



Sonde FISH « Break Apart » TP63

Couleur(s) : Vert/Orange

REF	TP63BA -10- GROR
REF	TP63BA -20- GROR
REF	TP63BA -CS- GROR

Σ	Quantité : 10 tests, 20 µl
Σ	Quantité : 20 tests, 40 µl
Σ	Quantité : voir l'étiquette de l'emballage



Pour usage diagnostique in vitro uniquement. Marqué CE dans certains pays. RUO aux États-Unis et dans d'autres pays.



Conservation, manipulation, durée de conservation et élimination : Conserver le produit à -20 °C ; éviter la lumière ; date de péremption indiquée sur l'étiquette du produit. Si l'emballage est endommagé, veuillez en informer votre distributeur local. Il convient de toujours porter des gants et d'autres équipements de protection lors de la manipulation des sondes. Les sondes d'Empire Genomics sont sensibles à la lumière et ne doivent pas être exposées à une lumière excessive. Manipulez les sondes dans un endroit sombre afin d'éviter toute photoblanchiment. Éliminez-les conformément à la réglementation locale.

Composition :

- Sonde FISH marquée concentrée : minimum 20 ng/µl
- Tampon d'hybridation (contient une faible concentration de formamide)

Utilisation prévue :

La sonde FISH TP63 Break Apart d'Empire Genomics est un test d'hybridation in situ par fluorescence (FISH) conçu pour détecter les réarrangements impliquant le gène TP63 dans la région chromosomique 3q28. Il s'agit d'un test qualitatif, non automatisé, destiné à être utilisé en complément d'autres tests cliniques et ne doit pas être utilisé comme seule méthode de diagnostic.

Types d'échantillons :

- Humain
- Tissu FPPE
- Sang périphérique
- Moelle osseuse

Avertissements et précautions : Le produit ne contient aucun composant d'origine humaine ou animale. Consultez la fiche de données de sécurité pour obtenir des informations plus détaillées sur la sécurité et la manipulation. Contient du formamide en faible concentration. N'utilisez pas de sonde périmée. Ne réutilisez pas la sonde. Évitez toute contamination croisée. Lisez attentivement le mode d'emploi avant utilisation.

- H360d Peut nuire au fœtus.
- P309 + P310 EN CAS d'exposition ou si vous ne vous sentez pas bien : appeler immédiatement un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin.
- P201 Obtenir des instructions spéciales avant utilisation.



• H315 + H320 Provoque une irritation de la peau et des yeux.

- P262 Éviter tout contact avec les yeux, la peau ou les vêtements.
- P305 + P351 + P338 EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX : Rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si cela peut se faire sans difficulté. Continuer à rincer.
- P501 Éliminer le contenu/réceptacle conformément à la réglementation locale/régionale/nationale/internationale.
- P280 Porter des gants de protection / des vêtements de protection / un équipement de protection des yeux / un équipement de protection du visage.



Caractéristiques de performance :

Cette sonde FISH a été testée sur des frottis sanguins normaux. Dans le cadre du contrôle qualité, la sonde a fait l'objet d'une analyse de l'intensité et de la spécificité du signal. Veuillez consulter le certificat d'analyse joint pour plus de détails. La précision a été déterminée à 100 %. Cette sonde est conçue pour s'hybrider uniquement aux régions indiquées sur les idéogrammes ci-dessous.

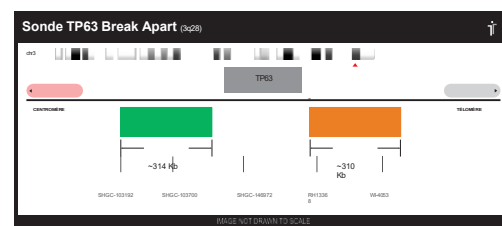
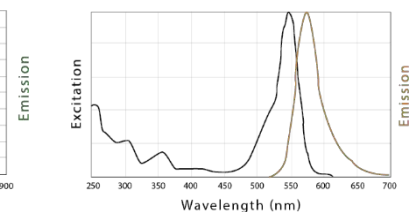
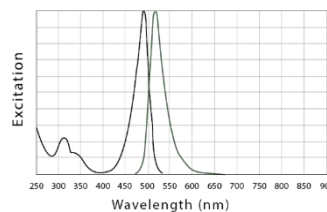
Limitations :

- Ce produit est destiné exclusivement à un usage diagnostique in vitro.
- Les performances de la sonde dépendent de la préparation et de la qualité des échantillons, ainsi que du stockage correct du produit.
- Ce produit est réservé à l'usage exclusif de professionnels de laboratoire formés.

