

Desnaturaçã

- Desnatura a amostra e a sonda em simultâneo aquecendo a lâmina numa placa quente a 75 °C (+/-1 °C) durante 5 minutos.

Hibridizaçã

- Coloque a lâmina num recipiente húmido resistente à luz a 37 °C (+/-1 °C) durante toda a noite.

Lavagens pós-hibridizaçã

- Retire a lamela e todos os vestígios de cola com cuidado.
- Mergulhe a lâmina em SSC 0,4x (pH 7,0) a 72 °C (+/-1 °C) durante 2 minutos sem agitar.
- Drene a lâmina e mergulhe-a em SSC 2x e 0,05% de Tween-20 à TA (pH 7,0) durante 30 segundos sem agitar.
- Drene a lâmina e aplique 10 µl–15 µl de DAPI Antifade em cada amostra.
- Cubra a amostra com uma lamela, elimine eventuais bolhas e deixe a cor desenvolver-se no escuro durante 10 minutos.
- Visualize com um microscópio de fluorescência.

Procedimento de Sangue Periférico ou Culturas de Medula Óssea

Preparação das lâminas

- Coloque uma gota de amostra celular numa lâmina de microscópio de vidro. Deixe secar.
- Mergulhe a lâmina em SSC 2x durante 2 minutos à temperatura ambiente (TA) sem agitar.
- Desidrate numa série de etanol (70%, 85% e 100%), cada uma durante 2 minutos à TA.
- Deixe secar.

Pré-desnaturaçã

- Retire a sonda do congelador e deixe-a aquecer até à TA.
- Certifique-se de que a solução da sonda é uniformemente misturada com uma pipeta.
- Retire 10 µl de sonda por cada teste e transfira para um tubo de microcentrifugaçã. Reponha o restante volume da sonda no congelador.
- Coloque a sonda e a lâmina da amostra numa placa quente a 37 °C (+/-1 °C) durante 5 minutos para pré-aquecimento.
- Coloque 10 µl da solução de sonda na amostra de células e aplique uma lamela com cuidado. Vede com cola de soluçã de borracha e deixe a cola secar completamente.

Desnaturaçã

- Desnatura a amostra e a sonda em simultâneo aquecendo a lâmina numa placa quente a 75 °C (+/-1 °C) durante 2 minutos.

Hibridizaçã

- Coloque a lâmina num recipiente húmido resistente à luz a 37 °C (+/-1 °C) durante toda a noite.

Lavagens pós-hibridizaçã

- Retire a lamela e todos os vestígios de cola com cuidado.
- Mergulhe a lâmina em SSC 0,4x (pH 7,0) a 72 °C (+/-1 °C) durante 2 minutos sem agitar.
- Drene a lâmina e mergulhe-a em SSC 2x e 0,05% de Tween-20 à TA (pH 7,0) durante 30 segundos sem agitar.
- Drene a lâmina e aplique 10 µl–15 µl de DAPI Antifade em cada amostra.
- Cubra a amostra com uma lamela, elimine eventuais bolhas e deixe a cor desenvolver-se no escuro durante 10 minutos.
- Visualize com um microscópio de fluorescência.

Comentários

A eficiência da hibridizaçã e a morfologia dos tecidos estão geralmente correlacionadas negativamente. Os procedimentos de pré-tratamento agressivos que melhoram a eficiência da hibridizaçã (por exemplo, um tempo prolongado de digestã enzimática) tendem a destruir a estrutura das células e a morfologia dos tecidos. No entanto, o pré-tratamento suave poupanha as estruturas de tecido e não é suficiente para a penetraçã da sonda e para obter resultados de FISH bem-sucedidos.

A duraçã ideal do pré-tratamento térmico e do tempo de digestã enzimática dependerá da idade do bloco, da composiçã do tecido e da qualidade da fixaçã do tecido. A digestã enzimática deve ser reduzida para biopsias de agulha grossa e quaisquer secções que contenham poucas células tumorais ou que tenham grandes áreas de necrose. Estas amostras têm de ser manuseadas com especial cuidado para evitar uma digestã excessiva.

Estabilidade das lâminas acabadas

As lâminas de FISH permanecem analisáveis durante um período máximo de 1 mês se conservadas no escuro a uma temperatura inferior a 4 °C.

Recomendações para o Procedimento

- Não é recomendado o aquecimento ou envelhecimento de lâminas que contém amostras de sangue periférico ou medula óssea, uma vez que tal pode reduzir a fluorescência do sinal.
- As condições de hibridizaçã podem ser negativamente afetadas pela utilizaçã de reagentes que não sejam os fornecidos ou recomendados pela CytoCell Ltd.
- Recomenda-se vivamente a utilizaçã de um termómetro calibrado para medir as temperaturas das soluções, banhos-maria e incubadoras, visto que estas temperaturas são críticas para o desempenho ideal do produto.
- As concentrações de lavagem, o pH e as temperaturas são importantes, visto que condições pouco rigorosas podem resultar numa ligaçã não específica da sonda e condições demasiado rigorosas podem resultar na ausência de sinal.
- Uma desnaturaçã incompleta pode resultar em ausência de sinal e uma desnaturaçã excessiva também pode resultar numa ligaçã não específica.

Resultados Esperados

Uma célula normal deve ter dois sinais vermelhos e dois sinais verdes (2R, 2G), enquanto uma célula com uma deleçã de P53 deve ter um sinal vermelho e dois sinais verdes (1R, 2G).

Limitações

A comunicaçã e interpretaçã dos resultados da FISH devem ser consistentes com as normas da prática profissional e devem tomar em consideraçã outras informações clínicas e de diagnóstico. Este kit destina-se a ser utilizado como adjuvante de outros testes de diagnóstico laboratoriais e não deve ser iniciada qualquer medida terapêutica apenas com base nos resultados da FISH.

Informações Adicionais

Para obter mais informações sobre o produto, contacte o departamento de assistência técnica da CytoCell.









T: +44 (0)1223 294048

E: techsupport@cytoCell.com

W: www.ogt.com

Bibliografia

- Döhner *et al.*, J Mol Med 1999;77:266-81
- Foá *et al.* Haematol 2013; 98(5):675-685
- Sturm *et al.* Cell Death Differ. 2003 Apr;10(4):477-84.
- Döhner *et al.* Blood. 1995 Mar 15;85(6):1580-9.

	PT: Número de catálogo
	PT: Dispositivo de diagnóstico <i>in vitro</i>
	PT: Código de lote
	PT: Consulte as Instruções de utilizaçã
	PT: Fabricante
	PT: Prazo de validade
	PT: Limites de temperatura
	PT: Suficiente para <n> testes
	PT: Conteúdo

Patentes e Marcas Comerciais

CytoCell é uma marca registada da CytoCell Ltd. Este produto contém tecnologia licenciada pela Life Technologies Corporation e está disponível apenas para uso em diagnósticos humanos ou para fins de investigaçã na área das ciências da vida.

CytoCell Ltd.
Oxford Gene Technology,
418 Cambridge Science Park,
Milton Road,
Cambridge, CB4 0PZ, UK
T: +44(0)1223 294048
F: +44(0)1223 294986
E: probes@cytoCell.com
W: www.ogt.com

