

Sonda MYC FISH, kit

Probe MYC FISH, kit

Somente para uso profissional

Nome: Sonda MYC FISH, kit

Especificações da embalagem

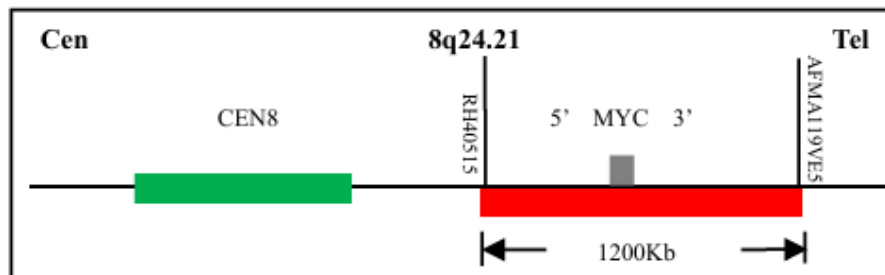
| Referência | Descrição | Tamanho Kit |
|-------------|---------------------|---------------|
| EP-13-11971 | Sonda MYC FISH, kit | 5 Testes/Kit |
| EP-13-11972 | Sonda MYC FISH, kit | 10 Testes/Kit |
| EP-13-11973 | Sonda MYC FISH, kit | 20 Testes/Kit |

Intenção de uso

O Kit de Sonda FISH MYC foi desenvolvido para detectar a amplificação do gene MYC por meio da técnica de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) em amostras de tecido de carcinoma pulmonar de não pequenas células (NSCLC) fixadas em formol e emblocadas em parafina (FFPE), fornecendo ao médico informações de apoio para o diagnóstico.

Princípio do teste

Descrição do desenho da sonda



A sonda MYC/CEN8 está localizada no cromossomo 8. Uma sonda de 1.200 Kb, que cobre a região gênica do MYC, é marcada com corante laranja, enquanto uma parte do cromossomo 8 (CEN8) é marcada com corante verde. O marcador gênico MYC está localizado em 8q24.21, apresentando alta especificidade e não hibridizando com centrômeros de outros cromossomos, o que evita a formação de sinais híbridos inespecíficos.

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 precisões 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 MYC/CEN8 (MYC sonda laranja, CEN8 sonda verde) | Sonda MYC/CEN8, COTI DNA, formamida, SSC, e dextran sulfate, 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.

Reagentes necessários mas não fornecidos no kit:

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

Instrumentos necessários

- Microscópio de fluorescência
- Pipeta de microlitro e 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 da amostra: tecido fixado em formalina e emblocado em parafina, Recomenda-se que sejam selecionadas amostras de parafina com menos de dois anos para garantir a precisão do teste.
2. Método de coleta de amostras: os tecidos frescos devem ser fixados em tampão de formalina neutra a 10% por 24-48 horas dentro de 0,5 a 1 hora após serem removidos. O tamanho do tecido não deve exceder 0,5 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

A- Preparo das soluções

Reagente de lavagem etanol

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

Solução Pré-tratamento

- Para preparar, junte:

| | |
|---------------|---------------------|
| 80 g | Tiocianato de sódio |
| <u>800 mL</u> | Água purificada |
| 1000 mL | Volume final. |

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

2× SSC /0.3% NP-40 Solução de lavagem

Para preparar, junte:

- | | |
|-------------|-----------------|
| 100 mL | 20× SSC pH 5.3 |
| 847 mL | Água purificada |
| <u>3 mL</u> | 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

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.

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

Processo de teste

Pré-tratamento amostra

1. Preequeça a lâmina a 65 °C por 5 minutos em estufa ou utilizando o hibridizador (Recomendado Hibridizador Ara EP-31-20147/EasyPath) ou equivalente e, em seguida, realize a desparafinização utilizando a solução transparente de desparafinização (à base de isoparafina) ou xileno, duas vezes, por 15 minutos cada.
2. Desidrate a lâmina em etanol absoluto duas vezes, por 5 minutos cada.
3. Reidrate a lâmina em etanol 85%, etanol 70% e água purificada, em gradiente, por 1 minuto cada.
4. Retire a lâmina e utilize papel absorvente para remover a solução residual da superfície.
5. Coloque a lâmina na solução de pré-tratamento previamente aquecida a 80 °C e mantenha por 30 minutos.
6. Retire a lâmina e mergulhe-a em água purificada por 1 minuto; em seguida, retire-a e remova a solução residual.
7. Mergulhe a lâmina em solução de pepsina a 2 mg/mL, previamente aquecida a 37 °C, por 25 minutos.
8. Após a digestão, mergulhe a lâmina em água purificada por 1 minuto.
9. Desidrate a lâmina em etanol 70%, etanol 85% e etanol 100%, sucessivamente, por 1 minuto cada.