Installation et fonctionnement : Tout l'équipement utilisé dans l'expérience FISH doit être correctement étalonné. Les filtres et la source lumineuse utilisés pour détecter les signaux fluorescents doivent être remplacés régulièrement afin de garantir des performances optimales de la sonde. Le contrôle de la température et de l'humidité est important pour le bon fonctionnement de la sonde ; assurez-vous que tous les thermomètres et hygromètres sont étalonnés. La sonde doit être évaluée sur des échantillons normaux afin de garantir une hybridation correcte.

Principe de la méthode : L'hybridation in situ par fluorescence (FISH) est une technique cytogénétique utilisée pour détecter des aberrations génomiques. Les sondes FISH sont couramment utilisées pour détecter des délétions, des amplifications et des réarrangements d'une cible génomique.

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



Réactifs non fournis

Pour la préparation de lames non tissulaires :

- Éthanol 70 %
- Méthanol 100 %
- Acide acétique

Pour le prétraitement FFPE

- HCl 0,01 N
- Xylène
- Éthanol (70 %, 85 %, 100 %)
- Acide citrique 10 mM (BDH, 4136-500G)
- 160 mg de pepsine solide (Sigma, n° P7012-1G)
- Igepal CA-630 0,3 % (Sigma ou NP40) 0,4XSSC
- Igepal CA-630 0,1 % (Sigma ou NP40) 2XSSC

Matériel requis :

- Microscope à fluorescence muni d'un jeu de filtres approprié.

Pour l'hybridation automatisée

- Solution de lavage 1 (WS1) – 0,3 % Igepal (Sigma CA-630) ou NP-40 / 0,4 x SSC
- Matériau absorbant
- dH₂O
- Solution de lavage 2 (WS2) – 0,1 % Igepal (Sigma CA-630) ou NP-40 / 2 x SSC
- DAPI avec antifading

Pour l'hybridation manuelle

- Tampon de dénaturation – 70 % formamide, 2X SSC, pH 7,0-8,0
- Éthanol 70 %, 85 %, 100 %
- Solution de lavage 1 (WS1) – 0,3 % Igepal (Sigma CA-630) ou NP-40 / 0,4 x SSC
- Solution de lavage 2 (WS2) – 0,1 % Igepal (Sigma CA-630) ou NP-40 / 2 x SSC
- DAPI avec antifading

Cellules intactes (pas trop étalées), sans cytoplasme et de couleur gris foncé. Si ce n'est pas le cas, tenez compte des variables suivantes :

- **Concentration trop élevée** : les cellules seront sous-étalées et se trouveront probablement dans le cytoplasme (les métaphases apparaîtront en 3D avec un halo distinct les entourant). Ajoutez du fixateur supplémentaire en conséquence.
- **Concentration trop faible** : la métaphase risque de ne pas être intacte ; il faut davantage de sonde pour couvrir une plus grande surface. Centrifugez à nouveau le tube (1 200 tr/min pendant 10 minutes) et retirez l'excès de fixateur en conséquence.
- **Séchage trop rapide** : les cellules en interphase apparaissent réfractiles, petites et noires. Les cellules en métaphase sont peu étalées, présentes dans le cytoplasme et restent noires. Si le taux d'humidité est trop bas (inférieur à 40-45 %), créez un environnement plus humide en procédant de l'une des manières suivantes : utilisez un humidificateur de pièce, préparez les lames au-dessus d'un bûcher contenant de la vapeur, préparez les lames au-dessus d'un évier sous un jet d'eau chaude, ou placez des lingettes humides sur le chauffe-lames et posez-y brièvement la lame (~5 secondes) avant de la placer directement sur le chauffe-lames.
- **Séchage trop lent** : les métaphases sont gris clair et peuvent être trop étalées ou abimées. Ces deux cas peuvent entraîner une hybridation de mauvaise qualité. Réduisez la durée des étapes 9 et 10 avant de placer la lame sur le chauffe-lames. Si le taux d'humidité est trop élevé (supérieur à 55 %), un déshumidificateur de pièce peut aider à le réduire.
- **Cytoplasme autour des métaphases** : si la présence de cytoplasme autour des métaphases persiste après avoir effectué les ajustements décrits ci-dessus, ajoutez 1 à 2 gouttes de fixateur sur la lame après les étapes 1 à 9 ci-dessus.
- **Séchage correct** : les cellules en interphase sont plates, charnues et pâles ; les cellules en métaphase sont gris foncé, bien étalées avec peu de croisements, intactes et sans cytoplasme.

