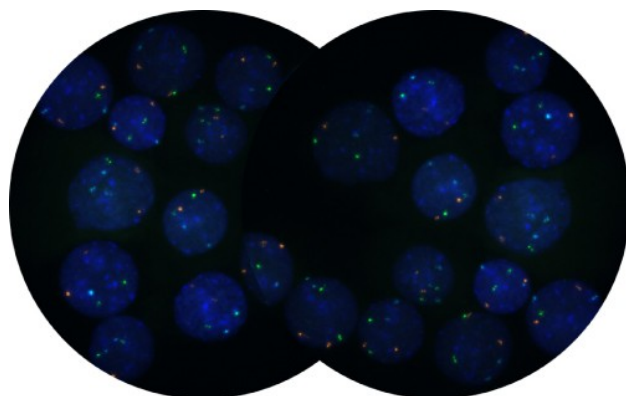




Sonda CytoTest DNA FISH Istruzioni per l'uso



Applicabile ai seguenti gruppi REF
CT-PAC
CT-LSP
CT-CCP

Indice

Informazioni sul prodotto

Guida ai simboli	3
Utilizzatore previsto	3
Nome comune del prodotto	3
Finalità d'uso.....	3
Indicazione per l'uso.....	3
Controindicazioni	4
Principi della procedura.....	4
Descrizione del prodotto.....	4
Avvertenze e precauzioni	5
Conservazione e manipolazione	5
Materiali forniti	5
Attrezzature di laboratorio necessarie ma non fornite	5

Procedura di analisi

<u>Procedura FISH per campioni FFPE</u>	
Reagenti necessari ma non forniti	5
Preparazione delle soluzioni di lavoro	6
Procedura FISH per sezioni di tessuto incluse in paraffina	6
<u>Procedura FISH per campioni citologici</u>	
Reagenti necessari ma non forniti	7
Preparazione delle soluzioni di lavoro	7
Procedura FISH per citologia	9
<u>Procedura FISH per campioni di liquido amniotico</u>	
Reagenti necessari ma non forniti	10
Preparazione delle soluzioni di lavoro	10
Procedura FISH per amniociti.....	12

Interpretazione dei risultati

Pattern di segnali per sonde di amplificazione/delezione.....	13
Pattern di segnali per sonde di disgregazione	13
Pattern di segnali per sonde di fusione/traslocazione.....	13

Supplementi

Riferimenti.....	14
Informazioni sul produttore.....	14
Informazioni sul rappresentante autorizzato nella CE.....	14

INFORMAZIONI SUL PRODOTTO

Guida ai simboli



Numero di catalogo



Nome e indirizzo del produttore



Dispositivo medico-
diagnostico
in vitro



Rappresentante autorizzato nella
Comunità Europea



Contiene reagente sufficiente
per < n > test



Rischi biologici



Numero di lotto



Consultare le istruzioni per l'uso



Usare entro AAAA-MM-GG



Temperatura minima/massima



Non sterile

Utilizzatore previsto

Le sonde CytoTest FISH sono destinate **esclusivamente ad uso professionale**.

Nome comune del prodotto

Sonde di DNA per ibridazione *in situ* fluorescente (FISH)

Finalità d'uso

La sonda FISH è destinata all'uso in un test teso a rilevare anomalie citogenetiche o cromosomiche note o sospette.

Indicazioni per l'uso

La valutazione iniziale di numerose neoplasie ematologiche e di altra natura, in genere, comprende analisi citogenetiche morfologiche, istologiche, immunofenotipiche (citometria a flusso e/o immunocitochimiche) e convenzionali. L'analisi FISH può essere una componente integrante della valutazione diagnostica per patologie che interessano aberrazioni genomiche, in aggiunta o successivamente a cariotipizzazione convenzionale, ma in particolare:

1. in presenza di anomalie con una bassa frequenza, ma con una percentuale ben documentata, di risultati citogenetici falsi negativi, in particolare in scenari in cui i parametri clinici, ematologici e patologici suggeriscono un'anomalia specifica;
2. in presenza di anomalie con un'elevata frequenza di citogenetica "falsa negativa";
3. qualora si renda necessaria l'analisi interfase, quando la citogenetica convenzionale non riesce o non è possibile, ad esempio, su tessuto fissato;

4. per chiarire risultati anomali o complessi del cariotipo convenzionale; e
5. come marcatore surrogato per un evento genetico primario.