10. Seque a lâmina à temperatura ambiente.

Desnaturação e hibridização da amostra

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

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

Lavagem Pós-hibridização

1. Remova cuidadosamente o Rubber Cement.
2. Coloque a lâmina em solução de lavagem 2× SSC/0,3% NP-40 no frasco Coplin à temperatura ambiente para lavar a lamínula (2 a 5 minutos).
3. Retire a lâmina e lave-a por 2 minutos com a Solução de Lavagem 2×SSC/0,3% NP-40, previamente aquecida 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 mantida em temperatura ambiente.
5. Retire a lâmina, remova a solução residual e coloque-a em etanol 70% à temperatura ambiente, lavando por 1 minuto.
6. Deixe a lâmina secar naturalmente ao ar, no escuro, para uso posterior.

Contra-coloração

1. Adicione 10 µL da solução de contracoloração na área de hibridização (evitando a formação de bolhas). Coloque a lamínula, remova cuidadosamente o excesso de solução de contracoloração com papel absorvente e mantenha a lâmina a -20 ± 5 °C, no escuro, por mais de 20 minutos.
2. Selecione o conjunto de filtros apropriado para observar os resultados ao microscópio de fluorescência.

Visualização da lâmina e coleta de dados

1. Observe a lâmina em um microscópio de fluorescência equipado com os conjuntos de filtros apropriados.
2. Localize a área sob a lente objetiva de 10× e realize a contagem sob a lente objetiva de 100×.
3. Ajuste o foco para encontrar uma área adequada, exigindo contorno nuclear completo, coloração uniforme pela solução de contracoloração, ausência de sobreposição de núcleos e pontos de sinal nítidos.
4. Na região selecionada, localize todos os pontos de sinal em diferentes planos do núcleo e conte os sinais individuais laranja e verde. Núcleos sem sinal ou com sinais fracos não devem ser contados.

Interpretação dos sinais



Determinação do limiar para amostras FISH negativas

Devem ser selecionadas aleatoriamente vinte amostras que não apresentem anormalidades genéticas conhecidas relacionadas ao conjunto de sondas FISH, para a preparação das lâminas-controle. Após a hibridização, conte 200 células de cada lâmina-controle e registre todos os tipos de padrões de sinal considerados positivos por FISH. Em seguida, calcule a porcentagem de sinais positivos observados e determine o desvio-padrão. O limiar para amostras FISH negativas deve ser definido como a média da porcentagem obtida somada a três vezes o desvio-padrão. As amostras-controle ou amostras FISH negativas devem, preferencialmente, ser do mesmo tipo de tecido ou célula que o alvo destinado à detecção por FISH.

Importância da determinação do limiar

O limiar deve ser estabelecido quando as sondas forem utilizadas pela primeira vez, pois esse valor servirá como referência para diferenciar amostras FISH positivas e negativas. Caso os procedimentos experimentais sejam alterados, como o método de pré-tratamento das amostras ou ocorra substituição de equipamentos, o limiar poderá variar; portanto, 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 imergir 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 é baseado na técnica de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) para a detecção da amplificação do gene MYC.
2. Este reagente é aplicável a cortes de tecidos emblocados em parafina, devendo-se ajustar o processo de pré-tratamento conforme a espessura dos cortes ou o tipo de amostra.

