

## Sonda BCL2 Break Apart FISH, kit

Probe BCL2 Break Apart FISH, kit

Somente para uso em pesquisa (RUO)

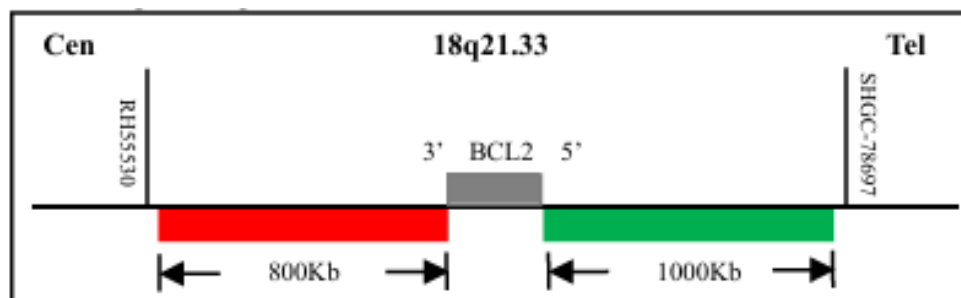
**Nome:** Sonda BCL2 Break Apart FISH, kit

### Especificações da embalagem

Referência	Descrição	Tamanho Kit
EP-13-10191	Sonda BCL2 Break Apart FISH, kit	5 Testes/Kit
EP-13-10192	Sonda BCL2 Break Apart FISH, kit	10 Testes/Kit
EP-13-10193	Sonda BCL2 Break Apart FISH, kit	20 Testes/Kit

### Princípio do teste

#### Descrição do desenho da sonda



### Descrição técnica

A hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) é uma técnica de ensaio molecular que utiliza fragmentos de DNA ou RNA, denominados sondas, marcados com fluoróforos para hibridizar, por meio do mecanismo de complementaridade de bases, às regiões-alvo dos cromossomos em amostras de pacientes. As sondas emitem sinais de fluorescência em um comprimento de onda específico após serem excitadas por uma fonte de luz, e a hibridização ao cromossomo pode ser observada diretamente por meio de um microscópio equipado com um conjunto adequado de filtros. Essa técnica permite detectar com precisão alterações cromossômicas e, conseqüentemente, avaliar o estado dos genes localizados nas regiões afetadas dos cromossomos.

## Principais Componentes

Especificação	Conteúdo do Kit	Principais componentes	Volume	Quantidade
5 testes/kit 10 testes/kit 20 testes/kit	BCL2 sonda (BCL2, 3' sonda laranja, BCL2, 5' sonda verde)	Sonda BCL2, formamida, SSC, e dextran sulfate, etc.	50 µl 100 µl 200 µl	1 frasco
	DAPI Meio de Montagem	Antifade reagente ,DAPI, e glycerin,etc.	50 µl 100 µl 200 µl	1 frasco

**Notas: 1. Os componentes dos kits de lotes diferentes não devem ser trocados entre si.**

### Reagentes necessários mas não fornecidos no kit:

- Rubber cement
- Solução para desparafinização
- Etanol absoluto
- Água purificada
- 1 M HCl
- 1 N or 2 N Hidróxido de Sódio (NaOH)
- 20× SSC Solução (3 M cloreto de sódio, 0.3 M citrato de sódio, pH 5.3)
- NP-40
- Tiocianato de sódio
- Pepsina (250 U/mg)

### Instrumentos necessários

- Microscópio de fluorescência
- Pipeta de microlitro e ponteiras esterilizadas
- Microcentrífuga
- Banho Maria
- Microcentrífuga
- Banho Maria
- Jarra de Coplin
- Hibridizador

**Notas:** Microscópio de fluorescência. A configuração do microscópio de fluorescência necessário inclui: ocular 10× e lentes objetivas 10×, 40× e 100×. Recomenda-se que, antes de utilizar a sonda, o usuário solicite ao fornecedor do conjunto de filtros os detalhes do conjunto de filtros a ser utilizado, de modo a escolher um conjunto de filtros compatível com os corantes fluorescentes marcados.

Fluorescência laranja: excitação máxima: 552 nm, emissão máxima: 576 nm.

Fluorescência verde: excitação máxima: 496 nm, emissão máxima: 520 nm.

DAPI: excitação máxima: 340 nm, emissão máxima: 488 nm.

### Condições de armazenamento e prazo de validade

Condições de armazenamento: abaixo de -15 °C, selado e armazenado no escuro.

Condições de envio: Os kits devem ser selados em caixas de espuma com sacos de gelo e gelo seco para envio. O tempo de envio não deve exceder uma semana e a temperatura de envio não deve ser superior à temperatura ambiente.

Prazo de validade: 12 meses.

**Nota:** consulte a data de produção e o prazo de validade na embalagem externa.

## Requisitos da amostra

1. Tipo da amostra: tecido fixado em formalina e emblocado em parafina, Recomenda-se que sejam selecionadas amostras de parafina com menos de dois anos para garantir a precisão do teste.
2. Método de coleta de amostras: os tecidos frescos devem ser fixados em tampão de formalina neutra a 10% por 24-48 horas dentro de 0,5 a 1 hora após serem removidos. O tamanho do tecido não deve exceder 0,5 cm<sup>3</sup> e a espessura recomendada da seção é de 3 µm a 5 µm.
3. Armazenamento de amostras: recomenda-se que as seções de parafina preparadas sejam utilizadas imediatamente ou armazenadas a -20±5 °C.

## Método teste

### A- Preparo das soluções

#### Reagente de lavagem etanol

Prepare diluições v/v de 70% e 85% utilizando etanol a 100% e água purificada. As diluições podem ser utilizadas durante 1 semana, a menos que ocorra evaporação ou que a solução se dilua devido a utilização excessiva. Armazene à temperatura ambiente em recipientes bem fechados quando não estiver em uso.

#### Solução Pré-tratamento

- Para preparar, junte:

80 g	Tiocianato de sódio
800 mL	Água purificada
1000 mL	Volume final.

Misture bem. Ajuste o volume para 1 litro com água purificada. Filtre através de uma unidade de filtração com poros de 0,45 µm. Descarte a solução usada no final de cada dia. Se o reagente estiver turvo ou contaminado, deve ser descartado imediatamente.

#### 2× SSC /0.3% NP-40 Solução de lavagem

Para preparar, junte:

100 mL	20× SSC pH 5.3
847 mL	Água purificada
3 mL	NP-40
1000 mL	Volume Final

Misture bem. Meça o pH à temperatura ambiente utilizando um medidor de pH. Ajuste o pH para 7,0±0,2 com NaOH 1 N ou 2 N. Ajuste o volume para 1 litro com água purificada. Se o reagente estiver turvo ou contaminado, deve ser descartado imediatamente.



