants, une blouse de laboratoire et manipuler sous une hotte. Après élimination, rincer abondamment avec de l'eau.
- Le DAPI est un carcinogène potentiel. Manipuler avec précaution. Porter des gants et une blouse de laboratoire. Après élimination, rincer abondamment avec de l'eau.
- Éliminer toutes les matières dangereuses selon les directives fonctionnelles de votre institution pour l'élimination des déchets dangereux.
- Les techniciens doivent être en mesure de distinguer le rouge, le bleu et le vert.

Conservation et manipulation

Le kit devra être stocké au congélateur entre -25°C et -15°C jusqu'à la date d'expiration figurant sur l'étiquette du kit. Conservez la sonde et les flacons de contre-colorant à l'abri de la lumière.

Recommandations sur les protocoles

Pour l'utilisation sur FFPE ou TMA.

Équipement nécessaire non fourni

- Plaques chauffantes (avec bloc et contrôle de la température jusqu'à 80°C).
- Micropipettes de volume variable et gamme d'embouts de 1µl - 200µl.
- Bain-marie avec contrôle précis de la température à 72°C.
- Tubes à microcentrifugation (0,5ml).
- Microscope à fluorescence (Voir la section Microscope à fluorescence recommandés).
- Bocaux Coplin en plastique ou en verre.
- Pincettes.
- Huile à immersion pour microscope à fluorescence.
- Centrifugeuse de paillasse.
- Lames de microscope.
- Lamelles 24x24mm.
- Chronomètre.
- Incubateur à 37°C.
- Colle à base de caoutchouc.
- Tissue Pretreatment Kit (LPS 100).

Microscope à fluorescence recommandés

Utiliser une lampe à mercure de 100 watts ainsi que des objectifs plan apochromatique x63 ou x100 pour une visualisation optimale. Utiliser un filtre triple bande DAPI/FITC/Texas Red pour une visualisation simultanée des fluorochromes vert et rouge et du DAPI optimale. Pour la visualisation des fluorochromes rouge et vert, utiliser le filtre double bande FITC/Texas Red.

Vérifiez le fonctionnement du microscope à fluorescence avant usage. Utilisez de l'huile à immersion adaptée à la microscopie de fluorescence et formulée pour une autofluorescence basse. Respectez les recommandations du fabricant concernant la durée de vie de la lampe et le vieillissement des filtres.

Préparation des échantillons

Préparez tous les échantillons conformément aux directives du laboratoire ou de l'établissement. Utilisez entre 4µm et 6µm de sections de tissus FFPE épaisses pour l'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH).

Prétraitement des échantillons de tissu

Le prétraitement des échantillons de tissu doit être effectué conformément aux directives du laboratoire ou de l'établissement. Utilisez Tissue Pretreatment Kit (LPS 100) pour obtenir les meilleurs résultats.

Protocole FISH

(Remarque: Assurez-vous que la sonde n'est exposée aux lumières de laboratoire que de façon limitée, à tous moments).

Pré-dénaturation

- Retirer la sonde du congélateur et la laisser se remettre à température ambiante (TA). Centrifugez brièvement les tubes avant usage.
- Bien homogénéiser la sonde en pipetant plusieurs fois.
- Prélever 10µl - 15µl (en fonction de la taille du tissu) de sonde par test et placer dans un tube à microcentrifugation. Remplacez rapidement le reste de sonde dans le congélateur.
- Mettre la sonde et la lame échantillon à préchauffer sur une plaque chauffante à 37°C (+/- 1°C) pendant 5 minutes.
- Déposer 10µl - 15µl de sonde sur l'échantillon et couvrir avec une lamelle. Sceller avec de la colle à base de caoutchouc et laisser sécher.

Dénaturation

- Dénaturer simultanément la sonde et l'échantillon en plaçant la lame sur une plaque chauffante à 75°C (+/- 1°C) pendant 5 minutes.

Hybridation

- Incuber la lame pendant une nuit à 37°C (+/- 1°C) dans un récipient humide et à l'abri de la lumière.

Lavages post-hybridation

- Retirer la lamelle et éliminer toute trace de colle à base de caoutchouc.
- Laver la lame dans du tampon 0,4xSSC (pH 7,0) à 72°C (+/- 1°C) pendant 2 minutes sans agiter.
- Egoutter la lame et laver dans du tampon 2xSSC, 0,05% Tween-20 (pH 7,0) à TA pendant 30 secondes sans agiter.
- Sécher la lame et appliquer 10µl - 15µl de DAPI antifade sur chaque échantillon.
- Recouvrir d'une lamelle, éliminer les bulles et laisser la coloration apparaître à l'abri de la lumière pendant 10 minutes.
- Visualiser avec un microscope à fluorescence.

Commentaires:

L'efficacité de l'hybridation et la morphologie du tissu d'habitude ont une corrélation négative. Les méthodes de prétraitement agressives améliorant l'efficacité d'hybridation (p.ex. un long temps de digestion enzymatique) ont tendance à détruire la structure cellulaire et la morphologie du tissu. Néanmoins, les méthodes de prétraitement douces conservant les

structures de tissu souvent ne sont pas suffisantes pour la pénétration de la sonde et l'obtention de bons résultats de FISH.

