

Sonda Evolume PML/RARa Dual Color, Dual Fusion FISH, kit

Evolume PML/RARa Dual Color, Dual Fusion FISH Probe Kit

Somente para uso em pesquisa (RUO)

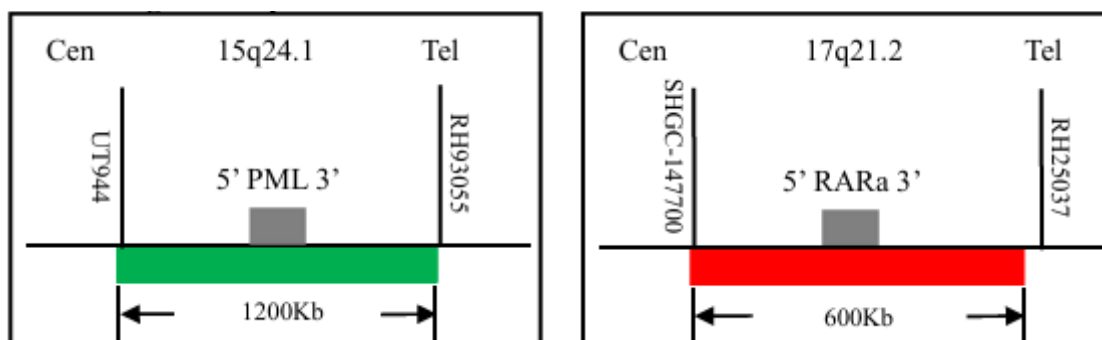
Nome: Sonda Evolume PML/RARa Dual Color, Dual Fusion FISH, kit

Especificações da embalagem

Referência	Descrição	Tamanho Kit
EP-13-10271	Sonda PML/RARa Dual Color, Dual Fusion FISH, kit	5 Testes/Kit
EP-13-10272	Sonda PML/RARa Dual Color, Dual Fusion FISH, kit	10 Testes/Kit
EP-13-10273	Sonda PML/RARa Dual Color, Dual Fusion 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	Sonda PML/RARa (PML sonda verde, RARa sonda laranja)	Sonda PML/RARa, formamida, SSC, e dextran sulfato, etc.	50 µl 100 µl 200 µl	1 frasco
	DAPI Meio de Montagem	Antifade reagente ,DAPI, e glicerina, 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
- 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
- Metanol
- Ácido acético glacial
- 0.075M Cloreto de potássio (KCl)
- Pepsina (250 U/mg)

Instrumentos necessários

- Microscópio de fluorescência
- Pipeta de microlitro e ponteiros esterilizados
- 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 transportados sob temperatura controlada entre 2 °C e 8 °C. O tempo de envio não deve exceder 10 dias. Durante o transporte, a temperatura não deve ultrapassar a 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 de amostra: Amostras celulares, tais como células cultivadas.
2. Armazenamento da amostra: Utilize a amostra dentro de 2 horas após a coleta ou armazene-a entre 2 °C e 8 °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

Solução 2×SSC

- Para preparar, junte:

100 ml	20×SSC pH5.3
900 mL	Água purificada
1000 mL	Volume final.

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

0.4×SSC/0.3% NP-40

- Para preparar, junte:

20ml	20×SSC pH5.3
877 mL	Água purificada
3ml	NP40
1000 mL	Volume final.

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



2×SSC/0.1% NP-40

- Para preparar, junte:

100 mL	20× SSC pH 5.3
849 mL	Água purificada
1 mL	NP-40
1000 mL	Volume Final

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

Solução 50 mg/ml Pepsina

- Para preparar. Junte:

25 mg	Pepsina (250U/mg)
500 μ L	Água purificada
500 μ L	Volume final

Misture bem até dissolver completamente. Distribua 100 μ L por frasco e armazene os frascos a -20 ± 5 °C; evite congelamentos e descongelamentos repetidos.

Tampão enzimático (pH 2.0 HCl)

- Para preparar. Junte:

10 mL	1 M HCl
900 mL	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.

Tratamento da amostra

Nota: O fixador (3:1 metanol:ácido acético glacial) deve ser preparado diariamente.

1. Retire 5-10 ml de amostras celulares, centrifugue-as a 1500 rpm durante 5 minutos e remova cuidadosamente o sobrenadante.
2. Adicione 10 ml de 0,075 M KCl pré-aquecido a 37 °C ao tubo de centrifuga e misture as substâncias pipetando suavemente.
3. Coloque o tubo de centrifuga em banho-maria a 37 °C por 30 minutos.
4. Adicione 1 ml de solução fixadora recente, misture as substâncias pipetando suavemente e pré-imobilize à temperatura ambiente por 8 minutos.
5. Misture as substâncias com uma pipeta e centrifugue a mistura a 1500 rpm durante 8 minutos.
6. Remova o sobrenadante, adicione 10 ml de solução fixadora fresca ao precipitado, misture as substâncias pipetando suavemente e deixe a mistura repousar à temperatura ambiente durante 8 minutos.
7. Centrifugue a mistura a 1500 rpm durante 8 minutos.

