



HISTOSONDA NEUROTENSINA

Referencia: CBM-0026-R5

Ensayo para 5 reacciones individuales en un único vial. 65µl por reacción

Clasificación del producto:

*Países miembros de la Unión Europea
Para Utilización en el Diagnóstico In Vitro

INTRODUCCIÓN

La Neurotensina es un péptido de 12 aminoácidos que se encuentra extensamente en todas las neuronas que producen catecolaminas en el cerebro.

Sus efectos fisiológicos, fundamentalmente es aumentar la permeabilidad vascular produciendo hipotensión de esta forma y cianosis.

Algunas células del sistema neuroendocrino disperso, fundamentalmente encontradas en el intestino delgado y en el pulmón también producen Neurotensina.

Hasta la fecha han sido descritos un escaso número de pacientes con tumores neuroendocrinos productores de Neurotensina y su clínica es muy similar al de los pacientes con VIPomas.

Algunos pacientes con VIPomas pancreáticos también producen Neurotensina.

Histosonda Neurotensina consiste en un fragmento de DNA monocatenario de 257 nucleótidos de longitud y marcado con digoxigenina.

FINALIDAD PREVISTA

Para su uso en diagnóstico in Vitro.

La Histosonda Neurotensina es útil para diagnosticar tumores productores de este péptido.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

La Histosonda Neurotensina ha sido diseñada para su utilización en el diagnóstico in vitro para uso profesional y debe ser manipulada por personal cualificado y debidamente entrenado.

Para la obtención de unos resultados adecuados, deben seguirse fielmente las instrucciones del manual. Cualquier cambio en las temperaturas o tiempos indicados, o en cualquier otro paso del proceso, puede dar lugar a resultados erróneos.

COMPONENTES

1 tubo con la cantidad necesaria de la Histosonda Neurotensina para 5 reacciones individuales.
La Histosonda Neurotensina consiste en un fragmento de DNA de una única cadena con una longitud de 257 nucleótidos dirigida contra el mRNA de la Neurotensina. Este DNA ha sido marcado con Digoxigenina.

CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO

Los reactivos suministrados se almacenan a temperatura 3-7°C hasta la fecha de caducidad indicada en su etiqueta. No utilizar el producto después de la fecha de caducidad indicada en su etiqueta.

MUESTRAS

Cualquier corte de un bloque de parafina en el cual se desee estudiar la presencia de RNA de la Neurotensina. Cortes de 4-6 micrómetros de espesor son adecuados para el estudio. El corte es preferible que sea reciente (no más de treinta días) aunque los resultados del ensayo no se ven afectados por la antigüedad del bloque. Se han realizado estudios en las instalaciones del fabricante utilizando bloques de parafina de 20 años de antigüedad con óptimos resultados.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Las muestras en las que se observe expresión de Neurotensina deberán mostrar una coloración marrón en el citoplasma celular que contrastará sobre el fondo azul-violeta que confiere la tinción con hematoxilina. El facultativo valorará los resulta-

dos en base a su experiencia a partir de la visualización de las señales observadas en la muestra, en paralelo con las señales observadas en las muestras de control positivo y control negativo para la expresión de este gen.

LIMITACIONES DEL ENSAYO

La Histosonda Neurotensina ha sido optimizada para detectar la expresión de su RNA en tejidos fijados en formol e incluidos en parafina. No se recomienda la utilización de otro tipo de muestras o de técnicas de preparación.

El funcionamiento del producto ha sido validado utilizando los protocolos indicados en el manual de instrucciones. La utilización de otros procedimientos o las modificaciones de los protocolos recomendados, pueden conducir a resultados erróneos.

Los resultados de este ensayo deben ser evaluados por el facultativo en combinación con el resto de datos clínicos del paciente de los que se disponga. Para la obtención de unos resultados óptimos y reproducibles es muy importante ajustarse rigurosamente a las condiciones de tiempos y temperaturas indicadas en el procedimiento.