Controindicazioni

Il presidio è soggetto alle limitazioni descritte di seguito.

1. Questo prodotto non è destinato a utilizzi ad alto rischio quali selezione della terapia, previsione della risposta terapeutica o screening per malattie. Non è stato stabilito l'utilizzo di questo dispositivo per la valutazione del rischio e il monitoraggio, la diagnosi e la prognosi delle malattie.
2. Le informazioni cliniche, patologiche e altre informazioni pertinenti devono sempre essere correlate ai risultati dei test FISH su campioni di pazienti. Quando si esegue il test e si utilizzano i risultati, occorre sempre tenere conto dello stato clinico del paziente.
3. Il test FISH non è adatto a determinare le seguenti anomalie:
 - a. una o più mutazioni puntiformi nel DNA da analizzare;
 - b. altre eventuali aberrazioni a livello di singoli nucleotidi;
 - c. piccole (al di sotto dell'intervallo kb) delezioni, inserzioni, inversioni;
 - d. precisione nell'identificazione di punti di rottura nell'accoppiamento di basi.
4. Questo test non consente la determinazione del livello di espressione genica o tipo di trascrizione, e non prevede la misurazione della quantità di prodotto genico o dell'integrità.
5. Interpretazione dei risultati: in casi rari è possibile osservare pattern insoliti di macchie/segnali. Tali pattern imprevisti possono avere un significato sconosciuto e non essere interpretabili solo con questo test. L'analisi metafase può essere utile per la caratterizzazione di alcuni pattern di segnali atipici o imprevisti.
6. Le caratteristiche prestazionali della sonda FISH sono state validate su campioni umani di linfociti di sangue periferico e tessuto.
7. L'uso del dispositivo per analizzare altri tipi di campioni può non essere stato ampiamente testato e può richiedere l'ottimizzazione e la modifica del protocollo.

Principi della procedura

L'ibridazione *in situ* fluorescente (FISH) è una tecnica potente progettata per rilevare la presenza o l'assenza, la posizione, l'integrità e la quantità di sequenze di DNA o RNA in tessuti, cellule o cromosomi. La tecnica FISH si basa sul rilevamento di sequenze specifiche tramite l'accoppiamento di basi (ibridazione) su singoli filamenti complementari di acido nucleico. Qui, uno dei filamenti è un frammento di sequenza fluorescente (sonda) che si lega solo a quelle parti del genoma con sequenze altamente o completamente complementari alla sequenza sonda, e l'altro filamento è presente nel materiale del campione che deve essere analizzato. Pertanto, l'ibridazione *in situ* inizia con la preparazione del campione da analizzare e con la preparazione della sonda. Il DNA dalla tipica forma a doppia elica nel campione deve essere sciolto (denaturato) in singoli filamenti, e la sonda deve essere fluorescente per attivare il rilevamento.

Descrizione del prodotto

Le sonde CytoTest FISH sono dispositivi medico-diagnostici *in vitro* fabbricati con DNA genomico ottenuto da cromosomi umani microdissezionati o frammenti di DNA clonati, a seconda del tipo di sonda.

Per ottenere risultati ottimali, occorre selezionare set di filtri per microscopio che siano compatibili con la fluorescenza delle sonde.

Fluoroforo	Picco di eccitazione (nm)	Picco di emissione (nm)	Compatibilità con altri coloranti
CytoRed™	583	605	SpectrumRed Ioduro di propidio (543-614)
CytoOrange™	551	575	SpectrumOrange

CytoGold™	523	549	SpectrumGold
CytoGreen™	495	518	SpectrumGreen Fluoresceina isotiocianato (FITC)
CytoAqua™	422	471	SpectrumAqua
CytoBlue™	402	421	SpectrumBlue (400-450)

Avvertenze e precauzioni

L'eccessiva esposizione alla luce può causare il photobleaching dei fluorofori della sonda. Durante la manipolazione di tutti i reagenti e vetrini contenenti la sonda, adottare opportune precauzioni per evitare l'esposizione alla luce diretta e prolungata. Si raccomanda di rispettare le istruzioni riportate in queste istruzioni per l'uso durante l'utilizzo delle sonde CytoTest FISH.