Protocole de préparation des lames pour les culots de cellules fixées

Remarques :

- Les conditions environnementales idéales pour la préparation des lames sont comprises entre 45 et 55 °C d'humidité et 24 °C (72-75 °F), avec un minimum de courants d'air. Un hygromètre/thermomètre doit être placé près de la paillasse de préparation des lames afin de surveiller les conditions environnementales. Si les conditions ne sont pas idéales, il convient de tenter de les ajuster avant de procéder à la préparation des lames.
- La qualité des échantillons est importante et difficile à corriger une fois le fixateur ajouté. Il est important de suivre les protocoles standard de cytogénétique en utilisant des réactifs qui ont été testés avant utilisation.
 - Facultatif : nettoyer les lames en les plaçant dans un jarre de Coplin contenant de l'éthanol à 70 % pendant 5 minutes, puis en les essuyant plusieurs fois dans le même sens à l'aide d'un mouchoir en papier. Ensuite, placer la lame dans un jarre de Coplin contenant un fixateur frais à base de méthanol et d'acide acétique dans un rapport 3:1. Les lames peuvent être utilisées directement, ou séchées et conservées au congélateur (-20 °C).
 - Préparez les lames à partir d'un seul échantillon de patient à la fois afin d'éviter toute contamination croisée entre les échantillons.

Étape 1 - Préparation des lames

1. Prélevez l'échantillon en suivant les protocoles standard de cytogénétique*.
2. Remplacer le fixateur (solution de Carnoy 3:1 méthanol:acide acétique) dans le tube à échantillon jusqu'à ce que le surnageant soit incolore. Refixer l'échantillon dans du fixateur neuf juste avant la préparation de la lame.
3. Régler le chauffe-lames à environ 45 °C.
4. Aspirer environ 5 ml de surnageant au-dessus du culot cellulaire et remettre les cellules en suspension à l'aide d'une pipette Pasteur en verre.
5. Ajouter suffisamment de fixateur frais et froid pour obtenir une suspension légèrement laiteuse.
6. Retirer une lame du jarre de Coplin contenant le fixateur, l'égoutter sur du papier absorbant. Sinon, retirer une lame froide du congélateur.
7. Tenir la lame légèrement à la verticale et déposer 3 gouttes de suspension en haut, au milieu et en bas de la lame.
8. Faire tourner doucement la lame, en l'inclinant légèrement après environ 15 secondes pour égoutter l'excès de suspension sur un mouchoir en papier.
9. Maintenir la lame à l'horizontale jusqu'à ce qu'un aspect granuleux apparaisse et que les bords de la lame commencent à sécher. Le temps nécessaire varie en fonction de l'humidité atmosphérique.
10. Essuyer le dos de la lame avec un mouchoir en papier, puis laisser sécher à l'air libre.
11. Placer la lame directement sur le chauffe-lames pour la garder au sec.
12. Étiqueter la lame avec l'étiquette de lame appropriée au patient. Ne laissez jamais une lame non étiquetée sur le chauffe-lames. Pour l'étiqueter, utilisez un crayon HB ou un marqueur permanent résistant à l'alcool. Étiquetez la lame avec au moins deux identifiants uniques du patient, la date et vos initiales.
13. Examiner la lame au microscope à contraste de phase (objectif 10x)

Étape 2 – Évaluation de la qualité de la lame

Idéalement, la concentration devrait être d'environ 50 cellules en interphase par champ ; les cellules en interphase doivent être grandes, grises et plates. Les métaphases doivent être bien étalées avec un minimum de croisements,

Étape 3 - Vieillessement/stockage des lames

1. Conserver les lames séchées dans un dessiccateur pendant au moins 24 heures à température ambiante afin qu'elles vieillissent suffisamment avant l'étape de FISH. Si les résultats sont attendus rapidement, laisser la lame sur le chauffe-lames pendant au moins 15 minutes avant la FISH.
2. Si la lame ne doit pas être hybridée dans les 24 à 48 heures, elle peut être conservée dans un récipient hermétique au congélateur (-20 °C) pendant deux semaines maximum.
3. Les suspensions de cellules fixées doivent être conservées dans des cryotubes au congélateur (-20 °C).