INSTRUCCIONES DE USO

Para la utilización de las sondas marcadas con Digoxigenina

PRINCIPIO DEL MÉTODO

La Hibridación In Situ Cromogénica (CISH), es una técnica utilizada para determinar la presencia de una secuencia de ADN o ARN, o estudiar la expresión de un gen así como la evaluación simultánea de la morfología del tejido mediante el uso de microscopía de campo claro.

La sonda marcada, de secuencia conocida, se hibrida con su diana en el tejido problema. Esta unión se detecta mediante un proceso inmunohistoquímico.

Las Histosondas, cuya diana es el RNA mensajero, están destinadas a hacer visibles los genes que se expresan detectando la expresión génica.

Protocolo de HistoSonda

Para mayor información incluyendo Preguntas más Frecuentes y Apoyo Técnico por favor consulte el Manual Técnico completo de HistoSonda.

Antes de comenzar, precaliente la cámara húmeda a 62°C.

1. Desparafinación

1. Caliente los portaobjetos a 62°C durante 10mins utilizando una placa caliente o un incubador.
2. Introduzca los portaobjetos en el siguiente orden en:
 - a. Xileno: 10 mins
 - b. Xileno: 5mins
 - c. Alcohol absoluto (etanol o isopropanol): 1min X 2 veces
 - d. Alcohol 96%: 1min X 3 veces
 - e. Metanol con 0.3% H₂O₂ o 3% H₂O₂ solo : 5mins
3. Lave enérgicamente los portaobjetos con agua (destilada o corriente), manténgalos en agua 1min.

1b. Inhibición de uniones inespecíficas de DNA (opcional)

Por lo general este paso no es necesario, a menos que el tejido que vaya a hibridar contenga una gran cantidad de leucocitos polimorfonucleares eosinófilos (generalmente médula ósea y tejidos gástricos).

1. Introducir los portaobjetos en agua destilada hirviendo durante **30 segundos** e inmediatamente transfíralos a agua destilada a temperatura ambiente.

¡ **Importante:** un tratamiento térmico excesivo puede provocar una tinción de fondo. Saque los portaobjetos de manera inmediata. !

2. Desproteínización

1. Preparar una dilución de Proteinasa K comercial a una concentración de 0,033 mg/ml en PBS pH 7.4.
2. Retire el exceso de agua de cada portaobjetos con un pañuelo de papel.
3. Cubra el tejido con 200µl de Proteinasa K e incube en una cámara húmeda

exactamente 10mins a temperatura ambiente.

4. Lave enérgicamente con agua.
5. Introduzca los portaobjetos en PBS pH 7.4 durante 2mins.

¡ **(Importante:** si los cortes han sido tratados previamente con calor en microondas, use la Proteinasa K sólo durante 5 minutos, ya que este tratamiento sensibiliza mucho los tejidos para esta enzima. **Las médulas óseas requieren una digestión de 20 min a 55°C con Proteinasa K tras su tratamiento con calor.** !

3. Incubación con la sonda

1. Retire el exceso de buffer de los portaobjetos con un pañuelo de papel.
2. Añada 65µl de sonda al corte asegurándose de que todo el tejido queda cubierto y de que no quedan burbujas de aire.
3. Coloque los cristales en posición horizontal en una cámara húmeda y cierre bien.
4. Incube a 62°C durante 1 h.
5. Si no dispone de una cámara húmeda apropiada, ponga una gota (65µl) de sonda sobre un cubreobjetos de 24x50 mm y colóquelo sobre el tejido. Selle los bordes del cubreobjetos con pegamento. Incube en una estufa a 62°C o en una placa caliente durante una hora. Después de la incubación, retire con cuidado el pegamento y el cubreobjetos y continúe con el protocolo.

4. Lavado de la sonda

¡ La solución de la sonda es muy viscosa debido a las grandes cantidades de dextrano que contiene. Es **muy importante** lavar bien los cristales para asegurarse de que la solución de la sonda es completamente retirada. !

1. Lave la superficie del tejido vigorosamente con PBS pH 7.4 para retirar toda la sonda.
2. Agite en PBS durante 5mins.

5. Revelado de la sonda

Protocolo para el revelado manual de la sonda. Como alternativa puede utilizar un aparato automático de inmunohistoquímica.

