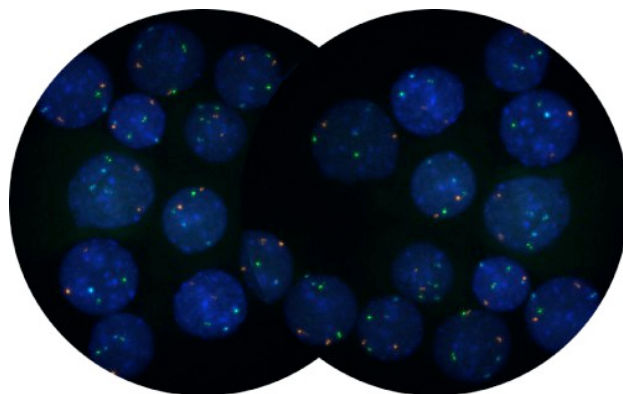




Sonda FISH de Teste de ADN da Cyto Instruções de utilização



CE **IVD**

REF

Aplicável aos seguintes grupos REF
CT-PAC
CT-LSP
CT-CCP

Índice

Informações sobre o produto

Chaves para os símbolos	3
Utilizadores a que se destina.....	3
Nome comum do produto	3
Utilização a que se destina	3
Indicações para a utilização	3
Contraindicações	4
Princípios de procedimento	4
Descrição do produto	4
Advertências e precauções.....	5
Armazenamento e manuseamento	5
Materiais fornecidos	5
Equipamento laboratorial necessário mas não fornecido.....	5

Procedimento de ensaio

<u>Procedimento FISH para espécimes FFPE</u>	
Reagentes necessários mas não fornecidos.....	5
Preparação das soluções de trabalho.....	6
Procedimento FISH para secções de tecido embebidas em parafina	6
<u>Procedimento FISH para espécimes citológicos</u>	
Reagentes necessários mas não fornecidos.....	7
Preparação das soluções de trabalho.....	7
Procedimento FISH para citologia.....	9
<u>Procedimento FISH para espécimes de líquido amniótico</u>	
Reagentes necessários mas não fornecidos.....	10
Preparação das soluções de trabalho.....	10
Procedimento FISH para amnióticos	12

Interpretação dos resultados

Padrões assinalantes para amplificação/eliminação de sondas.....	13
Padrões assinalantes para sondas de divisão	13
Padrões assinalantes para sondas de fusão/translocação	13

Suplementos

Bibliografia	14
Informações sobre o fabricante	14
Informação do mandatário da CE	14

INFORMAÇÕES SOBRE O PRODUTO

Chaves para os símbolos



Número de catálogo



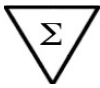
Nome e morada do fabricante



Diagnóstico médico de dispositivo *in vitro*



Representante Autorizado na Comunidade Europeia



Contém reagente suficiente para < n > testes



Riscos biológicos



Lotenúmero



Consultar as instruções de utilização



Utilizar até AAAA-MM-DD



Temperatura mínima/máxima



Não estéril

Utilizadores a que se destina

As sondas FISH a CytoTest destinam-se apenas a utilização profissional.

Nome comum do produto

Sondas (FISH) de hibridação *in situ* de fluorescência de ADN

Uso a que se destina

A sonda FISH destina-se a ser utilizada para análises de captura de anomalias citogenéticas ou cromossómicas conhecidas ou suspeitas.

Indicações de utilização

A análise inicial de muitas doenças hematológicas e de outras origens inclui, geralmente, análises morfológicas, histológicas, imunofenotípicas (de fluxo citométrico e/ou imunohistoquímico) e análises citogenéticas convencionais. As análises FISH podem ser um componente integral da avaliação do diagnóstico para quaisquer doenças relacionadas com aberrações genómicas, adicionalmente a ou segundo cariotipagem convencional, mas particularmente em casos de:

1. Anomalias com baixa frequência, mas com uma percentagem bem documentada de resultados citogenéticos falsos negativos, particularmente em cenários onde os parâmetros clínicos, hematológicos e patológicos sugerem uma anomalia específica.
2. Anomalias com alta frequência de citogenéticos com "falsos negativos"
3. Análise interfase, quando os citogenéticos convencionais falham ou não são possíveis, por exemplo, em tecido

fixo

4. Para clarificar resultados de cariotipagem convencional anómalos ou complexos; e
5. Como um marcador alternativo para eventos genéticos primários

