



1000 Youngs Road, Suite 207
Williamsville, USA, 14221
Telefon: (716) 856-3873 lub 1-800-715-5880
Faks: (716) 431-3440
info@empiregenomics.com
www.empiregenomics.com

Sonda FISH FGFR3 Break Apart

Kolor(y): Pomarańczowy/Zielony

REF

FGFR3BA -10- ORGR

REF

FGFR3BA -20- ORGR

REF

FGFR3BA -CS- ORGR

Ilość: 10 testów, 20 µl Ilość: 20 testów, 40 µl Ilość: Patrz etykieta opakowania



Tylko do użytku *in vitro*
Oznaczenie CE w niektórych krajach
RUO w USA i innych krajach

Przechowywanie, obchodzenie się, trwałość i utylizacja: Przechowywać produkt w temperaturze -20°C; unikać światła; data ważności podana na etykiecie produktu. Jeśli opakowanie jest uszkodzone, należy powiadomić lokalnego dystrybutora. Podczas pracy z sondą należy zawsze nosić rękawice i inny sprzęt ochronny. Sondy Empire Genomics są wrażliwe na światło i nie powinny być wystawiane na nadmierne działanie światła. Sondy należy przechowywać w ciemnym miejscu, aby uniknąć ich wybleśnienia. Utylizować zgodnie z lokalnymi przepisami.

Skład:

- Skoncentrowana znakowana sonda FISH: Minimum 20ng/µl
- Bufor do hybrydyzacji (zawiera małe stężenie formamidu)

:

Empire Genomics FGFR3 Break Apart FISH Probe to test fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH) przeznaczony do wykrywania rearanżacji obejmujących gen FGFR3 w regionie chromosomalnym 4p16.3. Jest to test jakościowy, nieautomatyzowany test przeznaczony do stosowania jako uzupełnienie innych testów klinicznych i nie może być stosowany jako jedyna metoda diagnozy.

Rodzaje próbek:

- Krew obwodowa
- Tkanka FFPE
- Szpik kostny

Ostrzeżenia i środki ostrożności: Produkt nie zawiera żadnych składników pochodzenia ludzkiego lub zwierzęcego. Bardziej szczegółowe informacje na temat bezpieczeństwa i obsługi znajdują się w karcie charakterystyki. Zawiera formamid w niskim stężeniu. Nie używać przeterminowanej sondy. Nie używać sondy ponownie. Unikać zanieczyszczenia krzyżowego. Przed użyciem należy przeczytać całą instrukcję obsługi.

- H360d Może działać szkodliwie na w łonie matki.
- P309+P310 W przypadku narażenia lub złego samopoczucia: Natychmiast skontaktować się z OŚRODKIEM ZATRUĆ lub lekarzem.
- P201 Przed użyciem należy zapoznać się ze specjalnymi instrukcjami.
- H315+H320 Działa drażniąco na skórę i oczy.
- P262 Nie dopuścić do przedostania się do oczu, na skórę lub .
- P305+P351+P338 W PRZYPADKU DOSTANIA SIĘ DO OCZU: Ostrożnie płukać wodą przez kilka minut. Wyjąć soczewki kontaktowe, jeśli są i można je łatwo . Kontynuować płukanie.
- P501 Zawartość/pojemnik należy utylizować zgodnie z lokalnymi/regionalnymi/krajowymi/międzynarodowymi przepisami.
- P280 Nosić rękawice ochronne/odzież ochronną/ochronę oczu/ochronę twarzy.

Charakterystyka działania:

Ta sonda FISH została przetestowana na normalnych próbkach krwi. W ramach kontroli jakości sonda została poddana analizie siły sygnału i swoistości. Więcej można znaleźć w dołączonym certyfikacie analizy. Dokładność została określona na 100%. Ta sonda została zaprojektowana do hybrydyzacji tylko z regionami określonymi na poniższych ideogramach.

