

Conditionnement





2x 100µl of XL CLL Probe Kit, est fournie prête à l'emploi dans le tampon d'hybridation.

Utilisation prévue

Les sondes ADN-FISH sont destinées à l'hybridation en fluorescence in situ afin d'analyser des aberrations chromosomiques dans des cellules fixées provenant de tissus humains. Les sondes FISH permettent après leur hybridation sur métaphases ou sur noyaux interphasiques l'analyse de la structure des chromosomes ou des variabilités du nombre de copies de gènes afin de détecter des altérations génétiques acquises selon la Global Medical Device Nomenclature (GMDN) CT929. L'analyse FISH est utilisée en complément d'autres analyses de diagnostic et ne peut être utilisée seule dans le cadre de décisions de thérapie ou de diagnostic.

Consignes de sécurité

Toutes les sondes MetaSystems Probes sont destinées à un usage professionnel uniquement, et doivent être manipulées par du personnel qualifié et formé. Pour garantir la sécurité des opérations et la reproductibilité des résultats, veuillez observer les avertissements et consignes de sécurité ci-dessous :

	DANGER: Le Formamide est un agent toxique et un tératogène potentiel ! Les sondes MetaSystems Probes contiennent du Formamide, substance classée comme toxique et tératogène. Peut nuire au fœtus. Ne pas respirer les vapeurs, évitez le contact avec la peau. Porter des gants et une blouse de laboratoire. En cas de contact avec la peau ou les yeux, rincer abondamment à l'eau.
	DANGER: Bains-marie et plaques très chaudes ! Les étapes de dénaturation et d'hybridation utilisent des bains-marie et plaques chauffantes à une température >37°C. Veuillez à ne pas entrer en contact direct avec des surfaces ou liquides très chauds. Porter des gants et une blouse de laboratoire. En cas de contact avec la peau, refroidir immédiatement à l'eau froide.
	ATTENTION: Bonnes pratiques de laboratoire! Utiliser selon les principes des bonnes pratiques de laboratoire.
	ATTENTION: Elimination des déchets! Toutes matières dangereuses doivent être éliminées selon les réglementations en vigueur dans votre institution pour l'élimination des déchets dangereux.

Conservation et Manipulation

Les sondes ADN doivent être conservées à -20°C (±5°C). L'efficacité du produit a été montrée d'être inchangée jusqu'à 20 cycles de congélation et décongélation.

Transport

Les sondes ADN MetaSystems Probes sont envoyées à température ambiante.

Equipement nécessaire non fourni

- Bain-marie avec contrôle de température
- Plaque chauffante 75°C (±1°C), avec bloc et contrôle de la température jusqu'à 80°C
- Congélateur -20°C (±5°C)
- Microscope à fluorescence associés avec des filtres adéquats (voir ci-dessous)
- Huile d'immersion pour fluorescence recommandée par le fournisseur microscope (au grade fluorescence)
- Système d'imagerie, p.ex. Isis (MetaSystems)
- Lamelles en verre: 22 x 22 mm² and 24 x 32 mm²
- Rubber Cement
- DAPI/antifade
- Thermomètre
- pH-mètre, calibré
- Chambre humide à 37°C (±1°C)
- Forceps
- Minuteurs
- Jarres « coplin » en verre ou céramique
- Gants
- Micro centrifugeuse de paillasse

Recommandations pour le Microscope et les Filtres

- Source lumineuse: systèmes d'illumination à lampe métal halide ou lampes à mercure conventionnelles de 100 watts peut être utilisé.
- Objectifs: objectifs adaptées à l'épi-fluorescence.
- Filtres fluorescents :Utiliser pour la visualisation et/ou le comptage de spots un set de filtres MetaSystems triple ou un set de filtre quad passband. Pour la capture d'images, utiliser des filtres à bande-passante unique correspondant au fluorochrome utilisé. Se renseigner pour plus de détails.

Spécification du Fluorochrome

Marquage	Absorption max.	Émission max.
Blue (aqua)	426 nm	480 nm
Green	505 nm	530 nm
Orange	552 nm	576 nm

Préparation des échantillons

Remarques générales

- Les sondes MetaSystems ont été développées pour utilisation sur des préparations cytogénétiques fixes avec 3 : 1 méthanol/acide acétique et doivent être réalisées selon les protocoles en vigueur dans le laboratoire ou institution.
- Préparer l'échantillon selon des techniques de Cytogénétique standard.

