








Sonde de dissociation PD-L1(CD274) pour FISH

Couleur(s) : Orange/vert

	PDL1BA -10- ORGR		Quantité : 10 Tests, 20µl
	PDL1BA -20- ORGR		Quantité : 20 Tests, 40µl
	PDL1BA -CS- ORGR		Quantité : Voir l'étiquette de l'emballage



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** : Stockez le produit à -20°C à l'abri de la lumière; la date de péremption est indiquée sur l'étiquette du produit. Si l'emballage est endommagé, veuillez en informer votre distributeur local. Le port de gants et d'autres équipements de protection est obligatoire lors de la manipulation de la sonde. Les sondes d'Empire Genomics sont sensibles à la lumière et ne doivent pas être exposées à une luminosité excessive. Manipulez les sondes dans un environnement sombre pour éviter toute dégradation par photoblanchiment, Éliminez conformément aux réglementations locales en vigueur.

Composition :

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

Utilisation prévue :

La sonde de dissociation PD-L1(CD274) pour FISH d'Empire Genomics est un test d'hybridation in situ par fluorescence (FISH) conçu pour détecter les réarrangements impliquant le gène PD-L1 dans la région chromosomique 9p24.1. Il s'agit d'un test qualitatif, non automatisé, conçu pour être utilisé en complément d'autres tests cliniques et ne doit pas être utilisé comme unique méthode de diagnostic.

Types de spécimens :

- Sang périphérique
- Tissu FFPE (Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded)
- Moelle osseuse

Avertissement et précautions : Le produit ne contient aucun composant d'origine humaine ou animale. Veuillez consulter la fiche de données de sécurité pour des informations 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 toute contamination croisée. Lire attentivement les instructions d'utilisation avant emploi.

- H360d Peut nuire au fœtus.
- P309+P310 EN CAS d'exposition ou de malaise : Contacter immédiatement un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin.



- P201 Se procurer les instructions spécifiques 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 prudemment à l'eau pendant plusieurs minutes. Retirer les lentilles de contact, si elles sont présentes et faciles à enlever. 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/une protection oculaire et une protection du visage.

Caractéristiques de performance :

Cette sonde FISH a été testée sur des échantillons de sang normal. Dans le cadre du contrôle de qualité, la sonde a été soumise à une analyse de l'intensité et de la spécificité du signal. Veuillez consulter le certificat d'analyse inclus pour plus de détails. La précision a été déterminée à 100 %. Cette sonde est conçue pour s'hybrider uniquement aux régions spécifiées sur les idéogrammes ci-dessous.

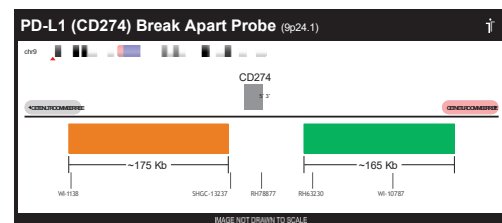
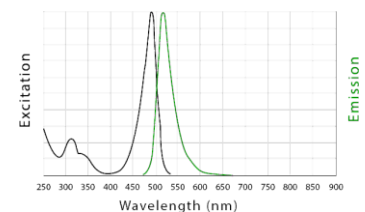
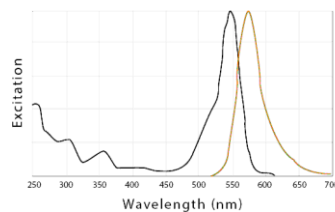
Limites :

- Ce produit est exclusivement destiné à une utilisation *in vitro*.
- La performance de la sonde dépend de la préparation et de la qualité de l'échantillon, et du stockage approprié du produit.
- Ce produit est réservé aux professionnels de laboratoire formés.

Installation et fonctionnement : Tout équipement utilisé pour l'expérience FISH doit être correctement calibré. Les filtres et la source lumineuse utilisés pour détecter les signaux fluorescents doivent être remplacés régulièrement pour garantir les performances optimales de la sonde. Le contrôle de la température et de l'humidité est essentiel pour le bon fonctionnement de la sonde, veillez à ce que tous les thermomètres et hygromètres soient calibrés. La sonde doit être évaluée sur des échantillons normaux pour garantir une hybridation correcte.