## Tampão enzimático (pH 2.0 HCl)

- Para preparar. Junte:

10 mL	1 M HCl
900mL	Água purificada
1000 mL	Volume final

Misture bem. Meça o pH à temperatura ambiente utilizando um medidor de pH. Ajuste o pH para  $2,0 \pm 0,2$  com HCl 1 M. Ajuste o volume para 1 litro com água purificada. Se o reagente estiver turvo ou contaminado, deve ser descartado imediatamente.

## B - Preparação

**Nota:** Observação: deve-se preparar diariamente uma solução de pepsina a 1 mg/ml (utilize 50 mg de pepsina, adicione 50 ml de tampão enzimático e misture bem).

1. Ligue o banho-maria e ajuste a temperatura para 80 °C. Despeje a solução de pré-tratamento no frasco Coplin, coloque o frasco no banho-maria e preaqueça a 80 °C.
2. Ligue o banho-maria e ajuste a temperatura para 37 °C. Despeje 50 ml de solução de pepsina 1 mg/ml no frasco Coplin, coloque o frasco no banho-maria e preaqueça a 37 °C.
3. Antes da lavagem pós-hibridização, ajuste a temperatura do banho-maria do termostato para 68 °C, despeje a solução de lavagem 2× SSC/0,3% NP-40 no frasco Coplin e coloque o frasco no banho-maria por pelo menos 30 minutos. Certifique-se de que a temperatura da solução de lavagem atinja  $68 \pm 1$  °C antes do uso. Despeje a solução de lavagem 2× SSC/0,3% NP-40 em outro frasco Coplin e mantenha em temperatura ambiente.

## Processo de teste

### Pré-tratamento amostra

1. Preequeça a lâmina a 65 °C por 5 minutos em estufa ou utilizando um hibridizador (Recomendado Ara (EP-31-20147/EasyPath) ou equivalente).
2. Imediatamente insira a lâmina preaquecida em um suporte de lâminas imerso na solução de desparafinização (do tipo isoparafina) ou xileno, e incube à temperatura ambiente por 15 minutos.
3. Após a incubação, transfira o suporte de lâminas para uma nova solução de desparafinização recém-preparada e incube por mais 15 minutos.
4. Após a desparafinização, remova o suporte de lâminas e coloque-o sobre papel toalha por 2 minutos para drenar o excesso de líquido.
5. Desidrate a lâmina em etanol absoluto duas vezes por 5 minutos cada.
6. Rehidrate a lâmina em etanol a 85%, etanol a 70% e água purificada, sequencialmente, durante 1 minuto cada.
7. Retire a lâmina e use o papel absorvente de água para remover a solução residual da lâmina.
8. Coloque a lâmina na solução de pré-tratamento preaquecida a 80 °C e incube por 30 minutos.
9. Retire a lâmina e mergulhe-a em água purificada por 1 minuto. Em seguida, retire-a e remova o líquido residual.
10. Mergulhe a lâmina em solução de pepsina 1 mg/ml pré-aquecida a 37 °C e incube por 25 minutos.
11. Após a digestão enzimática, mergulhe a lâmina em água purificada por 1 minuto.

12. Desidrate a lâmina em etanol a 70%, etanol a 85% e etanol a 100% em sequência durante 1 minuto cada.
13. Seque a lâmina à temperatura ambiente.

### Desnaturação e hibridização da amostra

1. Aqueça as sondas em temperatura ambiente, agite suavemente para homogeneizar, centrifugue brevemente as sondas por 2 a 3 segundos em uma microcentrífuga e deposite 10 µL da sonda sobre a amostra.
2. Coloque a lamínula (18 mm x 18 mm), evitando a formação de bolhas de ar, e sele a lâmina com Rubber Cement.
3. Insira a lâmina no hibridizador e execute o programa conforme descrito a seguir: desnaturação a 85 °C por 5 minutos e hibridização a 42 °C por 16-18 horas.

**Nota:** Programa rápido de hibridização: desnaturação a 85 °C por 5 minutos; hibridização a 42 °C por 2 horas.

### Lavagem Pós-hibridização

1. Remova cuidadosamente o Rubber Cement.
2. Coloque a lâmina em solução de lavagem 2× SSC/0,3% NP-40 no frasco Coplin à temperatura ambiente para lavar a lamínula (2 a 5 minutos).
3. Retire a lâmina e enxágue-a por 2 minutos com a solução de lavagem 2× SSC/0,3% NP-40 preaquecida a 68±1°C.
4. Retire a lâmina, absorva a solução residual, coloque a lâmina em etanol a 70% à temperatura ambiente e enxágue por 1 minuto.
5. Seque a lâmina naturalmente ao ar livre, no escuro, para uso posterior.

### Contra-coloração

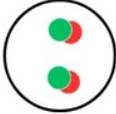
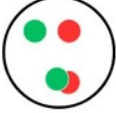
1. Coloque 10 µl de solução de contra-coloração na área de hibridização (evitando bolhas), coloque a lamínula, remova cuidadosamente o excesso de solução de contra-coloração com papel absorvente e contra-colora a lâmina no escuro durante 10 minutos.

**Nota:** A lâmina com contra-coloração deve ser examinada imediatamente utilizando um microscópio de fluorescência ou armazenada a -15 °C ou menos, no escuro, para observação posterior. A lâmina armazenada deve ser aquecida à temperatura ambiente antes de ser observada ao microscópio.

### Visualização da lâmina e coleta de dados

1. Observe a lâmina em um microscópio de fluorescência equipado com os conjuntos de filtros apropriados.
2. Localize a área sob a lente objetiva de 10× e realize a contagem sob a lente objetiva de 100×.
3. Ajuste o foco para encontrar a área observável que tenha limites nucleares completos, coloração uniforme e sinais claros sem sobreposição de núcleos.
4. Na região selecionada, encontre todos os pontos de sinal em diferentes níveis dos núcleos e conte os sinais fundidos e os sinais individuais laranja e verde; quando os pontos de sinal laranja (O) e verde (G) se sobrepõem ou a distância entre os dois pontos de sinal é menor que o diâmetro de um ponto de sinal, os sinais são contados como um sinal fundido (amarelo, F); os núcleos sem sinais ou com sinais fracos não são contados.