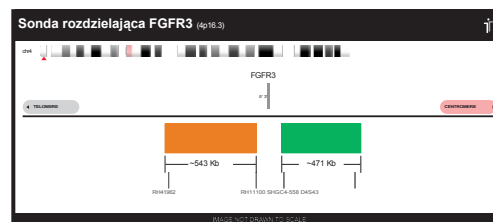
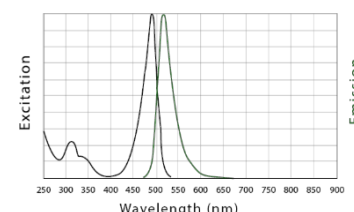
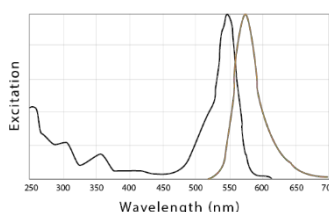
Ograniczenia:

- Ten produkt jest przeznaczony wyłącznie do użytku *in vitro*.
- Wydajność sondy zależy od przygotowania próbki, jej jakości i właściwego przechowywania produktu.
- Ten produkt jest przeznaczony wyłącznie do użytku przez przeszkolonych specjalistów laboratoryjnych.

Instalacja i obsługa: Cały sprzęt używany w eksperymencie FISH musi być odpowiednio skalibrowany. Filtry i źródło światła używane do wykrywania sygnałów fluorescencyjnych muszą być rutynowo wymieniane, aby zapewnić optymalną wydajność sondy. Kontrola temperatury i wilgotności jest ważna dla prawidłowego działania sondy, upewnij się, że wszystkie termometry i hydrometry są skalibrowane. Sonda powinna być oceniana na normalnych próbkach, aby zapewnić prawidłową hybrydyzację.

Zasada metody: Fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (FISH) jest techniką cytogenetyczną stosowaną do wykrywania aberracji genomowych. Sondy FISH są powszechnie stosowane do wykrywania delecji, amplifikacji i rearanżacji docelowego genomu.

Color	Absorbance Maximum	Emission Maximum
Orange-dUTP	548 nm	573 nm
Green-dUTP	491 nm	515 nm



Niedostarczone odczynniki

Do przygotowywania szkiełek nietkankowych:

- 70% etanol
- 100% metanol
- Kwas octowy

Obróbka wstępna FFPE

- 0.01N HCL
- Ksylen
- Etanol (70%, 85%, 100%)
- 10mM kwas cytrynowy (BDH, 4136-500G)
- 160 mg stałej pepsyny (Sigma, # P7012-1G)
- 0,3% Igepal, CA-630 Sigma (lub NP40)/0,4XSSC
- 0,1% Igepal CA-630, Sigma (lub NP40)/2XSSC

Wymagany sprzęt:

- Mikroskop fluorescencyjny z odpowiednim zestawem filtrów.

Do automatycznej hybrydyzacji

- Roztwór płuczający 1 (WS1) - 0,3% Igepal (Sigma CA-630) lub NP-40 / 0,4 x SSC
- Materiał chłonny
- dH_2O
- Roztwór płuczający 2 (WS2) - 0,1% Igepal (Sigma CA-630) lub NP-40 / 2 x SSC
- DAPI z Antifade

Do ręcznej hybrydyzacji

- Bufor denaturujący - 70% formamid, 2 x SSC, pH 7,0-8,0
- 70%, 85%, 100% etanolu
- Roztwór płuczający 1 (WS1) - 0,3% Igepal (Sigma CA-630) lub NP-40 / 0,4 x SSC
- Roztwór płuczający 2 (WS2) - 0,1% Igepal (Sigma CA-630) lub NP-40 / 2 x SSC
- DAPI z Antifade

nienaruszone (nie przerośnięte), bez cytoplazmy i w ciemnoszarym. Jeśli tak nie jest, należy następujące zmienić.

