

Kreatech™ FISH probes

- EN** - Instructions for use
- FR** - Mode d'emploi
- DE** - Gebrauchsanleitung
- IT** - Istruzioni per l'uso
- ES** - Instrucciones de uso
- PT** - Instruções de Utilização
- TR** - Kullanım talimatları

Table of Contents

Instructions for use	3
Mode d'emploi	21
Gebrauchsanleitung	41
Istruzioni per l'uso	61
Instrucciones de uso	79
Instruções de Utilização	99
Kullanma talimatları	119

Instructions for use

Formalin-fixed paraffin-embedded tissue

Using Kreatech™ FISH probes

Fluorescent *in situ* hybridization (FISH) is used to identify, or label, target genomic sequences so that their location can be studied. DNA sequences from appropriate, chromosome specific probes are first labeled with reporter molecules. The labeled DNA probe is then hybridized to the target DNA in the nuclei of the tissue. After washing, the specimen is screened for the reporter molecules by fluorescence microscopy.

KREATECH REPEAT-FREE FISH probes do not contain C₀t-1 DNA. Hybridization efficiency is therefore increased and background, due to unspecific binding, is greatly reduced.

For optimal results on paraffin embedded tissue sections it is advised to use Kreatech's complete Pre-treatment kits (KBI-60004, KBI-60007) which include a specially optimized "Instruction for Use" protocol.

For more info consult our website: <http://www.leicabiosystems.com/ihc-ish/kreatech-fish-probes/>

As an alternative the following protocols can also be used:

Slide pretreatment:

1. Mount 4 - 6 µm formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue sections on positively charged slides.
2. Bake mounted FFPE tissue sections for 2 hours at 80 °C or 16 hours at 56 °C.

3. De-paraffinize slides in xylene or xylene substitute, incubate for 2 x 10 minutes (min) at room temperature (RT).
4. Re-hydrate slides in 100%, 85% and 70% ethanol, incubate for 3 min each at RT.
5. Place slides in deionized H₂O (dH₂O), incubate for 3 min at RT. Proceed with Protocol I or Protocol II.

Protocol I (standard protocol, if not satisfactory use protocol II)

1. Pre-warm 0.01 M sodium citrate pH 6.0 to 96 - 98 °C.
2. Pre-warm 0.01 M HCl to 37 °C (if not using Ready-to-Use (RtU) pepsin (LK-101A)).
3. Place slides in 0.01 M sodium citrate pH 6.0 at 96 - 98 °C, incubate for 15 min.
4. Place slides in dH₂O, incubate for 2 min at RT.
5. Add pepsin to pre-warmed 0.01 M HCl to reach a final concentration of 0.025%. (if not using RtU pepsin (LK-101A)).
6. Digest slides in 0.025% pepsin in 0.01 M HCl at 37 °C or cover tissue in RtU pepsin (LK-101A) at RT, incubate for 5 - 45 min, (time depending on tissue fixation and tissue type).
7. Place slides in dH₂O, incubate for 1 min at RT.
8. Place slides in 1 x PBS, pH 7.4 or 2 x SSC, pH 7.0, incubate for 5 min at RT.
9. Dehydrate slides in 70%, 85%, and 100% ethanol, incubate for 1 min each at RT. Air-dry at RT.

Proceed with probe preparation.

Protocol II (for heavily cross-linked samples)

1. Pre-warm 8% sodium thiocyanate to 80 °C.
2. Pre-treat slides with 0.2 M HCl, incubate for 20 min at RT.
3. Place slides in dH₂O, incubate for 3 min at RT.
4. Pre-warm 0.01 M HCl to 37 °C (if not using RtU pepsin (LK-101A)).
5. Place slides in pre-warmed 8% sodium thiocyanate in dH₂O at 80 °C, incubate for 30 min.

6. Place slides in 2 x SSC, pH 7.0, incubate for 3 min at RT.
7. Add pepsin to pre-warmed 0.01 M HCl to a final concentration of 0.025% (if not using RtU pepsin (LK-101A)).
8. Digest slides in 0.025% pepsin in 0.01 M HCl at 37 °C or cover tissue in RtU pepsin (LK-101A) at RT, incubate for 5 - 45 min, (time depending on tissue fixation and tissue type).
9. Place slides in dH₂O, incubate for 1 min at RT.
10. Place slides in 1 x PBS, pH 7.4 or 2 x SSC, pH 7.0, incubate for 5 min at RT.
11. Dehydrate slides in 70%, 85%, and 100% ethanol, incubate for 1 min each at RT. Air-dry at RT.

Proceed with probe preparation.

Probe preparation:

Briefly spin down probe vial, vortex probe vial and briefly spin down again before use. Allow probe to reach RT before use.

Kreatech FISH probes are supplied RtU unless specified otherwise in the product documentation. Consult label on vial and specific probe pack insert for dilution specifics.

Co-denaturation:

1. Apply 10 µl of probe or probe-mix per 22 x 22 mm field.
2. Cover with glass coverslip and seal with Fixogum (LK-071A) or rubber cement.
3. Denature sample and probe on a *Thermobrite* (TS-01/02) for 5 min at 80 °C.

Hybridization:

Incubate overnight at 37 °C in a *Thermobrite* (TS-01/02) or in a humidified chamber.

Post-hybridization wash:

1. Pre-warm Wash Buffer I (0.4 x SSC / 0.3% Igepal) (LK-102A) to 72 °C.
2. Remove rubber cement.

- Place up to 14 slides in 200 ml of Wash Buffer II (2 x SSC / 0.1% Igepal) (LK-103A), incubate for 2 min at RT. Slide off coverslips. Re-use only once for a total of 28 slides.
- Place up to 14 slides in 200 ml of pre-warmed Wash Buffer I (0.4 x SSC / 0.3% Igepal) (LK-102A), incubate for 2 min at 72 °C (± 1 °C) without agitation. Re-use only once for a total of 28 slides.
- Place up to 14 slides in 200 ml of fresh Wash Buffer II (2 x SSC / 0.1% Igepal) (LK-103A), incubate for 1 min at RT without agitation. Re-use only once for a total of 28 slides.
- Dehydrate in fresh 70%, 85% and 100% ethanol, incubate for 1 min each at RT. Air-dry at RT and proceed to Counterstaining.

Counterstaining:

Apply 15 μ l DAPI counterstain (LK-095A (0.1 μ g/ml) or LK-096A (1 μ g/ml)) and apply glass coverslip. DAPI can be diluted in counterstain diluent (LK-097A) to obtain desired concentration. Place slides in the dark and allow 10 - 15 min for counterstain to develop. Proceed with microscopy.

Recommendations for fluorescence microscopy:

For optimal visualization use a well maintained and regularly calibrated microscope equipped with a 100W mercury lamp or other appropriate light source and a 63x or 100x fluorescence objective. Triple band-pass filters (DAPI/FITC/Cy3 or DAPI/FITC/TRITC) are used to view multiple colors, single band-pass filters are used for individual color visualization.

Suitable excitation and emission range for Kreatech fluorophores:

Fluorophore	Excitation	Emission
PlatinumBright™ 415	429 \pm 20 nm	470 \pm 30 nm
PlatinumBright™ 495	495 \pm 20 nm	525 \pm 30 nm
PlatinumBright™ 550	546 \pm 12 nm	580 \pm 30 nm

Troubleshooting

Check protein digestion and pre-treatment by applying 15 μ l DAPI counterstain and evaluate slides using a fluorescence microscope equipped with a DAPI filter. A 15 min protein digestion is normally sufficient for a wide range of breast tumors. Remove coverslip and soak tissue in 2 x SSC, pH 7.4 for 2 min at RT. Prolong protein digestion by 2 - 20 min if sample is not sufficiently digested. Use a fresh sample and reduce protein digestion time if the sample is over-digested.

Alternative protocol for probe denaturation (separate probe and sample denaturation):

1. Denature slide in 70% formamide / 2 x SSC, pH 7.0 at 72 °C (\pm 1 °C) for 2 min.
2. Dehydrate in ice cold (-20 °C) 70%, 85%, and 100% ethanol for 2 min each. Air-dry.
3. Denature probe mix at 90 °C for 10 min and then place on ice.
4. Briefly spin down probe vial, vortex probe vial and then spin down probe vial again.
5. Apply probe to denatured slide, cover with glass coverslip, seal with rubber cement and continue with Hybridization.

Frequently asked questions

I have weak or no signals

- Re-hybridize making sure that the probe has been mixed correctly and that it is at room temperature before use.
- Re-hybridize making sure that the stringency wash (Wash Buffer I) is at the right temperature (72 °C (\pm 1 °C)).
- Account for temperature drop when adding slides to pre-warmed reagents.
- Tissue digestion not optimal (under-digested) – soak off cover slip in 2 x SSC, pH 7.0 for 2 min at RT. Prolong protein digestion by 2 - 20 min.

- Tissue digestion not optimal (over-digested) – Discard slide and start with fresh section. Reduce protein digestion by at least 10 min.
- Use a minimum of 10 μ l of probe per 22 x 22 mm coverslip.
- Check microscope filters and light source are correct and in full working order.

I have high background.

- Tissue digestion not optimal. Under-digested tissue increase background. Soak off cover slip in 2 x SSC, pH 7.0 for 2 min at RT. Prolong protein digestion by 2 - 20 min.
- Increase the temperature of the stringency wash (Wash Buffer I) when washing slides.

I have cross-hybridization when using Centromeric probes.

- Increase the temperature of the stringency wash (Wash Buffer I) when washing slides.

Minimum probe application:

Glass cover slip size	Minimum probe application
22 x 22 mm	10 μ l
22 x 32 mm	15 μ l
22 x 50 mm	23 μ l

Procedural recommendations:

Temperature and buffer concentration (stringency) of hybridization and washing are important, as lower stringency can result in non-specific binding of the probe to other sequences, and higher stringency can result in a lack of signal. Incomplete denaturation of target DNA and/or probe DNA can result in lack of signal.

Material required, but not supplied: Reagents:

1. Xylene
2. Formamide
3. Ethanol 100%, 85% and 70%
4. 0.01 M sodium citrate pH 6.0 or 8% sodium thiocyanate
5. 0.01 M HCl and 0.2M HCl
6. Pepsin Solution RtU (LK-101A)
7. 1 x PBS, pH 7.4
8. 2 x SSC, pH 7.0
9. Wash Buffer I (0.4 x SSC / 0.3% Igepal) (LK-102A)
10. Wash Buffer II (2 x SSC / 0.1% Igepal) (LK-103A)
11. DAPI counterstain (LK-095A (0.1 µg/ml) or LK-096A (1 µg/ml))
12. Counterstain diluent (LK-097A)
13. Fixogum (LK-071A) or rubber cement

Material required, but not supplied: equipment:

1. Thermobrite (TS-01/02) or Thermobrite Elite
(See www.Leicabiosystems.com for more information)
2. Incubator at 37 °C
3. Water bath with accurate temperature from 37 °C to 90 °C
4. Plastic or glass Coplin jar
5. Variable micropipettes (1 µl - 200 µl)
6. Fluorescence microscope equipped with suitable filters (see recommendations for fluorescence microscopy)

Warnings and precautions:

1. For *in vitro* use only. For professional use only. In case of emergencies check SDS sheets for safety information.
2. DNA probes and hybridization buffers contain formamide which is a teratogen; do not inhale or allow skin contact. Wear gloves and a lab coat when handling DNA probes and DAPI counterstain.
3. All materials should be disposed of according to your institution's guidelines for hospital waste disposal.

4. Labelling according Regulation (EC) No 1272/2008

Pictogram



Signal word: Danger

Hazard statement(s)

H351 Suspected of causing cancer.

H360D May damage the unborn child.

H373 May cause damage to organs (Blood) through prolonged or repeated exposure if swallowed.

Precautionary statement(s)

P201 Obtain special instructions before use.

P281 Use personal protective equipment as required.

P308 + P313 IF exposed or concerned: Get medical advice/ attention.

Supplemental Hazard Statements: none

Restricted to professional users

Patents: *These products or the use of these products is subject to proprietary rights. The probes in these products are produced using the Janssen Diagnostics, LLC REPEAT-FREE™ technology and labeled with the Universal Linkage System (ULS™).*

The fluorophore used in the PlatinumBright - 415 labeling compound is subject to patents, owned or controlled, and manufactured by DYOMICS GmbH. US and International patents pending for Janssen Diagnostics, LLC REPEAT-FREE™ technology.

The ULS™ technology and products are covered by one or more of the following US patents 5,580,990; 5,714,327; 5,985,566; 6,133,038; US RE 40,557E, 6,797,818; 7,217,813. KREATECH is a trade name of KREATECH Biotechnology BV. ULS™, PlatinumBright™, are trademarks of KREATECH Biotechnology BV. REPEAT-FREE™ is a trademark of Janssen Diagnostics, LLC.

Thermobrite™ is a registered trademark of Leica Biosystems.

Cell Preparations

Using Kreatech™ FISH probes

Fluorescent *in situ* hybridization (FISH) is used to identify, or label, target genomic sequences so that their location can be studied. DNA sequences from appropriate, chromosome specific probes are first labeled with reporter molecules. The labeled DNA probe is then hybridized to the metaphase chromosomes or interphase nuclei on a slide. After washing, the specimen is screened for the reporter molecules by fluorescence microscopy.

KREATECH REPEAT-FREE FISH probes do not contain C₀t-1 DNA. Hybridization efficiency is therefore increased and background, due to unspecific binding, is greatly reduced.

For use on metaphase and interphase cells from peripheral blood and bone marrow cultures or direct preparations prepared by standard cytogenetic methods, see: The AGT genetics laboratory manual, 3rd ed. New York: Raven Press; 1996.

For optimal results it is advised to use Kreatech's complete Pre-treatment kits (KBI-60005, KBI-60006) which include a specially optimized "Instruction for Use" protocol.

For more info consult our website: <http://www.leicabiosystems.com/ihc-ish/kreatech-fish-probes/>

Pretreatment:

Protocol I (standard protocol, if not satisfactory use protocol II)

1. To age the slides, bake the slides for 10 minutes (min) at 80 °C, then allow slides to cool down to room temperature (RT).
2. Place slides in freshly prepared 70% acetic acid (in deionized H₂O)

(dH₂O)), incubate for 1 min at RT.

3. Place slides in 1 x PBS, pH 7.4, incubate for 30 seconds (s) at RT.
4. Place slides in 1 x PBS, pH7.4, incubate for 5 min at RT.
5. Dehydrate slide in 70%, 85% and 100% ethanol, incubate for 1 min each at RT. Air-dry at RT.

Proceed with Probe preparation.

Protocol II (for slides with high cytoplasmic background or direct preps (amniotic fluid or chronic villi))

1. Pre-warm 2 x SSC, pH 7.0 and 0.01 M HCl at 37 °C
2. Place dry sample slides in pre-warmed 2 x SSC, pH 7.0, incubate at 37 °C for 2 min.
3. Add pepsin to the pre-warmed 0.01 M HCl to a final concentration of 0.005%.
4. Place slides in 0.005% pepsin solution in 0.01 M HCl and incubate at 37 °C for 5 - 15 min (depending on the amount of cytoplasmic background).
5. Place slides in 1 x PBS, pH 7.4, incubate for 3 min at RT.
6. Post-fix slides by incubating in 1% buffered formaldehyde in 1 x PBS / 20 mM MgCl₂ for 10 min at RT.
7. Place slides in 1 x PBS, pH 7.4, incubate for 3 min at RT.
8. Dehydrate slide in 70%, 85% and 100% ethanol, incubate for 1 min each at RT. Air-dry at RT.

Proceed with Probe preparation.

Probe preparation:

Briefly spin down probe vial, vortex probe vial and briefly spin down again before use. Allow probe to reach RT before use.

Most Kreatech FISH probes are supplied Ready-to-Use (RtU).

Centromere, Subtelomere and Whole chromosome FISH probes are provided in 5 x concentrated formats and must be diluted with the provided hybridization buffer and/or other concentrated probes. Consult label on vial and specific probe package insert for dilution specifics.

Co-denaturation:

1. Apply 10 μ l of probe or probe-mix per 22 x 22 mm field.
2. Cover with glass coverslip and seal with Fixogum (LK-071A) or rubber cement.
3. Denature sample and probe on a *Thermobrite* (TS-01/02) for 5 min at 75 °C.

Hybridization:

Incubate overnight at 37 °C in a *Thermobrite* (TS-01/02) or in a humidified chamber.

Post-hybridization wash:

1. Pre-warm Wash Buffer I (0.4 x SSC / 0.3% Igepal) (LK-102A) to 72 °C.
2. Remove rubber cement.
3. Place up to 14 slides in 200 ml of Wash Buffer II (2 x SSC / 0.1% Igepal) (LK-103A), incubate for 2 min at RT. Slide off coverslips. Re-use only once for a total of 28 slides.
4. Place up to 14 slides in 200 ml of pre-warmed Wash Buffer I (0.4 x SSC / 0.3% Igepal) (LK-102A), incubate for 2 min at 72 °C (\pm 1 °C) without agitation. Re-use only once for a total of 28 slides.
5. Place up to 14 slides in 200 ml of fresh Wash Buffer II (2 x SSC / 0.1% Igepal) (LK-103A), incubate for 1 min at RT without agitation. Re-use only once for a total of 28 slides.
6. Dehydrate slides in 70%, 85% and 100% ethanol, incubate for 1 min each at RT. Air-dry at RT.

Proceed to Counterstaining.

Counterstaining:

Apply 15 μ l DAPI counterstain (LK-095A (0.1 μ g/ml) or LK-096A (1 μ g/ml)) and apply glass coverslip. DAPI can be diluted in counterstain diluent (LK-097A) to obtain desired concentration. Place slides in the dark and allow 10 - 15 min for counterstain to develop. Proceed with microscopy.

Recommendations for fluorescence microscopy:

For optimal visualization use a well maintained and regularly calibrated microscope equipped with a 100 W mercury lamp or other appropriate light source and a 63x or 100x fluorescence objective. Triple band-pass filters (DAPI/FITC/Cy3 or DAPI/FITC/TRITC) are used to view multiple colors, single band-pass filters are used for individual color visualization.

Suitable excitation and emission range for Kreatech FISH fluorophores:

Fluorophore	Excitation	Emission
PlatinumBright™ 415	429 ±20 nm	470 ±30 nm
PlatinumBright™ 495	495 ±20 nm	525 ±30 nm
PlatinumBright™ 550	546 ±12 nm	580 ±30 nm

Troubleshooting:

Alternative protocol for cytology specimens:

1. Pre-warm 50 ml of 2 x SSC / 0.5% Igepal (LK-105B) in a Coplin jar to 37 °C in a water bath. Place prepared slides in the Coplin jar and incubate for 15 minutes.
2. Dehydrate slides in 70%, 85%, and 100% ethanol, incubate for 1 min each at RT. Air-dry at RT.

Proceed with Probe preparation.

Alternative protocol for probe denaturation (separate probe and sample denaturation):

1. Prewarm 70% formamide / 2 x SSC, pH 7.0 to 72 °C.
2. Denature slides in 70% formamide / 2 x SSC, pH 7.0, incubate at 72 °C (±1 °C) for 2 min.
3. Dehydrate slides in ice cold (-20 °C) 70%, 85%, and 100% ethanol, incubate for 2 min each. Air-dry at RT.
4. Denature probe mix at 90 °C for 10 min and directly place on ice.
5. Briefly spin down probe vial, vortex probe vial and then spin down probe vial again.

6. Apply probe to denatured slide, cover with glass coverslip, seal with rubber cement.

Proceed with Hybridization.

Frequently asked questions

I have weak or no signals

- Re-hybridize making sure that the probe has been mixed correctly and that is at room temperature before use.
- Re-hybridize making sure that the stringency wash (Wash Buffer I) is at the right temperature (72 °C (± 1 °C)).
- Account for temperature drop when adding slides to pre-warmed reagents.
- Use a minimum of 10 μ l of probe per 22 x 22 mm coverslip.
- Check microscope filters and light source are correct and in full working order.

I have high background or a-specific cross-hybridization when using Centromeric or Subtelomeric probes.

- Increase the temperature of the stringency wash (Wash Buffer I) when washing slides.

Minimum probe application:

Glass cover slip size	Minimum probe application
22 x 22 mm	10 μ l
22 x 32 mm	15 μ l
22 x 50 mm	23 μ l

Procedural recommendations:

Temperature and buffer concentration (stringency) of hybridization and washing are important, as lower stringency can result in non-specific binding of the probe to other sequences, and higher stringency can result in a lack of signal. Incomplete denaturation of target DNA and/or probe DNA can result in lack of signal.

Material required, but not supplied: reagents:

1. FISH reagent Kit (KBI-60005)
2. FISH digestion Kit (KBI-60006)
3. 1% buffered formaldehyde / 1 x PBS / 20 mM MgCl₂
4. 1 x PBS, pH 7.4
5. 2 x SSC, pH 7.0
6. Pepsin solution (LK-101A)
7. Wash buffer I (0.4 x SSC / 0.3% Igepal) (LK-102A)
8. Wash buffer II (2 x SSC / 0.1% Igepal) (LK-103A)
9. Igepal
10. 0.01 M HCl
11. Carnoy's fixative (methanol : acetic acid = 3 : 1)
12. 70% acetic acid (in deionized H₂O)
13. DAPI counterstain (LK-095A (0.1 µg/ml) or LK-096A (1 µg/ml))
14. Counterstain diluent (LK-097A)
15. Formamide
16. Ethanol 100%, 85% and 70%
17. Fixogum (LK-071A) or rubber cement

Material required, but not supplied: equipment:

1. Thermobrite (TS-01/02).
2. Incubator at 37 °C
3. Water bath with accurate temperature from 37 °C to 90 °C
4. Plastic or glass Coplin jar
5. Variable micropipettes (1 µl - 200 µl)
6. Fluorescence microscope equipped with suitable filters (see Recommendations for fluorescence microscopy)

Warnings and precautions:

1. For *in vitro* use only. For professional use only. In case of emergencies check SDS sheets for safety information.
2. DNA probes and hybridization buffers contain formamide which is a teratogen; do not inhale or allow skin contact. Wear gloves and

- a lab coat when handling DNA probes and DAPI counterstain.
- All materials should be disposed of according to your institution's guidelines for hospital waste disposal.
 - Labelling according Regulation (EC) No 1272/2008

Pictogram



Signal word: Danger

Hazard statement(s)

H351 Suspected of causing cancer.

H360D May damage the unborn child.

H373 May cause damage to organs (Blood) through prolonged or repeated exposure if swallowed.

Precautionary statement(s)

P201 Obtain special instructions before use.

P281 Use personal protective equipment as required.

P308 + P313 IF exposed or concerned: Get medical advice/ attention.

Supplemental Hazard Statements: none

Restricted to professional users

Patents: *These products or the use of these products is subject to proprietary rights. The probes in these products are produced using the Janssen Diagnostics, LLC REPEAT-FREE™ technology and labeled with the Universal Linkage System (ULS™).*

The fluorophore used in the PlatinumBright – 415 labeling compound is subject to patents, owned or controlled, and manufactured by DYOMICS GmbH. US and International patents pending for Janssen Diagnostics, LLC REPEAT-FREE™ technology.

The ULS™ technology and products are covered by one or more of the following US patents 5,580,990; 5,714,327; 5,985,566; 6,133,038; US RE 40,557E, 6,797,818; 7,217,813. KREATECH is a trade name of KREATECH Biotechnology BV. ULS™, PlatinumBright™, are trademarks of KREATECH Biotechnology BV. REPEAT-FREE™ is a trademark of Janssen Diagnostics, LLC.

Thermobrite™ is a registered trademark of Leica Biosystems

Mode d'emploi

Tissus inclus dans la paraffine et fixés au formol

L'hybridation *in situ* fluorescente (FISH pour Fluorescent *In Situ* Hybridization -) identifie ou marque des séquences génomiques cibles afin d'étudier leur localisation. Les séquences d'ADN, issues de sondes chromosomiques spécifiques et adéquates, sont d'abord marquées à l'aide de molécules rapporteuses. La sonde ADN marquée est ensuite hybridée à l'ADN cible, dans les noyaux tissulaires. Après lavage, on identifie les molécules rapporteuses sur l'échantillon, à l'aide d'un microscope à fluorescence

Les sondes KREATECH REPEAT-FREE FISH ne contiennent pas d'ADN C₀t-1. L'efficacité de l'hybridation est ainsi accrue et le bruit de fond dû aux hybridations non spécifiques est fortement réduit.

Pour des résultats optimaux sur les coupes tissulaires incluses dans la paraffine, nous vous conseillons d'utiliser les kits de pré-traitement complets Kreatech (Réf. KBI-60004, KBI-60007) incluant un protocole de type « Mode d'emploi » spécialement optimisé.

Pour en savoir plus, rendez-vous sur notre site Internet : <http://www.leicabiosystems.com/ihc-ish/kreatech-fish-probes/>

Sinon, vous pouvez également utiliser les protocoles suivants :

Traitement des lames :

1. Montez des coupes de tissus de 4 - 6 μ m, fixées au formol et incluses dans la paraffine (FFPE), sur des lames chargées positivement.
2. Faites cuire les coupes tissulaires FFPE montées pendant 2 heures à 80 °C, ou pendant 16 heures à 56 °C.
3. Retirez la paraffine des lames dans du xylène ou un substitut du

xylène, puis faites incuber pendant 2 x 10 minutes (min) à Température Ambiante (TA).

4. Réhydratez les lames dans de l'éthanol à 100 %, 85 % et 70 %, pendant 3 min chaque à TA. Laisser sécher à l'air à TA.
5. Placez les lames dans de l'eau (H₂O) désionisée (dH₂O), puis faites incuber pendant 3 min à TA.

Continuez-en suivant le Protocole I ou le Protocole II.

