



## Sonde ZNF384 Break Apart FISH

Couleur(s): Vert/Orange

**REF** ZNF384BA -10- GROR  
**REF** ZNF384BA -20- GROR  
**REF** ZNF384BA -CS- GROR

**Quantité:** 10 Tests, 20µl  
**Quantité:** 20 Tests, 40µl  
**Quantité:** voir l'étiquette sur le produit



Pour usage in vitro uniquement  
 Marquage CE dans certains pays

RUO aux États-Unis et dans d'autres pays

**Stockage, manipulation, durée de conservation et élimination:** Stocker le produit à -20°C; Éviter la lumière; La date de péremption est indiquée sur l'étiquette du produit. Si l'emballage est endommagé, aviser votre distributeur local. Les gants et autres équipements de protection doivent toujours être portés lors de la manipulation de la sonde. Éliminer selon les réglementations locales. Les sondes d'Empire Genomics sont sensibles à la lumière et ne doivent pas être exposées à une lumière excessive. Manipuler les sondes dans un endroit sombre pour éviter le blanchiment. Éliminez conformément aux réglementations locales.

### Composition:

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

### Utilisation prévue:

La sonde FISH ZNF384 Break Apart d'Empire Genomics est un test d'hybridation in situ par fluorescence (FISH) conçu pour détecter les réarrangements impliquant le gène ZNF384 dans la région chromosomique 12p13.31. C'est un test qualitatif, non automatisé, conçu pour être utilisé en complément d'autres tests cliniques et ne doit pas être utilisé comme seule méthode de diagnostic.

### Types d'échantillons:

- Sang périphérique
- Tissu FFPE
- B Moelle osseuse

**Avertissements et précautions:** Le produit ne contient pas de composants issus d'humains ou animaux. Consulter la fiche de données de sécurité pour des informations plus détaillées sur la sécurité et la manipulation. Contient du formamide en faible concentration. Ne pas utiliser de sonde périmée. Ne pas réutiliser la sonde. Éviter la contamination croisée. Lire entièrement les instructions d'utilisation avant usage.

- H360d Peut nuire à l'enfant à naître.
- P309+P310 EN CAS d'exposition ou de malaise : Appeler immédiatement un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin.
- P201 Se procurer les instructions spéciales avant utilisation.



• H315+H320 Provoque une irritation cutanée et une irritation oculaire.

- P262 Ne pas mettre dans les yeux, sur la peau ou sur 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 elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer.
- P501 Éliminer le contenu/réceptacle conformément aux réglementations locales/régionales/nationales/internationales.
- P280 Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage.



### Caractéristiques de performance:

Cette sonde FISH a été testée sur des étalements de sang normaux. Dans le cadre du contrôle qualité, la sonde a été soumise à une analyse de la force et de la spécificité du signal. L'exactitude a été déterminée à 100 %. Cette sonde est conçue pour s'hybrider uniquement aux régions spécifiées sur les idéogrammes présentés plus bas dans cette fiche technique.

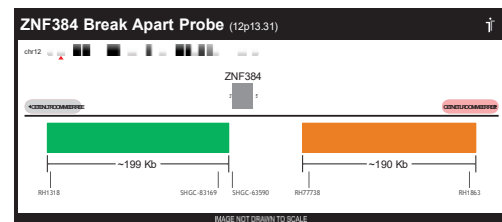
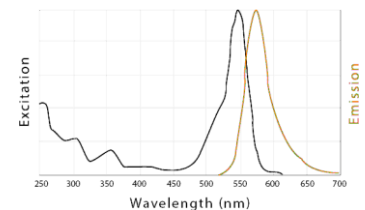
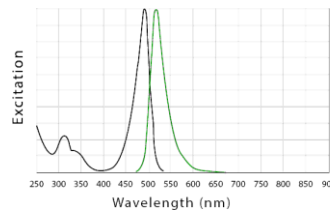
### Limitations:

- Ce produit est à usage *in vitro* uniquement.
- La performance de la sonde dépend de la préparation de l'échantillon, de la qualité de l'échantillon et d'un stockage correct du produit.
- Ce produit est destiné à être utilisé uniquement par des professionnels de laboratoire formés.