- **Zbyt duże stężenie:** Komórki będą słabo rozprzestrzenione i prawdopodobnie znajdą się w cytoplazmie (metafazy pojawiają się w 3D z wyraźną aureolą wokół nich). Dodaj odpowiednio dodatkową poprawkę.
- **Zbyt niskie stężenie:** Metafaza może nie być nienaruszona, wymagana większa ilość sondy dla większej powierzchni. Ponownie odwirować probówkę (1200 obr./min przez 10 minut) i odpowiednio usunąć nadmiar utwalacza.
- **Zbyt szybkie suszenie:** komórki interfazowe są załamane, małe i czarne. Komórki metafazy są słabo rozłożone, w cytoplazmie i pozostają czarne. Jeśli poziom wilgotności jest zbyt niski (poniżej 40-45%), stwórz bardziej wilgotne środowisko, wykonując jedną z następujących czynności: dodaj nawilżacz pokojowy, wykonaj szkiełka nad zlewką z parą, wykonaj szkiełka nad zlewem z bieżącą gorącą wodą lub umieść mokre tkanki na podgrzewaczu szkiełek i umieść szkiełko na krótko (~ 5 sekund) przed umieszczeniem bezpośrednio na podgrzewaczu szkiełek.
- **Zbyt wolne suszenie:** Metafazy są jasnoszare i mogą być nadmiernie rozłożone lub nienaruszone. Oba scenariusze mogą powodować niskiej jakości hybrydyzację. Zmniejsz czas w krokach 9-10 przed umieszczeniem szkiełka na podgrzewaczu szkiełek. Jeśli poziom wilgotności jest zbyt wysoki (powyżej 55%), osuszać pokojowy może pomóc w obniżeniu poziomu wilgotności.
- **Cytoplazma wokół metafazy:** Jeśli cytoplazma wokół metafazy nadal stanowi problem po dokonaniu korekt w powyższych krokach, dodaj 1-2 krople utwalacza do szkiełka po krokach 1-9 powyżej.
- **Prawidłowe suszenie:** Komórki interfazowe są płaskie, pulchne i blade; komórki metafazowe są ciemnoszare, dobrze rozłożone z kilkoma skrzyżowaniami i nienaruszone bez cytoplazmy.

Krok 3 - Starzenie się/przechowywanie slajdów

1. Przechowuj wysuszone szkiełka w eksykatorze przez co najmniej 24 godziny w temperaturze pokojowej, aby wystarczająco się zestarzały przed etapem FISH. Jeśli wyniki są wymagane szybko, należy pozostawić szkiełko w podgrzewaczu na co najmniej 15 minut przed FISH.
2. Jeśli slajd nie zostanie poddany hybrydyzacji w ciągu 24-48 godzin, może być przechowywany w szczelnie zamkniętym pojemniku w zamrażarce (-20°C) przez okres do dwóch tygodni.
3. Utrwalone zawiesiny komórek powinny być przechowywane w kriofolach w zamrażarce (-20°C).

*Referencje

1. Barcz MJ, Knutsen T, Spurbeck JL. Podręcznik laboratoryjny cytogenetyki AGT, wydanie trzecie. Rozdział 3 - Metody cytogenetyczne krwi obwodowej (M.G. Brown, H.J. Lawce). Lippincott-Raven Philadelphia 1991
2. Dunn B, Mouchrani P, Keagle M. The Cytogenetic Symposia - AGT. Wydanie drugie.

Przetwarzanie slajdów dla próbek tkanek zatopionych w parafinie

Niniejsza procedura opisuje etapy przetwarzania slajdów tkanek zatopionych w parafinie. Proces obróbki wstępnej de-parafinizuje i wstępnie przetwarza próbkę przed denaturacją i hybrydyzacją z odpowiednimi sondami. Po obróbce wstępnej szkiełka i odpowiednie sondy są denaturowane. Po zakończeniu przetwarzania należy przejść do odpowiednich instrukcji dotyczących hybrydyzacji.

Odparafinowanie i obróbka wstępna

- Podgrzać 10mM kwas cytrynowy do 90-95°C
- Podgrzać 40 ml 0,1 N HCL do temperatury 37°C.
- Rozgrzać piekarnik do 90°C
- Przygotować 1 ml pepsyny o stężeniu 160 mg/ml w H_2O

1. Starzenie szkiełek w temperaturze 90°C przez 25 minut w piekarniku.
2. Zanurzyć szkiełka w ksylenie na 10 minut. Powtórzyć jeden raz ze świeżym ksylenem.
3. Zanurzyć szkiełka w 100% etanolu na 5 minut. Powtórzyć jeden raz.
4. Suszyć na powietrzu w suszarce do suwaków.
5. Umieścić szkiełko w buforze do wstępnej obróbki kwasem cytrynowym o temperaturze 90-95°C (pH ~6,8) na 30 minut.