Principe de la méthode : L'hybridation in situ par fluorescence (FISH) est une technique cytogénétique utilisée pour détecter les anomalies génomiques. Les sondes FISH sont généralement 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 non tissulaires :

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

Pour le prétraitement des FFPE

- HCL 0,01N
- Xylène
- Éthanol (70 %, 85 %, 100 %)
- Acide citrique 10mM (BDH, 4136-500G)
- 160 mg de pepsine solide (Sigma, # P7012-1G)
- 0,3 % Igepal, CA-630 Sigma (ou NP40)/0,4XSSC
- 0,1% 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
- dH₂O
- Solution de lavage 2 (WS2) - 0,1% d'Igepal (Sigma CA-630) ou NP-40 / 2 x SSC
- DAPI avec agent anti-fading

Pour l'hybridation manuelle

- Tampon de dénaturation - Formamide 70 %, 2 x SSC, pH 7,0-8,0
- Ethanol 70%, 85%, 100%
- Solution de lavage 1 (WS1) – 0,3 % d'Igepal (Sigma CA-630) ou NP-40 / 0,4 x SSC
- Solution de lavage 2 (WS2) – 0,1% d'Igepal (Sigma CA-630) ou NP-40 / 2 x SSC
- DAPI avec agent anti-fading

intactes (non étalées), sans cytoplasme et de couleur gris foncé. Si ce n'est pas le cas, il faut tenir compte variables suivantes.

- **Concentration trop élevée** : Les cellules seront insuffisamment étalées et probablement entourées de cytoplasme (les métaphases apparaîtront en 3D avec un halo distinct autour d'elles). Ajouter du fixateur supplémentaire en conséquence.
- **Concentration trop faible** : La métaphase peut ne pas être intacte, plus de sonde est nécessaire pour une plus grande surface. Centrifuger à nouveau le tube (1200rpm pendant 10 minutes) et éliminer l'excès de fixateur en conséquence.
- **Séchage trop rapide** : les cellules interphasiques apparaissent réfractiles, petites et noires. Les cellules en métaphase sont moins étalées, dans le cytoplasme, et restent noires. Si le niveau d'humidité est trop bas (inférieur à 40-45 %), créez un environnement plus humide en procédant de l'une des manières suivantes : ajoutez un humidificateur d'air, faites des diapositives au-dessus d'un bûcher de vapeur, faites des diapositives au-dessus d'un évier où coule de l'eau chaude, ou placez des tissus humides sur le chauffe-lames et placez les diapositives brièvement (~5 secondes) avant de les placer directement sur le chauffe-lames.
- **Séché trop lentement** : Les métaphases sont gris clair et peuvent être trop étalées ou ne pas être intactes. Les deux scénarios peuvent produire une hybridation de mauvaise qualité. Réduire 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 peut aider à le réduire.
- **Cytoplasme autour des métaphases** : Si le cytoplasme autour des métaphases continue à poser problème après les ajustements des 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, dodues et pâles ; les cellules en métaphase sont gris foncé, bien réparties avec peu de croisements et intactes sans cytoplasme.

Protocole de préparation des lames pour le culot cellulaire fixé

Notes :

- Les conditions environnementales idéales pour la préparation des lames sont une humidité comprise entre 45-55% et une température de 24°C (72-75°F) avec un minimum de courants d'air. Un hygromètre/thermomètre doit être placé près du banc de préparation des lames pour contrôler les conditions environnementales. Si les conditions ne sont pas idéales, des ajustements doivent être effectués avant la préparation des lames.
- La qualité de l'échantillon est importante et difficile à ajuster une fois que le fixateur a été 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 bocal Coplin contenant de l'éthanol à 70% pendant 5 minutes, puis en les essuyant plusieurs fois dans une direction avec un mouchoir en papier. Ensuite, placez la lame dans un bocal Coplin avec un fixateur frais méthanol: acide acétique 3:1. Les lames peuvent être utilisées directement ou séchées et conservées au congélateur (-20°C).
- Préparer les lames à partir d'un seul échantillon de patient à la fois pour éviter toute contamination croisée entre les échantillons.

