



A Sysmex Group Company



REF: RU-LPS 003-S/RU-LPS 003

EGFR Amplification Probe

Research Use Only

Further information available at www.ogt.com

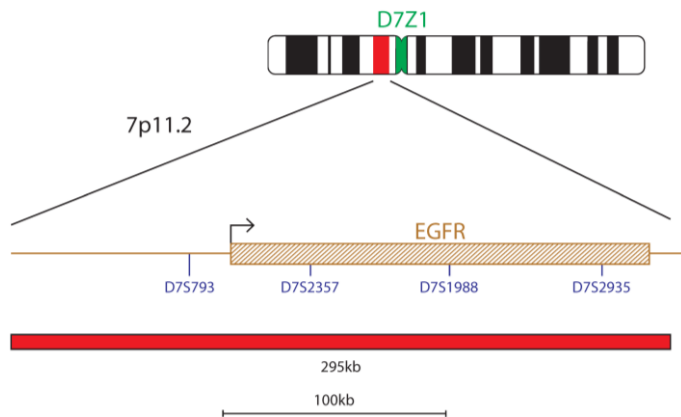
Fluorescence *In Situ* Hybridisation (FISH) is a technique that allows the visualisation of DNA sequences upon chromosomes. The technique uses DNA probes that hybridise to entire chromosomes or single unique sequences, and serves as a powerful adjunct to classic cytogenetics. Recent developments have meant that this valuable technique can now be applied as an essential tool in prenatal, haematological and pathological chromosomal analysis. Target DNA, after fixation and denaturation, is available for annealing to a similarly denatured, fluorescently labelled DNA probe, which has a complementary sequence. Following hybridisation, unbound and non-specifically bound DNA probe is removed and the DNA is counterstained for visualisation. Fluorescence microscopy then allows the visualisation of the hybridised probe on the target material.

Intended Use

This product is intended to be used for research use only and is not for use in diagnostic procedures.

Probe Specification

EGFR, 7p11.2, Red
D7Z1, 7p11.1-q11.1, Green



The EGFR Amplification probe consists of a red 295kb probe spanning the gene region 7p11.2. The centromeric probe in green acts as a control for chromosome 7.

Materials Provided

Probe: 50µl per vial or 100µl per vial

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

Counterstain: 150µl per vial

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

Warnings and Precautions

- For research use only. Not for use in diagnostic procedures. For professional use only.
- Wear gloves when handling DNA probes and DAPI counterstain.
- 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.
- DAPI is a potential carcinogen. Handle with care; wear gloves and a lab coat. Upon disposal, flush with a large volume of water.
- 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.

Protocol Recommendations

For use on FFPE or TMA.

Equipment Necessary but not Supplied

- Hotplate (with a solid plate and accurate temperature control up to 80°C).
- Variable volume micropipettes and tips range 1µl - 200µl.
- Water bath with accurate temperature control at 72°C.
- Microcentrifuge tubes (0.5ml).
- Fluorescence microscope (Please see Fluorescence Microscope Recommendation section).
- Plastic or glass coplin jars.
- Forceps.
- Fluorescence grade microscope lens immersion oil.
- Bench-top centrifuge.
- Microscope slides.
- 24x24mm coverslips.
- Timer.
- 37°C incubator.
- Rubber solution glue.
- 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

Samples should be prepared according to the laboratory or institution guidelines. For FISH, 4µm - 6µm thick FFPE tissue sections should be used.

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).

FISH Protocol

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

Pre-Denaturation

- Remove the probe from the freezer and allow it to warm to room temperature (RT).
- Ensure that the probe solution is uniformly mixed with a pipette.
- 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.
- Place the probe and the sample slide to prewarm on a 37°C (+/- 1°C) hotplate for 5 minutes.
- 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

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

Hybridisation

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

Post-Hybridisation Washes

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

- Hybridisation conditions may be adversely affected by the use of reagents other than those provided or recommended by CytoCell Ltd.

- 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.
- 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.
- 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 and two green signals are observed while in cells with amplification of the EGFR locus, multiple red signals will be observed.

Additional Information

For additional product information please contact the CytoCell Technical Support Department.

T: +44 (0)1223 294048
E: techsupport@cytoCELL.com
W: www.oGT.com

FRANÇAIS

L'hybridation *in situ* par fluorescence (FISH) est une technique qui permet de détecter des séquences ADN sur les chromosomes en métaphase ou sur les noyaux interphasiques d'échantillons cytogénétiques fixés cultivés ou non cultivés. La technique utilise des sondes ADN qui s'hybrident aux chromosomes entiers ou à des séquences spécifiques, et sert de test complémentaire à la cytogénétique classique. De récents développements ont démontré que cette technique informative peut maintenant être utilisée comme un outil essentiel lors de l'analyse des chromosomes en prénatal, hématologie et pathologie. L'ADN cible, après fixation est traité par la chaleur et à la formamide pour dénaturer la double hélice, la rendant simple hélice. L'ADN cible est alors disponible pour hybridation avec une sonde ADN complémentaire simple brin, dénaturée de la même manière et marquée avec un fluorochrome. Après l'hybridation, l'ADN non hybridé et l'ADN non lié spécifiquement sont éliminés par une série de lavages stringents et l'ADN est ensuite contre-coloré. Un microscope à fluorescence permet ensuite la visualisation de la sonde hybridée sur l'ADN cible.

