

KREATECH™ FISH PROBES

KI

EN - Instructions for use

ES - Instrucciones de uso

FR - Mode d'emploi

PT - Instruções de uso

*For Research Use Only.
Not for use in diagnostic procedures*

Table of Contents

EN	- Instructions for use	5
ES	- Instrucciones de uso	21
FR	- Mode d'emploi	41
PT	- Instruções de uso	59

FISH Procedure 1

Instructions for use

Formalin-fixed paraffin-embedded tissue

Using Kreatech™ FISH probes

Fluorescence *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 Cot-1 DNA. Hybridization efficiency is therefore increased and background, due to unspecific binding, is greatly reduced.

This protocol is developed for Research Use Only (RUO) Kreatech FISH probes.

For optimal results on paraffin embedded tissue sections it is advised to use Kreatech's complete Pre-treatment kits (KI-60004, KI-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.

Research Use Only (RUO) Kreatech FISH probes are supplied Ready-to-use (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 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 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.
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 (± 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 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
DAPI	360 ±20 nm	460 ±30 nm
PlatinumBright™ 415	429 ±15 nm	470 ±15 nm
PlatinumBright™ 495	495 ±10 nm	517 ±10 nm
PlatinumBright™ 550	550 ±10 nm	580 ±10 nm

Troubleshooting

Check protein digestion and pre-treatment by applying 15 µl 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 (±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 **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 it is at RT 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.
- 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 μ g/ml) or LK-096A (1 μ g/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 μ l - 200 μ l)
6. Fluorescence microscope equipped with suitable filters (see recommendations for fluorescence microscopy)

Warnings and precautions:

1. 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 waste disposal.
4. Labelling according Regulation OSHA HazCom Standard (2012) requirements.

FISH Procedure 2

Instructions for use

Cell Preparations

Using Kreatech™ FISH probes

Fluorescence *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 Cot-1 DNA. Hybridization efficiency is therefore increased and background, due to unspecific binding, is greatly reduced.

This protocol is developed for Research Use Only (RUO) Kreatech FISH probes.

For use on cells from peripheral blood cultures or direct preparations prepared by standard cytogenetic methods, see: The ACT cytogenetics laboratory manual. 3rd ed. New York: Raven Press; 1996.

For optimal results it is advised to use Kreatech's complete Pretreatment kits (KI-60005 or KI-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/>

As an alternative the following protocols can also be used:

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.

Research Use Only (RUO) 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.

- 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 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 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
DAPI	360 \pm 20 nm	460 \pm 30 nm
PlatinumBright™ 415	429 \pm 15 nm	470 \pm 15 nm
PlatinumBright™ 495	495 \pm 10 nm	517 \pm 10 nm
PlatinumBright™ 550	550 \pm 10 nm	580 \pm 10 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 it is at RT 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 (KI-60005)
2. FISH digestion Kit (KI-60006)
3. 1% buffered formaldehyde / 1 x PBS / 20 mM $MgCl_2$
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 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 waste disposal.
4. Labelling according Regulation OSHA HazCom Standard (2012) requirements.

Procedimiento 1 de FISH Instrucciones de uso

Tejido embebido en parafina y fijado en formalina

Uso de las sondas FISH de Kreatech™

La hibridación *in situ* de fluorescencia (FISH) permite 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 hibridiza con el ADN 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 Cot-1. De este modo, la eficacia de la hibridación aumenta y el fondo se reduce en gran medida debido a una fijación no específica.

Este protocolo fue desarrollado para las sondas FISH de Kreatech de uso exclusivo en investigación (RUO)

Para obtener resultados óptimos en cortes de tejido embebido en parafina, se recomienda emplear kits de pretratamiento completos de Kreatech (KI-60004, KI-60007), que incluyen un protocolo de

"Instrucciones de uso" especialmente optimizado. Para obtener más información, consulte nuestro sitio web: <http://www.Leica-Biosystems.com/ihc-ish/kreatech-fish-probes/>

Como alternativa, pueden usarse también los protocolos siguientes:

Pretratamiento de portaobjetos

1. Colocar cortes de tejido embebido en parafina y fijado en formalina (FFPE) de 4-6 μm en portaobjetos con carga positiva.
2. Someter los cortes de tejido FFPE 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 mediante 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 incubar los 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. Precalear 0,01 M de citrato de sodio con pH 6,0 a 96-98 °C.
2. Precalear 0,01 M de 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 incubar lo 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 mediante etanol al 70 %, 85 % y 100 % e incubar cada uno de ellos durante 1 min a TA.
10. 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 dH₂O 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 dH₂O 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 incubar durante 5-45 min (el tiempo dependerá de la fijación del tejido y del tipo de tejido).

- Colocar los portaobjetos en dH₂O e incubarlos durante 1 min a TA.
- 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.
- Deshidratar los portaobjetos mediante 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 la sonda

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 de uso exclusivo en investigación (RUO) se suministran listas para usar (LPU), a menos que se especifique lo contrario 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.