## Interpretação dos sinais

Cenário FISH 2F (2 sinais amarelo)	
Cenário FISH 1F1O1G (1 amarelo / 1 laranja / 1 sinal verde)	

## Interpretação dos resultados dos testes

### Problemas comuns e soluções no processo de teste

Problema	Possível causa	Solução recomendada
Sem sinal ou sinal fraco	Desnaturação insuficiente das amostras e sondas	Certifique-se de que a temperatura da lâmina esteja em $85 \pm 1^\circ\text{C}$ durante a desnaturação; Aumente o tempo de desnaturação da lâmina em 2-4 minutos.
	Nenhuma sonda adicionada	Descongele completamente as sondas e certifique-se de que o reagente da sonda seja aspirado pela pipeta
	Quantidade insuficiente de sondas	Certifique-se de que as sondas atinjam a temperatura ambiente antes do uso e de que o reagente da sonda seja aspirado pela pipeta.
	Secagem insuficiente da lâmina	Antes de adicionar as sondas sobre a lâmina, certifique-se de que a solução de etanol na lâmina tenha evaporado completamente.
	Secagem muito rápida das sondas	Cubra a área-alvo com a lamínula imediatamente após a adição das sondas; para a eluição, remova a lamínula de apenas uma lâmina por vez e mergulhe a lâmina na solução de lavagem imediatamente antes de remover a lamínula da próxima lâmina.
	Bolhas sob a lamínula durante a hibridização	Cubra a superfície das sondas com a lamínula e pressione suavemente para eliminar as bolhas de ar.
	Condições inadequadas de hibridização	Garanta o cumprimento do tempo e da temperatura de hibridizações especificadas; não deixe nenhuma abertura ao selar a lâmina com meio de montagem. Ajuste o tempo de hibridização e a umidade conforme necessário.
	Solução de lavagem incorreta ou condições de eluição inadequadas	Certifique-se de que a solução de lavagem seja preparada de acordo com o IFU; garanta que a temperatura da solução de lavagem alcance a especificada na etapa de eluição; remova a lamínula antes de imergir a lâmina na solução de lavagem.
	Armazenamento inadequado das sondas ou das lâminas de amostra	Armazene as sondas abaixo de $-15^\circ\text{C}$ no escuro; seque as lâminas não hibridizadas para armazenamento a longo prazo a $-20 \pm 5^\circ\text{C}$ ou armazenamento a curto prazo (geralmente não mais do que duas semanas) à temperatura ambiente; Armazene as lâminas hibridizadas a $-20 \pm 5^\circ\text{C}$ no escuro.
	Seleção inadequada do conjunto de filtros para observação	Use o conjunto de filtros correto para observar a fluorescência da sonda.
Estrutura inadequada do microscópio e lente objetiva para observação de amostras FISH, ou dano no conjunto de filtros	Entre em contato com o fabricante do microscópio.	
Fundo excessivamente intenso nas lâminas	Lavagem insuficiente das lâminas antes do preparo da amostra	Mergulhe a lâmina em etanol absoluto e seque-a com papel absorvente antes de colocar o reagente.
	Eluição inadequada após a hibridização	Certifique-se de que a solução de lavagem está preparada corretamente de acordo com as instruções de utilização; opere de acordo com as instruções de utilização; certifique-se de que a temperatura da solução de lavagem está correta; remova a lamela e repita a etapa de eluição.
	Uso prolongado ou armazenamento inadequado da solução de lavagem	Certifique-se de que a solução de lavagem seja armazenada a uma temperatura entre $2$ e $25^\circ\text{C}$ e descarte o reagente se estiver turvo ou contaminado.
	Umidade de hibridização muito alta ou muito baixa	Ajuste a umidade da hibridização para o nível ideal.
Contracoloração muito fraca	Contracoloração insuficiente	Remova a lamínula e mergulhe a lâmina na solução de lavagem por 5 minutos à temperatura ambiente. Coloque a lâmina em soluções de etanol a 70%, 85% e 100% por 1 minuto cada para desidratação gradiente e, em seguida, realize a contra-coloração.
	Vencimento ou exposição excessiva à luz da solução de coloração	Certifique-se de que a solução de coloração seja armazenada abaixo de $-15^\circ\text{C}$ no escuro; certifique-se de que a solução de coloração não esteja vencida.















## Limitações dos métodos de teste

1. Este kit se baseia na técnica de hibridização in situ por fluorescência para a quebra do gene BCL2.
2. Este reagente é aplicável a secções de tecido em parafina e ajusta o processo de pré-tratamento de acordo com a espessura das secções de tecido ou o tipo de amostras.

## Precauções

1. Este kit se destina apenas a fins de pesquisa.
2. Durante a utilização deste kit, é necessário usar luvar de látex para evitar o contato do reagente, com a pele. Em caso de contato acidental, lave imediatamente com água em abundância.
3. As amostras não devem ser expostas a ácidos e álcoois nem aquecidas em excesso, pois isso pode danificar o DNA e comprometer o resultado do teste FISH.
4. Todos os componentes do kit devem ser utilizados dentro do prazo de validade.
5. A solução de coloração contém DAPI que é um mutagênico. A inalação, ingestão ou contato com a pele devem ser evitados.
6. A sonda contém um teratógeno chamado formamida. O contato com a pele e as membranas mucosas deve ser evitado.
7. Para obter resultados ideais, é necessário garantir que os reagentes sejam preparados e armazenados adequadamente, de acordo com as instruções de uso.

## Explicações dos sinais

	<u>Limite superior de temperatura</u>		<u>Mantenha seco</u>
	<u>Não use se a embalagem estiver danificada</u>		<u>Consulte as instruções de uso</u>
	<u>Não reutilizar</u>		<u>Mantenha longe da luz solar</u>
	<u>Utilizar até</u>		<u>Número do lote</u>
	<u>Número de referência</u>		<u>Fabricante</u>
	<u>Data de fabricação</u>		<u>Contém quantidade suficiente para &lt;n&gt; testes</u>

## Sonda BCL2 Break Apart FISH, kit

Probe BCL2 Break Apart FISH, kit

Solamente para uso en investigación (RUO)

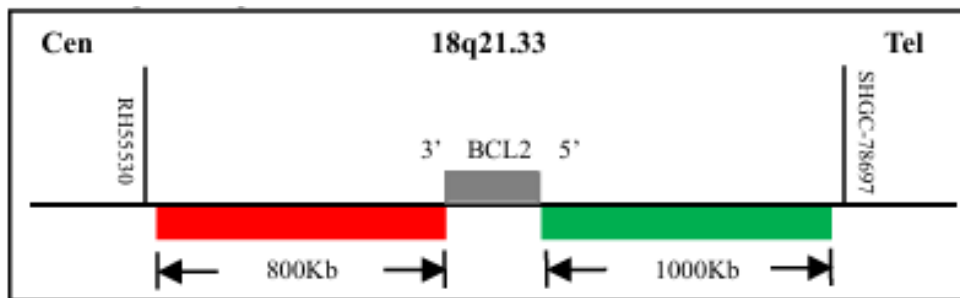
Nombre: Sonda BCL2 Break Apart FISH, Kit

