



Kreatech™ FISH sondy

CZ – Návod k použití

Návod k použití

Formalinem fixovaná tkáň zalitá v parafínu

Pomocí sond Kreatech™ FISH

Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) se používá k identifikaci nebo značení, cílových genomových sekvencí tak, aby bylo možné studovat jejich umístění. DNA sekvence z vhodných, chromozomově specifických sond, jsou nejprve označeny reportérovými molekulami. Označená DNA sonda je pak hybridizovaná s cílovou DNA v jádrech tkáně. Po odmytí je vzorek pozorován pod fluorescenčním mikroskopem.

Sondy KREATECH REPEAT-FREE FISH neobsahují Cot-1 DNA. Účinnost hybridizace je proto zvýšena a nespecifická vazba včetně pozadí je značně redukována.

Pro optimální výsledky na řezech tkání zalitých v parafínu se doporučuje používat kompletní sady pro předúpravu Kreatech (KBI-60004, KBI-60007), které zahrnují speciálně optimalizovaný protokol „Návod k použití“.

Pro více informací navštivte naše webové stránky: <http://www.leicabiosystems.com/ihc-ish/kreatech-fish-probes/>

Alternativně lze také použít následující protokoly:

Předúprava sklíčka:

1. Nařežte a nalovte 4 - 6 µm silné řezy tkání, fixované formalínem a zalité do parafínu (FFPE) na pozitivně nabitě sklíčka.
2. Sušte připevněné tkáňové řezy FFPE po dobu 2 hodin při 80 °C nebo 16 hodin při 56°C.
3. Odparafínujte sklíčka v xylenu nebo náhražce xylenu, inkubujte 2 x 10 minut při pokojové teplotě (RT).
4. Rehydratujte sklíčka ve 100%, 85% a 70% ethanolu, inkubujte každý preparát 3 minuty při pokojové teplotě.
5. Omyjte v destilované H₂O (dH₂O), inkubujte 3 minuty při pokojové teplotě.

Pokračujte protokolem I nebo protokolem II.

Protokol I (standardní protokol, pokud není vhodný, použijte protokol II)

1. Předehřejte 0,01 M citrát sodný pH 6,0 na 96 - 98 °C.
2. Předehřejte 0,01 M HCl na 37 °C (pokud nepoužíváte Ready-to-Use (RtU) pepsin (LK-101A)).

3. Vložte sklíčka do 0,01 M citrátu sodného pH 6,0 při 96 - 98 °C, inkubujte po dobu 15 minut.
4. Omyjte sklíčka v dH₂O, inkubujte 2 minuty při pokojové teplotě.
5. Přidejte pepsin do předehřáté 0,01 M HCl, abyste dosáhli konečné koncentrace 0,025 %. (pokud nepoužíváte RtU pepsin (LK-101A)).
6. Natravujte sklíčka v 0,025 % pepsinu v 0,01 M HCl při 37 °C, nebo pokryjte tkáň RtU pepsinem (LK-101A) při pokojové teplotě, inkubujte 5 - 45 min, (čas v závislosti na fixaci tkáně a typu tkáně).
7. Vložte sklíčka do dH₂O, inkubujte po dobu 1 minuty při pokojové teplotě.
8. Vložte sklíčka do 1 x PBS, pH 7,4 nebo 2 x SSC, pH 7,0, inkubujte po dobu 5 minut při pokojové teplotě.
9. Vysušte sklíčka v 70%, 85% a 100% ethanolu, inkubujte každý 1 min při pokojové teplotě. Sušte na vzduchu při pokojové teplotě.

Pokračujte přípravou sondy.

Protokol II (pro silně zesíťované a náročné vzorky)