Protocole I (protocole standard – si pas suffisant, utilisez le Protocole II)

1. Préchauffez du citrate de sodium 0,01 M (pH 6,0) à 96 - 98 °C.
2. Préchauffez de l'HCl 0,01 M à 37 °C (Sauf si vous utiliser de la pepsine « Prête à l'emploi (RtU) » (Réf. LK-101A).
3. Placez les lames dans le citrate de sodium 0,01 M (pH 6,0) à 96 - 98 °C, puis faites incuber pendant 15 min.
4. Placez les lames dans de la dH₂O, puis faites incuber pendant 2 min à TA.
5. Ajoutez la pepsine à l'HCl 0,01 M préchauffé pour obtenir une concentration finale de 0 025 %. (sauf si vous utiliser de la pepsine RtU (Réf. LK-101A).
6. Digérez les lames dans de la pepsine 0,01 M à 0,025 %, à 37 °C ou couvrir les lames de pepsine RtU (Réf. LK-101A) à TA, puis faites incuber pendant 5 - 45 min, (la durée dépendant de la fixation et du type tissulaire).
7. Placez les lames dans de dH₂O, puis faites incuber pendant 1 min à TA.
8. Placez les lames dans 1 x PBS (pH 7,4) ou dans 2 x SSC (pH 7,0), puis faites incuber pendant 5 min à TA.
9. Déshydratez les lames dans de l'éthanol à 70 %, 85 % et 100 %, pendant 1 min chaque à TA. Laisser sécher à l'air à TA.

Passez à la préparation de la sonde.

Protocole II (pour les échantillons complexes)

1. Préchauffez du thiocyanate de sodium 8 % à 80 °C.

2. Prétraitez les lames avec de l'HCl 0,2 M, puis faites incuber 20 min à TA.
 3. Placez les lames dans de la dH₂O, puis faites incuber pendant 3 min à TA.
 4. Préchauffez de l'HCl 0,01 M à 37°C (à sauf si vous utiliser de la pepsine RtU (Réf. LK-101A)
 5. Placez les lames dans une solution préchauffée de thiocyanate de sodium 8 % dans dH₂O à 80 °C, pendant 30 min.
 6. Rincez les lames dans 2 x SSC (pH 7,0), pendant 3 min à TA.
 7. Ajoutez la pepsine dans l'HCl 0,01 M préchauffé, pour obtenir une concentration finale de 0,025 % (sauf si vous utiliser de la pepsine RtU (Réf. LK-101A).
 8. Digérez les lames dans la pepsine 0,01 M à 0,025 %, à 37 °C ou couvrir les lames de pepsine RtU (Réf. LK-101A) à TA, puis faites incuber pendant 5 - 45 min, (la durée dépendant de la fixation et du type tissulaire).
 9. Rincez les lames dans de la dH₂O pendant 1 min à TA.
 10. Placez les lames dans 1 x PBS (pH 7,4) ou dans 2 x SSC (pH 7,0) pendant 5 min à TA.
 11. Déshydratez les lames dans de l'éthanol à 70 %, 85 % et 100 %, pendant 1 min chaque à TA. Laisser sécher à l'air libre à TA.
- Passer à la préparation de la sonde.

Préparation de la sonde :

Avant utilisation, centrifuger rapidement le tube contenant la sonde, puis passer le brièvement au Vortex et centrifuger de nouveau rapidement le tube. Laissez la sonde parvenir à TA avant utilisation.

Les sondes Kreatech FISH sont fournies sous forme RtU, sauf mention contraire dans la notice du produit. Pour connaître les caractéristiques de dilution, consultez l'étiquette du flacon et la notice figurant sur l'emballage de la sonde concernée.

Co-dénaturation :

1. Appliquez 10 µl de sonde ou de mélange-sonde par surface de 22 x 22 mm.
2. Recouvrez d'une lamelle en verre puis scellez au Fixogum (Réf. LK-071A) ou à la colle au caoutchouc.
3. Dénaturez l'échantillon et la sonde sur un *Thermobrite* (Réf. TS-01/02), pendant 5 min, à 80 °C.

Hybridation :

Faites incuber toute la nuit à 37 °C dans un *Thermobrite* (Réf. TS-01/02) ou dans une chambre humide.

Lavage post-hybridation :

1. Préchauffez le tampon de lavage Wash Buffer I (0,4 x SSC / Igepal 0,3 %) (Réf. LK-102A) à 72 °C.
2. Retirez la colle au caoutchouc.
3. Placez 14 lames maximum dans 200 ml de tampon de lavage Wash Buffer II (2 x SSC / Igepal 0,1 %) (Réf. LK-103A), puis faites incuber pendant 2 min à TA. Retirez les lamelles en les faisant glisser. À réutiliser une seule fois pour un total de 28 lames.
4. Placez 14 lames maximum dans 200 ml de tampon de lavage préchauffé Wash Buffer I (0,4 x SSC / Igepal 0,3 %) (Réf. LK-102A), puis faites incuber pendant 2 min à 72 °C (± 1 °C) sans agiter. À réutiliser une seule fois pour un total de 28 lames.
5. Placez 14 lames maximum dans 200 ml de tampon de lavage frais Wash Buffer II (2 x SSC / Igepal 0,1 %) (Réf. LK-103A), puis faites incuber pendant 1 min à TA, sans agiter. À réutiliser une seule fois pour un total de 28 lames.
6. Déshydratez dans l'éthanol à 70 %, 85 % et 100 % frais, pendant 1 min à chaque fois à TA. Faites sécher à l'air libre à TA, puis passez à la contre-coloration.

Contre-coloration :

Appliquez 15 µl de contre-colorant DAPI (Réf. LK-095A (0,1 µg/ml) ou

Réf. LK-096A (1 µg/ml) puis appliquez la lamelle en verre. Le DAPI peut être dilué dans un diluant pour contre-colorant (Réf. LK-097A) pour obtenir la concentration souhaitée. Mettez les lames dans le noir puis patientez 10 - 15 min pour que le contre-colorant se diffuse. Passez à la microscopie.

Recommandations concernant la microscopie à fluorescence :

Pour bénéficier d'une visualisation optimale, utilisez un microscope soigneusement entretenu et régulièrement étalonné, équipé d'une lampe à mercure de 100 W ou de toute autre source de lumière adéquate, ainsi que d'un objectif de 63 x 100 x. Utilisez des filtres passe-bande triples (DAPI/FITC/Cy3 ou DAPI/FITC/TRITC) pour voir plusieurs couleurs, ou des filtres passe-bande uniques pour voir une seule couleur.

Excitation souhaitable et gamme d'émission pour les fluorophores Kreatech :

Fluorophore	Excitation	Émission
Platinum <i>Bright</i> ™ 415	429 ± 20 nm	470 ± 30 nm
Platinum <i>Bright</i> ™ 495	495 ± 20 nm	525 ± 30 nm
Platinum <i>Bright</i> ™ 550	546 ± 12 nm	580 ± 30 nm

Evaluation de la digestion.

Vérifiez le prétraitement et la digestion protéique en appliquant 15 µl de contre-colorant DAPI, puis évaluez les lames à l'aide d'un microscope à fluorescence équipé d'un filtre DAPI. Une digestion protéique de 15 min est généralement suffisante pour la plupart des tumeurs du sein. Retirez la lamelle et rincez les tissus dans du 2 x SSC (pH 7,4) pendant 2 min à TA. Dans le cas d'une digestion insuffisante, prolongez la digestion protéique pendant 2 - 20 min. Dans le cas de tissu trop digéré, utilisez un échantillon frais et réduisez la durée de digestion protéique. Autre protocole possible pour la dénaturation de la sonde (dénaturation de la sonde séparée de celle de l'échantillon) :

1. Dénaturez la lame dans de la formamide à 70 % / 2 x SSC (pH 7,0), à 72 °C (± 1 °C), pendant 2 min.
2. Déshydratez les lames dans de l'éthanol à 70 %, 85 % et 100 %, glacé (-20 °C), pendant 2 min chaque. Faites sécher à l'air libre à TA.
3. Dénaturez le mélange de sonde à 90 °C pendant 10 min, puis mettez-le sur de la glace.
4. Centrifugez rapidement le tube contenant la sonde, puis passer le brièvement au Vortex et centrifuger de nouveau rapidement le tube.
5. Appliquez la sonde sur la lame dénaturée, recouvrez d'une lamelle en verre, scellez à l'aide d'une colle au caoutchouc, puis passez à l'hybridation.

Foire Aux Questions (FAQ)

J'obtiens des signaux faibles, voire pas de signal du tout

- Refaites l'hybridation en vous assurant, avant utilisation, que la sonde a été bien mélangée et qu'elle est à température ambiante.
- Refaites l'hybridation en vous assurant que la stringence du lavage (tampon de lavage Wash Buffer I) est à la bonne température (72 °C (± 1 °C)).
- Tenez compte de la chute de la température lorsque vous ajoutez des lames aux réactifs préchauffés.
- La digestion des tissus n'est pas optimale (ils sont sous-digérés) – Plongez la lamelle dans 2 x SSC (pH 7,0) pendant 2 min à TA. Prolongez la digestion des protéines pendant 2 - 20 min.
- La digestion des tissus n'est pas optimale (ils sont trop digérés) – Jetez la lame et recommencez avec une coupe fraîche. Réduisez la digestion des protéines d'au moins 10 min.
- Utilisez au minimum 10 μ l de sonde par lamelle de 22 x 22 mm.
- Assurez-vous que les filtres et la source de lumière du microscope sont adéquats et en bon état de marche.

J'ai un bruit de fond très présent.

- La digestion des tissus n'est pas optimale. Les tissus sous-digérés accentuent le bruit de fond. Plongez la lamelle dans 2 x SSC (pH 7,0) pendant 2 min à TA. Prolongez la digestion des protéines pendant 2 - 20 min.
- Augmentez la température du lavage de stringence (tampon de lavage Wash Buffer I) lors du lavage des lames.

J'obtiens une hybridation croisée lorsque j'utilise des sondes centromériques.

- Augmentez la température du lavage de stringence (tampon de lavage Wash Buffer I) lors du lavage des lames.

Qté minimale de sonde à appliquer :

Taille de la lamelle en verre	Qté minimale de sonde à appliquer
22 x 22 mm	10 µl
22 x 32 mm	15 µl
22 x 50 mm	23 µl

Recommandations concernant la procédure :

La température et la concentration du tampon (stringence) de l'hybridation et du lavage sont importantes car une faible stringence peut entraîner une liaison non-spécifique de la sonde à d'autres séquences, et une forte stringence peut entraîner l'absence de signal. Une dénaturation incomplète de l'ADN cible et/ou de l'ADN de la sonde peut entraîner l'absence de signal.

Matériel requis mais non fourni : Réactifs :

1. Xylène
2. Formamide
3. Éthanol à 100 %, 85 % et 70 %
4. Citrate de sodium 0,01 M (pH 6,0) ou thiocyanate de sodium 8 %

5. HCl 0,01 M et HCl 0,2 M
6. Solution de pepsine RtU (Réf. LK-101A)
7. 1 x PBS (pH 7,4)
8. 2 x SSC (pH 7,0)
9. Tampon de lavage Wash Buffer I (0,4 x SSC / Igepal 0,3 %) (Réf. LK-102A)
10. Tampon de lavage Wash Buffer II (2 x SSC / Igepal 0,1 %) (Réf. LK-103A)
11. Contre-colorant DAPI (Réf. LK-095A (0,1 µg/ml) ou Réf. LK-096A (1 µg/ml)
12. Diluant pour contre-colorant (Réf. LK-097A)
13. Fixogum (Réf. LK-071A) ou colle au caoutchouc

Matériel requis mais non fourni : équipement :

1. *Thermobrite* (Réf. TS-01/02) ou *Thermobrite Elite* (Consultez le site Internet www.Leicabiosystems.com pour en savoir plus)
2. Incubateur à 37 °C
3. Bain-marie avec température précise de 37 °C à 90 °C
4. Récipient de type Coplin en plastique ou en verre
5. Micropipettes à volume variable (1 à 200 µl)
6. Microscope à fluorescence doté des filtres adéquats (Cf. « Recommandations concernant la microscopie à fluorescence »)

Avertissement et précautions :

1. Réservé à une utilisation *in vitro*. Réservé aux professionnels. En cas d'urgence, consultez les fiches FDS pour prendre connaissance des informations liées à la sécurité.
2. Les sondes ADN et les tampons d'hybridation contiennent du formamide (une substance tératogène) ; ne les inhalez pas et ne les mettez pas en contact avec la peau. Portez des gants et une blouse de laboratoire quand vous manipulez des sondes ADN et du contre-colorant DAPI.

3. Tous les articles/produits doivent être jetés conformément aux directives de votre établissement en matière d'élimination des déchets hospitaliers.
4. Étiquetage en accord avec la réglementation (CE) n° 1272/2008



Mention d'avertissement : Danger

Mention de danger

H351 Susceptible de provoquer le cancer.

H360D Peut nuire au fœtus.

H373 Risque présumé d'effets graves pour les organes (sang) à la suite d'expositions répétées ou d'une exposition prolongée en cas d'ingestion.

Conseils de prudence

P201 Se procurer les instructions avant utilisation.

P281 Utiliser l'équipement de protection individuel requis.

P308 + P313 EN CAS d'exposition prouvée ou suspectée : consulter un médecin.

Informations additionnelles sur les dangers : aucune

Réservé aux utilisateurs professionnels

Brevets : ces produits ou l'utilisation de ces produits sont soumis à des droits de propriété. Les sondes contenues dans ces produits sont produites à l'aide de la technologie REPEAT-FREE™ de Janssen Diagnostics, LLC et marquées à l'aide du dispositif Universal Linkage System (ULS™).

Le fluorophore utilisé pour le composé de marquage PlatinumBright - 415 est protégé par des brevets, détenu ou contrôlé, et fabriqué par DYOMICS GmbH. Brevets US et internationaux en cours d'homologation concernant la technologie REPEAT-FREE™ de Janssen Diagnostics, LLC.

La technologie et les produits ULS™ sont couverts par un ou plusieurs de ces brevets US : 5,580,990 ; 5,714,327 ; 5,985,566 ; 6,133,038 ; US RE 40,557E, 6,797,818 ; 7,217,813.

KREATECH est le nom commercial de KREATECH Biotechnology BV. ULS™, PlatinumBright™ sont des marques commerciales de KREATECH Biotechnology BV. REPEAT-FREE™ est une marque commerciale de Janssen Diagnostics, LLC.

ThermoBrite™ est une marque déposée de Leica Biosystems.

Des préparations de cellules

Utilisation de sondes Kreatech™ FISH

L'hybridation *in situ* fluorescente (FISH pour Fluorescent *In Situ* Hybridization -) identifie ou marque des séquences génomiques cibles afin d'étudier leur localisation. Les séquences d'ADN, issues de sondes chromosomiques spécifiques et adéquates, sont d'abord marquées à l'aide de molécules rapporteuses. La sonde ADN marquée est ensuite hybridée aux chromosomes en métaphase ou aux noyaux en interphase sur une lame. Après lavage, on identifie les molécules rapporteuses sur l'échantillon, à l'aide d'un microscope à fluorescence.

Les sondes KREATECH REPEAT-FREE FISH ne contiennent pas d'ADN C₀t-1. L'efficacité de l'hybridation est ainsi accrue et le bruit de fond dû aux hybridations non spécifiques est fortement réduit.

Pour utilisation sur des cellules en métaphase ou en interphase, issues de cultures de sang périphérique ou de moelle osseuse, ou de préparations directes effectuées par des méthodes cytogénétiques standard, consultez : The ACT genetics laboratory manual, 3rd ed. New York: Raven Press; 1996.

Pour des résultats optimaux, nous vous conseillons d'utiliser les kits de prétraitement complets Kreatech (Réf. KBI-60005, KBI-60006) incluant un protocole « Mode d'emploi » spécialement optimisé.

Pour en savoir plus, rendez-vous sur notre site Internet : <http://www.leicabiosystems.com/ihc-ish/kreatech-fish-probes/>

Prétraitement :

Protocole I (protocole standard - si pas suffisant, utilisez le Protocole II)

1. Pour vieillir les lames, faites les cuire pendant 10 minutes (min) à 80 °C, puis laissez-les refroidir à Température Ambiante (TA).

2. Incuber les lames pendant 1 min à TA dans de l'acide acétique à 70 % fraîchement préparé dans de l'H₂O désionisée (dH₂O).
3. Incuber les lames pendant 30 secondes à TA dans 1 x PBS (pH 7,4)
4. Incuber les lames pendant 5 min à TA dans 1 x PBS (pH 7,4).
5. Déshydratez les lames dans de l'éthanol à 70 %, 85 % et 100 %, pendant 1 min chaque à TA. Laisser sécher à l'air à TA.

Procéder à la préparation de la sonde.

Protocole II (pour des lames présentant beaucoup de cytoplasme ou pour des préparations directes (liquide amniotique ou villosités choriales)

1. Préchauffez 2 x SSC (pH 7,0) et HCl 0,01 M à 37 °C
2. Incuber les lames sèches dans du 2 x SSC (pH 7,0) à 37 °C pendant 2 min.
3. Ajoutez la pepsine à l'HCl 0,01 M préchauffé pour obtenir une concentration finale de 0,005 %.
4. Placez les lames pendant 5 - 15 min (durée dépendante de l'échantillon) dans la solution de 0,005 % de pepsine dans l'HCl 0,01 M, puis faites incuber à 37 °C
5. Placez les lames pendant 3 min à TA dans 1 x PBS (pH 7,4)
6. Post-fixez les lames dans une solution de formaldéhyde 1 % dans 1 x PBS / MgCl 20 mM pendant 10 min à TA.
7. Placez les lames pendant 3 min à TA dans 1 x PBS (pH 7,4)
Déshydratez les lames dans de l'éthanol à 70 %, 85 % et 100 %, pendant 1 min chaque à TA. Laisser sécher à l'air à TA.

Procéder à la préparation de la sonde.

Préparation de la sonde :

Avant utilisation, centrifuger rapidement le tube contenant la sonde, puis passer le brièvement au Vortex et centrifuger de nouveau rapidement le tube. Laissez la sonde parvenir à TA avant utilisation.

La plupart des sondes FISH sont fournies « prêtes à l'emploi » (RtU).

Les sondes centromériques, subtélomériques et chromosome complet sont fournies en formats concentrés 5 x ; elles doivent être diluées à l'aide du tampon d'hybridation fourni et/ou avec d'autres sondes concentrées. Pour connaître les caractéristiques de dilution, consultez l'étiquette du flacon et la notice figurant sur l'emballage de la sonde concernée.

Co-dénaturation :

1. Appliquez 10 µl de sonde ou de mélange-sonde par surface de 22 x 22 mm.
2. Recouvrez d'une lamelle en verre puis scellez au Fixogum (Réf. LK-071A) ou de la colle au caoutchouc
3. Dénaturez l'échantillon et la sonde sur un *Thermobrite* (Réf. TS-01/02), pendant 5 min, à 75 °C.

Hybridation :

Faites incuber toute la nuit à 37 °C dans un *Thermobrite* (Réf. TS-01/02) ou dans une chambre humide.

Lavage post-hybridation :

1. Préchauffez le tampon de lavage Wash Buffer I (0,4 x SSC / Igepal 0,3 %) (Réf. LK-102A) à 72 °C.
2. Retirez la colle au caoutchouc.
3. Placez 14 lames maximum dans 200 ml de tampon de lavage Wash Buffer II (2 x SSC / Igepal 0,1 %) (Réf. LK-103A), puis faites incuber pendant 2 min à TA. Retirez les lamelles en les faisant glisser. À réutiliser une seule fois pour un total de 28 lames.
4. Placez 14 lames maximum dans 200 ml de tampon de lavage préchauffé Wash Buffer I (0,4 x SSC / Igepal 0,3 %) (Réf. LK-102A), puis faites incuber pendant 2 min à 72 °C (± 1 °C) sans agiter. À réutiliser une seule fois pour un total de 28 lames.
5. Placez 14 lames maximum dans 200 ml de tampon de lavage frais Wash Buffer II (2 x SSC / Igepal 0,1 %) (Réf. LK-103A), puis faites

incuber pendant 1 min à TA, sans agiter. À réutiliser une seule fois pour un total de 28 lames.

- Déshydratez les lames dans l'éthanol à 70 %, 85 % et 100 % pendant 1 min à chaque fois à TA. Faites sécher à l'air libre à TA. Passez à la contre-coloration.

Contre-coloration :

Appliquez 15 µl de contre-colorant DAPI (Réf. LK-095A (0,1 µg/ml) ou Réf. LK-096A (1 µg/ml) puis appliquez la lamelle en verre. Le DAPI peut être dilué dans un diluant pour contre-colorant (Réf. LK-097A) pour obtenir la concentration souhaitée. Mettez les lames dans le noir puis patientez 10 - 15 min pour que le contre-colorant se diffuse. Passez à la microscopie.

Recommandations concernant la microscopie à fluorescence :

Pour bénéficier d'une visualisation optimale, utilisez un microscope soigneusement entretenu et régulièrement étalonné, équipé d'une lampe à mercure de 100 W ou de toute autre source de lumière adéquate, ainsi que d'un objectif de 63 x 100 x. Utilisez des filtres passe-bande triples (DAPI/FITC/Cy3 ou DAPI/FITC/TRITC) pour voir plusieurs couleurs, ou des filtres passe-bande uniques pour voir une seule couleur.

Excitation souhaitable et gamme d'émission pour les fluorophores Kreatech FISH :

Fluorophore	Excitation	Émission
Platinum <i>Bright</i> ™ 415	429 ±20 nm	470 ±30 nm
Platinum <i>Bright</i> ™ 495	495 ±20 nm	525 ±30 nm
Platinum <i>Bright</i> ™ 550	546 ±12 nm	580 ±30 nm

Protocole alternatif pour les échantillons Cytologie :

- Préchauffez 50 ml de 2 x SSC / Igepal 0,5 % (Réf. LK-105B) dans un récipient de type Coplin, à 37 °C, dans un bain-marie. Placez

les lames préparées dans un récipient de type Coplin, puis faites incuber pendant 15 min.

2. Déshydratez les lames dans l'éthanol à 70 %, 85 % et 100 %, pendant 1 min à chaque fois à TA. Faites sécher à l'air libre à TA.

Autre protocole possible pour la dénaturation de la sonde (dénaturation de la sonde séparée de celle de l'échantillon) :

1. Préchauffez la formamide 70 % / 2 x SSC (pH 7,0) à 72 °C.
2. Dénaturez les lames dans de la formamide 70 % / 2 x SSC (pH 7,0), puis faites incuber à 72 °C (± 1 °C), pendant 2 min.
3. Déshydratez les lames dans de l'éthanol à 70 %, 85 % et 100 %, glacé (-20 °C), pendant 2 min chaque. Faites sécher à l'air libre à TA.
4. Dénaturez le mélange de sonde à 90 °C pendant 10 min et mettez-le directement sur de la glace.
5. Centrifugez rapidement le tube contenant la sonde, puis passer le brièvement au Vortex et centrifuger de nouveau rapidement le tube.
6. Appliquez la sonde sur la lame dénaturée, recouvrez d'une lamelle en verre, Scellez à l'aide d'une colle au caoutchouc.

Passez à l'hybridation.

Foire Aux Questions (FAQ)

J'obtiens des signaux faibles, voire pas de signal du tout

- Refaites l'hybridation en vous assurant, avant utilisation, que la sonde a été bien mélangée et qu'elle est à température ambiante.
- Refaites l'hybridation en vous assurant que la stringence du lavage (tampon de lavage Wash Buffer I) est à la bonne température (72 °C (± 1 °C)).
- Tenez compte de la chute de la température lorsque vous ajoutez des lames aux réactifs préchauffés.
- Utilisez au minimum 10 μ l de sonde par lamelle de 22 x 22 mm.
- Assurez-vous que les filtres et la source de lumière du microscope sont adéquats et en bon état de marche.

J'ai un bruit de fond très présent ou une hybridation croisée spécifique quand j'utilise des sondes centromériques ou subtélomériques.

- Augmentez la température de stringence du lavage (tampon de lavage Wash Buffer I) lors du Lavage des lames.

Qté minimale de sonde à appliquer :

Taille de la lamelle en verre Qté minimale de sonde à appliquer

Taille de la lamelle en verre	Qté minimale de sonde à appliquer
22 x 22 mm	10 μ l
22 x 32 mm	15 μ l
22 x 50 mm	23 μ l

Recommandations concernant la procédure :

La température et la concentration du tampon (stringence) de l'hybridation et du lavage sont importantes car une faible stringence peut entraîner une liaison non-spécifique de la sonde à d'autres séquences, et une forte stringence peut entraîner l'absence de signal. Une dénaturation incomplète de l'ADN cible et/ou de l'ADN de la sonde peut entraîner l'absence de signal.

Matériel requis mais non fourni : réactifs :

1. Kit de réactif FISH (Réf. KBI-60005)
2. Kit de digestion FISH (Réf. KBI-60006)
3. Formaldéhyde tamponné 1 % / 1 x PBS / $MgCl_2$ 20 mM
4. 1 x PBS (pH 7,4)
5. 2 x SSC (pH 7,0)
6. Solution de pepsine (Réf. LK-101A)
7. Tampon de lavage Wash Buffer I (0,4 x SSC / Igepal 0,3 %) (Réf. LK-102A)
8. Tampon de lavage Wash Buffer II (2 x SSC / Igepal 0,1 %) (Réf. LK-103A)
9. Igepal

10. HCl 0,01 M
11. Fixateur de type Carnoy (méthanol : acide acétique = 3 : 1)
12. Acide acétique 70 % (dans H₂O désionisée)
13. Contre-colorant DAPI (Réf. LK-095A (0,1 µg/ml) ou Réf. LK-096A (1 µg/ml))
14. Diluant pour contre-colorant (Réf. LK-097A)
15. Formamide
16. Éthanol à 100 %, 85 % et 70 %
17. Fixogum (Réf. LK-071A) ou colle au caoutchouc

Matériel requis mais non fourni : équipement :

1. Thermobrite (TS-01/02).
2. Incubateur à 37 °C
3. Bain-marie avec température précise de 37 °C à 90 °C
4. Récipient de type Coplin en plastique ou en verre
5. Micropipettes à volume variable (1 à 200 µl)
6. Microscope à fluorescence doté des filtres adéquats (Cf. « Recommandations concernant la microscopie à fluorescence »)

Avertissement et précautions :

1. Réservé à une utilisation *in vitro*. Réservé aux professionnels. En cas d'urgence, consultez les fiches FDS pour prendre connaissance des informations liées à la sécurité.
2. Les sondes ADN et les tampons d'hybridation contiennent de la formamide (une substance tératogène) ; ne les inhalez pas et ne les mettez pas en contact avec la peau. Portez des gants et une blouse de laboratoire quand vous manipulez des sondes ADN et du contre-colorant DAPI.
3. Tous les articles/produits doivent être jetés conformément aux directives de votre établissement en matière d'élimination des déchets hospitaliers.
4. Étiquetage en accord avec la réglementation (CE) n° 1272/2008

Pictogramme



Mention d'avertissement : Danger

Mention de danger

H351 Susceptible de provoquer le cancer.

