

Numero di catalogo prodotti FP-005 Per la diagnosi clinica e la ricerca scientifica.

RARA (17q21) Probe Detection Kit

[Nome del prodotto] RARA (17q21) Probe Detection Kit (Fluorescence In Situ Hybridization Method)

[CND] W01060299

[RDM] Non Applicabile

[Introduzione al prodotto]

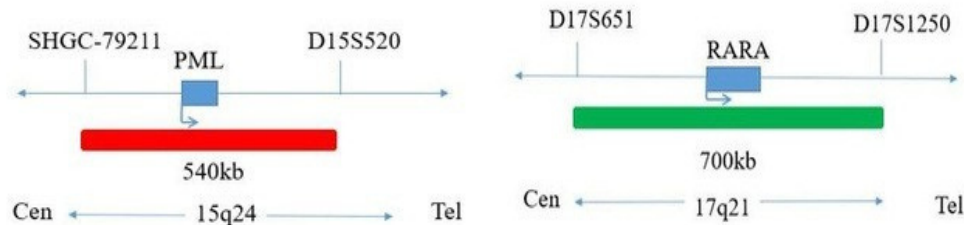
Questo kit utilizza la fluoresceina arancione per etichettare la sonda arancione PML e la fluoresceina verde per etichettare la sonda verde RARA. La sonda PML/RARA può essere combinata con il sito di rilevamento target mediante ibridazione in situ.

[Composizione del prodotto]

Il kit è composto da una sonda a doppio colore PML/RARA come mostrato in Tabella 1.

Tabella 1 Composizione Kit

Nome del componente	Formato	Quantità	Componenti principali
PML/RARA dual color probe	100µL/Tube	1	PML Orange probe; RARA Green probe



[Condizioni di conservazione e validità]

Tenere sigillato al riparo dalla luce a $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$. Il prodotto ha una validità di 12 mesi. Evitare inutili e ripetuti congelamenti e scongelamenti che non devono superare le 10 volte. Dopo l'apertura, entro 24 ore per la conservazione a breve termine e, conservare sigillato a $-2-8^{\circ}\text{C}$ al buio. Per la conservazione a lungo termine dopo l'apertura, tenere il coperchio sigillato a $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ al riparo dalla luce. La spedizione di questo kit deve essere effettuata a una temperatura inferiore a 0°C .

[Strumenti applicabili]

Sistemi di imaging per microscopia a fluorescenza, compresa la microscopia a fluorescenza e i set di filtri adatti per DAPI (367/452), Green (495/517), e Orange (547/565).

[Requisiti del campione]

- Prendere 1-3 ml di cellule del midollo osseo anticoagulanti di eparina sodica.
- Conservazione del campione: Campione di midollo osseo fresco senza fissazione (conservato a $-2-8^{\circ}\text{C}$ per non più di 24 ore). Dopo il fissaggio, la sospensione cellulare può essere conservata a $-20 \pm 5^{\circ}\text{C}$ per non più di 12 mesi; il vetrino cellulare preparato può essere conservato a $-20 \pm 5^{\circ}\text{C}$ per non più di 1 mese. Quando la temperatura di conservazione del campione è troppo alta o troppo bassa, la sospensione cellulare è eccessivamente volatilizzata o inquinata, il campione non può essere utilizzato per il rilevamento.

[Metodo di prova]

Reagenti correlati

I seguenti reagenti sono necessari per l'esperimento, ma non sono forniti in questo kit

- ① **20×SSC, pH 5.3±0.2** Pesare 176 g di cloruro di sodio e 88 g di citrato di sodio, sciogliere in 800 ml di acqua deionizzata, regolare il pH a 5.3 ± 0.2 a temperatura ambiente e completare a 1 L con acqua deionizzata. Sterilizzazione a vapore ad alta pressione, conservata a $-2-8^{\circ}\text{C}$, la durata di conservazione della soluzione è di 6 mesi. Scartare se il reagente appare torbido (turbido) o contaminato.

② 2×SSC, pH 7.0±0.2

Prendere 100 ml dei 20×SSC di cui sopra, diluire con 800 ml di acqua deionizzata, mescolare, regolare il pH a 7,0±0,2 a temperatura ambiente, completare a 1 litro con acqua deionizzata, conservata a 2-8°C, la durata di conservazione è di 6 mesi. Scartare se il reagente appare torbido (torbido) o contaminato.

③ Soluzione di etanolo: 70% etanolo, 85% etanolo

Diluire 700 ml, 850 ml di etanolo con acqua deionizzata fino a 1 L. La durata di conservazione è di 6 mesi. Eliminare se il reagente appare torbido o contaminato.