Precauções

1. Este kit se destina apenas a fins de pesquisa.
2. Não reutilize os componentes do kit.
3. A significância clínica do resultado obtido com este kit deve ser avaliada em conjunto com o histórico médico do paciente e outros resultados de exames.
4. 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.
5. As amostras não devem ser expostas a ácidos, bases ou superaquecimento, pois isso pode danificar o DNA e comprometer o teste FISH.
6. Todos os componentes do kit devem ser utilizados dentro do prazo de validade.
7. A solução de coloração contém DAPI, um mutagênico. Deve-se evitar sua inalação, ingestão ou contato com a pele.
8. A sonda contém formamida, uma substância teratogênica. Deve-se evitar o contato com a pele e as membranas mucosas.
9. Para obter resultados ideais, é necessário garantir que os reagentes sejam preparados e armazenados corretamente, de acordo com as instruções de uso (IFU).
10. As amostras e resíduos descartados durante o processo de teste devem ser coletados e eliminados como resíduos médicos.

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 MYC FISH, kit

Probe MYC FISH, kit

Solamente para uso profesional

Nombre: Sonda MYC FISH, Kit

Especificaciones de embalaje

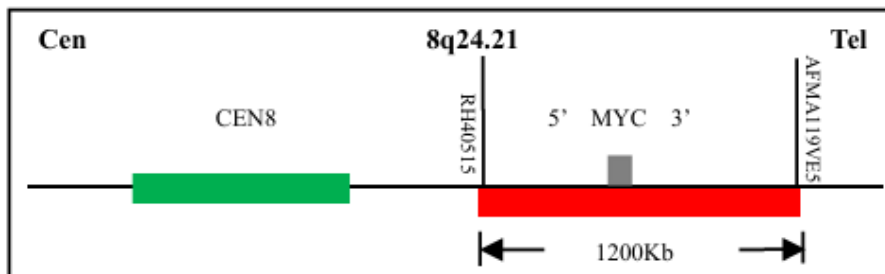
| Referencia | Descripción | Tamaño Kit |
|-------------|---------------------|---------------|
| EP-13-11971 | Sonda MYC FISH, kit | 5 Testes/Kit |
| EP-13-11972 | Sonda MYC FISH, kit | 10 Testes/Kit |
| EP-13-11973 | Sonda MYC FISH, kit | 20 Testes/Kit |

Intención de uso

El kit de sonda FISH MYC fue desarrollado para detectar la amplificación del gen MYC por medio de técnica de hibridación in situ por fluorescencia (FISH) en muestras de tejido de carcinoma pulmonar de no pequeñas células (NSCLC) fijadas en formol y encajadas en la parafina (FFPE), promoviendo al médico información de apoyo para el diagnóstico.

Principio del teste

Descripción del diseño de la sonda



La sonda MYC/CENB está localizada en el cromosoma 8. Una sonda de 1.200 Kb, que cubre la región génica del MYC, es marcada con la coloración naranja, mientras una parte del cromosoma 8 (CENB) es marcada con coloración verde. El marcador génico MYC está localizado en 8q24.21, presentando alta especificidad y no hibridando con centrómeros de otros cromosomas, lo que evita la formación de señales híbridas no específicas.

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 con fluoruros para hibridación, por medio de mecanismo de complementariedad de bases, las regiones – albo de los cromosoma en muestras de pacientes. Las sondas emiten señales de fluorescencia en una longitud de onda específica después de ser excitadas por una fuente de luz, y la hibridación al cromosoma puede ser observada directamente por medio de un microscopio equipado con un conjunto adecuado de filtros. Esa técnica permite detectar con precisión alteraciones

cromosomas es consecuentemente, 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 MYC/CEN8 (MYC sonda naranja, CEN8 sonda verde) | Sonda MYC/CEN8, COTI DNA, formamida, SSC, e dextrano sulfato, etc. | 50 µl 100 µl 200 µl | 1 frasco |
| | DAPI Medio de Montaje | Antidesvanecimiento regente ,DAPI, e glycerin,etc. | 50 µl 100 µl 200 µl | 1 frasco |

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

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

Instrumentos necesarios

- Microscopio de fluorescencia
- Pipeta de microlitro y puntas estériles
- Micro centrifuga
- Baño maría
- Micro centrifuga
- Baño maría
- Jarra de Coplin
- Hibridizador

Notas: Microscopio de fluorescencia. La configuración de microscopio de fluorescencia necesario incluye: Ocular 10× y lentes objetivas s 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 utilizado, de modo de escoger el conjunto de filtros compatible con la coloración de fluorescencia marcados.

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

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

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

Condiciones de almacenamiento y plazo de validez

Condiciones de almacenamiento: abajo de -15 °C, sellado y almacenado en los escuro.

