



A Sysmex Group Company



Instructions For Use
REF: LPS 032-S / LPS 032

IGH Breakpart Probe



PROFESSIONAL USE ONLY

ENGLISH/FRANÇAIS/ITALIANO/DEUTSCH/ESPAÑOL

Further information available at www.ogt.com

Fluorescence *In Situ* Hybridisation (FISH) is a technique that allows DNA sequences to be detected on metaphase chromosomes or in interphase nuclei from fixed cytogenetic samples. The technique uses DNA probes that hybridise to entire chromosomes or single unique sequences, and serves as a powerful adjunct to classic cytogenetics. Recent developments have meant that this valuable technique can now be applied to the assessment of solid tumour biopsies as well, which can provide important information for prediction of tumour progression. Current methodologies, namely immunohistochemistry or Southern blotting can provide information at the gene expression level but, when carried out on tissue sections (either cryostat or paraffin embedded), FISH can provide information at a gene level, *in situ*, at the precise site within the tumour. This can reveal cell-to-cell heterogeneity and enable the detection of small clones of genetically distinct cells.

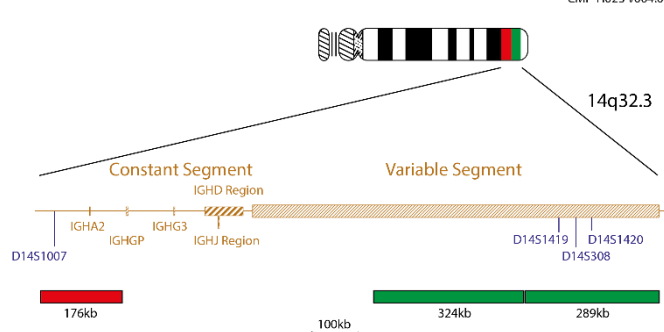
Probe Information

Rearrangements involving the IGH gene have been identified in numerous different tumour types. There are a number of stereotypical translocations involved in each of the diseases and more are being described regularly. The t(8;14)(q24;q32), involving IGH and the MYC gene, is the most common rearrangement in Burkitt's lymphoma and occurs in around 85% of cases¹. IGH rearrangements have also been noted in 50% of non-Hodgkin B-cell lymphomas (NHLs) and have been correlated to clinically relevant subgroups². One study showed that the t(14;18)(q32;q21) (IGH-BCL2) was found in 88.1% of follicular lymphomas and the t(11;14)(q13;q32) (IGH-CCND1) in 85.7% of mantle cell lymphomas². IGH rearrangements were also identified in 52.5% of diffuse large B-cell lymphomas (DLBCL)¹. IGH is commonly rearranged in lymphomas and has many different translocation partners. We have, therefore, designed a split probe set for IGH, which allows the detection of rearrangements of the IGH gene, regardless of partner gene or chromosome involved.

Probe Specification

IGHC, 14q32.3, Red
IGHV, 14q32.3, Green

CMP-H023 v004.00



The IGH probe mix consists of a 176kb probe, labelled in red, covering part of the Constant region of the gene and two green probes (324kb and 289kb), covering part of the Variable segment of the gene.

Materials Provided

Probe: 50µl per vial (5 tests) or 100µl per vial (10 tests)

Amount of Red IGH C probe: 40-50ng/test

Amount of Green IGH V probe: 60-75ng/test

The probes are provided premixed in hybridisation solution (Formamide; Dextran Sulphate; SSC) and are ready to use.

Counterstain: 150µl per vial (15 tests)

The counterstain is DAPI antifade (ES: 0.125µg/ml DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole)).

Warnings and Precautions

1. For *in vitro* diagnostic use. For professional use only.
2. Wear gloves when handling DNA probes and DAPI counterstain.
3. Probe mixtures contain formamide, which is a teratogen; do not breathe fumes or allow skin contact. Wear gloves, a lab coat, and handle in a fume hood. Upon disposal, flush with a large volume of water.
4. DAPI is a potential carcinogen. Handle with care; wear gloves and a lab coat. Upon disposal, flush with a large volume of water.
5. All hazardous materials should be disposed of according to your institution's guidelines for hazardous waste disposal.

Storage and Handling

The kit should be stored between -25°C to -15 °C in a freezer until the expiry date indicated on the kit label. The probe and counterstain vials must be stored in the dark.

Equipment Necessary but not Supplied

1. Hotplate (with a solid plate and accurate temperature control up to 80°C).
2. Variable volume micropipettes and tips range 1µl - 200µl.
3. Water bath with accurate temperature control at 72°C.
4. Microcentrifuge tubes (0.5ml).
5. Fluorescence microscope (Please see Fluorescence Microscope Recommendation section).
6. Plastic or glass coplin jars.
7. Forceps.
8. Fluorescence grade microscope lens immersion oil.
9. Bench-top centrifuge.
10. Microscope slides.
11. 24x24mm coverslips.
12. Timer.
13. 37°C incubator.
14. Rubber solution glue.
15. Tissue Pretreatment Kit (LPS 100).

Fluorescence Microscope Recommendation

For optimal visualisation of the probe we recommend a 100-watt mercury lamp and plan apochromat objectives x63 or x100. The Triple bandpass filter DAPI/FITC/Texas Red is optimal for viewing all fluorophores and DAPI simultaneously. Alternatively for viewing red and green fluorophores use dual bandpass filter FITC/Texas Red.

Sample Preparation

This Kit has been designed for use on:

- Formalin Fixed Paraffin Embedded (FFPE) Tissue sections or Tissue Microarrays (TMA), 4µm - 6µm thick tissue sections should be used.
- Peripheral blood samples or cultured bone marrow cells fixed in Carnoy's fixative air dried on a microscope slides according to standard cytogenetic procedures.

All samples should be prepared according to the laboratory or institution guidelines.

FISH Protocol

(Note: Please ensure that exposure of the probe to laboratory lights is limited at all times)

FFPE Procedure

Tissue Sample Pretreatment

Tissue sample pretreatment should be done according to the laboratory or institution guideline. For optimal results use the Tissue Pretreatment Kit (LPS 100).

Pre-Denaturation

1. Remove the probe from the freezer and allow it to warm to room temperature (RT)
2. Ensure that the probe solution is uniformly mixed with a pipette.
3. Remove 10µl - 15µl (depending on the size of the tissue) of probe per test, and transfer it to a microcentrifuge tube. Quickly return the remaining probe to the freezer.
4. Place the probe and the sample slide to prewarm on a 37°C (+/- 1°C) hotplate for 5 minutes.
5. Spot 10µl - 15µl of probe mixture onto the sample and carefully apply a coverslip. Seal with rubber solution glue and allow the glue to dry completely.

Denaturation

6. Denature the sample and probe simultaneously by heating the slide on a hotplate at 75°C (+/- 1°C) for 5 minutes.

Hybridisation

7. Place the slide in a humid, lightproof container at 37°C (+/- 1°C) overnight.

Post-Hybridisation Washes

8. Remove the coverslip and all traces of glue carefully.
9. Immerse the slide in 0.4xSSC (pH 7.0) at 72°C (+/- 1°C) for 2 minutes without agitation.
10. Drain the slide and immerse it in 2xSSC, 0.05% Tween-20 at RT (pH 7.0) for 30 seconds without agitation.
11. Drain the slide and apply 10µl - 15µl of DAPI antifade onto each sample.
12. Cover with a coverslip, remove any bubbles and allow the colour to develop in the dark for 10 minutes.
13. View with a fluorescence microscope.

Peripheral Blood or Cultured Bone Marrow Procedure

Slide preparation

- 1. Spot the cell sample onto a glass microscope slide. Allow to dry.
- 2. Immerse the slide in 2xSSC for 2 minutes at room temperature (RT) without agitation.
- 3. Dehydrate in an ethanol series (70%, 85% and 100%), each for 2 minutes at RT.
- 4. Allow to dry.

Pre-Denaturation

- 5. Remove the probe from the freezer and allow it to warm to RT.
- 6. Ensure that the probe solution is uniformly mixed with a pipette.
- 7. Remove 10µl of probe per test, and transfer it to a microcentrifuge tube. Quickly return the remaining probe to the freezer.
- 8. Place the probe and the sample slide to prewarm on a 37°C (+/- 1°C) hotplate for 5 minutes.
- 9. Spot 10µl of probe mixture onto the cell sample and carefully apply a coverslip. Seal with rubber solution glue and allow the glue to dry completely.