Gli operatori che eseguono il test devono indossare idonei indumenti protettivi, guanti e protezioni per occhi/viso. I reagenti utilizzati nel test FISH possono irritare gli occhi e la pelle; evitare il contatto con la pelle e gli occhi. In caso di contatto con gli occhi, lavare immediatamente con abbondante acqua e consultare un medico.

L'Uso improprio durante il trasporto o lo stoccaggio può potenzialmente degradare o compromettere le prestazioni del prodotto. Tutti i prodotti compromessi devono essere smaltiti in conformità alle leggi o regolamenti del vostro istituto, della vostra regione e /o del vostro paese, e i reagenti non devono essere utilizzati in nessun test. Se avete dei dubbi sul degrado della qualità o sulle prestazioni del prodotto, siete pregati di contattare il produttore o il/i distributore/i regionale/i.

Conservazione e manipolazione

Le sonde CytoTest FISH devono essere conservate a temperature comprese tra -15°C e -25°C e protette dalla luce. Evitare ripetuti cicli di congelamento/scongelamento. Verificare la data di scadenza sull'etichetta del prodotto prima dell'uso. Queste condizioni di conservazione e manipolazione si applicano sia ai prodotti aperti che a quelli chiusi.

Materiali forniti

Sonde CytoTest DNA FISH fornite a una concentrazione pronta per l'uso.

Attrezzature di laboratorio necessarie ma non fornite

- Pipetta microlitro (da 1 a 10 µl) e punte pulite
- Provette in polipropilene per microcentrifuga (0,5 ml o 1,5 ml)
- Coprivetrini da 22 mm x 22 mm
- Mastice
- Cilindro graduato
- Penna a punta di diamante
- Timer
- Pinza
- Vaschette Coplin
- Flaconi per liquidi (250 ml)
- Termometro calibrato
- Miscelatore vortex
- Microcentrifuga
- Bagni di acqua (37 ± 2°C, 72 ± 2°C e 80 ± 2°C)
- Incubatrice ad aria (37 ± 2°C)
- Scalda vetrini
- Microscopio ottico a contrasto di fase
- Microscopio a fluorescenza dotato di filtri consigliati

PROCEDURA DI ANALISI

(Le condizioni sperimentali descritte in questo manuale sono raccomandazioni generali e sono soggette a variazioni, a seconda delle condizioni del materiale dei campione. Esse possono richiedere modifiche per alcuni tipi di campioni.)

Procedura FISH per campioni FFPE

Reagenti necessari ma non forniti

- Kit reagenti per pretrattamento in paraffina (N. di cat: CT-ACC112-05):
 - Soluzione per pretrattamento (50 ml): conservare a temperatura ambiente
 - Tampone proteasi (62,5 ml, pH 2,0): conservare a temperatura ambiente
 - Proteasi (250 mg): liofilizzata, conservare a -20°C
- Kit reagenti FISH (N. di cat: CT-ACC101-20):
 - Tampone salino di citrato di sodio (SSC) 20X: conservare a temperatura ambiente, evitare l'umidità
 - Colorante di contrasto 4,6-diamidino-2-fenilindole (DAPI): conservare a 4°C al buio
 - NP-40 (ottilfenossipolietossietanolo, o Nonidet P-40): conservare a temperatura ambiente
- Xilene: conservare a temperatura ambiente
- Etanolo (100%): conservare a temperatura ambiente
- Acqua depurata: conservare a temperatura ambiente
- HCl concentrato (12N): conservare a temperatura ambiente

Preparazione delle soluzioni di lavoro

1. Soluzione SSC 20X (pH 7.0)

Reagenti	Quantità aggiunta	Concentrazione finale
Sale SSC	66 g	20X
H ₂ O deionizzata (dH ₂ O)	250 ml	
TOTALE	250 ml	

2. Soluzione di proteasi

Reagenti	Quantità aggiunta	Concentrazione finale
Proteasi, liofilizzata	250 mg	4 mg/ml
Tampone di proteasi	62,5 ml	
TOTALE	62,5 ml	