1. Předehřejte 8% thiokyanát sodný na 80 °C.
2. Sklíčka předem ošetřete v 0,2 M HCl, inkubujte 20 minut při pokojové teplotě.
3. Omyjte sklíčka v dH₂O, inkubujte 3 minuty při pokojové teplotě.
4. Předehřejte 0,01 M HCl na 37 °C (pokud nepoužíváte RtU pepsin (LK-101A)).
5. Vložte sklíčka do předehřátého 8% thiokyanatanu sodného v dH₂O při 80 °C, inkubujte 30 min.
6. Vložte sklíčka do 2 x SSC, pH 7,0, inkubujte 3 minuty při pokojové teplotě.
7. Přidejte pepsin do předehřáté 0,01 M HCl na konečnou koncentraci 0,025 % (pokud nepoužíváte RtU pepsin (LK-101A)).
8. Natravujte sklíčka v 0,025 % pepsinu v 0,01 M HCl při 37 °C nebo pokryjte tkáň RtU pepsinem (LK-101A) při pokojové teplotě, inkubujte 5 - 45 min, (čas v závislosti na fixaci tkáně a typu tkáně).
9. Vložte sklíčka do dH₂O, inkubujte po dobu 1 minuty při pokojové teplotě.
10. Vložte sklíčka do 1 x PBS, pH 7,4 nebo 2 x SSC, pH 7,0, inkubujte po dobu 5 minut při pokojové teplotě.
11. Vysušte sklíčka v 70%, 85% a 100% ethanolu, inkubujte každý 1 min při pokojové teplotě. Sušte na vzduchu při pokojové teplotě.

Pokračujte přípravou sondy.

Příprava sondy:

Krátce stočte lahvičku se sondou, odstředujte zkumavku se sondou a před použitím znovu krátce stočte. Před použitím nechte sondu dosáhnout pokojové teploty.

Sondy Kreatech FISH jsou dodávány RtU, pokud není uvedeno jinak v dokumentaci k produktu. Přečtěte si štítek na zkumavce sondy a příbalový leták pro konkrétní ředění.

Ko-denaturace:

1. Naneste 10 µl sondy nebo směsi sond na pole o velikosti 22 x 22 mm.
2. Zakryjte krycím sklem a utěsněte Fixogumem (LK-071A), popřípadě gumovým cementem.
3. Denaturujte vzorek se sondou v Thermobritu (TS-01/02) po dobu 5 min při 80 °C.

Hybridizace:

Inkubujte přes noc při 37 °C v Thermobritu (TS-01/02) nebo ve vlhké komoře.

Post-hybridizační omytí:

1. Předehřejte promývací pufr I (0,4 x SSC / 0,3 % Igepal) (LK-102A) na 72 °C.
2. Odstraňte gumový cement.
3. Vložte až 14 sklíček do 200 ml promývacího pufru II (2 x SSC / 0,1 % Igepal) (LK-103A), inkubujte 2 minuty při pokojové teplotě. Odstraňte krycí sklíčka. Opětovně použijte pouze jednou, celkem 28 sklíček.
4. Vložte až 14 sklíček do 200 ml předehřátého promývacího pufru I (0,4 x SSC / 0,3 % Igepal) (LK-102A), inkubujte 2 minuty při 72 °C (± 1 °C) bez třepání. Opětovně použijte pouze jednou, celkem 28 sklíček.
5. Vložte až 14 sklíček do 200 ml čerstvého promývacího pufru II (2 x SSC / 0,1 % Igepal) (LK-103A), inkubujte po dobu 1 minuty při pokojové teplotě bez třepání. Opětovně použijte pouze jednou, celkem 28 sklíček.
6. Vysušte v čerstvém 70%, 85% a 100% ethanolu, inkubujte každý 1 minutu při pokojové teplotě. Vysušte na vzduchu při pokojové teplotě a pokračujte v kontrastním podbarvení.

Podbarvení:

Naneste 15 µl DAPI (LK-095A (0,1 µg/ml) nebo LK-096A (1 µg/ml)) a přiložte krycí sklíčko. DAPI lze naředit v ředidle kontrastních barviv (LK-097A), pro dosažení požadované koncentrace. Umístěte sklíčka do tmy na 10 - 15 minut, aby se vyvinula kontrastní barva. Pozorujte pod mikroskopem.

Doporučení pro fluorescenční mikroskop:

Pro optimální vizualizaci používejte dobře udržovaný a pravidelně kalibrovaný mikroskop vybavený 100W rtuťovou výbojkou nebo jiným vhodným světelným zdrojem a 63x nebo 100x fluorescenčním objektivem. K vizualizaci více barev se používají trojpásmové filtry

(DAPI/FITC/Cy3 nebo DAPI/FITC/TRITC). K vizualizaci jedné barvy se používají jednopásmové filtry.

