

Sonda Evolume EWSR1Break-Apart FISH, kit

Evolume EWSR1 Break-Apart FISH Probe Kit

Somente para uso em pesquisa (RUO)

Nome: Sonda Evolume EWSR1 Break Apart FISH, kit

Especificações da embalagem

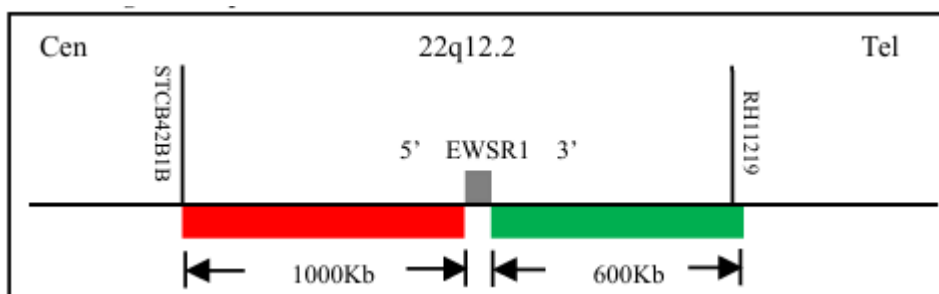
Referência	Descrição	Tamanho Kit
EP-13-11241	Sonda EWSR1 Break Apart FISH, kit	5 Testes/Kit
EP-13-11242	Sonda EWSR1 Break Apart FISH, kit	10 Testes/Kit
EP-13-11243	Sonda EWSR1 Break Apart FISH, kit	20 Testes/Kit

Intenção de uso

O Kit de Sonda FISH Break-Apart para EWSR1 é um teste utilizado para detectar rearranjos envolvendo o gene EWSR1 por meio da técnica de hibridização in situ por fluorescência (FISH) em amostras biológicas, fornecendo ao médico informações de apoio para a avaliação diagnóstica.

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, ou 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, portanto, 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 EWSR1 (EWSR1,5' sonda laranja, EWSR1,3' sonda verde)	EWSR1 sonda, formamida, SSC, e dextran sulfato, etc.	50 µl 100 µl 200 µl	1 frasco
	DAPI Meio de Montagem	Antifade reagente ,DAPI, e glicerin,etc.	50 µl 100 µl 200 µl	1 frasco

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

2. Reagentes necessários mas não fornecidos no kit:

- Rubber cement
- Solução para desparafinação
- Etanol absoluto
- Água purificada
- 0,5M EDTA pH8.0
- 2M Tris-HCL pH8.0
- 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)

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.

Instrumentos necessários

- Microscópio de fluorescência
- Pipeta de microlitro e ponteiros esterilizados
- 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.

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 0,5-1 hora após serem removidos. O tamanho do tecido não deve exceder 0,5 cm³ 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

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.

Solução 1× EDTA (10 mM EDTA, 10 mM Tris-HCL)

Para preparar, junte:

- 20 mL 0,5 M EDTA pH8.0
- 5 mL 2 M tris-HCL pH 8.0
- 975 mL Purified water
- 1000 mL Volume Final

Misture bem. Meça o pH em temperatura ambiente utilizando um pHmetro. Ajuste o pH para $8,1 \pm 0,1$ com NaOH 1 N ou 2 N. Ajuste o volume para 1 litro com água purificada. Caso o reagente esteja turvo ou contaminado, ele 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 $7,0 \pm 0,2$ 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.

Preparação

Nota: Observação: deve-se preparar diariamente uma solução de pepsina a 2 mg/ml (utilize 100 mg de pepsina, adicione 50 ml de tampão enzimático e misture bem).