3. Etanolo al 90%

Reagenti	Quantità aggiunta	Concentrazione finale
Etanolo (100%)	90 ml	90%
dH ₂ O	10 ml	
TOTALE	100 ml	

4. Etanolo al 70%

Reagenti	Quantità aggiunta	Concentrazione finale
Etanolo (100%)	70 ml	70%
dH ₂ O	30 ml	
TOTALE	100 ml	

5. Soluzione di lavaggio post-ibridazione (pH 7.0)

Reagenti	Quantità aggiunta	Concentrazione finale
Soluzione SSC 20X	10 ml	2X
NP-40	300 µl	0,3%
dH ₂ O	90 ml	
TOTALE	100 ml	

Procedura FISH per sezioni di tessuto incluse in paraffina

Pretrattamento dei vetrini

1. Immergere i vetrini in xilene a temperatura ambiente per 10 minuti. Ripetere l'operazione per due volte con xilene fresco ogni volta.
2. Essiccare i vetrini in etanolo al 100% a temperatura ambiente per 5 minuti. Ripetere l'operazione per una volta con etanolo fresco al 100%.
3. Volendo, far asciugare i vetrini all'aria per 2-5 minuti.
4. Immergere i vetrini in soluzione di pretrattamento preriscaldata a 80°C per 10 minuti.
5. Immergere i vetrini in acqua depurata a temperatura ambiente per 3 minuti.

Pretrattamento con proteasi

1. Immergere i vetrini in soluzione a base di proteasi a 37°C per 10-60 minuti (a seconda della condizione dei campioni) e monitorare lo stato delle cellule al microscopio ottico.
2. Immergere i vetrini in acqua depurata a temperatura ambiente per 3 minuti.
3. Far asciugare i vetrini all'aria per 2-5 minuti.

Essiccazione dei vetrini

1. Immergere i vetrini in etanolo al 70% per 3 minuti.
2. Immergere i vetrini in etanolo al 90% per 3 minuti.
3. Immergere i vetrini in etanolo al 100% per 3 minuti.
4. Far asciugare i vetrini all'aria.

Preparazione della sonda

1. Preriscaldare la sonda a temperatura ambiente per 20-30 minuti.
2. Inserire brevemente la sonda nel miscelatore vortex e decentrifugare.

Co-denaturazione e ibridazione

1. Applicare 10 µl della sonda su ogni area di ibridazione e coprire con un coprivetrino da 22 mm x 22 mm. Sigillare il/i coprivetrino/i con mastice.
2. Co-denaturare i vetrini con la sonda a 72°C per 5 minuti.
3. Posizionare i vetrini in una camera di ibridazione umidificata preriscaldata e incubare i vetrini a 37°C durante la notte (16 ore).

Lavaggio post-ibridazione

1. Contrassegnare ciascuna area di ibridazione sul retro dei vetrini con una penna a punta di diamante.
2. Rimuovere con cautela il mastice.
3. Immergere i vetrini in soluzione di lavaggio post-ibridazione a temperatura ambiente per allentare i coprivetrini. Agitare delicatamente per far sì che i vetrini si stacchino da sé; non tirare i coprivetrini.
4. Immergere i vetrini in soluzione di lavaggio pretrattamento preriscaldata a 72°C per 2 minuti.

Essiccazione dei vetrini

1. Immergere i vetrini in etanolo al 70% per 2 minuti.
2. Immergere i vetrini in etanolo al 90% per 2 minuti.
3. Immergere i vetrini in etanolo al 100% per 2 minuti.
4. Far asciugare i vetrini all'aria al buio.

Visualizzazione

1. Applicare il colorante di contrasto DAPI e coprire i vetrini con i coprivetrini.
2. Esaminare i vetrini al microscopio a fluorescenza con il corretto set di filtri.