H360D Peut nuire au fœtus.

H373 Risque présumé d'effets graves pour les organes (sang) à la suite d'expositions répétées ou d'une exposition prolongée en cas d'ingestion.

Conseils de prudence

P201 Se procurer les instructions avant utilisation.

P281 Utiliser l'équipement de protection individuel requis.

P308 + P313 EN CAS d'exposition prouvée ou suspectée : consulter un médecin.

Informations additionnelles sur les dangers : aucune

Réservé aux utilisateurs professionnels

Brevets : ces produits ou l'utilisation de ces produits sont soumis à des droits de propriété. Les sondes contenues dans ces produits sont produites à l'aide de la technologie REPEAT-FREE™ de Janssen Diagnostics, LLC et marquées à l'aide du dispositif Universal Linkage System (ULS™).

Le fluorophore utilisé pour le composé de marquage PlatinumBright - 415 est protégé par des brevets, détenu ou contrôlé, et fabriqué par DYOMICS GmbH. Brevets US et internationaux en cours d'homologation concernant la technologie REPEAT-FREE™ de Janssen Diagnostics, LLC.

La technologie et les produits ULS™ sont couverts par un ou plusieurs de ces brevets US : 5,580,990 ; 5,714,327 ; 5,985,566 ; 6,133,038 ; US RE 40,557E, 6,797,818 ; 7,217,813.

KREATECH est le nom commercial de KREATECH Biotechnology BV. ULS™, PlatinumBright™ sont des marques commerciales de KREATECH Biotechnology BV. REPEAT-FREE™ est une marque commerciale de Janssen Diagnostics, LLC.

Thermobrite™ est une marque déposée de Leica Biosystems

Gebrauchsanleitung

Formalinfixierte, in paraffin eingebettete gewebeprobe

Verwendung von Kreatech™ FISH-Sonden

Die Technik der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) wird zur Identifizierung oder Markierung von Ziel-Gensequenzen eingesetzt, um deren Lokalisierung zu untersuchen. Zunächst werden DNA-Sequenzen aus geeigneten spezifischen chromosomalen Strukturen mit Reportermolekülen markiert. Die markierte DNA-Sonde wird dann mit der Ziel-DNA im Zellkern des Gewebes hybridisiert. Nach dem Waschen wird die Probe mittels Fluoreszenzmikroskopie auf die Reportermoleküle überprüft.

KREATECH REPEAT-FREE FISH-Sonden enthalten keine C₀t-1 DNA. Die Hybridisierungseffizienz ist daher höher und unspezifische Bindungen, die zu einem hohen Hintergrundrauschen führen, werden deutlich reduziert.

Zur Erzielung optimaler Ergebnisse für formalinfixierte, in Paraffin eingebettete Gewebeschnitte wird die Verwendung der kompletten Kreatech Vorbehandlungskits (KBI-60004, KBI-60007) empfohlen, die ein speziell optimiertes Gebrauchsanleitungsprotokoll enthalten.

Weitere Informationen finden Sie auf unserer Website: <http://www.leicabiosystems.com/ihc-ish/kreatech-fish-probes/>

Alternativ dazu können auch die folgenden Protokolle verwendet werden:

Objektträger-vorbehandlung:

1. 4 - 6 µm dicke formalinfixierte, in Paraffin eingebettete (FFPE)

- Gewebeschnitte auf positiv geladene Objektträger aufziehen.
2. Aufgezogene FFPE-Gewebeschnitte 2 Stunden lang bei 80 °C oder 16 Stunden lang bei 56 °C anbacken.
 3. Objektträger in Xylol oder Xylol-Ersatz entparaffinieren, 2 x 10 Minuten (Min.) bei Raumtemperatur (RT) inkubieren.
 4. Objektträger in einer Folge von Ethanolkonzentrationen (100 %, 85 % und 70 %) rehydrieren, jeweils 3 Min. lang bei RT inkubieren.
 5. Objektträger in deionisiertes H₂O (dH₂O) legen, 3 Min. bei RT inkubieren.

Mit Protokoll I oder Protokoll II fortfahren.

Protokoll I (Standardprotokoll, wenn nicht zufriedenstellend, Protokoll II verwenden)

1. 0,01 M Natriumcitrat pH 6,0 auf 96 - 98 °C vorwärmen.
2. 0,01 M HCl auf 37 °C vorwärmen (sofern nicht gebrauchsfertiges (Ready-to-Use, RtU) Pepsin (LK-101A) verwendet wird).
3. Objektträger in 0,01 M Natriumcitrat pH 6,0 bei 96 - 98 °C legen, 15 Min. inkubieren.
4. Objektträger in dH₂O legen, 2 Min. bei RT inkubieren.
5. Pepsin zu vorgewärmtem 0,01 M HCl hinzugeben, um finale Konzentration von 0,025 % zu erreichen. (Sofern nicht RtU Pepsin (LK-101A) verwendet wird).
6. Objektträger in 0,025 % Pepsin in 0,01 M HCl bei 37 °C inkubieren oder Gewebe mit RtU Pepsin (LK-101A) bei RT bedecken, 5 - 45 Min. inkubieren (Dauer ist abhängig vom Fixierungsgrad des Gewebes und vom Gewebetyp).
7. Objektträger in dH₂O legen, 1 Min. bei RT inkubieren.
8. Objektträger in 1 x PBS, pH 7,4, oder 2 x SSC, pH 7,0, legen, 5 Min. bei RT inkubieren.
9. Objektträger in einer Folge von Ethanolkonzentrationen (70 %, 85 % und 100 %) dehydrieren, jeweils 1 Min. lang bei RT inkubieren. Bei RT an der Luft trocknen lassen.

Mit der Sondenvorbereitung fortfahren.

Protokoll II (für Proben mit starkem Cross-Linking)

1. 8%iges Natriumthiocyanat auf 80 °C vorwärmen.
2. Objektträger mit 0,2 M HCl vorbehandeln, 20 Min. bei RT inkubieren.
3. Objektträger in dH₂O legen, 3 Min. bei RT inkubieren.
4. 0,01 M HCl auf 37 °C vorwärmen (sofern nicht RtU Pepsin (LK-101A) verwendet wird).
5. Objektträger in vorgewärmtes 8%iges Natriumthiocyanat in dH₂O bei 80 °C legen, 30 Min. lang inkubieren.
6. Objektträger in 2 x SSC, pH 7,0, legen, 3 Min. lang bei RT inkubieren.
7. Pepsin zu vorgewärmtem 0,01 M HCl hinzugeben, um eine finale Konzentration von 0,025 % zu erreichen (sofern nicht RtU Pepsin (LK-101A) verwendet wird).
8. Objektträger in 0,025 % Pepsin in 0,01 M HCl bei 37 °C inkubieren oder Gewebe mit RtU Pepsin (LK-101A) bei RT bedecken, 5 - 45 Min. inkubieren (Dauer ist abhängig vom Fixierungsgrad des Gewebes und vom Gewebetyp).
9. Objektträger in dH₂O legen, 1 Min. bei RT inkubieren.
10. Objektträger in 1 x PBS, pH 7,4, oder 2 x SSC, pH 7,0, legen, 5 Min. bei RT inkubieren.
11. Objektträger in einer Folge von Ethanolkonzentrationen (70 %, 85 % und 100 %) dehydrieren, jeweils 1 Min. lang bei RT inkubieren. Bei RT an der Luft trocknen lassen.

Mit der Sondenvorbereitung fortfahren.

Sondenvorbereitung:

Sonden-Röhrchen kurz herunterzentrifugieren, Sonden-Röhrchen vortexen und vor Gebrauch noch einmal kurz herunterzentrifugieren. Sonde vor Gebrauch RT erreichen lassen.

Kreatech FISH-Sonden werden gebrauchsfertig geliefert, sofern in der Produktdokumentation nicht anders angegeben. Nähere Angaben zur Verdünnung sind auf dem Etikett des Röhrchens und in der Packungsbeilage zur jeweiligen Sonde zu finden.

Co-denaturierung:

1. 10 µl Sonde oder Sondenmix pro 22 x 22-mm-Feld aufbringen.
2. Deckglas auflegen und mit Fixogum (LK-071A) oder Gummilösung versiegeln.
3. Probe und Sonde in einem *Thermobrite* (TS-01/02) 5 Min. lang bei 80 °C denaturieren.

Hybridisierung:

Über Nacht bei 37 °C in einem *Thermobrite* (TS-01/02) oder in einer feuchten Kammer inkubieren.

Post-hybridisierungs-waschschritte:

1. Waschpuffer I (0,4 x SSC / 0,3 % Igepal) (LK-102A) auf 72 °C vorwärmen.
2. Gummilösung entfernen.
3. Bis zu 14 Objektträger in 200 ml Waschpuffer II (2 x SSC / 0,1 % Igepal) (LK-103A) legen, 2 Min. bei RT inkubieren. Deckgläser ablösen. Nur einmal für insgesamt 28 Objektträger verwenden.
4. Bis zu 14 Objektträger in 200 ml vorgewärmten Waschpuffer I (0,4 x SSC / 0,3 % Igepal) (LK-102A) legen, 2 Min. lang bei 72 °C (± 1 °C) ohne Schütteln inkubieren. Nur einmal für insgesamt 28 Objektträger verwenden.
5. Bis zu 14 Objektträger in 200 ml frischen Waschpuffer II (2 x SSC / 0,1 % Igepal) (LK-103A) legen, 1 Min. bei RT ohne Schütteln inkubieren. Nur einmal für insgesamt 28 Objektträger verwenden.
6. Objektträger in einer Folge von frischen Ethanolkonzentrationen (70 %, 85 % und 100 %) dehydrieren, jeweils 1 Min. lang bei RT inkubieren. Bei RT an der Luft trocknen lassen und mit Gegenfärbung fortfahren.

Gegenfärbung:

15 µl DAPI-Gegenfärbemittel (LK-095A (0,1 µg/ml) oder LK-096A (1 µg/ml)) aufbringen und mit einem Deckglas verschließen. DAPI kann in

Gegenfärbungslösung (LK-097A) verdünnt werden, um die gewünschte Konzentration zu erhalten. Objektträger im Dunkeln platzieren und 10 - 15 Min. warten, bis sich die Gegenfärbung entwickelt. Mit der Mikroskopie fortfahren.

Empfehlungen für die Fluoreszenzmikroskopie:

Für eine optimale Visualisierung empfehlen wir ein gut gewartetes und regelmäßig kalibriertes Mikroskop, das mit einer 100-Watt-Quecksilberlampe oder einer anderen geeigneten Lichtquelle und einem 63x- oder 100x-Fluoreszenzobjektiv ausgestattet ist. Dreifach-Bandpassfilter (DAPI/FITC/Cy3 oder DAPI/FITC/TRITC) werden zur Beobachtung mehrerer Farben und einfache Bandpassfilter für die Visualisierung einzelner Farben verwendet.

Geeignete Anregungs- und Emissionsspektren für Kreatech Fluorophore:

Fluorophor	Anregung	Emission
Platinum <i>Bright</i> ™ 415	429 ±20 nm	470 ±30 nm
Platinum <i>Bright</i> ™ 495	495 ±20 nm	525 ±30 nm
Platinum <i>Bright</i> ™ 550	546 ±12 nm	580 ±30 nm

Fehlerbehebung.

Prüfen Sie den Proteinaufschluss und die Vorbehandlung durch Auftragen von 15 µl DAPI Gegenfärbemittel und werten Sie die Objektträger mittels eines Fluoreszenzmikroskops mit DAPI-Filter aus. 15 Minuten Proteinaufschluss reichen bei den meisten Brusttumoren normalerweise aus. Deckglas entfernen und Gewebe für 2 Minuten in 2 x SSC, pH 7,4 bei RT waschen. Proteinaufschluss um 2 - 20 Minuten verlängern, falls die Probe nicht genügend aufgeschlossen ist. Eine frische Probe nehmen und die Proteinaufschlusszeit verkürzen, falls die Probe zu stark aufgeschlossen ist.

Alternatives Protokoll für die Sonden-Denaturierung (getrennte Denaturierung von Sonde und Probe):

1. Objektträger 2 Min. lang in 70%igem Formamid / 2 x SSC, pH 7,0, bei 72 °C (± 1 °C) denaturieren.
2. In einer Folge eiskalter (-20 °C) Ethanolkonzentrationen (70 %, 85 % und 100 %) jeweils für 2 Min. dehydrieren. An der Luft trocknen lassen.
3. Sondenmix bei 90 °C 10 Min. lang denaturieren und dann auf Eis legen.
4. Sonden-Röhrchen kurz herunterzentrifugieren, Sonden-Röhrchen vortexen und Sonden-Röhrchen dann noch einmal kurz herunterzentrifugieren.
5. Die Sonde auf den denaturierten Objektträger auftragen, Deckglas auflegen, mit Gummilösung versiegeln und mit der Hybridisierung fortfahren.

Häufig gestellte Fragen

Ich erhalte schwache oder gar keine Signale.

- Führen Sie eine Re-Hybridisierung durch und stellen Sie dabei sicher, dass die Sonde richtig gemixt wurde und vor Verwendung Raumtemperatur erreicht hat.
- Führen Sie eine Re-Hybridisierung durch und stellen Sie dabei sicher, dass der Stringenzwaschpuffer (Waschpuffer I) die richtige Temperatur (72 °C (± 1 °C)) hat.
- Berücksichtigen Sie den Temperaturabfall, wenn Objektträger in vorgewärmte Reagenzien gelegt werden.
- Bei nicht optimalem Gewebeaufschluss (zu wenig aufgeschlossen): Deckglas abnehmen und Gewebe in 2 x SSC, pH 7,0, 2 Min. lang bei RT waschen. Proteinaufschluss um 2 - 20 Min. verlängern.
- Bei nicht optimalem Gewebeaufschluss (zu stark aufgeschlossen): Objektträger entsorgen und mit frischem Schnitt starten. Proteinaufschluss um mindestens 10 Min. verkürzen.
- Verwenden Sie mindestens 10 μ l Sonde pro 22 x 22-mm-Deckglas.
- Vergewissern Sie sich, dass die Mikroskopfilter und die Lichtquel-

le richtig ausgewählt und voll funktionsfähig sind.

Ich habe ein hohes Hintergrundrauschen.

- Der Gewebeaufschluss ist nicht optimal. Zu wenig aufgeschlossenes Gewebe erhöht das Hintergrundrauschen. Deckglas entfernen und Gewebe für 2 Minuten in 2 x SSC, pH 7,0, bei RT waschen. Proteinaufschluss um 2 - 20 Min. verlängern.
- Erhöhen Sie die Temperatur des Stringenzwaschpuffers (Waschpuffer I) beim Waschen der Objektträger.

Ich habe eine hohe Kreuzhybridisierung bei Verwendung von Zentromer-Sonden.

- Erhöhen Sie die Temperatur des Stringenzwaschpuffers (Waschpuffer I) beim Waschen der Objektträger.

Mindestsondenauftragung:

Deckglasgröße	Mindestsondenauftragung
22 x 22 mm	10 μ l
22 x 32 mm	15 μ l
22 x 50 mm	23 μ l

Verfahrensempfehlungen:

Temperatur und Pufferkonzentration der Lösungen (Stringenz) der Hybridisierung und Waschschrte sind wichtig, da eine geringere Stringenz zu einer unspezifischen Bindung der Sonde an andere Sequenzen und eine höhere Stringenz zu schwächeren Signalen führen kann. Eine unvollständige Denaturierung der Ziel-DNA und/oder der Sonden-DNA kann zum vollständigen Fehlen von Signalen führen.

Erforderliches Material (nicht mitgeliefert): Reagenzien:

1. Xylol
2. Formamid

3. Ethanol 100 %, 85 % und 70 %
4. 0,01 M Natriumcitrat, pH 6,0 oder 8 % Natriumthiocyanat
5. 0,01 M HCl und 0,2 M HCl
6. Pepsinlösung RtU (LK-101A)
7. 1 x PBS, pH 7,4
8. 2 x SSC, pH 7,0
9. Waschpuffer I (0,4 x SSC / 0,3 % Igepal) (LK-102A)
10. Waschpuffer II (2 x SSC / 0,1 % Igepal) (LK-103A)
11. DAPI-Gegenfärbemittel (LK-095A (0,1 µg/ml) oder LK-096A (1 µg/ml)}
12. Gegenfärbungslösung (LK-097A)
13. Fixogum (LK-071A) oder Gummilösung

Erforderliches material (nicht mitgeliefert):

ausrüstung:

1. *Thermobrite* (TS-01/02) oder *Thermobrite* Elite (weitere Informationen siehe www.Leicabiosystems.com)
2. Brutschrank bei 37 °C
3. Wasserbad mit genauer Temperatur zwischen 37 °C und 90 °C
4. Coplin-Küvetten aus Kunststoff oder Glas
5. Verschiedene Mikropipetten (1 µl - 200 µl)
6. Fluoreszenzmikroskop mit geeigneten Filtern (siehe Empfehlungen für die Fluoreszenzmikroskopie)

Warnhinweise und vorsichtsmassnahmen:

1. Nur für den *In-vitro*-Gebrauch bestimmt. Nur für den professionellen Einsatz. Im Notfall Sicherheitsinformationen in den SDS-Datenblättern prüfen.
2. DNA-Sonden und Hybridisierungspuffer enthalten Formamid, das teratogen wirkt; nicht einatmen und nicht in Kontakt mit der Haut bringen. Bei der Handhabung von DNA-Sonden und DAPI-Gegenfärbemittel Handschuhe und Laborkittel tragen.
3. Alle Materialien müssen gemäß den Richtlinien Ihrer Einrichtung für die Entsorgung von Krankenhausabfällen entsorgt werden.

4. Kennzeichnung gemäß Verordnung (EG) Nr. 1272/2008



Signalwort: Gefahr

Gefahrenbezeichnung(en)

H351 Kann vermutlich Krebs erzeugen.

H360D Kann das Kind im Mutterleib schädigen.

H373 Kann die Organe (Blut) schädigen bei längerer oder wiederholter Exposition durch Verschlucken.

Vorsichtsmaßnahmen

P201 Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen.

P281 Vorgeschriebene persönliche Schutzausrüstung verwenden.

P308 + P313 BEI Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.

Ergänzende Gefahrenhinweise: kein(e,er)

Nur für gewerbliche Anwender.

Patente: *Diese Produkte oder der Gebrauch derselben sind eigentumsrechtlich geschützt. Die in diesen Produkten enthaltenen Sonden werden unter Verwendung der Janssen Diagnostics, LLC REPEAT-FREE™-Technologie hergestellt und mit dem Universal Linkage System (ULS™) markiert.*

Das in der Markierungsverbindung PlatinumBright – 415 verwendete Fluorophor ist durch Patente geschützt, die Eigentum oder unter der Kontrolle der DYOMICS GmbH sind, und wird von diesem Unternehmen hergestellt. Die Janssen Diagnostics, LLC REPEAT-FREE™-Technologie ist durch US- und

internationale Patente geschützt.

Die ULS™-Technologie und -Produkte unterliegen folgenden Patenten: US-Patente 5,580,990; 5,714,327; 5,985,566; 6,133,038; US RE 40,557E, 6,797,818; 7,217,813. KREATECH ist ein Handelsname der KREATECH Biotechnology BV. ULS™, PlatinumBright™ sind Marken der KREATECH Biotechnology BV. REPEAT-FREE™ ist eine Marke der Janssen Diagnostics, LLC.

Thermobrite™ ist eine eingetragene Marke von Leica Biosystems.

Zellpräparate

Verwendung von Kreatech™ FISH-Sonden

Die Technik der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) wird zur Identifizierung oder Markierung von Ziel-Gensequenzen eingesetzt, um deren Lokalisierung zu untersuchen. Zunächst werden DNA-Sequenzen aus geeigneten spezifischen chromosomalen Strukturen mit Reportermolekülen markiert. Die markierte DNA-Sonde wird auf Metaphase-Chromosomen oder Interphasenzellkernen, die auf einem Objektträger fixiert sind, hybridisiert. Nach dem Waschen wird die Probe mittels Fluoreszenzmikroskopie auf die Reportermoleküle überprüft.

KREATECH REPEAT-FREE FISH-Sonden enthalten keine C₀t-1 DNA. Die Hybridisierungseffizienz ist daher höher und unspezifische Bindungen, die zu einem hohen Hintergrundrauschen führen, werden deutlich reduziert.

Informationen zum Einsatz auf Metaphasen- und Interphasenzellen aus fixierten Kulturen peripheren Bluts oder auf durch zytogenetische Standardmethoden hergestellten Direktpräparaten siehe: The AGT genetics laboratory manual, 3. Ausgabe, New York: Raven Press; 1996.

Zur Erzielung optimaler Ergebnisse wird die Verwendung der kompletten Kreatech Vorbehandlungskits (KBI-60005, KBI-60006) empfohlen, die ein speziell optimiertes Gebrauchsanleitungsprotokoll enthalten.

Weitere Informationen finden Sie auf unserer Website: <http://www.leicabiosystems.com/ihc-ish/kreatech-fish-probes/>

Vorbehandlung:

Protokoll I (Standardprotokoll, wenn nicht zufriedenstellend, Protokoll II verwenden)

1. Die Objektträger zum Altern 10 Minuten (Min.) lang bei 80 °C backen. Anschließend bei Raumtemperatur (RT) abkühlen lassen.
2. Objektträger in frisch angesetzte 70%ige Essigsäure (in deionisiertes H₂O (dH₂O}) legen, 1 Min. bei RT inkubieren.
3. Objektträger in 1 x PBS, pH 7,4, legen, 30 Sekunden (s) lang bei RT inkubieren.
4. Objektträger in 1 x PBS, pH 7,4, legen, 5 Min. lang bei RT inkubieren.
5. Objektträger in einer Folge von Ethanolkonzentrationen (70 %, 85 % und 100 %) dehydrieren, jeweils 1 Min. lang bei RT inkubieren. Bei RT an der Luft trocknen lassen.

Mit der Sondenvorbereitung fortfahren.

Protokoll II (für Objektträger mit hohem Zytoplasmagehalt oder Direktpräparaten (Fruchtwasser oder Chorionzotten})

1. 2 x SSC, pH 7,0, und 0,01 M HCl bei 37 °C vorwärmen.
2. Getrocknete Präparate in vorgewärmtes 2 x SSC, pH 7,0, legen, 2 Min. lang bei 37 °C inkubieren.
3. Pepsin zu vorgewärmtem 0,01 M HCl hinzugeben, um finale Konzentration von 0,005 % zu erreichen.
4. Objektträger in 0,005 % Pepsin-Lösung in 0,01 M HCl legen und 5 - 15 Min. lang bei 37 °C inkubieren (je nach Menge des Zytoplasmagehalts).
5. Objektträger in 1 x PBS, pH 7,4, legen, 3 Min. lang bei RT inkubieren.
6. In einer Lösung aus 1 % gepuffertem Formaldehyd in 1 x PBS / 20 mM MgCl₂ 10 Min. bei RT nachfixieren.
7. Objektträger in 1 x PBS, pH 7,4, legen, 3 Min. lang bei RT inkubieren.
8. Objektträger in einer Folge von Ethanolkonzentrationen (70 %, 85 % und 100 %) dehydrieren, jeweils 1 Min. lang bei RT inkubieren. Bei RT an der Luft trocknen lassen.

Mit der Sondenvorbereitung fortfahren.

Sondenvorbereitung:

Sonden-Röhrchen kurz herunterzentrifugieren, Sonden-Röhrchen vortexen und vor Gebrauch noch einmal kurz herunterzentrifugieren. Sonde vor Gebrauch RT erreichen lassen.

Die meisten Kreatech FISH-Sonden werden gebrauchsfertig (Ready-to-Use, RtU) geliefert. Zentromer-, Subtelomer- und Ganzchromosomen-FISH-Sonden werden in 5x konzentrierter Form geliefert und müssen mit den bereitgestellten Hybridisierungspuffern und/oder anderen konzentrierten Sonden verdünnt werden. Nähere Angaben zur Verdünnung sind auf dem Etikett des Röhrchens und in der Packungsbeilage zur jeweiligen Sonde zu finden.

Co-denaturierung:

1. 10 µl Sonde oder Sondenmix pro 22 x 22-mm-Feld aufbringen.
2. Deckglas auflegen und mit Fixogum (LK-071A) oder Gummilösung versiegeln.
3. Probe und Sonde in einem *Thermobrite* (TS-01/02) 5 Min. lang bei 75 °C denaturieren.

Hybridisierung:

Über Nacht bei 37 °C in einem *Thermobrite* (TS-01/02) oder in einer feuchten Kammer inkubieren.

Post-hybridisierungs-waschschritte:

1. Waschpuffer I (0,4 x SSC / 0,3 % Igepal) (LK-102A) auf 72 °C vorwärmen.
2. Gummilösung entfernen.
3. Bis zu 14 Objektträger in 200 ml Waschpuffer II (2 x SSC / 0,1 % Igepal) (LK-103A) legen, 2 Min. bei RT inkubieren. Deckgläser ablösen. Nur einmal für insgesamt 28 Objektträger verwenden.
4. Bis zu 14 Objektträger in 200 ml vorgewärmten Waschpuffer I (0,4 x SSC / 0,3 % Igepal) (LK-102A) legen, 2 Min. lang bei 72 °C (± 1 °C) ohne Schütteln inkubieren. Nur einmal für insgesamt 28 Objektträger verwenden.

5. Bis zu 14 Objektträger in 200 ml frischen Waschpuffer II (2 x SSC / 0,1 % Igepal) (LK-103A) legen, 1 Min. bei RT ohne Schütteln inkubieren. Nur einmal für insgesamt 28 Objektträger verwenden.
6. Objektträger in einer Folge von Ethanolkonzentrationen (70 %, 85 % und 100 %) dehydrieren, jeweils 1 Min. lang bei RT inkubieren. Bei RT an der Luft trocknen lassen.

Mit Gegenfärbung fortfahren.

Gegenfärbung:

15 µl DAPI-Gegenfärbemittel (LK-095A (0,1 µg/ml) oder LK-096A (1 µg/ml) aufbringen und mit einem Deckglas verschließen. DAPI kann in Gegenfärbungslösung (LK-097A) verdünnt werden, um die gewünschte Konzentration zu erhalten. Objektträger im Dunkeln platzieren und 10 - 15 Min. warten, bis sich die Gegenfärbung entwickelt. Mit der Mikroskopie fortfahren.