*Références

1. Barch MJ, Knutsen T, Spurbeck JL. The AGT Cytogenetics Laboratory Manual, troisième édition. Chapitre 3 - Méthodes cytogénétiques du sang périphérique (M.G. Brown, H.J. Lawce). Lippincott-Raven, Philadelphie, 1991
2. Dunn B, Mouchrani P, Keagle M. The Cytogenetic Symposia - AGT. Deuxième édition.

Traitement des lames pour les échantillons de tissu inclus en paraffine

Cette procédure décrit les étapes du traitement des lames de tissu inclus en paraffine. Le processus de prétraitement permet de déparaffiner et de prétraiter l'échantillon avant la dénaturation et l'hybridation avec les sondes appropriées. Une fois le prétraitement terminé, les lames et les sondes appropriées sont dénaturées. Une fois le traitement terminé, suivre les instructions d'hybridation appropriées.

Déparaffinage et prétraitement

- Préchauffer l'acide citrique 10 mM à 90-95°C
- Préchauffer 40 ml de HCl 0,1 N à 37°C
- Chauffer le four à 90°C
- Préparer 1 ml de pepsine à 160 mg/ml dans de l'H₂O

1. Faire vieillir les lames à 90 °C pendant 25 minutes au four.
2. Plonger les lames dans du xylène pendant 10 minutes. Répéter une fois avec du xylène frais.
3. Plonger les lames dans de l'éthanol 100 % pendant 5 minutes. Répéter l'opération une fois.
4. Laisser sécher à l'air libre sur un chauffe-lames.
5. Placer la lame dans un tampon de prétraitement à l'acide citrique à 90-95 °C (pH ~6,8) pendant 30 minutes.

Digestion

1. Ajouter 1 ml de solution de pepsine à 160 mg/ml à 40 ml de HCl 0,1 N et bien mélanger.
2. Placer la lame dans la solution de pepsine pendant 20 à 30 minutes.
3. Laver les lames dans du 2X SSC pendant 5 minutes.
4. Plonger les lames dans de l'éthanol 70 % pendant 30 secondes. Laisser sécher à l'air libre ou placer les lames sur un chauffe-lames pour les sécher.
5. Observer la digestion au microscope. Si la digestion n'est pas suffisante, répéter les étapes 2 à 4, mais modifier la durée de digestion par incréments de 10 minutes et analyser les lames après chaque digestion.
6. Une fois la digestion adéquate obtenue, déshydrater les lames successivement dans de l'éthanol 70 %, 85 % et 100 % pendant 2 minutes chacune. Passer au protocole d'hybridation.

Instructions d'hybridation automatisée

Ces instructions concernent les hybridations réalisées à l'aide d'un appareil automatisé Hybrite/Thermobrite. Si vous n'utilisez pas d'appareil Hybrite/Thermobrite, suivez les « Instructions d'hybridation manuelle ».

Remarques

- Le protocole peut être utilisé avec toutes les sondes FISH : sondes de contrôle, sondes spécifiques à un gène, sondes FISH personnalisées.
- Les solutions peuvent être préparées avant la procédure.
- Une optimisation supplémentaire du protocole peut être nécessaire.

- Allumez l'Hybrite/Thermobrite.
- Réglez le guide de programme (voir « Options du guide de programme »).
- Faites tremper au préalable le matériau absorbant dans de l'eau distillé (dH₂O).
- Ajouter 2 µL de sonde et 8 µL de tampon d'hybridation.
- Appliquer une lamelle propre de 22 x 22mm.
- Appliquer de la colle caoutchouc sur les bords de la lamelle pour la sceller.
- Placer dans l'Hybrite/Thermobrite et fermer le couvercle.
- Lancer le programme.
- Laisser fonctionner pendant au moins 16 heures.
- Préchauffer le WS1 à 73 °C.
- Retirer la lamelle et placer la lame dans le WS1 en agitation pendant environ 10 secondes.
- Laisser reposer la lame pendant exactement 2 minutes.
- Transférer la lame dans le WS2 à température ambiante. Agiter pendant environ 10 à 15 secondes, puis laisser reposer les lames pendant 2 minutes.
- Laisser sécher la lame à l'abri de la lumière.
- Appliquer 10 µL de DAPI avec antifading et recouvrir d'une lamelle de 22 x 50 mm.
- Attendre 15 à 30 minutes, puis observer au microscope avec le filtre approprié.

