



Sonde MYC FISH

Couleur(s) Aqua



MYC-10- AQ
MYC-20- AQ
MYC-CS- AQ



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



À usage *diagnostic in vitro*
uniquement. Marquage 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 ; à l'abri de 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 de la sonde. 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 leur photoblanchiment. Éliminer conformément à la réglementation locale.

Composition :

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

Utilisation prévue :

La sonde FISH MYC d'Empire Genomics est un test d'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) conçu pour détecter les délétions et les amplifications du gène MYC dans la région chromosomique 8q24.21. Il s'agit d'un test qualitatif et non automatisé, destiné à être utilisé en complément d'autres tests cliniques ; il ne doit pas être utilisé comme seule méthode de diagnostic.

Types d'échantillons :

- Humain
- Tissu FFPE
- 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 à 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 : appelez immédiatement un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin.
- P201 Se procurer des consignes 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 avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la personne en porte et si cela peut se faire sans difficulté. Continuer à rincer.
- P501 Éliminer le contenu et le récipient conformément à la réglementation locale, régionale, nationale ou internationale.
- P280 Porter des gants de protection, des vêtements de protection, un équipement de protection des yeux et 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 estimée à 100 %. Cette sonde est conçue pour s'hybrider uniquement aux régions spécifiées sur les idéogrammes ci-dessous.

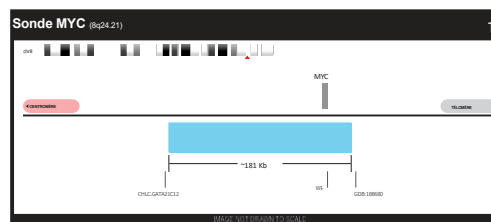
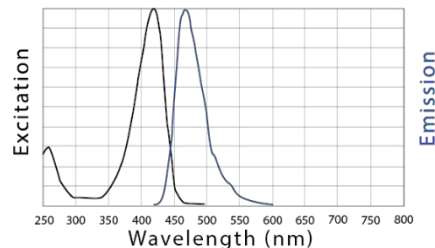
Limites :

- Ce produit est destiné exclusivement à un usage *diagnostic 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 destiné exclusivement à une utilisation par des professionnels de laboratoire qualifiés et formés.

Installation et fonctionnement : Tous les équipements utilisés dans l'expérience FISH doivent être correctement étalonnés. 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 essentiel au bon fonctionnement de la sonde ; assurez-vous que tous les thermomètres et hygromètres sont étalonnés. La sonde doit être testée 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
Aqua*-dUTP	418 nm	467 nm



Réactifs Non Fournis

Pour la préparation de lames non tissées :

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

Pour le prétraitement des échantillons FFPE

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

Matériel requis :

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

Pour l'hybridation automatisée

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

Pour l'hybridation manuelle :

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

Protocole de préparation des lames à partir d'un culot de cellules fixées:

Remarques :

- Les conditions environnementales idéales pour la réalisation des lames se situent entre 45 et 55 % d'humidité et 24 °C (72-75 °F), en évitant les courants d'air. Un hydromètre/thermomètre doit être placé à proximité 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 réalisation des lames.
- La qualité des échantillons est importante et difficile à ajuster une fois le fixateur ajouté. Il est essentiel 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 flacon Coplin contenant de l'éthanol à 70 % pendant 5 minutes, puis en les essuyant plusieurs fois dans un seul sens avec un mouchoir en papier. Ensuite, placer la lame dans un flacon Coplin contenant un fixateur frais à 3:1 de méthanol et d'acide acétique. Les lames peuvent être utilisées directement, ou séchées et conservées au congélateur (-20°C).
- Préparez des 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 (mélange 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 frais juste avant la préparation des lames.
3. Réglez le chauffe-lames à environ 45 °C
4. Aspirez environ 5 ml de surnageant au-dessus du culot cellulaire et remettez les cellules en suspension à l'aide d'une pipette Pasteur en verre.
5. Ajoutez suffisamment de fixateur frais et froid pour obtenir une suspension légèrement laiteuse.
6. Retirez une lame du bocal Coplin contenant le fixateur, puis égouttez-la sur du papier absorbant. Vous pouvez également retirer une lame froide du congélateur.
7. Tenez la lame légèrement à la verticale et déposez 3 gouttes de suspension en haut, au milieu et en bas de la lame.
8. Faites tourner délicatement la lame, en l'inclinant légèrement après environ 15 secondes pour évacuer l'excès de suspension sur un mouchoir en papier.
9. Maintenez 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. Essuyez le dos de la lame avec un mouchoir en papier, puis laissez les lames sécher à l'air libre.
11. Placez la lame directement sur le chauffe-lames pour la maintenir au sec.
12. Étiqueter la lame avec l'étiquette patient appropriée. Ne jamais laisser une lame non étiquetée sur la plaque chauffante. Pour l'étiquetage, utiliser un crayon HB ou un marqueur permanent résistant à l'alcool. Indiquer sur la lame au moins deux identifiants uniques du patient, ainsi que la date et les initiales.
13. Examinez 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 réparties, avec un minimum de chevauchements,