Trawienie

1. Dodać 1 ml 160 mg/ml roztworu pepsyny do 40 ml 0,1N HCL i dobrze wymieszać.
2. Umieścić szkiełko w roztworze pepsyny na 20-30 minut.
3. Płukać szkiełka w 2x SSC przez 5 minut.
4. Zanurzyć szkiełka w 70% etanolu na 30 sekund. Wysuszyć szkiełka na powietrzu lub umieścić na podgrzewaczu do szkiełek w celu wysuszenia.
5. Obejrzeć roztrawianie pod mikroskopem. Jeśli nie uzyskano odpowiedniego roztrawiania, powtórz kroki 2-4, ale zmienić czas roztrawiania na 10 minut i analizować szkiełka po każdym roztrawianiu.
6. Po osiągnięciu odpowiedniego trawienia, odwodnić szkiełka odpowiednio 70%, 85% i 100% etanolem przez 2 minuty. Przejść do protokołu hybrydyzacji.

Protokół przygotowania szkiełka dla utrwalonego osadu komórkowego

Uwagi:

- Idealne warunki środowiskowe do tworzenia slajdów to wilgotność 45-55% i temperatura 24°C (72-75°F) z minimalnymi przeciągami. Hydrometr/termometr powinien być umieszczony w pobliżu stołu do tworzenia slajdów w celu monitorowania warunków środowiskowych. Jeśli warunki nie są idealne, przed wykonaniem preparatu należy podjąć próbę ich dostosowania.
- Jakość próbki jest ważna i trudna do dostosowania po dodaniu utwalacza. Jest, aby postępować zgodnie ze standardowymi protokołami Cytogenetics* przy użyciu odczynników, które zostały przetestowane przed użyciem.
- Opcjonalnie: Oczyszczyć szkiełka, umieszczając je w słoiku z 70% etanolem na 5 minut, a następnie kilkakrotnie przecierając chusteczką w jednym kierunku. umieścić szkiełko w słoiku ze świeżym utwalaczem 3:1 metanol:g kwasu octowego. Szkiełka mogą być użyte bezpośrednio lub wysuszone i przechowywane w zamrażarce (-20°C).
- Wykonuj slajdy tylko na jednej próbce pacjenta na raz, aby uniknąć zanieczyszczenia krzyżowego między próbkami.

Krok 1 - Tworzenie slajdów

1. Zebrać próbkę przy użyciu standardowych protokołów Cytogenetics*.
2. Zmienić utwalacz (metanol Carnoy'a 3:1:g kwas octowy) w próbówce, aż supernatant stanie się bezbarwny. Ponownie utwalić próbkę w świeżym utwalaczu tuż przed wykonaniem slajdu.
3. Ustawić podgrzewacz szkiełek na ~45°C
4. Odessać supernatant ~5 ml powyżej osadu komórek i ponownie zawiesić komórki za pomocą szklanej pipety Pasteura.
5. Dodać tyle świeżego utwalacza na zimno, aby uzyskać lekko mleczną zawiesinę.
6. Wyjąć jeden slajd ze słoika z utwalaczem Coplin, osuszyć na ręczniku papierowym. Ewentualnie wyjmij jeden zimny slajd z zamrażarki.
7. Przytrzymaj szkiełko lekko pionowo i upuść 3 krople zawiesiny na górę, w środku i na dole szkiełka.
8. Delikatnie obrócić szkiełko, przechylając je lekko po ~15 sekundach, aby odsączyć nadmiar zawiesiny na chusteczkę.
9. Utrzymuj slajd w pozycji poziomej do momentu zaobserwowania ziarnistego wyglądu i wyschnięcia krawędzi slajdu. Czas będzie się różnił w zależności od wilgotności powietrza.
10. Wytrzyj tylną część szkiełka chusteczką i wysusz szkiełka na powietrzu.
11. Umieść szkiełko bezpośrednio na podgrzewaczu szkiełek, aby pozostało suche.
12. Oznaczyć szkiełka odpowiednią etykietą szkiełka pacjenta. Nigdy nie zostawiaj nieoznakowanych szkiełek na podgrzewaczu. Do etykietowania należy używać ołówka HB lub trwałego markera odpornego na alkohol. Oznaczyć szkiełko co najmniej dwoma unikalnymi identyfikatorami pacjenta, datą i inicjałem.
13. Ocenij preparat pod mikroskopem z kontrastem fazowym (obiektyw 10x).