Denaturation

- 10. Denature the sample and probe simultaneously by heating the slide on a hotplate at 75°C (+/- 1°C) for 2 minutes.

Hybridisation

- 11. Place the slide in a humid, lightproof container at 37°C (+/- 1°C) overnight.

Post-Hybridisation Washes

- 12. Remove the coverslip and all traces of glue carefully.
- 13. Immerse the slide in 0.4xSSC (pH 7.0) at 72°C (+/- 1°C) for 2 minutes without agitation.
- 14. Drain the slide and immerse it in 2xSSC, 0.05% Tween-20 at RT (pH 7.0) for 30 seconds without agitation.
- 15. Drain the slide and apply 10µl - 15µl of DAPI antifade onto each sample.
- 16. Cover with a coverslip, remove any bubbles and allow the colour to develop in the dark for 10 minutes.
- 17. View with a fluorescence microscope.

Comments

Hybridisation efficiency and tissue morphology are usually negatively correlated. Aggressive pretreatment procedures improving hybridisation efficiency (e.g. an extended enzyme digestion time) tend to destroy cell structure and tissue morphology. However, mild pretreatment saving tissue structures may not be sufficient for probe penetration and successful FISH results. The optimal length of heat pretreatment and enzyme digestion time will depend on the age of the block, the tissue composition, and quality of tissue fixation. Enzyme digestion should be decreased for core biopsies and any sections that contain few tumour cells or have large areas of necrosis. These samples need to be handled particularly carefully to avoid over-digestion.

Stability of Finished Slides

FISHed slides remain analysable for up to 1 month if stored in the dark below 4°C.

Procedural Recommendations

- 1. Baking or ageing of slides containing peripheral blood samples or bone marrow is not recommended as it may reduce signal fluorescence.
- 2. Hybridisation conditions may be adversely affected by the use of reagents other than those provided or recommended by CytoCell Ltd.
- 3. The use of a calibrated thermometer is strongly recommended for measuring temperatures of solutions, waterbaths, and incubators, as these temperatures are critical for optimum product performance.
- 4. The wash concentrations, pH and temperatures are important as low stringency can result in non-specific binding of the probe and too high stringency can result in a lack of signal.
- 5. Incomplete denaturation can result in lack of signal and over denaturation can also result in non-specific binding.

Expected Results

In a normal cell two red/green (or fused yellow) signals are expected (2Y). In a cell with monoallelic IGH translocation there should be one distinct red and one green signal in addition to one red/green (or fused yellow) signal of the normal chromosome 14 (1R, 1G, 1Y). In the event of a biallelic translocation no fused signals would be present, two distinct red and two green signals should be observed (2R, 2G).

Limitations

Reporting and interpretation of FISH results should be consistent with professional standards of practice and should take into consideration other clinical and diagnostic information. This kit is intended as an adjunct to other diagnostic laboratory tests and therapeutic action should not be initiated on the basis of the FISH result alone.

Additional Information

For additional product information please contact the CytoCell Technical Support Department.
T: +44 (0)1223 294048
E: techsupport@cytoCELL.com
W: www.oqt.com

FRANÇAIS

L'hybridation in situ par fluorescence (FISH) est une technique qui permet de détecter des séquences ADN sur les chromosomes métaphasiques ou sur les noyaux interphasiques d'échantillons cytogénétiques fixés. La technique s'appuie sur des sondes ADN qui s'hybrident aux chromosomes entiers ou à des séquences spécifiques, et représente un outil complémentaire très efficace pour la cytogénétique classique. De récents développements ont démontré que cette technique extrêmement utile peut maintenant être utilisée pour évaluer les

biopsies de tumeurs solides et permettre l'obtention de données importantes pour la prédiction de la progression tumorale.

Les méthodologies actuelles, à savoir l'immunohistochimie ou le transfert de Southern, peuvent fournir des informations au niveau de l'expression génique, mais la technique FISH, lorsqu'elle est appliquée à des coupes tissulaires (soit sur coupes au cryostat ou après inclusion dans la paraffine), peut fournir des informations au niveau des gènes, in situ, du site intratumoral précisément concerné. Ceci permet de déceler l'hétérogénéité entre les cellules et de détecter de petits clones de cellules génétiquement distinctes.

Caractéristiques de la sonde

Sonde de la région IGHC 14q32.3 en rouge
Sonde de la région IGHV 14q32.3 en vert

Le mélange de sondes IGH correspond à une sonde de 176kb, marquée en rouge, couvrant une partie de la région constante du gène et à deux sondes vertes (324kb et 289kb), qui couvrent une partie du segment variable du gène.

Conditionnement

Sonde : 50µl par tube (5 tests) ou 100µl par tube (10 tests)
Quantité de sonde IGHC, rouge: 40-50ng/test
Quantité de sonde IGHV, vert: 60-75ng/test
La sonde est fournie prémélangée prête-à-l'emploi dans le tampon d'hybridation (formamide, sulfate de dextran, SSC).

Contre-colorant: 150µl par tube (15 tests)

Le contre-colorant est le DAPI antifade (ES: 0,125µg/ml DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole)).

Avertissements et précautions

- 1. Pour utilisation en diagnostic *in vitro*. Pour usage professionnel uniquement.
- 2. Porter des gants lors de la manipulation des sondes ADN et du contre-colorant DAPI.
- 3. La sonde contient de la formamide qui est un tératogène. Ne pas respirer les vapeurs. Ne pas mettre en contact avec la peau. Porter des gants, une blouse de laboratoire et manipuler sous une hotte. Après élimination, rincer abondamment avec de l'eau.
- 4. Le DAPI est un carcinogène potentiel. Manipuler avec précaution. Porter des gants et une blouse de laboratoire. Après élimination, rincer abondamment avec de l'eau.
- 5. Toutes les matières dangereuses doivent être éliminées selon les réglementations concernant l'élimination des déchets dangereux en vigueur dans votre établissement.

Conservation et manipulation

Le kit devra être stocké au congélateur entre -25°C et -15°C jusqu'à la date d'expiration figurant sur l'étiquette du kit. La sonde et le contre-colorant doivent être conservés à l'abri de la lumière.

Équipement nécessaire non fourni

- 1. Plaque chauffante (avec bloc et contrôle de la température jusqu'à 80°C).
- 2. Micropipettes de volume variable et gamme d'embouts de 1µl - 200µl.
- 3. Bain-marie avec contrôle précis de la température à 72°C.
- 4. Tubes à microcentrifugation (0,5ml).
- 5. Microscope à fluorescence (Voir la section Microscope à fluorescence recommandés).
- 6. Bocaux Coplin en plastique ou en verre.
- 7. Pinces.
- 8. Huile à immersion pour microscope à fluorescence.
- 9. Centrifugeuse de paillasse.
- 10. Lames de microscope.
- 11. Lamelles 24x24mm.
- 12. Chronomètre.
- 13. Incubateur à 37°C.
- 14. Colle à base de caoutchouc.
- 15. Tissue Pretreatment Kit (LPS 100).

Microscope à fluorescence recommandés

Pour une visualisation optimale de la sonde, nous recommandons l'utilisation d'une lampe à mercure de 100 watts et d'objectifs plan apochromatiques x63 ou x100. Le filtre triple bande DAPI/FITC/Texas Red est optimal pour la visualisation des 3 fluorochromes et du DAPI simultanément. Pour la visualisation des fluochromes rouge et vert, utiliser le filtre double bande FITC/Texas Red.

Préparation des échantillons

- Ce kit a été conçu pour utilisation sur :
- des coupes tissulaires fixées dans du formol et incluses en paraffine (FFPE) ou des microréseaux de tissus (« microarrays » ou TMA). Il y a lieu d'utiliser des coupes tissulaires d'une épaisseur de 4 µm – 6 µm.
 - des cellules de sang périphérique ou de moelle osseuse cultivées et fixées avec du fixateur de Carnoy. Les échantillons doivent être préparés sur des lames de microscope séchées à l'air selon les procédures standard de cytogénétique.

Tous les échantillons doivent être préparés selon les protocoles en vigueur dans le laboratoire ou l'établissement .