8. Repita os passos de lavagem acima até que o sedimento celular esteja completamente limpo.

Preparação da lâmina

1. Utilize lâminas limpas.
2. Após ressuspender as células, retire 3 µl da suspensão e coloque-a em diferentes posições na lâmina, evitando sobreposições.
3. Seque a lâmina à temperatura ambiente.
4. Use uma lente objetiva de 20× para observar a densidade celular em três áreas sob um microscópio de contraste de fase; é necessário que as células não se sobreponham e que o número de células seja de 100 a 200; ① Se as células se sobrepossem, adicione uma quantidade adequada de solução fixadora fresca para diluir a suspensão celular e, após misturar, retire outra suspensão de 3 µl para a preparação da lâmina; ② Se a densidade celular for baixa, centrifugue a suspensão, remova cuidadosamente uma quantidade adequada de sobrenadante e, após misturar, retire outra suspensão de 3 µl para a preparação da lâmina; em seguida, seque a lâmina para observação.
5. No microscópio de contraste de fase, se houver muitos fragmentos celulares, é necessário fazer um pré-tratamento e selecionar a área de hibridização adequada.

Nota: é necessária pelo menos uma lâmina extra para cada amostra, e a suspensão celular restante pode ser armazenada a 2-8 °C por 1 mês, para que as lâminas possam ser preparadas novamente, se necessário.

Preparação

Nota: A solução de pepsina a 0,1 mg/ml (retire 100 µl da solução-mãe de pepsina a 50 mg/ml, adicione 50 ml de tampão enzimático e misture bem) deve ser preparada diariamente.

1. Ligue o banho-maria do termostato e ajuste a temperatura para 37 °C. Despeje 50 ml de solução de pepsina 0,1 mg/ml no frasco Coplin, coloque o frasco no banho-maria e pré-aqueça a 37 °C.
2. Antes da eluição, ajuste a temperatura do banho-maria do termostato para 68 °C, despeje a solução de lavagem no frasco de 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 ± 1 °C antes do uso.

Processo de teste

Pré-tratamento amostra

1. Mergulhe a lâmina em solução 2×SSC à temperatura ambiente durante 10 minutos.
2. Coloque a lâmina em solução de pepsina a 37 ± 1 °C e 0,1 mg/ml para digerir durante 10 minutos.
3. Mergulhe a lâmina em solução 2×SSC à temperatura ambiente durante 2 minutos.
4. Desidrate a lâmina em etanol a 70%, etanol a 85% e etanol a 100%, sucessivamente, durante 1 minuto cada.
5. Seque a lâmina à temperatura ambiente.

Desnaturação e hibridização da amostra

1. Coloque a tira umidificadora no compartimento correspondente do hibridizador após mergulhá-la em água destilada e certifique-se de que a superfície do instrumento de hibridização esteja limpa e livre de materiais estranhos.
2. 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.

1. Retire as sondas do freezer, agite-as suavemente e centrifugue-as após retornarem à temperatura ambiente. Em seguida, pipete 10 µL de sonda e aplique sobre a área-alvo da lâmina.
2. Coloque a lamínula, evitando a formação de bolhas de ar, e sele as bordas da lamínula com Rubber Cement.
3. Coloque a lâmina selada no hibridizador e inicie o programa de desnaturação e hibridização.

Lavagem Pós-hibridização

1. Pré-aqueça a solução de 0,4× SSC/0,3% NP-40 a 68 ± 1 °C e mantenha a solução de 2× SSC/0,1% NP-40 à temperatura ambiente.
2. Após a conclusão da hibridização, retire a lâmina e remova o Rubber Cement e a lamínula da lâmina.
3. Coloque a lâmina na solução de 0,4× SSC/0,3% NP-40 a 68 ± 1 °C e mergulhe-a, enxaguando por 2 minutos.
4. Coloque a lâmina na solução de 2× SSC/0,1% NP-40 à temperatura ambiente e mergulhe-a por 1 minuto.
5. Retire a lâmina, absorva a solução residual, coloque a lâmina em etanol a 70% à temperatura ambiente e enxágue por 1 minuto.
6. Seque a lâmina naturalmente ao ar livre, no escuro, para uso posterior.

Contra-coloração

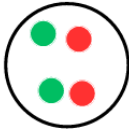

1. Adicione 10 µl da solução de contracorante na área de hibridização (evitando bolhas), coloque a lamínula, remova cuidadosamente o excesso da solução de contracorante com papel absorvente e contracore a lâmina no escuro por 10 minutos.

Observação: A lâmina contracorada deve ser examinada imediatamente em 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 visualizada no 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. Coloque uma gota de óleo de imersão sobre a lamínula, na área onde está localizada a amostra. Encontre a amostra utilizando a objetiva de 10× e, em seguida, examine os sinais sob a 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 planos do núcleo 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 eles é menor que o diâmetro de um ponto de sinal, esses sinais são contabilizados como um sinal fundido (amarelo, F). Núcleos sem sinais ou com sinais fracos não são contabilizados.