Étape 1 - Fabrication des lames

1. Prélever l'échantillon en suivant les protocoles standard de Cytogénétique*.
2. Changer le fixateur (Carnoy méthanol :g d'acide acétique 3:1) dans le tube d'échantillon jusqu'à ce que le surnageant devienne incolore. Fixer à nouveau l'échantillon dans un fixateur frais juste avant la préparation de la lame.
3. Régler le réchauffeur de lames à ~45°C
4. Aspirer le surnageant (~5 ml au-dessus du culot cellulaire) et ressuspendre les cellules à l'aide d'une pipette Pasteur en verre.
5. Ajouter suffisamment de fixateur froid frais pour obtenir une suspension légèrement laiteuse.
6. Retirer une lame du bocal Coplin contenant le fixateur et l'égoutter sur du papier absorbant. Vous pouvez également retirer une lame froide du congélateur.
7. Tenir la lame légèrement verticale et déposer 3 gouttes de la suspension en haut, au milieu et en bas de la lame.
8. Faire légèrement pivoter la lame, en l'inclinant légèrement après ~15 secondes pour égoutter l'excédent de suspension sur un tissu.
9. Garder 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 ambiante.
10. Essuyer le dos de la lame avec un papier absorbant et laisser sécher à l'air libre.
11. Placer la lame directement sur le chauffe-lames pour la garder sèche.
12. Étiqueter la lame avec l'étiquette appropriée pour la lame du patient. Ne jamais laisser une lame non étiquetée sur le chauffe-lames. Pour étiqueter, utilisez 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 l'initiale.
13. Examiner la lame au microscope à contraste de phase (objectif 10x),

Étape 2 - Évaluation de la qualité des diapositives

Idéalement, la concentration doit 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 chevauchements, intactes (sans étalement excessif), sans cytoplasme et de couleur gris foncé. Si ces critères ne sont pas remplis, il convient de prendre en compte les variables suivantes,

Étape 3 - Vieillesse et stockage des lames

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

*Références

1. Barch MJ, Knutsen T, Spurbeck JL. Manuel de laboratoire de cytogénétique de l'AGT, troisième édition. Chapitre 3 - Méthodes de cytogénétique du sang périphérique (M.G. Brown, H.J. Lawce). Lippincott-Raven Philadelphia 1991
2. Dunn B, Mouchrani P, Keagle M. The Cytogenetic Symposia - AGT. Deuxième édition.

Traitement des lames pour les échantillons de tissus inclus de paraffine

Cette procédure décrit les étapes du traitement des lames de tissus inclus en paraffine. Le prétraitement permet la déparaffinisation et la préparation de l'échantillon avant la dénaturation et l'hybridation avec les sondes appropriées. Après le prétraitement, les lames et les sondes sont dénaturées. Se référer au protocole d'hybridation approprié après la fin du traitement.

Désaffinisation et prétraitement

- Préchauffer une solution d'acide citrique 10mM à 90-95°C
 - Préchauffer 40mL de HCL 0,1N à 37°C
 - Chauffer le four à 90°C
 - Préparer 1 mL de pepsine à 160 mg/mL dans de l'eau distillée (H₂O)
1. Vieillir les lames à 90°C pendant 25 minutes dans un four.
 2. Immerger les lames dans du xylène pendant 10 minutes. Répéter l'opération une deuxième fois avec du xylène frais.
 3. Immerger les lames dans de l'éthanol à 100 % pendant 5 minutes. Répéter l'opération une deuxième fois.
 4. Sécher les lames à l'air libre sur un chauffe-lames.
 5. Placer les lames dans un tampon de prétraitement d'acide citrique à 90-95°C (pH ~6,8).
- ### 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. Sécher les lames à l'air libre ou les placer sur un chauffe-lames pour les sécher.
 5. Observer la digestion au microscope. Si la digestion est insuffisante, répéter les étapes 2 à 4, ajustant le temps 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 à 70 %, 85 % et 100 % pendant 2 minutes chacune. Passer ensuite au protocole d'hybridation.

Instructions pour l'hybridation automatisée

Ces instructions concernent les hybridations réalisées à l'aide d'un Hybrite/Thermobrite automatisé. Si un Hybrite/Thermobrite n'est pas utilisé, veuillez suivre les "Instructions pour l'hybridation manuelle".