Desnaturalización conjunta:

- Aplicar 10 µl de una sonda o de una mezcla de sondas por campo de 22 x 22 mm.
- Cubrirlo con un cubreobjetos de vidrio y sellarlo mediante Fixogum (LK-071A) o cemento de caucho.
- Desnaturalizar la muestra y la sonda en una placa ThermoBrite (TS-01/02) durante 5 min a 80 °C. Incubar toda la noche a 37 °C en una placa ThermoBrite (TS-01/02) o en una cámara húmeda.

Lavado tras la hibridación:

1. Precalentar el buffer de lavado II (0,4 x SSC/0,3 % IGEPAL) (LK-102A) a 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 los 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 vez durante 1 min a TA. Dejar 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 a 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 que cuente 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
DAPI	360 ±20 nm	460 ±30 nm
PlatinumBright™ 415	429 ±15 nm	470 ±15 nm
PlatinumBright™ 495	495 ±10 nm	517 ±10 nm
PlatinumBright™ 550	550 ±10 nm	580 ±10 nm

Solución de problemas

Compruebe la digestión de proteínas y el pretratamiento mediante la aplicación de 15 µl 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 a 20 min si la muestra aún no está lo 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 (desnatura-
lización 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 en etanol helado (-20 °C) al 70 %, 85 % y 100 % durante 2 min cada vez. 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 haya mezclado correctamente y de que se encuentre a TA antes de utilizarse.
- Vuelva a realizar la hibridación y asegúrese de que el lavado astringente (buffer de lavado I) se encuentre 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); empaque el cubreobjetos en 2 x SSC con pH 7.0 durante 2 min a TA. Prolongue la digestión de proteínas durante 2 a 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 a 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 para el 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 μ g/ml] o LK-096A [1 μ g/ml])
12. Diluyente de contratación (LK-097A)
13. Fixogum (LK-071A) o cemento de caucho

Material necesario que no se suministra:

1. Placa ThermoBrite (TS-01/02) o ThermoBrite Elite (visite 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 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.
4. El etiquetado debe cumplir con la Norma de Comunicación de Riesgos (2012) de OSHA

Procedimiento 2 de FISH Instrucciones de uso

Preparación celular

Uso de las sondas FISH de Kreatech™

La hibridación *in situ* de fluorescencia (FISH) permite 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 de metafase o núcleos de 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 Cot- 1. De este modo, la eficacia de la hibridación aumenta y el fondo se reduce en gran medida debido a una fijación no específica.

Este protocolo fue desarrollado para las sondas FISH de Kreatech de uso exclusivo en investigación (RUO).

Para obtener instrucciones sobre el uso de células en cultivos de sangre periférica o preparaciones directas realizadas con métodos citogenéticos estándar, consulte: The ACT cytogenetics laboratory manual. Tercera edición. New York: Raven Press; 1996.

Para obtener resultados óptimos, se recomienda emplear kits de pretratamiento completos de Kreatech (KI-60005 o KI-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/>

Como alternativa, pueden usarse también los protocolos siguientes:

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 el portaobjetos mediante 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 vellosidad coriónica])

1. Precalentar 2 x SSC con pH 7,0 y 0,01 M de HCl a 37 °C.
2. Colocar portaobjetos de muestras secos en 2 x SSC precalentado con pH 7,0 e incubarlos 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 incubarlos a 37 °C durante 5 a 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. Para fijar con posterioridad los portaobjetos, incubarlos 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 el portaobjetos mediante 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 la sonda

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 de uso exclusivo en investigación (RUO) 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.

Desnaturalización conjunta:

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:

Incubar toda la noche a 37 °C en una placa ThermoBrite (TS-01/02) o en una cámara húmeda.

Lavado tras la hibridación:

1. Precalear el buffer de lavado II (0,4 x SSC/0,3 % IGEPAL) (LK-102A) a 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.
- 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 incubarlos 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 mediante 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 a 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
DAPI	360 ±20 nm	460 ±30 nm
PlatinumBright™ 415	429 ±15 nm	470 ±15 nm
PlatinumBright™ 495	495 ±10 nm	517 ±10 nm
PlatinumBright™ 550	550 ±10 nm	580 ±10 nm

Solución de problemas

Protocolo alternativo para muestras de citología:

1. Precalentar 50 ml de 2 x SSC/LGEPAL 0,5 % (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 mediante 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. Desnatar los portaobjetos en formamida al 70 %/2 x SSC con pH 7,0 e incubarlos a 72 °C (±1 °C) durante 2 min.
3. Deshidratar los portaobjetos en etanol helado (-20 °C) al 70 %, 85 % y 100 %; incubarlos durante 2 min cada vez. Dejar

- secar al aire a TA.
4. Desnaturalizar la mezcla de las sondas a 90 °C durante 10 min e introducirla directamente en hielo.
 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 haya mezclado correctamente y de que se encuentre a TA antes de utilizarse.
- Vuelva a realizar la hibridación y asegúrese de que el lavado astringente (buffer de lavado I) se encuentre 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 sean adecuados y que funcionen correctamente.