La durée optimale de prétraitement thermique et de digestion enzymatique dépendra de l'âge du bloc, de la composition du tissu et de la qualité de la fixation du tissu. Réduisez la digestion d'enzymes pour les biopsies au trocar ainsi que pour toutes les sections qui comportent peu de cellules tumorales ou de grandes zones nécrosées. Manipulez ces échantillons avec beaucoup de précautions afin d'éviter une surdigestion.

Stabilité des lames

Les lames sont analysables pendant un mois si elles sont conservées à l'abri de la lumière et à au dessous de 4°C.

Recommandations

1. Les conditions d'hybridation peuvent être affectées par l'utilisation de réactifs autres que ceux fournis ou recommandés par CytoCell Ltd.
2. Utilisez un thermomètre étalonné pour mesurer les températures des solutions, des bains d'eau et des incubateurs, car ces températures sont essentielles à la performance optimale du produit.
3. Les concentrations des lavages, pH et température sont importants. Une faible stringence peut résulter en une liaison non-spécifique de la sonde et une trop forte stringence peut résulter en une perte de signal.
4. Une dénaturation incomplète peut engendrer une perte de signal et une trop forte dénaturation une hybridation non-spécifique.
5. Une hybridation trop importante peut entraîner des signaux supplémentaires ou inattendus.
6. Les utilisateurs doivent optimiser le protocole en fonction de leurs propres échantillons avant d'utiliser.

Interprétation des résultats

Sonde 1

Une cellule normale devrait présenter deux signaux rouges et deux signaux verts (2R, 2V). Les cellules contenant une suppression 1p36 devraient présenter un signal rouge et deux signaux verts (1R, 2V).

Sonde 2

Une cellule normale devrait présenter deux signaux rouges et deux signaux verts (2R, 2V). Les cellules contenant une suppression 19q13 devraient présenter un signal rouge et deux signaux verts (1R, 2V).

Réactivité croisée connue

Aucune réactivité croisée connue.

Informations supplémentaires

Pour plus d'informations sur le produit, veuillez contacter l'Assistance technique CytoCell.

T: +44 (0) 1223 294048

E: techsupport@cytoCELL.com

W: www.ogt.com

ITALIANO

L'ibridazione *in situ* in fluorescenza (Fluorescence *In Situ* Hybridisation - FISH) è una tecnica che permette di rilevare sequenze di DNA su cromosomi in metafase o in nuclei in interfase di campioni citogenetici fissati, o in coltura dopo prelievo. La tecnica prevede l'utilizzo di sonde di DNA in grado di ibridare con l'intero cromosoma o con singole sequenze. La FISH costituisce quindi un potente strumento in aggiunta alle tecniche citogenetiche classiche. Recenti sviluppi hanno reso possibile che questa preziosa tecnica può ora essere applicata come strumento essenziale nell'analisi cromosomica prenatale, ematologia e patologica. Il DNA bersaglio, dopo la fissazione, è sottoposto a denaturazione al calore in presenza di formamide. Il DNA bersaglio è così disponibile per l'annealing con una sonda di DNA a singola elica a sequenza complementare, marcata con una sostanza fluorescente. Terminata l'ibridazione, la sonda di DNA non legata o legata in modo non specifico, è rimossa per mezzo di lavaggi stringenti ed il DNA è in seguito colorato con un colorante di contrasto. L'ibridazione della sonda viene infine analizzata con un microscopio a fluorescenza.

Destinazione d'uso

Questo prodotto è destinato ad essere utilizzato solo per scopi di ricerca e non per l'uso in procedure diagnostiche

Specifiche della sonda

Regione 1p36.32 rosso

Regione 1q25.2 verde

Set di sonde 2

Regione 19p13.2 verde

Regione 19q13.33 rosso

Set di sonde 1

La sonda 1p36.32, etichettata in rosso, ha una dimensione di 433kb e copre la regione tra i marcatori RH122382 e SHGC-74088. La sonda 1q25.2, etichettata in verde, consiste di tre sonde (143kb, 334kb e 140kb) che coprono le regioni tra i marcatori SHGC-75984 e SHGC-147545.

Set di sonde 2

La sonda 19p13.2, etichettata in verde, consiste di tre sonde (148kb, 174kb e 131kb) che coprono le regioni tra i marcatori D19S1025 e D19S677E. La sonda 19q13.33, etichettata in rosso, ha una dimensione di 357kb e copre la regione tra i marcatori RH91552 e D19S902.

Materiali forniti

Sonda: 50µl per provetta o 100µl per provetta

Set di sonde 1

Concentrazione della sonda 1p36.32 rosso 8-10ng/µl

Concentrazione della sonda 1q25.2 verde 24-30ng/µl

Set di sonde 2

Concentrazione della sonda 19p13.2 verde 26-33ng/µl

Concentrazione della sonda 19q13.33 rosso 6-7.5ng/µl

Le sonde sono fornite premiscelate nella soluzione di ibridazione (formamide; destrano solfato; SSC) e pronte per l'uso.

Colorante di contrasto: 150µl per provetta o 300µl per provetta

Il colorante di contrasto è costituito da DAPI antifade (ES: 0,125µg/ml DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindolo)).

