

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 copriogetto. 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.

Revision: IT-General-RevA200129-200218

MetaSystems Probes GmbH
1. Industriest. 7, 68804 Altussheim,
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.

XCP X green
Whole Chromosome Paint
50µl (5)

D-0323-050-FI

-25°C -15°C

XCyting Chromosome Paints

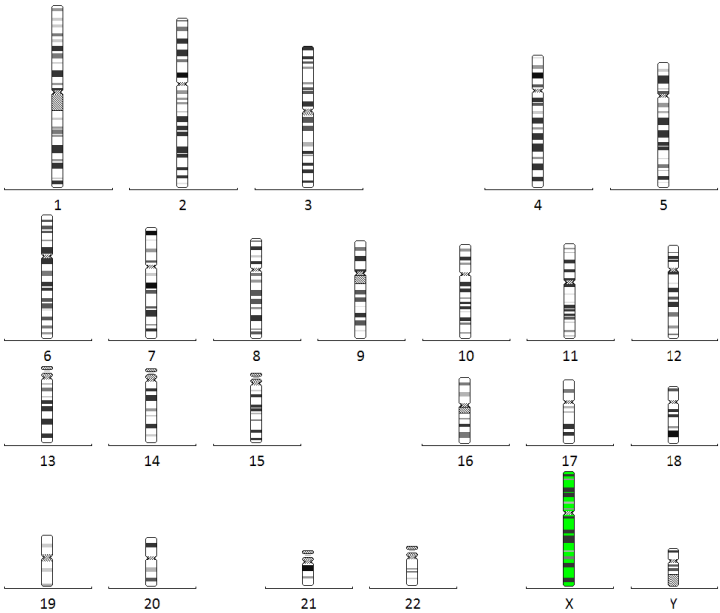
Per Utilizzo Professionale

Ulteriori informazioni sono disponibili su www.metasystems-probes.com

Prodotto	Marcatura	Codice prodotto	Confezione
XCP X green	green	D-0323-050-FI	50µl

Sonda XCyting Chromosome Paint (XCP) specifica per il Cromosoma X marcata con un fluorocromo che emette nella lunghezza d'onda del verde. Si potrebbe osservare cross-ibridizzazione con la regione pseudo-autosomica in Yp11.3. Si possono mescolare tra loro fino a quattro sonde XCP, ottenendo, così, segnali affidabili e di intensità leggermente ridotta rispetto alla singola applicazione.

Schema della sonda:



Materiali Forniti

50µl di XCP X green, 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.

	CAUTELE: 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.
	CAUTELE: 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	- Piastra riscaldante a 75°C (±1°C), a piastra solida e controllo accurato della temperatura fino a 80°C - Freezer a -20°C (±5°C)	Microscopio a fluorescenza con filtri adeguati (vedere di seguito)
- Micropipette calibrate con volumi variabili, compresi tra 1 µl e 1 ml - Termometro	Camera umida a 37°C (±1°C)	- 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.
- Filtri per fluorescenza: per la visualizzazione/ conteggio dei segnali, utilizzate un filtro MetaSystems a tripla banda o a quattro bande, oppure un filtro a singola banda a banda stretta. Per l'acquisizione delle immagini utilizzate, invece, filtri a singola banda a banda stretta specifici per i rispettivi fluorocromi. Non esitate a chiedere informazioni.

Specifiche dei fluorocromi

Marcatura	Assorbanza massima	Emissione massima
Aqua	426 nm	480 nm
Green	505 nm	530 nm
Orange	552 nm	576 nm

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 6 mesi 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.

Protocollo FISH per Sonde a DNA MetaSystems

Preparazione del vetrino

- Posizionate la goccia di campione cellulare su un vetrino da microscopia pulito. Lasciatelo asciugare all'aria. Se non dovete usarlo lo stesso giorno, conservate il vetrino a -20°C (±5°C).
- Applicate 10 µl di sonda Per mescolare due sonde XCP, si possono usare 5µl di ciascuna sonda di interesse e mescolare bene. Per ottenere una miscela a tre colori si possono usare 2.5µl di una prima XCP in green, 2.5µl di una seconda XCP in orange, 2.5µl each di una terza XCP in green e orange per ciascuna reazione, miscelando bene. Così si ottiene che, dopo la cattura o alla visione con un filtro a tripla banda, si osserveranno un cromosoma verde, uno arancio ed uno giallo.
- Coprite con un copri-oggetto 22 x 22 mm².
- Sigillate con collante per vetrini (es. rubber cement).

Denaturazione

- Co-denaturate campione e sonda utilizzando una piastra riscaldante a 75°C (±1°C) **per 2 min.**

Ibridizzazione

- Incubate il vetrino in camera umidificata a 37°C (±1°C) *overnight*.

Lavaggi Post-Ibridizzazione

Soluzioni necessarie

- SSC 0.4X (pH 7.0 – 7.5) a 72°C (±1°C)
- SSC 2X, 0.05% Tween-20 (pH 7.0) a temperatura ambiente

Procedura

- Rimuovete con cura il copri-oggetto e tutte le tracce di collante.
- Lavate il vetrino in SSC 0.4X (pH 7.0) a 72°C (±1°C) **per 2 min.**
- Sgocciolate il vetrino e lavatelo in SSC 2X, 0.05% Tween-20 (pH 7.0) a temperatura ambiente **per 30 secondi**.
- Risciacquate rapidamente in acqua distillata per evitare la formazione di cristalli e lasciatelo asciugare all'aria.

Controcolorazione

Soluzioni necessarie:

- DAPI/antifade (es. il DAPI/Antifade MetaSystems ha codice D-0902-500-DA)

Procedura:

- Applicate 10 µl di DAPI/Antifade e coprite con un copri-oggetto 24 x 32 mm².
- Consentite al DAPI/Antifade di penetrare nel vostro campione **per 10 min.**
- Procedete con l'analisi al microscopio.
- Conservate il vetrino a –20°C (±5°C). I segnali di ibridizzazione permangono stabili per almeno sei mesi.

Risultati Attesi

XCP X green ibridizzata su piastre metafasiche femminili umane normali consente di visualizzare segnali lungo l'intera lunghezza dei due cromosomi X omologhi. Ibridizzata su piastre metafasiche maschili normali consente di visualizzare un solo cromosoma X marcato per intero. Aberrazioni cromosomiche, quali delezioni e duplicazioni, vengono analizzate comparando la lunghezza dei cromosomi che mostrano rispettivamente i segnali di marcatura. Si potrebbe osservare un fenomeno di cross-ibridizzazione con la regione pseudo-autosomica in Yp11.3 (PAR1). I segnali sono assenti o molto deboli in corrispondenza delle porzioni eterocromatiche. XCP X mostra segnali addizionali sull'intero cromosoma 9, la cui intensità è pari a circa il 10%. Le traslocazioni che coinvolgono il cromosoma X producono, come risultato, segnali separati e cromosomi con regioni parzialmente non ibridizzate.