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 para el 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 (KI-60005)
2. Kit de digestión FISH (KI-60006)
3. Formaldehído tamponado al 1 % en 1 x PBS/20 mM de MgCl₂
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 Carnoy's (metanol: ácido acético = 3: 1)
12. Ácido acético al 70 % (en H₂O desionizada)
13. Contratinción DAPI (LK-095A [0,1 µg/ml] o LK-096A [1 µg/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:

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 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.
4. El etiquetado debe cumplir con la Norma de Comunicación

Mode d'emploi

Tissus inclus dans la paraffine et fixés au formol

Utilisation de sondes Kreatech™ FISH

L'Hybridation *in situ* en fluorescence (FISH pour Fluorescence 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 Cot-1. L'efficacité de l'hybridation est ainsi accrue et le bruit de fond dû aux hybridations non spécifiques est fortement réduit.

Ce protocole est développé pour la de recherche uniquement (RUO) Kreatech FISH probes .

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. KI-60004, KI-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 μm , 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 dH_2O , 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 dH_2O , 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 dH_2O 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 utilisez 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 dH_2O 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.

Passez 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 réservées à la recherche uniquement (RUO) et sont fournies prêtes à l'utilisation (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 μ l de contre-colorant DAPI (Réf. LK-095A (0,1 μ g/ml) ou Réf. LK-096A (1 μ g/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
DAPI	360 ±20 nm	460 ±30 nm
PlatinumBright™ 415	429 ±15 nm	470 ±15 nm
PlatinumBright™ 495	495 ±10 nm	517 ±10 nm
PlatinumBright™ 550	550 ±10 nm	580 ±10 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 TA.
- 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 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.
4. Étiquetage en accord avec la réglementation OSHA HazCom Standard (2012)

Mode d'emploi

Des préparations de cellules

Utilisation de sondes Kreatech™ FISH

L'Hybridation *in situ* en fluorescence (FISH pour Fluorescence 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 Cot-1. L'efficacité de l'hybridation est ainsi accrue et le bruit de fond dû aux hybridations non spécifiques est fortement réduit.

Pour une utilisation sur des cellules à partir de cultures de sang périphérique ou de préparations directs préparées par des méthodes cytogénétiques standard, voir: L'AGT cytogénétique de manuels de laboratoire. 3e éd. New York: Raven Press; 1996.

Ce protocole est développé pour la recherche uniquement (RUO) Kreatech FISH probes .

Pour des résultats optimaux, nous vous conseillons d'utiliser les kits de prétraitement complets Kreatech (Réf. KI-60005, KI-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/>

Sinon, vous pouvez également utiliser les protocoles suivants :

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 / MgCl₂ 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.

Les sondes Kreatech FISH sont réservées à la recherche uniquement (RUO) et sont fournies prêtes à l'utilisation (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 à 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.

- 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.
- 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 μ l de contre-colorant DAPI (Réf. LK-095A (0,1 μ g/ml) ou Réf. LK-096A (1 μ g/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
DAPI	360 ±20 nm	460 ±30 nm
PlatinumBright™ 415	429 ±15 nm	470 ±15 nm
PlatinumBright™ 495	495 ±10 nm	517 ±10 nm
PlatinumBright™ 550	550 ±10 nm	580 ±10 nm

Protocole alternatif pour les échantillons Cytologie :

1. 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 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 TA.
- 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
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. KI-60005)
2. Kit de digestion FISH (Réf. KI-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 »)

Procedimento FISH 1

Instruções de uso

Tecidos fixados em formalina e incluídos em parafina

Utilização de sondas Kreatech™ FISH

A hibridação fluorescente *in situ* (FISH) é usada para identificar ou classificar sequências genômicas alvo para que seu local possa ser estudado. As sequências de DNA são marcadas com sondas moleculares específicas ao cromossomo. A sonda de DNA marcada é então hibridizada ao alvo de DNA nos núcleos do tecido. Após a lavagem, a região selecionada onde estão localizadas as moléculas indicadoras é visualizada por microscopia de fluorescência.

As sondas KREATECH REPEAT-FREE FISH não contêm DNA de Cot-1. A eficiência da hibridização é aumentada e, o background, causado por ligações inespecíficas, é bastante reduzida.

Este protocolo foi desenvolvido somente para o uso em pesquisa (RUO) das sondas Kreatech FISH.

Para melhores resultados dos cortes de tecidos incluídos em parafina FFPE, recomenda-se o uso de kits de pré-tratamento Kreatech (KI-60004, KI-60007) que incluem um protocolo com "instruções de Uso" especialmente otimizado. Para mais informações, consulte o nosso site: <http://www.LeicaBiosystems.com/ihc-ish/kreatech-fish-probes/>

Os seguintes protocolos também podem ser usados como alternativa:

Pré-tratamento de lâminas

1. Monte os cortes de tecidos fixados em formalina e incluídos em parafina (FFPE) com espessura entre 4-6µm em lâminas com carga positiva.
2. Coloque as lâminas com os cortes de tecidos FFPE em estufa por 2 horas em 80°C ou 16 horas em 56°C.
3. Faça a desparafinização das lâminas no xilol ou substituto do xilol, incube de 2 a 10 minutos (min) em temperatura ambiente (TA).
4. Desidrate as lâminas em uma bateria de álcool 70%, 85%, 100% de álcool, incube cada uma por 3 min em TA.
5. Coloque as lâminas em H₂O (dH₂O) deionizada, incube por 3 min em TA. Prosseguir com o protocolo I ou o protocolo II.

