

Sonde FISH NCOA2 Break Apart

Couleur(s): Orange/vert

	NCOA2BA -10- ORGR		Quantité : 10 Tests, 20µl
	NCOA2BA -20- ORGR		Quantité : 20 Tests, 40µl
	NCOA2BA -CS- ORGR		Quantité : Voir l'étiquette de l'emballage



Pour le *diagnostic 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, veuillez en informer votre distributeur local. Des gants et d'autres équipements de protection doivent toujours être portés 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 pour éviter qu'elles ne blanchissent. Éliminez-les conformément aux réglementations locales.

Composition :

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

Utilisation prévue :

La sonde NCOA2 Break Apart FISH d'Empire Genomics est un test d'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) conçu pour détecter les réarrangements impliquant le gène NCOA2 dans la région chromosomique 8q13.3. Il s'agit d'un test qualitatif, test 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:

- Humain
- Sang périphérique
- Tissu FFPE
- Moelle osseuse

Avertissement et précautions : Le produit ne contient aucun composant humain ou animal. Voir 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 le mode d'emploi dans son intégralité avant utilisation.

- 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 Obtenir des instructions spéciales avant l'utilisation.



- H315+H320 Provoque une irritation de la peau et des yeux.
- P262 Ne pas mettre en 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/un équipement de protection des yeux/un équipement de 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 comme étant de 100 %. Cette sonde est conçue pour s'hybrider uniquement aux régions spécifiées dans les idéogrammes ci-dessous.

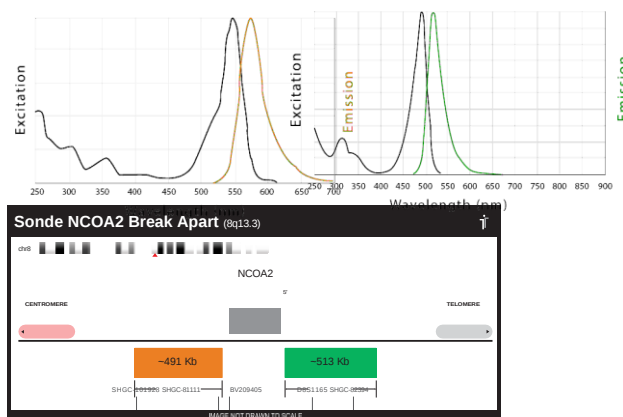
Limites :

- Ce produit est destiné uniquement au *diagnostic in vitro*.
- La performance de la sonde dépend de la préparation et de la qualité de l'échantillon, ainsi que du stockage adéquat du produit.
- Ce produit ne doit être utilisé que par des professionnels de laboratoire qualifiés.

Installation et fonctionnement : Tous les équipements utilisés dans l'expérience FISH doivent être correctement calibrés. Les filtres et la source de lumière utilisés pour détecter les signaux fluorescents doivent être régulièrement remplacés pour garantir les 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 hydromètres sont 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 aberrations 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
- 100% méthanol
- Acide acétique

Pour le prétraitement des FFPE

- 0,01N HCL
- 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 le 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 O₂
- Solution de lavage 2 (WS2) - 0,1% d'Igepal (Sigma CA-630) ou NP-40 / 2 x SSC
- DAPI avec antifade

Pour l'hybridation manuelle

- Tampon de dénaturation - 70 % de formamide, 2 x SSC, pH 7,0-8,0
- 70%, 85%, 100% d'éthanol
- 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 antifade

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

- **Concentration trop élevée** : Les cellules seront moins étalées et probablement dans le cytoplasme (les métaphases apparaîtront en 3D avec un halo distinct les entourant). Ajouter un correctif 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.
- **Séchage 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-lame. 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.

Étape 3 - Vieillessement et stockage des diapositives

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 doivent être obtenus rapidement, laisser la lame sur le chauffe-lame pendant au moins 15 minutes avant la FISH.
2. Si la lame n'est pas hybridée dans les 24-48 heures, elle peut être conservée dans un récipient scellé au congélateur (-20° C) jusqu'à deux semaines.
3. Les suspensions cellulaires fixées doivent être conservées dans des cryovials 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 Philadelphie 1991
2. Dunn B, Mouchrani P, Keagle M. The Cytogenetic Symposia - AGT. Deuxième édition.