Protocole FISH

(Remarque : Veuillez toujours vous assurer de limiter l'exposition de la sonde à l'éclairage du laboratoire)

Protocole sur échantillons FFPE

Prétraitement des échantillons de tissu

Le prétraitement des échantillons de tissu doit être effectué conformément aux directives du laboratoire ou de l'établissement. Pour de meilleurs résultats, utiliser le Tissue Pretreatment Kit (LPS 100).

Pré-dénaturation

- 1. Retirer la sonde du congélateur et la laisser se remettre à température ambiante (TA).
- 2. Bien homogénéiser la sonde en pipetant plusieurs fois.
- 3. Prélever 10µl - 15µl (en fonction de la taille du tissu) de sonde par test et placer dans un tube à microcentrifugation. Remplacez rapidement le reste de sonde dans le congélateur.
- 4. Mettre la sonde et la lame échantillon à préchauffer sur une plaque chauffante à 37°C (+/- 1°C) pendant 5 minutes.
- 5. Déposer 10µl - 15µl de sonde sur l'échantillon et couvrir avec une lamelle. Sceller avec de la colle à base de caoutchouc et laisser sécher.

Dénaturation

- 6. Dénaturer simultanément la sonde et l'échantillon en plaçant la lame sur une plaque chauffante à 75°C (+/- 1°C) pendant 5 minutes.

Hybridation

- 7. Incuber la lame pendant une nuit à 37°C (+/- 1°C) dans un récipient humide et à l'abri de la lumière.

Lavages post-hybridation

- 8. Retirer la lamelle et éliminer toute trace de colle à base de caoutchouc.
- 9. Laver la lame dans du tampon 0,4xSSC (pH 7,0) à 72°C (+/- 1°C) pendant 2 minutes sans agiter.
- 10. Egoutter la lame et laver dans du tampon 2xSSC, 0,05% Tween-20 (pH 7,0) à TA pendant 30 secondes sans agiter.

- 11. Sécher la lame et appliquer 10µl - 15µl de DAPI antifade sur chaque échantillon.
- 12. Recouvrir d'une lamelle, éliminer les bulles et laisser la coloration apparaître à l'abri de la lumière pendant 10 minutes.
- 13. Visualiser avec un microscope à fluorescence.

Commentaires:

L'efficacité de l'hybridation et la morphologie du tissu d'habitude ont une corrélation négative. Les méthodes de prétraitement agressives améliorant l'efficacité d'hybridation (p.ex. un long temps de digestion enzymatique) ont tendance à détruire la structure cellulaire et la morphologie du tissu. Néanmoins, les méthodes de prétraitement douces conservant les structures de tissu souvent ne sont pas suffisantes pour la pénétration de la sonde et l'obtention de bons résultats de FISH.

La durée optimale de prétraitement thermique et de digestion enzymatique dépendra de l'âge du bloc, de la composition du tissu et de la qualité de la fixation du tissu. La digestion enzymatique devrait être réduite pour les biopsies au trocar et pour toutes les coupes ne contenant que quelques cellules tumorales ou présentant de larges plages de nécrose. Ces échantillons doivent être utilisés avec une précaution particulière pour éviter une digestion excessive.

Protocole sur cellules de sang périphérique ou de moelle osseuse cultivées

Préparation de la lame échantillon

- 1. Déposer l'échantillon cellulaire sur une lame propre. Laisser sécher.
- 2. Plonger la lame dans du 2xSSC pendant 2 minutes à température ambiante sans agitation.
- 3. Déshydrater dans une série de bains éthanol (70%, 85% et 100%), 2 minutes dans chaque bain à température ambiante.
- 4. Laisser sécher.

Pré-dénaturation

- 5. Retirer la sonde du congélateur à -20°C et la laisser préchauffer à température ambiante.
- 6. Bien homogénéiser la sonde en pipetant plusieurs fois.
- 7. Prélever 10µl de sonde par test et placer dans un tube à microcentrifugation. Remplacer rapidement le reste de sonde dans le congélateur.
- 8. Mettre la sonde et la lame échantillon à préchauffer sur une plaque chauffante à 37°C (+/- 1°C) pendant 5 minutes.
- 9. Déposer 10µl de sonde sur l'échantillon et couvrir avec une lamelle. Sceller avec du rubber cément et laisser sécher.

Dénaturation

- 10. Dénaturer simultanément la sonde et l'échantillon en plaçant la lame sur une plaque chauffante à 75°C (+/-1°C) pendant 2 minutes.

Hybridation

- 11. Incuber la lame pendant une nuit à 37°C (+/-1°C) à l'abri de la lumière et dans une chambre humide.

Lavages post-hybridation

- 12. Retirer la lamelle et éliminer toutes traces de rubber cément.
- 13. Laver la lame dans du tampon 0.4xSSC (pH 7.0) à 72°C (+/- 1°C) pendant 2 minutes.
- 14. Egoutter la lame et laver dans du tampon 2xSSC, 0.05% Tween-20 (pH 7.0) à température ambiante pendant 30 seconde sans agitation.
- 15. Sécher la lame et appliquer 10µl de DAPI antifading sur chaque échantillon.
- 16. Recouvrir d'une lamelle, enlever les bulles et laisser la coloration apparaître à l'abri de la lumière pendant 10 minutes.
- 17. Visualiser avec un microscope à fluorescence.

Stabilité des lames

Les lames sont analysables pendant un mois si elles sont conservées à l'abri de la lumière et à au dessous de 4°C.

Recommandations

- 1. Il n'est pas recommandé de cuire ou de vieillir les lames préparées avec les échantillons de sang périphérique ou de moelle osseuse, ceci pouvant réduire l'intensité du signal fluorescent.
- 2. Les conditions d'hybridation peuvent être affectées par l'utilisation de réactifs autres que ceux fournis ou recommandés par Cytocell Ltd.
- 3. L'utilisation d'un thermomètre calibré est fortement recommandée pour mesurer les températures des solutions, bains-marie et incubateurs. Ces températures sont essentielles pour une efficacité optimale du produit.
- 4. Les concentrations des lavages, pH et température sont importants. Une faible stringence peut résulter en une liaison non-spécifique de la sonde et une trop forte stringence peut résulter en une perte de signal.
- 5. Une dénaturation incomplète peut engendrer une perte de signal et une trop forte dénaturation une hybridation non-spécifique.

Interprétation des résultats

Dans une cellule normale, deux signaux rouges/verts (ou de fusion jaunes) sont attendus (2J). Dans une cellule comportant une translocation IGH monoalélique, un signal rouge distinct et un signal vert doivent être observés en plus d'un signal rouge/vert (ou de fusion jaune) du chromosome 14 normal (1R, 1V, 1J). Dans le cas d'une translocation biallélique, aucun signal de fusion n'est présent, deux signaux rouges et deux signaux verts distincts doivent être observés (2R, 2V).

Limitations

La diffusion et l'interprétation du test FISH doivent être effectués conformément aux normes professionnelles mises en pratique et tout en prenant en considération les autres informations cliniques et diagnostiques disponibles. Ce kit est développé comme un test complémentaire à la cytogénétique classique, pour cette raison des actions thérapeutiques ne doivent pas être lancées sur la seule base des résultats du test FISH.

Informations supplémentaires

Pour plus d'informations sur le produit, veuillez contacter l'Assistance technique
CytoCell.
T: +44 (0)1223 294048
E: techsupport@cytozell.com
W: www.cgt.com

ITALIANO

L'ibridazione fluorescente *in situ* (Fluorescence *In Situ* Hybridisation, FISH) è una tecnica che consente di rilevare le sequenze del DNA su cromosomi metafasi o in nuclei interfasi da campioni citogenetici fissati. La tecnica utilizza sonde di DNA che ibridizzano con gli interi cromosomi o con singole sequenze e fungono da potente aggiunta alla citogenetica classica. Recenti sviluppi hanno fatto sì che ora questa valida tecnica possa essere applicata anche alla valutazioni di biopsie di tumori solidi, il che può fornire importanti informazioni per la previsione della progressione del tumore stesso. Le metodologie attuali, vale a dire all'immunoistochimica o il Southern blotting possono fornire informazioni a livello di espressione genica ma, quando eseguite su sezioni di tessuto (sia al criostato che incluse in paraffina), la FISH può fornire informazioni a livello di gene, *in situ*, al sito preciso all'interno del tumore. Questo può rivelare l'eterogeneità tra cellula e cellula e consentire l'individuazione di piccoli cloni di cellule geneticamente distinte.