Vhodný rozsah excitace a emise pro fluorchromy Kreatech:

Fluorochrom	Excitace	Emise
PlatinumBright™ 415	429 ± 20 nm	470 ± 30 nm
PlatinumBright™ 495	495 ± 20 nm	525 ± 30 nm
PlatinumBright™ 550	546 ± 20 nm	580 ± 30 nm

Řešení problémů

Zkontrolujte trávení a předúpravu vzorku nanesením 15 µl DAPI. Poté pozorujte sklíčka pod fluorescenčním mikroskopem, vybaveným filtrem pro DAPI. Trávení po dobu 15 minut je běžně dostatečné pro širokou škálu nádorů prsu. Odstraňte krycí sklíčko a omyjte tkáň ve 2 x SSC, pH 7,4 po dobu 2 minut při pokojové teplotě. Pokud není vzorek dostatečně natráven, prodlužte trávení o 2 - 20 minut. Pokud je tkáň přetrávená, použijte čerstvý vzorek a zkráťte dobu trávení.

Alternativní protokol pro denaturaci sondy (oddělená denaturace sondy a vzorku):

1. Denaturujte sklíčko v 70% formamidu / 2 x SSC, pH 7,0 při 72 °C (±1 °C) po dobu 2 minut.
2. Vysušte v ledově studeném (-20 °C) 70%, 85% a 100% ethanolu, každý 2 minuty. Sušte na vzduchu.
3. Denaturujte sondu při 90 °C po dobu 10 minut a poté ji umístěte na led.
4. Krátce stočte lahvičku se sondou, odstředujte zkumavku se sondou a poté ji znovu stočte.
5. Naneste sondu na denaturované sklíčko, přikryjte krycím sklíčkem, zalepte gumovým cementem a pokračujte v hybridizaci.

Často kladené otázky

Mám slabé nebo žádné signály

- Znovu hybridizujte a ujistěte se, že byla sonda správně promíchána a že má před použitím pokojovou teplotu.
- Znovu hybridizujte a ujistěte se, že stringence promývání (Promývací pufr I) Je správná - teplota (72 °C (±1 °C)).
- Zohledněte pokles teploty při přidávání sklíček do předehřátých činidel.
- Trávení tkání není optimální (nedostatečně natrávené) – omyjte krycí sklíčko

v 2 x SSC, pH 7,0 po dobu 2 minut při pokojové teplotě. Prodlužte trávení o 2 - 20 min.

- Trávení tkání není optimální (přetrávené) – vyhodte sklíčko a začněte s novým vzorkem. Snižte dobu trávení alespoň o 10 min.
- Použijte minimálně 10 µl sondy na krycí sklíčko 22 x 22 mm.
- Zkontrolujte, zda jsou filtry mikroskopu a světelný zdroj správné a v pořádku.

Mám vysoké pozadí

- Trávení tkání není optimální. Nedotrávená tkáň zvyšuje pozadí. Ponořte sklíčko do 2 x SSC, pH 7,0 na 2 minuty při pokojové teplotě. Prodlužte dobu trávení o 2 - 20 min.
- Zvyšte teplotu stringence omývání (Wash Buffer I)

Při použití centrmérových sond mám křížovou hybridizaci

- Zvyšte teplotu stringence omývání (Wash Buffer I)

Minimální množství použité sondy:

Velikost skleněného krycího sklíčka	Minimální použití sondy
22x22 mm	10 ul
22x32 mm	15 ul
22x 50 mm	23 ul

Doporučení při postupu:

Teplota a koncentrace pufru (stringence) při hybridizaci a promývání jsou důležité, protože nízká stringence může mít za následek nespecifické navázání sondy na jiné sekvence a vyšší stringence může mít za následek nedostatek signálu. Rovněž neúplná denaturace cílové DNA a/nebo DNA sondy může vést k chybění signálu.