Contraindicações

O dispositivo está sujeito às seguintes limitações:

1. Este produto não é destinado a utilizações de alto risco como seleção de terapias, previsão de resposta terapêutica ou rastreio de doenças. A utilização deste dispositivo para análise de riscos, monitorização de doenças, diagnóstico e prognóstico não foi estabelecida.
2. As informações clínicas, patológicas e outras informações que possam ser relevantes devem ser sempre correlacionadas com os resultados das análises FISH em amostras de doentes. O estado clínico dos pacientes deve ser tido em consideração ao levar a cabo estas análises e utilizar os resultados.
3. A análise FISH não é apropriada para determinar as seguintes anomalias:
 - a. Um ou mais pontos de mutação em ADN alvo, ou
 - b. Quaisquer outras aberrações únicas ao nível nucleótido,
 - c. Exclusões pequenas (inferiores ao alcance -kb), inserções, inversões
 - d. Identificação de ponto de quebra ao nível de exatidão de par de bases
4. Esta análise não permite a determinação do nível de expressão genética ou tipo de transcrição e não inclui medições da quantidade ou integridade do produto genético.
5. Interpretação dos resultados: Em casos raros podem ser observados padrões assinalantes/sinais pouco comuns. Tais padrões inesperados podem ser de importância desconhecida e não podem ser interpretados apenas por esta análise. Análises de metáfases podem ser úteis para a caracterização de alguns padrões assinalantes atípicos ou inesperados.
6. As características de desempenho da sonda FISH foram validadas em amostra de linfócitos de sangue humano periférico e amostras de tecido.
7. A utilização do dispositivo para análises a outros tipos de amostra pode não ter sido testada extensivamente e pode necessitar de otimização e ajuste do protocolo

Princípios de procedimento

A hibridação *in situ* de fluorescência (FISH) é uma técnica potente criada para detetar a presença ou ausência, localização e quantidade de ADN ou sequência de ARN em tecidos, células ou cromossomas. A FISH baseia-se na deteção de sequências específicas através do emparelhamento de bases (hibridação) em cadeias únicas complementares de ácido nucleico. Aqui, uma das cadeias é um fragmento de sequência rotulada fluorescentemente (sonda) que se liga apenas a essas partes do genoma com sequências altamente ou completamente complementares à sequência da sonda e a outra cadeia está presente no material de amostra que irá ser analisado. Logo, a hibridação *in situ* começa com a preparação da amostra a ser analisada e com a preparação da sonda. O ADN típico de duas cadeias na amostra tem de ser derretido (desnaturado) em cadeias individuais e a sonda tem de ser marcada fluorescentemente para permitir a deteção.

Descrição do produto

As sondas FISH da CytoTest são dispositivos médicos de diagnóstico *in vitro* e são fabricadas com ADN genómico obtido ou de cromossomas humanos microdissecados ou de fragmentos de ADN clonado, dependendo do tipo de sonda.

Para resultados otimizados, os conjuntos de filtros microscópicos, que são compatíveis com a fluorescência das sondas, têm de ser selecionados.

Fluoróforo	Pico de excitação (nm)	Pico de emissão (nm)	Compatibilidade com outros corantes
CytoRed™	583	605	SpectrumRed Iodeto de propídio (543-614)
CytoOrange™	551	575	SpectrumOrange

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

Advertências e Precauções

A exposição excessiva à luz pode descorar os fluoróforos da sonda. Tome as precauções apropriadas ao manusear todos os reagentes e lâminas que contenham a sonda para evitar exposição direta e prolongada à luz. Recomenda-se que cumpra as instruções descritas nestas instruções de utilização quando manusear ou utilizar as sondas FISH da CytoTest.

Os colaboradores que realizam a experiência devem vestir roupas de proteção, luvas e proteção para os olhos/cara. Os reagentes utilizados na experiência FISH podem causar irritação oftalmológica e cutânea. Evite o contacto com a pele e os olhos. Em caso de contacto com os olhos, enxague imediatamente com bastante água e procure aconselhamento médico.