Protocolo I (protocolo padrão, se não for satisfatório use o protocolo II)

1. Preaqueça 0,01 M de citrato de sódio em pH 6,0 a 96 - 98 °C.
2. Preaqueça 0,01 M de HCl a 37 °C (se não estiver usando pepsina pronta para o uso (RTU) (LK-101A)).
3. Coloque as lâminas em 0,01 M de citrato de sódio em pH 6,0 a 96 - 98 °C, incube por 15 min.
4. Coloque as lâminas em dH₂O, incube por 2 min em TA.
5. Adicione a pepsina a 0,01 M de HCl preaquecida para obter uma concentração final de 0,025%. (se não estiver usando pepsina RtU (LK-101A)).
6. Faça a digestão das lâminas em 0,025% de pepsina em 0,01 M de HCl em 37 °C ou cubra os tecidos com pepsina RtU (LK-101A) em TA, incube de 5 - 45 min, (o tempo depende da fixação do tecido e do tipo de tecido).
7. Coloque as lâminas em dH₂O, incube por 1 min em TA.
8. Coloque as lâminas em 1 x PBS, pH 7,4 ou 2 x SSC, pH 7,0, incube por 5 min em TA.
9. Desidrate as lâminas em uma bateria de álcool 70%, 85%, 100% de álcool, incube cada uma por 1 min em TA. Secar ao ar livre, em TA.

Prosseguir com a preparação de sondas.

Protocolo II (para amostras cross-linked)

1. Preaqueça 8% de tiocianato de sódio a 80 °C.
2. Faça o pré-tratamento das lâminas com 0,2 M de HCl, incube por 20 min em TA.
3. Coloque as lâminas em dH_2O , incube por 3 min em TA.
4. Preaqueça 0,01 M de HCl a 37 °C (se não estiver usando pepsina RtU (LK-101A)).
5. Coloque as lâminas em 8% de tiocianato de sódio em dH_2O em 80 °C, incube por 30 min.
6. Coloque as lâminas em 2 x SSC, pH 7,0, incube por 3 min em TA.
7. Adicione pepsina a 0,01 M de HCl preaquecida para uma concentração final de 0,025% (se não estiver usando a pepsina RtU (LK-101A)).
8. Digerir as lâminas em 0,025% de pepsina em 0,01 M de HCl em 37 °C ou cubra os tecidos com pepsina RtU (LK-101A) em TA, incube de 5 - 45 min, (o tempo depende da fixação do tecido e do tipo de tecido).
9. Coloque as lâminas em dH_2O , incube por 1 min em TA.
10. Coloque as lâminas em 1 x PBS, pH 7,4 ou 2 x SSC, pH 7,0, incube por 5 min em TA.
11. Desidrate as lâminas em álcool de 70%, 85% e 100%, incube cada uma por 1 min em TA. Secagem em TA.

Prosseguir com a preparação de sondas.

Preparação de sondas

Agite o frasco da sonda para que seu conteúdo esteja na parte de baixo, faça um vórtex e novamente agite-o antes de usar. Deixe que a sonda esteja em TA antes de usar.

Somente para uso em pesquisa (RUO), as sondas Kreatech FISH são fornecidas prontas para o uso (RTU), a menos que seja especificado o contrário na documentação do produto. Consulte o rótulo do frasco

e a bula específica da embalagem de sondas para detalhes sobre a diluição.

Co-desnaturação:

1. Aplique 10 µl da sonda ou da preparação da sonda em 22 x 22 mm de área.
2. Cubra com lamínula de vidro e lacre com Fixogum (LK-071A) ou rubber cement, específico para a técnica.
3. Desnature a amostra e a sonda em um ThermoBrite (TS-01/02) por 5 min em 80 °C.

Hibridização:

Incube e deixe de um dia para o outro em 37 °C em um ThermoBrite (TS-01/02) ou em uma câmara umidificadora.