④ Soluzione 0.3% NP-40/0.4×SSC, pH 7.0-7.5

Prendere 0,6 ml di NP-40 e 4 ml di 20×SSC, aggiungere 150 ml di acqua deionizzata, mescolare, regolare il pH a 7,0-7,5 a temperatura ambiente, con acqua deionizzata completo fino a un volume di 200 ml. Conservato a 2-8°C, la durata di conservazione è di 6 mesi. Scartare se il reagente appare torbido o contaminato.

⑤ Soluzione di fissazione (metanolo: acido acetico glaciale = 3:1)

Preparare una soluzione di fissazione pronta all'uso mescolando accuratamente 30 ml di metanolo e 10 ml di acido acetico glaciale.

⑥ Soluzione 0,075 milioni di KCl

Pesare 2,8 g di cloruro di potassio, sciogliere in 400 ml di acqua deionizzata e completare a 500 ml con acqua deionizzata. Conservato a temperatura ambiente, la durata di conservazione della soluzione è di 6 mesi. Scartare se il reagente appare torbido o contaminato.

⑦ Colorante di contrasto diamidinilfenilindolo (DAPI)

Utilizzare il colorante di contrasto DAPI anti-tempra disponibile in commercio.

[Disposizioni]**1. Raccolta dei campioni e preparazione dei vetrini**

- ① Raccolta del campione: prelevare 1-3 ml di cellule del midollo osseo anticoagulanti eparina sodica.
- ② Raccolta delle cellule: le cellule di midollo non coltivate o i campioni di cellule di midollo coltivate sono stati aspirati in una provetta centrifugata da 15 ml al fondo della punta, e centrifugato a 500g per 5min. Il surnatante è stato accuratamente aspirato e scartato, lasciando circa 500 µL di liquido residuo per sospendere nuovamente le cellule.
- ③ Lavaggio cellulare: aggiungere 5 ml di soluzione tampone 1×PBS, soffiare e mescolare la precipitazione cellulare in sospensione pesante, centrifugare 500 g per 5 minuti, aspirare e scartare con cura il surnatante e lasciare circa 500 µL di soluzione residua nella cella in sospensione pesante; Ripeti una volta.
- ④ Cellula ipotonica: aggiungere 10 ml di soluzione ipotonica in ogni provetta (bagno caldo a 37°C in anticipo) e bagnomaria a 37°C ipotonico per 20 minuti.
- ⑤ Prefissazione cellulare: aggiungere 1 ml (10% di volume) di soluzione fissa alla sospensione cellulare dopo il trattamento ipotonico, soffiare delicatamente e mescolare, centrifugare immediatamente 500 g per 5 minuti, rimuovere il surnatante e lasciare circa 500 µL di soluzione residua per la sospensione cellulare.
- ⑥ Fissazione cellulare: aggiungere lentamente 10 ml della soluzione fissa alla sospensione cellulare, lasciarla a temperatura ambiente per 10 minuti per fissare la cellula, centrifugare 500 g per 5 minuti e lasciare circa 500 µL della soluzione residua per risospendere la cellula; Ripetere una volta (o fissare la cella più volte fino a quando la cella non è precipitata, lavata e pulita).
- ⑦ Preparazione della sospensione cellulare: dopo l'ultima centrifugazione della fissazione cellulare, il surnatante viene aspirato e una quantità adeguata di fissato viene aggiunta una soluzione per creare una sospensione cellulare con concentrazione appropriata.
- ⑧ Preparazione: prendere una goccia di sospensione cellulare da 3-10 µL per far scivolare, lasciare agire a 56°C per 0,5 ore.

2. Pretrattamento vetrini

- ① I vetrini sono stati sciacquati due volte in soluzione 2×SSC a temperatura ambiente per 5 minuti ogni volta.
- ② Disidratazione: le gocce cellulari sono state poste rispettivamente in etanolo al 70%, etanolo all'85% ed etanolo al 100% per 2 minuti e poi asciugate naturalmente.

3. Denaturazione e ibridazione

Le seguenti operazioni devono essere eseguite in camera oscura.

- ① Estrarre la sonda, lasciarla a temperatura ambiente per 5 minuti, capovolgerla con forza, mescolare bene e poi centrifugarla per un breve periodo tempo (nessuna vibrazione dello strumento a vortice). Prendi 10 µL di esso e lascialo cadere nell'area di ibridazione della goccia cellulare, copri immediatamente il vetro di copertura di 22mm × 22mm. La sonda deve essere espansa uniformemente sotto il vetro di copertura senza bolle e sigillare il bordo con colla di gomma (il bordo deve essere completamente sigillato per evitare che il pezzo asciutto influisca sui risultati della prova nel processo di ibridazione).
- ② Le gocce cellulari sono state posizionate sull'ibridatore e denaturate a 88°C per 2 minuti (l'ibridatore deve essere preriscaldato a 88°C) e ibridate a 45°C per 2-16 ore.