**Installation et fonctionnement:** Tout équipement utilisé dans l'expérience FISH doit être correctement étalonné. Les filtres et la source de lumière utilisés pour la détection des signaux fluorescents doivent être remplacés régulièrement pour garantir une performance optimale de la sonde. Le contrôle de la température et de l'humidité est important pour le bon fonctionnement de la sonde ; s'assurer que tous les thermomètres et hygromètres sont étalonnés. La sonde doit être évaluée sur des échantillons normaux pour assurer une hybridation correcte.

**Principe de la méthode:** L'hybridation in situ par fluorescence (FISH) est une technique de cytogénétique utilisée pour détecter les aberrations génomiques. Les sondes FISH sont couramment utilisées pour détecter les délétions, les amplifications et les 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 autre pour les tissus

- Éthanol à 70 %
- Méthanol à 100 %
- Acide acétique

### Pour le prétraitement FFPE

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

### Équipement requis

- Microscope à fluorescence avec un jeu de filtres approprié.

### Pour l'hybridation automatisée

- Solution de lavage 1 (WS1) - 0,3 % d'Igepal (Sigma CA-630) ou NP-40/0,4 x SSC
- Matériau absorbant
- dH<sub>2</sub>O
- Solution de lavage 2 (WS2) - 0,1 % d'Igepal (Sigma CA-630) ou NP-40/2xSSC
- DAPI avec Antifade

### Pour l'hybridation manuelle

- Tampon de dénaturation - 70 % de formamide, 2xSSC pH 7,0-8,0
- Éthanol à 70 %, 85 %, 100 %
- Solution de lavage 1 (WS1) - 0,3 % d'Igepal (Sigma CA-630) ou NP-40/0,4xSSC
- Solution de lavage 2 (WS2) - 0,1 % d'Igepal (Sigma CA-630) ou NP-40/2xSSC
- DAPI avec Antifade

- **Concentration trop "épaisse"**: Les cellules apparaissent sous-étalées et probablement dans le cytoplasme (les métaphases apparaîtront en 3D avec un halo distinct les entourant). En conséquence - ajouter du fixateur supplémentaire.
- **Concentration trop "fine"**: Les métaphases peuvent ne pas être intactes, une quantité de sonde plus importante est nécessaire pour couvrir une plus grande surface. Recentrifuger le tube (1200 tr/min pendant 10 minutes) et enlever l'excès de fixateur.
- **Séchage trop rapide**: les cellules en interphase semblent réfractiles, petites et noires. Les cellules en métaphase sont sous-étalées, dans le cytoplasme, et sont restées noires. Si le niveau d'humidité est trop bas (en dessous de 40-45 %), créer un environnement plus humide en procédant ainsi: ajouter un humidificateur d'air, préparer les lames au-dessus d'un bécot de vapeur, préparer les lames au-dessus d'un évier avec de l'eau chaude qui coule, ou placer des mouchoirs humides sur le chauffe-lame et placer brièvement la lame (~5 secondes) avant de la placer directement sur le chauffe-lame.
- **Séchage trop lent**: Les métaphases sont gris clair et peuvent être trop étalées ou non intactes. Les deux scénarios peuvent produire une hybridation de mauvaise qualité. Diminuer le temps aux étapes 9-10 avant de placer la lame sur le chauffe-lame. Si le niveau d'humidité est trop élevé (au-dessus de 55 %), un déshumidificateur d'air peut aider à abaisser le niveau d'humidité.
- **Cytoplasme autour de la métaphase**: Si le cytoplasme autour des métaphases continue d'être un problème après avoir effectué les ajustements aux étapes ci-dessus, ajouter 1 à 2 gouttes de fixateur à la lame après les étapes 1 à 9 ci-dessus.
- **Séchage correct**: Les cellules en interphase sont plates, assez grosses et pâles ; les cellules en métaphase sont gris foncé, bien étalées avec peu de chevauchements, et intactes sans cytoplasme.