Notes

- Le protocole peut être utilisé avec toutes les sondes FISH - contrôles, sondes spécifiques de gènes, sondes FISH personnalisées.
 - Les solutions peuvent être préparées à l'avance.
 - Une optimisation supplémentaire du protocole peut être nécessaire.
- Allumer le système Hybrite/Thermobrite.
 - Régler le programme (voir "Options du guide des programmes").
 - Pré-tremper le matériau absorbant dans de l'eau distillée (dH₂O).
 - Ajouter 2µL de sonde et 8µL de tampon d'hybridation.
 - Appliquer une lamelle propre de 22 x 22 mm
 - Appliquer de la "colle caoutchouc" sur les bords de la lamelle pour assurer l'étanchéité.
 - Placer la lame dans l'Hybrite/Thermobrite et fermer le couvercle.
 - Démarrer le programme.
 - Laisser fonctionner pendant au moins 16 heures.
 - Préchauffer la solution WS1 à 73°C.
 - Retirer la lamelle et placer la lame dans WS1 en agitation pendant ~10 secondes.
 - Laisser la lame reposer pendant exactement 2 minutes.
 - Transférer la lame dans WS2 à température ambiante. Agiter pendant ~10-15 secondes puis laisser reposer pendant 2 minutes.
 - Laisser sécher la diapositive dans l'obscurité.
 - Appliquer 10µL de DAPI avec Antifading puis couvrir avec une lamelle 22x50 mm.
 - Attendre 15-30 minutes, puis observer au microscope avec le filtre approprié.

Options du guide des programmes

Pour les préparations de sang périphérique

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

Pour les tissus inclus en paraffine après prétraitement

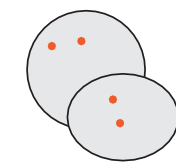
- Dénaturer à 75°C pendant 7 minutes.
 - Hybridation à 37°C pendant au moins 16 heures.
- Une optimisation du protocole peut être nécessaire*

Instructions pour l'hybridation manuelle

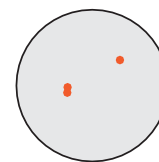
Ces instructions ne nécessitent pas l'utilisation d'un d'Hybrite/Thermobrite. En suivant ces étapes, la sonde pourra s'hybrider correctement à l'échantillon sans système automatisé. Si un système automatisé tel qu'un Hybrite/Thermobrite est utilisé, suivre les "Instructions pour l'hybridation automatisée".

- Amener la lame contenant 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 délicatement le dos de la diapositive et la placer sur un chauffe-diapositive à 45°C jusqu'à ce que l'éthanol s'évapore.
- Préparer le mélange de sonde en mélangeant 2µL de sonde avec 8µL de tampon.
- Pipeter le mélange de 10µL de la sonde sur la lame.
- Appliquer une lamelle couvre-objet propre de 22 mm² sur la lame.
- Sceller les bords de la lamelle couvre-objet avec de la colle à caoutchouc.
- Dénaturer la lame sur une plaque chauffante conformément aux "Options du guide des programmes" ci-dessus. Veillez à ce que la lame soit 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 WS1 (0,3% Igepal (Sigma CA-630) ou NP-40 / 0,4 x SSC) à 73°C.
- Retirer la lamelle couvre-objet. Placer dans WS1, agiter pendant environ 10 secondes puis laisser reposer pendant exactement 2 minutes.
- Transférer la lame sur 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 22x50.
- Attendre 15 à 30 minutes, puis visualiser au microscope en utilisant les jeux de filtres appropriés.

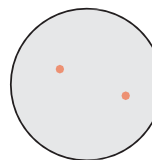
Évaluer la qualité du FISH :



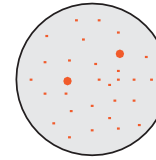
Noyaux qui se chevauchent : Ne pas lire ces cellules.



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



Signal faible : Voir le guide de dépannage. La lecture est toujours possible si le signal est clair.



Signaux de fond élevés : Voir le guide de dépannage, la cellule peut encore être lue si elle n'est pas trop importante.