Lavagem pós-hibridização:

1. Preequeça o tampão de lavagem I (0,4 x SSC / 0,3% Igepal) (LK-102A) a 72 °C.
2. Remova o rubber cement.
3. Coloque até 14 lâminas em 200 ml no tampão de lavagem II (2 x SSC / 0,1% Igepal) (LK-103A), incube por 2 min em TA. Remova as lamínulas. Você pode reutilizar o tampão apenas uma vez, totalizando 28 lâminas.
4. Coloque até 14 lâminas em 200 ml no tampão de lavagem I preaquecido (0,4 x SSC / 0,3% Igepal) (LK-102A), incube por 2 min em 72 °C (± 1 °C) sem agitar. Você pode reutilizar o tampão apenas uma vez, totalizando 28 lâminas.
5. Coloque até 14 lâminas em 200 ml em um tampão de lavagem II limpo (2 x SSC / 0,1% Igepal) (LK-103A), incube por 1 min em TA sem agitar. Você pode reutilizar o tampão apenas uma vez, totalizando 28 lâminas.
6. Desidrate em álcool fresco de 70%, 85% e 100%, incube cada uma por 1 min em TA. Secagem em TA e **prossiga para a contracoloração.**

Contracoloração:

Aplique 15 µl de contracoloração de DAPI (LK-095A (0,1 µg/ml) ou LK-096A (1 µg/ml)) e aplique a lamínula de vidro. O DAPI pode ser diluído no diluente da contracoloração (LK-097A) para obter a concentração desejada. Coloque as lâminas no escuro e aguarde 10 - 15 min para que a contracoloração possa se desenvolver.

Prosseguir com a microscopia.

Recomendações para a microscopia de fluorescência:

Para uma melhor visualização, use um microscópio bem conservado e calibrado regularmente, equipado com uma lâmpada de mercúrio de 100W ou outra fonte luminosa apropriada e uma objetiva de fluorescência de 63x ou 100x. Os filtros de faixa tripla (DAPI/FITC/Cy3 ou DAPI/FITC/TRITC) são usados para visualizar várias cores, os filtros de faixa única são usados para a visualização individual de cores.

Variação adequada de estimulação e de emissão de fluoróforos Kreatech:

Fluoróforos	Estimulação	Emissão
DAPI	360 ±20 nm	460 ±30 nm
PlatinumBright™ 415	429 ±15 nm	470 ±15 nm
PlatinumBright™ 495	495 ±10 nm	517 ±10 nm
PlatinumBright™ 550	550 ±10 nm	580 ±10 nm

Troubleshooting

Verifique a digestão de proteínas e o pré-tratamento aplicando 15µL de DAPI e avalie as lâminas usando um microscópio de fluorescência equipado com um filtro de DAPI. Em geral, a digestão de proteínas por 15 min é suficiente para uma grande variedade de tumores de mama. Remova a lamínula e molhe o tecido em 2 x SSC, pH 7,4 por 2 min em TA. Prolongue a digestão da proteína por 2 - 20 min se a

amostra não for digerida suficientemente. Use uma amostra fresca e reduza o tempo de digestão da proteína se a amostra tiver sido digerida em excesso.

Protocolo alternativo para desnaturação de sonda (sonda separada e amostra de desnaturação):

1. Desnatura a lâmina em formamida de 70% / 2 x SSC, pH 7,0 em 72 °C (± 1 °C) por 2 min.
2. Desidrate cada uma em álcool gelado (-20 °C) de 70%, 85%, e 100% por 2 min. Secagem ao ar livre.
3. Desnatura a mistura de sondas em 90 °C por 10 min e coloque no gelo.
4. Misture o conteúdo da sonda com vórtex e se assegure que o seu conteúdo está na parte de baixo para uso.
5. Aplique a sonda à lâmina desnaturada, cubra com lamínula, lacre com rubber cement e **prossiga com a hibridização**.

Perguntas frequentes

Sinais fracos ou inexistentes

- Hibridize novamente e certifique-se de que a sonda tenha sido misturada corretamente e de que esteja em TA antes do uso.
- Hibridize novamente e certifique-se de que a lavagem de estrigência (tampão de lavagem I) esteja na temperatura correta (72 °C (± 1 °C)).
- Considere a queda de temperatura ao adicionar lâminas a reagentes preaquecidos.
- Digestão de tecido não ideal (pouco digerida) – molhe a lamínula em 2 x SSC, pH 7,0 por 2 min em TA. Prolongue a digestão de da proteína por 2 - 20 min.
- Digestão de tecido não ideal (digerida em excesso) – descarte a lâmina e inicie uma nova lâmina. Reduza a digestão de proteína por pelo menos 10 min.
- Use no mínimo 10 μ l de sonda por 22 x 22 mm de lamínula
- Verifique se os filtros do microscópio e a fonte luminosa estão corretos e em pleno funcionamento.

Muito background

- Digestão não-ideal do tecido. O tecido pouco digerido aumenta a background. Molhe a lamínula em 2 x SSC, pH 7,0 por 2 min em TA. Prolongue a digestão da proteína por 2 - 20 min.
- Aumente a temperatura da lavagem de estringência (tampão de lavagem I) quando lavar as lâminas.

Hibridização cruzada ao usar sondas centroméricas.

- Aumente a temperatura da lavagem de estringência (tampão de lavagem I) quando lavar as lâminas.

