#### 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. Olio da immersione presente tra vetrino e	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. Cambiare il copri-oqqetto e rimettere il DAPI/Antifade.
attenuano in poco tempo.	copri-oggetto.	Usare un copri-oggetto 24x32 mm² anche se è stata ibridizzata una piccola regione.
Segnali diffusi.	Il preparato non è adeguatamente illuminato.	Controllare il percorso ottico del microscopio. Regolare l'illuminazione UV. Controllare il tempo di utilizzo della lampada UV.
	Il piano focale non può essere adeguatamente regolato.	Utilizzare il corretto volume di olio da immersione. Utilizzare un olio da immersione adeguato per la fluorescenza.
	Lo strato di Antifade è troppo spesso per la messa a fuoco.	Non usare eccessive quantità di DAPI/Antifade. 10µl per vetrino sono sufficienti (con coprioogetto. 24 x 32 mm²).
Segnali deboli.	Campione troppo vecchio.	I campioni non dovrebbero essere più vecchi di due settimane.
	La denaturazione dei cromosomi non è adeguata.	L'invecchiamento, l'essicamento 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.
	Si sta utilizzando un filtro multibanda.	Utilizzare un filtro a singola banda.
Segnali Aqua o Green deboli o fondo diffuso nel canale	L'intensità del DAPI è troppo elevata e causa cross-talk con l'AQUA o il GREEN.	Utilizzare DAPI/Antifade a concentrazioni minori.
del Green.	pH delle soluzioni di lavaggio troppo basso.	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	e non risolvono il problema, oppure il problema no	n 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				
CE	Questo prodotto è conforme ai requisiti della direttiva 98/79 CE sui dispositivi medico-diagnostici in vitro.	Λ	Tutti i pericoli sono contrassegnati da un triangolo di avvertimento con un punto esclamativo. A seconda del		
[VD]	Per uso diagnostico in vitro.	<u> </u>	carattere, possono essere integrati con le parole ATTENZIONE o CAUTELA.		
<b>—</b>	Produttore	REF	N. di Riferimento		
$\sum$	N. di test	<b>L</b> OТ	N. di Lotto		
8	Data di scadenza	<b>⋠</b>	Limiti di intervallo della temperatura di conservazione; sono indicati il limite inferiore e superiore.		

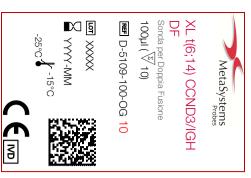
Revision: IT-General-RevA200129-240202v10.1

#### 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.

: Probes GmbH r. 7, 68804 Altlus I.: +49 (0)6205 2 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 quanti/ indumenti protettivi. IN CASO di esposizione o sospetto: consultare un



# **XCyting Locus-Specific Probes**

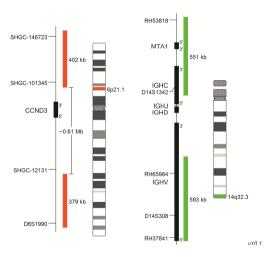
## Per Utilizzo Professionale

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

Prodotto	Marcatura	Codice prodotto	Confezione
XL t(6;14) CCND3/IGH DF	orange/green	D-5109-100-OG	100μΙ

La XL t(6;14) CCND3/IGH DF è disegnata come sonda dual fusion. La sonda marcata in arancio fiancheggia il punto di rottura nel locus 6p21 (CCND3); la sonda marcata in verde fiancheggia il punto di rottura sul locus14q32.

#### Schema della sonda:



Cromosoma 6 Cromosoma 14

#### Materiali Forniti

100µl di XL t(6:14) CCND3/IGH DF, 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 (fluorescente in-situ hybridization o FISH) utile negli studi di Citogenetica. L'ibridizzazione di nuclei interfasici 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 teraneutiche 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 seanali di cautela descritti di sequito.

<u>/</u>!\

#### 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 inalarne i vapori; evitare che entri in contatto con la pelle!

Indossare quanti 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 quanti e camice da laboratorio. In caso di contatto con pelle, lavare immediatamente con acqua fredda.



#### ATTENZIONE: Pratiche di Laboratoriol

Utilizzare seguendo i comuni principi delle buone pratiche di Laboratorio o, se ne siete in possesso, delle linee guida GLP (Good Laboratory Practice).



#### 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 termostatato con controllo accurato della temperatura
- Micropipette calibrate con volumi variabili, compresi tra 1 µl e 1 ml
- Termometro
- pH-metro calibrato
- Timer
- Portavetrini Coplin (in vetro o plastica)

- 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)
- Camera umida a 37°C (+1°C)
- Pinzette
- Guanti
- Microcentrifuga

- Microscopio a fluorescenza con filtri adeguati (vedere di seguito)
- Olio ad immersione per fluorescenza, raccomandato dal produttore del microscopio
- Adeguato sistema di Analisi d'Immagine, es. MetaSvstems Isis
- Copri-oggetto (vetro):
  - 22 x 22 mm<sup>2</sup> e 24 x 32 mm<sup>2</sup>
  - Collante per vetrini
  - DAPI/Antifade

## 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 chiede 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 Addizionali per le 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).
- 2. Applicate 10 ul di sonda
- 3. Coprite con un copri-oggetto 22 x 22 mm<sup>2</sup>.
- 4. Sigillate con collante per vetrini (es. rubber cement).

#### Denaturazione

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

#### Ibridizzazione

1. 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.
- 2. Lavate il vetrino in SSC 0.4X (pH 7.0) a 72°C (±1°C) per **2 min**.
- 3. Sgocciolate il vetrino e lavatelo in SSC 2X, 0.05% Tween-20 (pH 7.0) a temperatura ambiente per 30 secondi.
- 4. 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:

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

## Risultati Attesi

#### Cellula Normale:

Due segnali green (2G) e due segnali orange (2O).



Cellula Aberrante (risultato tipico): Un segnale green (1G), uno orange (1O) e due segnali orange-green (2GO) di colocalizzazione/fusione, derivanti da traslocazioni reciproche dei rispettivi loci.



Si potrebbe osservare una debolissima cross-ibridizzazione tra il 15q11.2 e il 16p11.2 per via della presenza degli pseudogeni IGH. Vengono mostrate solamente le combinazioni di segnali più frequenti; tuttavia potrebbero osservarsene di ulteriori, differenti da quelle visualizzate.