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 la embalaje externa.

Requisitos de muestra

1. Tipo de muestra: Tejido fijado en la formalina y encajado en la parafina, se recomienda que se seleccionados muestras de parafina con menos de dos años para garantizar la precisión del teste.
2. Método de recolección de muestras: Los tejidos frescos deben ser fijados en tampón de formalina neutra a 10% por 24 – 48 horas dentro de 0,5 a 1 hora después de ser retirados. El tamaño del tejido no debe exceder 0,5 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 teste

A-Preparo de soluciones

Regente de lavaje etanol

Prepare diluciones v/v de 70% y 85% utilizando etanol a 100% y agua purificada. Las diluciones pueden ser utilizadas durante 1 semana, a menos que ocurra evaporación o que la solución de 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:

80g Tio cianato de sodio

800mL Agua purificada

1000mL Volumen final.

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

2× SSC /0.3% NP-40 Solución de lavaje

Para preparar, junte

100mL 20× SSC pH 5.3

847 mL Agua purificada

3 mL NP-40

1000 mL Volumen final

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

Tampón enzimático (pH 2.0 HCl)

Para preparar. Junte:

10 mL 1 M HCl

900 mL Agua purificada

1000 mL Volumen final

Mezcle bien. Mueva el pH a temperatura ambiente utilizando un medidor de pH. Ajuste el pH para 2,0±0,2 con NCl 1M. Ajuste el volumen para 1 litro con agua purificada. Si el reagenente está turbio o contaminado, debe ser desechado inmediatamente.

B - Preparación

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

1. Encienda el baño maría y ajuste la temperatura para 80 °C. Deseche la solución de pre tratamiento en el frasco de Coplin, coloque el frasco en baño maría y re caliente a 80 °C
2. Encienda el baño maría y ajuste la temperatura para 37 °C. Deseche la solución 50 ml de solución de pepsina 2 mg/ml en el frasco de Coplin, coloque el frasco en baño maría y re caliente a 37 °C.
3. Antes de lavaje después de hibridación, ajuste la temperatura del baño maría del termostato para 68 °C, deseche la solución de lavaje 2× SSC/0,3% NP-40 en el frasco de Coplin y coloque el frasco en baño maría por lo menos 30 minutos. Certifique se la temperatura de la solución de lavaje alcanza 68±1 °C antes del uso. Deseche la solución de lavaje 2× SSC/0,3% NP-40 en otro frasco de Coplin y mantener en temperatura ambiente.

Proceso de teste

Pre tratamiento de muestra

1. Caliente la lamina a 65 °C por 5 minutos en estufa o utilizando el hibridizador (Recomendado el Hibridizador Ara EP-31-20147/EasyPath) o equivalente, enseguida, realice la desparafinización utilizando la solución transparente de desparafinización (Base de isoparafina) o xileno, dos veces por 15 minutos cada.
2. Deshidrate la lamina en etanol absoluto dos veces, por 5 minutos cada.
3. Re hidrate la lamina en etanol 85%, etanol 70% en agua purificada, gradiente, por 1 minutos cada.
4. Retirar la lamina y utilice papel absorbente para retirar la solución residual de la superficie
5. Coloque la lamina en la solución de pre tratamiento previamente caliente a 80 °C y mantener por 30 minutos
6. Retirar la lamina y sumergirla en agua purificada por 1 minuto enseguida, retirar y quitar la solución residual.
7. Sumergir la lamina en solución de pepsina a 2mg/ml, previamente caliente a 37 °, por 25 minutos.
8. Después de la digestión, sumergir la lamina en agua purificada por 1 minuto.
9. Deshidrate la lamina en etanol 70%, etanol 85% y etanol 100%, sucesivamente, por 1 minuto cada.
10. Seque la lamina a temperatura ambiente.