Krok 2 - Ocena jakości slajdów

Idealne stężenie powinno wynosić ~50 komórek interfazowych/pole; komórki interfazowe powinny być duże, szare i płaskie. Metafazy powinny być dobrze rozłożone z minimalnymi zwrótnicami,

Instrukcja automatycznej hybrydyzacji

Niniejsze instrukcje dotyczą hybrydyzacji, które będą przeprowadzane przy użyciu automatycznego urządzenia Hybrite/Thermobrite. Jeśli urządzenie Hybrite/Thermobrite nie będzie używane, należy postępować zgodnie z "Instrukcjami ręcznej hybrydyzacji".

Uwagi

- Protokół może być używany ze wszystkimi sondami FISH - kontrolnymi, specyficznymi dla genów, niestandardowymi sondami FISH.
- Rozwiązania można wprowadzić przed .
- Konieczna może być dalsza optymalizacja protokołu.

1. Włącz Hybrite/Thermobrite.
2. Ustawianie przewodnika po programach (patrz "Opcje przewodnika po programach").
3. Wstępnie namoczyć materiał absorbujący w dH_2O .
4. Dodać 2 μl sondy i 8 μl buforu hybrydyzacyjnego.
5. Nałożyć czystą szkiełko nakrywkowe 22 x 22
6. Nałożyć cement gumowy na krawędzie szkiełka nakrywkowego w celu uszczelnienia.
7. Umieścić w Hybrite/Thermobrite i zamknąć pokrywę.
8. Uruchom program.
9. Pozostawić na co najmniej 16 .
10. Podgrzać WS1 do 73°C.
11. Usunąć szkiełko nakrywkowe i umieścić szkiełko w mieszałce WS1 na ~10 sekund.
12. Pozostaw zjeżdżalnię na dokładnie 2 minuty.
13. Przenieś szkiełko do WS2 w temperaturze pokojowej. Mieszać przez około 10-15 sekund i szkiełka na 2 minuty.
14. Pozostaw slajd do wyschnięcia w ciemności.
15. Nałożyć 10 μl DAPI z Antifade i przykryć szkiełkiem nakrywkowym 22x50.
16. Odczekać 15-30 minut, a następnie wizualizować pod mikroskopem z odpowiednim filtrem.

Opcje przewodnika po programach

Preparaty krwi obwodowej

- Denaturować w temperaturze 72-73°C przez 2 minuty.
- Hybrydyzować w temperaturze 37°C przez co najmniej 16 godzin.

Dla tkanek osadzonych w parafinie po obróbce wstępnej

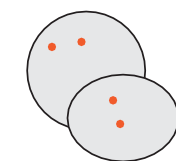
- Denaturować w temperaturze 75°C przez 7 minut.
 - Hybrydyzacja w 37°C przez co najmniej 16 godzin
- Może wymagać rozwiązywania problemów*

Instrukcje ręcznej hybrydyzacji

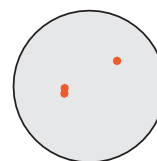
Instrukcje te nie wykorzystują Hybrite/Thermobrite. Postępowanie zgodnie z tymi instrukcjami pozwoli na prawidłową hybrydyzację sondy z próbką bez użycia systemu automatycznego. Jeśli używany będzie zautomatyzowany system, taki jak Hybrite/Thermobrite, należy postępować zgodnie z "Instrukcjami automatycznej hybrydyzacji".