Interpretação dos sinais

Cenário FISH 202G (2 laranja/ 2 sinais verde)	
Cenário FISH 2F101G (2 amarelo / 1 laranja/ 1 sinal verde)	

Determinação do limiar para amostras negativas para FISH

Vinte amostras sem alterações genéticas conhecidas para o conjunto de sondas FISH foram selecionadas aleatoriamente para preparar lâminas de controle. Após a hibridização, conte 200 células de cada lâmina de controle e registre quaisquer tipos de padrões de sinal considerados positivos para FISH. Calcule a porcentagem de sinais positivos observados e determine o desvio padrão. O limite para amostras negativas para FISH é definido como o valor médio da porcentagem mais 3 vezes o desvio padrão. As amostras de controle ou negativas para FISH são geralmente escolhidas para serem do mesmo tipo de tecido ou célula que o alvo pretendido para detecção por FISH.

Importância da determinação do limiar

O limiar deve ser definido quando as sondas são utilizadas pela primeira vez, uma vez que este valor servirá de referência para distinguir amostras FISH positivas e negativas. Se os procedimentos experimentais forem alterados, tais como o método de pré-tratamento das amostras ou a mudança de equipamento, o limiar pode variar, pelo que deve ser redefinido de acordo com as novas condições experimentais estabelecidas.

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±1 °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 mergulhar a lâmina na solução de lavagem.
	Armazenamento inadequado das sondas ou das lâminas de amostra	Armazene as sondas abaixo de -15 °C no escuro; seque as lâminas não hibridizadas para armazenamento a longo prazo a -20 ± 5 °C ou armazenamento a curto prazo (geralmente não mais do que duas semanas) à temperatura ambiente; Armazene as lâminas hibridizadas a -20 ± 5 °C no escuro.
	Seleção inadequada do conjunto de filtros para observação	Use o conjunto de filtros correto para observar a fluorescência da sonda.
Fundo excessivamente intenso nas lâminas	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.
	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 °C e descarte o reagente se estiver turvo ou contaminado.
Contracoloração muito fraca	Umidade de hibridização muito alta ou muito baixa	Ajuste a umidade da hibridização para o nível ideal.
	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 °C no escuro; certifique-se de que a solução de coloração não esteja vencida.













Limitações dos métodos de teste

1. Este kit é baseado na técnica de hibridização in situ por fluorescência para a detecção da translocação de dupla fusão do gene PML/RARa.
2. Este kit é aplicável a amostras celulares.

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

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

Sonda Evolume PML/RARa Dual Color, Dual Fusion FISH, kit

Evolume PML/RARa Dual Color, Dual Fusion FISH Probe Kit

Solamente para uso en investigación (RUO)

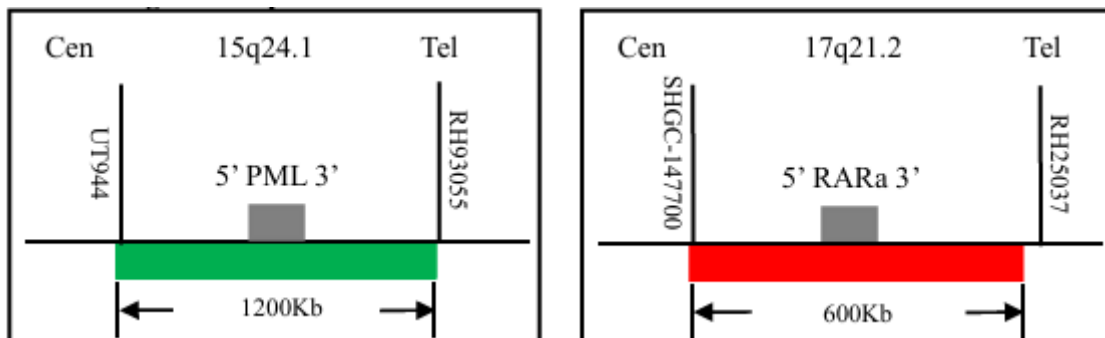
Nombre: Sonda Evolume PML/RARA Dual Color, Dual Fusion FISH, kit

Especificaciones de embalaje

Referencia	Descripción	Tamaño del Kit
EP-13-10271	Sonda PML/RARa Dual Color, Dual Fusion FISH, kit	5 Testes/Kit
EP-13-10272	Sonda PML/RARa Dual Color, Dual Fusion FISH, kit	10 Testes/Kit
EP-13-10273	Sonda PML/RARa Dual Color, Dual Fusion 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 hibridizar, 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 cumplimiento de onda específico después de ser excitadas por una fuente de luz y la hibridación al cromosomas puede ser observadas directamente por medio de un microscopio equipado con un conjunto adecuado de filtros. Esa técnica permite detectar con precisión alteraciones cromosómicas y consecuentemente, evaluar el estado de los genes localizados en las regiones afectadas de los cromosomas.