intacts (pas trop étalés), 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 insuffisamment étalées et probablement encore 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 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 éliminez l'excès de fixateur.
- **Séchage trop rapide** : les cellules en interphase apparaissent réfringentes, petites et noires. Les cellules en métaphase sont insuffisamment étalées, entourées de cytoplasme et restent noires. Si le taux d'humidité est trop faible (inférieur à 40–45 %), créer un environnement plus humide en utilisant l'une des méthodes suivantes : ajouter un humidificateur dans la pièce, préparer les lames au-dessus d'un bécier produisant de la vapeur, préparer les lames au-dessus d'un évier avec de l'eau chaude courante, ou placer des mouchoirs humides sur la plaque chauffante et y déposer brièvement la lame (~5 secondes) avant de la placer directement sur la plaque chauffante.
- **Séchage trop lent** : les métaphases sont gris clair et peuvent être trop étalées ou ne pas être intactes. Ces deux situations peuvent entraîner une hybridation de faible qualité. Réduire les temps indiqués aux étapes 9–10 avant de placer la lame sur la plaque chauffante. Si le taux d'humidité est trop élevé (supérieur à 55 %), l'utilisation d'un déshumidificateur peut aider à réduire le niveau d'humidité.
- **Cytoplasme autour des métaphases** : si la présence de cytoplasme autour des métaphases reste problématique après les ajustements décrits ci-dessus, ajouter 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, rebondies et pâles ; les cellules en métaphase sont gris foncé, bien étalées avec peu de chevauchements, intactes et sans cytoplasme.

Étape 3 – Vieillessement et conservation 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 réchauffeur de lames pendant au moins 15 minutes avant de procéder à 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 au maximum.
3. Les suspensions cellulaires 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 tissus inclus en paraffine

Cette procédure décrit les étapes du traitement des lames de tissus inclus dans la paraffine. Le processus de prétraitement consiste à déparaffiner et à 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, suivez les instructions d'hybridation appropriées.

Déparaffinage et prétraitement

- Préchauffez de l'acide citrique 10 mM à 90-95 °C
- Préchauffez 40 ml d'HCl 0,1 N à 37 °C
- Chauffez le four à 90 °C
- Préparez 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 l'opération une fois avec du xylène neuf.
3. Plonger les lames dans de l'éthanol à 100 % pendant 5 minutes. Répéter 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 (pH ~6,8) à 90-95 °C pendant 30 minutes.

Digestion

1. Ajouter 1 ml d'une solution de pepsine à 160 mg/ml à 40 ml d'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 SSC 2x pendant 5 minutes.
4. Plonger les lames dans de l'éthanol à 70 % pendant 30 secondes. Laisser 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 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 à 70 %, 85 % et 100 %, pendant 2 minutes à chaque fois. Passer au protocole d'hybridation.

Instructions d'Hybridation automatisée

Ces instructions s'appliquent aux 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

- Ce 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 s'avérer nécessaire.