Stabilité des lames hybridées

Les lames FISH hybridées sont analysables pendant au moins 6 mois si elles sont conservées à l'abri de la lumière et à -20°C (±5°C).

Recommandations supplémentaires

- L'usage d'un thermomètre calibré est fortement recommandé. En effet, la température des solutions, du bain-marie et des incubateurs sont des paramètres essentiels pour une efficacité optimale du produit.
- Vérifier soigneusement la température des solutions préchauffées.
- Contrôler soigneusement le pH de toutes les solutions utilisées. Il doit se trouver entre 7.0 et 7.5 à température ambiante.
- La concentration en sels des solutions de lavage (stringence), ainsi que le pH et la température sont critiques. Une stringence faible peut provoquer des hybridations non-spécifiques, et une stringence trop forte peut affaiblir le signal.
- Avant d'ouvrir: centrifuger brièvement l'échantillon de la sonde afin que tout son volume se retrouve dans le culot.

Protocole FISH pour sondes ADN MetaSystems Probes

Préparation des lames

- Etaler la suspension cellulaire sur une lame propre. Sécher à l'air. Si les lames ne sont pas utilisées immédiatement, conserver à -20°C (±5°C).
- Déposer 10 µl de sonde par lame .
- Couvrir avec une lamelle 22 x 22 mm².
- Sceller avec du rubber cement.

Dénaturation

- Dénaturer simultanément sonde/échantillon en plaçant la lame sur une plaque chauffante à 75°C (+/- 1°C) **pendant 2 minutes.**

Hybridation

- Incuber dans une chambre humide à 37°C (+/- 1°C) pendant la nuit (overnight).

Lavages post-hybridation

Solutions requises

- 0.4 x SSC (pH 7.0 – 7.5) à 72°C (+/- 1°C)
- 2 x SSC /0.05% Tween-20 (pH 7.0) à température ambiante

Procédure

- Décoller le rubber cement et retirer délicatement la lamelle.
- Laver la lame en la plongeant dans le tampon 0.4 x SSC (pH 7.0) à 72°C (+/- 1°C) **pendant 2 minutes.**
- Egoutter la lame et laver ensuite dans du tampon 2 x SSC, 0.05% Tween-20 (pH 7.0) à température ambiante pendant **30 secondes.**
- Rinsers la lame brièvement avec de l'eau distillé pour éviter la formation de cristaux, et laisser sécher.

Contre-coloration

Solutions requises:

- DAPI/antifade (p.ex. MetaSystems Probes DAPI/antifade, D-0902-500-DA)

Procédure:

- Appliquer 10 µl de la solution DAPI/antifade et couvrir avec une lamelle 24 x 32 mm².
- Laisser imprégner à l'abri de la lumière pendant **10min.**
- Procéder à l'aide de la microscopie et de l'analyse.
- Conservser les lames à l'obscurité et à -20°C (±5°C). Les signaux seront ainsi visibles pendant au moins six mois.

Résultats attendus

ATM/TP53

Cellule normale:
Deux signaux verts (2V) et deux signaux oranges (2O).



ATM/TP53

Cellule anormale (résultat typique): Un signal vert (1V) et deux signaux oranges (2O), indiquant une délétion dans le locus ATM.
Cellule anormale (résultat typique): Deux signaux verts (2V) et un signal orange (1O), indiquant une délétion dans le locus TP53.



DLEU/LAMP/12cen

Cellule normale: Deux signaux verts (2V), deux signaux oranges (2O) et deux signaux bleus (2B).
Cellule anormale (résultat typique): Trois signaux verts (3V), deux signaux oranges (2O) et deux signaux bleus (2B).



DLEU/LAMP/12cen

Cellule anormale (résultat typique): Deux signaux verts (2V), un signal orange (1O) et deux signaux bleus (2B).
Cellule anormale (résultat typique): Deux signaux verts (2V), un signal orange (1O) et un signal bleu (1B).



Seule la combinaison la plus fréquente est montrée, d'autres formes significatives peuvent être observées.