Empfehlungen für die fluoreszenzmikroskopie:

Für eine optimale Visualisierung empfehlen wir ein gut gewartetes und regelmäßig kalibriertes Mikroskop, das mit einer 100-Watt-Quecksilberlampe oder einer anderen geeigneten Lichtquelle und einem 63x oder 100x Fluoreszenzobjektiv ausgestattet ist. Dreifach-Bandpassfilter (DAPI/FITC/Cy3 oder DAPI/FITC/TRITC) werden zur Beobachtung mehrerer Farben und einfache Bandpassfilter für die Visualisierung einzelner Farben verwendet.

Geeignete Anregungs- und Emissionsspektren für Kreatech FISH Fluorophore:

Fluorophor	Anregung	Emission
Platinum <i>Bright</i> ™ 415	429 ±20 nm	470 ±30 nm
Platinum <i>Bright</i> ™ 495	495 ±20 nm	525 ±30 nm
Platinum <i>Bright</i> ™ 550	546 ±12 nm	580 ±30 nm

Fehlerbehebung:

Alternatives Protokoll für Zytologieproben:

1. 50 ml 2 x SSC / 0,5 % Igepal (LK-105B) in einer Coplin-Küvette in einem Wasserbad auf 37 °C erwärmen. Präparierte Objektträger in die Coplin-Küvette stellen und 15 Minuten lang inkubieren.
2. Objektträger in einer Folge von Ethanolkonzentrationen (70 %, 85 % und 100 %) dehydrieren, jeweils 1 Min. lang bei RT inkubieren. Bei RT an der Luft trocknen lassen.

Mit der Sondenvorbereitung fortfahren.

Alternatives Protokoll für die Sonden-Denaturierung (getrennte Denaturierung von Sonde und Probe):

1. 70%iges Formamid / 2 x SSC, pH 7,0, auf 72 °C erwärmen.
2. Objektträger 2 Min. lang in 70%igem Formamid / 2 x SSC, pH 7,0 denaturieren, bei 72 °C (± 1 °C) inkubieren.
3. In einer Folge eiskalter (-20 °C) Ethanolkonzentrationen (70 %, 85 % und 100 %) dehydrieren, jeweils für 2 Min. inkubieren. Bei RT an der Luft trocknen lassen.
4. Sondenmix bei 90 °C 10 Min. lang denaturieren und dann direkt auf Eis legen.
5. Sonden-Röhrchen kurz herunterzentrifugieren, Sonden-Röhrchen vortexen und Sonden-Röhrchen dann noch einmal kurz herunterzentrifugieren.
6. Die Sonde auf den denaturierten Objektträger auftragen, Deckglas auflegen und mit Gummilösung versiegeln.

Mit der Hybridisierung fortfahren.

Häufig gestellte Fragen

Ich erhalte schwache oder gar keine Signale.

- Führen Sie eine Re-Hybridisierung durch und stellen Sie dabei sicher, dass die Sonde richtig gemixt wurde und vor Verwendung Raumtemperatur erreicht hat.
- Führen Sie eine Re-Hybridisierung durch und stellen Sie dabei

sicher, dass der Stringenzwaschpuffer (Waschpuffer I) die richtige Temperatur (72 °C (± 1 °C)) hat.

- Berücksichtigen Sie den Temperaturabfall, wenn Objektträger in vorgewärmte Reagenzien gelegt werden.
- Verwenden Sie mindestens 10 μ l Sonde pro 22 x 22-mm-Deckglas.
- Vergewissern Sie sich, dass die Mikroskopfilter und die Lichtquelle richtig ausgewählt und voll funktionsfähig sind.

Ich habe ein hohes Hintergrundrauschen oder eine spezifische Kreuzhybridisierung bei Verwendung von Zentromer- oder Subtelomer-Sonden.

- Erhöhen Sie die Temperatur des Stringenzwaschpuffers (Waschpuffer I) beim Waschen der Objektträger.

Mindestsondenauftragung:

Deckglasgröße	Mindestsondenauftragung
22 x 22 mm	10 μ l
22 x 32 mm	15 μ l
22 x 50 mm	23 μ l

Verfahrensempfehlungen:

Temperatur und Pufferkonzentration der Lösungen (Stringenz) der Hybridisierung und Waschstreps sind wichtig, da eine geringere Stringenz zu einer unspezifischen Bindung der Sonde an andere Sequenzen und eine höhere Stringenz zu schwächeren Signalen führen kann. Eine unvollständige Denaturierung der Ziel-DNA und/oder der Sonden-DNA kann zum vollständigen Fehlen von Signalen führen.

Erforderliches material (nicht mitgeliefert): reagenzien:

1. FISH Reagenz-Kit (KBI-60005)
2. FISH Zellaufschluss-Kit (KBI-60006)
3. 1 % gepuffertes Formaldehyd / 1 x PBS / 20 mM MgCl₂

4. 1 x PBS, pH 7,4
5. 2 x SSC, pH 7,0
6. Pepsinlösung (LK-101A)
7. Waschpuffer I (0,4 x SSC / 0,3 % Igepal) (LK-102A)
8. Waschpuffer II (2 x SSC / 0,1 % Igepal) (LK-103A)
9. Igepal
10. 0,01 M HCl
11. Carnoy-Fixativ (Methanol : Essigsäure = 3 : 1)
12. 70%ige Essigsäure (in deionisiertem H₂O)
13. DAPI-Gegenfärbemittel (LK-095A (0,1 µg/ml) oder LK-096A (1 µg/ml))
14. Gegenfärbungslösung (LK-097A)
15. Formamid
16. Ethanol 100 %, 85 % und 70 %
17. Fixogum (LK-071A) oder Gummilösung

Erforderliches material (nicht mitgeliefert): ausrüstung:

1. Thermobrite (TS-01/02)
2. Brutschrank bei 37 °C
3. Wasserbad mit genauer Temperatur zwischen 37 °C und 90 °C
4. Coplin-Küvetten aus Kunststoff oder Glas
5. Verschiedene Mikropipetten (1 µl - 200 µl)
6. Fluoreszenzmikroskop mit geeigneten Filtern (siehe Empfehlungen für die Fluoreszenzmikroskopie)

Warnhinweise und vorsichtsmassnahmen:

1. Nur für den *In-vitro*-Gebrauch bestimmt. Nur für den professionellen Einsatz. Im Notfall Sicherheitsinformationen in den SDS-Datenblättern prüfen.
2. DNA-Sonden und Hybridisierungspuffer enthalten Formamid, das teratogen wirkt; nicht einatmen und nicht in Kontakt mit der Haut bringen. Bei der Handhabung von DNA-Sonden und DAPI-Gegenfärbemittel Handschuhe und Laborkittel tragen.
3. Alle Materialien müssen gemäß den Richtlinien Ihrer Einrichtung

für die Entsorgung von Krankenhausabfällen entsorgt werden.

4. Kennzeichnung gemäß Verordnung (EG) Nr. 1272/2008

Piktogramm



Signalwort: Gefahr

Gefahrenbezeichnung(en)

H351 Kann vermutlich Krebs erzeugen.

H360D Kann das Kind im Mutterleib schädigen.

H373 Kann die Organe (Blut) schädigen bei längerer oder wiederholter Exposition durch Verschlucken.

Vorsichtsmaßnahmen

P201 Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen.

P281 Vorgeschriebene persönliche Schutzausrüstung verwenden.

P308 + P313 BEI Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.

Ergänzende Gefahrenhinweise: kein(e,er)

Nur für gewerbliche Anwender.

Patente: *Diese Produkte oder der Gebrauch derselben sind eigentumsrechtlich geschützt. Die in diesen Produkten enthaltenen Sonden werden unter Verwendung der Janssen Diagnostics, LLC REPEAT-FREE™-Technologie hergestellt und mit dem Universal Linkage System (ULS™) markiert.*

Das in der Markierungsverbindung PlatinumBright – 415 verwendete Fluorophor ist durch Patente geschützt, die Eigentum oder unter der Kontrolle der DYOMICS GmbH sind, und wird von diesem Unternehmen hergestellt.

Die Janssen Diagnostics, LLC REPEAT-FREE™-Technologie ist durch US- und internationale Patente geschützt.

Die ULS™-Technologie und -Produkte unterliegen folgenden Patenten: US-Patente 5,580,990; 5,714,327; 5,985,566; 6,133,038; US RE 40,557E, 6,797,818; 7,217,813. KREATECH ist ein Handelsname der KREATECH Biotechnology BV. ULS™, PlatinumBright™ sind Marken der KREATECH Biotechnology BV. REPEAT-FREE™ ist eine Marke der Janssen Diagnostics, LLC.

Thermobrite™ ist eine eingetragene Marke von Leica Biosystems.

Istruzioni per l'uso

Tessuto fissato con formalina e incluso in paraffina

Uso delle sonde Kreatech™ FISH

L'ibridazione fluorescente *in situ* (FISH) viene usata per identificare, o marcare, sequenze genomiche bersaglio in modo da studiarne la posizione. Le sequenze DNA da sonde appropriate, specifiche del cromosoma, vengono innanzitutto marcate con molecole reporter. La sonda DNA marcata viene quindi ibridata con il DNA bersaglio nei nuclei del tessuto. Dopo il lavaggio, il campione viene scandito con microscopio a fluorescenza per individuare le molecole reporter.

Le sonde KREATECH FISH REPEAT-FREE non contengono DNA C₀t-1. L'efficienza dell'ibridazione viene quindi aumentata, riducendo ampiamente il sottofondo dovuto a legami aspecifici.

Per ottenere risultati ottimali su sezioni di tessuto incluse in paraffina si consiglia di utilizzare i kit di pretrattamento completo Kreatech (KBI-60004, KBI-60007) che includono un protocollo particolarmente ottimizzato di "Istruzioni per l'uso".

Per ulteriori informazioni, consultare il nostro sito web: <http://www.leicabiosystems.com/ihc-ish/kreatech-fish-probes/>

In alternativa, possono essere utilizzati anche i seguenti protocolli:

Pretrattamento dei vetrini:

1. Montare le sezioni di tessuto da 4 - 6 µm fissate in formalina e incluse in paraffina (FFPE) su vetrini caricati positivamente.
2. Cuocere le sezioni di tessuto FFPE montate per 2 ore a 80 °C o per 16 ore a 56 °C.

3. Deparaffinare i vetrini in xylene o suo sostituto, incubare per 2 x 10 minuti (min) a temperatura ambiente (TA).
4. Reidratare i vetrini in etanolo al 100%, 85% e 70%, incubare per 3 min ciascuno a TA.
5. Collocare i vetrini in H₂O deionizzata (dH₂O), incubare per 3 min a TA. Procedere con il Protocollo I o con il Protocollo II.

Protocollo I (protocollo standard, se i risultati non sono soddisfacenti, usare il protocollo II)

1. Preriscaldare il sodio citrato 0,01 M, pH 6,0, a 96 - 98 °C.
2. Preriscaldare l'HCl 0,01 M a 37 °C (se non si utilizza pepsina RtU (Ready-to-Use) (LK-101A)).
3. Collocare i vetrini in sodio citrato 0,01 M, pH 6,0, a 96 - 98 °C, incubare per 15 min.
4. Collocare i vetrini in dH₂O, incubare for 2 min a TA.
5. Aggiungere pepsina all'HCl 0,01 M pre-riscaldato per raggiungere una concentrazione finale dello 0,025%. (se non si utilizza pepsina RtU (LK-101A)).
6. Digerire i vetrini in pepsina allo 0,025% in HCl 0,01 M a 37 °C o coprire il tessuto con pepsina RtU (LK-101A) a TA, incubare per 5-45 min, (tempo dipendente dal fissaggio del tessuto e dal tipo di tessuto).
7. Collocare i vetrini in dH₂O, incubare for 1 min a TA.
8. Collocare i vetrini in 1 x PBS, pH 7,4 o 2 x SSC, pH 7,0, incubare per 5 min a TA.
9. Disidratare i vetrini in etanolo al 70%, 85% e 100%, incubare per 1 min ciascuno a TA. Asciugare all'aria a TA.

Procedere con la preparazione della sonda.

Protocollo II (per campioni con legami crociati resistenti)

1. Pre-riscaldare in sodio tiocianato all'8% a 80 °C.
2. Pretrattare i vetrini con HCl 0,2 M, incubare per 20 min a TA.
3. Collocare i vetrini in dH₂O, incubare for 3 min a TA.

4. Preriscaldare HCl 0,01 M a 37 °C (se non si utilizza pepsina RtU (LK-101A)).
5. Collocare i vetrini in una soluzione all'8% di sodio tiocianato in dH₂O 80 °C, incubare per 30 min.
6. Collocare i vetrini in 2 x SSC a pH 7,0 per 3 min a TA.
7. Aggiungere pepsina all'HCl 0,01 M pre-riscaldato per una concentrazione finale dello 0,025% (se non si utilizza pepsina RtU (LK-101A)).
8. Digerire i vetrini in pepsina allo 0,025% in HCl 0,01 M a 37 °C o coprire il tessuto con pepsina RtU (LK-101A) a TA, incubare per 5-45 min, (tempo dipendente dal fissaggio del tessuto e dal tipo di tessuto).
9. Collocare i vetrini in dH₂O, incubare for 1 min a TA.
10. Collocare i vetrini in 1 x PBS, pH 7,4 o 2 x SSC, pH 7,0, incubare per 5 min a TA.
11. Disidratare i vetrini in etanolo al 70%, 85% e 100%, incubare per 1 min ciascuno a TA. Asciugare all'aria a TA.

Procedere con la preparazione della sonda.

Preparazione della sonda:

Centrifugare brevemente il flaconcino della sonda, agitare a vortice il flaconcino della sonda, quindi centrifugare di nuovo brevemente prima dell'uso. Lasciare che la torni a TA prima dell'uso.

Nelle sonde Kreatech FISH viene aggiunta RtU, se non altrimenti specificato nella documentazione del prodotto. Consultare l'etichetta del flaconcino e l'inserito specifico nella confezione della sonda per le specifiche di diluizione.

Co-denaturazione:

1. Applicare 10 µl di sonda o miscela di sonda per ogni campo di 22 x 22 mm.
2. Coprire con un coprivetrino in vetro e sigillare con Fixogum (LK-071A) o colla per montaggio.

3. Denaturare il campione e la sonda su *Thermobrite* (TS-01/02) per 5 min a 80 °C.

Ibridazione:

Incubare durante la notte a 37 °C in *Thermobrite* (TS-01/02) o in a camera umidificata.

Lavaggio post-ibridazione:

1. Preriscaldare il Tampone di lavaggio I (0,4 x SSC / 0,3% Igepal) (LK-102A) a 72 °C.
2. Rimuovere la colla per montaggio.
3. Collocare fino a 14 vetrini in 200 ml di Tampone di lavaggio II (2 x SSC / 0,1% Igepal) (LK-103A), incubare per 2 min a TA. Staccare i coprivetrini facendoli scorrere. Riutilizzare una sola volta per un totale di 28 vetrini.
4. Collocare fino a 14 vetrini in 200 ml di Tampone di lavaggio II preriscaldato (0,4 x SSC / 0,3% Igepal) (LK-102A), incubare per 2 min a 72 °C (± 1 °C) senza agitare. Riutilizzare una sola volta per un totale di 28 vetrini.
5. Collocare fino a 14 vetrini in 200 ml di Tampone di lavaggio II (2 x SSC / 0,1% Igepal) (LK-103A), incubare per 1 min a TA senza agitare. Riutilizzare una sola volta per un totale di 28 vetrini.
6. Disidratare in etanolo fresco al 70%, 85% e 100%, incubare per 1 min ciascuno a TA. Asciugare all'aria a TA e procedere con la colorazione di contrasto.

Colorazione di contrasto:

Applicare 15 μ l di colore di contrasto DAPI (LK-095A (0,1 μ g/ml) o LK-096A (1 μ g/ml) quindi applicare il coprivetrino di vetro. DAPI può essere diluito con un diluente per colore di contrasto (LK-097A) per ottenere la concentrazione richiesta. Collocare i vetrini al buio e lasciare sviluppare il colore di contrasto per 10 - 15 min. Procedere con la microscopia.

Raccomandazioni per la microscopia a fluorescenza:

Per una visualizzazione ottimale, usare un microscopio ben mantenuto e regolarmente calibrato, dotato di lampada al mercurio da 100W, o di un'altra sorgente luminosa appropriata, e di un obiettivo per fluorescenza 63x o 100x. Per visualizzare più colori si usano filtri passa-banda tripli (DAPI/FITC/Cy3 o DAPI/FITC/TRITC), mentre per la visualizzazione di un unico colore si usano filtri a banda passante singola.

Intervallo di eccitazione ed emissione idoneo per i fluorocromi Kreatech:

Fluorocromo	Eccitazione	Emissione
PlatinumBright™ 415	429 ±20 nm	470 ±30 nm
PlatinumBright™ 495	495 ±20 nm	525 ±30 nm
PlatinumBright™ 550	546 ±12 nm	580 ±30 nm

Risoluzione dei problemi.

Controllare la digestione delle proteine e il pre-trattamento applicando 15 µl di colore di contrasto DAPI e valutare i vetrini con un microscopio a fluorescenza dotato di filtro DAPI. Una digestione delle proteine di 15 min è normalmente sufficiente per un'ampia gamma di tumori del seno. Rimuovere il coprivetrino e imbevare il tessuto di 2 x SSC a pH 7,4 per 2 min a TA. Prolungare la digestione delle proteine di 2-20 minuti se il campione non è stato digerito a sufficienza. Se il campione è sovra-digerito, utilizzare un campione fresco e ridurre il tempo di digestione delle proteine.

Protocollo alternativo per la denaturazione della sonda (separare la denaturazione della sonda e del campione):

1. Denaturare il vetrino in formammide al 70% / 2 x SSC, pH 7,0 a 72 °C (±1 °C) per 2 min.
2. Disidratare in etanolo al 70%, 85% e 100% ghiacciato (-20 °C) per 2 min ciascuno. Asciugare all'aria.

3. Denaturare la miscela della sonda a 90 °C per 10 minuti e collocare su ghiaccio.
4. Centrifugare brevemente il flaconcino della sonda, agitare a vortice il flaconcino della sonda, quindi centrifugare di nuovo il flaconcino della sonda.
5. Applicare la sonda al vetrino denaturato, coprirlo con il coprivetrino in vetro, sigillare con la colla per montaggio e proseguire con l'ibridazione.

Domande frequenti

Rilevo un segnale debole o il segnale è assente

- Reibridare assicurandosi che la sonda sia stata miscelata correttamente e che sia a temperatura ambiente prima dell'uso.
- Reibridare assicurandosi che il lavaggio di stringenza (Tampone di lavaggio I) sia alla temperatura corretta (72 °C (± 1 °C)).
- Tener conto della diminuzione di temperatura quando si aggiungono i vetrini ai reagenti preriscaldati.
- Digestione non ottimale del tessuto (sotto-digestione) – immergere il coprivetrino in 2 x SSC, pH 7,0 per 2 min a TA. Prolungare la digestione delle proteine di 2 - 20 min.
- Digestione non ottimale del tessuto (sovra-digestione) – Scartare il vetrino e iniziare con una nuova sezione. Ridurre la digestione delle proteine di almeno 10 min.
- Usare almeno 10 μ l di sonda per un coprivetrino di 22 x 22 mm.
- Controllare che i filtri del microscopio e la sorgente luminosa siano corretti e perfettamente funzionali.

Ho un sottofondo elevato.

- Digestione non ottimale del tessuto. Un tessuto sotto-digerito aumenta il sottofondo. Immergere il coprivetrino in 2 x SSC a pH 7,0 per 2 min a TA. Prolungare la digestione delle proteine di 2 - 20 min.
- Aumentare la temperatura del lavaggio di stringenza (Tampone di lavaggi I) per il lavaggio dei vetrini.

Utilizzando le sonde Centromeriche ottengo un'ibridazione crociata.

- Aumentare la temperatura del lavaggio di stringenza (Tampone di lavaggi I) per il lavaggio dei vetrini.

Minima applicazione di una sonda:

Dimensioni del coprivetrino in vetro	Minima applicazione di una sonda
22 x 22 mm	10 μ l
22 x 32 mm	15 μ l
22 x 50 mm	23 μ l

Raccomandazioni procedurali:

La concentrazione e la temperatura del tampone (stringenza) dell'ibridazione e il lavaggio sono importanti, in quanto una minore stringenza può produrre legami aspecifici della sonda ad altre sequenze, mentre una stringenza più alta può generare una perdita di segnale. L'incompleta denaturazione del DNA bersaglio e/o della sonda DNA possono generare una perdita di segnale.

Materiale richiesto, ma non fornito: Reagenti:

1. Xilene
2. Formammide
3. Etanolo 100%, 85% e 70%
4. Sodio citrato 0,01 M a pH 6,0 o sodio tiocianato all'8%
5. HCl 0,01 M e HCl 0,2M
6. Soluzione di pepsina RtU (LK-101A)
7. 1 x PBS, pH 7,4
8. 2 x SSC, pH 7,0
9. Tampone di lavaggio I (0,4 x SSC / 0,3% Igepal) (LK-102A)
10. Tampone di lavaggio II (2 x SSC / 0,1% Igepal) (LK-103A)
11. Colore di contrasto DAPI (LK-095A (0,1 μ g/ml) o LK-096A (1 μ g/ml))
12. Diluente per colore di contrasto (LK-097A)
13. Fixogum (LK-071A) o colla per montaggio

Materiale richiesto, ma non fornito: apparecchiature:

1. *Thermobrite* (TS-01/02) o *Thermobrite Elite* (Vedere www.Leica-biosystems.com per ulteriori informazioni)
2. Incubatore a 37 °C
3. Bagnomaria con controllo accurato della temperatura da 37 °C a 90 °C
4. Vaso Coplin in plastica o vetro
5. Micropipette variabili (1 µl - 200 µl)
6. Microscopio a fluorescenza dotato di filtri adeguati (vedere le raccomandazioni per la microscopia a fluorescenza)

AVVERTENZE E PRECAUZIONI:

1. Solo per uso diagnostico *in vitro*. Solo per uso professionale. In caso di emergenza, consultare le SDS per le informazioni sulla sicurezza.
2. Le sonde DNA e i tamponi di ibridazione contengono formammide, che è un composto teratogeno; non inspirare né consentire in contatto con la pelle. Quando si manipolano sonde DNA e colore di contrasto DAPI, indossare i guanti e il camice da laboratorio.
3. Tutti i materiali devono essere smaltiti secondo le direttive del proprio istituto per lo smaltimento di rifiuti ospedalieri.
4. Etichettatura conforme alla normativa (EC) N. 1272/2008

Pittogramma



Parola di segnalazione: Pericolo

Dichiarazioni di pericolo

H351 Sospetta causa di cancro.

H361D Può arrecare danni fetali.

H373 Se ingerito può causare danni agli organi (sangue) a seguito di esposizione prolungata o ripetuta.

Dichiarazioni precauzionali

P201 Prima dell'uso, procurarsi le istruzioni speciali.

P281 Usare i dispositivi di protezione individuale secondo necessità,

P308 + P313 IN CASO di esposizione o dubbi: Consultare un medico / farsi visitare.

Dichiarazioni aggiuntive sui pericoli: nessuna

Limitato all'uso da parte di utenti professionali

Brevetti: *Questi prodotti, o l'uso di questi prodotti sono soggetti a diritti esclusivi. Le sonde in questi prodotti sono generate utilizzando la tecnologia LLC REPEAT-FREE™ di Janssen Diagnostics e marcate con lo Universal Linkage System (ULS™).*

Il fluorocromo usato per il composto di marcatura PlatinumBright - 415 è soggetto a brevetti posseduti o controllati, ed è prodotto da DYOMICS GmbH. Esistono brevetti USA e internazionali in corso di rilascio per la tecnologia REPEAT-FREE™ di Janssen Diagnostics, LLC.

La tecnologia e i prodotti ULS™ sono coperti da uno o più dei seguenti brevetti USA 5.580.990; 5.714.327; 5.985.566; 6.133.038; US RE 40.557E, 6.797.818; 7,217,813. KREATECH è una denominazione commerciale di KREATECH Biotechnology BV. ULS™, PlatinumBright™ sono marchi commerciali di KREATECH Biotechnology BV. REPEAT-FREE™ è un marchio commerciale di Janssen Diagnostics, LLC.

Thermobrite™ è un marchio registrato di Leica Biosystems.

Preparazioni cellulari

Uso delle sonde Kreatech™ FISH

L'ibridazione fluorescente *in situ* (FISH) viene usata per identificare, o marcare, sequenze genomiche bersaglio in modo da studiarne la posizione. Le sequenze DNA da sonde appropriate, specifiche del cromosoma, vengono innanzitutto marcate con molecole reporter. La sonda DNA marcata viene quindi ibridata su un vetrino con cromosomi in metafase o nuclei in interfase. Dopo il lavaggio, il campione viene scandito con microscopio a fluorescenza per individuare le molecole reporter.

Le sonde KREATECH FISH REPEAT-FREE non contengono DNA C_gt-1. L'efficienza dell'ibridazione viene quindi aumentata, riducendo ampiamente il sottofondo dovuto a legami aspecifici.

Per uso su cellule in metafase e interfase da colture di sangue periferico e midollo osseo o da preparazioni dirette ottenute con metodi citogenetici standard, vedere: The AGT genetics laboratory manual, 3rd ed. New York: Raven Press; 1996.

Per ottenere risultati ottimali si consiglia di utilizzare i kit di pretrattamento completo Kreatech (KBI-60005, KBI-60006) che includono un protocollo particolarmente ottimizzato di "Istruzioni per l'uso".

Per ulteriori informazioni, consultare il nostro sito web: <http://www.leicabiosystems.com/ihc-ish/kreatech-fish-probes/>

Pretrattamento:

Protocollo I (protocollo standard, se i risultati non sono soddisfacenti, usare il protocollo II)

1. Per invecchiare i vetrini, cuocere i vetrini per 10 minuti (min) a 80 °C, quindi lasciar raffreddare i vetrini a temperatura ambiente (TA).

2. Collocare i vetrini in una preparazione fresca di acido acetico al 70% (in H₂O deionizzata (dH₂O}), incubare per 1 min a TA.
3. Collocare i vetrini in 1 x PBS, a pH 7,4, incubare per 30 secondi (s) a TA.
4. Collocare i vetrini in 1 x PBS a pH 7,4 per 5 min a TA.
5. Disidratare il vetrino in etanolo al 70%, 85% e 100%, incubare per 1 min ciascuno a TA. Asciugare all'aria a TA.