Aplicação mínima de sondas:

Tamanho da lamínula de vidro	Aplicação mínima de sondas
------------------------------	----------------------------

22 x 22 mm	10 µl
------------	-------

22 x 32 mm	15 µl
------------	-------

22 x 50 mm	23 µl
------------	-------

Recomendações para o procedimento:

A temperatura e a concentração do tampão (estringência) de hibridização e de lavagem são importantes, uma vez que uma estringência mais baixa pode resultar em ligação não específica da sonda a outras sequências, e uma estringência mais elevada pode resultar em falta de sinal. A desnaturação incompleta do DNA alvo e/ou do DNA da sonda pode resultar em falta de sinal.

Materiais necessários, mas não fornecidos: reagentes:

1. Xilol
2. Formamida
3. Álcool de 100%, 85% e 70%
4. 0,01 M de citrato de sódio, pH 6,0 ou 8% de tiocianato de sódio
5. 0,01 M de HCl e 0,2 M de HCl

6. Solução de pepsina RtU (LK-101A)
7. 1 x PBS, pH 7,4
8. 2 x SSC, pH 7,0
9. Tampão de lavagem I (0,4 x SSC / 0,3% Igepal) (LK-102A)
10. Tampão de lavagem II (2 x SSC / 0,1% Igepal) (LK-103A)
11. Contracoloração de DAPI (LK-095A (0,1 µg/ml) ou LK-096A (1 µg/ml))
12. Diluente de contracoloração (LK-097A)
13. Fixogum (LK-071A) ou rubber cement

Materiais necessários, mas não fornecidos: equipamentos:

1. ThermoBrite (TS-01/02) ou ThermoBrite Elite
(Veja www.LeicaBiosystems.com para mais informações)
2. Incubador em 37 °C
3. Banho Maria com temperatura precisa de 37 °C a 90 °C
4. Frasco coplim de vidro ou de plástico
5. Micropipetas variáveis (1 µl - 200 µl)
6. Microscópio de fluorescência equipado com filtros apropriados
(veja recomendações para a microscopia de fluorescência)

Avisos e precauções:

1. Apenas para utilização profissional. Em caso de emergências, consulte as folhas de dados de segurança (MSDS) para informações de segurança.
2. As sondas de DNA e os tampões de hibridização contêm formamida, um teratogênico; não inale nem permita o contato com a pele. Use luvas e jaleco de laboratório quando manusear sondas de DNA e contracoloração de DAPI.
3. Todos os materiais devem ser descartados de acordo com as normas de sua instituição para a eliminação de resíduos.
4. A classificação deve ser realizada de acordo com os requerimentos da OSHA HazCom Standard (2012).

Procedimento FISH 2

Instruções de uso

Preparações de células

Utilização de sondas Kreatech™ FISH

A hibridação fluorescente *in situ* (FISH) é usada para identificar ou classificar sequências genômicas alvo para que seu local possa ser estudado. As sequências de DNA são marcadas com sondas moleculares específicas ao cromossomo. A sonda do DNA marcado é então hibridizada para os cromossomos metafásicos ou núcleos interfásicos em uma lâmina. Após a lavagem, a região selecionada onde estão localizadas as moléculas indicadoras é visualizada por microscopia de fluorescência.

As sondas KREATECH REPEAT-FREE FISH não contêm DNA de Cot-1. A eficiência da hibridização é consequentemente elevada o background, causado por ligações inespecíficas, é bastante reduzida.

Este protocolo foi desenvolvido somente para o uso em pesquisa (RUO) das sondas Kreatech FISH.

Para uso em células de culturas sanguíneas periféricas ou preparações diretas preparadas por métodos citogenéticos padrão, consulte: The ACT cytogenetics laboratory manual. 3rd ed. New York: Raven Press; 1996.

Para melhores resultados, recomenda-se o uso de kits de pré-tratamento completos Kreatech (KI-60005, KI-60006) que incluem um protocolo de "instrução de uso" especialmente otimizado.

Para mais informações, consulte o nosso site:

<http://www.LeicaBiosystems.com/ihc-ish/kreatech-fish-probes/>

Os seguintes protocolos também podem ser usados como alternativa:

Pré-tratamento:

Protocolo I (protocolo padrão, se não for satisfatório use o protocolo II)

1. Para preparar as lâminas, programe as lâminas para 10 minutos (min) em 80 °C, e deixe as lâminas esfriarem a temperatura local (TA).
2. Coloque as lâminas em ácido acético fresco, preparado de 70% (em H₂O(dH₂O deionizado)), incube por 1 min em TA.
3. Coloque as lâminas em 1 x PBS, pH 7,4, incube por 30 segundos em TA.
4. Coloque as lâminas em 1 x PBS, pH 7,4, incube por 5 min em TA.
5. Desidrate a lâmina em álcool de 70%, 85% e 100%, incube cada uma por 1 min em TA. Secagem em TA.

Prosseguir com a preparação de sondas.