Manuseamento incorrecto durante o transporte ou armazenamento pode potencialmente degradar ou prejudicar o desempenho do produto. Quaisquer produtos comprometidos devem ser descartados de acordo com qualquer lei ou regulamentação aplicável na sua instituição, região e / ou país, e os reagentes não devem ser utilizados em quaisquer testes. Se houver alguma dúvida sobre a degradação da qualidade e desempenho do produto, entre em contato com o fabricante ou com o(s) distribuidor(es) regional(ais).

Armazenamento e manuseamento

As sondas FISH da CytoTest devem ser armazenadas num local entre -15 °C e -25 °C e serem protegidas da exposição solar. Evite ciclos de congelamento/descongelamento repetidos. Verifique a data de validade no rótulo do produto antes de o utilizar. Estas condições de armazenamento e manuseamento aplicam-se tanto a produtos abertos como fechados.

Materiais fornecidos

As sondas FISH de ADN da CytoTest são fornecidas com concentração pronta a utilizar.

Equipamento laboratorial necessário mas não fornecido

- Pipetas de microlitro (1 até 10 µL) e cotonetes limpos
- Tubos de micro-centrifugação de polipropileno (0,5 mL ou 1,5 mL)
- Lamelas de vidro de 22 mm x 22 mm
- Cola de borracha
- Cilindro de graduação
- Riscador de ponta de diamante
- Temporizador
- Pinças
- Jarro Coplin
- Garrafas médias (250 mL)
- Termómetro calibrado
- Misturador de vórtices
- Micro-centrifugadora
- Lavatórios (37 ± 2 °C, 72 ± 2 °C e 80 ± 2 °C)
- Incubadora de ar (37 ± 2 °C)
- Aquecedor de lamelas
- Microscópio de luz por contraste de fase
- Microscópio fluorescente equipado com os filtros recomendados

PROCEDIMENTO DA ANÁLISE

(As condições experimentais neste manual do utilizador são, regra geral, recomendações e estão sujeitas a alterações, dependendo das condições do material de amostra. Poderão necessitar de ajustes para certos tipos de amostras.)

Procedimento FISH para espécimes FFPE

Reagentes necessários mas não fornecidos

- Kit de reagentes de pré-tratamento de parafina (n.º Cat: CT-ACC112-05):
 - Solução de pré-tratamento (50 ml): armazenar à temperatura ambiente (room temperature, RT)
 - Tampão de protease (62,5 ml, pH 2,0): armazenar à temperatura ambiente
 - Protease (250 mg): liofilizado, armazenar a -20 °C
- Kit de reagentes FISH (N.º Cat: CT-ACC101-20):
 - Sal de tampão de cloreto de sódio/citrato de sódio 20X (SSC): armazenar à temperatura ambiente e evitar a humidade
 - Corante de contraste 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI): armazenar a 4 °C no escuro
 - NP-40 (octilfenoxipolietoxietanol ou Nonidet P-40): armazenar à temperatura ambiente
- Xileno: armazenar à temperatura ambiente
- Etanol (100%): armazenar à temperatura ambiente
- Água purificada: armazenar à temperatura ambiente
- HCl concentrado (12 N): armazenar à temperatura ambiente

Preparação das soluções de trabalho

1. Solução 20X SSC (pH 7.0)

Reagentes	Quantidade adicionada	Concentração final
Sal SSC	66 g	20X
H2O desionizada (dH ₂ O)	250 ml	
TOTAL	250 ml	

2. Solução de protease

Reagentes	Quantidade adicionada	Concentração final
Protease, liofilizado	250 mg	4 mg/ml
Tampão de protease	62,5 ml	
TOTAL	62,5 ml	

3. 90% de etanol

Reagentes	Quantidade adicionada	Concentração final
Etanol (100%)	90 ml	90%
dH ₂ O	10 ml	
TOTAL	100 ml	

4. 70% de etanol

Reagentes	Quantidade adicionada	Concentração final
Etanol (100%)	70 ml	70%
dH ₂ O	30 ml	
TOTAL	100 ml	