1. Ligue o banho-maria e ajuste a temperatura para 90 °C. Coloque a Solução de Pré-tratamento (ou solução EDTA 1×) no frasco Coplin, posicione o frasco no banho-maria e pré-aqueça até 90 °C.
2. Ligue o banho-maria e ajuste a temperatura para 37 °C. Adicione 50 mL da solução de pepsina a 2 mg/mL no frasco Coplin, coloque o frasco no banho-maria e pré-aqueça até 37 °C
3. Antes da lavagem pós-hibridização, ajuste a temperatura do banho-maria termostaticado para 68°C. Adicione a Solução de Lavagem 2× SSC/0,3% NP-40 em um 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 ± 1 °C antes do uso. Adicione também a Solução de Lavagem 2× SSC/0,3% NP-40 em outro frasco Coplin e mantenha-o à temperatura ambiente.

Processo de teste

Pré-tratamento amostra

1. Preaqueça a lâmina a 65 °C por 5 minutos em estufa ou utilizando um equipamento de hibridização, 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 xilol, 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 90 °C e incube por 20 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 2 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 até a 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 equipamento de hibridização 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 e lave-a por 1 minuto com a Solução de Lavagem 2× SSC/0,3% NP-40 previamente equilibrada à temperatura ambiente.
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

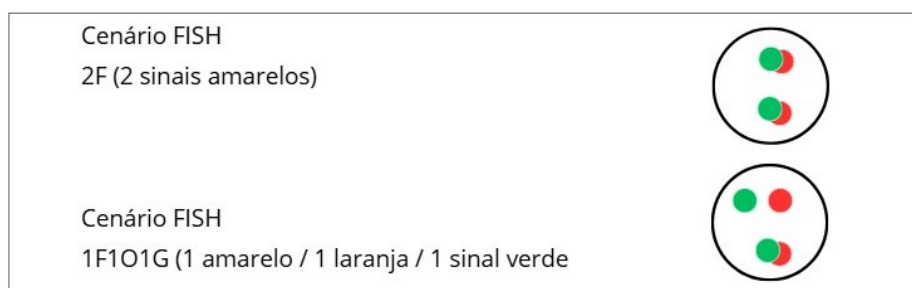
1. Coloque 10 µl de solução de contra-coloração na área de hibridização (evitando bolhas), coloque a lamínula, remova cuidadosamente o excesso de solução de contra-coloração com papel absorvente e contra-colora a lâmina no escuro durante 10 minutos.

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. 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, identifique todos os pontos de sinal em diferentes planos dos núcleos e conte os sinais fusionados e os sinais individuais laranja e verde. Quando os pontos de sinal laranja (O) e verde (G) se sobrepõem ou quando a distância entre eles é menor que o diâmetro de um ponto de sinal, devem ser considerados como um sinal fusionado (amarelo, F). Os núcleos sem sinais ou com sinais fracos não devem ser contabilizados.

Interpretação dos sinais



Determinação do limiar para amostras negativas para FISH

Vinte amostras sem anomalias 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 limite deve ser definido quando as sondas forem utilizadas pela primeira vez, uma vez que este valor servirá como 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 limite poderá variar, pelo que deverá 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 $85 \pm 1^\circ\text{C}$ 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 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 $-20 \pm 5^\circ\text{C}$ 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.
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 se baseia na técnica de hibridização in situ por fluorescência para a quebra do gene EWSR1.
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 teratogênico 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 EWSR1Break-Apart FISH, kit

Evolume EWSR1 Break-Apart FISH Probe Kit

Solo para uso en investigación (RUO)