1. Retire el exceso de buffer de los cortes como anteriormente.
2. Cubra el tejido con 100 µl de Anti-Digoxina (no suministrado con este producto) e incube en una cámara húmeda durante 30mins a temperatura ambiente.
3. Lave enérgicamente con PBS, y agite en PBS pH 7.4 y agite en PBS durante 1min.
4. Retire el exceso de buffer de los cortes.
5. Ponga una gota de un polímero comercial HRP (no suministrado con este producto) que reconozca el anticuerpo primario utilizado sobre el tejido (suficiente para cubrir todo el tejido 50-100µl) e incube en una cámara húmeda siguiendo las instrucciones del fabricante.
6. Lave vigorosamente con PBS, agite en PBS durante 1min.
7. Retire el exceso de buffer de los tejidos y aplique una dilución de Diaminobenzidina (DAB) comercial siguiendo las instrucciones del fabricante.
8. Lave con agua.
9. Tiña los cortes brevemente (2-3secs) con hematoxilina Harris diluida al 50% en agua.
10. Lave con agua, deshidrate y haga el montaje de los cristales siguiendo los protocolos habituales del laboratorio.

Fecha de emisión: 23/08/2016



HISTOSONDA NEUROTENSIN

Reference: CBM-0026-R5

Assay of one vial for 5 individual reactions. 65µl for reaction.

Product classification:
*EU countries
For In Vitro Diagnostics

INTRODUCTION

Neurotensin is a 12 amino acid long peptide that is extensively found in all catecholamine producing neurons in the brain.

Its main physiological effect is to increase vascular permeability producing hypotension and cyanosis.

Some disperse neuroendocrine system cells also produce Neurotensin, principally those found in the small intestine and lung.

To date there have been described a small number of patients with neuroendocrine tumors that produced Neurotensin whose clinical presentation was very similar to that of VIPoma patients.

Some patients with pancreatic VIPomas also produce Neurotensin.

Histosonda Neurotensin consists of a single stranded DNA fragment that is 257 nucleotides long and labeled with digoxigenin.

INTENDED USE

For use in In Vitro Diagnosis.
Histosonda Neurotensin is useful for the diagnosis of tumors producing this peptide.

WARNINGS AND PRECAUTIONS

Histosonda Neurotensin has been designed for professional use in In Vitro Diagnosis and must be manipulated by qualified and accordingly trained personnel.

In order to obtain the best results, the instructions contained in the manual must be followed. Any change to the indicated temperatures, times or any other step of the process can lead to poor results.

COMPONENTS

1 tube with the necessary amount of Histosonda Neurotensin for developing 5 single reactions.
Histosonda Neurotensin consists of a single stranded DNA fragment with a length of 257 nucleotides targeted against Neurotensin mRNA. The DNA of this has been labeled with digoxigenin.

STORAGE CONDITIONS

Supplied reagents are stored at 3-7°C until expiration date. Do not use after expiration date.

SAMPLES

Any paraffin block section in which Neurotensin RNA presence is to be studied. Sections of 4-6 micrometers in width are sufficient to conduct the study. Preferably, the cut should be recent (no more than thirty days old). Assay results are not affected by block age. Studies have been carried out in the manufacturer's laboratories using 20 year old paraffin blocks with optimal results.

INTERPRETATION OF RESULTS

Samples in which Neurotensin expression is observed will show a brownish color in the cell cytoplasm, which will contrast over the blue-violet background given by hematoxylin staining. The pathologist will evaluate the results according to their experience, drawing conclusions from the staining of the sample, in parallel with the staining observed in the positive and negative controls.

ASSAY LIMITATIONS

Histosonda Neurotensin has been optimized to detect RNA expression in formalin-fixed, paraffin-

embedded tissues. Its use is not recommended for other types of samples or preparation techniques. The correct operation of this product has been validated using the protocols indicated in the instructions manual. The use of other procedures or the modification of the recommended protocols may lead to erroneous results.

The results from this assay must be evaluated by the pathologist in combination with the rest of available patient clinical data.

In order to obtain optimal and reproducible results it is important to rigorously maintain the time and temperature conditions indicated in the procedure.