Specifiche della sonda

Regione IGHC, 14q32.3 rosso
Regione IGHV, 14q32.3 verde

Il mix della sonda IGH consiste di una sonda di 176kb, marcata in rosso, che copre parte della regione costante del gene, e di due sonde verdi (324kb e 289kb), che coprono parte del segmento variabile del gene.

Materiali forniti

Sonda: 50µl per flaconcino (5 test) o 100µl per flaconcino (10 test)
Quantità di sonda IGHC rosso probe: 40-50ng/test
Quantità di sonda IGHV verde probe: 60-75ng/test
Le sonde sono fornite premiscelate nella soluzione di ibridazione (formammide; destrano solfato; SSC) e pronte per l'uso.

Colorante di contrasto: 150µl per flaconcino (15 test)

Il colorante di contrasto è costituito da DAPI antifade (ES: 0,125µg/ml DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindolo)).

Avvertenze e precauzioni

- 1. Per uso diagnostico *in vitro*. Solo per uso professionale.
- 2. Quando si maneggiano le sonde e il colorante di contrasto DAPI, è necessario indossare guanti.
- 3. Le miscele delle sonde contengono formammide, una sostanza teratogena. Non respirare i fumi ed evitare il contatto con la pelle. Indossare guanti e camice da laboratorio e maneggiare sotto cappa chimica. Per lo smaltimento, sciacquare con grandi quantità di acqua.
- 4. Il DAPI è un potenziale cancerogeno. Maneggiare con cura, indossare guanti e camice da laboratorio. Per lo smaltimento, sciacquare con grandi quantità di acqua.
- 5. Lo smaltimento dei materiali pericolosi deve avvenire nel rispetto delle normative interne dell'istituzione relative allo smaltimento dei rifiuti pericolosi.

Conservazione e manipolazione

Conservare il kit in congelatore a una temperatura compresa tra -25°C e -15°C fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta. I flaconcini della sonda e del colorante di contrasto devono essere conservati al buio.

Apparecchiature necessarie ma non fornite

- 1. Piastra riscaldante (dotata di superficie d'appoggio e controllo accurato della temperatura fino a 80°C).
- 2. Micropipette a volume variabile con capacità da 1µl a 200µl e relativi puntali.
- 3. Bagno termostato con controllo accurato della temperatura a 72°C.
- 4. Provette da microcentrifuga (0,5ml).
- 5. Microscopio a fluorescenza (fare riferimento alla sezione Caratteristiche consigliate per il microscopio a fluorescenza).
- 6. Vaschette di Coplin in plastica o in vetro.
- 7. Pinzette.
- 8. Olio di immersione per obiettivi per microscopia a fluorescenza.
- 9. Centrifuga da banco.
- 10. Vetrini per microscopia.
- 11. Vetrini copri oggetto da 24x24mm.
- 12. Timer.
- 13. Incubatore a 37°C.
- 14. Colla tipo mastice.
- 15. Tissue Pretreatment Kit (LPS 100).

Caratteristiche consigliate per il microscopio a fluorescenza

Per una visualizzazione ottimale della sonda si consiglia di utilizzare una lampada al mercurio da 100 watt e obiettivi planapocromatici 63x o 100x. Il filtro triplo DAPI/FITC/Texas Red è ottimale per visualizzare contemporaneamente tutti e tre i fluorofori e il DAPI. In alternativa, utilizzare il doppio filtro passabanda FITC/Texas Red per visualizzare i fluorofori rosso e verde.

Preparazione del campione

Questo kit è stato studiato per essere utilizzato su:

- Devono essere utilizzate sezioni di tessuto incluse in paraffina fissate in formalina (Formalin Fixed Paraffin Embedded, FFPE) o microarray tissutali con spessore 4µm - 6µm.
- Campioni di sangue periferico o colture di cellule di midollo osseo fissate con fissativo di Carnoy e lasciate asciugare all'aria su vetrini da microscopio secondo le procedure citogenetiche standard.

Tutti i campioni devono essere preparati secondo le linee direttrici del laboratorio o dell'istituzione

Protocollo della FISH

(Nota: limitare l'esposizione della sonda alle luci del laboratorio durante l'intera procedura)

Procedura FFPE

Pretrattamento del campione di tessuto

Il pretrattamento del campione di tessuto deve essere eseguito secondo il protocollo in uso nel proprio laboratorio o istituzione. Per risultati ottimali utilizzare il Tissue Pretreatment Kit (LPS100).

Pre-denaturazione

- 1. Rimuovere la sonda dal congelatore e attendere che raggiunga la temperatura ambiente (TA).
- 2. Mescolare con una pipetta la soluzione della sonda in modo da renderla omogenea.
- 3. Trasferire in una provetta da microcentrifuga 10µl - 15µl (a seconda delle dimensioni del tessuto) di sonda per ciascun test da eseguire. Riporre velocemente la sonda non utilizzata nel congelatore.
- 4. Pre-riscaldare la sonda e il vetrino con il campione su una piastra riscaldante a 37°C (+/- 1°C) per 5 minuti.
- 5. Collocare 10µl - 15µl di miscela della sonda sul campione e cellulare e coprire delicatamente con un vetrino copri oggetto. Sigillare con una colla tipo mastice e attendere che la colla si asciughi completamente.

Denaturazione

- 6. Denaturare contemporaneamente il campione e la sonda riscaldando il vetrino su una piastra riscaldante a 75°C (+/- 1°C) per 5 minuti.

Ibridazione

- 7. Disporre il vetrino in una camera umida, non permeabile alla luce, a 37°C (+/- 1°C) per tutta la notte.

Lavaggi post-ibridazione

- 8. Rimuovere accuratamente il vetrino copri oggetto e qualsiasi residuo di colla.
- 9. Lavare il vetrino in 0.4xSSC (pH 7.0) a 72°C (+/- 1°C) per 2 minuti, senza agitazione.
- 10. Scolare il vetrino e lavare in 2xSSC, Tween-20 0,05% (pH 7.0) a TA per 30 secondi senza agitazione.
- 11. Scolare il vetrino e applicare 10µl - 15µl di DAPI antifade su ciascun campione.
- 12. Coprire con un vetrino copri oggetto, rimuovere eventuali bolle e attendere lo sviluppo del colore per 10 minuti lasciando il vetrino al buio.
- 13. Esaminare con un microscopio a fluorescenza.

Commenti:
L'efficacia dell'ibridazione e la morfologia tissutale sono solitamente correlate in modo negativo. Procedure di pretrattamento aggressivo che aumentano l'efficacia dell'ibridazione (ades., tempi prolungati di digestione enzimatica) tendono a distruggere la struttura cellulare e la morfologia tissutale. Tuttavia, un pretrattamento blando suscettibile di salvare le struttureritissutali potrebbe non essere sufficiente per garantire la penetrazione della sonda e per garantire risultati positivi di FISH.
La durata ottimale del pretrattamento al calore e della digestione enzimatica dipenderà dall'età del blocco, dalla composizione tissutale e dalla qualità del fissaggio tissutale. La digestione enzimatica deve essere ridotta al minimo per biopsie percutanee e per qualsiasi sezione suscettibile di contenere un numero ridotto di cellule tumorali o caratterizzata da vaste aree necrotizzate. I campioni devono essere manipolati con particolare attenzione al fine di evitare un'eccessiva digestione.

Sangue periferico o coltura di midollo osseo Procedura
Preparazione del vetrino

- 1. Caricare il campione cellulare su un vetrino da microscopia. Lasciare asciugare i vetrino.
- 2. Immergere i vetrini in 2xSSC per 2 minuti a temperatura ambiente (TA) senza agitazione.
- 3. Disidratare in una serie di diluizioni di etanolo (70%, 85% e 100%), ognuna per 2 minuti a TA.
- 4. Lasciare asciugare il vetrino.