1. Ogrzać preparat do temperatury pokojowej.
2. Umieścić szkiełka w 70% etanolu w temperaturze pokojowej na 2 minuty.
3. Umieścić szkiełka w 85% etanolu w temperaturze pokojowej na 2 minuty.
4. Umieścić szkiełka w 100% etanolu w temperaturze pokojowej na 2 minuty.
5. Delikatnie osuszyć tylną część szkiełka i umieścić na podgrzewaczu szkiełek w temperaturze 45°C, aż etanol odparuje.
6. Przygotować mieszaninę sondy, mieszając 2 μl sondy z 8 μl buforu.
7. Odmierzyć pipetą 10 μl mieszaniny na szkiełko podstawowe.
8. Nałożyć czystą szkiełko nakrywkowe 22 mm² na szkiełko.
9. Uszczelnij krawędzie szkiełka nakrywkowego za pomocą cementu gumowego.
10. Denaturuj szkiełko na płycie grzejnej zgodnie z "Opcjami przewodnika po programach" powyżej. Upewnij się, że szkiełko jest osłonięte przed światłem podczas tego procesu.
11. Umieścić szkiełko w ogrzanej do 37°C komorze z nawilżaniem i umieścić komorę w inkubatorze 37°C.
12. Inkubować w temperaturze 37°C przez 16 godzin.
13. Podgrzać WS1 (0,3% Igapal (Sigma CA-630) lub NP-40 / 0,4 x SSC) do 73°C.
14. Usunąć szkiełko nakrywkowe. Umieścić w WS1, mieszając przez około 10 sekund, a następnie odstawić na dokładnie 2 minuty.
15. Przenieś szkiełko do WS2 w temperaturze pokojowej. Mieszać przez około 10-15 sekund i pozostawić szkiełka na 2 minuty.
16. Pozostawić do wyschnięcia w ciemności.
17. Nałożyć 10 μl DAPI z Antifade i przykryć szkiełkiem nakrywkowym 22x50.
18. Odczekać 15-30 minut, a następnie wizualizować pod mikroskopem przy użyciu odpowiednich zestawów filtrów.

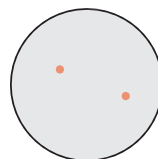
Ocena jakości FISH:



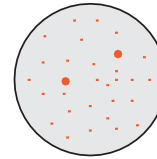
Nakładające się jądra: Nie należy odczytywać tych komórek.



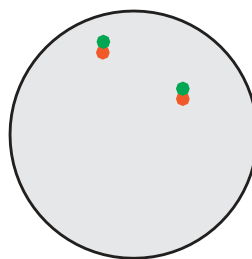
Podwójny sygnał na jednym chromosomie: Policz podwójny sygnał jako pojedynczy sygnał.



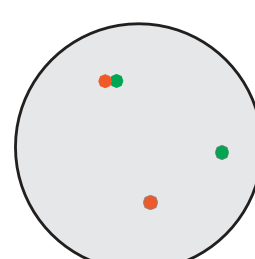
Słaby sygnał: Patrz przewodnik rozwiązywania problemów. Nadal można odczytać, jeśli sygnał jest wyraźny.



Wysokie sygnały tła: Patrz przewodnik rozwiązywania problemów, nadal można odczytać komórkę, jeśli nie jest to zbyt poważne.



Rysunek 1



Rysunek 2

Rysunek 1: Normalny wzór sygnału wyświetlający 2 pomarańczowe/zielone sygnały fuzji.

Rycina 2: Nieprawidłowy wzór sygnału wyświetlający 1 pomarańczowy sygnał, 1 zielony sygnał i 1 pomarańczowo-zielony sygnał fuzyjny wskazujący na rearanżację obejmującą FGFR3.

Zniekształcona morfologia chromosomów

Możliwy powód: Slajdy wyschły zbyt szybko

Potencjalne rozwiązania:

- Zwiększ wilgotność podczas zrzucania slajdów.
- Wydłuż czas po upuszczeniu slajdu przed umieszczeniem go w podgrzewaczu slajdów.
- Upewnij się, że temperatura podgrzewacza szkiełek wynosi ~45°C. Monitorować temperaturę za pomocą termometru powierzchniowego.
- Utrwalić zawieszinę komórek w świeżo przygotowanym utrwalczu 3:1 metanol:g kwasu octowego.

Możliwy powód: Niewłaściwe starzenie/przechowywanie slajdów

Potencjalne rozwiązania:

- Przed wykonaniem FISH dojrzewać szkiełka przez co najmniej 24 godziny w temperaturze pokojowej.
- Nie piec szkiełek.
- Jeśli FISH musi być przeprowadzona tego samego dnia co przygotowanie szkiełka, należy inkubować szkiełko przez co najmniej 1 godzinę w słoiku coplin zawierającym 2 x SSC w 37°C, a następnie odwozić szkiełko przez 1 minutę odpowiednio w 70%, 85% i 100% etanolu przed etapem denaturacji.