Principales componentes

Especificaciones	Contenido del Kit	Principales componentes	Volumen	Cantidad
5 testes/kit 10 testes/kit 20 testes/kit	Sonda PML/RARa (PML sonda verde, RARa sonda naranja)	Sonda PML/RARa, formamida, SSC, sulfato de dextrano etc	50 µl 100 µl 200 µl	1 frasco
	DAPI Medio de Montaje	Regente antifade, DAPI y glicerina, 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 necesario mas no promovidos en el kit

- Rubber cement
- 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
- Metanol
- Acido acético glacial
- 0.075M Clorato de potasio (KCl)
- Pepsina (250 U/mg)

Instrumentos necesarios

- Microscopio de fluorescencia
- Pipeta de microlitro e 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× y 100×. Se recomienda de que antes de utilizar la sonda, el usuario solicite al proveedor del conjunto de filtros los detalles del conjunto de filtros a ser utilizado, de modo de escoger el conjunto de filtros compatibles con los colorantes fluorescencia.

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 transportados bajo temperatura controlada entre 2 °C y 8 °C. El tiempo de envío no debe exceder los 10 días. Durante el transporte, la temperatura no debe superar la temperatura ambiente.

Plazo de validez: 12 meses.

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

Requisitos de muestras

1. Tipo de muestra: Las muestras celulares, tales como las células cultivadas.
2. Almacenamiento de muestra: Utilice la muestra dentro de 2 horas después de la recolección o almacene entre 2°C a 8°C

Método de teste

A – Preparo de las soluciones

Regentes de lavaje etanol

Prepare diluciones v/v de 70% y 85% utilizando etanol a 100% y agua purificada. Las diluciones puede ser utilizadas durante 1 semana, a 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.

Soluciones pre tratamiento

Solución 2×SSC

- Para preparar, junte:

100 ml	20×SSC pH5.3
<u>900 mL</u>	Agua purificada
1000 mL	Volumem final.

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

0.4×SSC/0.3% NP-40

- Para preparar, junte:

20ml	20×SSC pH5.3
877 mL	Agua purificada
<u>3ml</u>	NP40
1000 mL	Volumen final.

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

2×SSC/0.1% NP-40

- Para preparar, junte:

100 mL	20× SSC pH 5.3
849 mL	Agua purificada
1 mL	NP-40
1000 mL	Volumen Final

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

Solução 50 mg/ml Pepsina

- Para preparar. Junte:

25 mg	Pepsina (250U/mg)
500 ul	Agua purificada
500 ul	Volumen final

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

Tampão enzimático (pH 2.0 HCl)

- Para preparar. Junte:

10 mL	1 M HCl
900mL	Agua purificada
1000 mL	Volumen final

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

Tratamiento de muestra

Nota: El fijador (3:1 metanol: ácido glacial) debe ser preparado diariamente.

1. Retirar 5-10 ml de muestras celulares, centrifugue a 1500 rpm durante 5 minutos y remueva cuidadosamente la flota.
2. Adiciones 10ml de 0,075 M KCl re caliente a 37°C a tubo de centrifugue la mezcla y las sustancias pipeteando suavemente
3. Coloque el tubo de centrifugue en baño maria a 37°C por 30 minutos
4. Adiciones 1 ml de solución fijadora reciente, mezcle las sustancias pipeteando suavemente y pre inmovilice a temperatura ambiente por 8 minutos
5. Mezcle las sustancias con una pipeta y centrifugue la mezcla a 1500 rpm durante 8 minutos.
6. Remueva la flota, adiciones 10ml de solución fijadora fresca a precipitado, mezcle las sustancias pipeteando suavemente y deje la mezcla reposar a temperatura ambiente durante 8 minutos.
7. Centrifugue la mezcla a 1500 rpm durante 8 minutos.



8. Repita los pasos de lavaje arriba hasta que el sedimento celular este completamente limpio.

Preparación de la lamina

1. Utilice laminas limpias
2. Después re suspender las células, retire 3 µl de la suspensión y coloque en diferentes posiciones en la lamina, evitando sobre posiciones
3. Seque la lamina en temperatura ambiente.
4. Use una lente objetiva de 20× para observar la densidad celular en tres áreas sob un microscopio de contraste de fase, es necesario que las células no se sobre ponen y que el número de las células sea de 100 a 200; Si las células se sobre ponen, adicione una cantidad adecuada de solución fijadora fresca para diluir la suspensión celular, después mezclar, retire otra suspensión de 3µl para la preparación de la lamina. Si la densidad celular es baja, centrifugue la suspensión, remueva cuidadosamente una cantidad adecuada del sobrenadante y después mezclar, retire otra suspensión de 3 µl para la preparación de la lamina, enseguida, seque la lamina para la observación
5. En el microscopio de contraste de fase, se tiene muchos fragmentos celulares, es necesario hacer un pre tratamiento y seleccionar la área de hibridación adecuada.

Nota: Es necesario por lo menos una lamina extra para cada muestra, la suspensión celular restante puede ser almacenada a 2-8°C por 1 mes, para que las laminas puedan ser preparadas nuevamente, si es necesario.

Preparación

Nota: La solución de pepsina a 0,1 mg/ml (retire 100 µl de la solución madre de pepsina a 50mg/ml, adicione 50 ml de tampón enzimático y mezcle bien) debe ser preparada diariamente.