Des naturalización y hibridación de muestra

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

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

Lavaje después de la hibridación

Lavagem Pós-hibridização

1. Retirar cuidadosamente el Rubber Cement
2. Coloque la lamina en solución de lavaje 2× SSC/0,3% NP-40 em el frasco Coplin la temperatura ambiente para lavar la lamina (2 a 5 minutos)
3. Retirar la lamina y llevarla por 2 minutos con la solución de lavaje 2×SSC/0,3% NP-40, previamente caliente a 68±1 °C
4. Retirar la lamina y llevarla por 1 minuto con solución de lavaje 2×SSC/0,3% NP-40, previamente mantenida en temperatura ambiente.
5. Retirar la lamina, y quitar la solución residual y colocarla en etanol 70% a temperatura ambiente, lavando por 1 minuto.
6. Dejar la lamina secar naturalmente al aire, en lo oscuro, para uso posterior.
- 7.


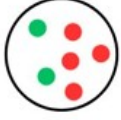
Contra – coloración

1. Adicione 10 μ L de la solución de contra coloración en la área de hibridación (evitando la formación de burbujas) Coloque la lamina, retire cuidadosamente el exceso de solución de contra coloración con papel absorbente y mantener la lamina a -20±5 °C, en lo oscuro por mas de 20 minutos.
2. Selecciones el conjunto de filtros apropiados para observar los resultados al microscopio de fluorescencia.

Visualización de lamina y recolección de datos

1. Observe la lamina en un microscopio de fluorescencia equipado con los conjuntos de filtros apropiados.
2. Localice la área de sub lente objetiva de 10× y realice el conteo sub la lente objetiva de 100×.
3. Ajuste el foco para encontrar una área adecuada, exigido contorno nuclear completo, coloración uniforme por la solución de contra coloración, ausencia de sobre posición de núcleos y puntos de señal nítidos.
4. En la región seleccionada, localice todos los puntos de señal en diferentes planos del núcleo y cuente los señales individuales naranja y verde. Núcleos sin señal o con señales flacos no deben ser contados.

Interpretación de los señales

| | |
|------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| Escenario FISH 202G (2 naranja/2 señales verdes) |  |
| Escenario FISH NO2G (n naranja/ 2 señales verdes) |  |

Determinación del umbral para muestras FISH negativas

Deben ser seleccionadas aleatoriamente veinte muestras que no presenten anomalías genéticas conocidas relacionadas al conjunto de sondas FISH, para la preparación de las laminas – control.

Después de la hibridación, conté 200 células de cada lamina – control y registre todos los tipos de padrón de señal considerados positivos por FISH. Enseguida, calcule el porcentaje de señales positivas observados y determine el desvío padrón. El umbral para muestra FISH negativas debe ser definido como media de porcentaje obtenida sumada a tres veces el desvío padrón. Las muestras control o mezclado FISH negativas deben, preferentemente, ser del mismo tipo de tejido o célula que el albo destinado la detección por FISH.

Importancia de determinación del umbral

El umbral debe ser establecido cuando las sondas fueron utilizadas por la primera vez, ese valor servirá como referencia para diferenciar muestras FISH positivas y negativas. Caso los procedimientos experimentales sean alterados, como el método de pre tratamiento de las muestras o ocurra sustitución de equipamientos, o umbral puede variar, por lo tanto, deberá ser redefinido de acuerdo con las nuevas condiciones experimentales establecidas.

Interpretación de los resultados de los testes.

