

Risoluzione Problemi

Problemi	Causa Potenziale	Soluzione Raccomandata
Non sono presenti segnali FISH visibili al microscopio.	- Otturatore luce riflessa chiuso/ slitta presente sul percorso luminoso. - La lampada a fluorescenza è spenta. - Filtro selezionato non corretto. - Obbiettivo fuori posizione. - Il fototubo è in posizione camera.	- Aprire l'otturatore/ spostare la slitta dal percorso luminoso. - Accendere la lampada a fluorescenza. - Posizionare il filtro corretto sul percorso luminoso. - Spostare l'obbiettivo nella posizione corretta. - Posizionare il percorso luminoso per gli oculari.
I segnali di ibridizzazione si attenuano in poco tempo.	Olio da immersione presente tra vetrino e copri-oggetto.	Cambiare il copri-oggetto e rimettere il DAPI/Antifade. Usare un copri-oggetto 24x32 mm² anche se è stata ibridizzata una piccola regione.
Segnali diffusi.	- Il preparato non è adeguatamente illuminato. - Il piano focale non può essere adeguatamente regolato. - Lo strato di Antifade è troppo spesso per la messa a fuoco.	- Controllare il percorso ottico del microscopio. Regolare l'illuminazione UV. Controllare il tempo di utilizzo della lampada UV. - Utilizzare il corretto volume di olio da immersione. Utilizzare un olio da immersione adeguato per la fluorescenza. - Non usare eccessive quantità di DAPI/Antifade. 10µl per vetrino sono sufficienti (con coprioggetto. 24 x 32 mm²).
Segnali deboli.	- Campione troppo vecchio. - La denaturazione dei cromosomi non è adeguata. - Si sta utilizzando un filtro multibanda.	- I campioni non dovrebbero essere più vecchi di due settimane. - L'invecchiamento, l'essiccamento in stufa o eccessiva fissazione possono inibire l'ibridizzazione e non sono raccomandati; - si raccomanda di aumentare la T di denaturazione fino a 80 °C. - Utilizzare un filtro a singola banda.
Segnali Aqua o Green deboli o fondo diffuso nel canale del Green.	- L'intensità del DAPI è troppo elevata e causa <i>cross-talk</i> con l'AQUA o il GREEN. - pH delle soluzioni di lavaggio troppo basso.	- Utilizzare DAPI/Antifade a concentrazioni minori. - Assicurarsi che il valore di pH sia compreso tra 7.0 - 7.5. Alcuni fluorofori green sono molto sensibili a valori di pH inferiori a 7.
Elevato fondo aspecifico.	Le proteine citoplasmatiche residue possono influire negativamente sull'ibridizzazione.	Pre-trattare i vetrini con la Pepsina.
Se le raccomandazioni elencate non risolvono il problema, oppure il problema non è indicato, si prega di contattare MetaSystems Italia.		

Assistenza Clienti

Si prega di contattare MetaSystems s.r.l. a socio unico (i contatti sono indicati di seguito).
MetaSystems Probes, in qualità di produttore, non riconosce alcun interesse proprietario nei marchi e nei nomi di terze parti.

MetaSystems s.r.l. a socio unico
Via Gallarate, 80
20151 Milano
Italia
Tel.: +39 0245375300
Fax: +39 0245375303
e-mail: customer_care@metasystems-italy.com
URL: www.metasystems-probes.com/it

Simboli Usati

Simbolo	Descrizione		
	Questo prodotto è conforme ai requisiti della direttiva 98/79 CE sui dispositivi medico-diagnostici in vitro.		Tutti i pericoli sono contrassegnati da un triangolo di avvertimento con un punto esclamativo. A seconda del carattere, possono essere integrati con le parole ATTENZIONE o CAUTELA.
	Per uso diagnostico in vitro.		
	Produttore		N. di Riferimento
	N. di test		N. di Lotto
	Data di scadenza		Limiti di intervallo della temperatura di conservazione; sono indicati il limite inferiore e superiore.

MetaSystems Probes GmbH
1, Industriest. 7, 68804 Altlussheim,
Germany, Tel.: +49 (0)6205 292760



FORMAMIDE
Danger. May damage the unborn child. Suspected of causing cancer. May cause damage to organs through prolonged/repeated exposure. Obtain special instructions before use. Do not breathe vapours. Wear protective gloves/protective clothing. IF exposed or concerned: Get medical advice.