### Especificaciones de embalaje

Referencia	Descripción	Tamaño Kit
EP-13-10191	Sonda BCL2 Break Apart FISH, kit	5 Testes/Kit
EP-13-10191	Sonda BCL2 Break Apart FISH, kit	10 Testes/Kit
EP-13-10191	Sonda BCL2 Break Apart FISH, kit	20 Testes/Kit

### Principio del teste

#### Descripción del diseño de la sonda



### Descripción técnica

La hibridación in situ por fluorescencia (FISH) es una técnica de ensayo molecular que utiliza fragmentos de DNA o RNA, denominados sondas, marcados como fluoruros para hibridarse, por medio del mecanismo de complementariedad de bases, las regiones – albo de los cromosomas en muestras de pacientes. Las sondas emiten señales de fluorescencia en un comprimiendo de onda específico después de ser excitadas por una fuente de luz, la hibridación al cromosomas puede ser observada directamente por medio de un microscopio equipado con un conjunto adecuado de filtros. Esta técnica permite detectar con precisión alteraciones cromosomas y consecuentemente, evaluar el estado de genes localizados en la regiones afectadas de los cromosomas.

### Principales componentes

Especificación	Conteúdo del Kit	Principais componentes	Volumen	Cantidad
5 testes/kit 10 testes/kit 20 testes/kit	BCL2 sonda (BCL2, 3' sonda naranja, BCL2, 5' sonda verde)	Sonda BCL2, formamida, SSC, e dextrano sulfato, etc.	50 µl 100 µl 200 µl	1 frasco
	DAPI Médio de Montaje	Antidesvanecimiento regente ,DAPI, y glycerin,etc.	50 µl 100 µl 200 µl	1 frasco

**Notas: 1. Los componentes de los kits de lotes diferentes no deben ser cambiados entre si. Regentes necesarios mas no promovidos en el kit**

- Rubber cement
- Solución para desparafinización
- Etanol absoluto
- Agua purificada
- 1 M HCl
- 1 N or 2 N Hidróxido de Sodio (NaOH)
- 20× SSC Solución (3 M clorato de sodio, 0.3 M citrato de sodio, pH 5.3)
- NP-40
- Tio cianato de sodio
- Pepsina (250 U/mg)

**Instrumentos necesarios**

- Microscopio de fluorescencia
- Pipeta de microlitro y punteras esterilizadas
- Micro centrífuga
- Baño Maria
- Micro centrífuga
- Baño Maria
- Jarra de Coplin
- Hibridizador

Notas: Microscopio de fluorescencia. La configuración de microscopio de fluorescencia necesario incluye: Ocular 10× y lentes objetivas 10×, 40× e 100×. Se recomienda, antes de utilizar las sondas, el usuario solicite al proveedor del conjunto de filtros los detalles del conjunto de filtros debe ser utilizado, de modo a escoger un conjunto de filtros compatibles con la coloración fluorescentes marcados.

Fluorescencia naranja: Excitación máxima: 552 nm, emisión máxima: 576 nm.

Fluorescencia verde: Excitación máxima: 496 nm, emisión máxima: 520 nm.

DAPI: Excitación Máxima: 340 nm, emisión máxima: 488 nm.

**Condiciones de almacenamiento y plazo de validez**

Condiciones de almacenamiento: Abajo de -15 °C, sellado y almacenado en lo oscuro.

Condiciones de envío: Los kits deben ser sellados en cajas de espuma con sacos de hielo y de hielo seco para envío.

El tiempo de envío no debe exceder una semana y la temperatura de envío no debe ser superior a la temperatura ambiente.

Plazo de validez: 12 meses.

**Nota:** Consulte la fecha de producción y el plazo de validez en la embalaje parte externa.

## Requisitos de muestras

1. Tipo de muestra: Tejido fijado en formalina y encajado en la parafina, se recomienda que sea seleccionados muestras de parafina con menos de dos años para garantizar la precisión del teste
2. Método de recolección de muestra: Los tejidos frescos deben ser fijados en tampón de formalina neutra a 10% por 24-48 horas dentro de 0,5 a 1 hora después de ser retirados. El tamaño del tejido no debe exceder 0,5 cm<sup>3</sup> y la espesura recomendada de la sección 3 µm a 5 µm.
3. Almacenamiento de muestras: Se recomienda que las secciones de parafina preparadas sean utilizadas inmediatamente o almacenadas a -20+5 °C.

## Método teste

### A – Preparo de soluciones

#### Regente de lavaje etanol

Prepare las diluciones v/v de 70% y 85% utilizando etanol a 100% y agua purificada. Las diluciones pueden ser utilizadas durante 1 semana, al menos que ocurras evaporación o que la solución se diluya debido a la utilización excesiva. Almacene la temperatura ambiente en recipientes bien cerrados cuando no este en uso.

#### Solución pre tratamiento

Para preparar junte

100 mL 20× SSC pH 5.3

847 mL Agua purificada

3mL NP – 40

1000 mL Volumen final

Mezcle bien. Mueva el pH a temperatura ambiente utilizando un medidor de pH. Ajuste el pH para 7,0+0,2 con NaOH 1 N o 2 N. Ajuste el volumen para 1 litro con agua purificada. Se el regente esta turbo o contamiando, debe ser desechado inmediatamente.

#### Tampón enzimático (pH 2.0 HCl)

Para preparar junte:

10 mL 1M HCl

900 mL Agua purificada

1000 mL Volumen final

Mezcle bien. Mueva el pH a temperatura ambiente utilizando un medidor de pH. Ajuste el pH para 2,0 + 0,2 con HCl 1 M. Ajuste el volumen para 1 litro con agua purificada. Si el regente esta turbo o contaminado, debe ser desechado inmediatamente.