Požadovaný materiál, který není součástí dodávky, reagenty:

1. Xylen
2. Formamid
3. Ethanol 100%, 85% a 70%
4. 0,01 M citrát sodný pH 6,0 nebo 8% thiokyanát sodný
5. 0,01 M HCl a 0,2 M HCl
6. Roztok pepsínu, RtU (LK-101A)
7. 1 x PBS, pH 7,4
8. 2 x SSC, pH 7,0

9. Promývací pufr I (0,4 x SSC / 0,3 % Igepal) (LK-102A)
10. Promývací pufr II (2 x SSC / 0,1 % Igepal) (LK-103A)
11. DAPI podbarvení (LK-095A (0,1 µg/ml) nebo LK-096A (1 µg/ml))
12. Ředidlo podbarvení (LK-097A)
13. Fixogum (LK-071A) nebo gumový cement

Požadovaný, ale nedodávaný materiál, vybavení:

1. Thermobrite (TS-01/02) nebo Thermobrite Elite (další informace najdete na www.Leicabiosystems.com)
2. Inkubátor při 37 °C
3. Vodní lázeň s přesnou teplotou od 37 °C do 90 °C
4. Plastová nebo skleněná nádoba typu Coplin
5. Variabilní mikropipety (1 µl - 200 µl)
6. Fluorescenční mikroskop vybavený vhodnými filtry (viz doporučení pro fluorescenční mikroskop)

Upozornění a opatření:

1. Pouze pro použití *in vitro*. Pouze pro profesionální použití. V případě nouze zkontrolujte bezpečnostní informace na listech SDS.
2. DNA sondy a hybridizační pufrы obsahují formamid, který je teratogen; nevdechujte a zabraňte kontaktu s pokožkou. Používejte rukavice a laboratorní plášť při manipulaci se sondami DNA a podbarvením DAPI.
3. Všechny materiály by měly být zlikvidovány podle pokynů vaší instituce a pokynů pro likvidaci nemocničního odpadu.
4. Označování podle nařízení (ES) č. 1272/2008

Piktogram



Signální slovo: Nebezpečí

Standardní věty o nebezpečnosti

H351 Podezření na vyvolání rakoviny.

H360D Může poškodit plod v těle matky.

H373 Může způsobit poškození orgánů při prodloužené nebo opakované expozici.

Pokyny pro bezpečné zacházení

P201 Před použitím si obzobtejte speciální instrukce.

P281 Používejte požadované osobní ochranné prostředky.

P308 + P313 Při expozici nebo podezření na ni: Vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření.

Doplňkové údaje o nebezpečnosti: žádné

Omezeno na profesionální uživatele

Patenty: Tyto produkty nebo použití těchto produktů podléhá majetkovému právu. Sondy jsou vyráběny pomocí Technologie Janssen Diagnostics, LLC REPEAT- FREE™ a značené pomocí Universal Linkage System (ULS™).

Fluorochrom použitý v PlatinumBright - 415 podléhá patentům vlastněným nebo kontrolovaným a vyráběným společností DYOMICS GmbH. USA a mezinárodním patentům Janssen Diagnostics, Technologie LLC REPEAT-FREE™.

Technologie a produkty ULS™ jsou pokryty jedním nebo více z následujících US patentů 5,580,990; 5,714,327; 5,985,566; 6,133,038; US RE40,557E, 6,797,818; 7,217,813. KREATECH je obchodní název společnosti KREATECH Biotechnology BV. ULS™, PlatinumBright™, jsou ochranné známky společnosti KREATECH Biotechnology BV. REPEAT-FREE™ je ochranná známka společnosti Janssen Diagnostics, LLC.

Thermobrite™ je registrovaná ochranná známka společnosti Leica Biosystems.

Příprava buněk

Pomocí Kreatech™ FISH sond

Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) se používá k identifikaci nebo značení, cílových genomových sekvencí, aby bylo možné studovat jejich umístění. DNA sekvence z vhodných, chromozomově specifických sond, jsou nejprve označeny reportérovými molekulami. Naznačená DNA sonda je pak hybridizována na sklíčku s metafázovými chromozomy nebo interfázovými jádry. Po odmytí je vzorek pozorován pod fluorescenčním mikroskopem.

Sondy KREATECH REPEAT-FREE FISH neobsahují Cot-1 DNA. Účinnost hybridizace je proto zvýšena a nespecifická vazba včetně pozadí je značně redukována.

Pro použití na metafázních a interfázních buňkách z periferní krve a kulturách kostní dřeně nebo na přímých preparátech, připravených podle standardních cytogenetických metod, viz: The AGT genetics laboratory manual, 3 vyd. New York: Raven Press; 1996.

Pro optimální výsledky se doporučuje používat kompletní sady Kreatech pro předúpravu (KBI-60005, KBI-60006), které obsahují speciální optimalizovaný protokol „Návod k použití“.