Procedura FISH per campioni citologici

Reagenti necessari ma non forniti

- Kit reagenti FISH (N. di cat: CT-ACC101-20):
 - Sale SSC 20X: conservare a temperatura ambiente, evitare l'umidità
 - Colorante di contrasto DAPI: conservare a 4°C al buio
 - NP-40: a temperatura ambiente
- Pepsina (liofilizzata): conservare a temperature non superiori a -20°C
- Acido idroclorico (1N): conservare a temperatura ambiente
- Formaldeide (37%): conservare a temperatura ambiente

- Soluzione tampone fosfato (PBS) 10X: conservare a temperatura ambiente
- Etanolo (100%): conservare a temperatura ambiente

Preparazione delle soluzioni di lavoro

1. Soluzione SSC 20X (pH 7.0)

Reagenti	Quantità aggiunta	Concentrazione finale
Sale SSC	66 g	20X
dH ₂ O	250 ml	
TOTALE	250 ml	

2. Soluzione madre di pepsina

Reagenti	Quantità aggiunta	Concentrazione finale
Pepsina, liofilizzata	100 mg	100 mg/ml
dH ₂ O	1 ml	
TOTALE	1 ml	

Nota: tenere sul ghiaccio. Preparare aliquote da 20 µl, conservare a -20°C.

3. Soluzione di lavoro di pepsina

Reagenti	Quantità aggiunta	Concentrazione finale
HCl (1N)	1 ml	0,01N
Soluzione madre di pepsina	20 µl	0,02 µg/µl
dH ₂ O	99 ml	
TOTALE	100 ml	

4. Soluzione SSC 20X

Reagenti	Quantità aggiunta	Concentrazione finale
Soluzione SSC 20X	10 ml	2X
dH ₂ O	90 ml	
TOTALE	100 ml	

5. Soluzione PBS 1X

Reagenti	Quantità aggiunta	Concentrazione finale
Soluzione PBS 10X	10 ml	1X
dH ₂ O	90 ml	
TOTALE	100 ml	

6. Soluzione di formaldeide

Reagenti	Quantità aggiunta	Concentrazione finale
Formaldeide (37%)	2,7 ml	1%
Soluzione PBS 10X	10 ml	1X
dH ₂ O	89 ml	
TOTALE	100 ml	

7. Etanolo al 90%

Reagenti	Quantità aggiunta	Concentrazione finale
Etanolo (100%)	90 ml	90%
dH ₂ O	10 ml	
TOTALE	100 ml	

8. Etanolo al 70%

Reagenti	Quantità aggiunta	Concentrazione finale
Soluzione SSC 20X	2 ml	0,4X
NP-40	300 µl	0,3%
dH ₂ O	98 ml	
TOTALE	100 ml	

9. Soluzione di lavaggio post-ibridazione 2

Reagenti	Quantità aggiunta	Concentrazione finale
Soluzione SSC 20X	10 ml	2X
NP-40	100 µl	0,1%
dH ₂ O	90 ml	
TOTALE	100 ml	

10.

Procedura FISH per citologia

Preparazione dei vetrini

1. Equilibrare i vetrini in soluzione SSC 2X a temperatura ambiente per 2 minuti.
2. Immergere i vetrini in soluzione di lavoro a base di pepsina preriscaldata a 37°C per 1-10 minuti (a seconda della condizione dei campioni) e monitorare lo stato delle cellule al microscopio ottico.
3. Lavare i vetrini in soluzione PSB 1X a temperatura ambiente per 5 minuti.
4. Fissare successivamente i vetrini in soluzione a base di formaldeide a temperatura ambiente per 5 minuti.
5. Lavare i vetrini in soluzione PSB 1X a temperatura ambiente per 5 minuti.

Essiccazione dei vetrini

1. Immergere i vetrini in etanolo al 70% per 3 minuti.
2. Immergere i vetrini in etanolo al 90% per 3 minuti.
3. Immergere i vetrini in etanolo al 100% per 3 minuti.
4. Far asciugare i vetrini all'aria.

Preparazione della sonda

1. Pre-riscaldare le sonde a temperatura ambiente per 20-30 minuti.
2. Inserire brevemente le sonde nel miscelatore vortex e decentrifugare.

Co-denaturazione e ibridazione

1. Applicare 10 µl della sonda su ogni area di ibridazione e coprire con un coprivetrino da 22 mm x 22 mm. Sigillare il/i coprivetrino/i con mastice.
2. Co-denaturare i vetrini con la sonda a 72°C per 2 minuti.
3. Posizionare i vetrini in una camera di ibridazione umidificata preriscaldata e incubare i vetrini a 37°C durante la notte (16 ore).