### B – Preparación

**Nota:** La observación: Se debe preparar diariamente una solución de pepsina a 1mg/ml (Utilice 50 mg de pepsina, adicione 50 ml de tampón enzimático y mezcle bien)

1. Encienda el baño maria y ajuste la temperatura para 80 °C, despeche la solución de pre tratamiento en el frasco de Coplin, coloque el frasco en el baño maria y re caliente a 80 °C.
2. Encienda el baño maria y ajuste la temperatura para 37 °C. Despeche 50 ml de solución de pepsina 1mg/ml en el frasco Coplin, coloque el frasco en el baño maria y re caliente a 37 °C
3. Antes del lavaje después de la hibridación, ajuste la temperatura del baño maria del termostato para 68 °C, despeche la solución de lavaje 2× SSC/0,3% NP-40 em el frasco Coplin y coloque el frasco em el baño maria por lo menos 30 minutos. Certificarse que la temperatura de la solución de lavaje alcance



68±1 °C antes del uso. Despeche la solución de lavaje 2× SSC/0,3% NP-40 en otro frasco Coplin y mantenga la temperatura ambiente.

## Proceso de teste

### Pre tratamiento muestra.

1. Caliente la lamina a 65 °C por 5 minutos en estufa o utilizando un hibridizador (Recomendado Ara (EP-31-20147/EasyPath) o equivalente).
2. Inmediatamente insiera la lamina caliente en un soporte de laminas inmerso en la solución de desparafinización (del tipo isoparafina) o xileno, y se incuba a temperatura ambiente por 15 minutos.
3. Después de la incubación, transfiera el soporte de laminas para una nueva solución de desparafinización
4. Después de la parafinización, retire el soporte de laminas y coloque sobre el papel toalla por 2 minutos para drenar el exceso de liquido.
5. Deshidrate la lamina en etanol absoluto dos veces por 5 minutos cada.
6. Re hidrate la lamina en etanol a 85%, etanol a 70% y agua purificada, secuencialmente, durante 1 minuto cada
7. Retirar la lamina y use el papel absorbente de agua para retirar la solución residual de la lamina.
8. Coloque la lamina en la solución de pre tratamiento caliente a 80° e incube por 30 minutos
9. Retirar la lamina y sumérgjala en agua purificada por 1 minuto. Enseguida, retirar y quitar el liquido residual
10. Sumergir la lamina en la solución de pepsina 1mg/ml, caliente a 37° e incube por 25 minutos
11. Después de la digestión enzimática, sumergir la lamina en agua purificada por 1 minuto.
12. Deshidrate la lamina en etanol a 70%, etanol a 85% y etanol a 100% en secuencia durante 1 minuto cada.
13. Seque la lamina a temperatura ambiente.

### Desnaturalización y hibridación de muestras

1. Caliente las sondas en temperatura ambiente, agite suavemente para homogeneizar, centrifugue brevemente las sondas por 2 a 3 segundos en una micro centrifuga y deposite 10 µL de la sonda sobre la muestra.
2. Coloque la lamina (18 mm x 18 mm), evitando la formación de burbujas de aire, selle la lamina con Rubber Cement
3. Insiera la lamina en el hibridizador y ejecute el programa conforme descrito a seguir: desnaturalización a 85°C por 5 minutos y hibridación a 42°C por 16 – 18 horas.

**Nota:** Programa rápido de hibridación: desnaturalización a 85°C por 5 minutos; hibridación a 42°C por 2 horas.

### Lavaje después hibridación

1. Retirar cuidadosamente el Rubber Cement
2. Coloque la lamina en la solución de lavaje 2× SSC/0,3% NP-40 en el frasco Coplin a temperatura ambiente.
3. Retirar la lamina y enjuagar por 2 minutos con la solución de lavaje 2× SSC/0,3% NP-40 caliente a 68±1 °C
4. Retirar la lamina absorba la solución residual, coloque la lamina en etanol a 70% a temperatura ambiente y enjuague por 1 minuto.

5. Seque la lamina naturalmente al aire libre, em lo escuro, para uso superior

### Contra coloración

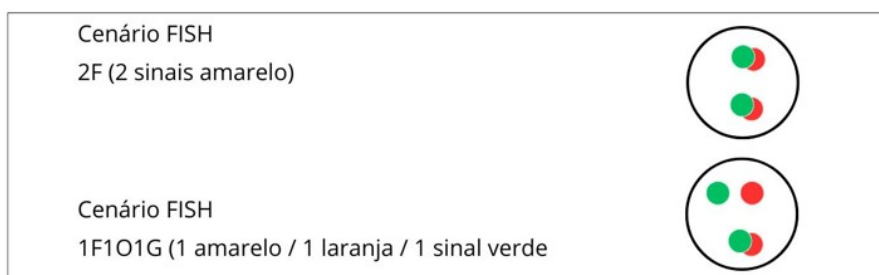
1. Coloque 10 µl de la solución de contra coloración en la área de hibridación (evitando burbujas), coloque la lamina, removía cuidadosamente el exceso de solución de contra coloración con papel absorbente y contra coloración la lamina en lo escuro durante 10 minutos.

**Nota:** La lamina con contra coloración debe ser examinada inmediatamente utilizando un microscopio de fluorescencia o almacenada a -15 °C o menos, en lo escuro, para observación posterior. La lamina almacenada debe ser calentada a temperatura ambiente antes de ser observada por el microscopio.

### Visualización de lamina y recolección de datos

1. Observe la lamina en un microscopio de fluorescencia equipado con los conjuntos de filtros apropiados.
2. Localice la área sub la lente objetiva de 10× y realice el recuento bajo la lente objetiva de 100×.
3. Ajuste el foco para encontrar la área observable que tenga limites nucleares completos, coloración uniforme y señales claros sin sobre posición de núcleos.
4. En la región seleccionada, encontré todos los puntos de señal en diferentes niveles de núcleos y conté los señales fundidos y los señales individuales naranja y verde; cuando los puntos de señal naranja (O) o verde (G) se sobre ponen o la distancia entre los dos puntos de señal es menor que el diámetro de un punto de señal, las señales son contados como un señal fundido (amarillo F); los nucleos sin señales o con señales flacos no son contados.