Pro více informací navštivte naše webové stránky: <http://www.leicabiosystems.com/ihc-ish/kreatech-fish-probes/>

Předúprava:

Protokol I (standardní protokol, pokud není vhodný, použijte protokol II)

1. Pro zesteršení sklíček, peče 10 minut při 80 °C, poté nechte sklíčka vychladnout na pokojovou teplotu.
2. Vložte sklíčka do čerstvě připravené 70% kyseliny octové (v destilované H₂O (dH₂O)), inkubujte po dobu 1 minuty při pokojové teplotě.
3. Vložte sklíčka do 1 x PBS, pH 7,4, inkubujte po dobu 30 sekund při pokojové teplotě.
4. Vložte sklíčka do 1 x PBS, pH 7,4, inkubujte po dobu 5 minut při pokojové teplotě.
5. Vysušte sklíčko v 70%, 85% a 100% ethanolu, inkubujte každý 1 minutu při pokojové teplotě. Sušte na vzduchu při pokojové teplotě.

Pokračujte přípravou sondy.

Protokol II (pro preparáty s vysokým cytoplazmatickým pozadím nebo přímé preparáty (plodová voda nebo choriové klky))

1. Předehřejte 2 x SSC, pH 7,0 a 0,01 M HCl na 37 °C
2. Suchá sklíčka se vzorky vložte do předehřátého 2 x SSC, pH 7,0, inkubujte při 37 °C po dobu 2 minut.
3. Přidejte pepsin do předehřátého 0,01 M HCl na konečnou koncentraci 0,005 %.

4. Vložte sklíčka do 0,005% roztoku pepsinu v 0,01 M HCl a inkubujte při 37 °C po dobu 5-15 minut (v závislosti na množství cytoplazmy v pozadí).
5. Vložte sklíčka do 1 x PBS, pH 7,4, inkubujte po dobu 3 minut při pokojové teplotě.
6. Post-fixujte sklíčka inkubováním v 1% pufrovaném formaldehydu v 1x PBS / 20 mM MgCl₂ po dobu 10 minut při pokojové teplotě.
7. Vložte sklíčka do 1 x PBS, pH 7,4, inkubujte 3 minuty při pokojové teplotě.
8. Vysušte sklíčka v 70%, 85% a 100% ethanolu, inkubujte každý 1 minutu při pokojové teplotě. Sušte na vzduchu při pokojové teplotě.

Pokračujte přípravou sondy.

Příprava sondy:

Krátce stočte lahvičku se sondou, odstředívejte zkumavku se sondou a před použitím znovu krátce stočte. Před použitím nechte sondu dosáhnout pokojové teploty. Většina FISH sond Kreatech se dodává Ready-to-Use (RtU). Centromérové, subtelomérové a malovací FISH sondy jsou dodávány 5x koncentrované a musí být naředěny dodaným hybridizačním pufrem a/nebo jinými koncentrovanými sondami. Přečtěte si štítek na zkumavce sondy a příbalový leták pro konkrétní ředění.

Ko-denaturace:

1. Naneste 10 µl sondy nebo směsi sond na pole 22 x 22 mm.
2. Zakryjte krycím sklíčkem a utěsněte Fixogumem (LK-071A), popřípadě gumovým cementem.
3. Denaturujte vzorek a sondu v Thermobritu (TS-01/02) po dobu 5 min při 75 °C.

Hybridizace:

Inkubujte přes noc při 37 °C v Thermobritu (TS-01/02) nebo ve vlhké komoře.

Post-hybridizační omytí:

1. Předehřejte promývací pufr I (0,4 x SSC / 0,3 % Igpal) (LK-102A) na 72 °C.
2. Odstraňte gumový cement.
3. Vložte až 14 sklíček do 200 ml promývacího pufru II (2 x SSC / 0,1 % Igpal) (LK-103A), inkubujte 2 minuty při pokojové teplotě. Sundejte krycí sklíčka. Opětovně použijte pouze jednou, celkem 28 sklíček.
4. Vložte až 14 sklíček do 200 ml předehřátého promývacího pufru I (0,4 x SSC / 0,3 % Igpal) (LK-102A), inkubujte 2 minuty při 72 °C (±1 °C) bez třepání. Opětovně použijte pouze jednou, celkem 28 sklíček.
5. Vložte až 14 sklíček do 200 ml čerstvého promývacího pufru II (2 x SSC / 0,1 % Igpal) (LK-103A), inkubujte po dobu 1 minuty při pokojové teplotě bez třepání. Opětovně použijte pouze jednou, celkem 28 sklíček.