1. Allumez l'Hybrite/Thermobrite.
2. Configurez le guide de programme (voir « Options du guide de programme »).
3. Pré-trempez le matériau absorbant dans de l'eau distillée (dH_2O).
4. Ajouter 2 μL de sonde et 8 μL de tampon d'hybridation.
5. Appliquer une lamelle propre de 22 x 22
6. Appliquer de la colle à caoutchouc sur les bords de la lamelle pour la sceller.
7. Placer dans l'Hybrite/Thermobrite et fermer le couvercle.
8. Lancez le programme.
9. Laisser fonctionner pendant au moins 16 heures.
10. Préchauffez le WS1 à 73 °C.
11. Retirez la lamelle et placez la lame dans le WS1 en agitation pendant environ 10 secondes.
12. Laissez reposer la lame pendant exactement 2 minutes.
13. Transférez la lame dans le WS2 à température ambiante. Agitez pendant environ 10 à 15 secondes, puis laissez reposer la lame pendant 2 minutes.
14. Laissez la lame sécher à l'abri de la lumière.
15. Appliquer 10 μL de DAPI avec Antifade et recouvrir d'une lamelle de 22 x 50.
16. Attendez 15 à 30 minutes, puis observez au microscope avec le filtre approprié.

Options du guide du programme

Pour les préparations de sang périphérique

- Dénaturez 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.
- Hybrider à 37 °C pendant au moins 16 heures

Problèmes pouvant survenir

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 recourir à un système automatisé. Si un système automatisé tel qu'un Hybrite/Thermobrite est utilisé, suivez plutôt les « Instructions d'hybridation automatisée ».

1. Laissez la lame d'échantillon revenir à température ambiante.
2. Placez les lames dans de l'éthanol à 70 % à température ambiante pendant 2 minutes.
3. Placez les lames dans de l'éthanol à 85 % à température ambiante pendant 2 minutes.
4. Placez les lames dans de l'éthanol à 100 % à température ambiante pendant 2 minutes.
5. Séchez délicatement le dos de la lame et placez-la sur un chauffe-lames à 45 °C jusqu'à évaporation complète de l'éthanol.
6. Préparez le mélange de sonde en mélangeant 2 μL de sonde avec 8 μL de tampon.
7. Déposer 10 μL du mélange de sonde sur la lame à l'aide d'une pipette.
8. Appliquez une lamelle propre de 22 mm² sur la lame.
9. Scellez les bords de la lamelle avec de la colle à caoutchouc.
10. Placez la lame sur une plaque chauffante conformément aux « Options du guide de programme » ci-dessus. Veillez à ce que votre lame soit à l'abri de toute exposition à la lumière pendant ce processus.
11. Placez la lame dans une chambre humidifiée préchauffée à 37 °C, puis placez la chambre dans un incubateur à 37 °C.
12. Incuber à 37 °C pendant 16 heures.
13. Préchauffez le WS1 (0,3 % d'Igepal (Sigma CA-630) ou de NP-40 / 0,4 x SSC) à 73 °C.
14. Retirez la lamelle. Placez la lame dans le WS1, agitez pendant environ 10 secondes, puis laissez reposer pendant exactement 2 minutes.
15. Transférez la lame dans le WS2 à température ambiante. Agiter pendant environ 10 à 15 secondes et laissez reposer les lames pendant 2 minutes.
16. Laissez sécher à l'abri de la lumière.
17. Appliquer 10 μL de DAPI avec Antifade et recouvrir d'une lamelle de 22 x 50.
18. Attendez 15 à 30 minutes, puis observez au microscope à l'aide des jeux de filtres appropriés

Évaluation de la qualité de la FISH :