Gefahr. Kann das Kind im Mutterleib schädigen. Kann vermutlich Krebs erzeugen. Kann die Organe schädigen bei längerer/wiederholter Exposition. Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen. Dampf nicht einatmen. Schutzhandschuhe/Schutzkleidung tragen. Bei Exposition oder Verdacht: Ärztlichen Rat einholen.

Pericolo. Può danneggiare il feto. Può provocare il cancro. Può provocare danni agli organi in caso di esposizione prolungata/ ripetuta. Seguire istruzioni speciali prima dell'uso. Non respirarne i vapori. Indossare guanti/indumenti protettivi. IN CASO di esposizione o sospetto: consultare un medico.

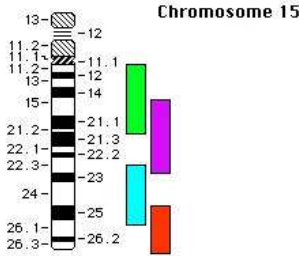
Human mBAND Probes

Per Utilizzo Professionale
Ulteriori informazioni sono disponibili su www.metasystems-probes.com

Prodotto	Marcatura	Codice prodotto	Confezione
XCyte 15	multicolor	D-0215-030-DI	30µl

Miscela di sonde per regioni specifiche ed in parziale reciproca sovrapposizione del Cromosoma 15, marcate con differenti fluorocromi. Gli spettri di emissione/eccitazione sono compatibili con i più comuni fluorocromi aqua, green, orange e red vicino.

Schema della sonda:



Materiali Forniti

30µl di XCyte 15, la sonda è disciolta in una soluzione di ibridizzazione pronta all'uso.

Destinazione d'Uso

Le sonde FISH a DNA sono progettate per l'analisi delle aberrazioni cromosomiche su cellule fissate prelevate da campioni umani attraverso la metodica dell'ibridizzazione in situ fluorescente (fluorescence in-situ hybridization o FISH) utile negli studi di Citogenetica. L'ibridizzazione di nuclei interfascici e/o di metafasi con sonde FISH consente l'analisi della struttura dei cromosomi o della variazione del loro numero di copie, allo scopo di individuare alterazioni genetiche acquisite, definite come dalla Nomenclatura Internazionale sui Dispositivi Medici CT929 (Global Medical Device Nomenclature - GMDN). L'analisi FISH è impiegata a supporto di altre metodiche diagnostiche e non deve essere l'unica fonte informativa per decisioni terapeutiche o diagnostiche.

Istruzioni di sicurezza

Tutte le sonde prodotte da MetaSystems Probes sono esclusivamente per uso professionale e devono essere usate solo da personale qualificato e opportunamente addestrato. Per garantire la sicurezza operativa e risultati riproducibili, si prega di osservare gli avvisi di sicurezza e i segnali di cautela descritti di seguito.

	CAUTELA: La formammide è tossica ed è un potenziale agente teratogeno! Le sonde MetaSystems contengono formammide. La formammide è tossica e teratogena. Può causare danni al feto. Non inalare i vapori; evitare che entri in contatto con la pelle! Indossare guanti e camice da laboratorio. In caso di contatto con pelle oppure occhi, lavare immediatamente con acqua.
	CAUTELA: Bagno ad acqua calda e piastre riscaldanti! Per la denaturazione e l'ibridizzazione vengono utilizzati bagni ad acqua calda e piastre riscaldanti a temperature >37°C. Prestare attenzione a non entrare in contatto diretto con superfici o liquidi caldi. Indossare guanti e camice da laboratorio. In caso di contatto con pelle, lavare immediatamente con acqua fredda.
	ATTENZIONE: <i>Pratiche di Laboratorio!</i> Utilizzare seguendo i comuni principi delle buone pratiche di Laboratorio o, se ne siete in possesso, delle linee guida GLP (<i>Good Laboratory Practice</i>).
	ATTENZIONE: Indicazioni per lo smaltimento! Tutti i materiali pericolosi devono essere smaltiti in accordo con la regolamentazione locale/ nazionale in materia di smaltimento dei rifiuti pericolosi.