## Protocole de préparation des lames pour culot cellulaire fixé

### Remarques:

- Les conditions environnementales idéales pour la préparation des lames se situent entre 45 et 55 % d'humidité et 24°C (72-75°F) avec un minimum de courants d'air. Un hygromètre/thermomètre doit être positionné près du banc de préparation des lames pour surveiller les conditions environnementales. Si les conditions ne sont pas idéales, des ajustements doivent être réalisés avant de préparer les lames.
- La qualité de l'échantillon est importante et difficile à ajuster 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 une cuve à coloration de Coplin avec 70 % d'éthanol pendant 5 minutes, puis en les essuyant plusieurs fois dans une seule direction avec un mouchoir. Après cela, placer la lame dans un pot de Coplin avec du fixateur préparé extemporanément 3:1 méthanol:acide acétique. Les lames peuvent être utilisées directement, ou séchées et stockées dans un congélateur (-20°C)
- Ne préparer les lames que pour un seul échantillon de patient à la fois pour éviter la contamination croisée entre les échantillons.

### Étape 1 - Préparation des lames

1. Récupérer l'échantillon en utilisant les protocoles standard de Cytogénétique\*.
2. Changer le fixateur (méthanol de Carnoy 3:1:acide acétique) dans le tube de l'échantillon jusqu'à ce que le surnageant soit incolore. Refixer l'échantillon dans du fixateur préparé extemporanément juste avant la préparation des lames.
3. Régler le chauffe-lame à ~45°C.
4. Aspirer le surnageant à ~5 ml 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 froid et préparé extemporanément pour produire une suspension légèrement laiteuse.
6. Retirer une lame du pot de fixateur et l'égoutter sur une serviette en papier. Alternativement, 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 ~15 secondes pour égoutter l'excès de suspension sur un mouchoir.
9. Maintenir la lame à l'horizontale jusqu'à ce qu'une apparence granuleuse soit observée et que les bords de la lame commencent à sécher. Le temps variera en fonction de l'humidité de la pièce.
10. Essuyer le dos de la lame avec un mouchoir et laisser les lames sécher à l'air libre.
11. Placer la lame directement sur le chauffe-lame pour la maintenir au sec.
12. Étiqueter la lame avec l'étiquette de patient appropriée. Ne jamais laisser une lame non étiquetée sur le chauffe-lame. Pour l'étiquetage, utiliser un crayon HB ou un marqueur permanent résistant à l'alcool. Étiqueter la lame avec au moins deux identifiants uniques du patient, la date et les initiales.
13. Évaluer la lame sous un microscope à contraste de phase (objectif 10x).

### Étape 2 - Évaluation de la qualité de la lame

Idéalement, la concentration devrait avoir ~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 chevauchements, intactes (pas trop étalées), sans cytoplasme et de couleur gris foncé. Si ce n'est pas le cas, prendre en considération les variables suivantes.

### Étape 3 - Vieillesse/Stockage de la lame

1. Conserver les lames séchées dans un dessiccateur pendant au moins 24 heures à température ambiante pour qu'elles "vieillissent" suffisamment avant l'étape FISH. Si les résultats sont requis rapidement, laisser la lame sur le chauffe-lame 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 stockée dans un récipient scellé dans un congélateur (-20°C) pendant un maximum de deux semaines.
3. Les suspensions de cellules fixées doivent être stockées dans des cryovials dans le congélateur (-20°C).

### \* Références

1. Barch MJ, Knutsen T, Spurbeck JL. The AGT Cytogenetics Laboratory Manual Third Edition. Chapter 3 - Peripheral Blood Cytogenetic Methods (M.G. Brown, H.J. Lawce). Lippincott-Raven Philadelphia 1991
2. Dunn B, Mouchrani P, Keagle M. The Cytogenetic Symposia - AGT. Second edition.

## Traitement des lames pour échantillons de tissu inclus en paraffine

Cette procédure décrit les étapes impliquées dans le traitement des lames de tissu inclus en paraffine. Le processus de prétraitement déparaffine et prétraite l'échantillon avant la dénaturation et l'hybridation avec les sondes appropriées. Après le prétraitement, les lames et les sondes appropriées sont dénaturées. Procéder aux instructions d'hybridation appropriées une fois le traitement terminé.