Problemas comunes y soluciones en el proceso del

| Problema | Posible causa | Solución recomendada |
|--------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Sin señal o señal flaco | Desnaturalización insuficiente de las muestras y sondas | Certificarse que la temperatura de la lamina este en 85+1 °C durante la desnaturalización; Aumente el tiempo de desnaturalización de la lamina en 2 a 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 sondas | Certificarse que las sondas alcance la temperatura ambiente antes del uso y de que el regente de la sonda sea aspirado por la pipeta. |
| | Secado insuficiente de lamina | Antes de adicionar las sondas sobre la lamina, certificarse de que la solución de etanol en la lamina tenga aprobado completamente. |
| | Secado muy rápida de las sondas | Cubra la área-albo con la lamina inmediatamente después de la adición de las sondas; para la elución, retire la lamina, apenas una lamina por vez y sumerja la lamina en la solución de lavaje inmediatamente antes de retirar la lamina de la próxima lamina. |
| | Burbujas sob la lamina durante la hibridación | Cubra la superficie de las sondas con la lamina y presione suavemente para eliminar las burbujas de aire. |
| | Condiciones inadecuadas de hibridación | Garantir el cumplimiento del tiempo y de la temperatura de hibridación especificadas, no dejar ninguna abertura al sellar la lamina con medio de montaje. Ajuste el tiempo de hibridación y la humedad conforme necesario. |
| | Solución de lavaje incorrecto o condiciones de lución inadecuadas | Certificarse de la solución de lavaje sea preparada de acuerdo con el IFU; Garantir que la temperatura de la solución de lavaje alcance la especificada etapa de elución; Retirar la lamina antes de sumergir la lamina en la solución de lavaje. |
| | Almacenamiento inadecuado de las sondas o de las laminas de las muestras | Almacene las sondas abajo de -15 °C en lo oscuro, seque las laminas no hibridadas para almacenamiento y largo plazo a -20+5 °C o almacenamiento de 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 del conjunto de filtros para observación | Use el conjunto de filtros correctos 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 del conjunto de filtros. | Entre en contacto con el proveedor del microscopio |
| | Lavaje insuficiente de las laminas antes del preparo de las muestras. | Sumerja 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 solución de lavaje este correcta, retirar la lamina y repita la etapa de elución |
| | Uso prolongado o almacenamiento inadecuado de la solución de lavaje. | Certificarse de que 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 insuficientes | Retirar la laminula y sumergir la lamina en la solución de lavaje por 5 minutos a temperatura ambiente. Coloque la lamina en soluciones de etanol a 70%, 85% y 100% por 1 minuto cada para deshidratación gradiente e 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 la coloración no este vencida. |

Limitaciones de los métodos de teste

1. Este kit es basado en la técnica de hibridación in situ por fluorescencia (FISH) para la detección de la amplificación del gen MYC.
2. Este regente es aplicable a cortes de tejidos encajados en la parafina, se debe ajustar el proceso de pre tratamiento conforme la espesura de los cortes o del tipo de muestra.

Precauciones

1. Este kit se destina apenas a finales de busca.
2. No reutilice los componentes del kit
3. La significación clínica del resultado obtenido con este kit debe ser avaluado en conjunto con el histórico medico del paciente y otros resultados de exámenes.
4. Durante la utilización de este kit, es necesario usar guantes de látex para evitar el contacto con el regente, con la piel. En caso de contacto accidental, lave inmediatamente con agua en abundancia.
5. Las muestras no deben ser expuestas a acidos, bases o super calentamiento, pues eso puede danificar el DNA y comprometer el teste FISH
6. Todos los componentes del kit deben ser utilizados dentro del plazo de validez.
7. La solución de coloración contiene DAPI, un mutagénico. Debe evitar la inhalación, ingestión o contacto con la piel.
8. La sonda contiene formamida, una sustancia teratogénica. Debe evitar el contacto con la piel y las membranas mucosas.
9. Para obtener resultados ideales, es necesario garantir que los regentes sea preparados y almacenados correctamente, de acuerdo con las instrucciones de uso (IFU)
10. Las muestras y residuos descartados durante el proceso de teste deben se colectados y eliminados como residuos médicos.

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 MYC FISH, kit

Probe MYC FISH, kit

For professional use only

Product Name: Probe MYC FISH, kit

Packaging Specifications

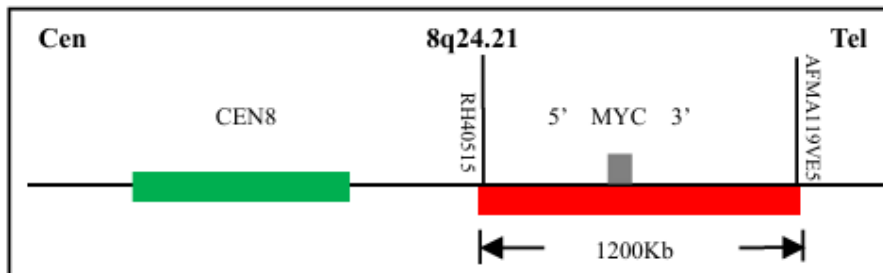
| Reference | Description | Kit Size |
|-------------|---------------------|--------------|
| EP-13-11971 | Probe MYC FISH, kit | 5 Tests/Kit |
| EP-13-11972 | Probe MYC FISH, kit | 10 Tests/Kit |
| EP-13-11973 | Probe MYC FISH, kit | 20 Tests/Kit |

INTENDED USE

The MYC FISH Probe Kit is designed to detect amplification of the MYC gene via fluorescence in situ hybridization (FISH) in formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) non small cell lung cancer (NSCLC) tissue specimens, to provide the physician with supporting information for diagnosis.