Options du guide du programme

Pour les préparations de sang périphérique

- Dénaturer à 72-73 °C pendant 2 minutes.
- Hybridation à 37 °C pendant au moins 16 heures.

Pour les tissus inclus en paraffine après prétraitement

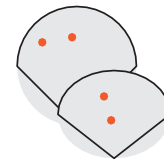
- Dénaturer à 75 °C pendant 7 minutes.
 - Hybridation à 37 °C pendant au moins 16 heures.
- Dépannage éventuel*

Instructions d'hybridation manuelle

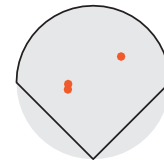
Ces instructions ne prévoient pas l'utilisation d'un Hybrite/Thermobrite. Le respect de ces instructions permettra à la sonde de s'hybrider correctement à un échantillon sans système automatisé. Si un système automatisé tel qu'un Hybrite/Thermobrite est utilisé, suivez plutôt les « Instructions d'hybridation automatisée ».

- Réchauffez la lame à température ambiante.
- Placer les lames dans de l'éthanol 70 % à température ambiante pendant 2 minutes.
- Placer les lames dans de l'éthanol 85 % à température ambiante pendant 2 minutes.
- Placer les lames dans de l'éthanol 100 % à température ambiante pendant 2 minutes.
- Sécher délicatement le dos de la lame et la placer sur un chauffe-lames à 45 °C jusqu'à ce que l'éthanol s'évapore.
- Préparer le mélange de sonde en mélangeant 2 µL de sonde avec 8 µL de tampon.
- Pipeter 10 µL du mélange de sonde sur la lame.
- Appliquer une lamelle propre de 22 x 22 mm sur la lame.
- Sceller les bords de la lamelle avec de la colle caoutchouc.
- Dénaturer la lame sur une plaque chauffante conformément aux « Options du guide de programme » ci-dessus. Assurer que la lame est protégée de toute exposition à la lumière pendant ce processus.
- Placer la lame dans une chambre humidifiée préchauffée à 37 °C, puis placer la chambre dans un incubateur à 37 °C.
- Incuber à 37 °C pendant 16 heures.
- Préchauffer le WS1 (0,3 % Igepal (Sigma CA-630) ou NP-40 / 0,4X SSC) à 73 °C.
- Retirer la lamelle. Placer la lame dans le WS1, agiter pendant environ 10 secondes, puis laisser reposer exactement 2 minutes.
- Transférer la lame dans le WS2 à température ambiante. Agiter pendant environ 10 à 15 secondes et laisser reposer les lames pendant 2 minutes.
- Laisser sécher à l'abri de la lumière.
- Appliquer 10 µL de DAPI avec antifading et recouvrir d'une lamelle de 22 x 50 mm.
- Attendre 15 à 30 minutes, puis observer au microscope en utilisant les jeux de filtres appropriés

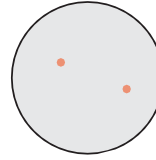
Évaluation de la qualité des signaux FISH :



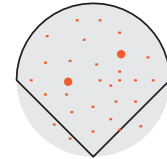
Noyaux qui se chevauchent : ne pas analyser ces cellules.



Double signal sur un chromosome : comptabiliser le double signal comme un seul signal.



Signal faible : consultez le guide de dépannage. L'analyse reste possible si le signal est clair.



Signaux de fond élevés : voir le guide de dépannage ; la cellule peut tout de même être analysée si le problème n'est pas trop important.

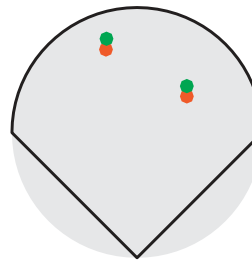


Figure 1

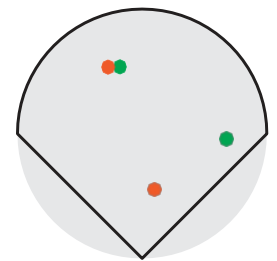


Figure 2

Figure 1 : Profil de signal normal présentant 2 signaux de fusion vert/orange.

Figure 2 : Profil de signal normal présentant 1 signal de fusion vert/orange, 1 signal vert et 1 signal orange, indiquant un réarrangement impliquant TP63.