6. Vysušte sklíčka v 70%, 85% a 100% ethanolu, inkubujte každé 1 minutu při pokojové teplotě. Sušte na vzduchu při pokojové teplotě.

Podbarvení:

Naneste 15 µl DAPI (LK-095A (0,1 µg/ml) nebo LK-096A (1 µg/ml)) a přiložte krycí sklíčko. DAPI lze naředit v ředidle kontrastních barviv (LK-097A), pro dosažení požadované koncentrace. Umístěte sklíčka do tmy na 10 - 15 minut, aby se vyvinula kontrastní barva. Pozorujte pod mikroskopem.

Doporučení pro fluorescenční mikroskop:

Pro optimální vizualizaci používejte dobře udržovaný a pravidelně kalibrovaný mikroskop vybavený 100W rtuťovou výbojkou nebo jiným vhodným světelným zdrojem a 63x nebo 100x fluorescenčním objektivem. K vizualizaci více barev se používají trojpásmové filtry (DAPI/FITC/Cy3 nebo DAPI/FITC/TRITC). K vizualizaci jedné barvy se používají jednopásmové filtry.

Vhodný rozsah excitace a emise pro fluorochromy Kreatech:

Fluorochrom	Excitace	Emise
PlatinumBright™ 415	429 ± 20 nm	470 ± 30 nm
PlatinumBright™ 495	495 ± 20 nm	525 ± 30 nm
PlatinumBright™ 550	546 ± 20 nm	580 ± 30 nm

Řešení problémů

Alternativní protokol pro cytologické vzorky:

1. Předehřejte 50 ml 2 x SSC / 0,5 % Igepal (LK-105B) v nádobě typu Coplin na 37 °C ve vodní lázni. Vložte připravená sklíčka do nádoby typu Coplin a inkubujte 15 minut.
2. Vysušte sklíčka v 70%, 85% a 100% etanolu, inkubujte každý 1 minutu při pokojové teplotě. Sušte na vzduchu při pokojové teplotě.

Pokračujte přípravou sondy.

Alternativní protokol pro denaturaci sondy (oddělená denaturace sondy a vzorku)

1. Předehřejte 70% formamid / 2 x SSC, pH 7,0 až 72 °C.
2. Denaturujte sklíčka v 70% formamidu / 2 x SSC, pH 7,0, inkubujte při 72 °C (±1 °C) po dobu 2 minut.
3. Vysušte sklíčka v ledově chladném (-20 °C) 70%, 85% a 100% etanolu, inkubujte každý 2 minuty. Sušte na vzduchu při pokojové teplotě.
4. Denaturujte sondu při 90 °C po dobu 10 minut a obratem umístěte na led.

5. Krátce stočte lahvičku se sondou, odstředíte zkumavku se sondou a poté ji znovu stočte.
6. Naneste sondu na denaturované sklíčko, přikryjte krycím sklíčkem, zalepte gumovým cementem a pokračujte v hybridizaci.

Často kladené otázky

Mám slabé nebo žádné signály

- Znovu hybridizujte a ujistěte se, že byla sonda správně promíchána a měla pokojovou teplotu před použitím.
- Znovu hybridizujte a ujistěte se, že stringence promývání (Promývací pufr I) je správná - teplota (72 °C (± 1 °C)).
- Zohledněte pokles teploty při vkládání sklíček do předehřátých činidel.
- Použijte minimálně 10 μ l sondy na krycí sklíčko 22 x 22 mm.
- Zkontrolujte, zda jsou filtry mikroskopu a světelný zdroj správné a v pořádku.