4. Lavaggio

Le seguenti operazioni devono essere eseguite in camera oscura.

- ① Rimuovere con cautela la colla sigillante attorno al vetro di copertura con una pinzetta per evitare che si attacchi o sposti il vetro di copertura, immergere il campione in 2xSSC per circa 5 secondi, estrarlo, spingere delicatamente un angolo del vetro di copertura verso il bordo del vetrino con una pinzetta e rimuovere delicatamente il vetro di copertura con una pinzetta;
- ② Posizionare il campione a temperatura ambiente 2xSSC per 1 minuto;
- ③ Prelevare il campione e immergerlo in una soluzione allo 0,3% NP-40/0,4xSSC preriscaldata a 68°C per 2 minuti;
- ④ Prelevare il campione e immergerlo in acqua deionizzata preriscaldata a 37°C in anticipo per 1 minuto; asciugarlo naturalmente in un ambiente buio.

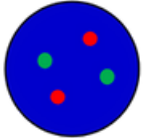
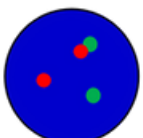
5. Controcolorazione

Le seguenti operazioni devono essere eseguite in una camera oscura 10µl di colorante composto DAPI vengono versati nell'area di ibridazione del vetrino e immediatamente coperti. Viene selezionato il filtro adatto per l'osservazione del vetrino al microscopio a fluorescenza.

6. Osservazione dei risultati FISH

Posizionare la pellicola controcolorata sotto il microscopio a fluorescenza e prima posizionarla sotto la lente dell'obiettivo a bassa potenza (10 ×) Confermare l'area cellulare al microscopio; Vai a 40× Sotto la lente dell'obiettivo, trova una posizione in cui le cellule sono distribuite uniformemente; Poi nell'obiettivo ad alta potenza (100 ×) sono stati osservati i risultati dei nuclei dei pesci.

[Comune interpretazione del tipo di segnale]

Segnale del sito del gene PML  	Segnale del sito del gene RARA
	Negativo: 2 Orange; 2 Green (2R2G)
	Positivo: 1 Orange; 1 Green; 2 di Fusione (1R1G2F)
	Positivo: 1 Orange; 1Green; 1 di Fusione (1R1G1F)

[Precauzioni]

1. Si prega di leggere attentamente questo manuale prima del test. Il personale addetto alle prove deve ricevere una formazione tecnica professionale. Il personale addetto al conteggio dei segnali deve essere in grado di osservare e distinguere i segnali arancioni, rossi e verdi.
2. Quando si testano campioni clinici, se è difficile contare i segnali di ibridazione e i campioni non sono sufficienti per ripetere il test, il test non fornirà alcun risultato del test. Se la quantità di cellule è insufficiente per l'analisi, il test non fornirà i risultati del test.
3. La formamide e l'agente controcolorante DAPI utilizzati in questo esperimento hanno una potenziale tossicità o cancerogenicità; quindi, devono essere utilizzati nella cappa aspirante e indossare maschere e guanti per evitare il contatto diretto.

4. I risultati di questo kit saranno influenzati da vari fattori del campione stesso, ma anche limitati dal tempo di digestione degli enzimi, dalla temperatura e dal tempo di ibridazione, dall'ambiente operativo e dai limiti dell'attuale tecnologia di biologia molecolare, che possono portare a risultati errati. L'utente deve comprendere i potenziali errori e le limitazioni di precisione che possono esistere nel processo di rilevamento.
5. Tutte le sostanze chimiche sono potenzialmente pericolose. Evitare il contatto diretto. I kit usati sono rifiuti clinici e devono essere smaltiti correttamente.
6. Questo prodotto è per la diagnosi clinica e la ricerca scientifica.

[Spiegazione dei simboli]

	Da utilizzare per		Dispositivo medico-diagnostico in vitro
	Codice lotto		Marcatore CE
	Fabbricante		Segnale di avvertimento
	Numero di catalogo		European Authorised Representative
	Limitazione della temperatura		Consultare le istruzioni per l'uso
	Contiene una quantità sufficiente per <n> test		

[Versione manoscritta e data di approvazione]

 Versione manuale: [V1.2 recensito il 07 dicembre 2021](#)

 Data approvazione: [01 marzo 2020](#)


Via dei Colli S.Paolo 3/D – 00072 ARICCIA (RM)- Italy

Tel.: (+39)0693955058 – Fax.: (+39)0693955059

 E-mail: servizioclienti@resnovaweb.it – PEC mail: resnova@pec.it

 Per invio ordini: ordini@resnovaweb.it – Web site: www.resnovaweb.com