Test Principle

Probe Design Description



The MYC/CEN8 probe is located on chromosome 8. A 1200Kb probe covering the MYC gene region is labeled with an orange dye, and part of chromosome 8 (CEN8) is labeled with a green dye. The MYC gene marker region is located on 8q24.21, which has high specificity and will not hybridize with other chromosome centromeres to produce hybrid spots.

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 | MYC/CEN8 probe (MYC orange probe, CEN8 green probe) | MYC/CEN8probe, COTIDNA, formamide, SSC, and dextransulfate, etc. | 50 µl | 1 vial |
| 10 tests/kit | | | 100 µl | |
| 20 tests/kit | DAPI Mounting Medium | Antifade reagent ,DAPI, and glycerin,etc. | 200 µl | |
| | | | 50 µl | 1 vial |
| | | | 100 µl | |
| | | | 200 µl | |

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

Material need but not provided

- Rubber cement
- Deparaffinization solution
- Absolute ethanol
- Purified water
- 1 M HCl
- 1 N or 2 N Hidróxido de Sódio (NaOH)
- 20×SSCSolution (3 M sodium chloride, 0.3 M sodium citrate, pH 5.3)
- NP-40
- Sodiumthiocyanate
- 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: 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

A - Preparation of Working Reagen

Ethanol Wash Solutions

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

Pretreatment Solution

- To prepare, add together:

| | |
|---------|--------------------|
| 80 g | Sodium thiocyanate |
| 800 mL | Purified water |
| 1000 mL | FinalVolume |

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

2× SSC /0.3%NP-40 Washing Solution

- To prepare, add together:

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

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

Enzyme buffer (pH 2.0 HCl)

To prepare, add together:

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

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

B - Preparation of instruments

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

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

Testing process

Sample pretreatment

1. Preheat the slide at 65°C for 5 min on the hybridization instrument (Recommended Hybridizer: Ara EP-31-20147/EasyPath), and deparaffinize with the transparent deparaffinization solution (isoparaffintype) or xylene twice, 15 min each time.
2. Dehydrate the slide in absolute ethanol twice, 5 min each time.
3. Rehydrate the slide in 85% ethanol, 70% ethanol and purified water in gradients for 1 min each.
4. Take out the slide and use the water absorbing paper to remove the residual solution from the slide.
5. Place the slide in the pretreatment solution preheated to 80°C and maintain for 30 min.
6. Take out the slide and immerse it in purified water for 1 min; then, take it out and remove the residual solution from it.
7. Immerse the slide in 2 mg/ml Pepsin solution preheated to 37°C for 25 min.
8. After digestion, immerse the slide in purified water for 1 min.
9. Dehydrate the slide in 70% ethanol, 85% ethanol and 100% ethanol in turn for 1 min each.
10. Dry the slide at room temperature for use later.

Sample denaturation and hybridization

1. Preheat the probes to the room temperature, swirl and mix them well, centrifuge the mixture for 2s-3s in a microcentrifuge, and drop 10 µl probes to the hybridization area.
2. Place the cover slide (18mmx18mm), avoiding air bubbles, and seal the slide with rubber cement.



3. Set the hybridization instrument program: 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.

Post-hybridization wash

1. Carefully remove the Rubber Cement.
2. Place the slide in the room temperature 2×SSC/0.3%NP-40 Washing Solution in the Coplin jar to wash off the cover slide (2min-5min).
3. Take out the slide and rinse it for 2 min 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 min.
6. Air-dry the slide naturally in the dark for use later.