Traitement des lames pour les échantillons de tissus enrobés de paraffine

Cette procédure décrit les étapes du traitement des lames de tissus inclus en paraffine. Le processus de prétraitement permet de dé-paraffiner et de prétraiter l'échantillon avant la dénaturation et l'hybridation avec les sondes appropriées. Après le prétraitement, les lames et les sondes appropriées sont dénaturées. Une fois le traitement terminé, passez aux instructions d'hybridation appropriées.

Désaffinisation et prétraitement

- Préchauffer l'acide citrique 10mM 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 160 mg/ml de pepsine dans H O₂
1. Vieillir les lames à 90° C pendant 25 minutes dans le four.
 2. Immerger les lames dans le xylène pendant 10 minutes. Répéter l'opération une fois avec du xylène frais.
 3. Immerger les lames dans de l'éthanol à 100 % pendant 5 minutes. Répéter l'opération une fois.
 4. Sécher à l'air libre sur un chauffe-plat.
 5. Placer la lame dans un tampon de prétraitement à l'acide citrique de 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 une 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 n'est pas adéquate, répéter les étapes 2 à 4, mais changer le temps de digestion à des incréments de 10 minutes et analyser les lames après chaque digestion.
6. Lorsque la digestion est adéquate, déshydrater les lames dans de l'éthanol à 70 %, 85 % et 100 % pendant 2 minutes chacune. Passer au protocole d'hybridation.

Protocole de préparation des lames pour le culot cellulaire fixé

Notes :

- Les conditions environnementales idéales pour la fabrication de diapositives se situent entre 45 et 55 % d'humidité et 24° C (72-75° F) avec un minimum de courants d'air. Un hydromètre/thermomètre doit être placé près de la table de fabrication des diapositives pour contrôler les conditions environnementales. Si les conditions ne sont pas idéales, des ajustements doivent être effectués avant la fabrication des diapositives.
- La qualité de l'échantillon est importante et difficile à ajuster une fois que le fixateur est ajouté. Il est important de suivre les protocoles standard de cytogénétique* en utilisant des réactifs qui ont été testés avant d'être utilisés.
- Facultatif : Nettoyez les lames en les plaçant dans un bocal de 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 de coplin avec un fixateur frais 3:1 méthanol:acide acétique. Les lames peuvent être utilisées directement ou séchées et conservées au congélateur (-20° C).
- Réalisez des lames sur un seul échantillon de patient à la fois afin d'éviter toute contamination croisée entre les échantillons.

Étape 1 - Fabrication des diapositives

1. Prélever l'échantillon en suivant les protocoles standard de Cytogenetics*.
2. Changer le fixateur (méthanol de Carnoy 3:1:g d'acide acétique) dans le tube d'échantillon jusqu'à ce que le surnageant soit incolore. Fixer à nouveau l'échantillon dans un fixateur frais juste avant la réalisation de la lame.
3. Régler la température de la glissière à ~45 C°
4. Aspirer le surnageant ~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 frais pour obtenir une suspension légèrement laiteuse.
6. Retirer une lame du pot de coplin de fixateur et l'égoutter sur du papier absorbant. Vous pouvez également 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. Tourner doucement la lame, en la basculant légèrement après ~15 secondes pour drainer l'excès de suspension sur un tissu.
9. Maintenir la diapositive à l'horizontale jusqu'à ce qu'un aspect granuleux soit observé et que les bords de la diapositive commencent à sécher. Le temps varie en fonction de l'humidité atmosphérique.
10. Essuyer le dos de la diapositive avec un mouchoir en papier et sécher les diapositives à l'air libre.
11. Placer la diapositive directement sur le chauffe-diapositive 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. Évaluer la lame au microscope à contraste de phase (objectif 10x)

Étape 2 - Évaluation de la qualité des diapositives

Idéalement, la concentration devrait comporter environ 50 cellules interphasiques par champ ; les cellules interphasiques doivent être grandes, grises et plates. Les métaphases doivent être bien réparties avec un minimum de croisements,

Instructions pour l'hybridation automatisée

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

Notes

- Le protocole peut être utilisé avec toutes les sondes FISH - contrôles, gènes spécifiques, sondes FISH personnalisées.
- Des solutions peuvent être apportées avant la procédure.
- Une optimisation plus poussée du protocole peut s'avérer nécessaire.