1. Encienda el baño maria del termostato y ajuste la temperatura para 37°C, coloque 50ml de solución de pepsina 0,1mg/ml en el frasco Coplin, coloque el frasco en baño maria y re caliente a 37°C
2. Antes de elución ajuste la temperatura del baño maria de termostato para 68°C, coloque la solución de lavaje en el frasco Coplin y coloque el baño maria por lo menos 30 minutos, certificarse que la temperatura de solución de lavaje alcance 68+1°C antes del uso.

Proceso del teste

Pre tratamiento muestra.

1. Sumergir la lamina en solución 2×SSC a temperatura ambiente durante 10 minutos
2. Coloque la lamina en solución de pepsina a 37+1° y 0,1mg/ml para dirigir durante 10 minutos
3. Sumergir la lamina en la solución 2×SSC a temperatura ambiente durante 2 minutos
4. Deshidrate la lamina en etanol a 70%, etanol a 85% y etanol a 100% sucesivamente, durante 1 minuto cada.
5. Seque la lamina a temperatura ambiente

Desnaturalización e hibridación de muestra.

1. Coloque la tira humidificadora en el compartimiento correspondiente del hibridador después de sumergir en agua destilada y certificarse de que la superficie del instrumento de hibridación sea limpia y libre de materias extrañas.
2. Insiera la lamina en el hibridador y ejecute el programa conforme descrito a seguir: Desnaturalización a 85°C por 5 minutos e 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.

1. Retirar las sondas del congelador, agite suavemente y centrifugue, después retornar las sondas a temperatura ambiente. Enseguida, pipetee 10 µL de la sonda y aplique sobre la área alba de la lamina.
2. Coloque la lamínula, evitando la formación de burbujas de aire, y selle las bordas de la lamínula con Rubber Cement
3. Coloque la lamina sellada en el hibridizador y inicie el programa de desnaturalización e hibridación

Lavaje después de la hibridación

1. Re caliente la solución de 0,4× SSC/0,3% NP-40 a 68 ± 1 °C, mantenga la solución de 2× SSC/0,1% NP-40 a temperatura ambiente.
2. Después de la conclusión de hibridación, retire la lamina y remueva el Rubber Cement y la lamínula de la lamina.
3. Coloque la lamina en la solución de 0,4× SSC/0,3% NP-40 a 68 ± 1 °C sumergirla, enjuagando durante 2 minutos
4. Coloque la lamina en la solución de 2× SSC/0,1% NP-40 a temperatura ambiente y sumergir por 1 minuto
5. Retire la lamina, absorba la solución residual, coloque la lamina en etanol a 70% a temperatura ambiente y enjuague por 1 minuto.
6. Seque la lamina naturalmente al aire libre, en lo oscuro para uso posterior

Contra coloración

1. Adicione 10 µl de la solución de contra colorante em la area de hibridación (evitando burbujas), coloque la lamínula, remueva cuidadosamente el exceso de la solución de contra colorante con papel absorbente y contracore la lamina en lo oscuro por 10 minutos.

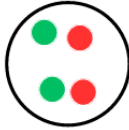

Observación: La lamina contracore debe ser examinada inmediatamente en un microscopio de fluorescencia o almacenada a -15°C o menos, en lo oscuro, para observación posterior. La lamina almacenada debe ser calentada a temperatura ambiente antes de ser visualizada en el microscopio.

Visualización de la lamina y recolección de datos

1. Observe la lamina en un microscopio de fluorescencia equipado con los conjuntos de filtros apropiados
2. Coloque una gota de aceite de inmersión sobre la lamínula en la área donde esta localizada la muestra. Encuentre la muestra utilizando la objetiva de 10× , enseguida, examine los señales sob la objetiva de 100×.
3. Ajuste el foco encontrar la área observable que tenga limites nucleares completos, coloración uniforme y señales claros sin sobre posición de núcleos.
4. En la región seleccionada, encuentre todos los puntos de señal en diferentes planos de núcleos y cuente los señales fundidos y los señales individuales naranja y verde. Cuando los puntos de señale naranja (O) y verde (G) se sobre ponen o la distancia entre ellos es menor que el diametro de un punto de señal, ese señales son contabilizados con un señal de fundido (Amarillo F). Nucleos sin señal o con señal flacos no son contabilizados.



Interpretación de los señales

Escenario FISH	
202G (2 naranja / 2 señales verdes)	
Escenario FISH	
2F101G (2 amarillo / 1 naranja / 1 señal verde)	

Determinación del umbral para muestras negativas para FISH

Veinte muestras sin alteraciones genéticas conocidas para el conjunto de sondas FISH fueron seleccionadas aleatoriamente para preparar las laminas de control. Después de hibridación, cuente 200 células de cada lamina de control y registre cualquier tipo de padrones de señal considerados positivos para FISH. Calcule el porcentaje de señales positivas observados y determine el desvió de padrón. El limite para muestras negativas para FISH es definido como el valor medio de porcentaje mas 3 veces el desvió padrón. Las muestras de control o negativas para FISH son generalmente escogidas por ser del mismo tipo de tejido o de celula que el albo pretendido de detección por FISH.