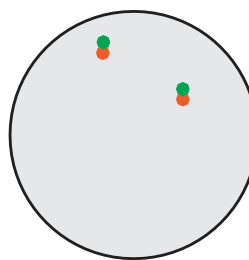


Figure 1

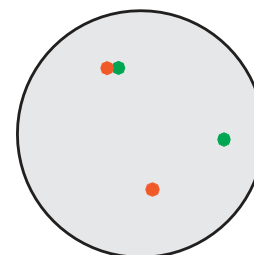


Figure 2

Figure 1 : Profil de signal normal affichant deux signaux de fusion orange/vert.

Figure 2 : Profil de signal anormal présentant 1 signal orange, 1 signal vert et 1 signal de fusion orange/vert indiquant un réarrangement impliquant PD-L1.

Questions fréquences sur le dépannage

Morphologie chromosomique déformée

Raison possible : Les Lames ont séché trop rapidement

Solutions possibles :

- Augmenter l'humidité lors de la dépose des lames.
- Augmenter le temps après avoir déposé la lame avant de la placer sur le chauffe-lames.
- S'assurer que la température du chauffe-lames est de ~45°C. Contrôler la température à l'aide d'un thermomètre de surface.
- Refixer la suspension cellulaire dans un fixateur fraîchement préparé méthanol:acide acétique 3:1.

Raison possible : Les lames ont vieilli ou ont été stockées de manière inappropriée.

Solutions possibles :

- Laisser vieillir les lames au moins 24 heures à température ambiante avant de procéder à la FISH.
- Ne pas cuire les lames.
- Si la FISH doit être réalisée le même jour que la préparation de la lame, incuber la lame pendant au moins 1 heure dans un bocal Coplin contenant 2 x SSC à 37°C, puis déshydrater la lame pendant 1 minute successivement dans de l'éthanol à 70 %, 85 % et 100 % avant l'étape de dénaturation.

Ford bruit de fond/faible spécificité

Raison possible : Les lames de verre ne sont pas propres

Solutions possibles :

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

Raison possible : Qualité de l'échantillon médiocre avec des débris cellulaires

Solutions possibles :

- Laver le culot cellulaire 2-3 fois avec un nouveau fixateur frais, puis répéter la préparation des lames. Veiller à ce que la suspension cellulaire ne soit pas trop épaisse.

Raison possible : Cytoplasme autour des chromosomes

Solutions possibles :

- Les lames ont séché trop rapidement. Voir les recommandations ci-dessus

Raison possible : Solutions de lavage incorrectes

Solutions possibles :

- S'assurer que les solutions WS1 et WS2 sont préparées et stockées correctement.
- Vérifier que le pH (7,0) et la température (73°C) des solutions de lavage sont corrects. Placer un thermomètre directement dans WS1.
- S'assurer que les solutions de lavage ne sont pas périmées ou trop utilisées. Jeter après 10 lames.
- Veiller à ce que seules 4 lames soient lavées en même temps afin de maintenir la température de WS1 à un niveau adéquat.
- Veiller à ce que le temps passé dans les solutions de lavage soit approprié.
- Augmenter le temps passé dans WS1 à 3 minutes.

Raison possible : Bande passante trop large des filtres du microscope

Solutions possibles :

- Utiliser des filtres avec des bandes passantes étroites spécifiques aux fluorochromes utilisés.

Raison possible : Conditions d'hybridation inadéquates

Solutions possibles :

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

Signal faible ou absence de signal

Raison possible : La lame n'a pas été suffisamment dénaturée

Solutions possibles :

- S'assurer 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 dispositif.
- Dépanner en augmentant la température de dénaturation.
- S'assurer que la durée de dénaturation est correcte selon les "Options du guide des programmes" ci-dessus. Augmenter ou diminuer le temps si nécessaire.

Raison possible : La sonde n'est pas suffisamment préparée

Solutions possibles :

- Décongeler complètement la sonde et le tampon hyb (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 stockée de manière incorrecte

Solutions possibles :

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

Raison possible : Spécifications du microscope inadéquates

Solutions possibles :

- S'assurer que la source de lumière UV est adéquate pour visualiser les signaux FISH. En cas de doute, contacter le fabricant du microscope.
- Vérifier que la source de lumière UV est centrée.
- S'assurer que les filtres appropriés sont installés pour les fluorochromes utilisés. 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.