Wysokie tło/niska specyficzność

Możliwy powód: Szklane szkiełka nie są czyste

Potencjalne rozwiązania:

- Moczyć szkiełka w 70% etanolu przez 5 minut, a następnie przetrzeć 2-3 razy chusteczką.

Możliwy powód: Niska jakość próbki z resztkami komórkowymi

Potencjalne rozwiązania:

- Przemycić osad komórkowy świeżym utrwalczem 2-3 razy, a następnie powtórzyć wykonanie szkiełka. Upewnij się, że zawieszina komórek nie jest zbyt gęsta.

Możliwy powód: Cytoplazma wokół chromosomów

Potencjalne rozwiązania:

- Slajdy wyschły zbyt szybko. Patrz wyżej

Możliwy powód: Nieprawidłowe roztwory płuczące

Potencjalne rozwiązania:

- Upewnij się, że WS1 i WS2 są odpowiednio przygotowane i przechowywane.
- Sprawdź, czy pH (7,0) i temperatura (73°C) roztworów płuczających są prawidłowe. Umieść termometr bezpośrednio w WS1.
- Upewnij się, że roztwory płuczające nie są przeterminowane lub nadużywane. Wyrzucić po 10 slajdach.
- Upewnij się, że tylko 4 szkiełka są myte jednocześnie, aby utrzymać odpowiednią temperaturę WS1.
- Upewnij się, że czas przebywania w roztworach myjących jest odpowiedni.
- Zwiększyć czas w WS1 do 3 minut.

Możliwy powód: szerokopasmowe filtry mikroskopowe

Potencjalne rozwiązania:

- Należy używać filtrów o wąskich szerokościach pasma właściwych dla używanych fluorochromów.

Możliwy powód: nieodpowiednie warunki hybrydyzacji

Potencjalne rozwiązania:

- Należy używać szczelnie zamkniętych komór z odpowiednią kontrolą wilgotności.

Słaby sygnał lub jego brak

Możliwy powód: Szkiełko nie zostało odpowiednio zdenaturowane

Potencjalne rozwiązania:

- Upewnij się, że temperatura denaturacji jest prawidłowa, rejestrując temperaturę płyty grzejnej lub automatycznego hybrydyzatora za pomocą pistoletu do pomiaru temperatury lub innego urządzenia.
- Rozwiązywanie problemów poprzez zwiększenie temperatury denaturacji.
- Upewnij się, że czas denaturacji jest prawidłowy, postępując zgodnie z "Opcjami przewodnika po programach" powyżej. W razie potrzeby zwiększ lub zmniejsz czas.

Możliwy powód: Sonda nie jest odpowiednio przygotowana

Potencjalne rozwiązania:

- Całkowicie rozmrozić sondę i bufor hyb (15 minut w temperaturze pokojowej w ciemnym miejscu). Dodaj bufor hyb do sondy. Wortexować i krótko odwirować.

Możliwa przyczyna: Sonda wystawiona na działanie światła lub nieprawidłowo przechowywana

Potencjalne rozwiązania:

- Przeprowadzać FISH w słabo oświetlonym pomieszczeniu. Przechowywać sondy w temperaturze -20°C. Unikać nadmiernych cykli zamrażania/rozmarzania.

Możliwy powód: Nieodpowiednie specyfikacje mikroskopu

Potencjalne rozwiązania:

- Upewnij się, że źródło światła UV jest odpowiednie do oglądania sygnałów FISH. W razie wątpliwości należy skontaktować się z producentem mikroskopu.
- Upewnij się, że źródło światła UV jest wyśrodkowane.
- Upewnij się, że zainstalowane są odpowiednie filtry dla używanych fluorochromów. W razie wątpliwości należy skontaktować się z producentem mikroskopu.
- Upewnij się, że filtry nie są uszkodzone.
- Upewnij się, że roztwory myjące zostały prawidłowo przygotowane.