5. Solução de lavagem de pós-hibridação (pH 7,0)

Reagentes	Quantidade adicionada	Concentração final
Solução 20X SSC	10 ml	2X
NP-40	300 µl	0,3%

dH ₂ O	90 ml
TOTAL	100 ml

Procedimento FISH para secções de tecido embebido em parafina

Pré-tratamento das lâminas

1. Mergulhe as lâminas em xileno à temperatura ambiente por 10 minutos. Repita duas vezes utilizando xileno fresco em cada uma das vezes.
2. Desidrate as lâminas em 100% de etanol à temperatura ambiente por 5 minutos. Repita uma vez com 100% de etanol fresco.
3. Deixe as lâminas secar ao ar por 2-5 minutos, se tal for pretendido.
4. Mergulhe as lâminas na solução de pré-tratamento preaquecida a 80 °C por 10 minutos.
5. Mergulhe as lâminas em água purificada à temperatura ambiente por 3 minutos.

Pré-tratamento de protease

1. Mergulhe as lâminas na solução de protease a 37 °C por 10-60 minutos (dependendo da condição das amostras) e monitorize a condição das células sob um microscópio com luz.
2. Mergulhe as lâminas em água purificada à temperatura ambiente por 3 minutos.
3. Deixe as lâminas secar ao ar por 2-5 minutos.

Desidratação das lâminas

1. Mergulhe as lâminas em 70% de etanol por 3 minutos.
2. Mergulhe as lâminas em 90% de etanol por 3 minutos.
3. Mergulhe as lâminas em 100% de etanol por 3 minutos.
4. Deixe as lâminas secar ao ar.

Preparação das sondas

1. Preequeça a sonda à temperatura ambiente por 20-30 minutos.
2. Centrifugue brevemente a sonda num vórtice.

Co-desnaturação e hibridação

1. Aplique 10 µl da sonda em cada área de hibridação e cubra-a com uma lamela de 22 mm x 22 mm. Sele a(s) lamela(s) com cola de borracha.
2. Co-desnature as lâminas com a sonda a 72 °C por 5 minutos.
3. Coloque as lâminas numa câmara de hibridação humidificada preaquecida e incube as lâminas a 37 °C de um dia para o outro (16 horas).

Lavagem pós-hibridação

1. Marque cada área de hibridação na parte de trás das lâminas com uma caneta diamantada.
2. Remova a cola de borracha cuidadosamente.
3. Mergulhe as lâminas na solução de lavagem pós-hibridação à temperatura ambiente para soltar as lamelas. Agite delicadamente para remover as lamelas; não as puxe.
4. Mergulhe as lâminas na solução de lavagem pós-hibridação preaquecida a 72 °C por 2 minutos.

Desidratação das lâminas

1. Mergulhe as lâminas em 70% de etanol por 2 minutos.
2. Mergulhe as lâminas em 90% de etanol por 2 minutos.
3. Mergulhe as lâminas em 100% de etanol por 2 minutos.
4. Deixe as lâminas secar ao ar no escuro.

Visualização

1. Aplique o corante de contraste DAPI e cubra as lâminas com as lamelas.
2. Examine as lâminas sob um microscópio de fluorescência com os filtros adequados.

Procedimento FISH para espécimes citológicos

Reagentes necessários mas não fornecidos

- Kit de reagentes FISH (N.º Cat: CT-ACC101-20):
 - Sal 20X SSC: armazenar à temperatura ambiente, evitar a humidade

- Corante de contraste DAPI: armazenar a 4 °C no escuro
- NP-40: armazenar à temperatura ambiente
- Pepsina (liofilizada): armazenar a -20 °C ou menos
- Ácido clorídrico (1 N): armazenar à temperatura ambiente
- Formaldeído (37%): armazenar à temperatura ambiente
- Solução de tampão fosfato-salino 10X (Phosphate-buffered Saline, PBS): armazenar à temperatura ambiente
- Etanol (100%): armazenar à temperatura ambiente

Preparação das soluções de trabalho

1. Solução 20X SSC (pH 7.0)

Reagentes	Quantidade adicionada	Concentração final
Sal SSC	66 g	20X
dH ₂ O	250 ml	
TOTAL	250 ml	

2. Solução padrão de pepsina

Reagentes	Quantidade adicionada	Concentração final
Pepsina, liofilizada	100 mg	100 mg/ml
dH ₂ O	1 ml	
TOTAL	1 ml	

Nota: manter em gelo. Fazer alíquotas de 20 µl, armazenar a -20 °C.