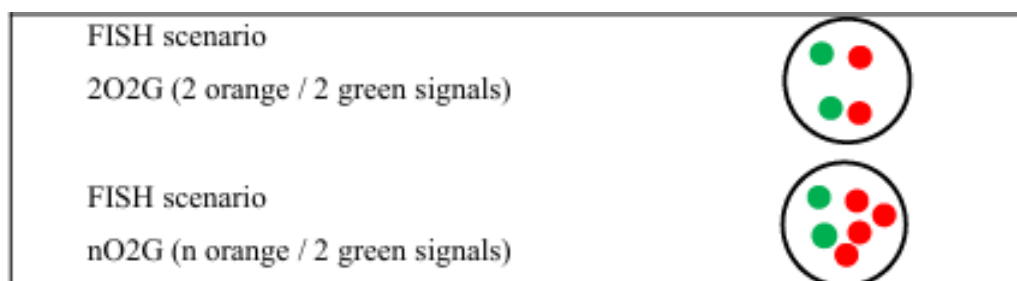
Counterstaining

1. Drop 10µl counterstaining solution to the hybridization area (avoiding bubbles), place the cover slide, carefully remove the excess counterstaining solution with water absorbing paper, and counter stain the slide at -20±5°C in the dark for more than 20 min.
2. Select the appropriate filter set to observe the results under the fluorescence microscope

Slide viewing and data collection

1. Select the appropriate filter set to observe the results under the fluorescence microscope.
2. Find the area under a 10× objective lens and count the number under a 100× objective lens.
3. Adjust the focal length to find the suitable area, requiring complete nucleus boundary, uniform staining by the counterstaining solution, no overlap of nuclei, and clear signal points.
4. In the selected region, find all signal points at different levels of the nuclei, and count the individual orange and green signals; 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 are required to be 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 specimens is set as the average value of percentage plus 3 times 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 serve 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 a 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 |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Nosignal 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. |
| | Bubbles under the coverslip during hybridization | Cover the surface of the probes with the cover slide, and gently squeeze it to eliminate the air bubbles. |
| | Inappropriate hybridization conditions | Ensure the compliance with the specified hybridization time and temperature; do not leave any gap when sealing the slide with fluoro gel; Adjust the hybridization time and humidity as appropriate. |
| | Incorrect washing solution or elution conditions | Ensure that the washing solution is prepared in accordance with the IFU; ensure that the temperature of the washing solution reaches the temperature specified in the elution step; remove the cover slide before immersing the slide in the washing solution. |
| | Improper storage of probes or sample slides | Store the probes below -15°C in the dark; dry the unhybridized slides for long-term storage at $-20\pm 5^{\circ}\text{C}$ 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. |
| Inappropriate microscope structure and objective lens for observing FISH samples, or damage of the filter set | Please contact the microscope manufacturer. | |
| Excessively intense background of slides | Insufficient washing of slides before sample preparation | Immerse the slide in absolute ethanol and wipe it dry with water absorbing paper before dropping the reagent. |
| | Inadequate elution after the hybridization | Ensure that the washing solution is prepared correct in accordance with the IFU; operate in accordance with the IFU; ensure that the temperature of the washing solution is correct; remove the cover slide and repeat the elution step. |
| | Long-term use or improper storage of washing solution | Ensure that the washing solution is stored at $2-25^{\circ}\text{C}$, and discard the reagent if it is turbid or contaminated. |
| | Too high or too low hybridization humidity | Adjust the hybridization humidity to the optimum. |
| Too weak counterstaining | Too weak counterstaining | Remove the cover slide and immerse the slide in the washing solution for 5 min at room temperature. Place the slide in 70%, 85% and 100% ethanol solutions for 1 min each for gradient dehydration, and then perform counterstaining. |
| | Expiration or excessive light exposure of staining solution | Ensure that the staining solution is stored below -15°C in the dark; ensure that the staining solution is not expired. |













Limitations of Test Methods

1. This kit is based on the fluorescence in situ hybridization technique for the MYC gene amplification.
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. Do not reuse the kit components.
3. The clinical significance of the test result of this kit should be evaluated in conjunction with the patient's past medical history and do their examination results.
4. 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.
5. Samples should not be exposed to acid and alkali or be overheated, which may damage DNA and lead to failure of FISH test.
6. All components in the kit should be used within the shelf life.
7. The staining solution contains DAPI, which is a mutagen. Inhalation, ingestion or contact with the skin should be avoided.
8. The probe contains a teratogen called formamide. Contact of it with the skin and mucous membranes should be avoided.
9. In order to obtain ideal results, it is necessary to ensure that the reagents are properly prepared and stored in accordance with the IFU.
10. The discarded samples and wastes in the testing process should be collected and disposed of as medical waste.

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 |