Importancia de determinación del umbral

El umbral debe ser definido cuando las sondas son utilizadas por la primera vez, una vez que este valor sirva de referencia para distinguir muestras FISH positivas y negativas. Si el procedimientos experimentales fueron alterados, tal como el método de pre tratamiento de muestras o de la mudanza de equipamiento, el umbral puede variar, por lo que debe ser redefinir de acuerdo con las nuevas condiciones experimentales establecidas.

Interpretación de los resultados de los testes

Problemas comunes y soluciones en el proceso del teste.

Problema	Posible causa	Solución 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 de la sonda sea aspirado por la pipeta.
	Cantidad insuficiente de las sondas	Certificarse de que la sondas alcancen la temperatura ambiente antes del uso y de que el regente de la sonda sea aspirado por la pipeta.
	Secado insuficiente de la lamina	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 laminula inmediatamente después de la adición de las sondas; para elución, remueva la laminula de apenas una lamina por vez y sumergir la lamina en la solución de lavaje inmediatamente antes de retirar la laminula de la próxima lamina.
	Burbujas sob la laminula durante la hibridación	Cubra la superficie de las sondas con la laminula y presione suavemente para eliminar las burbujas del aire.
	Condiciones inadecuadas de hibridación	Garantir el cumplimiento del tiempo y de la temperatura de hibridaciones especificas; no deje ninguna abertura al sellar la lamina con medio de montaje. Ajuste el tiempo de hibridaciones y la humedad conforme necesario.
	Solución de lavaje incorrecta o condiciones de elución inadecuadas	Certificarse de que la solución de lavaje sea preparada de acuerdo com la IFU; Garantir que la temperatura de la solución de lavaje alcance la especificada etapa de elución; Remueva la laminula antes de sumergir la lamina en la solución de lavaje.
	Almacenamiento inadecuado de las sondas o de las laminas de muestra	Almacene las sondas abajo de -15°C en lo oscuro; seque las laminas no hibridizadas para almacenamiento a lejos plazo a -20+5°C o almacenamiento a corto plazo (generalmente no mas que dos semanas) a temperatura ambiente; Almacene las laminas hibridizadas a -20+5°C en lo oscuro
	Selección inadecuada del conjunto de filtros para observación	Use el conjunto de filtros correcto para observar la fluorescencia de sonda. .
Fundo excesivamente intenso en las laminas	Estrutura inadeguada do microscópio e lente objetiva para observação de amostras FISH, ou dano no conjunto de filtros	Entre en contacto con el fabricante del microscopio.
	Lavaje insuficiente de las laminas antes del preparo de la muestra	Sumergir la lamina en etanol absoluto y seque con papel absorbente 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 utilización; certificarse de que la temperatura de la solución de lavaje esta correcta; remueva la lamina y repita y etapa de elución.
	Uso prolongado o almacenamiento inadecuado de la 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	Remueva la laminula y sumergir la lamina en la solución de lavaje por 5 minutos a temperatura ambiente. Coloque la lamina en la soluciones de etanol a 70%, 85% y 100% por 1 minuto cada para la deshidratación gradiente 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 en lo oscuro; certificarse de que la solución de coloración no este vencida



Limitaciones de los métodos del teste

1. Este kit es basado en la técnica de hibridación in situ por fluorescencia para la detección de la translocación de dupla fusión del gen PML/RARa.
2. Este kit es aplicable a muestras celulares.

Precauciones

1. Este kit se destina apenas para finales de investigación
2. Durante la utilización de este kit, es necesario usar guantes de látex para evitar el contacto del regente, con la piel. En caso de contacto accidental. Lave inmediatamente con agua en abundancia.
3. Las muestra no deben ser expuestas a ácidos y alcoholes calientes en exceso, por que puede dañar el DNA e comprometer el resultado del teste FISH
4. Todos los componentes del kit deben utilizados dentro del plazo de 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 teratógeno llamado formamida. El contacto con la piel y las membranas mucosas debe ser evitado.
7. Para obtener los resultados ideales, es necesario garantizar que los regentes sean preparados y almacenados adecuadamente, de acuerdo con las instrucciones de uso.

Explicaciones de los señales

	Limite superior de temperatura		Mantenga seco
	No use la embalaje si esta dañada		Consulte las instrucciones De uso
	No utilizar		Mantener lejos de la luz solar
	Utilizar hasta		Numero del lote
	Numero de referencia		Fabricante
	Fecha de fabricación		Contiene cantidad Suficiente para <n> testes

Sonda Evolume PML/RARa Dual Color, Dual Fusion FISH, kit
Evolume PML/RARa Dual Color, Dual Fusion FISH Probe Kit