3. Solução de trabalho de pepsina

Reagentes	Quantidade adicionada	Concentração final
HCl (1 N)	1 ml	0,01 N
Solução padrão de pepsina	20 µl	0,02 µg/µl
dH ₂ O	99 ml	
TOTAL	100 ml	

4. Solução 2X SSC

Reagentes	Quantidade adicionada	Concentração final
Solução 20X SSC	10 ml	2X
dH ₂ O	90 ml	
TOTAL	100 ml	

5. Solução 1X PBS

Reagentes	Quantidade adicionada	Concentração final
Solução 10X PBS	10 ml	1X
dH ₂ O	90 ml	
TOTAL	100 ml	

6. Solução de formaldeído

Reagentes	Quantidade adicionada	Concentração final
Formaldeído (37%)	2,7 ml	1%
Solução 10X PBS	10 ml	1X
dH ₂ O	89 ml	
TOTAL	100 ml	

Reagentes	Quantidade adicionada	Concentração final
Etanol (100%)	70 ml	70%
H ₂ O	30 ml	
TOTAL	100 ml	

7. Solução de lavagem pós-hibridação 1

Reagentes	Reagentes	Quantidade adicionada	Quantidade adicionada	Concentração final
Solução 20X SSC	Etanol (100%)	2 ml	90 ml	90%
JP-40	dH ₂ O	300 µl	10 ml	
H ₂ O	TOTAL	98 ml	100 ml	
TOTAL	8. 70% de etanol	100 ml		

9. Solução de lavagem pós-hibridação 2

Reagentes	Quantidade adicionada	Concentração final
Solução 20X SSC	10 ml	2X
JP-40	100 µl	0,1%
H ₂ O	90 ml	
TOTAL	100 ml	

10.

Procedimento FISH para citologia

Preparação das lâminas

1. Equilibre as lâminas numa solução 2X SSC à temperatura ambiente por 2 minutos.
2. Mergulhe as lâminas na solução de trabalho de pepsina preaquecida a 37 °C por 1-10 minutos (dependendo da condição das amostras) e monitorize a condição das células sob um microscópio com luz.
3. Lave as lâminas numa solução 1X PBS à temperatura ambiente por 5 minutos.
4. Prefixe as lâminas numa solução de formaldeído à temperatura ambiente por 5 minutos.
5. Lave as lâminas numa solução 1X PBS à temperatura ambiente por 5 minutos.

Desidratação das lâminas

1. Mergulhe as lâminas em 70% de etanol por 3 minutos.
2. Mergulhe as lâminas em 90% de etanol por 3 minutos.
3. Mergulhe as lâminas em 100% de etanol por 3 minutos.
4. Deixe as lâminas secar ao ar.

Preparação das sondas

1. Preequeça as sondas à temperatura ambiente por 20-30 minutos.
2. Centrifugue brevemente as sondas num vórtice.

Co-deasnaturação e hibridação

1. Aplique 10 µl da sonda em cada área de hibridação e cubra-a com uma lamela de 22 mm x 22 mm. Sele a(s) lamela(s) com cola de borracha.

2. Co-desnature as lâminas com a sonda a 72 °C por 2 minutos.
3. Coloque as lâminas numa câmara de hibridação humidificada preaquecida e incube as lâminas a 37 °C de um dia para o outro (16 horas).

Lavagem pós-hibridação

1. Marque a área de hibridação na parte de trás das lâminas com uma caneta diamantada.
2. Remova a cola de borracha cuidadosamente.
3. Mergulhe a lâmina numa solução 2X SSC à temperatura ambiente para soltar a(s) lamela(s). Não puxe a(s) lamela(s).
4. Mergulhe as lâminas na solução de lavagem pós-hibridação preaquecida 1 a 72 °C por 1 minuto.
5. Mergulhe as lâminas na solução de lavagem pós-hibridação 2 à temperatura ambiente por 2 minutos.
6. Deixe as lâminas secar ao ar.