Nombre: Sonda Evolume EWSR1 Break Apart FISH, kit

Especificaciones de embalaje

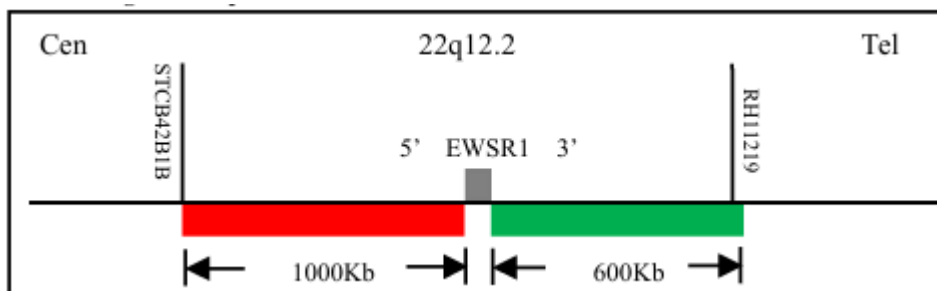
Referencia	Descripción	Tamaño Kit
EP-13-11241	Sonda EWSR1 Break Apart FISH, kit	5 Testes/Kit
EP-13-11242	Sonda EWSR1 Break Apart FISH, kit	10 Testes/Kit
EP-13-11243	Sonda EWSR1 Break Apart FISH, kit	20 Testes/Kit

Intención de uso

El kit de sonda FIEIS Break-Apart para EWSR1 es un teste utilizando para detectar re ordenamientos envolviendo el gen EWSR1 por medio de técnica de hibridación in situ por fluorescencia (FISH) en muestras biológicas, promoviendo al medico informaciones de apoyo para la evaluación diagnósticos.

Principio del teste

Descripción de 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 o sondas, marcados con fluoroforos para hibridismo por medio de mecanismo de complementariedad de bases, las regiones – albo de los cromosomas en muestras de pacientes. Las sondas emiten señal de fluorescencia en un cumplimiento 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 filtro. Esa técnica permite detectar con precisión alteraciones cromosómicas y por tanto, evaluar el estado de los genes localizados en las regiones afectadas de los cromosomas.

Principales componentes

Especificación	Conteúdo del Kit	Principales componentes	Volumen	Cantidad
5 testes/kit 10 testes/kit 20 testes/kit	Sonda EWSR1 (EWSR1,5' sonda naranja, EWSR1,3' sonda verde)	EWSR1 sonda, formamida, SSC, y sulfato de dectrán, etc.	50 µl 100 µl 200 µl	1 frasco
	DAPI Medio de Montaje	Reactivo 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.

2. reactivos necesario mas no promovidos del kit

- Rubber cement
- Solución para desparafinización
- Etanol absoluto
- Agua purificada
- 0,5M EDTA pH8.0
- 2M Tris-HCL pH8.0
- 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 sódio, pH 5.3)
- NP-40
- Tio cianato de sodio
- Pepsina (250 U/mg)

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 sob la temperatura controlada en tre 2°C y 8°C. El tiempo de envío no debe exceder 10 días. Durante el transporte, la temperatura no debe ultra pasar la temperatura ambiente.

Plazo de validez: 12 meses

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

Instrumentos necesario

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

Notas: Microscopio de fluorescencia. La configuración de microscopio de fluorescencia necesario incluya: ocular 10× gafas objetivas 10×, 40× e 100×. Se recomienda que antes de utilizar la sonda, el usuario solicite el proveedor del conjunto de filtros los detalles del conjunto de filtros a ser usado, de modo a escoger un conjunto de filtros compatible con los colorantes 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.

Requisitos de muestra

1. Tipo de muestra: Tejido fijado en formalina e incluido en parafina. Se recomienda que sean seleccionadas las 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 0,5-1 hora después de ser removidos. El tamaño de tejido no debe exceder 0,5 cm³ y la espesura recomendada de la sección es de 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 de teste

Preparo de las soluciones

Reactivo 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 ocurra 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:
80 g Tiocianato de sódio
800 mL Agua purificada
1000 mL Volume final.

Mezcle bien. Ajuste el volumen para 1 litro con agua purificada. Filtre a través de una unidad de filtración con poros de 0,45 µm. Deseche la solución usada al final de cada día. Si el reactivo esta turbio o contaminado, debe ser desechado inmediatamente.