- Activer Hybrite/Thermobrite.
- Régler le guide des programmes (voir "Options du guide des programmes").
- Prétrempier le matériel absorbant dans de l'eau chaude (dH O)₂.
- Ajouter 2µL de sonde et 8µL de tampon d'hybridation.
- Appliquer une lamelle propre de 22 x 22
- Appliquer de la colle à caoutchouc sur les bords de la lamelle couvre-objet pour assurer l'étanchéité.
- Placer dans l'Hybrite/Thermobrite et fermer le couvercle.
- Démarrer le programme.
- Laisser agir pendant au moins 16 heures.
- Préchauffer WS1 à 73 C.^o
- Retirer la lamelle couvre-objet et la placer dans le WS1 agité pendant ~10 secondes.
- Laisser reposer la lame 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 la diapositive dans l'obscurité.
- Appliquer 10µL de DAPI avec Antifade et couvrir avec une lamelle 22x50.
- Attendre 15-30 minutes, puis visualiser 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.
- 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.

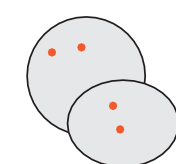
Peut nécessiter un dépannage

Instructions pour l'hybridation manuelle

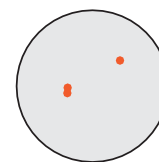
Ces instructions n'utilisent pas d'Hybrite/Thermobrite. Le respect de ces instructions permettra à la sonde de s'hybrider correctement à un échantillon sans système automatisé. Si un système automatisé tel qu'un Hybrite/Thermobrite est utilisé, suivre les "Instructions pour l'hybridation automatisée".

- Réchauffer la lame de l'échantillon à la 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 % d'Igepal (Sigma CA-630) ou NP-40 / 0,4 x SSC) à 73 C.^o
- 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.

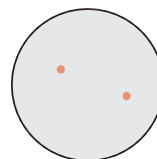
Évaluation de la qualité du FISH :



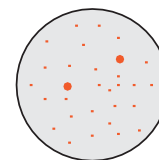
Noyaux qui se chevauchent : Ne pas lire ces cellules.



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.

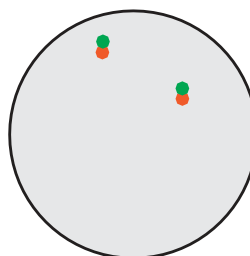


Figure 1

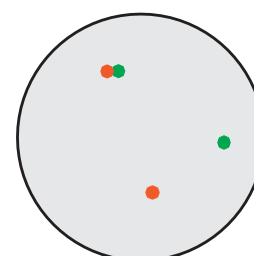


Figure 2

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

Figure 2 : Modèle de signal anormal présentant 1 signal orange, 1 signal vert et 1 signal de fusion orange/vert indiquant un réarrangement impliquant NCOA2.

FAQ sur le dépannage

Morphologie chromosomique déformée

Raison possible : Les diapositives ont séché trop rapidement

Solutions possibles :

- Augmenter l'humidité lors de la chute des diapositives.
- Augmenter le temps après la chute de la diapositive avant de la placer sur le chauffe-diapositive.
- Veiller à ce que la température de la glissière soit d'environ 45° C. Contrôler la température à l'aide d'un thermomètre de surface.
- Refixer la suspension cellulaire dans un fixateur fraîchement préparé 3:1 méthanol:g acide acétique.

Raison possible : Les diapositives ont été vieilles/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 diapositives.
- 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 de coplin contenant 2 x SSC à 37° C, puis déshydrater la lame pendant 1 minute dans de l'éthanol à 70 %, 85 % et 100 % respectivement avant l'étape de dénaturation.

Fond élevé/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 ou 3 fois avec un mouchoir en papier.

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

Solutions possibles :

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

Raison possible : Cytoplasme autour des chromosomes

Solutions possibles :

- Les diapositives ont séché trop rapidement. Voir ci-dessus

Raison possible : Solutions de lavage incorrectes

Solutions possibles :

- S'assurer que WS1 et WS2 sont préparés et stockés correctement.
- Vérifier que le pH (7,0) et la température (73° C) des solutions de lavage sont corrects. Placer le thermomètre directement dans WS1.
- S'assurer que les solutions de lavage ne sont pas périmées ou surutilisées. 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 de WS1 à 3 minutes.

Raison possible : La bande large passe devant les 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 inexistant

Raison possible : La diapositive 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 en suivant les "Options du guide des programmes" ci-dessus. Augmenter ou diminuer la durée 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 hyb à la sonde. Vortexer et centrifuger brièvement.

Raison possible : Sonde 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 adaptée à la visualisation des signaux FISH. En cas de doute, contacter le fabricant du microscope.
- S'assurer 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.
- S'assurer 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