FAQ sur le dépannage

Morphologie chromosomique altérée

Raison possible : les lames ont séché trop rapidement

Solutions potentielles :

- Augmenter l'humidité lors de la mise en place des lames.
- Augmenter le temps d'attente après la pose de la lame avant de la placer sur le chauffe-lames.
- Vérifier que le chauffe-lames est à environ 45 °C. Surveiller la température à l'aide d'un thermomètre de surface.
- Refixer la suspension cellulaire dans un fixateur fraîchement préparé à 3:1 de méthanol et d'acide acétique.

Raison possible : lames vieilles/mal conservées

Solutions potentielles :

- Laisser les lames vieillir au moins 24 heures à température ambiante avant la FISH.
- Ne pas chauffer les lames.
- Si le test FISH doit être réalisé le jour même de la préparation des lames, incuber la lame pendant au moins 1 heure dans un jarre de Coplin contenant du 2X SSC à 37 °C, puis déshydrater la lame pendant 1 minute dans l'éthanol 70 %, 85 % et 100 % respectivement avant l'étape de dénaturation.

Bruit de fond élevé / Faible spécificité

Raison possible : les lames de verre ne sont pas propres

Solutions potentielles :

- Faire tremper les lames dans l'éthanol 70 % pendant 5 minutes, puis les essuyer 2 à 3 fois avec un mouchoir en papier.

Raison possible : Mauvaise qualité de l'échantillon avec des débris cellulaires

Solutions potentielles :

- Laver le culot cellulaire avec du fixateur frais 2 à 3 fois, puis refaire la préparation. S'assurer que la suspension cellulaire n'est pas trop épaisse.

Raison possible : présence de cytoplasme autour des chromosomes

Solutions potentielles :

- Les lames ont séché trop rapidement (voir ci-dessus).

Raison possible : solutions de lavage incorrectes

Solutions potentielles :

- S'assurer que les solutions WS1 et WS2 sont préparées et conservées correctement.
- Vérifier que le pH (7,0) et la température (73 °C) des solutions de lavage sont corrects. Placer le thermomètre directement dans la solution WS1.
- S'assurer que les solutions de lavage ne sont pas périmées ou surutilisées. Les jeter après 10 lames.
- S'assurer que seules 4 lames sont lavées à la fois afin de maintenir la température appropriée de WS1.
- S'assurer que le temps de séjour dans les solutions de lavage est approprié.
- Augmenter la durée dans WS1 à 3 minutes.

Raison possible : Débordement de bande passante des filtres du microscope

Solutions potentielles :

- Utiliser des filtres à bande passante étroite adaptés aux fluorochromes utilisés.

Raison possible : conditions d'hybridation inadéquates

Solutions potentielles :

- Utiliser des chambres hermétiques avec un contrôle approprié de l'humidité.

Signal faible ou absent

Raison possible : Lame insuffisamment dénaturée

Solutions potentielles :

- Vérifier que la température de dénaturation est correcte en mesurant la température de la plaque chauffante ou de l'hybrideur automatisé à l'aide d'un pistolet thermique ou d'un autre appareil.
- Résoudre le problème en augmentant la température de dénaturation.
- Vérifier que la durée de dénaturation est correcte en suivant les « Options du guide de programme » ci-dessus. Augmenter ou réduire la durée si nécessaire.

Raison possible : Sonde mal préparée

Solutions potentielles :

- Décongeler complètement la sonde et le tampon d'hybridation (15 minutes à température ambiante dans un environnement sombre). Ajouter le tampon d'hybridation à la sonde. Vortexer et centrifuger brièvement.

Raison possible : la sonde a été exposée à la lumière ou mal conservée









Solutions potentielles :

- Effectuer la FISH dans une pièce faiblement éclairée. Conserver les sondes à -20 °C. Éviter les cycles excessifs de congélation/décongélation.

Raison possible : caractéristiques techniques du microscope inadéquates

Solutions potentielles :

- S'assurer que la source de lumière UV est adaptée à l'observation des signaux FISH. En cas de doute, contacter le fabricant du microscope.
- S'assurer que la source de lumière UV est centrée.
- Vérifier que les filtres adaptés aux fluorochromes utilisés sont installés. En cas de doute, contacter le fabricant du microscope.
- Vérifier que les filtres ne sont pas endommagés.
- S'assurer que les solutions de lavage ont été préparées correctement.

	Catalog Number
	Manufacturer
	Health hazard/Hazardous to the ozone layer
	Serious health hazard
	Temperature for storage
	European Authorized Representative
	In vitro diagnostic medical device
	Number of tests