Solución 1× EDTA (10 mM EDTA,10 mM Tris-HCL)

Para preparar, junte:

20 mL	0,5 M EDTA pH8.0
5 mL	2 M tris-HCL pH 8.0
975 mL	Purified water
1000 mL	Volumen Final



Mezcle bien. Mida el pH en temperatura ambiente utilizando un pH-metro. Ajuste el pH para 8,1±0,1 con NaOH 1 N o 2 N. Ajuste el volumen para 1 litro con agua purificada. Caso el reactivo este turbio o contaminado, debe ser desechado inmediatamente.

2× SSC /0.3% NP-40 Solución de lavaje

- Para preparar, junte:

100 mL	20× SSC pH 5.3
847 mL	Agua purificada
3 mL	NP-40
1000 mL	Volumen Final

Mezcle bien. Mueva el pH a temperaturas ambiente utilizado 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. Si el reactivo esta turbio o contaminado, debe ser desechado inmediatamente.

Tampón 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 1 M. Ajuste el volumen para 1 litro con agua purificada. Si el reactivo esta turbio o contaminado, debe ser desechado inmediatamente.

Preparación

Nota: Observación: Se debe preparar diariamente en una solución de pepsina a 2 mg/ml (utilice 100 mg de pepsina, adicione 50 ml de tampón enzimático y mezcle bien)

1. Ascienda el baño maría y ajuste la temperatura para 90°C, coloque la solución de pre tratamiento (o solución EDTA 1×) en el frasco Coplin, posicione el frasco en baño maría y re caliente hasta 90°C.
2. Ascienda el baño maría y ajuste la temperatura para 37°C. Adiciones 50 mL de la solución de pepsina a 2mg/mL en el frasco Coplin, coloque el frasco en baño maría y re caliente hasta 37°C.
3. Antes del lavaje después de la hibridación, 2× SSC/0,3% NP-40 en un frasco Coplin y coloque en frasco en baño maría por lo menos 30 minutos. Certificarse de que la temperatura de la solución de lavaje alcance 68±1 °C antes del uso. Adicione también la solución de lavaje 2× SSC/0,3% NP-40 en otro frasco Coplin y mantener la temperatura ambiente.

Proceso de teste

Pre tratamiento de muestra

1. Re caliente la lamina a 65°C por 5 minutos en estufa o utilizando un equipamiento de hibridación, recomendada Ara (EP-31-20147/EasyPath) o equivalente.
2. Inmediatamente insiera la lamina re calentada en un soporte de laminas inmerso en la solución de desparafinización (del tipo de iso parafina) o xilol, e incube a temperatura ambiente por 15 minutos.
3. Después de la incubación, transfiera el soporte de laminas para una nueva solución de desparafinización recién preparada e incube por mas 15 minutos.

4. Después de la parafinización, remueva el soporte de laminas y coloque sobre el papel toalla por 2 minutos para drenar el exceso de líquido.
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. Re hidrate la lamina y use papel absorbente de agua para remover la solución residual de la lamina
8. Coloque la lamina en solución de pre tratamiento re caliente a 90°C e incube por 20 minutos.
9. Retire la lamina y sumergir en agua purificada por 1 minuto. Enseguida, retire y remueva el líquido residual.
10. Sumergir la lamina en solución pepsina 2mg/ml re caliente a 37°C 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 en temperatura

Des naturalización e hibridación de muestra

1. Caliente las sondas hasta la temperatura ambiente, agite suavemente para homogenizar, 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 laminilla (18 mm x 18 mm), evitando la formación de burbujas de aire, y selle la lamina con Rubber Cement.
3. Insiera la lamina en el calentamiento de hibridación 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 de la hibridación

1. Remueva cuidadosamente el Rubber Cement.
2. Coloque la lamina en solución de lavaje 2× SSC/0,3% NP-40 em frasco Coplin a temperatura ambiente para lavar la laminilla (2 a 5 minutos)
3. Retire la lamina e enjuague por 2 minutos con la solución de lavaje 2× SSC/0,3% NP-40 re caliente a 68±1°C
4. Retire la lamina y lavarla por 1 minuto con solución de lavaje 2× SSC/0,3% NP-40 previamente equilibrada a temperatura ambiente.
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