### Interpretación de los señales



## Interpretación de los resultados de los testes - Problemas comunes y soluciones en el proceso de teste

Problema	Posible causa	Solução recomendada
Sin señal o señal flaco	Desnaturalización insuficiente de las muestras y sondas	Certificarse de que la temperatura de la lamina este en 85+1 °C durante la desnaturalización; Aumente el tiempo de desnaturalización de la lamina en 2-4 minutos.
	Ninguna sonda adicionada	Descongele completamente las sondas y certificarse de que el regente se la sonda sea aspirado por la pipeta.
	Cantidad insuficiente de las sondas	Certificarse de que las sondas alcance la temperatura ambiente antes del uso y de que el regente de la sonda sea aspirado por la pipeta.
	Secado insuficientes de las sondas	Antes de adicionar las sondas sobre la lamina, certificarse de que la solución de etanol en la lamina tenga evaporado completamente.
	Secado muy rápida de las sondas	Cubra la área-albo con la lamina inmediatamente después de la adición de las sondas, para la elución, remover la lamina, apenas una por vez y sumérjala en la solución de lavaje inmediatamente antes de retirar la lamina de la próxima lamina.
	Burbujas sub la lamina Durante la hibridación	Cubra la superficie de las sondas con la lamina y presiones suavemente para eliminar las burbujas de aire.
	Condiciones inadecuadas de hibridación	Garantir el cumplimiento del tiempo y de la temperatura de hibridación especificadas/ no deje ninguna abertura al sellar la lamina con medio de montaje. Ajuste el tiempo de hibridación y la humedad conforme necesario.
	Solución de lavaje incorrecta o condiciones de lución inadecuada	Certificarse de que la solución de lavaje sea preparada de acuerdo com el IFU; Garantir que la temperatura de la solución de lavaje alcance la especificada en la etapa de elución; Retirar la lamina antes de sumergir la lamina en la solución de lavaje.
	Almacenamiento inadecuado de las sondas o de las lamina de muestra	Almacene las sondas abajo de -15 °C em lo oscuro; seque las laminas no hibridizadas para almacenamiento a perlongado plazo a -20+5 °C o almacenamiento corto plazo (generalmente no mas de que dos semanas) la temperatura ambiente; Almacene las laminas hibridizadas a -20 + 5 °C en lo oscuro.
	Selección inadecuado de conjunto de filtros para observación	Use el conjunto de filtros correcto para observar la fluorecencia de la sonda.
Fondo excesivamente intenso en las laminas	Estructura inadecuada de microscopio y lente objetiva para observación de muestra de FISH, o danço del conjunto de filtros	Entre en contacto con el fabricante de microscopio
	Lavaje insuficiente de las laminas antes del preparo de muestra	Sumergir la lamina en etanol absoluto y seque el papel absrovente antes de colocar el regente.
	Elución inadecuada después de la hibridación	Certificarse de que la solución de lavaje esta preparada correctamente de acuerdo con las instrucciones de utilización; opere de acuerdo con las instrucciones de utilizaciones, certificarse de que la temperatura de solución de lavaje este correcta; retirar la lamina y repetir la etapa de elución
	Uso prolongado o almacenamiento inadecuado de solución de lavaje	Certificarse de que la solución de lavaje sea almacenada a una temperatura entre 2 y 25 °C y deseche el regente se esta turbo o contaminado.
Contra coloración muy flaca	Humedad de hibridación muy alta o muy baja.	Ajuste la humedad de hibridación para el nivel ideal.
	Contra coloración insuficiente.	Retirar la lamina y sumergir la lamina en la solución de lavaje por 5 minutos la temperatura ambiente. Coloque la lamina en soluciones de etanol a 70%, 85% y 100% por 1 minuto cada para deshidratación gradiente y enseguida, realice la contra coloración.
	Vencimiento o exposición excesiva a la luz de la solución de coloración	Certificarse de que la solución de coloración sea almacenada abajo de -15 °C em lo oscuro; certificarse de que la solución de coloración no esta vencida.












## Limitaciones de los métodos del teste

1. Este kit se basa en la técnica de hibridación in situ por fluorescencia para la quiebra del gen BCL2.
2. Este regente es aplicable en las secciones de tejido en parafina y ajuste el proceso de pre tratamiento de acuerdo con la espesura de secciones o del tipo de muestras

## Precauciones

1. Este kit se destina apenas a finales de investigación
2. Durante la utilización de este kit es necesario usar guantes de látex para evitar el contacto con el regente, con la piel. En caso de contacto accidental, lave inmediatamente con agua en abundancia
3. Las muestras no deben ser expuestas a los ácidos y alcoholes ni re calientes en exceso, pues eso puede dañar el DNA y comprometer el resultado del teste FISH
4. Todos los componentes del kit deben ser utilizados dentro del plazo da validez
5. La solución de coloración contiene DAPI que es un mutagénico. La inhalación, ingestión o contacto con la piel deben ser evitados.
6. LA sonda contiene un teratogeno llamado formamida. El contacto con la piel y las membranas mucosas debe ser evitado.
7. Para obtener resultados de ideas, es necesario garantir que los regentes sean preparados y almacenados adecuadamente, de acuerdo con las instrucciones de uso.

## Explicaciones de los señales.

	<u>Limite superior de temperatura</u>		<u>Mantenha seco</u>
	<u>Não use se a embalagem estiver danificada</u>		<u>Consulte as instruções de uso</u>
	<u>Não reutilizar</u>		<u>Mantenha longe da luz solar</u>
	<u>Utilizar até</u>		<u>Número do lote</u>
	<u>Número de referência</u>		<u>Fabricante</u>
	<u>Data de fabricação</u>		<u>Contém quantidade suficiente para &lt;n&gt; testes</u>

# Sonda BCL2 Break Apart FISH, kit

Probe BCL2 Break Apart FISH, kit

For Research Use Only (RUO)

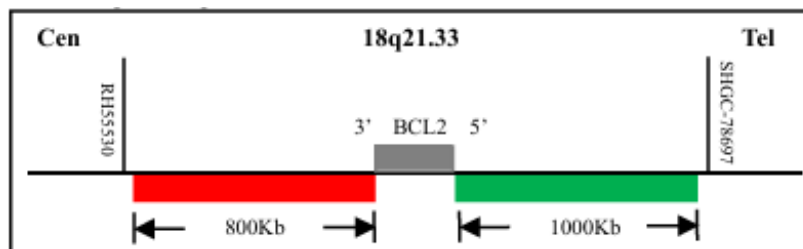
**Product Name: Probe BCL2 Break Apart FISH, kit**

Packaging Specifications

Reference	Description	Kit Size
EP-13-10191	Probe BCL2 Break Apart FISH, kit	5 Tests/Kit
EP-13-10192	Probe BCL2 Break Apart FISH, kit	10 Tests/Kit
EP-13-10193	Probe BCL2 Break Apart FISH, kit	20 Tests/Kit

## Test Principle

### Probe Design Description



### Technique Description

Fluorescence in situ hybridization (FISH) is a molecular assay technique that uses fluorescently labeled DNA or RNA fragments or probes to hybridize via base complementary mechanism to the targeted regions of chromosomes in specimens. The probes emit fluorescence signals at a specific wavelength after excitation by a light source, and the hybridization to the chromosome can be directly observed through a microscope equipped with a proper filter set. This technique can accurately detect chromosomal abnormalities, therefore, the status of genes located at the affected regions of chromosomes can be evaluated.