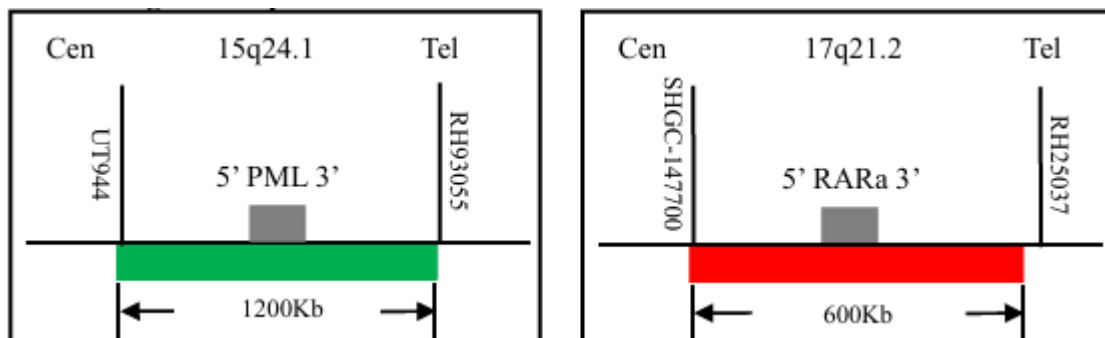
Product Name: Evolume PML/RARa Dual Color, Dual Fusion FISH Probe Kit

Packaging Specifications

Reference	Description	Kit Size
EP-13-10271	PML/RARa Dual Color, Dual Fusion FISH Probe Kit	5 Tests/Kit
EP-13-10272	PML/RARa Dual Color, Dual Fusion FISH Probe Kit	10 Tests/Kit
EP-13-10273	PML/RARa Dual Color, Dual Fusion FISH Probe 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	PML/RARa probe (PML green probe, RARa orange probe)	PML/RARa probe, formamide, SSC, and dextransulfate, 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
- 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
- Methanol
- Glacialaceticacid
- 0.075M Potassium chloride (KCl)
- 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 must be transported under controlled temperature conditions between 2 °C and 8 °C. The shipping time must not exceed 10 days. During transport, the temperature must not exceed room temperature.

Shelf life: 12 months.

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

Sample Requirements

1. Sample type: Cell samples, such as Cultured cell.
2. Sample storage: Use the sample within 2 hours after sampling, or store it at 2°C-8°C.

Test Methods

Preparation of Working Reagent

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

2×SSC solution

- To prepare, add together:

100ml	20×SSCpH5.3
<u>900 mL</u>	Purified water
1000 mL	Final Volume

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

0.4×SSC/0.3% NP-40

- To prepare, add together:

20 mL	20× SSC pH 5.3
877 mL	Purified water
<u>3 mL</u>	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.

2×SSC/0.1%NP-40



- To prepare, add together:

20 mL	20× SSC pH 5.3
849 mL	Purified water
<u>1 mL</u>	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.

50 mg/ml Pepsin solution

- To prepare, add together:

25 mg	Pepsin (250U/mg)
<u>500µl</u>	Purified water
1000 mL	Final volume

Mix thoroughly until it is fully dissolved. Dispense at 100µl per vial, and store the vials at $-20 \pm 5^\circ\text{C}$; avoid repeated freezing and thawing.

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 ± 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.

Sample treatment

Note: Fixative (3:1 methanol: glacial acetic acid) should be prepared fresh daily.

- Take 5-10 ml cell samples, centrifuge them at 1500 rpm for 5 minutes, and remove the supernatant carefully.
- Add 10ml 0.075M KCl preheated to 37°C into the centrifuge tube, and mix the substances by pipetting gently.
- Place the centrifuge tube in the 37°C water bath for 30 minutes.
- Add 1ml fresh fixative solution, mix the substances by pipetting gently, and pre-immobilize at room temperature for 8 minutes.
- Mix the substances by pipetting and centrifuge the mixture at 1500 rpm for 8 minutes.
- Remove the supernatant, add 10ml fresh fixative solution to the precipitate, mix the substances by pipetting gently, and let the mixture stand at room temperature for 8 minutes.
- Centrifuge the mixture at 1500 rpm for 8 minutes.
- Repeat the above washing steps until the cell pellet is washed clean.

Slide preparation

1. Take a clean object slide.
2. After resuspending the cells, take 3µl suspension and drop it to different positions on the object slide, avoiding overlap.
3. Dry the slide at room temperature.
4. Use a 20× objective lens to observe the cell density in three areas under a phase-contrast microscope; it is required that the cells have no overlap and the number of cells is 100-200; ① If the cells overlap, add an appropriate amount of fresh fixative solution to dilute the cell suspension, and after mixing, take another 3µl suspension for slide preparation; ② If the cell density is low, centrifuge the suspension, carefully remove an appropriate amount of supernatant, and after mixing, take another 3µl suspension for slide preparation; then dry the slide for observation.
5. Under the phase-contrast microscope, if there are too many cell fragments, it is necessary to do pretreatment and select the appropriate hybridization area.

Note: at least one extra slide is required for each sample, and the remaining cell suspension can be stored at 2-8°C for 1 month, so that slides can be re-prepared if necessary.

Preparation of instruments

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

1. Turn on the thermostat water bath and set the temperature to 37°C. Pour 50 ml 0.1 mg/ml Pepsin solution into the Coplin jar, put the jar in the water bath, and preheat it to 37°C.
2. Before elution, set the temperature of the thermostat water bath to 68°C, pour the washing solution into the Coplin jar, and place the jar in the water bath for at least 30 min. Ensure that the temperature of the washing solution reaches 68±1°C before use.