Avvertenze e precauzioni

1. Per uso ricerca. Non per l'uso in procedure diagnostiche. Solo per uso professionale.
2. Quando si maneggiano le sonde e il colorante di contrasto DAPI, è necessario indossare guanti.
3. Le miscele delle sonde contengono formamide, una sostanza teratogena. Non respirare i fumi ed evitare il contatto con la pelle. Indossare guanti e camicia da laboratorio e maneggiare sotto cappa chimica. Per lo smaltimento, sciacquare con grandi quantità di acqua.
4. Il DAPI è un potenziale cancerogeno. Maneggiare con cura, indossare guanti e camicia da laboratorio. Per lo smaltimento, sciacquare con grandi quantità di acqua.
5. Smaltire tutti i materiali pericolosi nel rispetto delle linee guida del proprio istituto per lo smaltimento dei rifiuti pericolosi.

6. Gli operatori devono poter distinguere visivamente fra rosso, blu e verde.

Conservazione e manipolazione

Conservare il kit in congelatore a una temperatura compresa tra -25°C e -15°C fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta. Conservare la sonda e i flaconi del controcolorante al buio.

Protocollo Raccomandazioni

Per l'uso su FFPE o TMA.

Apparecchiature necessarie ma non fornite

1. Piastra riscaldante (dotata di superficie d'appoggio e controllo accurato della temperatura fino a 80°C).
2. Micropipette a volume variabile con capacità da 1µl a 200µl e relativi puntali.
3. Bagno termostatico con controllo accurato della temperatura a 72°C.
4. Provette da microcentrifuga (0,5ml).
5. Microscopio a fluorescenza (fare riferimento alla sezione Caratteristiche consigliate per il microscopio a fluorescenza).
6. Vaschette di Coplin in plastica o in vetro.
7. Pinzette.
8. Olio di immersione per obiettivi per microscopia a fluorescenza.
9. Centrifuga da banco.
10. Vetrini per microscopia.
11. Vetrini copri oggetto da 24x24mm.
12. Timer.
13. Incubatore a 37°C.
14. Colla tipo mastice.
15. Tissue Pretreatment Kit (LPS 100).

Caratteristiche consigliate per il microscopio a fluorescenza

Utilizzare una lampada al mercurio da 100 watt e obiettivi apocromatici x63 o x100 per una visione ottimale. Utilizzare un filtro triplo passa banda DAPI/FITC/Texas Red per la visione ottimale di DAPI e fluorofori verdi e rosso e contemporaneamente. In alternativa, utilizzare il doppio filtro passabanda FITC/Texas Red per visualizzare i fluorofori rosso e verde. Verificare il microscopio a fluorescenza prima dell'uso per garantire che funzioni correttamente. Usare olio a immersione adatto al microscopio a fluorescenza e formulato per fluorescenza bassa. Seguire le raccomandazioni del produttore su durata della lampadina e dei filtri.

Preparazione del campione

Preparare tutti i campioni secondo le linee guida del laboratorio o dell'istituto. Usare sezioni di tessuto in FFPE di 4µm-6µm di spessore per FISH.

Pretrattamento del campione di tessuto

Il pretrattamento del campione di tessuto deve essere eseguito secondo il protocollo in uso nel proprio laboratorio o istituzione. Utilizzare l'Tissue Pretreatment Kit (LPS 100) al fine di ottenere risultati ottimali.

Protocollo della FISH

(Nota: Assicurare che l'esposizione della sonda alle luci di laboratorio sia sempre limitata).

Pre-denaturazione

1. Rimuovere la sonda dal congelatore e attendere che raggiunga la temperatura ambiente (TA). Centrifugare brevemente le provette prima dell'uso.
2. Mescolare con una pipetta la soluzione della sonda in modo da renderla omogenea.
3. Trasferire in una provetta da microcentrifuga 10µl - 15µl (a seconda delle dimensioni del tessuto) di sonda per ciascun test da eseguire. Riporre velocemente la sonda non utilizzata nel congelatore.
4. Pre-riscaldare la sonda e il vetrino con il campione su una piastra riscaldante a 37°C (+/- 1°C) per 5 minuti.
5. Collocare 10µl - 15µl di miscela della sonda sul campione e cellulare e coprire delicatamente con un vetrino copri oggetto. Sigillare con una colla tipo mastice e attendere che la colla si asciughi completamente.

Denaturazione

6. Denaturare contemporaneamente il campione e la sonda riscaldando il vetrino su una piastra riscaldante a 75°C (+/- 1°C) per 5 minuti.

Ibridazione

7. Disporre il vetrino in una camera umida, non permeabile alla luce, a 37°C (+/- 1°C) per tutta la notte.

Lavaggi post-ibridazione

8. Rimuovere accuratamente il vetrino copri oggetto e qualsiasi residuo di colla.
9. Lavare il vetrino in 0.4xSSC (pH 7.0) a 72°C (+/- 1°C) per 2 minuti, senza agitazione.
10. Scolare il vetrino e lavare in 2xSSC, Tween-20 0,05% (pH 7.0) a TA per 30 secondi senza agitazione.
11. Scolare il vetrino e applicare 10µl - 15µl di DAPI antifade su ciascun campione.
12. Coprire con un vetrino copri oggetto, rimuovere eventuali bolle e attendere lo sviluppo del colore per 10 minuti lasciando il vetrino al buio.
13. Esaminare con un microscopio a fluorescenza.

Commenti:

L'efficacia dell'ibridazione e la morfologia tissutale sono solitamente correlate in modo negativo. Procedure di pretrattamento aggressivo che aumentano l'efficacia dell'ibridazione (ad es., tempi prolungati di digestione enzimatica) tendono a distruggere la struttura cellulare e la morfologia tissutale. Tuttavia, un pretrattamento blando suscettibile di salvare le strutture tissutali potrebbe non essere sufficiente per garantire la penetrazione della sonda e per garantire risultati positivi di FISH.