Conservazione e Gestione

Le sonde devono essere conservate al buio a -20°C (±5°C). Le prestazioni della sonda sono risultate inalterate per un massimo di 20 cicli di congelamento/ scongelamento.

Spedizione

Le sonde MetaSystems a DNA vengono spedite a temperatura ambiente.

Strumentazione necessaria ma non fornita

- Bagno termostato con controllo accurato della temperatura - Micropipette calibrate con volumi variabili, compresi tra 1 µl e 1 ml - Termometro	- Piastra riscaldante a 75°C (±1°C), a piastra solida e controllo accurato della temperatura fino a 80°C <i>Freezer</i> a -20°C (±5°C) - Camera umida a 37°C (±1°C)	- Microscopio a fluorescenza con filtri adeguati (vedere di seguito) - Olio ad immersione per fluorescenza, raccomandato dal produttore del microscopio - Adeguate sistema di Analisi d'Immagine, es. MetaSystems Isis - Copri-oggetto (vetro): 22 x 22 mm² e 24 x 32 mm² - Collante per vetrini - DAPI/Antifade
pH-metro calibrato	Pinzette	
- Timer - Portavetrini Coplin (in vetro o plastica)	- Guanti - Microcentrifuga	

Raccomandazioni per il Microscopio a Fluorescenza

- Illuminazione a fluorescenza: sistema di illuminazione ad alogenuri metallici oppure illuminatori a mercurio da 100 watt.
- Obbiettivi dedicati all'illuminazione in epi-fluorescenza.

Raccomandazioni per i Filtri a Fluorescenza

Si raccomanda l'impiego di filtri a singola banda a banda stretta con tutte le sonde multicolore, al fine di minimizzare (od evitare) effetti di *cross-talk* tra i fluorocromi. MetaSystems raccomanda i seguenti set di filtri:

Filtro	Codice Prodotto	Filtro	Codice Prodotto
- MetaSystems DAPI - MetaSystems AQUA - MetaSystems GREEN	- C-3010-001-MS - C-3010-004-MS - C-3010-002-MS	- MetaSystems ORANGE - MetaSystems RED - MetaSystems FAR RED	- C-3010-003-MS - C-3010-010-MS - C-3010-006-MS

I sei filtri per mFISH raccomandati sono disponibili anche come unico set (C-3000-007-CR).

Raccomandazioni per il Sistema di Analisi d'Immagine

MetaSystems raccomanda il software Isis. Per le sonde da mFISH/mBAND sono richiesti i moduli di *upgrade* per la cariotipizzazione a colori e per l'analisi mFISH/mBAND.

Referenze

Le procedure di denaturazione sono state adattate (modificate) da: Fritz et al, Hum Genet (1998)103:441-449; Rieder et al, Leukemia (1998)9:1473-1481).

Preparazione del Campione

Commenti Generali

- Le sonde MetaSystems sono disegnate per essere utilizzate su campioni di citogenetica fissati in metanolo/acido acetico 3:1 e devono essere preparate in accordo con le linee guida del laboratorio o dell'Ente di appartenenza.
- Preparate i campioni seguendo le procedure standard di citogenetica.

Stabilità dei Vetrini Ibridizzati

- I vetrini FISH ibridizzati possono essere analizzati per almeno due settimane se conservati al buio a -20°C (±5°C).

Raccomandazioni Aggiuntive per la Procedura

- Vi raccomandiamo vivamente l'impiego di un termometro calibrato per la misurazione della temperatura delle soluzioni, del bagnomaria e degli incubatori, in quanto le corrette temperature sono fattori critici per ottenere risultati ottimali.
- Controllate attentamente la temperatura delle soluzioni preriscaldate.
- Controllate attentamente il pH delle soluzioni.
- La concentrazione delle soluzioni di lavaggio (stringenza), il pH e la temperatura sono parametri importanti, poiché una bassa stringenza può risultare in un legame aspecifico della sonda, mentre un'elevata stringenza può causare la perdita dei segnali.
- Prima dell'apertura:** Centrifugate brevemente per raccogliere la sonda sul fondo della provetta.