### Déparaffinisation et prétraitement

- Préchauffer l'acide citrique 10 mM à 90-95°C.
  - Préchauffer 40 mL de HCL 0,1N à 37°C.
  - Chauffer le four à 90°C.
  - Préparer 1 mL de pepsine à 160 mg/mL dans H<sub>2</sub>O.
1. Chauffer les lames à 90°C pendant 25 minutes au four
  2. Immerger les lames dans du xylène pendant 10 minutes. Répéter une fois avec du xylène frais.
  3. Immerger les lames dans de l'éthanol à 100 % pendant 5 minutes. Répéter une fois.
  4. Laisser sécher à l'air sur le chauffe-lame.
  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 0,1N et bien mélanger.
2. Placer la lame dans la solution de pepsine pendant 20 à 30 minutes.
3. Laver les lames dans 2x SSC pendant 5 minutes.
4. Immerger les lames dans de l'éthanol à 70 % pendant 30 secondes. Laisser sécher la lame à l'air libre ou la placer sur un chauffe-lame pour la faire sécher.
5. Observer la digestion au microscope. Si une digestion adéquate n'est pas obtenue, répéter les étapes 2 à 4, mais changer le temps de digestion par incréments de 10 minutes et analyser les lames après chaque digestion.
6. Lorsqu'une digestion adéquate est obtenue, déshydrater les lames successivement dans de l'éthanol à 70 %, 85 % et 100 % pendant 2 minutes chacune. Procéder au protocole d'hybridation.

## Instructions d'hybridation automatisée

Ces instructions s'appliquent aux hybridations qui seront effectuées à l'aide d'un Hybrite/Thermobrite automatisé. Si un Hybrite/Thermobrite ne doit pas être utilisé, suivez les « Instructions d'hybridation manuelle ».

### Remarques

- Le protocole peut être utilisé avec toutes les sondes FISH : contrôles, sondes spécifiques de gènes, sondes FISH personnalisées.
  - Les solutions peuvent être préparées avant la procédure.
  - Une optimisation supplémentaire du protocole peut être nécessaire.
- Allumer le Hybrite/Thermobrite.
  - Définir le guide du programme (voir « Options du guide du programme »).
  - Pré-imbiber le matériel absorbant dans dH<sub>2</sub>O.
  - Ajouter 2 µL de sonde et 8 µL de tampon d'hybridation.
  - Appliquer une lamelle couvre-objet propre de 22 x 22.
  - Appliquer de la colle de montage (colle caoutchouc) sur les bords du couvre-objet pour le sceller.
  - Placer dans le Hybrite/Thermobrite et fermer le couvercle.
  - Démarrer le programme.
  - Laisser tourner pendant au moins 16 heures.
  - Préchauffer le WS1 à 73 °C.
  - Retirer la lamelle couvre-objet et placer la lame dans WS1 et agiter pendant ~10 secondes.
  - Laisser la lame reposer pendant exactement 2 minutes.
  - Transférer la lame dans le WS2 à température ambiante. Agiter pendant ~10-15 secondes et laisser les lames reposer pendant 2 minutes.
  - Laisser la lame sécher dans l'obscurité.
  - Appliquer 10 µL de DAPI avec Antifade et couvrir avec une lamelle couvre-objet de 22x50.
  - Attendre 15-30 minutes, puis visualiser 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.
- Hibrider à 37°C pendant au moins 16 heures.

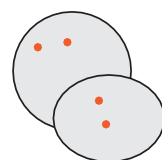
#### Pour le tissu inclus en paraffine après prétraitement

- Dénaturer à 75°C pendant 7 minutes.
  - Hibrider à 37°C pendant au moins 16 heures
- Vérifier la section de dépannage si nécessaire*

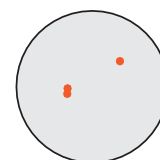
## Instructions d'hybridation manuelle

Ces instructions ne sont pas adaptées pour le Hybrite/Thermobrite. Le fait de suivre ces instructions permettra à la sonde de s'hybrider correctement à un échantillon sans système automatisé. Si un système automatisé comme un Hybrite/Thermobrite doit être utilisé, suivez plutôt les « Instructions d'hybridation automatisée ».