La durata ottimale del pretrattamento al calore e della digestione enzimatica dipenderà dall'età del blocco, dalla composizione tissutale e dalla qualità del fissaggio tissutale. Ridurre la digestione enzimatica per biopsie di base ed eventuali sezioni che contengono poche cellule tumorali o che hanno grandi aree di necrosi. Maneggiare questi campioni con particolare attenzione per evitare una digestione eccessiva.

Stabilità dei vetrini ultimati

I vetrini sottoposti a FISH restano analizzabili per circa 1 mese se conservati al buio se conservata al buio sotto i 4°C.

Raccomandazioni per la procedura

1. Le condizioni di ibridazione potrebbero essere influenzate negativamente dall'impiego di reagenti diversi da quelli forniti o consigliati da CytoCell Ltd.
2. Usare un termometro calibrato per misurare la temperatura delle soluzioni, dell'acqua e degli incubatori, poiché queste temperature sono fondamentali per ottimizzare le prestazioni del prodotto.
3. Le concentrazioni, il pH e la temperatura dei lavaggi sono di fondamentale importanza in quanto condizioni di stringenza blande possono favorire un legame aspecifico della sonda, mentre condizioni di stringenza troppo elevate possono determinare l'assenza di segnale.
4. Una denaturazione incompleta può determinare l'assenza di segnale, mentre una denaturazione eccessiva può produrre un legame aspecifico.
5. L'eccessiva ibridazione può provocare segnali aggiuntivi o imprevisti.
6. Gli utenti devono sviluppare il protocollo per i loro campioni prima dell'uso

Interpretazione dei risultati

Set di sonda 1

Una cellula normale dovrebbe mostrare 2 segnali rossi e 2 segnali verdi (2R, 2V). Le cellule con delezione 1p36 dovrebbero mostrare 1 segnale rosso e 2 segnali verdi (1R, 2V).

Set di sonda 2

Una cellula normale dovrebbe mostrare 2 segnali rossi e 2 segnali verdi (2R, 2V). Le cellule con delezione 19q13 dovrebbero mostrare 1 segnale rosso e 2 segnali verdi (1R, 2V).

Reattività crociata nota

Nessuna reattività crociata nota.

Informazioni aggiuntive

Per informazioni aggiuntive sul prodotto con contattare il Reparto di Assistenza Tecnica CytoCell.
T: +44 (0) 1223 294048
E: techsupport@cytoCELL.com
W: www.ogt.com

DEUTSCH

Die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) ist eine Technik, mit der DNA-Sequenzen auf Metaphase-Chromosomen oder Interphase-Kernen in fixierten zytogenetischen Proben nachgewiesen werden können. Dabei werden DNA-Sonden verwendet, die an ganze Chromosomen oder einzelne, einmalige Sequenzen hybridisieren. Kürzliche Entwicklungen haben gezeigt, dass diese nützliche Technik nun auch als essentielles Werkzeug für pränatale, hämatologische und pathologische Chromosomenanalysen eingesetzt werden kann. Nachdem die zu untersuchende DNA fixiert und denaturiert wurde, kann die Fluoreszenz markierte, einzelsträngige Sonde daran binden. Nach der Hybridisierung werden nicht gebundene sowie unspezifisch gebundene DNA-Sonden durch eine Reihe von Waschworgängen entfernt und die DNA zur Visualisierung gefärbt. Unter dem Fluoreszenzmikroskop wird dann die hybridisierte Sonde am Zielmaterial erkennbar.

Verwendungszweck

Dieses Produkt ist ausschließlich zu Forschungszwecken bestimmt und nicht für die Anwendung in diagnostischen Verfahren.

Sondenspezifikation

Sondensatz 1

1p36.32, rot
1q25.2 grün

Sondensatz 2

19p13.2 grün
19q13.33, rot

Sondensatz 1

Die 1p36.32-Sonde, rot gekennzeichnet, ist 433kb groß und deckt die Region zwischen den Markern RH122382 und SHGC-74088 ab. Die 1q25.2-Sonde, grün beschriftet, besteht aus drei Sonden (143kb, 334kb und 140kb), die Regionen einschließlich der Marker SHGC-75984 und SHGC-147545 abdecken.

Sondensatz 2

Die 19p13.2-Sonde, grün beschriftet, besteht aus drei Sonden (148kb, 174kb und 131kb), die Regionen einschließlich der Marker D19S1025 und D19S677E abdecken. Die 19q13.33-Sonde, rot beschriftet, ist 357kb groß und deckt die Region zwischen den Markern RH91552 und D19S902 ab.

Bestandteile des Kits

Sonde: 50µl pro Röhrchen oder 100µl pro Röhrchen

Sondensatz 1

Sondenkonzentration 1p36.32 rot 8-10ng/µl
Sondenkonzentration 1q25.2 grün 24-30ng/µl

Sondensatz 2

Sondenkonzentration 19p13.2 grün 26-33ng/µl
Sondenkonzentration 19q13.33 rot 6-7.5ng/µl

Die Sonden werden vorgemischt und gebrauchsfertig in Hybridisierungslösung geliefert (Formamid, Dextransulfat, SSC).

