

## Risoluzione Problemi

Problemi	Causa Potenziale	Soluzione Raccomandata
Non sono presenti segnali FISH visibili al microscopio.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Otturatore luce riflessa chiuso/ slitta presente sul percorso luminoso.</li> <li>La lampada a fluorescenza è spenta.</li> <li>Filtro selezionato non corretto.</li> <li>Obiettivo fuori posizione.</li> <li>Il fototubo è in posizione camera.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Aprire l'otturatore/ spostare la slitta dal percorso luminoso.</li> <li>Accendere la lampada a fluorescenza.</li> <li>Posizionare il filtro corretto sul percorso luminoso.</li> <li>Spostare l'obiettivo nella posizione corretta.</li> <li>Posizionare il percorso luminoso per gli oculari.</li> </ul>
I segnali di ibridizzazione si attenuano in poco tempo.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Olio da immersione presente tra vetrino e copri-oggetto.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Cambiare il copri-oggetto e rimettere il DAPI/Antifade. Usare un copri-oggetto 24x32 mm<sup>2</sup> anche se è stata ibridizzata una piccola regione.</li> </ul>
Segnali diffusi.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Il preparato non è adeguatamente illuminato.</li> <li>Il piano focale non può essere adeguatamente regolato.</li> <li>Lo strato di Antifade è troppo spesso per la messa a fuoco.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Controllare il percorso ottico del microscopio. Regolare l'illuminazione UV. Controllare il tempo di utilizzo della lampada UV.</li> <li>Utilizzare il corretto volume di olio da immersione. Utilizzare un olio da immersione adeguato per la fluorescenza.</li> <li>Non usare eccessive quantità di DAPI/Antifade. 10µl per vetrino sono sufficienti (con coprioggetto. 24 x 32 mm<sup>2</sup>).</li> </ul>
Segnali deboli.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Campione troppo vecchio.</li> <li>La denaturazione dei cromosomi non è adeguata.</li> <li>Si sta utilizzando un filtro multibanda.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>I campioni non dovrebbero essere più vecchi di due settimane.</li> <li>L'invecchiamento, l'essiccamento in stufa o eccessiva fissazione possono inibire l'ibridizzazione e non sono raccomandati;</li> <li>si raccomanda di aumentare la T di denaturazione fino a 80 °C.</li> <li>Utilizzare un filtro a singola banda.</li> </ul>
Segnali Aqua o Green deboli o fondo diffuso nel canale del Green.	<ul style="list-style-type: none"> <li>L'intensità del DAPI è troppo elevata e causa <i>cross-talk</i> con l'AQUA o il GREEN.</li> <li>pH delle soluzioni di lavaggio troppo basso.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Utilizzare DAPI/Antifade a concentrazioni minori.</li> <li>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.</li> </ul>
Elevato fondo aspecifico.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Le proteine citoplasmatiche residue possono influire negativamente sull'ibridizzazione.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Pre-trattare i vetrini con la Pepsina.</li> </ul>

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.		N. di Riferimento
	Produttore		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 Altlußheim,  
Germany, Tel.: +49 (0)6205 292760

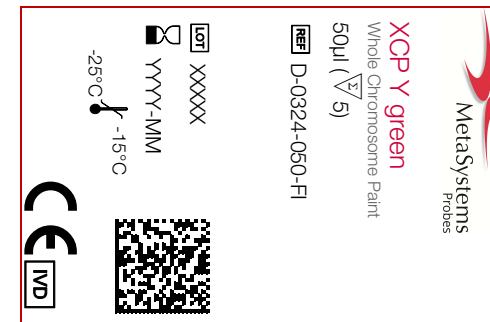


### FORMAMIDE

**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.



## XCyting Chromosome Paints

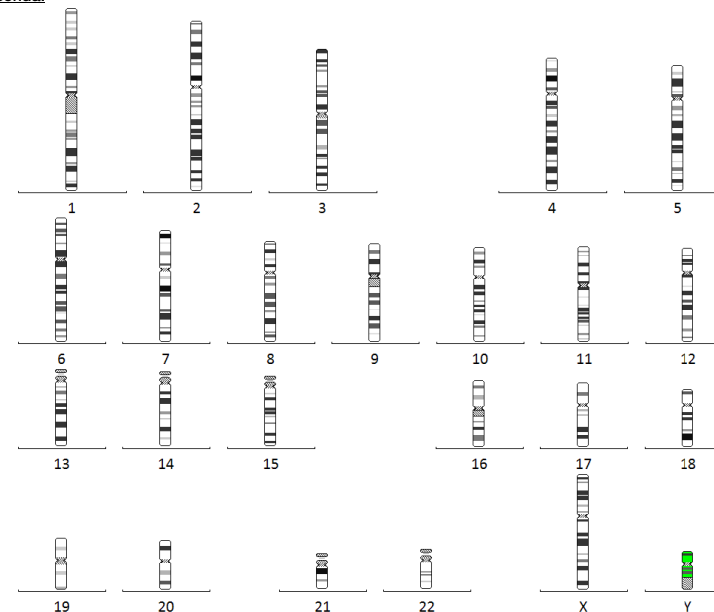
### Per Utilizzo Professionale

Ulteriori informazioni sono disponibili su [www.metasystems-probes.com](http://www.metasystems-probes.com)

Prodotto	Marcatura	Codice prodotto	Confezione
XCP Y green	green	D-0324-050-FI	50µl

Sonda XCyting Chromosome Paint (XCP) specifica per il Cromosoma Y marcata con un fluorocromo che emette nella lunghezza d'onda del verde. Si potrebbe osservare cross-ibridizzazione con la regione pseudo-autosomica in Xp22.3 e con la regione di omologia XY in Xq21.3. 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 Y 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.

	<b>CAUTELA: La formammide è tossica ed è un potenziale agente teratogeno</b> 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.
	<b>CAUTELA: Bagno ad acqua calda e piastre riscaldanti!</b> 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.
	<b>ATTENZIONE: <i>Pratiche di Laboratorio</i></b> 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> ).
	<b>ATTENZIONE: Indicazioni per lo smaltimento!</b> 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)
- Olio ad immersione per fluorescenza, raccomandato dal produttore del microscopio
- Adeguato 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
- Microscopio a fluorescenza con filtri adeguati (vedere di seguito)
- Camera umida a 37°C (±1°C)
- Pinzette
- Guanti
- Microcentrifuga
- Micropipette calibrate con volumi variabili, compresi tra 1 µl e 1 ml
- Termometro
- pH-metro calibrato
- Timer
- Portavetrini Coplin (in vetro o plastica)

## 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 specifico 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 Y green ibridizzata su piastre metafasiche maschili normali consente di visualizzare un solo cromosoma Y marcato per intero. I segnali sono, invece, assenti o molto deboli in corrispondenza delle porzioni eterocromatiche e centromeriche. Si può altresì osservare cross-ibridizzazione con le regioni pseudo-autosomiche in Xp22.3 e la regione di omologia XY (XY-HF) in Xq21.3. Le traslocazioni che coinvolgono il cromosoma Y producono, come risultato, segnali separati e cromosomi con regioni parzialmente non ibridizzate. Ibridizzata su metafasi femminili normali si possono osservare soltanto segnali di cross-ibridizzazione tra i due cromomi X in Xp22.3 e Xq21.3.