Protocolo II (para lâminas com background citoplasmático ou preparações diretas (fluido amniótico ou vilosidades crônicas)

1. Preequeça 2 x SSC, pH 7,0 e 0,01 M de HCl em 37 °C
2. Coloque lâminas de amostras secas em 2 x SSC preaquecido, pH 7,0, incube em 37 °C por 2 min.
3. Adicione a pepsina a 0,01 M de HCl preaquecido para obter uma concentração final de 0,005%.
4. Coloque as lâminas em 0,005% de uma solução de pepsina em 0,01 M de HCl e incube em 37 °C por 5 - 15 min (dependendo da quantidade de base citoplasmática).
5. Coloque as lâminas em 1 x PBS, pH 7,4, incube por 3 min em TA.
6. Repare as lâminas posteriormente incubando-as em 1% de formaldeído tamponado em 1 x PBS / 20 mM MgCl₂ por 10 min em TA.
7. Coloque as lâminas em 1 x PBS, pH 7,4, incube por 3 min em TA.
8. Desidrate a lâmina em álcool de 70%, 85% e 100%, incube cada uma por 1 min em TA. Secagem em TA.

Prosseguir com a preparação de sondas.

Preparação de sondas

Misture o conteúdo da sonda com vórtex e se assegure que o seu conteúdo está na parte de baixo para uso.

Somente para uso em pesquisa (RUO), as sondas Kreatech FISH são fornecidas prontas para o uso (RTU).

As sondas FISH de regiões centrômeras, subteloméricas e inteiras de cromossomos são fornecidas em formatos concentrados em 5x e devem ser diluídas em tampão de hibridização fornecido e/ou outras sondas concentradas. Consulte o rótulo do frasco e a bula específica da embalagem de sondas para detalhes sobre a diluição.

PT

Co-desnaturação:

1. Aplique 10 µl da sonda ou preparação da sonda em 22 x 22 mm de área.
2. Cubra com laminula de vidro e lacre com Fixogum (LK-071A) ou rubber cement apropriado para a técnica.
3. Desnature a amostra e a sonda em um ThermoBrite (TS-01/02) por 5 min em 75 °C.

Hibridização:

Incube e deixe de um dia para o outro em 37 °C em um ThermoBrite (TS-01/02) ou em uma câmara umidificadora.

Lavagem pós-hibridização:

1. Preeaqueça o tampão de lavagem I (0,4 x SSC / 0,3% Igepal) (LK-102A) a 72 °C.
2. Remova o rubber cement
3. Coloque até 14 lâminas em 200 ml no tampão de lavagem II (2 x SSC / 0,1% Igepal) (LK-103A), incube por 2 min em TA. Remova as laminulas. Você pode reutilizar o tampão apenas uma vez, totalizando 28 lâminas.

4. Coloque até 14 lâminas em 200 ml no tampão de lavagem I preaquecido (0,4 x SSC / 0,3% Igepal) (LK-102A), incube por 2 min em 72 °C (± 1 °C) sem agitar. Você pode reutilizar o tampão apenas uma vez, totalizando 28 lâminas.
5. Coloque até 14 lâminas em 200 ml em um tampão de lavagem II limpo (2 x SSC / 0,1% Igepal) (LK-103A), incube por 1 min em TA sem agitar. Você pode reutilizar o tampão apenas uma vez, totalizando 28 lâminas.
6. Desidrate as lâminas em álcool de 70%, 85% e 100%, incube cada uma por 1 min em TA. Seque ao ar livre em TA.

Prosseguir com a contracoloração.

Contracoloração:

Aplique 15 μ l de contracoloração de DAPI (LK-095A (0,1 μ g/ml) ou LK-096A (1 μ g/ml)) e aplique a lamínula de vidro. O DAPI pode ser diluído no diluente da contracoloração (LK-097A) para se obter a concentração desejada. Coloque as lâminas no escuro e aguarde 10 - 15 min para que a contracoloração possa se desenvolver.

Prosseguir com a microscopia.

Recomendações para a microscopia de fluorescência:

Para uma melhor visualização, use um microscópio bem conservado e calibrado regularmente, equipado com uma lâmpada de mercúrio de 100 W ou outra fonte luminosa apropriada e uma objetiva de fluorescência de 63x ou 100x. Os filtros de faixa tripla (DAPI/FITC/Cy3 ou DAPI/FITC/TRITC) são usados para visualizar várias cores, os filtros de faixa única são usados para a visualização individual de cores.

Variação adequada de estimulação e de emissão de fluoróforos Kreatech:

Fluoróforos	Estimulação	Emissão
DAPI	360 ±20 nm	460 ±30 nm
PlatinumBright™ 415	429 ±15 nm	470 ±15 nm
PlatinumBright™ 495	495 ±10 nm	517 ±10 nm
PlatinumBright™ 550	550 ±10 nm	580 ±10 nm

Troubleshooting

Protocolo alternativo para espécimes da citologia:

1. Preequeça 50 ml de 2 x SSC / 0,5% Igepal (LK-105B) em um frasco de coplim a 37°C com lavagem em água. Coloque as lâminas preparadas no frasco de coplim e incube por 15 minutos.
2. Desidrate as lâminas em álcool de 70%, 85% e 100%, incube cada uma por 1 min em TA. Ar seco em TA.

Prosseguir com a preparação de sondas.