Testing process

Sample pretreatment

1. Immerse the prepared slide in 2×SSC solution at room temperature for 10 min.
2. Place the slide in 37±1°C 0.1 mg/ml Pepsin solution to digest for 10 min.
3. Immerse the slide in 2×SSC solution at room temperature for 2 min.
4. Dehydrate the slide in 70% ethanol, 85% ethanol and 100% ethanol in turn for 1 min each.
5. Dry the slide at room temperature.

Sample denaturation and hybridization

1. Place the moisturizing strip in the corresponding slot of the hybridization instrument after soaking it in purified water, and ensure that the surface of the hybridization instrument is clean and free of foreign matter.
2. The denaturation and hybridization program is set as follows: denaturation: 85°C, 5 min; hybridization: 42°C, 16-18 hours.

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

1. Take out the probes from below -15°C storage, swirl and centrifuge them after they return to room temperature, take 10 µl probes, and drop them onto the target area of the slide.
2. Place the cover slide, avoiding air bubbles, and seal the edge of the cover slide with Rubber Cement.



- Put the sealed slide on the hybridization instrument and start the denaturation and hybridization program.

Post-hybridization wash

- Preheat 0.4× SSC/0.3% NP-40 to 68±1°C, and place 2× SSC/0.1% NP-40 at room temperature.
- After the hybridization is completed, take out the cell slide, and remove the fluoro gel and cover slide from the cell slide.
- Put the slide in 68±1°C 0.4× SSC/0.3% NP-40, and immerse and rinse it for 2 min.
- Put the slide in 2× SSC/0.1% NP-40 at room temperature, and immerse it for 1 min.
- Put the slide in 70% alcohol solution, and wash it for 1 min.
- Take out the slide and dry it naturally in the dark.

Counterstaining

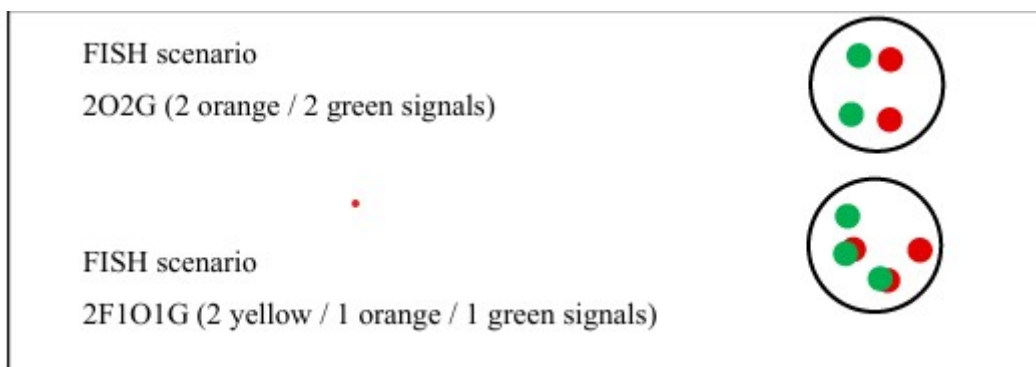
- Drop 10 µl counterstaining solution to the hybridization area (avoiding bubbles), place the coverslip, carefully remove the excess counterstaining solution with absorbing paper, and counterstain the slide in the dark for 10 minutes.

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.

Result analysis

- View the slide under a fluorescence microscope equipped with proper filter sets.
- 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.
- Adjust the focus to find the observable area that has complete nucleus boundary, uniformed staining, and clear signals without overlapping nuclei.
- 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



Threshold Determination for FISH Negative Specimen

Twenty specimens without the known genetic abnormalities to the FISH probe set were randomly selected to prepare control slides. After hybridization, count 200 cells from each control slide and record any types of signal patterns that are considered to be FISH positive. Calculate the percentage of positive signals observed and determine the standard deviation. The threshold for FISH negative specimen is set as the average value of percentage plus 3 times of the standard deviation. The control or FISH negative specimens are usually chosen to be the same type of tissue or cell as that of the intended target of detection by FISH.

Importance of Threshold Determination

The threshold must be set when probes are used for the first time since this value will be served as the reference to distinguish FISH positive and negative specimens. If the experimental procedures are altered such as the method of specimen pre-treatment or change of equipment, the threshold may vary therefore must be reset under the newly established experimental conditions.

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 $85 \pm 1^\circ\text{C}$ 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.
	Bolhas sob a lâmina durante a hibridização	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 $-20 \pm 5^\circ\text{C}$ or short-term storage (generally no more than two weeks) at room temperature; Store the hybridized slides at $-20 \pm 5^\circ\text{C}$ in the dark.
	Inappropriate selection of filter set for observation	Use the correct filter set to observe the probe fluorescence.
Excessively intense background of slides	Inappropriate microscope structure and objective lens for observing FISH samples, or damage of the filter set	Please contact the microscope manufacturer.
	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 $2-25^\circ\text{C}$, and discard the reagent if it is turbid or contaminated.
Too weak counterstaining	Too high or too low hybridization humidity	Adjust the hybridization humidity to the optimum.
	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 PML/RARa gene Dual Fusion Translocation.
2. This kit is applicable to cell 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