Lavaggio post-ibridazione

1. Contrassegnare ciascuna area di ibridazione sul retro dei vetrini con una penna a punta di diamante.
2. Rimuovere con cautela il mastice.
3. Immergere il vetrino in soluzione SSC 2X a temperatura ambiente per allentare il/i coprivetrino/i. Non tirare il/i coprivetrino/i.
4. Immergere i vetrini in soluzione di lavaggio post-ibridazione 1 preriscaldata a 72°C per 1 minuto.
5. Immergere i vetrini in soluzione di lavaggio post-ibridazione 2 a temperatura ambiente per 2 minuti.

6. Far asciugare i vetrini all'aria.

Visualizzazione

1. Applicare il colorante di contrasto DAPI, coprire con il/i coprivetrino/i.
2. Esaminare i vetrini al microscopio a fluorescenza con il corretto set di filtri.

Procedura FISH per campioni di liquido amniotico

Reagenti necessari ma non forniti

- Kit reagenti FISH:
 - Sale SSC 20X: conservare a temperatura ambiente, evitare l'umidità
 - Colorante di contrasto DAPI: conservare a 4°C al buio
 - NP-40: a temperatura ambiente
- Pepsina (liofilizzata): conservare a temperature non superiori a -20°C
- Acido idroclorico (1N): conservare a temperatura ambiente
- Formaldeide (37%): conservare a temperatura ambiente
- Soluzione PBS 10X: conservare a temperatura ambiente
- Etanolo (100%): conservare a temperatura ambiente

Preparazione delle soluzioni di lavoro

1. Soluzione SSC 20X (pH 7.0)

Reagenti	Quantità aggiunta	Concentrazione finale
Sale SSC	66 g	20X
dH ₂ O	250 ml	
TOTALE	250 ml	

2. Soluzione madre di pepsina

Reagenti	Quantità aggiunta	Concentrazione finale
Pepsina, liofilizzata	100 mg	100 mg/ml
dH ₂ O	1 ml	
TOTALE	1 ml	

Nota: tenere sul ghiaccio. Preparare aliquote da 20 µl, conservare a -20°C.

3. Soluzione di lavoro a base di pepsina 1 (per campioni non moltiplicati in terreno di coltura)

Reagenti	Quantità aggiunta	Concentrazione finale
HCl (1N)	1 ml	0,01N
Soluzione madre di pepsina	50 µl	0,05 µg/µl
dH ₂ O	99 ml	
TOTALE	100 ml	

4. Soluzione di lavoro a base di pepsina 2 (per campioni moltiplicati in terreno di coltura)

Reagenti	Quantità aggiunta	Concentrazione finale
HCl (1N)	1 ml	0,01N
Soluzione madre di pepsina	20 µl	0,02 µg/µl
dH ₂ O	99 ml	
TOTALE	100 ml	

5. Soluzione SSC 2X

Reagenti	Quantità aggiunta	Concentrazione finale
----------	-------------------	-----------------------

Soluzione SSC 20X	10 ml	2X
dH ₂ O	90 ml	
TOTALE	100 ml	

6. Soluzione PBS 1X

Reagenti	Quantità aggiunta	Concentrazione finale
Soluzione PBS 10X	10 ml	1X
dH ₂ O	90 ml	
TOTALE	100 ml	

7. Soluzione di formaldeide

Reagenti	Quantità aggiunta	Concentrazione finale
Formaldeide (37%)	2,7 ml	1%
Soluzione PBS 10X	10 ml	1X
dH ₂ O	89 ml	
TOTALE	100 ml	

8. Etanolo al 90%

Reagenti	Quantità aggiunta	Concentrazione finale
Etanolo (100%)	90 ml	90%
dH ₂ O	10 ml	
TOTALE	100 ml	

9. Etanolo al 70%

Reagenti	Quantità aggiunta	Concentrazione finale
Etanolo (100%)	70 ml	70%
dH ₂ O	30 ml	
TOTALE	100 ml	

10. Soluzione di lavaggio post-ibridazione 1

Reagenti	Quantità aggiunta	Concentrazione finale
Soluzione SSC 20X	2 ml	0,4X
NP-40	300 µl	0,3%
dH ₂ O	98 ml	
TOTALE	100 ml	