Farbstoff für die Gegenfärbung: 150µl pro Röhrchen oder 300µl pro Röhrchen
Der Farbstoff für die Gegenfärbung ist DAPI Antifade (ES: 0,125µg/ml DAPI (4,6-Diamidino-2-Phenylindol)).

Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen

- Nur für Forschungszwecke. Bestimmt nicht für die Anwendung in diagnostischen Verfahren. Durchführung ausschließlich durch qualifiziertes Laborpersonal.
- Beim Umgang mit DNA-Sonden und dem DAPI Farbstoff Handschuhe tragen.
- Sondenmischungen enthalten Formamid, das Teratogen ist. Keine Dämpfe einatmen und Hautkontakt vermeiden. Handschuhe und Labormantel tragen und unter einer Abzugshaube arbeiten. Bei der Entsorgung mit viel Wasser nachspülen.
- DAPI ist ein potenzielles Karzinogen. Vorsichtig damit umgehen, Handschuhe und Labormantel tragen. Bei der Entsorgung mit viel Wasser nachspülen.
- Entsorgen Sie alle gefährlichen Materialien nach Richtlinien Ihrer Einrichtung für die Entsorgung gefährlicher Abfälle.
- Die Anwender dieses Produkts müssen in der Lage sein, optisch zwischen den Farben rot, blau und grün zu unterscheiden.

Lagerung und Behandlung

Das Kit sollte bis zum Verfallsdatum, welches auf dem Etikett angegeben ist, in einem Gefrierschrank bei einer Temperatur zwischen -25°C und -15°C gelagert werden. Die Durchstechflaschen mit den Sonden und dem Farbstoff müssen lichtgeschützt aufbewahrt werden.

Protokoll Empfehlungen

Für den Einsatz auf FFPE oder TMA.

Benötigte, aber nicht mitgelieferte Laborgeräte

- Heizplatte (mit stabiler Platte und genauer Temperaturregelung bis 80°C).
- Mikropipetten mit unterschiedlichen Volumen von 1µl - 200µl.
- Wasserbad mit genauer Temperaturregelung bei 72°C.
- Mikrozentrifugenröhrchen (0,5ml).
- Fluoreszenzmikroskop (siehe auch „Empfehlungen zum Fluoreszenzmikroskop“).
- Coplin-Färbetrog aus Kunststoff oder Glas.
- Pinzette.
- Für Fluoreszenzobjektive geeignetes Immersionsöl.
- Tischzentrifuge.
- Objektträger für das Mikroskop.
- 24x24mm Deckgläser.
- Zeituhr.
- 37°C-Inkubator.
- Gummilösung zum Versiegeln der Deckgläseränder.
- Tissue Pretreatment Kit (LPS 100).

Empfehlungen zum Fluoreszenzmikroskop

Zur bestmöglichen Darstellung empfehlen wir eine 100-Watt-Quecksilberlampe und Planachromat-Objektive mit 63-facher oder 100-facher Vergrößerung. Verwenden Sie einen Dreifach-Bandpass-Filter DAPI/FITC/Texas Red zur optimalen und simultanen Darstellung der grünen und roten Fluorophore und DAPI-Färbung. Alternativ dazu kann zur Beobachtung des roten und des grünen Fluorophors ein Zweifach-Bandpassfilter FITC/Texas Red verwendet werden.

Das Fluoreszenzmikroskop muss vor dem Gebrauch auf korrekte Funktionsweise überprüft werden. Das Immersionsöl muss für die Verwendung in der Fluoreszenzmikroskopie geeignet und für geringe Autofluoreszenz formuliert sein. Den Herstellerempfehlungen zur Lebensdauer der Lampe und zum Alter der Filter ist Folge zu leisten.

Probenvorbereitung

Alle Proben sind nach den Richtlinien des Labors oder der Einrichtung zu präparieren. Es dient der Verwendung bei FFPE-Gewebschnitten für FISH mit einer Dicke von 4 µm - 6 µm.

Vorbehandlung von Gewebeproben

Gewebeproben werden gemäß den Richtlinien des Labors oder der Einrichtung vorbehandelt. Optimale Ergebnisse werden mit dem Tissue Pretreatment Kit (LPS 100) erzielt.

FISH-Protokoll

(Hinweis: Bitte versuchen Sie nach Möglichkeit, die Sonde vor Licht zu schützen).

Prä-denaturierung

- Nehmen Sie die Sonde aus dem Gefrierschrank und lassen Sie diese sich auf Zimmertemperatur erwärmen. Die Röhrchen vor der Anwendung kurz zentrifugieren.
- Mischen der Sondenlösung durch mehrmaliges Aufpipettieren.
- Pro Test 10µl - 15µl (je nach Größe des Gewebes) Sonde entnehmen und in ein Mikrozentrifugenröhrchen geben. Stellen Sie die restliche Probe schnell wieder zurück in den Gefrierschrank.
- Sonde und Probenobjektträger 5 Minuten auf einer Heizplatte bei 37°C (+/- 1°C) vorwärmen.
- 10µl - 15µl Sondenmischung auf die Zellprobe auftropfen und Deckglas sorgfältig auflegen. Mit Gummikleber-Lösung versiegeln und vollständig trocknen lassen.

Denaturierung

- Denaturieren Sie Probe und Sonde gleichzeitig durch 5 minütiges Erwärmen des Objektträgers auf einer Heizplatte bei 75°C (+/- 1°C).