## Main Components

Specification	Kit content	Main components	Volume	Quantity
5 tests/kit	BCL2 probe (BCL2,3' orange probe, BCL2,5' green probe)	BCL2 probe formamide, SSC, and dextran sulfate, etc.	50 µl	1 vial
10 tests/kit			100 µl	
20 tests/kit			200 µl	
	DAPI Mounting Medium	Antifade reagent ,DAPI, and glycerin,etc.	50 µl	1 vial
			100 µl	
			200 µl	

**Notes: The components in kits of different lots should not be interchanged.**

### Material need but not provided

- Rubber cement
- Deparaffinization solution
- Absolute ethanol
- Purified water
- 1 M HCl
- 1 N or 2 N Hidróxido de Sódio (NaOH)
- 20×SSCSolution (3 M sodium chloride, 0.3 M sodium citrate, pH 5.3)
- NP-40
- Sodium thiocyanate
- Pepsin (250 U/mg)

### Applicable instruments

- Fluorescence microscope.
- Microliter pipettor and sterile tips
- Microcentrifuge
- Water bath
- Coplin jars
- Hybridization instrument

**Notes:** Fluorescence microscope. The configuration of the required fluorescence microscope includes: 10× eye piece, and 10×, 40× and 100× objective lenses. It is recommended that before using the probe, the user should ask the filter set supplier for the details of the filter set to be used, so as to choose a filter set that is compatible with the labeled fluorescent dyes.

Orange fluorescence: excitation maximum: 552 nm, emission maximum: 576 nm.

Green fluorescence: excitation maximum: 496 nm, emission maximum: 520 nm.

DAPI: excitation maximum: 340 nm, emission maximum: 488 nm.

## Storage Conditions and Shelf Life

Storage conditions: below-15°C, sealed, and stored in the dark.

Shipping conditions: The kits should be sealed in foam boxes with ice bags and dry ice for shipping. The shipping time should not exceed one week, and the shipping temperature should not be higher than the room temperature.

Shelf life: 12 months.

**Note:** see the production date and shelf life on the outer package

## Sample Requirements

1. Sample type: formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections, it is recommended that paraffin samples less than two years be selected to ensure the accuracy of the test.
2. Sample collection method: the fresh tissues should be fixed in 10% neutral formalin buffer for 24-48 hours within 0.5-1 hour after being removed. The tissue size should not exceed 0.5 cm<sup>3</sup> and the recommended section thickness is 3 µm- 5 µm.
3. Sample storage: the prepared paraffin sections are recommended to be used immediately, or stored at -20±5°C.

## Test Methods

### A - Preparation of Working Reagen

#### Ethanol Wash Solutions

Prepare v/v dilutions of 70% and 85% using 100% ethanol and purified water. Dilutions may be used for 1 week unless evaporation occurs or the solution becomes diluted due to excessive use. Store at room temperature in tightly capped containers when not in use.

#### Pretreatment Solution

- To prepare, add together:

80 g	Sodium thiocyanate
800 mL	Purified water
1000 mL	Final Volume

Mix thoroughly. Adjust volume to 1 liter with purified water. Filter through 0.45 µm pore filtration unit. Discard used solution at the end of each day. If the reagent is turbid or contaminated, it should be discarded immediately.

#### 2× SSC /0.3%NP-40 Washing Solution

- To prepare, add together:

100 mL	20× SSC pH 5.3
847 mL	Purified water
3 mL	NP-40
1000 mL	Final volume

Mix thoroughly. Measure pH at room temperature using a pH meter. Adjust pH to 7.0±0.2 with 1 N or 2 N NaOH. Adjust volume to 1 liter with purified water. If the reagent is turbid or contaminated, it should be discarded immediately.

## Enzyme buffer (pH 2.0 HCl)

To prepare, add together:

10 mL	1 M HCl
<u>900mL</u>	Purified water
1000 mL	Final Volume

Mix thoroughly. Measure pH at room temperature using a pH meter. Adjust pH to  $2.0 \pm 0.2$  with 1 M HCl. Adjust volume to 1 liter with purified water. If the reagent is turbid or contaminated, it should be discarded immediately.

## B - Preparation of instruments

**Note:** 1 mg/ml Pepsin solution (Take 50mg pepsin, add 50ml enzyme buffer and mixwell) should be prepared fresh daily.

1. Turn on the thermostat water bath and set the temperature to 80°C. Pour the Pretreatment Solution into the Coplin jar, put the jar in the water bath, and preheat it to 80°C.
2. Turn on the thermostat water bath and set the temperature to 37°C. Pour 50 ml 1 mg/ml Pepsin solution into the Coplin jar, put the jar in the water bath, and preheat it to 37°C.
3. Before post-hybridization wash, set the temperature of the thermostat water bath to 68°C, pour the 2× SSC/0.3% NP-40 Washing Solution into the Coplin jar, and place the jar in the water bath for at least 30 minutes. Ensure that the temperature of the washing solution reaches  $68 \pm 1^\circ\text{C}$  before use. Pour the 2× SSC/0.3% NP-40 Washing Solution into another Coplin jar and keep room temperature.

## Testing process

### Sample pretreatment

1. Preheat the slide at 65°C for 5 minutes in an oven or using the hybridization instrument or hybridizer, recommended ARA (EP-31-20147/EasyPath) or equivalent.
2. Immediately insert the preheated slide into a slide holder immersed in the deparaffinization solution (isoparaffin type) or xylene and incubate at room temperature for 15 minutes
3. After incubation, transfer the slide holder into freshly prepared deparaffinization solution and incubate for additional 15 minutes.
4. After deparaffinization, remove the slide holder and place it on paper towel for 2 minutes to drain extra liquid.
5. Dehydrate the slide in absolute ethanol twice for 5 minutes each.
6. Rehydrate the slide in 85% ethanol, 70% ethanol and purified water in sequence for 1 minute each
7. Take out the slide and use the water absorbing paper to remove the residual solution from the slide.
8. Place the slide in the pretreatment solution preheated to 80°C and incubate for 30 minutes.
9. Take out the slide and immerse it in purified water for 1 minute. Then, take it out and remove the residual liquid.
10. Immerse the slide in 1 mg/ml Pepsin solution preheated to 37°C and incubate for 25 minutes.
11. After the enzymatic digestion, immerse the slide in purified water for 1 minute.
12. Dehydrate the slide in 70% ethanol, 85% ethanol and 100% ethanol in sequence for 1 minute each.
13. Dry the slide at room temperature.