Denaturazione del vetrino

Soluzioni necessarie:

- SSC 0.1X, pH 7.0 - 7.5 (vi occorrerà una soluzione a temperatura ambiente e una a 4°C)
- SSC 2X, pH 7,0 - 7.5 (vi occorrerà una soluzione a 70°C e una a 4°C)
- NaOH 0.07mol/l, a temperatura ambiente
- Serie degli Etanoli: 100%, 95%, 70%, a temperatura ambiente

Procedura:

- Mettete una vaschetta Coplin con SSC 0.1X e una con SSC 2X in frigorifero.
- Preriscaldate una Coplin con SSC 2X a 70°C (±1°C) in un bagno termostato.
- Immergete il vetrino nell'SSC 2X a 70°C (±1°C) ed incubate per **30min**.
- Rimuovete la Coplin dal bagno termostato e lasciatela raffreddare a temperatura ambiente per circa **20min**.
- Trasferite il vetrino nell'SSC 0.1X a temperatura ambiente per **1min**.
- Denaturate il vetrino con NaOH 0.07 N a temperatura ambiente per **1 min**.
- Immergete il vetrino nell'SSC 0.1X a 4°C per **1min**.
- Immergete il vetrino nell'SSC 2X a 4°C per **1min**.
- Trasferite il vetrino in una Coplin con Etanolo 70% per **1 min**.
- Successivamente, trasferite il vetrino in una Coplin con Etanolo 95% e poi in una con Etanolo 100%, incubando in ciascuna per **1 min**.
- Lasciate che il vetrino asciughi all'aria.

Denaturazione e Ibridazione della Sonda

Procedura:

- Preparate la quantità di sonda adatta alla superficie di ibridizzazione: 7µl per copri-oggetto 18x18 mm², 10µl per copri-oggetto 22x22 mm² o 12µl per copri-oggetto 24x24 mm².
- Denaturate la sonda incubandola a 75°C (±1°C) per **5 min**.
- Mettete la sonda brevemente in ghiaccio.
- Incubate a 37°C (±1°C) per **30 min**.
- Centrifugate brevemente per far precipitare la sonda.
- Pipettate la sonda già denaturata sul vetrino recante il preparato cromosomico anch'esso già denaturato.
- Coprite con un vetrino copri-oggetto e sigillate con collante per vetrini (es. rubber cement).
- Incubate **1 – 2 giorni** in camera umidificata a 37°C (±1°C).

Lavaggi Post-Ibridizzazione

Soluzioni necessarie:

- SSC 0.4X, pH 7.0 - 7.5, 72°C (±1°C)
- SSCT 2X (SSC 2X, pH 7.0 - 7.5 con 0.05% Tween20), a temperatura ambiente

Procedura:

- Rimuovete con cura il collante e il vetrino copri-oggetto.
- Immergete il vetrino nell'SSC 0.4X pre-riscaldato (72 °C, ±1°C) per **2min**.
- Incubate il vetrino in SSCT 2X per **1/2 min**.

Controcolorazione

Soluzioni necessarie:

- Il DAPI/Antifade di MetaSystems (cod. D-0902-500-DA) oppure altro DAPI/antifade (250ng/ml)

Procedura:

- Lavate rapidamente con acqua bidistillata per evitare la formazione di cristalli e lasciate asciugare all'aria.
- Applicate 20µl di DAPI/Antifade e coprite con un vetrino copri-oggetto 24x60 mm².
- Lasciate che la miscela DAPI/Antifade penetri nel campione per **10 min**. Adesso potete procedere con l'analisi al microscopio o conservare il vetrino a -20°C (±5°C).

Risultati Attesi:

Quando ibridizzata su piastre metafasiche umane normali consente di visualizzare segnali lungo l'intera lunghezza dei due cromosomi ripetitivamente omologhi. Cromosomi della stessa classe o loro frammenti mostrano la medesima marcatura o combinazione. I segnali sono, invece, assenti o molto deboli in corrispondenza delle porzioni eterocromatiche. Le singole classi cromosomiche possono essere distinte dalla loro combinazione di colori unica ed univoca (vedi lo schema di marcatura). Le traslocazioni producono cromosomi che sono composti da frammenti con differenti combinazioni di colori. Raccomandiamo vivamente di utilizzare un sistema di analisi d'immagine appropriato (MetaSystems Isis/mFISH/mBAND) a supporto dell'analisi.