Mám vysoké pozadí nebo specifickou křížovou hybridizaci při použití centromerových a subtelomerových sond

- Zvyšte teplotu stringence omývání (Wash Buffer I)

Minimální aplikace sondy:

Velikost skleněného krycího sklíčka	Minimální použití sondy
22x22 mm	10 μ l
22x32 mm	15 μ l
22x 50 mm	23 μ l

Doporučení při postupu:

Teplota a koncentrace pufru (stringence) při hybridizaci a promývání jsou důležité, protože nízká stringence může mít za následek nespecifické navázání sondy na jiné sekvence a vyšší stringence může mít za následek nedostatek signálu. Rovněž neúplná denaturace cílové DNA a/nebo DNA sondy může vést k nedostatku signálu.

Požadovaný materiál, který není součástí dodávky: činidla:

1. Souprava činidel FISH (KBI-60005)
2. Sada pro trávení FISH (KBI-60006)
3. 1% pufovaný formaldehyd / 1 x PBS / 20 mM MgCl₂
4. 1 x PBS, pH 7,4
5. 2 x SSC, pH 7,0
6. Roztok pepsinu (LK-101A)
7. Promývací pufr I (0,4 x SSC / 0,3 % Igepal) (LK-102A)

8. Promývací pufr II (2 x SSC / 0,1 % Igepal) (LK-103A)
9. Igepal
10. 0,01 M HCl
11. Carnoyuv fixační roztok (methanol : kyselina octová = 3 : 1)
12. 70% kyselina octová (v destilované H₂O)
13. Podbarvení DAPI (LK-095A (0,1 µg/ml) nebo LK-096A (1 µg/ml))
14. Ředidlo podbarvení (LK-097A)
15. Formamid
16. Ethanol 100%, 85% a 70%
17. Fixogum (LK-071A) nebo gumový cement

Požadovaný, ale nedodávaný materiál: vybavení:

1. Thermobrite (TS-01/02).
2. Inkubátor při 37 °C
3. Vodní lázeň s přesnou teplotou od 37 °C do 90 °C
4. Plastová nebo skleněná nádoba typu Coplin
5. Variabilní mikropipety (1 µl - 200 µl)
6. Fluorescenční mikroskop vybavený vhodnými filtry (viz Doporučení pro fluorescenční mikroskop)

Upozornění a opatření:

1. Pouze pro použití *in vitro*. Pouze pro profesionální použití. V případě nouze zkontrolujte bezpečnostní informace na listech SDS.
2. DNA sondy a hybridizační pufrы obsahují formamid, který je teratogen; nevdechujte a zabraňte kontaktu s pokožkou. Používejte rukavice a laboratorní plášť při manipulaci se sondami DNA a podbarvením DAPI.
3. Všechny materiály by měly být zlikvidovány podle pokynů vaší instituce a pokynů pro likvidaci nemocničního odpadu.
4. Označování podle nařízení (ES) č. 1272/2008

Piktogram



Signální slovo: Nebezpečí

Standardní věty o nebezpečnosti

H351 Podezření na vyvolání rakoviny.

H360D Může poškodit plod v těle matky.

H373 Může způsobit poškození orgánů při prodloužené nebo opakované expozici.

Pokyny pro bezpečné zacházení

P201 Před použitím si obznejte speciální instrukce.

P281 Používejte požadované osobní ochranné prostředky.

P308 + P313 Při expozici nebo podezření na ni: Vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření.

Doplňkové údaje o nebezpečnosti: žádné

Omezeno na profesionální uživatele

Patenty: Tyto produkty nebo použití těchto produktů podléhá majetkovému právu. Sondy jsou vyráběny pomocí Technologie Janssen Diagnostics, LLC REPEAT- FREE™ a značené pomocí Universal Linkage System (ULS™).

Fluorochrom použitý v PlatinumBright - 415 podléhá patentům vlastněným nebo kontrolovaným a vyráběným společností DYOMICS GmbH. USA a mezinárodním patentům Janssen Diagnostics, Technologie LLC REPEAT-FREE™.

Technologie a produkty ULS™ jsou pokryty jedním nebo více z následujících US patentů 5,580,990; 5,714,327; 5,985,566; 6,133,038; US RE40,557E, 6,797,818; 7,217,813. KREATECH je obchodní název společnosti KREATECH Biotechnology BV. ULS™, PlatinumBright™, jsou ochranné známky společnosti KREATECH Biotechnology BV. REPEAT-FREE™ je ochranná známka společnosti Janssen Diagnostics, LLC.

Thermobrite™ je registrovaná ochranná známka společnosti Leica Biosystems.