Protocolo alternativo para desnaturação de sonda (sonda separada e amostra de desnaturação):

1. Preequeça formamida de 70% / 2 x SSC, pH 7,0 a 72°C.
2. Desnature as lâminas em formamida de 70% / 2 x SSC, pH 7,0, incube em 72°C (±1°C) por 2 min.
3. Desidrate as lâminas em álcool gelado (-20°C) de 70%, 85%, e 100%, incube cada uma por 2 min. Ar seco em TA.
4. Desnature a mistura de sondas em 90°C por 10 min e coloque diretamente no gelo.
5. Misture o conteúdo da sonda com vórtex e se assegure que o seu conteúdo está na parte de baixo para uso.
6. Aplique a sonda à lâmina desnaturada, cubra com lamínula, lacre com rubber cement

Prosseguir com a hibridização.

Perguntas frequentes

Sinais fracos ou inexistentes

- Hibridize novamente e certifique-se de que a sonda tenha sido misturada corretamente e de que esteja em TA antes do uso.
- Hibridize novamente e certifique-se de que a lavagem de estringência (tampão de lavagem I) esteja na temperatura correta (72 °C (± 1 °C)).
- Considere a queda de temperatura ao adicionar lâminas a reagentes preaquecidos.
- Use no mínimo 10 μ l de sonda por 22 x 22 mm de lamínula.
- Verifique se os filtros do microscópio e a fonte luminosa estão corretos e em pleno funcionamento.

Muito background em uma hibridização cruzada específica ao usar sondas centroméricas ou subteloméricas.

- Aumente a temperatura da lavagem de estringência (tampão de lavagem I) quando lavar as lâminas.

Aplicação mínima de sondas:

Tamanho da lamínula de vidro	Aplicação mínima de sondas
------------------------------	----------------------------

22 x 22 mm	10 μ l
------------	------------

22 x 32 mm	15 μ l
------------	------------

22 x 50 mm	23 μ l
------------	------------

Recomendações para o procedimento:

A concentração da temperatura e do tampão (estringência) de hibridização e de lavagem são importantes, uma vez que uma estringência mais baixa pode resultar de ligação não específica da sonda a outras sequências, e uma estringência mais elevada pode resultar em falta de sinal. A desnaturação incompleta do DNA alvo e/ou do DNA da sonda pode resultar em falta de sinal.

Materiais necessários, mas não fornecidos: reagentes:

1. Kit de reagentes FISH (KI-60005)
2. Kit de assimilação FISH (KI-60006)
3. 1% de formaldeído tamponado / 1 x PBS / 20 mM MgCl₂
4. 1 x PBS, pH 7,4
5. 2 x SSC, pH 7,0
6. Solução de pepsina (LK-101A)
7. Tampão de lavagem I (0,4 x SSC / 0,3% Igepal) (LK-102A)
8. Tampão de lavagem II (2 x SSC / 0,1% Igepal) (LK-103A)
9. Igepal
10. 0,01 M de HCl
11. Fixador Carnoy's (metanol : ácido acético = 3 : 1)
12. Ácido acético de 70% (em H₂O deionizado)
13. Contracoloração de DAPI (LK-095A (0,1 µg/ml) ou LK-096A (1 µg/ml))
14. Diluente de contracoloração (LK-097A)
15. Formamida
16. Álcool de 100%, 85% e 70%
17. Fixogum (LK-071A) ou rubber cement

Materiais necessários, mas não fornecidos: equipamentos:

1. ThermoBrite (TS-01/02)
2. Incubador em 37°C
3. Lavagem em água com temperatura precisa de 37°C a 90°C
4. Frasco coplim de vidro ou de plástico
5. Micropipetas variadas (1 µl - 200 µl)
6. Microscópio de fluorescência equipado com filtros apropriados (veja recomendações para a microscopia de fluorescência)

Avisos e precauções:

1. Apenas para utilização profissional. Em caso de emergências, consulte as folhas de dados de segurança (MSDS) para informações de segurança.
2. As sondas de DNA e os tampões de hibridização contêm forma-

mida, um teratígeno; não inale nem permita o contato com a pele. Use luvas e jaleco de laboratório quando manusear sondas de DNA e contracoloração de DAPI.

3. Todos os materiais devem ser descartados de acordo com as normas de sua instituição para a eliminação de resíduos.
4. A classificação deve ser realizada de acordo com os requerimentos da OSHA HazCom Standard (2012).

DANGER



FORMAMIDE

Emergency Phone Number: 0800-2480123

Hazard statement

H319: Causes serious eye irritation.

H360: May damage fertility or the unborn child.

Precautionary statement(s) Prevention

P201: Obtain special instructions before use.

P280: Wear protective gloves, protective clothing, eye protection and face protection.

P308+P313: If exposed or concerned: get medical advice / attention.

P501: Dispose of contents/container to authorised hazardous or special waste collection point in accordance with any local regulation.

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.

Kreatech FISH Probes. 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



Kreatech Biotechnology B.V.

Vlierweg 20

1032 LG Amsterdam

The Netherlands

www.LeicaBiosystems.com