Visualização

1. Aplique o corante de contraste DAPI, cubra com a(s) lamela(s).
2. Examine as lâminas sob um microscópio de fluorescência com os filtros adequados.

Procedimento FISH para espécimes de líquido amniótico

Reagentes necessários mas não fornecidos

- Kit de reagentes FISH:
 - Sal 20X SSC: armazenar à temperatura ambiente, evitar a humidade
 - Corante de contraste DAPI: armazenar a 4 °C no escuro
 - NP-40: armazenar à temperatura ambiente
- Pepsina (liofilizada): armazenar a -20 °C ou menos
- Ácido clorídrico (1 N): armazenar à temperatura ambiente
- Formaldeído (37%): armazenar à temperatura ambiente
- Solução 10X PBS: armazenar à temperatura ambiente
- Etanol (100%): armazenar à temperatura ambiente

Preparação das soluções de trabalho

1. Solução 20X SSC (pH 7.0)

Reagentes	Quantidade adicionada	Concentração final
Sal SSC	66 g	20X
dH ₂ O	250 ml	
TOTAL	250 ml	

2. Solução padrão de pepsina

Reagentes	Quantidade adicionada	Concentração final
Pepsina, liofilizada	100 mg	100 mg/ml
dH ₂ O	1 ml	
TOTAL	1 ml	

Nota: manter em gelo. Fazer alíquotas de 20 µl, armazenar a -20 °C.

3. Solução de trabalho de pepsina 1 (para espécimes não cultivados)

Reagentes	Quantidade adicionada	Concentração final
HCl (1 N)	1 ml	0,01 N
Solução padrão de pepsina	50 µl	0,05 µg/µl
dH ₂ O	99 ml	
TOTAL	100 ml	

4. Solução de trabalho de pepsina 2 (para espécimes cultivados)

Reagentes	Quantidade adicionada	Concentração final
-----------	-----------------------	--------------------

HCl (1 N)	1 ml	0,01 N
Solução padrão de pepsina	20 µl	0,02 µg/µl
dH ₂ O	99 ml	
TOTAL	100 ml	

5. Solução 2X SSC

Reagentes	Quantidade adicionada	Concentração final
Solução 20X SSC	10 ml	2X
dH ₂ O	90 ml	
TOTAL	100 ml	

6. Solução 1X PBS

Reagentes	Quantidade adicionada	Concentração final
Solução 10X PBS	10 ml	1X
dH ₂ O	90 ml	
TOTAL	100 ml	

7. Solução de formaldeído

Reagentes	Quantidade adicionada	Concentração final
Formaldeído (37%)	2,7 ml	1%
Solução 10X PBS	10 ml	1X
dH ₂ O	89 ml	
TOTAL	100 ml	

8. 90% de etanol

Reagentes	Quantidade adicionada	Concentração final
Etanol (100%)	90 ml	90%
dH ₂ O	10 ml	
TOTAL	100 ml	

9. 70% de etanol

Reagentes	Quantidade adicionada	Concentração final
Etanol (100%)	70 ml	70%
dH ₂ O	30 ml	
TOTAL	100 ml	

10. Solução de lavagem pós-hibridação 1

Reagentes	Quantidade adicionada	Concentração final
Solução 20X SSC	2 ml	0,4X
NP-40	300 µl	0.3%
dH ₂ O	98 ml	
TOTAL	100 ml	

11. Solução de lavagem pós-hibridação 2

Reagentes	Quantidade adicionada	Concentração final
Solução 20X SSC	10 ml	2X

NP-40	100 µl	0.1%
dH ₂ O	90 ml	
TOTAL	100 ml	

Procedimento FISH para amnióticos

Preparação das lâminas

Espécimes não cultivados:

1. Equilibre as lâminas na solução 2X SSC a 37 °C por 1 hora.
2. Mergulhe as lâminas na solução de trabalho de pepsina preaquecida 1 a 37 °C por 1-10 minutos (dependendo da condição das amostras) e monitorize a condição das células sob um microscópio com luz.
3. Lave as lâminas numa solução 1X PBS à temperatura ambiente por 5 minutos.
4. Prefixe as lâminas numa solução de formaldeído à temperatura ambiente por 5 minutos.
5. Lave as lâminas numa solução 1X PBS à temperatura ambiente por 5 minutos.