11. Soluzione di lavaggio post-ibridazione 2

Reagenti	Quantità aggiunta	Concentrazione finale
Soluzione SSC 20X	10 ml	2X
NP-40	100 µl	0,1%
dH ₂ O	90 ml	
TOTALE	100 ml	

Procedura FISH per amniociti

Preparazione dei vetrini

Campioni non moltiplicati in terreno di coltura

1. Equilibrare i vetrini in soluzione SSC 2X a 37°C per 1 ora.
2. Immergere i vetrini in soluzione di lavoro a base di pepsina 1 preriscaldata a 37°C per 1-10 minuti (a seconda della condizione dei campioni) e monitorare lo stato delle cellule al microscopio ottico.
3. Lavare i vetrini in soluzione PSB 1X a temperatura ambiente per 5 minuti.
4. Fissare successivamente i vetrini in soluzione a base di formaldeide a temperatura ambiente per 5 minuti.
5. Lavare i vetrini in soluzione PSB 1X a temperatura ambiente per 5 minuti.

Campioni moltiplicati in terreno di coltura

1. Equilibrare i vetrini in soluzione SSC 2X a temperatura ambiente per 2 minuti.
2. Immergere i vetrini in soluzione di lavoro a base di pepsina 2 preriscaldata a 37°C per 1-10 minuti (a seconda della condizione dei campioni) e monitorare lo stato delle cellule al microscopio ottico.
3. Lavare i vetrini in soluzione PSB 1X a temperatura ambiente per 5 minuti.
4. Fissare successivamente i vetrini in soluzione a base di formaldeide a temperatura ambiente per 5 minuti.
5. Lavare i vetrini in soluzione PSB 1X a temperatura ambiente per 5 minuti.

Essiccazione dei vetrini

1. Immergere i vetrini in etanolo al 70% per 3 minuti.
2. Immergere i vetrini in etanolo al 90% per 3 minuti.
3. Immergere i vetrini in etanolo al 100% per 3 minuti.
4. Far asciugare i vetrini all'aria.

Preparazione della sonda

1. Preriscaldare le sonde a temperatura ambiente per 20-30 minuti.
2. Inserire brevemente le sonde nel miscelatore vortex e decentrifugare.

Co-denaturazione e ibridazione

1. Applicare 10 µl della sonda su ogni area di ibridazione e coprire con un coprivetrino da 22 mm x 22 mm. Sigillare il/i coprivetrino/i con mastice.
2. Co-denaturare i vetrini con la sonda a 72°C per 2 minuti.
3. Posizionare i vetrini in una camera di ibridazione umidificata preriscaldata e incubare i vetrini a 37°C durante la notte (16 ore).

Lavaggio post-ibridazione

1. Contrassegnare le aree di ibridazione sul retro dei vetrini con una penna a punta di diamante.
2. Rimuovere con cautela il mastice.
3. Immergere il vetrino in soluzione SSC 2X a temperatura ambiente per allentare il/i coprivetrino/i. Non tirare il/i coprivetrino/i.
4. Immergere i vetrini in soluzione di lavaggio post-ibridazione 1 preriscaldata a 72°C per 1 minuto.
5. Immergere i vetrini in soluzione di lavaggio post-ibridazione 2 a temperatura ambiente per 2 minuti.
6. Far asciugare i vetrini all'aria.

Visualizzazione

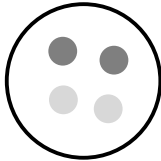
1. Applicare il colorante di contrasto DAPI, coprire con il/i coprivetrino/i.
2. Esaminare i vetrini al microscopio a fluorescenza con il corretto set di filtri.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Pattern di segnali per sonde di amplificazione/delezione

Pattern normali

- 2 segnali arancioni + 2 segnali verdi (2O2G)



Guida ai colori

- Segnali arancioni rappresentati da punti grigio scuro
- Segnali verdi rappresentati da punti grigio chiaro

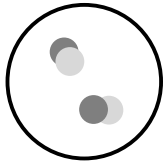
Pattern anomali

- Qualsiasi altro pattern

Pattern di segnali per sonde di disgregazione

Pattern normali

- 2 segnali sovrapposti arancione-verde (2OG)