Hybridisierung

- Den Objektträger über Nacht 37°C (+/- 1°C) in eine feuchte, lichtdichte Kammer geben.

Waschen nach der Hybridisierung

- Deckglas und alle Kleberspuren vorsichtig entfernen.
- Objektträger 2 Minuten lang bei 72°C (+/- 1°C) in 0,4xSSC (pH 7,0) waschen.
- Objektträger abtropfen lassen und 30 Sekunden bei Zimmertemperatur in 2xSSC, 0,05% Tween-20 (pH 7,0), waschen.
- Objektträger abtropfen lassen und 10µl - 15µl DAPI Antifade zu jeder Probe geben.
- Mit einem Deckglas abdecken, die Luftblasen entfernen und 10 Minuten unter Lichtschutz entwickeln lassen.
- Unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachten.

Bemerkungen:

Wirkungsgrad der Hybridisierung und Gewebemorphologie stehen gewöhnlich in negativem Zusammenhang. Aggressive Vorbehandlungsmethoden, die zu einem erhöhten Wirkungsgrad der Hybridisierung beitragen (z.B. eine verlängerte Enzymverdauungszeit), zerstören oft die Zellstrukturen und die Gewebemorphologie. Dennoch sind milde Vorbehandlungsmethoden, durch die die Gewebestrukturen erhalten bleiben, oft nicht ausreichend für das Eindringen der Sonde und erfolgreiche FISH Ergebnisse. Die optimale Länge der Wärmeverhandlung und Enzymverdauung hängt vom Alter des Blocks, der Gewebeszusammensetzung und der Qualität der Gewebefixierung ab. Die Enzymverdauung für Stanzbiopsien sowie Schnitte mit wenig Tumorzellen oder großen nekrotischen Bereichen sind zu verringern. Mit diesen Proben ist besonders vorsichtig umzugehen, um Überverdau zu vermeiden.

Stabilität der fertigen Objektträger

Objektträger mit FISH-Proben können bis zu einem Monat lang analysiert werden, wenn sie im Dunkeln bei oder unter 4°C aufbewahrt werden.

Empfehlungen zur Durchführung

- Durch die Verwendung von Reagenzien, die nicht von CytoCell Ltd. empfohlen sind, können die Hybridisierungsbedingungen negativ beeinflusst werden.
- Es wird dringend empfohlen, zur Temperaturmessung von Lösungen, Wasserbädern und Inkubatoren ein geeichtes Thermometer zu verwenden, da diese Temperaturen für die optimale Leistung des Produkts ausschlaggebend sind.
- Die Konzentration der Waschlösungen, pH und Temperatur sind wichtig, da niedrig stringente Bedingungen zu nicht spezifischer Bindung der Sonde führen kann und zu hohe Stringenz zum Verlust des Signals.
- Unvollständige Denaturierung kann zu einem Verlust des Signals führen und übermäßige Denaturierung kann zu nicht spezifischer Bindung der Sonde führen.
- Bei übermäßiger Hybridisierung kann es zu zusätzlichen oder unerwarteten Signalen kommen.
- Die Anwender sollten das Protokoll für ihre eigenen Proben optimieren, bevor sie verwenden

Zu erwartende Ergebnisse

Sondensatz 1

Eine normale Zelle sollte 2 rote und 2 grüne Signale anzeigen (2R, 2G). Zellen, die eine 1p36-Deletion in sich tragen, sollten 1 rotes und 2 grüne Signale anzeigen (1R, 2G).

Sondensatz 2

Eine normale Zelle sollte 2 rote und 2 grüne Signale anzeigen (2R, 2G). Zellen, die eine 19q13-Deletion in sich tragen, sollten 1 rotes und 2 grüne Signale anzeigen (1R, 2G).

Bekannte Kreuzreaktivität

Keine Kreuzreaktivität bekannt.

Weitere Informationen:

Weitere Produktinformationen erhalten Sie vom Technischen Kundendienst von CytoCell.
T: +44 (0) 1223 294048
E: techsupport@cytoCELL.com
W: www.ogt.com

ESPAÑOL

La hibridación *in situ* fluorescente (FISH) es una técnica que permite detectar secuencias de ADN en cromosomas metafásicos o núcleos interfásicos en muestras citogenéticas y fijadas. En la técnica se utiliza una sonda de ADN que hibrida los cromosomas completos o las secuencias únicas simples y es un complemento útil para la citogenética clásica. Recientes estudios indican que esta es una técnica que puede aplicarse como herramienta esencial de prenatal, hematológico y patológico. Después de la fijación, el ADN se trata con calor para desnaturar el ADN bicatenario haciendo que resulte monocatenario. El ADN diana

queda entonces disponible para hibridarlo con una sonda de ADN igualmente desnaturizado, monocatenario marcado con fluorescencia que tiene una secuencia complementaria. Después de la hibridación la sonda de ADN no específicamente hibridada y no hibridada se elimina y se aplica un contraste al ADN para su visualización. El uso de un microscopio de fluorescencia permite la visualización de la sonda hibridada en el material utilizado.

Uso Previsto

Este producto está diseñado para ser utilizado en investigación y no en procedimientos de diagnóstico.