Procedere con la preparazione della sonda.

Protocollo II (per vetrini con notevole sottofondo citoplasmatico o preparazioni dirette (fluido amniotico o villi corionici))

1. Preriscaldare 2 x SSC, pH 7,0, e HCl 0,01 M a 37 °C
2. Collocare i vetrini dei campioni asciutti in 2 x SSC, pH 7,0 preriscaldato, incubare a 37 °C per 2 min.
3. Aggiungere pepsina all'HCl 0,01 M preriscaldato per una concentrazione finale dello 0,005%.
4. Collocare i vetrini in una soluzione di pepsina allo 0,005% in HCl 0,01 M e incubare a 37 °C per 5 - 15 min (a seconda della quantità di sottofondo citoplasmatico).
5. Collocare i vetrini in 1 x PBS, pH 7,4 per 3 min a TA.
6. Post-fissare i vetrini per incubazione in formaldeide tamponata all'1% in 1 x PBS / MgCl₂ 20 mM per 10 min a TA.
7. Collocare i vetrini in 1 x PBS, pH 7,4 per 3 min a TA.
8. Disidratare il vetrino in etanolo al 70%, 85% e 100%, incubare per 1 min ciascuno a TA. Asciugare all'aria a TA.

Procedere con la preparazione della sonda.

Preparazione della sonda:

Centrifugare brevemente il flaconcino della sonda, agitare a vortice il flaconcino della sonda, quindi contrifugare di nuovo brevemente prima dell'uso. Lasciare che la torni a TA prima dell'uso.

La maggior parte delle sonde Kreatech FISH è fornita RtU (Ready-to-Use). Le sonde FISH per Centromeri, Subtelomeri e cromosomi

Interi sono fornite in formati concentrati 5 x e devono essere diluite con il tampone di ibridazione fornito e/o altre sonde concentrate. Consultare l'etichetta del flaconcino e l'inserito specifico nella confezione della sonda per le specifiche di diluizione.

Co-denaturazione:

1. Applicare 10 μ l di sonda o miscela di sonda per ogni campo di 22 x 22 mm.
2. Coprire con un coprivetrino in vetro e sigillare con Fixogum (LK-071A) o colla per montaggio.
3. Denaturare il campione e la sonda su *Thermobrite* (TS-01/02) per 5 min a 75 °C.

Ibridazione:

Incubare durante la notte a 37 °C in *Thermobrite* (TS-01/02) o in a camera umidificata.

Lavaggio post-ibridazione:

1. Preriscaldare il Tampone di lavaggio I (0,4 x SSC / 0,3% Igepal) (LK-102A) a 72 °C.
2. Rimuovere la colla per montaggio.
3. Collocare fino a 14 vetrini in 200 ml di Tampone di lavaggio II (2 x SSC / 0,1% Igepal) (LK-103A), incubare per 2 min a TA. Staccare i coprivetrini facendoli scorrere. Riutilizzare una sola volta per un totale di 28 vetrini.
4. Collocare fino a 14 vetrini in 200 ml di Tampone di lavaggio II preriscaldato (0,4 x SSC / 0,3% Igepal) (LK-102A), incubare per 2 min a 72 °C (± 1 °C) senza agitare. Riutilizzare una sola volta per un totale di 28 vetrini.
5. Collocare fino a 14 vetrini in 200 ml di Tampone di lavaggio II (2 x SSC / 0,1% Igepal) (LK-103A), incubare per 1 min a TA senza agitare. Riutilizzare una sola volta per un totale di 28 vetrini.
6. Disidratare i vetrini in etanolo al 70%, 85% e 100%, incubare per 1 min ciascuno a TA. Asciugare all'aria a TA.

Procedere con la colorazione di contrasto.

Colorazione di contrasto:

Applicare 15 μ l di colore di contrasto DAPI (LK-095A (0,1 μ g/ml) o LK-096A (1 μ g/ml) quindi applicare il coprivetrino di vetro. DAPI può essere diluito con un diluente per colore di contrasto (LK-097A) per ottenere la concentrazione richiesta. Collocare i vetrini al buio e lasciare sviluppare il colore di contrasto per 10 - 15 min. Procedere con la microscopia.

Raccomandazioni per la microscopia a fluorescenza:

Per una visualizzazione ottimale, usare un microscopio ben mantenuto e regolarmente calibrato, dotato di lampada al mercurio da 100W, o di un'altra sorgente luminosa appropriata, e di un obiettivo per fluorescenza 63x o 100x. Per visualizzare più colori si usano filtri passa-banda tripli (DAPI/FITC/Cy3 o DAPI/FITC/TRITC), mentre per la visualizzazione di un unico colore si usano filtri a banda passante singola.

Intervallo di eccitazione ed emissione idoneo per i fluorocromi FISH Kreatech:

Fluorocromo	Eccitazione	Emissione
PlatinumBright™ 415	429 \pm 20 nm	470 \pm 30 nm
PlatinumBright™ 495	495 \pm 20 nm	525 \pm 30 nm
PlatinumBright™ 550	546 \pm 12 nm	580 \pm 30 nm

Risoluzione dei problemi:

Protocollo alternativo per campioni di citologia:

1. Preriscaldare 50 ml di 2 x SSC / 0,5% Igepal (LK-105B) in un vaso Coplin a 37 °C a bagnomaria. Collocare i vetrini preparati nel vaso Coplin e incubati per 15 minuti.
2. Disidratare i vetrini in etanolo al 70%, 85% e 100%, incubare per 1 min ciascuno a TA. Asciugare all'aria a TA.

Procedere con la preparazione della sonda.

Protocollo alternativo per la denaturazione della sonda (separare la denaturazione della sonda e del campione):

1. Preriscaldare formammide al 70% / 2 x SSC, pH 7,0, a 72 °C.
2. Denaturare i vetrini in formammide al 70% / 2 x SSC, pH 7,0, incubare a 72 °C (± 1 °C) per 2 min.
3. Disidratare i vetrini in etanolo al 70%, 85% e 100% ghiacciato (-20 °C), incubare per 2 min ciascuno. Asciugare all'aria a TA.
4. Denaturare la miscela della sonda a 90 °C per 10 minuti e collocare direttamente su ghiaccio.
5. Cantrifugare brevemente il flaconcino della sonda, agitare a vortice il flaconcino della sonda, quindi centrifugare di nuovo il flaconcino della sonda.
6. Applicare la sonda al vetrino denaturato, coprirlo con il coprivetrino in vetro, sigillare con la colla per montaggio.

Proseguire con l'ibridazione.

Domande frequenti

Rilevo un segnale debole o il segnale è assente

- Reibridare assicurandosi che la sonda sia stata miscelata correttamente e che sia a temperatura ambiente prima dell'uso.
- Reibridare assicurandosi che il lavaggio di stringenza (Tampone di lavaggio I) sia alla temperatura corretta (72 °C (± 1 °C)).
- Tener conto della diminuzione di temperatura quando si aggiungono i vetrini ai reagenti preriscaldati.
- Usare almeno 10 μ l di sonda per un coprivetrino di 22 x 22 mm.
- Controllare che i filtri del microscopio e la sorgente luminosa siano corretti e perfettamente funzionali.

Ottingo un sottofondo elevato o un'ibridazione crociata specifica utilizzando le sonde Centromeriche o Subtelomeriche.

- Aumentare la temperatura del lavaggio di stringenza (Tampone di lavaggi I) per il lavaggio dei vetrini.

Minima applicazione di una sonda:

Dimensioni del coprivetrino in vetro	Minima applicazione di una sonda
22 x 22 mm	10 µl
22 x 32 mm	15 µl
22 x 50 mm	23 µl

Raccomandazioni procedurali:

La concentrazione e la temperatura del tampone (stringenza) dell'ibridazione e il lavaggio sono importanti, in quanto una minore stringenza può produrre legami aspecifici della sonda ad altre sequenze, mentre una stringenza più alta può generare una perdita di segnale. L'incompleta denaturazione del DNA bersaglio e/o della sonda DNA possono generare una perdita di segnale.

Materiale richiesto, ma non fornito: reagenti:

1. Kit reagenti FISH (KBI-60005)
2. Kit digestione FISH (KBI-60006)
3. Formaldeide tamponata all'1% / 1 x PBS / 20 mM MgCl₂
4. 1 x PBS, pH 7,4
5. 2 x SSC, pH 7,0
6. Soluzione di pepsina (LK-101A)
7. Tampone di lavaggio I (0,4 x SSC / 0,3% Igepal) (LK-102A)
8. Tampone di lavaggio II (2 x SSC / 0,1% Igepal) (LK-103A)
9. Igepal
10. HCl 0,01 M
11. Fissativo Carnoy's (metanolo : acido acetico = 3 : 1)
12. Acido acetico al 70% (in H₂O deionizzata)
13. Colore di contrasto DAPI (LK-095A (0,1 µg/ml) o LK-096A (1 µg/ml)}
14. Diluente per colore di contrasto (LK-097A)
15. Formammide
16. Etanolo 100%, 85% e 70%

17. Fixogum (LK-071A) o colla per montaggio

Materiale richiesto, ma non fornito: apparecchiature:

1. Thermobrite (TS-01/02).
2. Incubatore a 37 °C
3. Bagnomaria con controllo accurato della temperatura da 37 °C a 90 °C
4. Vaso Coplin in plastica o vetro
5. Micropipette variabili (1 µl - 200 µl)
6. Microscopio a fluorescenza dotato di filtri adeguati (vedere le raccomandazioni per la microscopia a fluorescenza)

Avvertenze e precauzioni:

1. Solo per uso diagnostico *in vitro*. Solo per uso professionale. In caso di emergenza, consultare le SDS per le informazioni sulla sicurezza.
2. Le sonde DNA e i tamponi di ibridazione contengono formammide, che è un composto teratogeno; non inspirare né consentire in contatto con la pelle. Quando si manipolano sonde DNA e colore di contrasto DAPI, indossare i guanti e il camice da laboratorio.
3. Tutti i materiali devono essere smaltiti secondo le direttive del proprio istituto per lo smaltimento di rifiuti ospedalieri.
4. Etichettatura conforme alla normativa (EC) N. 1272/2008

Pittogramma



Parola di segnalazione: Pericolo

Dichiarazioni di pericolo

H351 Sospetta causa di cancro.

H361D Può arrecare danni fetali.

H373 Se ingerito può causare danni agli organi (sangue) a seguito di esposizione prolungata o ripetuta.

Dichiarazioni precauzionali

P201 Prima dell'uso, procurarsi le istruzioni speciali.

P281 Usare i dispositivi di protezione individuale secondo necessità,

P308 + P313 IN CASO di esposizione o dubbi: Consultare un medico / farsi visitare.

Dichiarazioni aggiuntive sui pericoli: nessuna

Limitato all'uso da parte di utenti professionali

Brevetti: *Questi prodotti, o l'uso di questi prodotti sono soggetti a diritti esclusivi. Le sonde in questi prodotti sono generate utilizzando la tecnologia LLC REPEAT-FREE™ di Janssen Diagnostics e marcate con lo Universal Linkage System (ULS™).*

Il fluorocromo usato per il composto di marcatura PlatinumBright - 415 è soggetto a brevetti posseduti o controllati, ed è prodotto da DYOMICS GmbH. Esistono brevetti USA e internazionali in corso di rilascio per la tecnologia REPEAT-FREE™ di Janssen Diagnostics, LLC.

La tecnologia e i prodotti ULS™ sono coperti da uno o più dei seguenti brevetti USA 5.580.990; 5.714.327; 5.985.566; 6.133.038; US RE 40.557E, 6.797.818; 7,217,813. KREATECH è una denominazione commerciale di KREATECH Biotechnology BV. ULS™, PlatinumBright™ sono marchi commerciali di KREATECH Biotechnology BV. REPEAT-FREE™ è un marchio commerciale di Janssen Diagnostics, LLC.

Thermobrite™ è un marchio registrato di Leica Biosystems.

Instrucciones de uso

Tejido embebido en parafina y fijado en formalina

Uso de sondas FISH de Kreatech™

La hibridación fluorescente *in situ* (FISH) se emplea para identificar o etiquetar secuencias genómicas específicas para poder estudiar su ubicación. Las secuencias de ADN de sondas adecuadas y específicas para cromosomas se etiquetan en primer lugar con moléculas informantes. A continuación, la sonda de ADN etiquetada se hibridiza con el DNA específico en los núcleos del tejido. Tras el lavado, la muestra se examina para detectar las moléculas informantes mediante microscopía de fluorescencia.

Las sondas FISH REPEAT-FREE de KREATECH no contienen ADN C₀t-1. De este modo, la eficacia de la hibridación aumenta y el fondo se reduce en gran medida debido a una fijación no específica.

Para obtener resultados óptimos en cortes de tejido embebido en parafina, se recomienda emplear kits de pretratamiento completos de Kreatech (KBI-60004, KBI-60007), que incluyen un protocolo de "Instrucciones de uso" especialmente optimizado.

Para obtener más información, consulte nuestro sitio web: <http://www.leicabiosystems.com/ihc-ish/kreatech-fish-probes/>

Como alternativa, pueden usarse también los protocolos siguientes:

Pretratamiento con portaobjetos:

1. Colocar cortes de tejido embebido en parafina y fijado en formalina (FFPE) de 4 - 6 μ m en portaobjetos con carga positiva.
2. Someter los cortes de tejido FFPE colocados a 80 °C durante 2 horas, o a 56 °C durante 16 horas.

3. Desparafinar los portaobjetos mediante xileno o un sustituto del xileno e incubarlos durante 2 x 10 minutos (min) a temperatura ambiente (TA).
4. Rehidratar los portaobjetos con etanol al 100 %, 85 % y 70 % e incubar cada uno de ellos durante 3 min a TA.
5. Colocar los portaobjetos en H₂O desionizada (dH₂O) e incubarlos durante 3 min a TA.

Continúe con el protocolo I o el protocolo II.

Protocolo I (protocolo estándar; si no resulta satisfactorio, siga el protocolo II)

1. Precalentar 0,01 M de citrato de sodio con pH 6.0 a 96 - 98 °C.
2. Precalentar 0,01 M de HCl a 37 °C (si no se utiliza pepsina lista para usar [LPU] [LK-101A]).
3. Colocar los portaobjetos en 0,01 M de citrato de sodio con pH 6.0 a 96 - 98 °C e incubarlos durante 15 min.
4. Colocar los portaobjetos en dH₂O e incubarlos durante 2 min a TA.
5. Añadir pepsina al 0,01 M de HCl precalentado para alcanzar una concentración final del 0,025 % (si no se utiliza pepsina LPU [LK-101A]).
6. Digerir los portaobjetos en pepsina al 0,025 % en 0,01 M de HCl a 37 °C o cubrir el tejido con pepsina LPU (LK-101A) a TA e incubarlo durante 5 - 45 min (el tiempo dependerá de la fijación del tejido y del tipo de tejido).
7. Colocar los portaobjetos en dH₂O e incubarlos durante 1 min a TA.
8. Colocar los portaobjetos en 1 x PBS con pH 7.4 o en 2 x SSC con pH 7.0 e incubarlos durante 5 min a TA.
9. Deshidratar los portaobjetos con etanol al 70 %, 85 % y 100 % e incubar cada uno de ellos durante 1 min a TA. Dejar secar al aire a TA.

Continúe con la preparación de las sondas.

Protocolo II (para muestras muy reticuladas)

1. Precalentar tiocianato de sodio al 8 % a 80 °C.
 2. Pretratar los portaobjetos mediante 0,2 M de HCl e incubarlos durante 20 min a TA.
 3. Colocar los portaobjetos en dH_2O e incubarlos durante 3 min a TA.
 4. Precalentar 0,01 M de HCl a 37 °C (si no se utiliza pepsina LPU [LK-101A]).
 5. Colocar los portaobjetos en tiocianato de sodio al 8 % precalentado en dH_2O a 80 °C e incubarlos durante 30 min.
 6. Colocar los portaobjetos en 2 x SSC con pH 7.0 e incubarlos durante 3 min a TA.
 7. Añadir pepsina a 0,01 M de HCl precalentado para obtener una concentración final del 0,025 % (si no se utiliza pepsina LPU [LK-101A]).
 8. Digerir los portaobjetos en pepsina al 0,025 % en 0,01 M de HCl a 37 °C o cubrir el tejido con pepsina LPU (LK-101A) a TA e incubarlo durante 5 - 45 min (el tiempo dependerá de la fijación del tejido y del tipo de tejido).
 9. Colocar los portaobjetos en dH_2O e incubarlos durante 1 min a TA.
 10. Colocar los portaobjetos en 1 x PBS con pH 7.4 o en 2 x SSC con pH 7.0 e incubarlos durante 5 min a TA.
 11. Deshidratar los portaobjetos con etanol al 70 %, 85 % y 100 % e incubar cada uno de ellos durante 1 min a TA. Dejar secar al aire a TA.
- Continúe con la preparación de las sondas.

Preparación de las sondas:

Centrifugue brevemente el vial de la sonda, realice un centrifugado con una agitadora vorticial y vuelva a centrifugarlo brevemente después de su uso. Espere a que la sonda alcance la TA antes de usarla. Las sondas FISH de Kreatech se suministran LPU a no ser que se especifique de otro modo en la documentación del producto. Consulte la etiqueta del vial y el folleto específico suministrado con la sonda para obtener información detallada sobre la dilución.

Co-desnaturalización:

1. Aplicar 10 µl de una sonda o de una mezcla de sondas por campo de 22 x 22 mm.
2. Cubrirlo con un cubreobjetos de vidrio y sellarlo mediante Fixogum (LK-071A) o cemento de caucho.
3. Desnaturalizar la muestra y la sonda en una placa *Thermobrite* (TS-01/02) durante 5 min a 80 °C.

Hibridación:

Incube durante la noche a 37 °C en una placa *Thermobrite* (TS-01/02) o en una cámara húmeda.

Lavado tras hibridación:

1. Precalentar el buffer de lavado I (0,4 x SSC / 0,3 % Igepal) (LK-102A) hasta alcanzar 72 °C.
2. Extraer el cemento de caucho.
3. Colocar un máximo de 14 portaobjetos en 200 ml de buffer de lavado II (2 x SSC / 0,1 % Igepal) (LK-103A) e incubar durante 2 min a TA. Extraer los cubreobjetos. Reutilizar una sola vez para un total de 28 portaobjetos.
4. Colocar un máximo de 14 portaobjetos en 200 ml de buffer de lavado I (0,4 x SSC / 0,3 % Igepal) (LK-102A) precalentado e incubar durante 2 min a 72 °C (± 1 °C) sin agitación. Reutilizar una sola vez para un total de 28 portaobjetos.
5. Colocar un máximo de 14 portaobjetos en 200 ml de buffer de lavado II (2 x SSC / 0,1 % Igepal) (LK-103A) nuevo e incubar durante 1 min a TA sin agitar. Reutilizar una sola vez para un total de 28 portaobjetos.
6. Deshidratar en etanol nuevo al 70 %, 85 % y 100 % e incubar cada uno de ellos durante 1 min a TA. Secar al aire a TA y proceder a la contratinción.

Contratinción:

Aplique 15 μ l de contratinción DAPI (LK-095A [0,1 μ g/ml] o LK-096A [1 μ g/ml]) y coloque el cubreobjetos de vidrio. DAPI se puede diluir mediante un diluyente de contratinción (LK-097A) para obtener la concentración deseada. Coloque los portaobjetos en un lugar oscuro durante 10 - 15 min para que se desarrolle la contratinción. Realice la microscopía.

Recomendaciones para la microscopía de fluorescencia:

Para lograr una visualización óptima, se recomienda utilizar un microscopio con un mantenimiento y una calibración adecuados y equipado con una lámpara de mercurio de 100 W u otra fuente de iluminación adecuada, así como un objetivo de fluorescencia de 63x o 100x. Se emplean filtros de paso de banda triples (DAPI/FITC/Cy3 o DAPI/FITC/TRITC) para visualizar múltiples colores, mientras que los filtros de paso de banda sencillos se emplean para la visualización de un solo color.

Intervalo aceptable de excitación y emisión para fluoróforos Kreatech:

Fluoróforo	Excitación	Emisión
PlatinumBright™ 415	429 \pm 20 nm	470 \pm 30 nm
PlatinumBright™ 495	495 \pm 20 nm	525 \pm 30 nm
PlatinumBright™ 550	546 \pm 12 nm	580 \pm 30 nm

Solución de problemas.

Compruebe la digestión de proteínas y el pretratamiento mediante la aplicación de 15 μ l de contratinción DAPI y evaluar los portaobjetos mediante un microscopio de fluorescencia equipado con un filtro DAPI. Normalmente, una digestión de proteínas de 15 min suele ser suficiente para una amplia gama de tumores de mama. Extraiga el cubreobjetos y sumerja el tejido en 2 x SSC con pH 7.4 durante 2 min

a TA. Prolongue la digestión de proteínas durante 2 - 20 min si la muestra aún no está suficientemente digerida. Utilice una muestra reciente y reduzca el tiempo de digestión de proteínas si la muestra está excesivamente digerida.

Protocolo alternativo para la desnaturalización de sondas (desnaturalización de la sonda y la muestra por separado):

1. Desnaturalizar el portaobjetos en formamida al 70 % / 2 x SSC con pH 7.0 a 72 °C (± 1 °C) durante 2 min.
2. Deshidratar cada uno con etanol al 70 %, 85 % y 100 % a temperatura de congelación (-20 °C) durante 2 min. Dejar secar al aire.
3. Desnaturalizar la mezcla de las sondas a 90 °C durante 10 min y, a continuación, introducir en hielo.
4. Centrifugar brevemente el vial de la sonda, realizar un centrifugado con una agitadora vorticial y volver a centrifugar.
5. Colocar la sonda en el portaobjetos desnaturalizado, tapar con el cubreobjetos de vidrio, sellar con cemento de caucho y continuar con la hibridación.

Preguntas frecuentes

Las señales son débiles o inexistentes

- Vuelva a realizar la hibridación y asegúrese de que la sonda se ha mezclado correctamente y de que se encuentra a temperatura ambiente antes de su uso.
- Vuelva a realizar la hibridación y asegúrese de que el lavado astringente (buffer de lavado I) se encuentra a la temperatura adecuada (72 °C [± 1 °C]).
- Tenga en cuenta la caída de temperatura al añadir portaobjetos a los reactivos precalentados.
- Digestión de tejido inadecuada (digestión insuficiente); empape el cubreobjetos en 2 x SSC con pH 7.0 durante 2 min a TA. Prolongue la digestión de proteínas durante 2 - 20 min.

- Digestión de tejido inadecuada (digestión excesiva); deseche el portaobjetos y comience con un corte nuevo. Reduzca la digestión de proteínas en al menos 10 min.
- Utilice un mínimo de 10 μ l de sonda por cubreobjetos de 22 x 22 mm.
- Compruebe que los filtros del microscopio y la fuente de luz son correctos y funcionan perfectamente.

Hay demasiado fondo.

- Digestión de tejido inadecuada. El tejido con digestión insuficiente hace aumentar el fondo. Sumerja el cubreobjetos en 2 x SSC con pH 7.0 durante 2 min a TA. Prolongue la digestión de proteínas durante 2 - 20 min.
- Aumente la temperatura del lavado astringente (buffer de lavado I) al lavar los portaobjetos.

Se produce una hibridación cruzada al emplear sondas centroméricas.

- Aumente la temperatura del lavado astringente (buffer de lavado I) al lavar los portaobjetos.

Aplicación de sonda mínima:

Tamaño del cubreobjetos de vidrio	Aplicación de sonda mínima
22 x 22 mm	10 μ l
22 x 32 mm	15 μ l
22 x 50 mm	23 μ l

Recomendaciones acerca del procedimiento:

La temperatura y la concentración del buffer (astringencia) durante la hibridación y el lavado son importantes, ya que una astringencia más baja puede provocar una fijación no específica de la sonda con otras secuencias, mientras que una astringencia más alta puede

provocar una ausencia de señal. La desnaturalización incompleta del ADN específico o del ADN de la sonda puede provocar una ausencia de señal.

Material necesario que no se suministra: Reactivos:

1. Xileno
2. Formamida
3. Etanol al 100 %, 85 % y 70 %
4. 0,01 M de citrato de sodio con pH 6.0 o tiocianato de sodio al 8 %
5. 0,01 M de HCl y 0,2 M de HCl
6. Solución de pepsina LPU (LK-101A)
7. 1 x PBS con pH 7.4
8. 2 x SSC con pH 7.0
9. Buffer de lavado I (0,4 x SSC / 0,3 % Igepal) (LK-102A)
10. Buffer de lavado II (2 x SSC / 0,1 % Igepal) (LK-103A)
11. Contratación DAPI (LK-095A [0,1 µg/ml] o LK-096A [1 µg/ml])
12. Diluyente de contratación (LK-097A)
13. Fixogum (LK-071A) o cemento de caucho

Material necesario que no se suministra: equipo:

1. Placa Thermobrite (TS-01/02) o Thermobrite Elite (consulte www.Leicabiosystems.com para obtener más información)
2. Incubadora a 37 °C
3. Baño María con una temperatura precisa de entre 37 °C y 90 °C
4. Cubeta Coplin de vidrio o plástico
5. Micropipetas variables (1 µl - 200 µl)
6. Microscopio de fluorescencia equipado con filtros adecuados (consulte las recomendaciones para microscopía de fluorescencia)

Advertencias y precauciones:

1. Para uso exclusivo *in vitro*. Para uso exclusivo profesional. En caso de emergencia, consulte las hojas de datos de seguridad para obtener información sobre la seguridad.
2. Las sondas de ADN y los buffers de hibridación contienen forma-

- mida, que es un teratógeno; no inhalar y evitar el contacto con la piel. Utilice guantes y una bata de laboratorio al manipular sondas de ADN y contratinción DAPI.
3. Todos los materiales se deberán eliminar según las directrices del centro para la eliminación de desechos hospitalarios.
 4. Etiquetado de acuerdo con el Reglamento (CE) 1272/2008

Pictograma



Palabra de advertencia: Peligro

Indicación(es) de peligro

H351 Se sospecha que provoca cáncer.

H360D Puede dañar al feto

H373 Puede perjudicar a determinados órganos (Sangre) por exposición prolongada o repetida en caso de ingestión.

Declaración(es) de prudencia

P201 Pedir instrucciones especiales antes del uso.

P281 Utilizar el equipo de protección individual obligatorio.

P308 + P313 en caso de exposición manifiesta o presunta: Consultar a un médico.