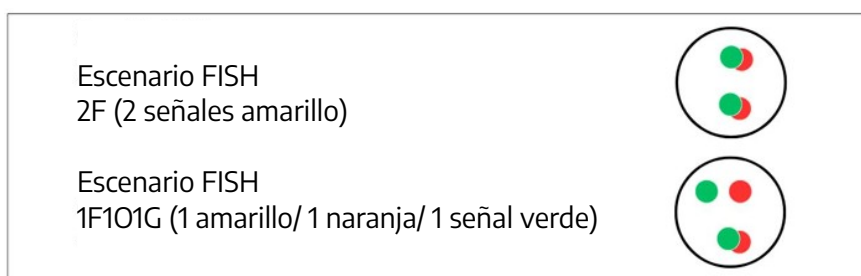
1. Coloque 10 µl de solución de contra coloración en la área de hibridación (evitando burbujas), coloque la laminilla, remueva cuidadosamente el exceso de solución de contra coloración con papel absorbente y contra colora la lamina en lo oscuro por 10 minutos.

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

Visualización de lamina y re colección de datos

1. Observe la lamina en el microscopio de fluorescencia equipado con los conjuntos de filtros apropiados
2. Coloque una gota de aceite de inmersión sobre la laminilla en la área donde esta localizada la muestra. Encuentre la muestra utilizando la objetiva de 10 \times , enseguida, examine los señales sob el objetivo de 100 \times .
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, identifique todos los puntos de señal en diferentes planos de núcleos y cuente señales fusionados y los señales individuales naranja y verde. Cuando las puntos de señal naranja (O) y verde (G) se sobre ponen o cuando la distancia entre ellos es menor que el diámetro de un punto de señal, deben ser considerados como un señal fusionado (amarillo F). Los núcleos sin señal o con señal flaco no deben ser contabilizados.

Interpretación de los señales



Determinación del umbral para muestras negativas para FISH

Veinte muestras sin anomalías genéticas conocidas para el conjunto de sondas FISH fueron seleccionadas aleatoriamente para preparar lamina de control. Después de la 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 los señales positivos observados y determine el desvío padrón. El limite para muestras negativas para FISH es definido como un valor medio de porcentaje mas de 3 veces el desvío padrón. Las muestras de control o negativas para FISH son generalmente escogidas para ser del mismo tipo de tejido o de célula que el albo pretende para detección por FISH.

Importancia de determinación del umbral

El limite debe ser definido cuando las sondas fueron utilizadas por la primera vez, una vez que este valor servirá como referencia para distinguir muestras FISH positivas e negativas. Si los procedimiento experimentales fueron alterados, tal como el método de pre tratamiento de muestras o de mudanza de equipamiento, el limite puede cambiar, por lo que debe ser redefinido de acuerdo con las nuevas condiciones experimentales establecidas.

Interpretación de los resultados de los testes.