### Sample denaturation and hybridization

1. Warm the probes to room temperature, swirl and mix well, briefly spin the probes for 2- 3 seconds in a microcentrifuge, and drop 10 µl probes on top of the specimen.
2. Place the coverslip (18mm x 18mm), avoid air bubbles, and seal the slide with Rubber Cement
3. Place the slide into a hybridizer and run the hybridization program as the following: denaturation at 85°C for 5 minutes and hybridization at 42°C for 16-18 hours.

**Note:** The fast hybridization program: denaturation: 85°C, 5 min; hybridization: 42°C, 2 hours.

### Post-hybridization wash

1. Carefully remove the Rubber Cement.
2. Place the slide into 2× SSC/0.3% NP-40 Washing Solution in the Coplin jar at room temperature to wash off the coverslip (2- 5 minutes).
3. Take out the slide and rinse it for 2 minutes with the 2× SSC/0.3% NP-40 Washing Solution preheated to 68±1°C.
4. Take out the slide, absorb the residual solution, put the slide in 70% ethanol at room temperature, and rinse it for 1 minute.
5. Air-dry the slide naturally in the dark for use later.

### Counterstaining

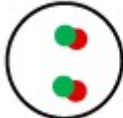

1. Drop 10 µl counterstaining solution to the hybridization area (avoiding bubbles), place the coverslip, carefully remove the excess counterstaining solution with absorbing paper, and counterstain the slide in the dark for 10 minutes.

**Note:** The counterstained slide should be examined immediately using a fluorescence microscope or stored at -15°C or lower in the dark for later observation. The stored slide should be warmed to room temperature prior to viewing under the microscope.

### Slide viewing and data collection

1. View the slide under a fluorescence microscope equipped with proper filter sets.
2. Place one drop of immersion oil on top of the coverslip in the area where the specimen is located. Find the specimen using the 10× objective lens and then examine the signals under the 100× lens.
3. Adjust the focus to find the observable area that has complete nucleus boundary, uniformed staining, and clear signals without overlapping nuclei.
4. In the selected region, find all signal points at different levels of the nuclei, and count the fused signals and the individual orange and green signals; when the orange (O) and green (G) signal points overlap or the distance between the two signal points is less than one signal point diameter, the signals are counted as a fused signal (yellow, F); the nuclei without signals or with weak signals are not counted.

## Interpretation of common signal type

FISH scenario 2F (2 yellow signals)	
FISH scenario 1F1O1G (1 yellow / 1 orange / 1 green signals)	

## Interpretation of Test Results

### Common problems and solutions in the testing process:

Problem	Possible cause	Recommended solution
No signal or weak signal	Insufficient denaturation of samples and probes	Ensure that the temperature of the slide is 85±1°C during the denaturation; Extend the slide denaturation time by 2-4 min.
	No probe added	Fully thaw the probes, and ensure that the probe reagent is drawn by the pipette.
	Insufficient quantity of probes	Ensure that the probes reach room temperature before use, and ensure that the probe reagent is drawn by the pipette.
	Insufficient drying of slide	Before adding the probes onto the slide, ensure that the ethanol solution on the slide has completely volatilized.
	Too fast drying of probes	Cover the target area by the cover slide immediately after the probes are added; for the elution, remove the cover slide on only one slide at a time, and immerse the slide in the washing solution immediately before the cover slide on the next slide is removed.
	Bubbles under the coverslip during hybridization	Cover the surface of the probes with the cover slide, and gently squeeze it to eliminate the air bubbles.
	Inappropriate hybridization conditions	Ensure the compliance with the specified hybridization time and temperature; do not leave any gap when sealing the slide with fluoro gel; Adjust the hybridization time and humidity as appropriate.
	Incorrect washing solution or elution conditions	Ensure that the washing solution is prepared in accordance with the IFU; ensure that the temperature of the washing solution reaches the temperature specified in the elution step; remove the cover slide before immersing the slide in the washing solution.
	Improper storage of probes or sample slides	Store the probes below -15°C in the dark; dry the unhybridized slides for long-term storage at -20±5°C or short-term storage (generally no more than two weeks) at room temperature; Store the hybridized slides at -20±5°C in the dark.
	Inappropriate selection of filter set for observation	Use the correct filter set to observe the probe fluorescence.
Inappropriate microscope structure and objective lens for observing FISH samples, or damage of the filter set	Please contact the microscope manufacturer.	
Excessively intense background of slides	Insufficient washing of slides before sample preparation	Immerse the slide in absolute ethanol and wipe it dry with water absorbing paper before dropping the reagent.
	Inadequate elution after the hybridization	Ensure that the washing solution is prepared correct in accordance with the IFU; operate in accordance with the IFU; ensure that the temperature of the washing solution is correct; remove the cover slide and repeat the elution step.
	Long-term use or improper storage of washing solution	Ensure that the washing solution is stored at 2-25°C, and discard the reagent if it is turbid or contaminated.
	Too high or too low hybridization humidity	Adjust the hybridization humidity to the optimum.
Too weak counterstaining	Too weak counterstaining	Remove the cover slide and immerse the slide in the washing solution for 5 min at room temperature. Place the slide in 70%, 85% and 100% ethanol solutions for 1 min each for gradient dehydration, and then perform counterstaining.
	Expiration or excessive light exposure of staining solution	Ensure that the staining solution is stored below -15°C in the dark; ensure that the staining solution is not expired.













## Limitations of Test Methods

1. This kit is based on the fluorescence in situ hybridization technique for the BCL2 gene break.
2. This reagent is applicable to paraffin tissue sections, and adjust the pretreatment process according to the thickness of the tissue sections or the type of samples.

## Precautions

1. This kit is only for research.
2. During the operation of this kit, it is necessary to wear latex gloves to avoid the contact of the reagent with the skin. In the case of accidental contact, rinse immediately with plenty of water.
3. Samples should not be exposed to acid and alkali or be overheated, which may damage DNA and lead to failure of FISH test.
4. All components in the kit should be used within the shelf life.
5. The staining solution contains DAPI, which is a mutagen. Inhalation, ingestion or contact with the skin should be avoided.
6. The probe contains a teratogen called formamide. Contact of it with the skin and mucous membranes should be avoided.
7. In order to obtain ideal results, it is necessary to ensure that the reagents are properly prepared and stored in accordance with the IFU.

## Explanation of Signs

	Upper limit of temperature		Keep Dry
	Do Not Use if Package is Damage		Consult instructions for use
	Do not reuse		Keep away from sunlight
	Use By		Lot Number
	Reference Number		Manufacturer
	Date of Manufacture		Contains sufficient for <n> tests