

METODICA FISH su citologici O/N con Buffer Smart-ISH

&

METODICA FISH RAPIDA su citologici con Buffer Rapid-ISH Integra

PRIMA DI COMINCIARE LA FISH RAPIDA ASSICURARSI DI AVER CAMBIATO TUTTI I SOLVENTI E GLI ALCOLI PER AVERE LA MASSIMA PERFORMANCE!

Materiali

- Xilolo o analogo per paraffinatura
- Etanolo o analogo miscela alcolica al 100%; 85%; 70%
- Tampone Sodio-Citrato (SSC) 2X pH 7
- HCL 0.01N
- Pepsina
- Sonda per FISH
- **Buffer Rapid-ISH Integra / Buffer Smart-ISH**
- Rubber Cement o analogo collante vinilico
- Vetrino Coprioggetto
- Tampone di Stringenza SSC2X/NP40 1.5%
- Controcolorante DAPI

Strumenti

- Stufa a Secco
- Bagnetto termostato a tre pozzetti
- Piastra di ibridazione
- Vaschette "Coplin Jar"

Protocollo

Se il preparato citologico da analizzare è già stato colorato e montato con coprioggetto porre in stufa a secco a 65°C per 24-48 ore al fine di staccare il coprioggetto senza danneggiare il materiale.

- Pre riscaldare nel bagnetto termostato una vaschetta con 50ml di SSC 2X pH 7 a 73°C
- Pre riscaldare nel bagnetto termostato una vaschetta con 50ml di HCL 0.01N a 37°C
- Pre riscaldare nel bagnetto termostato una vaschetta con 100ml SSC2X/NP40 1.5% a 75°C
- Procedere con 3 lavaggi sequenziali dei vetri in coplin con 50ml di xilolo a RT per 5 minuti/cad.
- Asciugare i vetri a RT per 5 minuti (**solo per citologici pre-montati e colorati**)
- Deidratare i vetrini in 2 passaggi sequenziali in coplin con 50 ml di Etanolo 100% per 5 minuti/Cad.
- Asciugare i vetri a RT per 5 minuti
- Incubare i vetri nella coplin con SSC 2X a 73°C 3 minuti circa in relazione alle caratteristiche del preparato (**solo per citologici pre-montati e colorati**)
- Sciogliere 0.50 gr di Pepsina nella coplin con HCL a 37°C
- Incubare i vetri nella coplin a 37°C per 25-30 minuti circa in relazione alle caratteristiche del preparato
- Lavare quindi i vetri in un'immersione rapida in una coplin con 50 ml di SSC2X

- Deidratare i vetrini in 3 passaggi sequenziali in coplin con 50 ml di Etanolo 70%-85%-100% per 1 minuto/Cad.
- Asciugare i vetri a RT per 5 minuti

METODICA FISH O/N:

- Su ciascun vetrino apporre 3 ul di sonda e 5ul di *Buffer Smart-ISH*
- Coprire l'area con coprioggetto e sigillare con Rubber Cement
- Impostare sulla piastra di ibridazione un protocollo che preveda : **Denaturazione**, temperatura e tempi secondo le specifiche della sonda; **Ibridazione**, temperatura secondo le specifiche della sonda, tempo *O/N*
- Rimuovere il coprioggetto e lavare velocemente i vetrini in una coplin con 50 ml di SSC2X a RT
- Immergere i vetrini nella coplin con SSC2X/NP40 1.5% a 75°C per 2 minuti
- Lavare velocemente i vetrini in una coplin con 50ml di SSC 2X
- Deidratare i vetrini in 3 passaggi sequenziali in coplin con 50 ml di Etanolo 70%-85%-100% per 1 minuto/Cad.
- Asciugare i vetri a RT per 5 minuti
- Apporre 5-10 ul di DAPI su ciascun vetrino, coprire con coprioggetto
- Osservazione al microscopio

METODICA FISH RAPIDA:

- Su ciascun vetrino apporre 3 ul di sonda e 5ul di *Buffer Rapid-ISH Integra* (la tipologia di buffer è da definirsi in relazione al tipo di campione da analizzare; vedere schede tecniche allegate)
- Coprire l'area con coprioggetto e sigillare con Rubber Cement
- Impostare sulla piastra di ibridazione un protocollo che preveda : **Denaturazione**, temperatura e tempi secondo le specifiche della sonda; **Ibridazione**, temperatura secondo le specifiche della sonda, tempo *40 minuti*
- Rimuovere il coprioggetto e lavare velocemente i vetrini in una coplin con 50 ml di SSC2X a RT
- Immergere i vetrini nella coplin con SSC2X/NP40 1.5% a 75°C per 2 minuti
- Lavare velocemente i vetrini in una coplin con 50ml di SSC 2X
- Deidratare i vetrini in 3 passaggi sequenziali in coplin con 50 ml di Etanolo 70%-85%-100% per 1 minuto/Cad.
- Asciugare i vetri a RT per 5 minuti
- Apporre 5-10 ul di DAPI su ciascun vetrino, coprire con coprioggetto
- Osservazione al microscopio



BUFFER Rapid-ISH Integra e Smart-ISH



VELOCE



EFFICIENTE



**FACILE DA
USARE**

OaCP SRL

Viale Fanin, 48, 40127, Bologna (IT)

m@il: ask@oacp.it

www.oacp.it