Guida ai colori

- Segnali arancioni rappresentati da punti grigio scuro
- Segnali verdi rappresentati da punti grigio chiaro
- I segnali arancione-verde sovrapposti possono apparire gialli

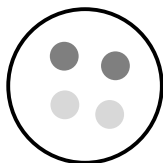
Pattern anomali

- Qualsiasi altro pattern

Pattern di segnali per sonde di fusione/traslocazione

Pattern normali

- 2 segnali arancioni + 2 segnali verdi (2O2G)



Guida ai colori

- Segnali arancioni rappresentati da punti grigio scuro
- Segnali verdi rappresentati da punti grigio chiaro

Pattern anomali

- Qualsiasi altro pattern. I segnali fusi (sovrapposizione di segnali arancioni e verdi) possono apparire come segnali gialli.

RIFERIMENTI

1. Andersson S, et al. *Am J Pathol.* 175(5): 1831–1847 (2009).
2. Blackburn EH. *Nature.* 350(6319):569-73 (1991).
3. Cairns P, et al. *Cancer Res.* 57(22):4997-5000 (1997).
4. Chiarle R, et al. *Nat Rev Cancer.* 8(1):11-23 (2008).
5. Chu EC & Tarnawski AS. *Med Sci Monit.* 10(10):RA235-41 (2004).
6. Coussens L, et al. *Science.* 230(4730):1132-9 (1985).
7. Djulbegovic M, et al. *BMJ.* 341:c4543 (2010).
8. Druker BJ, et al. *N Engl J Med.* 355(23):2408-17 (2006).
9. Ernst T, et al. *Hematol Oncol Clin North Am.* 25(5):997-1008, v-vi (2011).
10. Foulkes WD, et al. *Mol Med.* 3(1):5-20 (1997).
11. Gonzalez S, et al. *Nature.* 440(7084):702-6 (2006).
12. Heselmeyer K, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93(1):479-84 (1996).
13. Heselmeyer-Haddad K, et al. *Cancer Res.* 62(8):2365-9 (2002).
14. Heselmeyer-Haddad K, et al. *Am J Pathol.* 166(4): 1229–1238 (2005).
15. Kamb A, et al. *Science.* 264(5157):436-40 (1994).
16. Kwak EL, et al. *N Engl J Med.* 363(18):1693-703 (2010).
17. Krimpenfort P, et al. *Nature.* 413(6851):83-6 (2001).
18. Landstrom AP & Tefferi A. *Leuk Lymphoma.* 47(3):397-402 (2006).
19. Minoo P & Wang HY. *Int J Clin Exp Pathol.* 5(5):397-410 (2012).
20. Nowell PC, Hungerford DA. *J Natl Cancer Inst.* 25:85-109 (1960).
21. Pathmanathan N & Bilous AM. *Pathology.* 44(7):587-95 (2012).
22. Pauletti G, et al. *J Clin Oncol.* 18(21):3651-64 (2000).
23. Rowley JD. *Nature.* 243(5405):290-3 (1973).
24. Salido M, et al. *J Thorac Oncol.* 6(1):21-7 (2011).
25. Sasaki T, et al. *Eur J Cancer.* 46(10):1773-80 (2010).
26. Sharpless E & Chin L. *Oncogene.* 22(20):3092-8 (2003).
27. Shay JW & Bacchetti S. *Eur J Cancer.* 33(5):787-91 (1997).
28. Slamon DJ, et al. *Science.* 235(4785):177-82 (1987).
29. Steck PA, et al. *Nat Genet.* 1997 Apr;15(4):356-62 (1997).
30. Yoshimoto M, et al. *Br J Cancer.* 97(5):678–685 (2007).

Produttore



CytoTest Inc.
9430 Key West
Suite 210
Rockville, MD 20850
USA

Tel.: +1-202-688-1188
Fax: +1-301-296-6950
E-mail: sales@cytotest.com

Rappresentante autorizzato nella CE



Obelis S.A.
Bd. General Wahis 53
1030 Bruxelles
Belgio

Tel.: +32-2-732-59-54
Fax: +32-2-732-60-03
E-mail: mail@obelis.net

Copyright © 2015 CytoTest, Inc.

Tutti i diritti riservati.
www.cytotest.com