Especificaciones de las sondas

1p36.32, rojo

1q25.2 verde

Conjunto de sondas 2

19p13.2 verde

19q13.33, rojo

Conjunto de sondas 1

La sonda 1p36.32, marcada en rojo, tiene un tamaño de 433kb y cubre la zona entre los marcadores RH122382 y SHGC-74088. La sonda 1q25.2, marcada en verde, consta de tres sondas (143kb, 334kb y 140kb) que cubren las zonas que incluyen los marcadores SHGC-75984 y SHGC-147545.

Conjunto de sondas 2

La sonda 19p13.2, marcada en verde, consta de tres sondas (148kb, 174kb y 131kb) que cubren las zonas que incluyen los marcadores D19S1025 y D19S677E. La sonda 19q13.33, marcada en rojo, tiene un tamaño de 357kb y cubre la zona entre los marcadores RH91552 y D19S902.

Material incluido

Sonda: 50µl por vial o 100µl por vial

Conjunto de sondas 1

Concentración de la sonda 1p36.32 rojo 8-10ng/µl

Concentración de la sonda 1q25.2 verde 24-30ng/µl

Conjunto de sondas 2

Concentración de la sonda 19p13.2 verde 26-33ng/µl

Concentración de la sonda 19q13.33 rojo 6-7.5ng/µl

Las sondas se presentan premezcladas en la solución de hibridación (formamida; sulfato de dextrano; SSC) y listas para usar.

Contratinción: 150µl por vial o 300µl por vial

La tinción se realiza con DAPI Antifade (ES: 0,125µg/ml de DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol)).

Advertencias y precauciones

1. Para uso en investigación. No en procedimientos de diagnóstico. Sólo para uso profesional.
2. Utilizar guantes al manipular las sondas de ADN y la contratinción DAPI.
3. La sonda contiene formamida, que es teratogena; no respire los vapores y evite el contacto con la piel. Utilizar guantes, bata de laboratorio y manipular utilizando la campana de humos. Para eliminarla, aclarar con abundante agua.
4. La contratinción DAPI puede producir cáncer. Manipular con cuidado; utilizar guantes y bata de laboratorio. Para eliminarla, aclarar con abundante agua.
5. Deseche todos los materiales peligrosos de acuerdo a directrices de su institución para la eliminación de residuos peligrosos.
6. Los operadores deben ser capaces de diferenciar visualmente los colores rojo, azul y verde.

Almacenamiento y manipulación

El kit debe almacenarse en un congelador a una temperatura comprendida entre -25°C y -15°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del kit. Almacene la sonda y los viales de contraste en un lugar oscuro.

Protocolo Recomendado

Para uso en FFPE o TMA.

Material necesario pero no incluido

1. Placa calefactora (con una placa estable y un control de temperatura preciso hasta 80°C).
2. Micropipetas y puntas de volumen variable (de 1µl a 200µl).
3. Baño maría con control preciso de temperatura a 72°C.
4. Tubos de microcentrifugación (0,5ml).
5. Microscopio de fluorescencia (véase la sección Recomendaciones sobre el microscopio de fluorescencia).
6. Cubetas Coplin de cristal y de plástico.
7. Pinzas.
8. Aceite de inmersión para objetivos de microscopio de fluorescencia.
9. Centrífuga sobremesa.
10. Portaobjetos para microscopio.
11. Cubreobjetos de 24x24mm.
12. Temporizador.
13. Incubadora a 37°C.
14. Pegamento de solución de caucho.
15. Tissue Pretreatment Kit (LPS 100).

Recomendaciones sobre el microscopio de fluorescencia

Use una lámpara de mercurio de 100 vatios y equípese con objetivos apocromáticos x63 o x100 para una óptima visualización. Use un triple filtro de paso de banda DAPI/FITC/Texas Red para una visualización simultánea óptima de los fluoróforos verde y rojo y DAPI. Para los fluorocromos rojo y verde debe emplearse el doble filtro pasabanda FITC/Texas Red.

Compruebe el microscopio de fluorescencia antes de usarlo para asegurarse de que funciona correctamente. Utilice un aceite de inmersión que sea adecuado para el microscopio de fluorescencia y esté formulado para una baja autofluorescencia. Siga las recomendaciones de los fabricantes respecto a la vida útil de la lámpara y la edad de los filtros.

Preparación de la muestra

Todas las muestras deben prepararse según las normas del laboratorio o de la institución.

Use secciones de tejido FFPE de 4-6 µm de grosor para FISH.

Pretratamiento de las muestras de tejido

El pretratamiento de las muestras de tejido debe realizarse de acuerdo con los protocolos del laboratorio o institución. Use el Tissue Pretreatment Kit (LPS 100) para obtener unos resultados óptimos.

Protocolo para la FISH

(Observación: Asegúrese de limitar la exposición de la sonda a las luces del laboratorio en todo momento.)

Antes de la desnaturalización

1. Saque la sonda del congelador y deje que se caliente a temperatura ambiente (TA). Centrifugue brevemente los tubos antes de su uso.
2. Asegúrese de que la solución de la sonda queda homogéneamente mezclada con una pipeta.
3. Extraiga 10µl - 15µl (dependiendo del tamaño de la muestra) de la sonda por análisis e introduzcalos en un tubo de microcentrifugación. Rápidamente vuelva a almacenar el resto de la sonda a -20°C.
4. Precaliente la sonda y el portaobjetos de la muestra en una placa calefactora a 37°C (+/- 1°C) durante 5 minutos.
5. Vierta 10µl - 15µl de la solución de la sonda sobre la muestra de células y coloque cuidadosamente un cubreobjetos. Selle con pegamento de solución de caucho y deje que el pegamento se seque completamente.