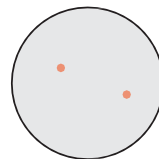
- Porter la lame de l'échantillon à température ambiante.
- Placer les lames dans de l'éthanol à 70 % à température ambiante pendant 2 minutes.
- Placer les lames dans de l'éthanol à 85 % à température ambiante pendant 2 minutes.
- Placer les lames dans de l'éthanol à 100 % à température ambiante pendant 2 minutes.
- Sécher doucement le dos de la lame et la placer sur un chauffe-lame à 45°C jusqu'à ce que l'éthanol s'évapore.
- Préparer la solution de sonde en mélangeant 2 µL de sonde avec 8 µL de tampon.
- Pipeter 10 µL de la solution de sonde et déposer sur la lame.
- Appliquer une lamelle couvre-objet propre de 22 mm<sup>2</sup> sur la lame.
- Sceller les bords de la lamelle couvre-objet avec une colle de montage (colle caoutchouc).
- Dénaturer la lame sur une plaque chauffante selon les « Options du guide du programme » ci-dessus. Assurez-vous que votre lame est protégée de toute exposition à la lumière pendant ce processus.
- Placer la lame dans une chambre humidifiée préchauffée à 37°C et 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 / 0.4 x SSC) à 73°C.
- Retirer la lamelle couvre-objet. Placer dans le WS1, agiter pendant environ 10 secondes puis laisser reposer pendant exactement 2 minutes.
- Transférer la lame dans le WS2 à température ambiante. Agiter pendant ~10-15 secondes et laisser les lames reposer pendant 2 minutes.
- Laisser sécher dans l'obscurité.
- Appliquer 10 µL de DAPI avec Antifade et couvrir avec une lamelle couvre-objet de 22x50.
- Attendre 15-30 minutes puis visualiser au microscope en utilisant les jeux de filtres appropriés.



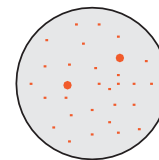
Noyaux superposés : Ne pas lire ces cellules.



Signal double sur un chromosome : Compter le signal double comme un signal unique.



Signal faible : Voir le guide de dépannage. Peut être lu si le signal est clair.



Bruit de fond élevés : Voir le guide de dépannage, la cellule peut être lue si le bruit de fond n'est pas trop important.

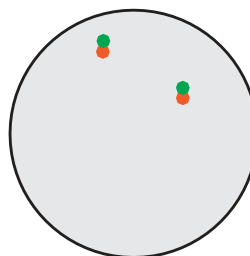


Figure 1

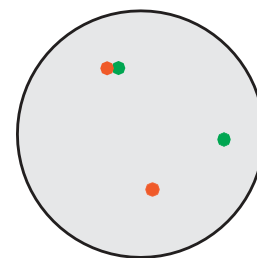


Figure 2

Figure 1 : Motif de signal normal affichant 2 signaux de fusion vert/orange.

Figure 2 : Motif de signal normal affichant 1 signal de fusion vert/orange, 1 signal vert et 1 signal orange, ce qui indique un réarrangement impliquant ZNF384.

## Questions fréquentes de dépannage

### **Morphologie chromosomique déformée**

#### **Cause possible : Les lames ont séché trop rapidement**

Solutions potentielles:

- Augmentez l'humidité de l'air ambiant au moment du dépôt des gouttes
- Laissez s'écouler plus de temps après le dépôt des gouttes avant de placer la lame sur le chauffe-lame.
- Assurez-vous que le chauffe-lame est à environ 45°C. Surveillez la température avec un thermomètre de surface.
- Refixez la suspension cellulaire dans un fixateur 3:1 de méthanol et d'acide acétique fraîchement préparé.