Declaración Suplementaria del Peligro: ninguno(a)

Reservado exclusivamente a usuarios profesionales.

Patentes: *Estos productos o el uso de estos productos deberán respetar los derechos registrados. Las sondas de estos productos se han fabricado mediante tecnología LLC REPEAT-FREE™ de Janssen Diagnostics y poseen la marca de Universal Linkage System (ULS™).*

El fluoróforo empleado en el compuesto del etiquetado de PlatinumBright

- 415 está fabricado y es propiedad de DYOMICS GmbH, quien ejerce el control sobre el producto y posee sus patentes. Hay patentes estadounidenses pendientes para la tecnología LLC REPEAT-FREE™ de Janssen Diagnostics.

La tecnología y los productos de ULS™ están cubiertos por una de las patentes estadounidenses siguientes: 5,580,990; 5,714,327; 5,985,566; 6,133,038; US RE 40,557E, 6,797,818; 7,217,813. KREATECH es una marca comercial de KREATECH Biotechnology BV. ULS™ y PlatinumBright™ son marcas comerciales de KREATECH Biotechnology BV. REPEAT-FREE™ es una marca comercial de Janssen Diagnostics, LLC.

Thermobrite™ es una marca comercial registrada de Leica Biosystems.

Preparación de las células

Uso de sondas FISH de Kreatech™

La hibridación fluorescente *in situ* (FISH) se emplea para identificar o etiquetar secuencias genómicas específicas para poder estudiar su ubicación. Las secuencias de ADN de sondas adecuadas y específicas para cromosomas se etiquetan en primer lugar con moléculas informantes. A continuación, la sonda de ADN etiquetada se hibridiza con cromosomas en metafase o núcleos en interfase en un portaobjetos. Tras el lavado, la muestra se examina para detectar las moléculas informantes mediante microscopía de fluorescencia.

Las sondas FISH REPEAT-FREE de KREATECH no contienen ADN C₀t-1. De este modo, la eficacia de la hibridación aumenta y el fondo se reduce en gran medida debido a una fijación no específica.

Para obtener instrucciones sobre el uso de células en metafase e interfase en cultivos de sangre periférica y médula ósea o preparaciones directas obtenidas a través de métodos citogenéticos estándar, consulte: The AGT genetics laboratory manual, 3rd ed. New York: Raven Press; 1996.

Para obtener resultados óptimos, se recomienda emplear kits de pretratamiento completos de Kreatech (KBI-60005, KBI-60006), que incluyen un protocolo de "Instrucciones de uso" especialmente optimizado.

Para obtener más información, consulte nuestro sitio web:
<http://www.leicabiosystems.com/ihc-ish/kreatech-fish-probes/>

Pretratamiento:

Protocolo I (protocolo estándar; si no resulta satisfactorio, siga el protocolo II)

1. Para envejecer los portaobjetos, someterlos durante 10 minutos (min) a 80 °C y, a continuación, dejar que se enfríen hasta alcanzar la temperatura ambiente (TA).
 2. Colocar los portaobjetos en ácido acético al 70 % recién preparado (en H₂O desionizada [dH₂O]) e incubarlos durante 1 min a TA.
 3. Colocar los portaobjetos en 1 x PBS con pH 7.4 e incubarlos durante 30 segundos (s) a TA.
 4. Colocar los portaobjetos en 1 x PBS con pH 7.4 e incubarlos durante 5 min a TA.
 5. Deshidratar los portaobjetos con etanol al 70 %, 85 % y 100 % e incubar cada uno de ellos durante 1 min a TA. Dejar secar al aire a TA.
- Continúe con la preparación de las sondas.

Protocolo II (para portaobjetos con fondo citoplasmático elevado o preparaciones directas [líquido amniótico o velloidad coriónica])

1. Precalentar 2 x SSC con pH 7.0 y 0,01 M HCl a 37 °C.
 2. Colocar portaobjetos de muestras secos en 2 x SSC precalentado con pH 7.0 e incubar a 37 °C durante 2 min.
 3. Añadir pepsina al 0,01 M de HCl precalentado para alcanzar una concentración final del 0,005 %.
 4. Colocar los portaobjetos en solución de pepsina al 0,005 % en 0,01 M de HCl e incubar a 37 °C durante 5 - 15 min (en función de la cantidad de fondo citoplasmático).
 5. Colocar los portaobjetos en 1 x PBS con pH 7.4 e incubarlos durante 3 min a TA.
 6. Fijar con posterioridad los portaobjetos mediante su incubación en formaldehído tamponado al 1 % en 1 x PBS / 20 mM de MgCl₂ durante 10 min a TA.
 7. Colocar los portaobjetos en 1 x PBS con pH 7.4 e incubarlos durante 3 min a TA.
 8. Deshidratar los portaobjetos con etanol al 70 %, 85 % y 100 % e incubar cada uno de ellos durante 1 min a TA. Dejar secar al aire a TA.
- Continúe con la preparación de las sondas.

Preparación de las sondas:

Centrifugue brevemente el vial de la sonda, realice un centrifugado con una agitadora vorticial y vuelva a centrifugarlo brevemente después de su uso. Espere a que la sonda alcance la TA antes de usarla.

La mayoría de las sondas FISH de Kreatech se suministran listas para usar (LPU). Las sondas FISH de cromosomas completos, centrómeros y subtelómeros se suministran en formatos de concentración x 5 y se deben diluir con el buffer de hibridación incluido u otras sondas de concentrados. Consulte la etiqueta del vial y el folleto específico suministrado con la sonda para obtener información detallada sobre la dilución.

Co-desnaturalización:

1. Aplicar 10 μ l de una sonda o de una mezcla de sondas por campo de 22 x 22 mm.
2. Cubrirlo con un cubreobjetos de vidrio y sellarlo mediante Fixogum (LK-071A) o cemento de caucho.
3. Desnaturalizar la muestra y la sonda en una placa *Thermobrite* (TS-01/02) durante 5 min a 75 °C.

Hibridación:

Incube durante la noche a 37 °C en una placa *Thermobrite* (TS-01/02) o en una cámara húmeda.

Lavado tras hibridación:

1. Precalentar el buffer de lavado I (0,4 x SSC / 0,3 % Igepal) (LK-102A) hasta alcanzar 72 °C.
2. Extraer el cemento de caucho.
3. Colocar un máximo de 14 portaobjetos en 200 ml de buffer de lavado II (2 x SSC / 0,1 % Igepal) (LK-103A) e incubar durante 2 min a TA. Extraer los cubreobjetos. Reutilizar una sola vez para un total de 28 portaobjetos.
4. Colocar un máximo de 14 portaobjetos en 200 ml de buffer de lavado I (0,4 x SSC / 0,3 % Igepal) (LK-102A) precalentado e incubar

durante 2 min a 72 °C (± 1 °C) sin agitación. Reutilizar una sola vez para un total de 28 portaobjetos.

- Colocar un máximo de 14 portaobjetos en 200 ml de buffer de lavado II (2 x SSC / 0,1 % Igepal) (LK-103A) nuevo e incubar durante 1 min a TA sin agitar. Reutilizar una sola vez para un total de 28 portaobjetos.
- Deshidratar los portaobjetos con etanol al 70 %, 85 % y 100 % e incubar cada uno de ellos durante 1 min a TA. Dejar secar al aire a TA. Proceda a realizar la contratinción.

Contratinción:

Aplique 15 μ l de contratinción DAPI (LK-095A [0,1 μ g/ml] o LK-096A [1 μ g/ml]) y coloque el cubreobjetos de vidrio. DAPI se puede diluir mediante un diluyente de contratinción (LK-097A) para obtener la concentración deseada. Coloque los portaobjetos en un lugar oscuro durante 10 - 15 min para que se desarrolle la contratinción. Realice la microscopía.

Recomendaciones para la microscopía de fluorescencia:

Para lograr una visualización óptima, se recomienda utilizar un microscopio con un mantenimiento y una calibración adecuados y equipado con una lámpara de mercurio de 100 W u otra fuente de iluminación adecuada, así como un objetivo de fluorescencia de 63x o 100x. Se emplean filtros de paso de banda triples (DAPI/FITC/Cy3 o DAPI/FITC/TRITC) para visualizar múltiples colores, mientras que los filtros de paso de banda sencillos se emplean para la visualización de un solo color.

Intervalo aceptable de excitación y emisión para fluoróforos FISH de Kreatech:

Fluoróforo	Excitación	Emisión
PlatinumBright™ 415	429 ±20 nm	470 ±30 nm
PlatinumBright™ 495	495 ±20 nm	525 ±30 nm
PlatinumBright™ 550	546 ±12 nm	580 ±30 nm

Solución de problemas:

Protocolo alternativo para muestras de citología:

1. Precalentar 50 ml de 2 x SSC / 0,5 % Igepal (LK-105B) en una cubeta Coplin a 37 °C al baño María. Colocar los portaobjetos preparados en la cubeta Coplin e incubar durante 15 minutos.
2. Deshidratar los portaobjetos con etanol al 70 %, 85 % y 100 % e incubar cada uno de ellos durante 1 min a TA. Dejar secar al aire a TA. Continúe con la preparación de las sondas.

Protocolo alternativo para la desnaturalización de sondas (desnatura-
lización de la sonda y la muestra por separado):

1. Precalentar formamida al 70 % / 2 x SSC con pH 7.0 a 72 °C.
 2. Desnaturalizar los portaobjetos en formamida al 70 % / 2 x SSC con pH 7.0 e incubar a 72 °C (±1 °C) durante 2 min.
 3. Deshidratar cada uno de los portaobjetos con etanol al 70 %, 85 % y 100 % a temperatura de congelación (-20 °C) durante 2 min. Dejar secar al aire a TA.
 4. Desnaturalizar la mezcla de las sondas a 90 °C durante 10 min e introducir en hielo directamente.
 5. Centrifugar brevemente el vial de la sonda, realizar un centrifugado con una agitadora vorticial y volver a centrifugar.
 6. Colocar la sonda en el portaobjetos desnaturalizado, tapar con el cubreobjetos de vidrio y sellar con cemento de caucho.
- Realice la hibridación.

Preguntas frecuentes

Las señales son débiles o inexistentes

- Vuelva a realizar la hibridación y asegúrese de que la sonda se ha mezclado correctamente y de que se encuentra a temperatura ambiente antes de su uso.
- Vuelva a realizar la hibridación y asegúrese de que el lavado astringente (buffer de lavado I) se encuentra a la temperatura adecuada (72 °C [± 1 °C]).
- Tenga en cuenta la caída de temperatura al añadir portaobjetos a los reactivos precalentados.
- Utilice un mínimo de 10 μ l de sonda por cubreobjetos de 22 x 22 mm.
- Compruebe que los filtros del microscopio y la fuente de luz son correctos y funcionan perfectamente.

Hay demasiado fondo o se produce una hibridación cruzada al emplear sondas centroméricas o subtelméricas.

- Aumente la temperatura del lavado astringente (buffer de lavado I) al lavar los portaobjetos.

Aplicación de sonda mínima:

Tamaño del cubreobjetos de vidrio	Aplicación de sonda mínima
22 x 22 mm	10 μ l
22 x 32 mm	15 μ l
22 x 50 mm	23 μ l

Recomendaciones acerca del procedimiento:

La temperatura y la concentración del buffer (astringencia) durante la hibridación y el lavado son importantes, ya que una astringencia más baja puede provocar una fijación no específica de la sonda con otras secuencias, mientras que una astringencia más alta puede provocar una ausencia de señal. La desnaturalización incompleta del ADN específico o del ADN de la sonda puede provocar una ausencia de señal.

Material necesario que no se suministra: reactivos:

1. Kit de reactivos FISH (KBI-60005)
2. Kit de digestión FISH (KBI-60006)
3. Formaldehído tamponado al 1 % / 1 x PBS / 20 mM de $MgCl_2$
4. 1 x PBS con pH 7.4
5. 2 x SSC con pH 7.0
6. Solución de pepsina (LK-101A)
7. Buffer de lavado I (0,4 x SSC / 0,3 % Igepal) (LK-102A)
8. Buffer de lavado II (2 x SSC / 0,1 % Igepal) (LK-103A)
9. Igepal
10. 0,01 M de HCl
11. Fijador de Carnoy (metanol: ácido acético = 3 : 1)
12. Ácido acético al 70 % (en H_2O desionizada)
13. Contratinción DAPI (LK-095A [0,1 $\mu g/ml$] o LK-096A [1 $\mu g/ml$])
14. Diluyente de contratinción (LK-097A)
15. Formamida
16. Etanol al 100 %, 85 % y 70 %
17. Fixogum (LK-071A) o cemento de caucho

Material necesario que no se suministra: equipo:

1. Placa Thermobrite (TS-01/02).
2. Incubadora a 37 °C
3. Baño María con una temperatura precisa de entre 37 °C y 90 °C
4. Cubeta Coplin de vidrio o plástico
5. Micropipetas variables (1 μl - 200 μl)
6. Microscopio de fluorescencia equipado con filtros adecuados (consulte las recomendaciones para microscopía de fluorescencia)

Advertencias y precauciones:

1. Para uso exclusivo *in vitro*. Para uso exclusivo profesional. En caso de emergencia, consulte las hojas de datos de seguridad para obtener información sobre la seguridad.

2. Las sondas de ADN y los buffers de hibridación contienen formamida, que es un teratógeno; no inhalar y evitar el contacto con la piel. Utilice guantes y una bata de laboratorio al manipular sondas de ADN y contratinción DAPI.
3. Todos los materiales se deberán eliminar según las directrices del centro para la eliminación de desechos hospitalarios.
4. Etiquetado de acuerdo con el Reglamento (CE) 1272/2008

Pictograma



Palabra de advertencia: Peligro

Indicación(es) de peligro

H351 Se sospecha que provoca cáncer.

H360D Puede dañar al feto

H373 Puede perjudicar a determinados órganos (Sangre) por exposición prolongada o repetida en caso de ingestión.

Declaración(es) de prudencia

P201 Pedir instrucciones especiales antes del uso.

P281 Utilizar el equipo de protección individual obligatorio.

P308 + P313 en caso de exposición manifiesta o presunta: Consultar a un médico.

Declaración Suplementaria del Peligro: ninguno(a)

Reservado exclusivamente a usuarios profesionales.

Patentes: *Estos productos o el uso de estos productos deberán respetar los derechos registrados. Las sondas de estos productos se han fabricado mediante tecnología LLC REPEAT-FREE™ de Janssen Diagnostics y poseen la marca de Universal Linkage System (ULS™).*

El fluoróforo empleado en el compuesto del etiquetado de PlatinumBright – 415 está fabricado y es propiedad de DYOMICS GmbH, quien ejerce el control sobre el producto y posee sus patentes. Hay patentes estadounidenses pendientes para la tecnología LLC REPEAT-FREE™ de Janssen Diagnostics.

La tecnología y los productos de ULS™ están cubiertos por una de las patentes estadounidenses siguientes: 5,580,990; 5,714,327; 5,985,566; 6,133,038; US RE 40,557E, 6,797,818; 7,217,813. KREATECH es una marca comercial de KREATECH Biotechnology BV. ULS™ y PlatinumBright™ son marcas comerciales de KREATECH Biotechnology BV. REPEAT-FREE™ es una marca comercial de Janssen Diagnostics, LLC.

Thermobrite™ es una marca comercial registrada de Leica Biosystems.

Instruções de utilização

Tecido fixado em formalina e embebido em parafina (FFPE)

Como utilizar sondas FISH da Kreatech™

A hibridização fluorescente *in situ* (FISH) é utilizada para identificar ou etiquetar sequências genómicas alvo para estudar a sua localização. As sequências de ADN de sondas adequadas e específicas para cromossomas são etiquetadas em primeiro lugar com moléculas repórter. A sonda etiquetada de ADN é, em seguida, hibridizada para o ADN alvo no núcleo do tecido. Após lavagem, a amostra é examinada para procura de moléculas repórter através de microscopia de fluorescência.

As sondas FISH KREATECH REPEAT-FREE não contêm ADN C_gt-1. A eficiência da hibridização é aumentada e o ruído de fundo, devido a ligações não-específicas, é reduzido consideravelmente.

Para obter resultados ideais em secções de tecido embebido em parafina, aconselha-se a utilização dos Kits completos de pré-tratamento da Kreatech (KBI-60004, KBI-60007), que incluem um protocolo especialmente melhorado de “Instruções de utilização”.

Para obter mais informações, consulte o nosso Web site: <http://www.leicabiosystems.com/ihc-ish/kreatech-fish-probes/>

Em alternativa, também pode utilizar os seguintes protocolos:

Pré-tratamento de lâminas:

1. Monte secções de tecido fixado em formalina e embebido em parafina (FFPE) de 4 a 6 µm em lâminas com carga elétrica positiva.
2. Coloque no forno as secções de tecido FFPE montado durante 2 horas a 80 °C ou 16 horas a 56 °C.

3. Deparafinize as lâminas em xileno ou um substituto de xileno e incube durante 2 x 10 minutos (min) à temperatura ambiente.
4. Reidrate as lâminas em etanol a 100%, 85% e 70% e incube durante 3 min cada uma à temperatura ambiente.
5. Coloque as lâminas em H₂O desionizado (dH₂O) e incube durante 3 min à temperatura ambiente.

Continue com o Protocolo I ou o Protocolo II.

Protocolo I (protocolo padrão; caso não seja satisfatório, utilize o protocolo II)

1. Preaqueça 0,01 m de citrato de sódio, pH 6,0 entre 96 e 98 °C.
2. Preaqueça 0,01 m de ácido clorídrico a 37 °C (se não utilizar pepsina para uso imediato (LK-101A)).
3. Coloque as lâminas em 0,01 m de citrato de sódio, pH 6,0 entre 96 e 98 °C e incube durante 15 min.
4. Coloque as lâminas em dH₂O e incube durante 2 min à temperatura ambiente.
5. Adicione pepsina a 0,01 m de ácido clorídrico preaquecido para obter uma concentração final de 0,025% (se não utilizar pepsina para uso imediato (LK-101A)).
6. Hidrolise as lâminas em pepsina a 0,025% em 0,01 m de ácido clorídrico a 37 °C ou cubra o tecido em pepsina para uso imediato (LK-101A) à temperatura ambiente e incube entre 5 e 45 min (o tempo depende da fixação do tecido e do tipo do tecido).
7. Coloque as lâminas em dH₂O e incube durante 1 min à temperatura ambiente.
8. Coloque as lâminas em 1 x solução salina de fosfato tamponado, pH 7,4 ou 2 x solução salina de citrato de sódio, pH 7,0 e incube durante 5 min à temperatura ambiente.
9. Desidrate as lâminas em etanol a 70%, 85% e 100% e incube durante 1 min cada uma à temperatura ambiente. Seque ao ar à temperatura ambiente.

Continue com a preparação da sonda.

Protocolo II (para amostras fortemente reticuladas)

1. Preequeça tiocianato de sódio a 8% a 80 °C.
2. Execute pré-tratamento às lâminas com 0,2 m de ácido clorídrico e incube durante 20 min à temperatura ambiente.
3. Coloque as lâminas em dH_2O e incube durante 3 min à temperatura ambiente.
4. Preequeça 0,01 m de ácido clorídrico a 37 °C (se não utilizar pepsina para uso imediato (LK-101A)).
5. Coloque as lâminas em tiocianato de sódio a 8% preaquecido em dH_2O a 80 °C e incube durante 30 min.
6. Coloque as lâminas em 2 x solução salina de citrato de sódio, pH 7,0 e incube durante 3 min à temperatura ambiente.
7. Adicione pepsina a 0,01 m de ácido clorídrico preaquecido para obter uma concentração final de 0,025% (se não utilizar pepsina para uso imediato (LK-101A)).
8. Hidrolise as lâminas em pepsina a 0,025% em 0,01 m de ácido clorídrico a 37 °C ou cubra o tecido em pepsina para uso imediato (LK-101A) à temperatura ambiente e incube entre 5 e 45 min (o tempo depende da fixação do tecido e do tipo do tecido).
9. Coloque as lâminas em dH_2O e incube durante 1 min à temperatura ambiente.
10. Coloque as lâminas em 1 x solução salina de fosfato tamponado, pH 7,4 ou 2 x solução salina de citrato de sódio, pH 7,0 e incube durante 5 min à temperatura ambiente.
11. Desidrate as lâminas em etanol a 70%, 85% e 100% e incube durante 1 min cada uma à temperatura ambiente. Seque ao ar à temperatura ambiente.

Continue com a preparação da sonda.

Preparação da sonda:

Centrifugue brevemente o frasco da sonda, agite o frasco da sonda e centrifugue brevemente antes de utilizar de novo. Deixe que a sonda atinja a temperatura ambiente antes de a utilizar.

As sondas FISH da Kreatech estão preparadas para uso imediato, salvo indicação em contrário na documentação do produto. Consulte o rótulo no frasco e o folheto informativo específico da sonda para obter informações sobre diluição.

Co-desnaturação:

1. Aplique 10 µl de sonda ou de mistura de sonda por campo de 22 x 22 mm.
2. Cubra com uma lamela de vidro e vede com Fixogum (LK-071A) ou cola de borracha.
3. Desnature a amostra e a sonda num *Thermobrite* (TS-01/02) durante 5 min a 80 °C.

Hibridização:

Incube de um dia para o outro a 37 °C num *Thermobrite* (TS-01/02) ou numa câmara humidificada.

Lavagem pós-hibridização:

1. Preaqueça Wash Buffer I (0,4 x solução salina de citrato de sódio / Igepal a 0,3%) (LK-102A) a 72 °C.
2. Remova a cola de borracha.
3. Coloque o máximo de 14 lâminas em 200 ml de Wash Buffer II (2 x solução salina de citrato de sódio / Igepal a 0,1%) (LK-103A) e incube durante 2 min à temperatura ambiente. Retire as lamelas. Reutilize apenas para um total de 28 lâminas.
4. Coloque o máximo de 14 lâminas em 200 ml de Wash Buffer I (0,4 x solução salina de citrato de sódio / Igepal a 0,3%) (LK-102A) preaquecido e incube durante 2 min a 72 °C (± 1 °C) sem agitação. Reutilize apenas para um total de 28 lâminas.
5. Coloque o máximo de 14 lâminas em 200 ml de Wash Buffer II (2 x solução salina de citrato de sódio / Igepal a 0,1%) (LK-103A) puro e incube durante 1 min à temperatura ambiente sem agitação. Reutilize apenas para um total de 28 lâminas.

6. Desidrate em etanol a 70%, 85% e 100% puro e incube durante 1 min cada uma à temperatura ambiente. Seque ao ar à temperatura ambiente e continue com a Contracoloração.

Contracoloração:

Aplique 15 µl de contracoloração DAPI (LK-095A (0,1 µg/ml) ou LK-096A (1 µg/ml)) e coloque a lamela de vidro. O DAPI pode ser diluído em diluente de contracoloração (LK-097A) para obter a concentração pretendida. Coloque as lâminas num local escuro. A contracoloração ocorre entre 10 e 15 min. Continue com a microscopia.

Recomendações para a microscopia de fluorescência:

Para conseguir a visualização ideal, utilize um microscópio preservado adequadamente e regularmente calibrado equipado com uma lâmpada de mercúrio de 100 W ou outra fonte de iluminação adequada e uma objetiva de fluorescência de 63x ou 100x. São utilizados filtros triplos de banda (DAPI/FITC/Cy3 ou DAPI/FITC/TRITC) para visualização de múltiplas cores e filtros únicos de banda para visualização de cores únicas.

Excitação adequada e alcance de emissão para fluoróforos Kreatech:

Fluoróforo	Excitação	Emissão
PlatinumBright™ 415	429 ±20 nm	470 ±30 nm
PlatinumBright™ 495	495 ±20 nm	525 ±30 nm
PlatinumBright™ 550	546 ±12 nm	580 ±30 nm

Resolução de problemas.

Verifique o pré-tratamento e a hidrólise da proteína ao aplicar 15 µl de contracoloração DAPI e avalie as lâminas ao utilizar um microscópio de fluorescência equipado com um filtro DAPI. Uma hidrólise de proteína de 15 min é suficiente para deteção de vários tumores mamários. Remova a lamela e embeba o tecido em 2 x solução salina de citrato de sódio, pH 7,4 durante 2 min à temperatura ambiente. Es-

tenda o período de hidrólise da proteína entre 2 e 20 min se a amostra não apresentar hidrólise suficiente. Utilize uma amostra limpa e reduza o período de hidrólise da proteína se a amostra apresentar hidrólise excessiva.

Protocolo alternativo para desnaturação de sonda (desnaturação de amostra e sonda em separado):

1. Desnatura a lâmina em formamida a 70% / 2 x solução salina de citrato de sódio, pH 7,0 a 72  C (± 1  C) durante 2 min.
2. Desidrate em etanol a 70%, 85% e 100% gelado (- 20  C) durante 2 min cada uma. Seque ao ar.
3. Desnatura a mistura da sonda a 90  C durante 10 min e, em seguida, coloque em gelo.
4. Centrifugue brevemente o frasco da sonda, agite o frasco da sonda e, em seguida, centrifugue o frasco da sonda novamente.
5. Aplique a sonda a uma lâmina desnaturada, cubra com uma lamela de vidro, vede com cola de borracha e continue com a Hibridização.

Perguntas mais frequentes

Obtive resultados fracos ou não obtive resultados

- Hibridize novamente, assegurando-se de que a sonda foi misturada corretamente e que se encontra   temperatura ambiente antes da utilização.
- Hibridize novamente, assegurando-se de que a lavagem de estringência (Wash Buffer I)   realizada   temperatura correta (72  C (± 1  C)).
- Tenha em consideração a queda da temperatura ao adicionar lâminas a reagentes preaquecidos.
- Hidrólise incorreta de tecido (hidrólise insuficiente) – embeba a lamela em 2 x solução salina de citrato de sódio, pH 7,0 durante 2 min   temperatura ambiente. Estenda o período de hidrólise de proteína entre 2 e 20 min.

- Hidrólise incorreta de tecido (hidrólise excessiva) – elimine a lâmina e recomece com uma secção limpa. Reduza a hidrólise da proteína, pelo menos, 10 min.
- Utilize 10 µl de sonda, pelo menos, por lamela de 22 x 22 mm.
- Verifique se os filtros microscópicos e a fonte de iluminação estão corretos e a funcionar corretamente.

Obtive ruído de fundo elevado.