Pre-denaturazione

- 5. Rimuovere la sonda dal congelatore a -20°C e lasciarla riscaldare a TA.
- 6. Accertarsi che la soluzione della sonda sia uniforme pipettando ripetutamente con delicatezza.
- 7. Pipettare 10µl di sonda per test ed inserirli in una provetta da microcentrifuga. Riporre velocemente la sonda non utilizzata nel congelatore.
- 8. Pre-riscaldare la sonda, il vetrino ed il coprioggetto su una piastra riscaldante a 37°C (+/- 1°C) per 5 minuti.
- 9. Caricare 10µl di miscela della sonda sul campione cellulare e coprire delicatamente con il coprioggetto. Sigillare con soluzione collante gommosa e far asciugare completamente.

Denaturazione

- 10. Lasciare simultaneamente il campione e la sonda riscaldando il vetrino su una piastra riscaldante a 75°C (+/- 1°C) per 2 minuti.

Ibridazione

- 11. Disporre il vetrino in una camera umida, non permeabile alla luce, a 37°C (+/- 1°C) per tutta la notte.

Lavaggi post-ibridazione

- 12. Rimuovere accuratamente il vetrino coprioggetto e tutte le tracce di colla.
- 13. Lavare il vetrino in 0.4xSSC (pH 7.0) a 72°C (+/- 1°C) per 2 minuti, senza agitazione.
- 14. Scolare il vetrino e lavare in 2xSSC, Tween-20 0,05% (pH 7.0) a TA per 30 secondi senza agitazione.
- 15. Scolare i vetrini e applicare 10µl di DAPI antifade su ciascun campione.
- 16. Coprire con un vetrino coprioggetto, rimuovere eventuali bolle e attendere 10 minuti lasciando il vetrino al buio.
- 17. Analizzare con il microscopio a fluorescenza.

Stabilità deivetrini ultimati

I vetrini sottoposti a FISH restano analizzabili per circa 1 mese se conservati al buio se conservata al buio sotto i 4°C

Raccomandazioni per la procedura

- 1. L'utilizzo del forno o l'invecchiamento di vetrini contenenti campioni di sangue periferico non sono consigliati perché potrebbero ridurre la fluorescenza del segnale.
- 2. Le condizioni di ibridazione potrebbero essere influenzate negativamente dall'impiego di reagenti diversi da quelli forniti o consigliati da CytoCell Ltd.
- 3. È fortemente consigliato l'uso di un termometro calibrato per la misurazione delle temperature delle soluzioni, dei bagni termostati e degli incubatori in quanto queste temperature sono di fondamentale importanza per il funzionamento ottimale del prodotto.
- 4. Le concentrazioni, il pH e la temperatura dei lavaggi sono di fondamentale importanza in quanto condizioni di stringenza blande possono favorire un legame aspecifico della sonda, mentre condizioni di stringenza troppo elevate possono determinare l'assenza di segnale.
- 5. Una denaturazione incompleta può determinare l'assenza di segnale, mentre una denaturazione eccessiva può produrre un legame aspecifico.

Interpretazione dei risultati

In una cellula normale ci si aspetta due segnali rosso/verde (o giallo fuso) (2Y). In una cellula con una traslocazione IGH monoallelica ci dovrebbero essere un segnale distinto rosso e uno verde oltre a un segnale rosso/verde (o giallo fuso) del cromosoma normale 14 (1R, 1G, 1Y). Nel caso di una traslocazione bialelelica non sarà presente alcun segnale fuso; si dovrebbero vedere due segnali distinti rossi e due verdi (2R, 2G).

Limitazioni

La refertazione e l'interpretazione dei risultati della FISH devono essere coerenti con gli standard professionali della pratica medica e dovrebbe prendere in considerazione altre informazioni cliniche e diagnostiche.
Questo kit è concepito in aggiunta alla tecniche citogenetica classica e azione terapeutica non deve essere messa in atto esclusivamente sulla base del risultato di FISH.

Informazioni aggiuntive

Per informazioni aggiuntive sul prodotto con tattare il Reparto di Assistenza Tecnica CytoCell.
T: +44 (0)1223 294048
E: techsupport@cytozell.com
W: www.ogt.com

DEUTSCH

Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) ist eine Technik, mit der der Nachweis von DNA-Sequenzen auf Metaphasechromosomen oder in Interphasezellkernen fixierter zytogenetischer Proben erbracht werden kann. Die Technik nutzt DNA-Sonden, die auf ganze Chromosomen oder einzelne eindeutige Sequenzen hybridisieren, und dient als leistungsfähige Ergänzung zur klassischen Zytogenetik. Seit Kurzem ist es möglich, diese wertvolle Technik nun auch für die Auswertung von Biopsien solider Tumore anzuwenden, was wichtige Informationen für die Vorhersage der Tumorprogression liefert. Aktuelle Methoden, wie z. B. Immunhistochemie oder Southern-Blotting, können Informationen auf Genexpressionsniveau bereitstellen. Mit der FISH-Technik hingegen erhält man, sofern diese entweder am Kryostat oder an in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitten durchgeführt wird, Informationen auf Genniveau an genau der untersuchten Stelle innerhalb des Tumors (*in situ*). Hierdurch können Heterogenitäten zwischen den einzelnen Zellen sowie kleine Klone genetisch verschiedenartiger Zellen aufgezeigt werden.

Sondenspezifikation

IGHC 14q32.3 Region, rot
IGHV 14q32.3 Region, grün

Der IGH-Sondenmix besteht aus einer rot markierten 176kb-Sonde, die einen Teil der konstanten Genregion abdeckt, und zwei grünen Sonden (324kb und 289kb), die einen Teil der variablen Region des Gens abdecken.

Bestandteile des Kits

Sonde: 50µl pro Röhrchen (5 Tests) oder 100µl pro Röhrchen (10 Tests)
Menge an IGH rot Sonde: 40-50ng/Test
Menge an IGHV grün Sonde: 60-75ng/Test
Die Sonden werden vorgemischt und gebrauchsfertig in Hybridisierungslösung geliefert (Formamid, Dextransulfat, SSC).

Farbstoff für die Gegenfärbung: 150µl pro Röhrchen (15 Tests)

Der Farbstoff für die Gegenfärbung ist DAPI Antifade (ES: 0,125µg/ml DAPI (4,6-Diamidino-2-Phenylindol)).

Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen

- 1. Zur Verwendung in der *in vitro* Diagnostik. Durchführung ausschließlich durch qualifiziertes Laborpersonal.
- 2. Beim Umgang mit DNA-Sonden und dem DAPI Farbstoff Handschuhe tragen.
- 3. Sondenmischungen enthalten Formamid, das Teratogen ist. Keine Dämpfe einatmen und Hautkontakt vermeiden. Handschuhe und Labormantel tragen und unter einer Abzugshaube arbeiten. Bei der Entsorgung mit viel Wasser nachspülen.
- 4. DAPI ist ein potenzielles Karzinogen. Vorsichtig damit umgehen, Handschuhe und Labormantel tragen. Bei der Entsorgung mit viel Wasser nachspülen.
- 5. Alle Gefahrstoffe sollten gemäß den Ihren hausinternen Richtlinien zur Gefahrstoffentsorgung entsorgt werden.

Lagerung und Behandlung

Das Kit sollte bis zum Verfallsdatum, welches auf dem Etikett angegeben ist, in einem Gefrierschrank bei einer Temperatur zwischen -25 C und -15 C gelagert werden. Die Röhrchen mit den Sonden und der Gegenfärbung müssen im Dunkeln aufbewahrt werden.

Benötigte, aber nicht mitgelieferte Laborgeräte

- 1. Heizplatte (mit stabiler Platte und genauer Temperaturregelung bis 80°C).
- 2. Mikropipetten mit unterschiedlichen Volumen von 1µl - 200µl.
- 3. Wasserbad mit genauer Temperaturregelung bei 72°C.
- 4. Mikrozentrifugenröhrchen (0,5ml).
- 5. Fluoreszenzmikroskop (siehe auch „Empfehlungen zum Fluoreszenzmikroskop“).
- 6. Coplin-Färbetrog aus Kunststoff oder Glas.
- 7. Pinzette.
- 8. Für Fluoreszenzobjektive geeignetes Immersionsöl.
- 9. Tischzentrifuge.
- 10. Objektträger für das Mikroskop.
- 11. 24x24mm Deckgläser.
- 12. Zeituhr.
- 13. 37°C-Inkubator.
- 14. Gummilösung zum Versiegeln der Deckglasränder.
- 15. Tissue Pretreatment Kit (LPS 100).