Problema comunes y soluciones en el proceso de 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 reactivo de la sonda sea aspirado por la pipeta
	Cantidad insuficiente de las sondas	Certificarse de que las sondas alcancen la temperatura ambiente antes del uso y de que el reactivo de la sonda sea aspirado por la pipeta
	Secado insuficiente de las lamina	Antes de adicionar las sondas sobre a lamina, certificarse de que la solución de etanol en la lamina tenga evaporado completamente.
	Secado muy rápido de las sondas	Cubra la área – albo con la laminilla inmediatamente después de la adición de las sondas; para elución, remueva la laminilla de apenas una lamina por vez y sumergir la lamina de lavaje inmediatamente antes de remover la laminilla de la proxima lamina.
	Burbujas sob de la laminilla durante la hibridación	Cubra la superficie de las sondas con la laminilla y presione suavemente para eliminar las burbujas de aire.
	Condiciones inadecuadas de la hibridación	Garantir el cumplimiento del tiempo y de la temperatura de hibridaciones especificadas; 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 con el IFU; Garantir que la temperatura de solución de lavaje alcance la especificada etapa de elución; Remueva la laminilla 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 hibridadas para almacenamiento a un largo plazo a -20 +5°C o almacenamiento a corto plazo (generalmente no mas de que dos semanas) la temperatura ambiente; almacene las laminas hibridadas a -20+5°C en lo oscuro.
	Selección inadecuada de conjunto de filtros para observación	Use el conjunto de filtros correcto para observar la fluorescencia de la sonda.
Fundo excesivamente intenso en las laminas	Estructura inadecuada de microscopio y lente objetiva para observación de muestras FISH o daño en el conjunto de filtros	Entre en contacto con el fabricante do microscopio.
	Lavaje insuficiente de las laminas antes del preparo de muestra	Sumergir la lamina en etanol absoluto y seque con papel absorbente antes de colocar el reactivo.
	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 la solución de lavaje este correcta; remueva la lamina y repita la 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 reactivo se esta turbo o contaminado.
Contra coloración muy débil	Humedad de hibridación muy alta o muy baja	Ajuste la humedad de la hibridación para el nivel ideal.
	Contra coloración insuficiente	Remueva la laminilla 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, enseguida, realice la contra coloración.
	Vencimiento o exposición excesiva a la luz de 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 de teste

1. Este kit se basa en la técnica de hibridaciones in situ por fluorescencia para la quiebra del gen EWSR1
2. Este reactivo es aplicable a las secciones de tejido en parafina y ajuste el proceso de pre tratamiento de acuerdo con la espesura de las secciones de tejido o del tipo de muestras

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 de reactivo, con la piel. En caso de contacto accidental, lave inmediatamente con agua en abundancia
3. Las muestras no deben ser expuestas a Ácidos y alcoholes ni calentados en exceso, porque puede dañar el DNA y comprometer el resultado de teste FISH
4. Todos los componentes del kit deben ser utilizados dentro del plazo de validez.
5. La solución de coloración contiene DAPI que es un mutagenico. La inhalación, ingestión o contacto con la piel deben ser evitados.
6. Las sondas contienen un teratógeno llamado formamida. El contacto con la piel y las membranas mucosas debe ser evitado.
7. Para obtener resultados ideales, es necesario garantizar que los reactivos sean preparados y almacenados adecuadamente, de acuerdo con las instrucciones de uso.

Explicaciones de los señales

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

Sonda Evolume EWSR1Break-Apart FISH, kit

Evolume EWSR1 Break-Apart FISH Probe Kit

For Research Use Only (RUO)

Product Name: Evolume EWSR1 Break-Apart FISH Probe Kit

Packaging Specifications

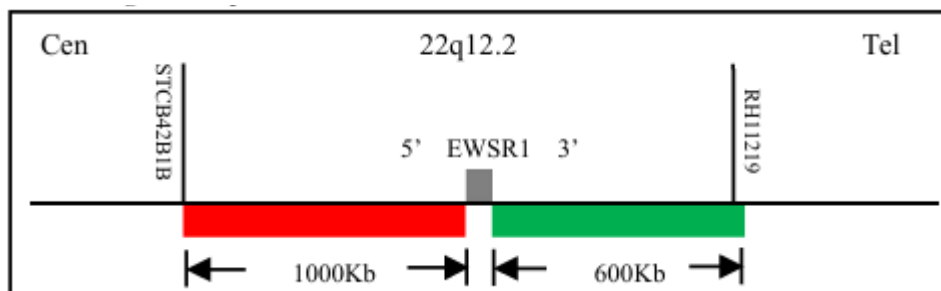
Reference	Description	Kit Size
EP-13-11241	EWSR1 BreakApart FISH Probe Kit	5 Tests/Kit
EP-13-11242	EWSR1 BreakApart FISH Probe Kit	10 Tests/Kit
EP-13-11243	EWSR1 BreakApart FISH Probe Kit	20 Tests/Kit

Intended Use

The EWSR1 BreakApart FISH Probe Kit is a test to detect rearrangements involving the EWSR1 gene via fluorescence in situ hybridization (FISH) in specimen to provide the physician with supporting information for evaluation.