Espécimes cultivados:

1. Equilibre as lâminas numa solução 2X SSC à temperatura ambiente por 2 minutos.
2. Mergulhe as lâminas na solução de trabalho de pepsina preaquecida 1 a 37 °C por 2-10 minutos (dependendo da condição das amostras) e monitorize a condição das células sob um microscópio com luz.
3. Lave as lâminas numa solução 1X PBS à temperatura ambiente por 5 minutos.
4. Prefixe as lâminas numa solução de formaldeído à temperatura ambiente por 5 minutos.
5. Lave as lâminas numa solução 1X PBS à temperatura ambiente por 5 minutos.

Desidratação das lâminas

1. Mergulhe as lâminas em 70% de etanol por 3 minutos.
2. Mergulhe as lâminas em 90% de etanol por 3 minutos.
3. Mergulhe as lâminas em 100% de etanol por 3 minutos.
4. Deixe as lâminas secar ao ar.

Preparação das sondas

1. Preequeça as sondas à temperatura ambiente por 20-30 minutos.
2. Centrifugue brevemente as sondas num vórtice.

Co-desnaturação e hibridação

1. Aplique 10 µl da sonda em cada área de hibridação e cubra-a com uma lamela de 22 mm x 22 mm. Sele a(s) lamela(s) com cola de borracha.
2. Co-desnature as lâminas com a sonda a 72 °C por 2 minutos.
3. Coloque as lâminas numa câmara de hibridação humidificada preaquecida e incube as lâminas a 37 °C de um dia para o outro (16 horas).

Lavagem pós-hibridação

1. Marque as áreas de hibridação na parte de trás das lâminas com uma caneta diamantada.
2. Remova a cola de borracha cuidadosamente.
3. Mergulhe a lâmina numa solução 2X SSC à temperatura ambiente para soltar a(s) lamela(s). Não puxe a(s) lamela(s).
4. Mergulhe as lâminas na solução de lavagem pós-hibridação preaquecida 1 a 72 °C por 1 minuto.
5. Mergulhe as lâminas na solução de lavagem pós-hibridação 2 à temperatura ambiente por 2 minutos.
6. Deixe as lâminas secar ao ar.

Visualização

1. Aplique o corante de contraste DAPI, cubra com a(s) lamela(s).
2. Examine as lâminas sob um microscópio de fluorescência com os filtros adequados.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Padrões assinalantes para sondas de amplificação/eliminação

Padrões normais

- 2 sinais laranja + 2 sinais verdes (2O2G)



Chave de cores

- Sinais laranja representados por pontos cinza escuro
- Sinais verdes representados por pontos cinza claro

Padrões anormais

- Quaisquer outros padrões

Padrões assinalantes para sondas de divisão

Padrões normais

- 2 sinais laranja/verdes sobrepostos (2OG)



Chave de cores

- Sinais laranja representados por pontos cinza escuro
- Sinais verdes representados por pontos cinza claro
- Os sinais de cor laranja e verde sobrepostos podem surgir a amarelo.

Padrões anormais

- Quaisquer outros padrões

Padrões assinalantes para sondas de fusão/translocação

Padrões normais

- 2 sinais laranja + 2 sinais verdes (2O2G)



Chave de cores

- Sinais laranja representados por pontos cinza escuro
- Sinais verdes representados por pontos cinza claro

Padrões anormais

- Quaisquer outros padrões. Os sinais fundidos (sobreposição de sinais de cor laranja e verde) podem surgir como sinais amarelos

BIBLIOGRAFIA

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).

Fabricante



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

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

Mandatário da CE



Obelis S.A.
Bd. General Wahis 53
1030 Brussels
Bélgica

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

Copyright © 2015 CytoTest, Inc.
Todos os direitos reservados.
www.cytotest.com