#### **Cause possible : Les lames ont vieilli ou ont été mal conservées**

Solutions potentielles:

- Laissez les lames "vieillir" au moins 24 heures à température ambiante avant la FISH.
- Ne pas trop chauffer les lames.
- Si la FISH doit être effectuée le jour même de la préparation des lames, incubez-les pendant au moins 1 heure dans une cuve de Coplin contenant 2x SSC à 37°C, puis déshydratez-les pendant 1 minute dans de l'éthanol à 70 %, 85 % et 100 % respectivement, avant l'étape de dénaturation.

### **Bruit de fond élevé / Faible spécificité**

#### **Cause possible : Les lames de verre ne sont pas propres**

Solution possible:

- Trempez les lames dans de l'éthanol à 70 % pendant 5 minutes, puis essuyez-les 2 à 3 fois avec un papier.

#### **Cause possible : Mauvaise qualité du spécimen, présence de débris cellulaires**

Solution possible:

- Lavez le culot cellulaire 2 à 3 fois avec un fixateur frais, puis répétez la préparation de la lame. Assurez-vous que la suspension cellulaire n'est pas trop épaisse.

#### **Cause possible : Présence de cytoplasme autour des chromosomes**

Solution possible:

- Les lames ont séché trop rapidement. Se référer aux solutions ci-dessus

#### **Cause possible : Solutions de lavage incorrectes**

Solutions possibles:

- Assurez-vous que le WS1 et le WS2 sont préparés et stockés correctement.
- Vérifiez que le pH (7,0) et la température (73°C) des solutions de lavage sont corrects. Placez un thermomètre directement dans le WS1.
- Assurez-vous que les solutions de lavage ne sont pas périmées ou surutilisées. Jetez-les après 10 lames.
- Assurez-vous que seulement 4 lames sont lavées à la fois pour maintenir la température appropriée du WS1.
- Assurez-vous que le temps dans les solutions de lavage est adéquat.
- Augmentez le temps dans le WS1 à 3 minutes.

#### **Cause possible : Lumière à large bande passante à travers les filtres du microscope.**

Solution possible:

- Utilisez des filtres à bande passante étroite, spécifiques aux fluorochromes utilisés.

#### **Cause possible : Conditions d'hybridation inadéquates**

Solution potentielle:

- Utilisez des chambres hermétiquement fermées avec un contrôle de l'humidité approprié.

### **Signal faible ou absent**

#### **Cause possible : La lame n'est pas suffisamment dénaturée**

Solutions potentielles:

- Assurez-vous que la température de dénaturation est correcte en mesurant la température de la plaque chauffante ou de l'appareil d'hybridation automatisé à l'aide d'un thermomètre ou d'un autre appareil.
- En cas de problème, augmentez la température de dénaturation.
- Assurez-vous que le temps de dénaturation est correct en suivant les "Options du guide de programme" ci-dessus. Augmentez ou diminuez le temps si nécessaire.

#### **Cause possible : La sonde n'a pas été préparée correctement**

Solutions potentielles:

- Décongelez complètement la sonde et le tampon d'hybridation (15 minutes à température ambiante dans un environnement sombre). Ajoutez le tampon d'hybridation à la sonde. Vortexez et centrifugez brièvement.

#### **Cause possible : La sonde a été exposée à la lumière ou stockée de manière incorrecte**

Solutions potentielles:

- Effectuez la FISH dans une pièce faiblement éclairée. Conservez les sondes à -20°C. Évitez les cycles de congélation/décongélation excessifs.

#### **Cause possible : Les spécifications du microscope sont inadéquates**

Solutions potentielles:

- Assurez-vous que la source de lumière UV est adaptée pour visualiser les signaux FISH. En cas de doute, contactez le fabricant du microscope.
- Assurez-vous que la source de lumière UV est centrée.
- Assurez-vous que les filtres appropriés sont installés pour les fluorochromes utilisés. En cas de doute, contactez le fabricant du microscope.
- Assurez-vous que les filtres ne sont pas endommagés.
- Vérifiez également que les solutions de lavage ont été préparées correctement.