Empfehlungen zum Fluoreszenzmikroskop

Für die optimale Visualisierung der Probe empfehlen wir die Verwendung plan-apochromatischer Objektive mit 63-facher oder 100-facher Vergrößerung sowie einer 100-Watt Quecksilberlampe. Das Dreifach-Bandpassfilter DAPI/FITC/Texasrot ist für die simultane Beobachtung aller drei Fluorophore und DAPI optimal geeignet. Alternativ dazu kann zur Beobachtung des roten und des grünen Fluorophors ein Zweifach-Bandpassfilter FITC/Texas Red verwendet werden.

Probenvorbereitung

Dieses Kit ist speziell der Verwendung bei:

- formalinfixierten, paraffineingebetteten Gewebeschnitten (FFPE-Gewebeschnitte) oder Gewebe-Microarrays (Tissue-Microarray, TMA) mit einer Dicke von 4 µm – 6 µm.
- in Carnoy's Fixativ fixierten, auf einem Mikroskop-Objektträger gemäß zytogenetischer Standardmethoden luftgetrockneten, peripheren Blutproben oder kultivierten Knochenmarkzellen.

Alle Proben sind nach den Richtlinien des Labors oder der Einrichtung zu präparieren.

FISH-Protokoll

(Hinweis: Bitte versuchen Sie nach Möglichkeit, die Sonde vor Licht zu schützen)

FFPE-Verfahren

Vorbehandlung von Gewebeproben

Gewebeproben werden gemäß den Richtlinien des Labors oder der Einrichtung vorbehandelt. Optimale Ergebnisse werden mit dem Tissue Pretreatment Kit (LPS 100) erzielt.

Prä-denaturierung

- 1. Nehmen Sie die Sonde aus dem Gefrierschrank und lassen Sie diese sich auf Zimmertemperatur aufwärmen.
- 2. Mischen der Sondenlösung durch mehrmaliges Aufpipettieren
- 3. Pro Test 10µl - 15µl (je nach Größe des Gewebes) Sonde entnehmen und in ein Mikrozentrifugenröhrchen geben. Stellen Sie die restliche Probe schnell wieder zurück in den Gefrierschrank.
- 4. Sonde und Probenobjektträger 5 Minuten auf einer Heizplatte bei 37°C (+/- 1°C) vorwärmen.
- 5. 10µl - 15µl Sondenmischung auf die Zellprobe auftropfen und Deckglas sorgfältig auflegen. Mit Gummikleber-Lösung versiegeln und vollständig trocknen lassen.

Denaturierung

- 6. Denaturieren sie Probe und Sonde gleichzeitig durch 5 minütiges Erwärmen des Objektträgers auf einer Heizplatte bei 75°C (+/- 1°C).

Hybridisierung

- 7. Den Objektträger über Nacht 37°C (+/- 1°C) in eine feuchte, lichtdichte Kammer geben.

Waschen nach der Hybridisierung

- 8. Deckglas und alle Kleberspuren vorsichtig entfernen.
- 9. Objektträger 2 Minuten lang bei 72°C (+/- 1°C) in 0,4xSSC (pH 7,0) waschen.
- 10. Objektträger abtropfen lassen und 30 Sekunden bei Zimmertemperatur in 2xSSC, 0,05% Tween-20 (pH 7,0), waschen.
- 11. Objektträger abtropfen lassen und 10µl - 15µl DAPI Antifade zu jeder Probe geben.
- 12. Mit einem Deckglas abdecken, die Luftblasen entfernen und 10 Minuten unter Lichtschutz entwickeln lassen.
- 13. Unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachten.

Bemerkungen:

Wirkungsgrad der Hybridisierung und Gewebemorphologie stehen gewöhnlich in negativem Zusammenhang. Aggressive Vorbehandlungsmethoden, die zu einem erhöhten Wirkungsgrad der Hybridisierung beitragen (z.B. eine verlängerte Enzymverdauungszeit), zerstören oft die Zellstrukturen und die Gewebemorphologie. Dennoch sind milde Vorbehandlungsmethoden, durch die die Gewebestrukturen erhalten bleiben, oft nicht ausreichend für das Eindringen der Sonde und erfolgreiche FISH Ergebnisse.
Die optimale Länge der Wärmeverbehandlung und Enzymverdauung hängt vom Alter des Blocks, der Gewebezusammensetzung und der Qualität der Gewebefixierung ab. Die Enzymverdauung sollte für Kerngewebe sowie jegliche Schnitte, die nur wenige Tumorzellen oder große Nekrosebereiche enthalten, verkürzt werden. Solche Proben müssen besonders sorgfältig behandelt werden, um eine übermäßige Zersetzung zu vermeiden.

Verfahren für periphere Blutproben oder kultivierte Knochenmarkzellen
Vorbereitung des Objektträgers

1. Zellprobe auf Objektträger auftropfen und trocknen lassen.
2. Den Objektträger in 2xSSC für 2 Minuten bei RT eintauchen (schütteln nicht notwendig).
3. Dehydration mittels Alkoholreihe (70%, 85% und 100%), jeweils für 2 Minuten bei RT.
4. Trocknen lassen.

Prä-denaturierung

5. Nehmen Sie die Sonde aus dem Gefrierschrank und lassen Sie diese sich auf Zimmertemperatur aufwärmen.
6. Mischen der Sondenlösung durch mehrmaliges Aufpipettieren
7. Pro Test 10µl Sonde entnehmen und in ein Mikrozentrifugenröhrchen geben. Stellen Sie die restliche Probe schnell wieder zurück in den Gefrierschrank.
8. Sonde und Probenobjektträger 5 Minuten auf einer Heizplatte bei 37°C (+/- 1°C) vorwärmen.
9. 10µl Sondenmischung auf die Zellprobe auftropfen und Deckglas sorgfältig auflegen. Mit Gummikleber-Lösung versiegeln und vollständig trocknen lassen.

Denaturierung

10. Denaturieren sie Probe und Sonde gleichzeitig durch 2 minütiges Erwärmen des Objektträgers auf einer Heizplatte bei 75°C (+/- 1°C).

Hybridisierung

11. Den Objektträger über Nacht bei 37°C (+/- 1°C) in eine feuchte, lichtdichte Kammer geben.

Waschen nach der Hybridisierung

12. Deckgläschen und alle Kleberspuren vorsichtig entfernen.
13. Objektträger 2 Minuten in 0,4 x SSC (pH 7,0) bei 72°C (+/- 1°C) waschen.
14. Objektträger abtropfen lassen und 30 Sekunden in 2 x SSC, 0,05% Tween-20 bei RT, (pH 7,0), waschen.
15. Den Objektträger abtropfen lassen und 10µl des DAPI Antifade zu jeder Probe geben.
16. Mit einem Deckglas abdecken, die Luftblasen entfernen and 10 Minuten unter Lichtschutz entwickeln lassen.
17. Unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachten.

Stabilität der fertigen Objektträger

Objektträger mit FISH-Proben können bis zu einem Monat lang analysiert werden, wenn sie im Dunkeln bei oder unter 4°C aufbewahrt werden.

Empfehlungen zur Durchführung

1. Erhitzen oder Altern von Objektträgern mit peripheren Blutproben oder Knochenmark wird nicht empfohlen, da dies zu einer Verminderung der Signalfluoreszenz kann.
2. Durch die Verwendung von Reagenzien, die nicht von Cytocell Ltd. empfohlen sind, können die Hybridisierungsbedingungen negativ beeinflusst werden.
3. Es wird dringend empfohlen, zur Temperaturmessung von Lösungen, Wasserbädern und Inkubatoren ein geeichtes Thermometer zu verwenden, da diese Temperaturen für die optimale Leistung des Produkts ausschlaggebend sind.
4. Die Konzentration der Waschlösungen, pH und Temperatur sind wichtig, da niedrig stringente Bedingungen zu nicht spezifischer Bindung der Sonde führen kann und zu hohe Stringenz zum Verlust des Signals.
5. Unvollständige Denaturierung kann zu einem Verlust des Signals führen und übermäßige Denaturierung kann zu nicht spezifischer Bindung der Sonde führen.