Utilisation Prévue

Ce produit est destiné à être utilisé à des fins de recherche uniquement et n'est pas destiné à être utilisé dans les procédures de diagnostic.

Caractéristiques de la sonde

Sonde de la région EGFR, 7p11.2, en Rouge
Sonde de la région D7Z1, 7p11.1-q11.1 en Vert

La sonde EGFR d'une taille de 295kb et avec marquage rouge couvre le gène EGFR à 7p11.2. La sonde verte du centromère permet de contrôler le chromosome 7.

Conditionnement

Sonde: 50µl par tube ou 100µl par tube
La sonde est fournie prémélangée prête-à-l'emploi dans le tampon d'hybridation (formamide, sulfate de dextran, SSC).

Contre-colorant: 150µl par tube

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

Avertissements et précautions

- Pour la recherche uniquement. Pas destiné à être utilisé dans les procédures de diagnostic. Pour usage professionnel uniquement.
- Porter des gants lors de la manipulation des sondes ADN et du contre-colorant DAPI.
- 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.
- 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.
- 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.

Recommandations sur les protocoles

Pour l'utilisation sur FFPE ou TMA.

Équipement nécessaire non fourni

- Plaques chauffantes (avec bloc et contrôle de la température jusqu'à 80°C).
- Micropipettes de volume variable et gamme d'embouts de 1µl - 200µl.
- Bain-marie avec contrôle précis de la température à 72°C.
- Tubes à microcentrifugation (0,5ml).
- Microscope à fluorescence (Voir la section Microscope à fluorescence recommandés).
- Bocaux Coplin en plastique ou en verre.
- Pinces.
- Huile à immersion pour microscope à fluorescence.
- Centrifugeuse de paillasse.
- Lames de microscope.
- Lamelles 24x24mm.
- Chronomètre.
- Incubateur à 37°C.
- Colle à base de caoutchouc.
- 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 fluorochromes rouge et vert, utiliser le filtre double bande FITC/Texas Red.

Préparation des échantillons

La préparation de l'échantillon doit être effectuée conformément aux recommandations du guide des bonnes pratiques en cytogénétique. Pour FISH, des échantillons fixés au formol et inclus en paraffine d'une épaisseur de 4µm - 6µm doivent être utilisés.

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).

Protocole FISH

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

Pré-dénaturation

- Retirer la sonde du congélateur et la laisser se remettre à température ambiante (TA).
- Bien homogénéiser la sonde en pipetant plusieurs fois.
- Prélever 10µl - 15µl (en fonction de la taille du tissu) de sonde par test et placer dans un tube à microcentrifugation. Remplacer rapidement le reste de sonde dans le congélateur.
- Mettre la sonde et la lame échantillon à préchauffer sur une plaque chauffante à 37°C (+/- 1°C) pendant 5 minutes.
- 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

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

Hybridation

- 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

- Retirer la lamelle et éliminer toute trace de colle à base de caoutchouc.
- Laver la lame dans du tampon 0,4xSSC (pH 7,0) à 72°C (+/- 1°C) pendant 2 minutes sans agiter.
- Egoutter la lame et laver dans du tampon 2xSSC, 0,05% Tween-20 (pH 7,0) à TA pendant 30 secondes sans agiter.
- Sécher la lame et appliquer 10µl - 15µl de DAPI antifade sur chaque échantillon.
- Recouvrir d'une lamelle, éliminer les bulles et laisser la coloration apparaître à l'abri de la lumière pendant 10 minutes.
- 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.

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

- Les conditions d'hybridation peuvent être affectées par l'utilisation de réactifs autres que ceux fournis ou recommandés par CytoCell Ltd.
- 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.
- 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.
- 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 et deux signaux verts peuvent être observés, tandis que de signaux rouges multiples seront observés dans une cellule avec une amplification du locus du gène EGFR.

Informations supplémentaires

Pour plus d'informations sur le produit, veuillez contacter l'Assistance technique CytoCell.