Desnaturalización

6. Desnaturalice la muestra y la sonda simultáneamente calentando el porta sobre la placa calefactora a 75°C (+/- 1°C) durante 5 minutos.

Hibridación

7. Introduzca el porta en un recipiente húmedo y opaco a 37°C (+/- 1°C) y déjelo toda la noche.

Lavados post-hibridación

8. Quite el cubreobjetos y los restos del pegamento cuidadosamente.
9. Sumerja el portaobjetos en 0,4xSSC (pH 7,0) a 72°C (+/- 1°C) durante 2 minutos sin agitar.
10. Deje escurrir el portaobjetos y súmalo en 2xSSC, 0,05% de Tween-20 (pH 7,0) a TA durante 30 segundos sin agitar.
11. Escurra el portaobjetos y añada 10µl - 15µl de DAPI antifade sobre cada muestra.
12. Coloque un cubreobjetos, extraiga las burbujas y deje revelar el color en un lugar oscuro durante 10 minutos.
13. Visualice con un microscopio de fluorescencia.

Comentarios:

La eficiencia de la hibridación y la morfología tisular son inversamente proporcionales. Los procedimientos de pretratamiento agresivos que mejoran la eficiencia de la hibridación (por ejemplo, un tiempo de digestión enzimática más prolongado) tienden a destruir la estructura celular y la morfología tisular. Sin embargo, un pretratamiento suave que resguarde las estructuras tisulares puede no bastar para que la sonda penetre bien y los resultados de FISH sean adecuados.

La duración óptima del pretratamiento térmico y de la digestión enzimática dependerá de la edad del bloque, la composición del tejido y la calidad de la fijación tisular. La digestión enzimática debe reducirse en caso de biopsias de punción con aguja gruesa y en cualquier sección que contenga pocas células tumorales o tenga zonas vastas de necrosis. Estas muestras deben manipularse con especial atención para evitar una digestión excesiva.

Estabilidad de los portaobjetos terminados

Los portaobjetos sometidos a la técnica FISH pueden analizarse durante 1 mes si se conservan en un lugar oscuro debajo de 4°C.

Recomendaciones para los procedimientos

1. Las condiciones de hibridación pueden verse afectadas negativamente si se emplean reactivos distintos de los suministrados o recomendados por CytoCell Ltd.
2. Use un termómetro calibrado para medir la temperatura de las soluciones, de los baños maría y de las incubadoras, ya que estas temperaturas son cruciales para un rendimiento óptimo del producto.
3. Las concentraciones de los lavados, el pH y las temperaturas son importantes ya que unas condiciones poco rigurosas pueden provocar una hibridación inespecífica de la sonda y unas condiciones demasiado rigurosas pueden derivar en una falta de señal.
4. Una desnaturalización incompleta puede provocar falta de señal y una desnaturalización excesiva también puede originar una hibridación inespecífica.
5. La hibridación excesiva puede producir señales adicionales o inesperadas.
6. Se recomienda a los usuarios optimizar el protocolo para sus propias muestras antes de usar la prueba.

Interpretación de los resultados

Conjunto de sondas 1

Una célula normal debe presentar 2 señales rojas y 2 señales verdes (2R, 2V). Una célula con una deleción 1p36 debe presentar 1 señal roja y 2 señales verdes (1R, 2V).

Conjunto de sondas 2

Una célula normal debe presentar 2 señales rojas y 2 señales verdes (2R, 2V). Una célula con una deleción 19q13 debe presentar 1 señal roja y 2 señales verdes (1R, 2V).

Reactividad cruzada conocida

No presenta reactividad cruzada conocida.





Información adicional

Si desea obtener información adicional sobre el producto, póngase en contacto con el Departamento de soporte técnico de CytoCell.

T: +44 (0) 1223 294048

E: techsupport@cytozell.com

W: www.ogt.com

| | |
|---|---|
| REF | EN: Catalogue number DE: Bestellnummer FR: Référence du catalogue IT: Riferimento di Catalogo ES: Número de catálogo |
| LOT | EN: Batch code DE: Loscode FR: Code du lot IT: Codice di lotto ES: Código |
|  | EN: Consult instructions for use DE: Gebrauchsanweisung beachten FR: Consulter la notice d'utilisation IT: Consultare le istruzioni per l'uso ES: Consultense las instrucciones de uso |
|  | EN: Manufacturer DE: Hersteller FR: Fabricant IT: Fabbricante ES: Fabricante |
|  | EN: Use by DE: Verwendbar bis FR: Utiliser jusqu'au IT: Utilizzare entro ES: Fecha de caducidad |
|  | EN: Temperature limitation DE: Temperaturbegrenzung FR: Limites de température IT: Limiti di temperatura ES: Limitación de temperatura |
| CONT | EN: Contents DE: Inhalt FR: Contenu IT: Contenuto ES: Contenido |

Patents and Trademarks

CytoCell is a registered trademark of CytoCell Ltd.
This product contains technology licensed from Life Technologies Corporation and is available for research use only.



Cytocell Ltd.
Oxford Gene Technology,
418 Cambridge Science Park,
Milton Road,
Cambridge, CB4 0PZ, UK
T: +44(0)1223 294048
F: +44(0)1223 294986
E: probes@cytoCell.com
W: www.ogt.com