Zu erwartende Ergebnisse

In einer normalen Zelle sind zwei rot/grüne (oder fusionierte gelbe) Signale zu erwarten (2Y). In einer Zelle mit monoallelischer IGH-Translokation sollte ein deutliches rotes und ein grünes Signal, zusätzlich zu einem rot/grünen (oder fusioniertem gelben) Signal des normalen Chromosoms 14 vorhanden sein (1R, 1G, 1Y). Im Falle einer biallelischen Translokation wären keine fusionierten Signale vorhanden; es sollten zwei verschiedene rote und zwei grüne Signale zu beobachten sein (2R, 2G).

Einschränkungen

Protokollierung und Interpretation der FISH-Tests müssen den fachlichen Standards für die Praxis entsprechen und unter Berücksichtigung anderer klinischer und diagnostischer Informationen erfolgen.

Der Test ist als Ergänzung zur klassischen Zytogenetik zu verstehen. Daher sollten therapeutische Maßnahmen nicht allein auf Grundlage der FISH-Ergebnisse veranlasst.

Weitere Informationen:

Weitere Produktinformationen erhalten Sie vom Technischen Kundendienst von Cyto Cell.

T: +44 (0)1223 294048

E: techsupport@cytozell.com

W: www.oqt.com

ESPAÑOL

La hibridación fluorescente *in situ* (FISH) es una técnica que permite detectar secuencias de ADN en cromosomas metafásicos o núcleos interfásicos de muestras citogenéticas fijas. La técnica utiliza sondas de ADN que hibridan con cromosomas enteros o secuencias únicas individuales, y constituye una potente herramienta auxiliar para la citogenética clásica. En recientes desarrollos se ha señalado que esta valiosa técnica puede aplicarse también ahora para evaluar las biopsias de tumores sólidos, que pueden aportar información importante para predecir la progresión tumoral. Las metodologías actuales, como la inmunohistoquímica o la técnica de Southern, pueden proporcionar datos a nivel de expresión génica, aunque, si se realizan cortes de tejido (criostato o inclusión en parafina), con la FISH se puede obtener información a nivel génico, *in situ*, en el punto exacto en el interior del tumor. Esto puede poner de manifiesto la heterogeneidad intercelular y permitir la detección de pequeños clones de células genéticamente distintas.

Información sobre las sondas

Se han identificado reordenamientos que afectan al gen IGH en numerosos tipos de tumores. Hay una serie de translocaciones estereotipadas implicadas en cada una de las enfermedades y regularmente se describen más. La t(8;14)(q24;q32), que implica a IGH y al gen MYC, es la reordenación más común en el linfoma de Burkitt y se produce en alrededor del 85% de los casos¹. También se han observado reordenamientos IGH en el 50% de los linfomas no Hodgkin de células B (LNH) y se han correlacionado con subgrupos clínicamente relevantes². Un estudio demostró que la t(14;18)(q32;q21) (IGH-BCL2) se encontraba en el 88,1% de los linfomas foliculares y la t(11;14)(q13;q32) (IGH-CCND1) en el 85,7% de los linfomas de células del manto². También se identificaron reordenamientos IGH en el 52,5% de los linfomas difusos de células B grandes (DLBCL)¹. IGH se reordena comúnmente en los linfomas y tiene muchos compañeros de translocación diferentes. Por lo tanto, hemos diseñado un conjunto de sondas divididas para IGH, que permite la detección de reordenamientos del gen IGH, independientemente del gen asociado o del cromosoma implicado.

Especificaciones de las sondas

Región IGHG 14q32.3 en rojo

Región IGHV 14q32.3 en verde

El conjunto de sondas IgH consta de una sonda de 176 kb, marcada en rojo, que cubre parte de la región constante del gen, y dos sondas verdes (de 324 kb y 289 kb) que cubren parte del segmento variable del gen.

Material incluido

Sonda: 50µl por vial (5 análisis) o 100µl por vial (10 análisis) Cantidad

de rojo IGHG sonda: 40-50ng/análisis

Cantidad de verde IGHV sonda: 60-75ng/análisis

Las sondas se presentan premezcladas en la solución de hibridación (formamida; sulfato de dextrano; SSC) y listas para usar.

Contratinción: 150µl por vial (15 análisis)

La tinción se realiza con DAPI Antifade (ES: 0,125µg/ml de DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol)).

Advertencias y precauciones

1. Para diagnóstico in vitro. Sólo para uso profesional.
2. Utilizar guantes al manipular las sondas de ADN y la contratinción DAPI.
3. La sonda contiene formamida, que es teratogénica; no respire los vapores y evite el contacto con la piel. Utilizar guantes, bata de laboratorio y manipular utilizando la campana de humos. Para eliminarla, aclarar con abundante agua.
4. La contratinción DAPI puede producir cáncer. Manipular con cuidado; utilizar guantes y bata de laboratorio. Para eliminarla, aclarar con abundante agua.
5. Las sustancias peligrosas deben eliminarse de acuerdo con las instrucciones de su institución en relación con la eliminación de sustancias peligrosas.

Almacenamiento y manipulación

El kit debe almacenarse en un congelador a una temperatura comprendida entre - 25°C y -15°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del kit. Los viales de las sondas y de la contratinción deben almacenarse en un lugar oscuro.

Material necesario pero no incluido

1. Placa calefactora (con una placa estable y un control de temperatura preciso hasta 80°C).
2. Micropipetas y puntas de volumen variable (de 1µl a 200µl).
3. Baño maría con control preciso de temperatura a 72°C.
4. Tubos de microcentrifugación (0,5ml).
5. Microscopio de fluorescencia (véase la sección Recomendaciones sobre el microscopio de fluorescencia).
6. Cubetas Coplin de cristal y de plástico.
7. Pinzas.
8. Aceite de inmersión para objetivos de microscopio de fluorescencia.
9. Centrífuga sobremesa.
10. Portaobjetos para microscopio.
11. Cubreobjetos de 24x24mm.
12. Temporizador.
13. Incubadora a 37°C.
14. Pegamento de solución de caucho.
15. Tissue Pretreatment Kit (LPS 100).

Recomendaciones sobre el microscopio de fluorescencia

Para una visualización óptima de la sonda, se recomienda utilizar una lámpara de mercurio de 100 vatios y objetivos Plan-Apochromat de 63 o 100 aumentos. El triple filtro pasabanda DAPI/FITC/Texas Red es óptimo para ver simultáneamente los tres fluorocromos y DAPI. Para los fluorocromos rojo y verde debe emplearse el doble filtro pasabanda FITC/Texas Red.

Preparación de las muestras

Este Kit se ha diseñado para utilizar en:

- Cortes histológicos fijados e incluidos en parafina (FFPE) o micromatrices histológicas (TMA), se deberán utilizar cortes de 4 µm – 6 µm de grosor.
- Muestras de sangre periférica o células de médula ósea cultivadas tratadas con fijador de Carnoy y secadas al aire en portaobjetos según los procedimientos citogenéticos habituales.

Todas las muestras deben prepararse según las instrucciones del laboratorio o la institución.

Protocolo para la FISH

(Observación: asegúrese de limitar la exposición de la sonda a las luces del laboratorio en todo momento)

Procedimiento para los FFPE

Pretratamiento de las muestras de tejido

El pretratamiento de las muestras de tejido debe realizarse de acuerdo con los protocolos del laboratorio o institución. Para un mejor resultado utilice el Tissue Pretreatment Kit (LPS 100).

Antes de la desnaturalización

1. Saque la sonda del congelador a -20°C y deje que se caliente a temperatura ambiente (TA).
2. Asegúrese de que la solución de la sonda queda homogéneamente mezclada con una pipeta.
3. Extraiga 10µl - 15µl (dependiendo del tamaño de la muestra) de la sonda por análisis e introdúzcalos en un tubo de microcentrifugación. Vuelva a colocar la solución que quede en la sonda al congelador.
4. Precaliente la sonda y el portaobjetos de la muestra en una placa calefactora a 37°C (+/- 1°C) durante 5 minutos.
5. Vierta 10µl - 15µl de la solución de la sonda sobre la muestra de células y coloque cuidadosamente un cubreobjetos. Selle con pegamento de solución de caucho y deje que el pegamento se seque completamente.