- Hidrólise incorreta de tecido. Um tecido com hidrólise insuficiente aumenta o ruído de fundo. Embeba a lamela em 2 x solução salina de citrato de sódio, pH 7,0 durante 2 min à temperatura ambiente. Estenda o período de hidrólise de proteína entre 2 e 20 min.
- Aumente a temperatura da lavagem de estrigência (Wash Buffer I) ao lavar as lâminas.

Obtive hibridização cruzada ao utilizar sondas centroméricas.

- Aumente a temperatura da lavagem de estrigência (Wash Buffer I) ao lavar as lâminas.

Aplicação mínima da sonda:

Tamanho da lamela de vidro	Aplicação mínima da sonda
22 x 22 mm	10 µl
22 x 32 mm	15 µl
22 x 50 mm	23 µl

Recomendações processuais:

A temperatura e a concentração da solução tamponada (estrigência) da hibridização e a lavagem são importantes, uma vez que uma estrigência mais baixa pode resultar numa ligação não-específica da sonda a outras sequências e uma estrigência mais elevada pode resultar em ausência de resultados. Uma desnaturação incompleta do ADN alvo e/ou do ADN da sonda pode resultar em ausência de resultados.

Materiais necessários não fornecidos: reagentes:

1. Xileno
2. Formamida
3. Etanol a 100%, 85% e 70%
4. 0,01 m de citrato de sódio, pH 6,0 ou tiocianato de sódio a 8%
5. 0,01 m de ácido clorídrico e 0,2 m de ácido clorídrico
6. Solução de pepsina para uso imediato (LK-101A)
7. 1 x solução salina de fosfato tamponado, pH 7,4
8. 2 x solução salina de citrato de sódio, pH 7,0
9. Wash Buffer I (0,4 x solução salina de citrato de sódio / Igepal a 0,3%) (LK-102A)
10. Wash Buffer II (2 x solução salina de citrato de sódio / Igepal a 0,1%) (LK-103A)
11. Contracoloração DAPI (LK-095A (0,1 µg/ml) ou LK-096A (1 µg/ml))
12. Diluente de contracoloração (LK-097A)
13. Fixogum (LK-071A) ou cola de borracha

Materiais necessários não fornecidos: equipamentos:

1. *Thermobrite* (TS-01/02) ou *Thermobrite Elite* (consulte www.Leicabiosystems.com para obter mais informações)
2. Incubadora a 37 °C
3. Banho de água com temperatura precisa de 37 °C a 90 °C
4. Tina de coloração Coplin de plástico ou vidro
5. Micropipetas diversas (1 µl a 200 µl)
6. Microscópio de fluorescência equipado com filtros adequados (consulte as recomendações para microscopia de fluorescência)

Advertências e precauções:

1. Apenas para utilização *in vitro*. Apenas para utilização profissional. Em caso de emergência, verifique as fichas de dados de segurança para obter informações de segurança.
2. As sondas de ADN e as soluções tamponadas de hibridização contêm formamida, uma substância teratogénica; não inale nem

- permita contacto cutâneo. Utilize luvas e uma bata de laboratório ao manusear sondas de ADN e contracoloração DAPI.
3. Todos os materiais devem ser eliminados de acordo com as diretrizes da sua instituição relativamente a eliminação de resíduos hospitalares.
 4. Rotulagem de acordo com o Regulamento (CE) 1272/2008

Pictograma



Palavra-sinal: Perigo

Declaração de perigo

H351 Suspeito de provocar cancro.

H360D Pode afetar o nascituro.

H373 Pode afetar os órgãos (sangue) após exposição prolongada ou repetida por ingestão.

Declaração de precaução

P201 Pedir instruções específicas antes da utilização.

P281 Usar o equipamento de proteção individual exigido.

P308 + P313 EM CASO DE exposição ou suspeita de exposição: consulte um médico.

Declarações de perigo adicionais: nenhum(a)

Apenas para utilizadores profissionais

Patentes: *estes produtos ou a utilização destes produtos estão sujeitos ao direito de propriedade. As sondas nestes produtos são produzidas utilizando a tecnologia REPEAT-FREE™ da Janssen Diagnostics, LLC e etiquetadas com o Universal Linkage System (ULS™).*

O fluoróforo utilizado no composto de etiquetagem PlatinumBright - 415 está sujeito a patentes, detidas ou controladas, e é fabricado pela DYOMICS GmbH. Patentes nos E.U.A. e internacionais pendentes para a tecnologia REPEAT-FREE™ da Janssen Diagnostics, LLC.

Os produtos e a tecnologia ULS™ estão abrangidos por uma ou mais das seguintes patentes nos E.U.A.: 5,580,990; 5,714,327; 5,985,566; 6,133,038; US RE 40,557E, 6,797,818; 7,217,813. KREATECH é um nome comercial da KREATECH Biotechnology BV. ULS™ e PlatinumBright™ são marcas registadas da KREATECH Biotechnology BV. REPEAT-FREE™ é uma marca registada da Janssen Diagnostics, LLC.

Thermobrite™ é uma marca registada da Leica Biosystems.

Preparações celulares

Como utilizar sondas FISH da Kreatech™

A hibridização fluorescente *in situ* (FISH) é utilizada para identificar ou etiquetar sequências genômicas alvo para estudar a sua localização. As sequências de ADN de sondas adequadas e específicas para cromossomas são etiquetadas em primeiro lugar com moléculas repórter. A sonda etiquetada de ADN é, em seguida, hibridizada para os cromossomas em metáfase ou para os núcleos em intérfase, numa lâmina. Após lavagem, a amostra é examinada para procura de moléculas repórter através de microscopia de fluorescência.

As sondas FISH KREATECH REPEAT-FREE não contêm ADN C₀t-1. A eficiência da hibridização é aumentada e o ruído de fundo, devido a ligações não-específicas, é reduzido consideravelmente.

Para utilizar em células em intérfase e em metáfase de culturas de sangue periférico e de medula espinal ou para preparações diretas através de métodos citogenéticos padrão, consulte: The AGT genetics laboratory manual, 3rd ed. New York: Raven Press; 1996.

Para obter resultados ideais, aconselha-se a utilização dos Kits completos de pré-tratamento da Kreatech (KBI-60005, KBI-60006), que incluem um protocolo especialmente melhorado de “Instruções de utilização”.

Para obter mais informações, consulte o nosso Web site: <http://www.leicabiosystems.com/ihc-ish/kreatech-fish-probes/>

Pré-tratamento:

Protocolo I (protocolo padrão; caso não seja satisfatório, utilize o protocolo II)

1. Para envelhecer as lâminas, coloque-as no forno durante 10 minutos (min) a 80 °C e, em seguida, deixe as lâminas arrefecerem até à temperatura ambiente.
2. Coloque as lâminas numa solução de ácido acético a 70% (em H₂O desionizado (dH₂O)) recentemente preparada e incube durante 1 min à temperatura ambiente.
3. Coloque as lâminas em 1 x solução salina de fosfato tamponado, pH 7,4 e incube durante 30 segundos (s) à temperatura ambiente.
4. Coloque as lâminas em 1 x solução salina de fosfato tamponado, pH 7,4 e incube durante 5 min à temperatura ambiente.
5. Desidrate a lâmina em etanol a 70%, 85% e 100% e incube durante 1 min cada à temperatura ambiente. Seque ao ar à temperatura ambiente.

Continue com a Preparação da sonda.

Protocolo II (para lâminas com ruído de fundo citoplasmático elevado ou preparações diretas (fluido amniótico ou vilosidade crónica))

1. Preaqueça 2 x solução salina de citrato de sódio, pH 7,0 e 0,01 M de ácido clorídrico a 37 °C
2. Coloque lâminas secas de amostra em 2 x solução salina de citrato de sódio preaquecida, pH 7,0 e incube a 37 °C durante 2 min.
3. Adicione pepsina à solução preaquecida de 0,01 M de ácido clorídrico para obter uma concentração final de 0,005%.
4. Coloque as lâminas numa solução de pepsina a 0,005% em 0,01 M de ácido clorídrico e incube a 37 °C entre 5 e 15 min (dependendo da quantidade de ruído de fundo citoplasmático).
5. Coloque as lâminas em 1 x solução salina de fosfato tamponado, pH 7,4 e incube durante 3 min à temperatura ambiente.
6. Fixe as lâminas, posteriormente, incubando em solução de formaldeído tamponado a 1% em 1 x solução salina de fosfato tamponado / 20 mm de MgCl₂ durante 10 min à temperatura ambiente.
7. Coloque as lâminas em 1 x solução salina de fosfato tamponado, pH 7,4 e incube durante 3 min à temperatura ambiente.

8. Desidrate a lâmina em etanol a 70%, 85% e 100% e incube durante 1 min cada à temperatura ambiente. Seque ao ar à temperatura ambiente.

Continue com a Preparação da sonda.

Preparação da sonda:

Centrifugue brevemente o frasco da sonda, agite o frasco da sonda e centrifugue brevemente antes de utilizar de novo. Deixe que a sonda atinja a temperatura ambiente antes de a utilizar.

A maioria das sondas FISH da Kreatech é fornecida para uso imediato. As sondas FISH de cromossoma completo, centrómero e subtelómero são fornecidas em 5 unidades de formatos concentrados e devem ser diluídas com a solução tamponada de hibridização fornecida e/ou com outras sondas concentradas. Consulte o rótulo no frasco e o folheto informativo específico da sonda para obter informações sobre diluição.

Co-desnaturação:

1. Aplique 10 µl de sonda ou de mistura de sonda por campo de 22 x 22 mm.
2. Cubra com uma lamela de vidro e vede com Fixogum (LK-071A) ou cola de borracha.
3. Desnature a amostra e a sonda num *Thermobrite* (TS-01/02) durante 5 min a 75 °C.

Hibridização:

Incube de um dia para o outro a 37 °C num *Thermobrite* (TS-01/02) ou numa câmara humidificada.

Lavagem pós-hibridização:

1. Preaqueça Wash Buffer I (0,4 x solução salina de citrato de sódio / Igepal a 0,3%) (LK-102A) a 72 °C.
2. Remova a cola de borracha.

3. Coloque o máximo de 14 lâminas em 200 ml de Wash Buffer II (2 x solução salina de citrato de sódio / Igepal a 0,1%) (LK-103A) e incube durante 2 min à temperatura ambiente. Retire as lamelas. Reutilize apenas para um total de 28 lâminas.
4. Coloque o máximo de 14 lâminas em 200 ml de Wash Buffer I (0,4 x solução salina de citrato de sódio / Igepal a 0,3%) (LK-102A) preaquecido e incube durante 2 min a 72 °C (± 1 °C) sem agitação. Reutilize apenas para um total de 28 lâminas.
5. Coloque o máximo de 14 lâminas em 200 ml de Wash Buffer II (2 x solução salina de citrato de sódio / Igepal a 0,1%) (LK-103A) puro e incube durante 1 min à temperatura ambiente sem agitação. Reutilize apenas para um total de 28 lâminas.
6. Desidrate as lâminas em etanol a 70%, 85% e 100% e incube durante 1 min cada uma à temperatura ambiente. Seque ao ar à temperatura ambiente.

Continue com a Contracoloração.

Contracoloração:

Aplique 15 μ l de contracoloração DAPI (LK-095A (0,1 μ g/ml) ou LK-096A (1 μ g/ml)) e coloque a lamela de vidro. O DAPI pode ser diluído em diluente de contracoloração (LK-097A) para obter a concentração pretendida. Coloque as lâminas num local escuro. A contracoloração ocorre entre 10 e 15 min. Continue com a microscopia.

Recomendações para a microscopia de fluorescência:

Para conseguir a visualização ideal, utilize um microscópio preservado adequadamente e regularmente calibrado equipado com uma lâmpada de mercúrio de 100 W ou outra fonte de iluminação adequada e uma objetiva de fluorescência de 63x ou 100x. São utilizados filtros triplos de banda (DAPI/FITC/Cy3 ou DAPI/FITC/TRITC) para visualização de múltiplas cores e filtros únicos de banda para visualização de cores únicas.

Excitação adequada e alcance de emissão para fluoróforos FISH da Kreatech:

Fluoróforo	Excitação	Emissão
PlatinumBright™ 415	429 ±20 nm	470 ±30 nm
PlatinumBright™ 495	495 ±20 nm	525 ±30 nm
PlatinumBright™ 550	546 ±12 nm	580 ±30 nm

Resolução de problemas:

Protocolo alternativo para amostras de citologia:

1. Preaqueça 50 ml de 2 x solução salina de citrato de sódio / Igepal a 0,5% (LK-105B) numa tina de coloração Coplin até 37 °C num banho de água. Coloque lâminas preparadas na tina de coloração Coplin e incube durante 15 minutos.
2. Desidrate as lâminas em etanol a 70%, 85% e 100% e incube durante 1 min cada uma à temperatura ambiente. Seque ao ar à temperatura ambiente.

Continue com a Preparação da sonda.

Protocolo alternativo para desnaturação de sonda (desnaturação de amostra e sonda em separado):

1. Preaqueça uma solução de formamida a 70% / 2 x solução salina de citrato de sódio, pH 7,0 a 72 °C.
2. Desnature as lâminas em solução de formamida a 70% / 2 x solução salina de citrato de sódio, pH 7,0 e incube a 72 °C (± 1 °C) durante 2 min.
3. Desidrate as lâminas em etanol a 70%, 85% e 100% gelado (- 20 °C) e incube cada uma durante 2 min. Seque ao ar à temperatura ambiente.
4. Desnature a mistura da sonda a 90 °C durante 10 minutos e coloque diretamente em gelo.
5. Centrifugue brevemente o frasco da sonda, agite o frasco da sonda e, em seguida, centrifugue o frasco da sonda novamente.

6. Aplique a sonda à lâmina desnaturada, cubra com uma lamela de vidro e vede com cola de borracha.

Continue com a Hibridização.

Perguntas mais frequentes

Obtive resultados fracos ou não obtive resultados

- Hibridize novamente, assegurando-se de que a sonda foi misturada corretamente e que se encontra à temperatura ambiente antes da utilização.
- Hibridize novamente, assegurando-se de que a lavagem de estringência (Wash Buffer I) é realizada à temperatura correta (72 °C (\pm 1 °C)).
- Tenha em consideração a queda da temperatura ao adicionar lâminas a reagentes preaquecidos.
- Utilize 10 μ l de sonda, pelo menos, por lamela de 22 x 22 mm.
- Verifique se os filtros microscópicos e a fonte de iluminação estão corretos e a funcionar corretamente.

Obtive um ruído de fundo elevado ou uma hibridização cruzada não-específica ao utilizar sondas centroméricas ou subteloméricas.

- Aumente a temperatura da lavagem de estringência (Wash Buffer I) ao lavar as lâminas.

Aplicação mínima da sonda:

Tamanho da lamela de vidro	Aplicação mínima da sonda
22 x 22 mm	10 μ l
22 x 32 mm	15 μ l
22 x 50 mm	23 μ l

Recomendações processuais:

A temperatura e a concentração da solução tamponada (estringência) da hibridização e a lavagem são importantes, uma vez que uma estringência mais baixa pode resultar numa ligação não-específica

da sonda a outras sequências e uma estringência mais elevada pode resultar em ausência de resultados. Uma desnaturação incompleta do ADN alvo e/ou do ADN da sonda pode resultar em ausência de resultados.

Materiais necessários não fornecidos: reagentes:

1. Kit de reagentes FISH (KBI-60005)
2. Kit de hidrólise FISH (KBI-60006)
3. Solução de formaldeído tamponado a 1% / 1 x solução salina de fosfato tamponado / 20 mM de $MgCl_2$
4. 1 x solução salina de fosfato tamponado, pH 7,4
5. 2 x solução salina de citrato de sódio, pH 7,0
6. Solução de pepsina (LK-101A)
7. Wash buffer I (0,4 x solução salina de citrato de sódio / Igepal a 0,3%) (LK-102A)
8. Wash buffer II (2 x solução salina de citrato de sódio / Igepal a 0,1%) (LK-103A)
9. Igepal
10. 0,01 M de ácido clorídrico
11. Solução fixadora de Carnoy (metanol : ácido acético = 3 : 1)
12. Ácido acético a 70% (em H_2O desionizado)
13. Contracoloração DAPI (LK-095A (0,1 $\mu g/ml$) ou LK-096A (1 $\mu g/ml$))
14. Diluente de contracoloração (LK-097A)
15. Formamida
16. Etanol a 100%, 85% e 70%
17. Fixogum (LK-071A) ou cola de borracha

Materiais necessários não fornecidos: equipamentos:

1. Thermobrite (TS-01/02).
2. Incubadora a 37 °C
3. Banho de água com temperatura precisa de 37 °C a 90 °C
4. Tina de coloração Coplin de plástico ou vidro
5. Micropipetas diversas (1 μl a 200 μl)

6. Microscópio de fluorescência equipado com filtros adequados (consulte as Recomendações para microscopia de fluorescência)

Advertências e precauções:

1. Apenas para utilização *in vitro*. Apenas para utilização profissional. Em caso de emergência, verifique as fichas de dados de segurança para obter informações de segurança.
2. As sondas de ADN e as soluções tamponadas de hibridização contêm formamida, uma substância teratogénica; não inale nem permita contacto cutâneo. Utilize luvas e uma bata de laboratório ao manusear sondas de ADN e contracoloração DAPI.
3. Todos os materiais devem ser eliminados de acordo com as diretrizes da sua instituição relativamente a eliminação de resíduos hospitalares.
4. Rotulagem de acordo com o Regulamento (CE) 1272/2008

Pictograma



Palavra-sinal: Perigo

Declaração de perigo

H351 Suspeito de provocar cancro.

H360D Pode afetar o nascituro.

H373 Pode afetar os órgãos (sangue) após exposição prolongada ou repetida por ingestão.

Declaração de precaução

P201 Pedir instruções específicas antes da utilização.

P281 Usar o equipamento de proteção individual exigido.

P308 + P313 EM CASO DE exposição ou suspeita de exposição: consulte um médico.

Declarações de perigo adicionais: nenhum(a)

Apenas para utilizadores profissionais

Patentes: *estes produtos ou a utilização destes produtos estão sujeitos ao direito de propriedade. As sondas nestes produtos são produzidas utilizando a tecnologia REPEAT-FREE™ da Janssen Diagnostics, LLC e etiquetadas com o Universal Linkage System (ULS™).*

O fluoróforo utilizado no composto de etiquetagem PlatinumBright - 415 está sujeito a patentes, detidas ou controladas, e é fabricado pela DYOMICS GmbH. Patentes nos E.U.A. e internacionais pendentes para a tecnologia REPEAT-FREE™ da Janssen Diagnostics, LLC.

Os produtos e a tecnologia ULS™ estão abrangidos por uma ou mais das seguintes patentes nos E.U.A.: 5,580,990; 5,714,327; 5,985,566; 6,133,038; US RE 40,557E, 6,797,818; 7,217,813. KREATECH é um nome comercial da KREATECH Biotechnology BV. ULS™ e PlatinumBright™ são marcas registadas da KREATECH Biotechnology BV. REPEAT-FREE™ é uma marca registada da Janssen Diagnostics, LLC.

Thermobrite™ é uma marca registada da Leica Biosystems

Kullanım Talimatları

Formalinle sabitlenip parafine gömülmüş doku

Kreatech™ FISH problemlerini kullanma

Yerlerini inceleyebilmek amacıyla hedef genom dizilişlerini tanımlamak veya etiketlemek için floresan *in situ* hibridizasyon (FISH) kullanılır. Kromozoma özgü uygun problemlerden elde edilen DNA dizilişleri önce haberci (raportör) moleküller ile etiketlenir. Etiketlenen DNA probu daha sonra dokunun çekirdeklerindeki hedef DNA'ya hibritlenir. Yıkama sonrasında örnek, floresans mikroskopisi ile haberci moleküller açısından taranır.

KREATECH REPEAT-FREE FISH problemleri C₀t-1 DNA içermez. Bu nedenle hibridizasyon etkisi artmıştır ve spesifik olmayan bağlanma nedeniyle arka plan sesi fazlasıyla düşüktür.

Parafine gömülmüş doku kesitleri üzerinde en iyi sonuç için, özel olarak optimize edilmiş "Kullanım Talimatı" protokolünü içeren, Kreatech eksiksiz Ön işlem kitlerinin (KBI-60004, KBI-60007) kullanılması önerilir.

Daha fazla bilgi için web sitemize başvurun: <http://www.leicabiosystems.com/ihc-ish/kreatech-fish-probes/>

Alternatif olarak aşağıdaki protokoller de kullanılabilir:

Lam ön işlemi:

1. 4-6 µm formalinle sabitlenip parafine gömülmüş (FFPE) doku kesitlerini, pozitif yüklü lamlara yerleştirin.

2. Yerleřtirilen FFPE doku kesitlerini 80 °C sıcaklıkta 2 saat veya 56 °C sıcaklıkta 16 saat süreyle fırınlayın.
3. Ksilen ya da ksilen ikamesi içinde lamları parafinden arındırın ve oda sıcaklığında 2 x 10 dakika (dak.) enkübe edin.
4. Lamları %100, %85 ve %70 etanol içinde yeniden hidrate edin ve her birini oda sıcaklığında 3 dak. enkübe edin.
5. Lamları deiyonize H₂O (dH₂O) içine koyup oda sıcaklığında 3 dak. enkübe edin.

Protokol I veya Protokol II ile iřlemden geçirin.

Protokol I (standart protokol; tatmin edici olmazsa protokol II'yi kullanın)

1. 0,01 M sodyum sitrat pH 6,0'ya ön ısıtma uygulayıp 96 - 98 °C'ye getirin.
2. 0,01 M HCl'ye ön ısıtma uygulayıp 37 °C'ye getirin (Kullanıma Hazır () pepsin (LK-101A) kullanılmıyorsa).
3. Lamları 96 - 98 °C'deki 0,01 M sodyum sitrat pH 6.0 içine koyun ve 15 dak. enkübe edin.
4. Lamları dH₂O içine koyun ve oda sıcaklığında 2 dak. enkübe edin.
5. n ısıtma uygulanmıř 0,01 M HCl'ye pepsin ekleyerek %0,025 nihai konsantrasyona ulařmasını saėlayın. (kullanıma hazır pepsin (LK-101A) kullanılmıyorsa).
6. Lamları 37 °C'de 0,01 M HCl içindeki %0,025 pepsinde veya oda sıcaklığında kullanıma hazır pepsin (LK-101A) içindeki örtü dokusunda parçalayın ve 5 - 45 dak. (bu süre, doku fiksasyonuna ve doku türüne göre deėiřir) enkübe edin.
7. Lamları dH₂O içine koyun ve oda sıcaklığında 1 dak. enkübe edin.
8. Lamları 1 x PBS, pH 7,4 veya 2 x SSC, pH 7,0 içine koyun ve oda sıcaklığında 5 dak. enkübe edin.

9. Lamları %70, %85 ve %100 etanol içinde dehidrate edin ve her birini oda sıcaklığında 1 dak. enkübe edin. Oda sıcaklığında havayla kurutun.

Prob hazırlama işlemiyle devam edin.

Protokol II (yoğun şekilde çapraz bağlı numuneler)

1. %8 sodyum tiyosiyanaata ön ısıtma uygulayıp 80 °C'ye getirin.
2. Lamlara 0,2 M HCl ile ön işlem uygulayın ve oda sıcaklığında 20 dak. enkübe edin.
3. Lamları dH₂O içine koyun ve oda sıcaklığında 3 dak. enkübe edin.
4. 0,01 M HCl'ye ön ısıtma uygulayıp 37 °C'ye getirin (kullanıma hazır pepsin (LK-101A) kullanılmıyorsa).
5. dH₂O içinde lamları 80 °C'de ön ısıtma uygulanmış %8 sodyum tiyosiyanaata koyup 30 dak. enkübe edin.
6. Lamları 2 x SSC, pH 7,0 içine koyun ve oda sıcaklığında 3 dak. enkübe edin.
7. Ön ısıtma uygulanmış 0,01 M HCl'ye pepsin ekleyip %0,025 nihai konsantrasyona getirin (kullanıma hazır pepsin (LK-101A) kullanılmıyorsa).
8. Lamları 37 °C'de 0,01 M HCl içindeki %0,025 pepsinde veya oda sıcaklığında kullanıma hazır pepsin (LK-101A) içindeki örtü dokusunda parçalayın ve 5 - 45 dak. (bu süre, doku fiksasyonuna ve doku türüne göre değişir) enkübe edin.
9. Lamları dH₂O içine koyun ve oda sıcaklığında 1 dak. enkübe edin.
10. Lamları 1 x PBS, pH 7,4 veya 2 x SSC, pH 7,0 içine koyun ve oda sıcaklığında 5 dak. enkübe edin.
11. Lamları %70, %85 ve %100 etanol içinde dehidrate edin ve her birini oda sıcaklığında 1 dak. enkübe edin. Oda sıcaklığında havayla kurutun.

Prob hazırlama işlemiyle devam edin.

Prob hazırlama:

prob flakonunu kısa bir süreliğine hızlıca çalkalayın; prob flakonunu döndürerek karıştırın ve kullanmadan önce tekrar kısa bir süreliğine hızlıca çalkalayın. Kullanmadan önce probun oda sıcaklığına ulaşmasını bekleyin.

Ürün belgelerinde aksi belirtilmedikçe, Kreatech FISH problemleri kullanıma hazır olarak sağlanır. Özel dilüsyon bilgileri için flakon üzerindeki etikete ve özel prob prospektüsüne başvurun.

Birlikte denatürasyon:

1. 22 x 22 mm'lik alan başına 10 µl prob veya prob karışımı uygulayın.
2. Cam lamel ile kapatın ve Fixogum (LK-071A) ya da lastik solüsyon ile sızdırmazlığını sağlayın.
3. Numuneyi ve probu Thermobrite (TS-01/02) cihazında 80 °C'de 5 dak. denatüre edin.

Hibridizasyon:

37 °C'de, Thermobrite (TS-01/02) cihazında veya nemli haznede gece boyunca enkübe edin.

Hibridizasyon sonrası yıkama:

1. Yıkama Tamponu I'ye (0,4 x SSC / %0,3 Igepal) (LK-102A) ön ısıtma uygulayıp 72 °C'ye getirin.
2. Lastik solüsyonu çıkarın.
3. 200 ml Yıkama Tamponu II (2 x SSC / %0,1 Igepal) (LK-103A) içine 14 lam koyun ve oda sıcaklığında 2 dak. enkübe edin. Lamelleri çıkarın. Toplam 28 lam için yalnızca bir kez yeniden kullanın.
4. Ön ısıtma uygulanmış 200 ml Yıkama Tamponu I'e (0,4 x SSC / %0,3 Igepal) (LK-102A) 14 lam koyun; 72 °C'de (± 1 °C) karıştırmadan 2 dak. enkübe edin. Toplam 28 lam için yalnızca bir kez yeniden kullanın.