PROCEDURE

For Digoxigenin- labeled probes

BASIS OF THE METHOD

Chromogenic In Situ Hybridization (CISH) is a technique used to determine the presence of a DNA or RNA sequence or to study gene expression, as well as for the simultaneous evaluation of tissue morphology by white light microscopy. A labeled probe of known sequence hybridizes with its target in the tissue being studied. This hybridization is then detected by an immunohistochemical process.

The Histosondas targets are messenger RNA and they are therefore designed to detect and visualise gene expression.

HistoSonda Protocol

For further important details including FAQs and Troubleshooting please refer to the complete HistoSonda Technical Manual.

Before starting pre-heat the humid chamber to 62°C.

1. Deparaffinization

- Heat slides at 62°C for 10mins using a hot plate or incubator.
- Immerse slides in:
 - Xylene: 10 mins
 - Xylene: 5mins
 - Absolute alcohol (ethanol or isopropanol): 1min X 2
 - Alcohol 96%: 1min X 3
 - Methanol containing 0.3% H₂O₂ or 3% H₂O₂ only: 5mins
- Wash well with distilled water, leave standing in water.

1b. Inhibition of unspecific DNA binding (optional)

Generally this step is not necessary unless the tissue to be hybridized contains a great quantity of polymorphonuclear eosinophil leukocytes (generally **bone marrow and gastric tissues**).

- Place slides in boiling distilled water for **30 seconds** and immediately transfer to distilled water at room temp.

! Important: excess heat treatment will result in background staining. Remove slides immediately. !

2. Deproteinization

- Prepare a dilution of any commercial Proteinase K at a work concentration of 0,033mg/ml in PBS pH 7.4.
- Remove excess water from individual slides with tissue paper.
- Cover tissue sections with the 200µl of Proteinase K and incubate in a humid chamber for exactly 10mins at room temp.
- Wash well with water.
- Transfer to PBS pH 7.4 for 2mins.

! (Important: if the slides have been boiled in the microwave previously only use Proteinase K for 5 minutes as the heat treatment will have significantly sensitized the tissue sections. **Bone marrows require a Proteinase K digestion of 20min at 55°C after heat treatment) !**

3. Incubation with the probe

- Remove excess buffer from sections as described previously.
- Add 65µl of probe to the tissue section ensuring the entire section is completely covered and avoiding air bubbles.
- Place the slides in a horizontal position in a humid chamber and close well.
- Incubate at 62°C for 1hr.
- If no suitable humid chamber is available drop the 65µl of probe over a 24 X 50mm coverslip and place over the

tissue section. Seal the edges of the coverslip with rubber cement. Incubate in a 62°C incubator or over a hot plate for 1 hour. After incubation carefully remove the rubber cement and coverslip and continue the protocol.

4. Washing the probe

! The probe solution is very viscous due to large quantities of dextran. It is very important to wash the slides well to ensure the probe solution is completely removed.!

- Wash the surface of the section vigorously with PBS pH 7.4 to remove the probe.
- Agitate in PBS for 5mins.

5. Revealing the probe

Protocol for manual revealing of the probe. Alternatively, an automatic immunohistochemistry apparatus may be used.

- Remove excess buffer from sections as before.
- Cover sections with 100µl of Anti-Digoxin (not provided with this product) and incubate in a humid chamber for 30mins at room temp.
- Wash vigorously with PBS, pH 7.4 agitate in PBS for 1min.
- Remove excess buffer from sections.
- Drop commercial HRP polymer (not provided with this product) that binds the primary antibody used before over the sections (enough to cover the tissue 50-100µl) and incubate in a humid chamber following the manufacturer's instructions.
- Wash vigorously with PBS, agitate in PBS 1min.
- Remove excess buffer from sections and apply commercial Diaminobenzidine (DAB) following the manufacturer's instructions.
- Wash with water.
- Counter stain the sections briefly (2-3secs) with Harris hematoxylin diluted 50% in water.
- Wash with water, dehydrate and coverslip following normal laboratory protocols.

Emission date: 23/08/2016



Manufacturer: CENBIMO S.L.
C/Doctor Iglesias Otero s-n
27004-Lugo, Spain