Desnaturalización

6. Desnaturalice la muestra y la sonda simultáneamente calentando el porta sobre la placa calefactora a 75°C (+/- 1°C) durante 5 minutos.

Hibridación

7. Introduzca el porta en un recipiente húmedo y opaco a 37°C (+/- 1°C) y déjelo toda la noche.

Lavados posthibridación

8. Quite el cubreobjetos y los restos del pegamento cuidadosamente.
9. Sumerja el portaobjetos en 0,4xSSC (pH 7,0) a 72°C (+/- 1°C) durante 2 minutos sin agitar.
10. Deje escurrir el portaobjetos y sumérjalo en 2xSSC, 0,05% de Tween-20 (pH 7,0) a TA durante 30 segundos sin agitar.
11. Escorra el portaobjetos y añada 10µl - 15µl de DAPI antifade sobre cada muestra.
12. Coloque un cubreobjetos, extraiga las burbujas y deje revelar el color en un lugar oscuro durante 10 minutos.
13. Visualice con un microscopio de fluorescencia.

Comentarios:

La eficiencia de la hibridación y la morfología tisular son inversamente proporcionales. Los procedimientos de pretratamiento agresivos que mejoran la eficiencia de la hibridación (por ejemplo, un tiempo de digestión enzimática más prolongado) tienden a destruir la estructura celular y la morfología tisular. Sin embargo, un pretratamiento suave que resguarde las estructuras tisulares puede no bastar para que la sonda penetre bien y los resultados de FISH sean adecuados.

La duración óptima del pretratamiento térmico y de la digestión enzimática dependerá de la edad del bloque, la composición del tejido y la calidad de la fijación tisular. La digestión enzimática debe reducirse en caso de biopsias de punción con aguja gruesa y en cualquier sección que

contenga pocas células tumorales o tengan zonas vastas de necrosis. Estas muestras deben manipularse con especial atención para evitar una digestión excesiva.

Procedimiento para la sangre periférica o la médula ósea cultivada
Preparación del portaobjetos

- 1. Extender la muestra en un portaobjetos. Dejarlo secar.
- 2. Sumerja el portaobjetos en 2xSSC durante 2 minutos a temperatura ambiente sin agitación.
- 3. Deshidrate en una serie de etanol (70%, 85% y 100%), 2 minutos en cada una a TA.
- 4. Dejarlo secar.

Antes de la desnaturalización

- 5. Saque la sonda del congelador a -20°C y deje que se caliente a TA.
- 6. Asegúrese de que la solución de la sonda es uniforme mezclando varias veces con la pipeta.
- 7. Extraiga 10µl de la sonda por prueba, poner en un tubo de microcentrifuga. Vuelva a colocar la solución que quede en la sonda al congelador.
- 8. Precaliente el portaobjetos y la muestra en una placa caliente a 37°C (+/- 1°C) durante 5 minutos.
- 9. Ponga 10µl de sonda sobre el portaobjetos y aplique cuidadosamente el cubreobjetos. Selle con solución de goma y deje secar completamente.

Desnaturalización

- 10. Desnaturalice la muestra y la sonda simultáneamente calentando el porta en la placa caliente a 75°C (+/- 1°C) durante 2 minutos.

Hibridación

- 11. Ponga el porta en un contenedor húmedo a prueba de luz a 37°C (+/- 1°C) toda la noche.

Lavados post-hibridación

- 12. Quite el cubreobjetos y los restos de goma cuidadosamente.
- 13. Lave el portaobjetos en 0.4xSSC (pH 7.0) a 72°C (+/- 1°C) durante 2 minutos.
- 14. Seque el portaobjetos y lávelo en 2 x SSC, 0.05% Tween-20 (pH 7.0) a TA durante 30 segundos sin agitación.
- 15. Escurra el portaobjetos y añada 10µl de DAPI antifade sobre cada muestra.
- 16. Aplique un cubreobjetos, elimine burbujas y deje reposar en oscuridad durante 10 minutos.
- 17. Obsérvelo con el microscopio de fluorescencia.

Estabilidad de los portaobjetos terminados

Los portaobjetos sometidos a la técnica FISH pueden analizarse durante 1 mes si se conservan en un lugar oscuro debajo de 4°C.

Recomendaciones para los procedimientos

- 1. No se recomienda calentar ni madurar los portas con muestras de sangre periférica ni de médula ósea ya que puede reducir la fluorescencia de la señal.
- 2. Las condiciones de hibridación pueden verse afectadas negativamente si se emplean reactivos distintos de los suministrados o recomendados por CytoCell Ltd.
- 3. Se recomienda encarecidamente el uso de un termómetro de precisión para medir las temperaturas de soluciones, baños maría e incubadores ya que estas temperaturas son cruciales para un resultado óptimo del producto.
- 4. Las concentraciones de los lavados, el pH y las temperaturas son importantes ya que unas condiciones poco rigurosas pueden provocar una hibridación inespecífica de la sonda y unas condiciones demasiado rigurosas pueden derivar en una falta de señal.
- 5. Una desnaturalización incompleta puede provocar falta de señal y una desnaturalización excesiva también puede originar una hibridación inespecífica.

Interpretación de los resultados

En una célula normal es de esperar que aparezcan dos señales rojas/verdes (o amarillas fusionadas) (2A). En una célula con translocación IGH monoalélica deben existir una señal roja y una verde separadas, además de una señal roja/verde (o amarilla fusionada) del cromosoma normal 14 (1R, 1V, 1A). En el caso de una translocación bialélica, no debe existir ninguna señal fusionada y deben observarse dos señales rojas y dos verdes (2R, 2V).

Limitaciones

La comunicación y la interpretación de FISH debe ser conforme a los estándares de prácticas profesionales, y debe tener en consideración otra información clínica y de diagnóstico. Esta prueba está diseñada como un complemento de la citogenética clásica y no deben tomarse medidas terapéuticas basándose únicamente en el resultado de FISH.

Información adicional

Si desea obtener información adicional sobre el producto, póngase en contacto con el Departamento de soporte técnico de CytoCell.
T: +44 (0)1223 294048
E: techsupport@cytoCell.com
W: www.ogt.com

References/Bibliographie/Bibliographia/Literatur/Bibliografia

- 1. Hoffman, Ronald (2009). Hematology : basic principles and practice (5th ed. ed.). Philadelphia, PA: Churchill Livingstone/Elsevier. pp. 1304–1305
- 2. Bernicot *et al.*, Cytogenet Genome Res. 2007;118(2-4):345-52

REF	EN: Catalogue number DE: Bestellnummer FR: Référence du catalogue IT: Numero di catalogo ES: Número de catálogo
IVD	EN: <i>In vitro</i> diagnostic device DE: <i>In-vitro</i> -Diagnostikum FR: Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i> IT: Dispositivo medico-diagnostico <i>in vitro</i> ES: Producto sanitario para diagnóstico <i>in vitro</i>
LOT	EN: Batch code DE: Ch.-B. FR: Code du lot IT: Codice lotto ES: Código de lote
	EN: Consult instructions for use DE: Gebrauchsanweisung beachten FR: Consulter la notice d'utilisation IT: Consultare le istruzioni per l'uso ES: Consulte las instrucciones de uso
	EN: Manufacturer DE: Hersteller FR: Fabricant IT: Produttore ES: Fabricante
	EN: Use by DE: Haltbarkeitsdatum FR: A utiliser avant IT: Scadenza ES: Fecha de caducidad
	EN: Temperature limitation DE: Temperaturbegrenzung FR: Limites de température IT: Limiti di temperatura ES: Limitación de temperatura
	EN: Sufficient for <n> tests DE: Ausreichend für <n> Tests FR: Suffisant pour <n> tests IT: Sufficiente per <n> test ES: Válido para <n> análisis
CONT	EN: Contents DE: Inhalt FR: Contenu IT: Contenuto ES: Contenido

Patents and Trademarks

CytoCell is a registered trademarks of CytoCell Ltd.
This product contains technology licensed from Life Technologies Corporation and is available for human diagnostics or life science research use only.



CytoCell Ltd.
Oxford Gene Technology,
418 Cambridge Science Park,
Milton Road,
Cambridge, CB4 0PZ, UK
T: +44(0)1223 294048
F: +44(0)1223 294986
E: probes@cytoCell.com
W: www.ogt.com