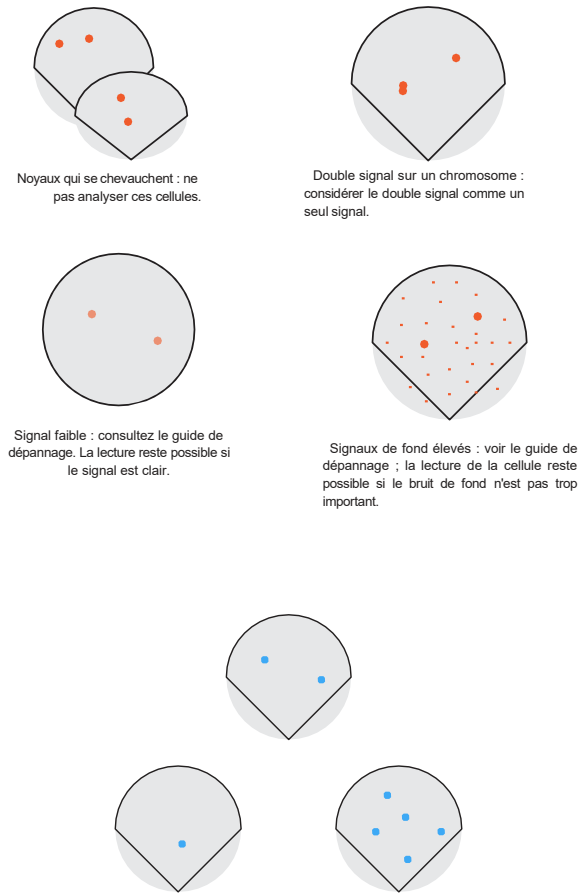


Figure 1 : Profil de signal normal présentant 2 signaux de couleur aqua.

Figure 2 : Profil de signal anormal présentant un signal de couleur aqua, indiquant une délétion.

Figure 3 : Profil de signal anormal présentant plus de 2 signaux de couleur aqua, indiquant une amplification.

Questions Fréquentes sur le dépannage

Morphologie chromosomique altérée

Cause possible : les lames ont séché trop rapidement

Solutions possibles :

- Augmenter l'humidité lors de la mise en place des lames.
- Allonger le délai entre le dépôt / étalement sur lame et celui où son placement sur le chauffe-lames.
- S'assurer que le chauffe-lames est à environ 45 °C. Surveiller la température à l'aide d'un thermomètre de surface.
- Refixez la suspension cellulaire dans un fixateur fraîchement préparé à 3:1 (méthanol : acide acétique).

Cause possible : lames trop anciennes ou mal conservées

Solutions possibles :

- Laisser vieillir les lames pendant au moins 24 heures à température ambiante avant la FISH.
- Ne pas incuber les lames à l'étuve
- Si la FISH doit être réalisée le jour même de la préparation des lames, incuber la lame pendant au moins 1 heure dans un flacon de Coplin contenant du SSC 2x à 37 °C, puis la déshydrater 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

Solutions possibles :

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

Cause possible : Mauvaise qualité de l'échantillon contenant des débris cellulaires

Solutions possibles :

- Lavez le culot cellulaire 2 à 3 fois avec un fixateur frais, puis refaites la préparation. Veillez à ce que la suspension cellulaire ne soit pas trop épaisse.

Cause possible : présence de cytoplasme autour des chromosomes

Solutions possibles :

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

Cause possible : solutions de lavage inadaptées

Solutions possibles :

- S'assurer que les solutions de lavage WS1 et WS2 sont préparées et conservées correctement.
- Vérifiez que le pH (7,0) et la température (73 °C) des solutions de lavage sont corrects. Placez le thermomètre directement dans la solution WS1.
- S'assurer que les solutions de lavage ne sont pas périmées ou trop utilisées. Les jeter après 10 lames.
- Veillez à ne laver que 4 lames à la fois afin de maintenir la température adéquate de la solution WS1.
- S'assurer que le temps d'incubation dans les solutions de lavage est appropriée.
- Augmentez le temps d'incubation dans la solution WS1 à 3 minutes.

Cause possible : Filtres à large bande du microscope

Solutions possibles :

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

Cause possible : conditions d'hybridation inadéquates

Solutions possibles :

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

Signal faible ou absent

Cause possible : Lame insuffisamment dénaturée

Solutions possibles :

- Vérifiez 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 Thermomètre infrarouge ou d'un autre appareil.
- Pour résoudre le problème, augmentez la température de dénaturation.
- Vérifiez que la durée de dénaturation est correcte en suivant les « Options du guide de programmation » ci-dessus. Augmentez ou réduisez cette durée si nécessaire.

Cause possible : sonde mal préparée

Solutions possibles :

- 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. Agitez au vortex et centrifugez brièvement.

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

Solutions possibles :

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

Cause possible : caractéristiques techniques du microscope inadéquates

Solutions possibles :

- 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.
- Vérifiez que les filtres adaptés aux fluorochromes utilisés sont bien installés. En cas de doute, contactez le fabricant du microscope.
- Vérifiez que les filtres ne sont pas endommagés.
- Vérifiez 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