5. 200 ml taze Yıkama Tamponu II (2 x SSC / %0,1 Igepal) (LK-103A) içine 14 lam koyun; oda sıcaklığında karıştırma-
dan 1 dak. enkübe edin. Toplam 28 lam için yalnızca bir kez
yeniden kullanın.
6. Taze %70, %85 ve %100 etanol içinde dehidrate edin ve her
birini oda sıcaklığında 1 dak. enkübe edin. Oda sıcaklığında
havayla kurutun ve Karşıt Boyama işlemine geçin.

Karşıt boyama:

15 µl DAPI karşıt boya (LK-095A (0,1 µg/ml) veya LK-096A (1 µg/ml) uygulayın ve cam lameli yerleştirin. DAPI, istenen konsantrasyonu elde etmek üzere karşıt boya seyreltici (LK-097A) içinde seyreltilebilir. Lamaları karanlık ortama koyun ve karşıt boyanın oluşması için 10 - 15 dak. bekleyin. Mikroskopi ile devam edin.

Floresans mikroskopisi için öneriler:

en uygun görüntüleme için, 100 W cıva buharlı lamba veya diğer uygun ışık kaynağı ile donatılmış, bakımı iyi yapılan ve düzenli aralıklarla kalibre edilen bir mikroskop ve 63x ya da 100x floresans merceği kullanın. Birden fazla rengi görüntülemek için üçlü bant geçirici filtreler (DAPI/FITC/Cy3 veya DAPI/FITC/TRITC) kullanılırken, tek renk görüntüleme için tekli bant geçirici filtreler kullanılır.

Kreatech floroforlar için uygun eksitasyon ve emisyon aralığı:

Florofor	Eksitasyon	Emisyon
PlatinumBright™ 415	429 ± 20 nm	470 ± 30 nm
PlatinumBright™ 495	495 ± 20 nm	525 ± 30 nm
PlatinumBright™ 550	546 ± 12 nm	580 ± 30 nm

Sorun giderme.

15 µl DAPI karşıt boya uygulayarak protein sindirimini ve ön işlemi kontrol edin ve DAPI filtresiyle donatılmış bir floresans mikroskobu kullanarak lamaları değerlendirin. Çok çeşitli meme tümörleri için normalde 15 dak. protein sindirimi yeterlidir. Lameli çıkarın ve dokuyu oda sıcaklığında 2 dak. süreyle 2 x SSC, pH 7,4 içinde ıslatın. Numune yeterince parçalanmamışsa protein sindirimini 2 - 20 dak. uzatın. Numune aşırı parçalanmışsa, taze bir numune kullanın ve protein sindirimi süresini azaltın.

Prob denatürasyonu için alternatif protokol (ayrı prob ve numune denatürasyonu):

1. Lamı %70 formamid / 2 x SSC, pH 7,0 içinde, 72 °C'de (± 1 °C) 2 dak. denatüre edin.
2. Buz soğukluğundaki (-20 °C) %70, %85 ve %100 etanol içinde ikişer dak. dehidrate edin. Havayla kurutun.
3. Prob karışımını 90 °C'de 10 dak. denatüre edin ve ardından buzun üzerine koyun.
4. Prob flakonunu kısa bir süreliğine hızlıca çalkalayın; prob flakonunu döndürerek karıştırın ve sonra prob flakonunu tekrar hızlıca çalkalayın.
5. Probu denatüre lama uygulayın, cam lamel ile örtüp lastik solüsyon ile sızdırmazlığını sağlayın ve Hibridizasyon ile devam edin.

Sık sorulan sorular.

Zayıf sinyaller alıyorum ya da hiç sinyal almıyorum

- Probu doğru şekilde karıştırıldığından ve kullanım öncesinde oda sıcaklığında bulunduğundan emin olarak tekrar hibridizasyon uygulayın.
- Sıklık yıkamasının (Yıkama Tamponu I) doğru sıcaklıkta (72 °C (± 1 °C)) bulunduğundan emin olarak tekrar hibridizasyon uygulayın.

- Lamları ön ısıtma uygulanmış reaktiflere eklerken sıcaklık düşüşünü hesaba katın.
- Doku sindirimi optimum düzeyde değil (yeterince parçalanmamış) – lameli oda sıcaklığında 2 x SSC, pH 7,0 içinde 2 dak. ıslatıp çıkarın. Protein sindirimini 2 - 20 dak. uzatın.
- Doku sindirimi optimum düzeyde değil (aşırı parçalanmış) – Lamı atın ve taze kısım ile işleme başlayın. Protein sindirimini en az 10 dak. kısaltın.
- 22 x 22 mm lamel başına en az 10 µl prob kullanın.
- Mikroskop filtrelerinin ve ışık kaynağının doğru ve tam çalışır durumda olduğunu kontrol edin.

Arka plan çok yüksek.

- oku sindirimi optimum düzeyde değil. Yeterince parçalanmamış doku arka planı artırır. Lameli oda sıcaklığında 2 dak. süreyle 2 x SSC, pH 7,0 içinde ıslatıp çıkarın. Protein sindirimini 2 - 20 dak. uzatın.
- Lamları yıkarken sıklık yıkamasının (Yıkama Tamponu I) sıcaklığını artırın.

Sentromerik problemleri kullanırken çapraz hibridizasyon oluyor.

- Lamları yıkarken sıklık yıkamasının (Yıkama Tamponu I) sıcaklığını artırın.

Minimum prob uygulaması:

Cam lamelin boyutu	Minimum prob uygulaması
22 x 22 mm	10 µl
22 x 32 mm	15 µl
22 x 50 mm	23 µl

Prosedürle ilgili öneriler:

düşük sıklık probun diğer dizilere spesifik olmayan bağlanmasına ve yüksek sıklık da sinyal kaybına neden olabileceğinden, hibridizasyon ve yıkama işlemlerinin sıcaklığı ve tampon konsantrasyonu (sıklık) önemlidir. Hedef DNA'nın ve/veya prob DNA'sının eksik denatürasyonu sinyal kaybına neden olabilir.

Gerekli, ancak sağlanmayan materyal: reaktifler:

1. Ksilen
2. Formamid
3. Etanol %100, %85 ve %70
4. 0,01 M sodyum sitrat pH 6,0 veya %8 sodyum tiyosiyanat
5. 0,01 M HCl ve 0,2 M HCl
6. Pepsin Çözeltisi kullanıma hazır (LK-101A)
7. 1 x PBS, pH 7,4
8. 2 x SSC, pH 7,0
9. Yıkama Tamponu I (0,4 x SSC / %0,3 Igepal) (LK-102A)
10. Yıkama Tamponu II (2 x SSC / %0,1 Igepal) (LK-103A)
11. DAPI karşıt boya (LK-095A (0,1 µg/ml) veya LK-096A (1 µg/ml)}
12. Karşıt boya seyreltici (LK-097A)
13. Fixogum (LK-071A) veya lastik solüsyon

Gerekli, ancak sağlanmayan materyal: ekipman:

1. Thermobrite (TS-01/02) veya Thermobrite Elite (Daha fazla bilgi için bkz. www.Leicabiosystems.com)
2. 37 °C'de enkübatör
3. 37 °C ile 90 °C arasında doğru sıcaklığı sağlayan su banyosu
4. Plastik veya cam şale (Coplin kavanoz)
5. Değişken mikropipetler (1 µl - 200 µl)
6. Uygun filtreler ile donatılmış floresans mikroskobu (floresans mikroskopisi için önerilere bakın)

Uyarılar ve önlemler:

1. Yalnızca *in vitro* kullanım içindir. Yalnızca profesyonel kullanıma yöneliktir. Acil durumlarda güvenlik bilgileri için SDS sayfalarına bakın.
2. DNA problemleri ve hibridizasyon tamponları formamid içerir ve bu madde teratojendir; solumayın ya da ciltle temasına izin vermeyin. DNA problemleri ve DAPI karşıt boya ile işlem yaparken eldiven ve laboratuvar önlüğü giyin.
3. Tüm materyaller, kurumunuzun hastane atıklarını elden çıkarma yönergelerine uygun olarak elden çıkarılmalıdır.
4. (EC) No 1272/2008 [CLP] yönetmeliğine göre etiketleme.

Piktogram



Uyarı kelimesi: Tehlike

Tehlike açıklama(lar)ı

H351 Kansere yol açma şüphesi var.

H360D Doğmamış çocukta hasara yol açabilir.

H373 Yutulması halinde uzun süreli veya tekrarlı maruz kalma sonucu organlarda hasara yol açar (Kan).

Önlem açıklama(lar)ı

P201 Kullanmadan önce özel talimatları okuyun.

P281 Kişisel koruyucu ekipman kullanın.

P308 + P313 Maruz kalınma veya etkileşme halinde İSE: Tıbbi yardım/bakım alın.

Ek Tehlike Açıklamaları: hiç

Profesyonel kullanıcılar harici kullanımı yasaktır.

Patentler: *Bu ürünler veya bu ürünlerin kullanımı mülkiyet haklarına tabidir. Bu ürünlerdeki problemler Janssen Diagnostics, LLC REPEAT- FREE™ teknolojisi kullanılarak üretilmiş olup Universal Linkage System (ULS™) etiketini taşımaktadır.*

PlatinumBright - 415 etiketleme bileşiminde kullanılan florofor, DYOMICS GmbH şirketinin sahibi olduğu veya denetimini elinde bulundurduğu patentlere tabidir ve bu şirket tarafından üretilir. Janssen Diagnostics, LLC REPEAT-FREE™ teknolojisi için ABD ve Uluslararası patentler beklemektedir.

ULS™ teknolojisi ve ürünleri aşağıdakilerden biri veya daha fazlasının kapsamındadır:

ABD patentleri 5,580,990; 5,714,327; 5,985,566; 6,133,038; US RE 40,557E, 6,797,818; 7,217,813. KREATECH ifadesi, KREATECH Biotechnology BV şirketinin ticari unvanıdır. ULS™ ve PlatinumBright™ markaları, KREATECH Biotechnology BV şirketinin ticari markalarıdır. REPEAT-FREE™ markası, Janssen Diagnostics, LLC şirketinin ticari markasıdır.

Thermobrite™ markası, Leica Biosystems şirketinin tescilli ticari markasıdır.

Hücre Preparatları

Kreatech™ FISH problemlerini kullanma

Yerlerini inceleyebilmek amacıyla hedef genom dizilişlerini tanımlamak veya etiketlemek için floresan *in situ* hibridizasyon (FISH) kullanılır. Kromozoma özgü uygun problemlerden elde edilen DNA dizilişleri önce haberci (raportör) moleküller ile etiketlenir. Etiketlenen DNA probu daha sonra, bir lam üzerinde bulunan interfaz çekirdeklerine veya metafaz kromozomlarına hibritlenir. Yıkama sonrasında örnek, floresans mikroskopisi ile haberci moleküller açısından taranır.

KREATECH REPEAT-FREE FISH problemleri C₀t-1 DNA içermez. Bu nedenle hibridizasyon etkisi artmıştır ve spesifik olmayan bağlanma nedeniyle arka plan fazlasıyla düşüktür.

Periferik kan ve kemik iliği kültürlerinden elde edilen metafaz ve interfaz hücrelerinde veya standart sitogenetik yöntemler ile hazırlanmış doğrudan preparatlarda kullanım için bkz.: AGT genetik laboratuvarı kılavuzu, 3. bs. New York: Raven Press; 1996.

En iyi sonuç için, özel olarak optimize edilmiş "Kullanım Talimatı" protokolünü içeren, Kreatech eksiksiz Ön işlem kitlerinin (KBI-60005, KBI-60006) kullanılması önerilir.

Daha fazla bilgi için web sitemize başvurun: <http://www.leicabiosystems.com/ihc-ish/kreatech-fish-probes/>

ÖN İŞLEM:

Protokol I (standart protokol; tatmin edici olmazsa protokol II'yi kullanın)

1. Lamları olgunlaştırmak için 80 °C'de 10 dakika (dak.) fırınlayın ve ardından oda sıcaklığına kadar soğumalarını bekleyin.
2. Lamları taze hazırlanmış %70 asetik aside (deiyonize H₂O (dH₂O) içinde) koyup oda sıcaklığında 1 dak. enkübe edin.
3. Lamları 1 x PBS, pH 7,4 içine koyun ve oda sıcaklığında 30 saniye (sn.) enkübe edin.
4. Lamları 1 x PBS, pH7,4 içine koyun ve oda sıcaklığında 5 dak. enkübe edin.
5. Lamı %70, %85 ve %100 etanol içinde dehidrate edin ve her birini oda sıcaklığında 1 dak. enkübe edin. Oda sıcaklığında havayla kurutun.

Prob Hazırlama işlemiyle devam edin.

Protokol II (yüksek sitoplazmik arka plan veya doğrudan prep. içeren lamlar için (amniyotik sıvı veya koryonik villüsler)

1. 2 x SSC, pH 7,0 ve 0,01 M HCl'ye 37 °C'de ön ısıtma uygulayın.
2. Kuru numune lamlarını ön ısıtma uygulanmış 2 x SSC, pH 7,0 içine koyun ve 37 °C'de 2 dak. enkübe edin.
3. Ön ısıtma uygulanmış 0,01 M HCl'ye pepsin ekleyerek %0,005 nihai konsantrasyona gelmesini sağlayın.
4. Lamları 0,01 M HCl içinde %0,005 pepsin çözeltisine koyun ve 37 °C'de 5 - 15 dak. (sitoplazmik arka plan miktarına bağlı olarak) enkübe edin.
5. Lamları 1 x PBS, pH 7,4 içine koyun ve oda sıcaklığında 3 dak. enkübe edin.
6. 1 x PBS / 20 mM MgCl₂ içinde %1 tamponlu formaldehitte 10 dak. oda sıcaklığında enkübe ederek lamlara sabitleme sonrası işlem (post-fix) uygulayın.
7. Lamları 1 x PBS, pH 7,4 içine koyun ve oda sıcaklığında 3 dak. enkübe edin.
8. Lamı %70, %85 ve %100 etanol içinde dehidrate edin ve her birini oda sıcaklığında 1 dak. enkübe edin. Oda sıcaklığında havayla kurutun.

Prob Hazırlama işlemiyle devam edin.

Prob hazırlama:

prob flakonunu kısa bir süreliğine hızlıca çalkalayın; prob flakonunu döndürerek karıştırın ve kullanmadan önce tekrar kısa bir süreliğine hızlıca çalkalayın. Kullanmadan önce probun RT'ye ulaşmasını bekleyin.

Çoğu Kreatech FISH probu kullanıma hazır halde sağlanır. Sentromer, Subtelomer ve Tam kromozom FISH problemleri 5 x konsantrasyon biçimlerinde sağlanır ve sağlanan hibridizasyon tamponu ve/veya diğer konsantrasyon problemleri ile seyreltilmeleri gerekir. Özel dilüsyon bilgileri için flakon üzerindeki etikete ve özel prob prospektüsüne başvurun.

Birlikte denatürasyon:

1. 22 x 22 mm'lik alan başına 10 µl prob veya prob karışımı uygulayın.
2. Cam lamel ile kapatın ve Fixogum (LK-071A) ya da lastik solüsyon ile sızdırmazlığını sağlayın.
3. Numuneyi ve probu Thermobrite (TS-01/02) cihazında 75 °C'de 5 dak. denatüre edin.

Hibridizasyon:

37 °C'de, Thermobrite (TS-01/02) cihazında veya nemli haznede gece boyunca enkübe edin.

Hibridizasyon sonrası yıkama:

1. Yıkama Tamponu I'ye (0,4 x SSC / %0,3 Igepal) (LK-102A) ön ısıtma uygulayıp 72 °C'ye getirin.
2. Lastik solüsyonu çıkarın.
3. 200 ml Yıkama Tamponu II (2 x SSC / %0,1 Igepal) (LK-103A) içine 14 lam koyun ve oda sıcaklığında 2 dak. enkübe edin. Lamelleri çıkarın. Toplam 28 lam için yalnızca bir kez yeniden kullanın.

4. Ön ısıtma uygulanmış 200 ml Yıkama Tamponu I'e (0,4 x SSC / %0,3 Igepal) (LK-102A) 14 lam koyun; 72 °C'de (± 1 °C) karıştırmadan 2 dak. enkübe edin. Toplam 28 lam için yalnızca bir kez yeniden kullanın.
 5. 200 ml taze Yıkama Tamponu II (2 x SSC / %0,1 Igepal) (LK-103A) içine 14 lam koyun; oda sıcaklığında karıştırmadan 1 dak. enkübe edin. Toplam 28 lam için yalnızca bir kez yeniden kullanın.
 6. Lamları %70, %85 ve %100 etanol içinde dehidrate edin ve her birini oda sıcaklığında 1 dak. enkübe edin. Oda sıcaklığında havayla kurutun.
- Karşı Boyama işlemine geçin.

Karşı boyama:

15 µl DAPI karşı boyama (LK-095A (0,1 µg/ml) veya LK-096A (1 µg/ml) uygulayın ve cam lameli yerleştirin. DAPI, istenen konsantrasyonu elde etmek üzere karşı boyama seyreltici (LK-097A) içinde seyreltilir. Lamları karanlık ortama koyun ve karşı boyamanın oluşması için 10-15 dak. bekleyin. Mikroskopi ile devam edin.

Floresans mikroskopisi için öneriler:

en uygun görüntüleme için, 100 W cıva buharlı lamba veya diğer uygun ışık kaynağı ile donatılmış, bakımı iyi yapılan ve düzenli aralıklarla kalibre edilen bir mikroskop ve 63x ya da 100x floresans objektifi kullanın. Birden fazla rengi görüntülemek için üçlü bant geçirici filtreler (DAPI/FITC/Cy3 veya DAPI/FITC/TRITC) kullanılırken, tek renk görüntüleme için tekli bant geçirici filtreler kullanılır.

Uygun eksitasyon ve emisyon aralığı (Kreatech FISH floroforlar):

Florofor	Eksitasyon	Emisyon
PlatinumBright™ 415	429 ± 20 nm	470 ± 30 nm
PlatinumBright™ 495	495 ± 20 nm	525 ± 30 nm
PlatinumBright™ 550	546 ± 12 nm	580 ± 30 nm

Sorun giderme:

sitoloji örnekleri için alternatif protokol:

1. 50 ml 2 x SSC / %0,5 Igepal'a (LK-105B) bir şale (Coplin kavanoz) içinde ön ısıtma uygulayarak, su banyosunda 37 °C'ye getirin. Hazırlanan lamları Coplin kavanoza koyun ve 15 dakika enkübe edin.
2. Lamları %70, %85 ve %100 etanol içinde dehidrate edin ve her birini oda sıcaklığında 1 dak. enkübe edin. Oda sıcaklığında havayla kurutun.

Prob Hazırlama işlemiyle devam edin.

Prob denatürasyonu için alternatif protokol (ayrı prob ve numune denatürasyonu):

1. %70 formamid / 2 x SSC, pH 7,0'ye ön ısıtma uygulayarak 72 °C'ye getirin.
2. Lamları %70 formamid / 2 x SSC, pH 7,0 içinde, 72 °C'de (± 1 °C) 2 dak. enkübe edin.
3. Lamları buz soğukluğundaki (-20 °C) %70, %85 ve %100 etanol içinde dehidrate edin ve ikişer dak. enkübasyon uygulayın. Oda sıcaklığında havayla kurutun.
4. Prob karışımını 90 °C'de 10 dak. denatüre edin ve doğrudan buzun üzerine koyun.
5. Prob flakonunu kısa bir süreliğine hızlıca çalkalayın; prob flakonunu döndürerek karıştırın ve sonra prob flakonunu tekrar hızlıca çalkalayın.

6. Probu denatüre lama uygulayın, cam lamel ile örtüp lastik solüsyon ile sızdırmazlığını sağlayın.

Hibridizasyon ile devam edin.

Sık sorulan sorular

Zayıf sinyaller alıyorum ya da hiç sinyal almıyorum

- Probu doğru şekilde karıştırıldığından ve kullanım öncesinde oda sıcaklığında bulunduğundan emin olarak tekrar hibridizasyon uygulayın.
- Sıklık yıkamasının (Yıkama Tamponu I) doğru sıcaklıkta (72 °C (± 1 °C)) bulunduğundan emin olarak tekrar hibridizasyon uygulayın.
- Lamaları ön ısıtma uygulanmış reaktiflere eklerken sıcaklık düşüşünü hesaba katın.
- 22 x 22 mm lamel başına en az 10 μ l prob kullanın.
- Mikroskop filtrelerinin ve ışık kaynağının doğru ve tam çalışır durumda olduğunu kontrol edin.

Sentromerik veya Subtelomerik problemleri kullanırken yüksek arka plan veya spesifik çapraz hibridizasyon oluyor.

- Lamaları yıkarken sıklık yıkamasının (Yıkama Tamponu I) sıcaklığını artırın.

Minimum prob uygulaması:

Cam lamelin boyutu	Minimum prob uygulaması
22 x 22 mm	10 μ l
22 x 32 mm	15 μ l
22 x 50 mm	23 μ l

Prosedürle ilgili öneriler:

düşük sıklık probun diğer dizilere spesifik olmayan bağlanmasına ve yüksek sıklık da sinyal kaybına neden olabileceğinden, hibridizasyon ve yıkama işlemlerinin sıcaklığı ve tampon konsantrasyonu (sıklık) önemlidir. Hedef DNA'nın ve/veya prob DNA'sının eksik denatürasyonu sinyal kaybına neden olabilir.

Gerekli, ancak sağlanmayan materyal: reaktifler:

1. FISH reaktif Kiti (KBI-60005)
2. FISH sindirim Kiti (KBI-60006)
3. %1 tamponlu formaldehit / 1 x PBS / 20 mM MgCl₂
4. 1 x PBS, pH 7,4
5. 2 x SSC, pH 7,0
6. Pepsin çözeltisi (LK-101A)
7. Yıkama tamponu I (0,4 x SSC / %0,3 Igepal) (LK-102A)
8. Yıkama tamponu II (2 x SSC / %0,1 Igepal) (LK-103A)
9. Igepal
10. 0,01 M HCl
11. Carnoys fiksatif (metanol: asetik asit = 3 : 1)
12. %70 asetik asit (deiyonize H₂O içinde)
13. DAPI karşıt boya (LK-095A (0,1 µg/ml) veya LK-096A (1 µg/ml)}
14. Karşıt boya seyreltici (LK-097A)
15. Formamid
16. Etanol %100, %85 ve %70
17. Fixogum (LK-071A) veya lastik solüsyon

Gerekli, ancak sağlanmayan materyal: ekipman:

1. Thermobrite (TS-01/02).
2. 37 °C'de enkübatör
3. 37 °C ile 90 °C arasında doğru sıcaklığı sağlayan su banyosu
4. Plastik veya cam şale (Coplin kavanoz)
5. Değişken mikropipetler (1 µl - 200 µl)

6. Uygun filtreler ile donatılmış floresans mikroskobu (floresans mikroskopisi için Öneriler'e bakın)

Uyarılar ve önlemler:

1. Yalnızca *in vitro* kullanım içindir. Yalnızca profesyonel kullanıma yöneliktir. Acil durumlarda güvenlik bilgileri için SDS sayfalarına bakın.
2. DNA probları ve hibridizasyon tamponları formamid içerir ve bu madde teratojendir; solumayın ya da ciltle temasına izin vermeyin. DNA probları ve DAPI karşıt boya ile işlem yaparken eldiven ve laboratuvar önlüğü giyin.
3. Tüm materyaller, kurumunuzun hastane atıklarını elden çıkarma yönergelerine uygun olarak elden çıkarılmalıdır.
4. (EC) No 1272/2008 [CLP] yönetmeliğine göre etiketleme

Piktogram



Uyarı kelimesi: Tehlike

Tehlike açıklama(lar)ı

H351 Kansere yol açma şüphesi var.

H360D Doğmamış çocukta hasara yol açabilir.

H373 Yutulması halinde uzun süreli veya tekrarlı maruz kalma sonucu organlarda hasara yol açar (Kan).

Önlem açıklama(lar)ı

P201 Kullanmadan önce özel talimatları okuyun.

P281 Kişisel koruyucu ekipman kullanın.

P308 + P313 Maruz kalınma veya etkileşme halinde İSE: Tıbbi yardım/bakım alın.

Ek Tehlike Açıklamaları: hiç

Profesyonel kullanıcılar harici kullanımı yasaktır.

Patentler: *Bu ürünler veya bu ürünlerin kullanımı mülkiyet haklarına tabidir. Bu ürünlerdeki problemler Janssen Diagnostics, LLC REPEAT- FREE™ teknolojisi kullanılarak üretilmiş olup Universal Linkage System (ULS™) etiketini taşımaktadır. PlatinumBright - 415 etiketleme bileşiminde kullanılan florofor, DYOMICS GmbH şirketinin sahibi olduğu veya denetimini elinde bulundurduğu patentlere tabidir ve bu şirket tarafından üretilir. Janssen Diagnostics, LLC REPEAT-FREE™ teknolojisi için ABD ve Uluslararası patentler beklenmektedir.*

ULS™ teknolojisi ve ürünleri aşağıdakilerden biri veya daha fazlasının kapsamındadır: ABD patentleri 5,580,990; 5,714,327; 5,985,566; 6,133,038; US RE 40,557E, 6,797,818; 7,217,813. KREATECH ifadesi, KREATECH Biotechnology BV şirketinin ticari unvanıdır. ULS™ ve PlatinumBright™ markaları, KREATECH Biotechnology BV şirketinin ticari markalarıdır. REPEAT-FREE™ markası, Janssen Diagnostics, LLC şirketinin ticari markasıdır.

Thermobrite™ markası, Leica Biosystems şirketinin tescilli ticari markasıdır.

DANGER



FORMAMIDE



Kreatech Biotechnology B.V.
Vlierweg 20
1032 LG Amsterdam
The Netherlands
www.LeicaBiosystems.com

For detailed information about European sales offices,
please visit our website: LeicaBiosystems.com

95.13126 Rev A · 05/2015 · Copyright © by Leica Biosystems, Amsterdam,
2014. Subject to modifications. LEICA and the Leica Logo are registered
trademarks of Leica Microsystems IR GmbH.