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 10 tests/kit 20 tests/kit	EWSR1 probe (EWSR1,5' orange probe, EWSR1,3' green probe)	EWSR1 probe formamide, SSC, and dextran sulfate, etc.	50 µl 100 µl 200 µl	1 vial
	DAPI Mounting Medium	Antifade reagent ,DAPI, and glycerin,etc.	50 µl 100 µl 200 µl	1 vial

Notes: 1.The components in kits of different lots should not be interchanged.

2.Experimental reagents not provided in the kit but necessary:

- Rubber cement
- Deparaffinization solution
- Absolute ethanol
- Purified water
- 0.5M EDTA pH8.0
- 2M Tris-HCL pH8.0
- 1 M HCl
- 1 N or 2 N Hidróxido de Sódio (NaOH)
- 20×SSC Solution (3 M sodium chloride, 0.3 M sodium citrate, pH 5.3)
- NP-40
- Sodium thiocyanate
- Pepsin (250 U/mg)

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

Applicable Instruments

- Fluorescence microscope.
- Microliter pipettor and sterile tips
- Microcentrifuge
- Waterbath
- Coplinjars
- Hybridization instrument

Notes: Fluorescence microscope. The configuration of the required fluorescence microscope includes: 10× eyepiece, 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.

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 cm³ 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

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.

1× EDTASolution (10 mM EDTA,10 mM Tris-HCL)

- To prepare, add together:

20 mL	0.5 M EDTA pH8.0
5 mL	2 M Tris-HCL pH 8.0
<u>975 mL</u>	Purified water
1000 mL	Final Volume

2× SSC /0.3%NP-40 Washing Solution

- To prepare, add together:

100 mL	20× SSC pH 5.3
847 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.

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.

Preparation of instruments

Note: 2 mg/ml Pepsin solution (Take 100 mg pepsin, add 50 ml enzyme buffer and mix well) should be prepared fresh daily

- Turn on the thermostat water bath and set the temperature to 90°C . Pour the Pretreatment Solution into the Coplin jar, put the jar in the water bath, and preheat it to 90°C .
- Turn on the thermostat water bath and set the temperature to 37°C . Pour 50 ml 2 mg/ml Pepsin solution into the Coplin jar, put the jar in the water bath, and preheat it to 37°C .
- 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

- 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 90°C and incubate for 20 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. specimen. Place the coverslip (18mm x 18mm), avoid air bubbles, and seal the slide with Rubber cement.
2. 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 and rinse it for 1 min with the 2× SSC/0.3% NP-40 Washing Solution preheated at the room temperature.
5. Take out the slide, absorb the residual solution, put the slide in 70% ethanol at room temperature, and rinse it for 1 minute.
6. Air-dry the slide naturally in the dark for use later.

Counterstaining

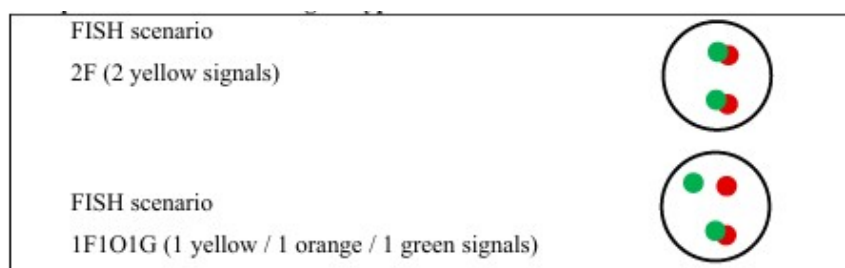
1. Drop 10 µl counterstaining solution to the hybridization area (avoiding bubbles), place the coverslip, carefully remove the excess counterstaining solution with absorbing paper, and counterstain the slide in the dark for 10 minutes.

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 types



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 EWSR1 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