T: +44 (0)1223 294048
E: techsupport@cytoCELL.com
W: www.oGT.com

ITALIANO

L'ibridazione *in situ* in fluorescenza (Fluorescence *In Situ* Hybridisation - FISH) è una tecnica che permette di rilevare sequenze di DNA su cromosomi in metafase o in nuclei in interfase di campioni citogenetici fissati, o in coltura dopo prelievo. La tecnica prevede l'utilizzo di sonde di DNA in grado di ibridare con l'intero cromosoma o con singole sequenze. La FISH costituisce quindi un potente strumento in aggiunta alle tecniche citogenetiche classiche. Recenti sviluppi hanno reso possibile che questa preziosa tecnica può ora essere applicata come strumento essenziale nell'analisi cromosomica prenatale, ematologia e patologica. Il DNA bersaglio, dopo la fissazione, è sottoposto a denaturazione al calore in presenza di formamide. Il DNA bersaglio è così disponibile per l'annealing con una sonda di DNA a singola elica a sequenza complementare, marcata con una sostanza fluorescente. Terminata l'ibridazione, la sonda di DNA non legata o legata in modo non specifico, è rimossa per mezzo di lavaggi stringenti ed il DNA è in seguito colorato con un colorante di contrasto. L'ibridazione della sonda viene infine analizzata con un microscopio a fluorescenza.

Destinazione d'uso

Questo prodotto è destinato ad essere utilizzato solo per scopi di ricerca e non per l'uso in procedure diagnostiche.

Specifiche della sonda

Regione EGFR, 7p11.2, Rosso
Regione D7Z1, 7p11.1-q11.1, Verde

La sonda EGFR di 295kb etichettata in rosso copre l'intera regione del gene EGFR in corrispondenza di 7p11.2. La sonda centromerica etichettata in verde agisce come sonda di controllo per il cromosoma 7.

Materiali forniti

Sonda: 50µl per provetta o 100µl per provetta
Le sonde sono fornite premiscelate nella soluzione di ibridazione (formamide; destrano solfato; SSC) e pronte per l'uso.

Colorante di contrasto: 150µl per provetta

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

Avvertenze e precauzioni

- Per uso ricerca. Non per l'uso in procedure diagnostiche. Solo per uso professionale.

- Quando si maneggiano le sonde e il colorante di contrasto DAPI, è necessario indossare guanti.
- 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.
- Il DAPI è un potenziale cancerogeno. Maneggiare con cura, indossare guanti e camice da laboratorio. Per lo smaltimento, sciacquare con grandi quantità di acqua.
- 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.

Protocollo Raccomandazioni

Per l'uso su FFPE o TMA.

Apparecchiature necessarie ma non fornite

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

La preparazione del campione deve essere eseguita secondo le linee guida del laboratorio o dell'istituzione.

Per FISH devono essere utilizzati campioni di tessuto fissati in formalina e inclusi in paraffina con uno spessore da 4µm - 6µm.

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).

Protocollo della FISH

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

Pre-denaturazione

- Rimuovere la sonda dal congelatore e attendere che raggiunga la temperatura ambiente (TA).
- Mescolare con una pipetta la soluzione della sonda in modo da renderla omogenea.
- 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.
- Pre-riscaldare la sonda e il vetrino con il campione su una piastra riscaldante a 37°C (+/- 1°C) per 5 minuti.
- 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

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

Ibridazione

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

Lavaggi post-ibridazione

- Rimuovere accuratamente il vetrino copri oggetto e qualsiasi residuo di colla.
- Lavare il vetrino in 0.4xSSC (pH 7.0) a 72°C (+/- 1°C) per 2 minuti, senza agitazione.
- Scolare il vetrino e lavare in 2xSSC, Tween-20 0,05% (pH 7.0) a TA per 30 secondi senza agitazione.
- Scolare il vetrino e applicare 10µl - 15µl di DAPI antifade su ciascun campione.
- Coprire con un vetrino copri oggetto, rimuovere eventuali bolle e attendere lo sviluppo del colore per 10 minuti lasciando il vetrino al buio.
- 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 (ad es., tempi prolungati di digestione enzimatica) tendono a distruggere la struttura cellulare e la morfologia tissutale. Tuttavia, un pretrattamento blando suscettibile di salvare le strutture tissutali 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.

Stabilità dei vetrini 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

- Le condizioni di ibridazione potrebbero essere influenzate negativamente dall'impiego di reagenti diversi da quelli forniti o consigliati da CytoCell Ltd.
- 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.

- 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.
- Una denaturazione incompleta può determinare l'assenza di segnale, mentre una denaturazione eccessiva può produrre un legame aspecifico.

Interpretazione dei risultati

In una normale cellula sarà possibile osservare due segnali verdi e due segnali rossi mentre all'interno di una cellula con un'amplificazione della regione EGFR sarà possibile osservare molteplici segnali rossi.

Informazioni aggiuntive

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

DEUTSCH

Die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) ist eine Technik, mit der DNA-Sequenzen auf Metaphase-Chromosomen oder Interphase-Kernen in fixierten zytogenetischen Proben nachgewiesen werden können. Dabei werden DNA-Sonden verwendet, die an ganze Chromosomen oder einzelne, einmalige Sequenzen hybridisieren. Kürzliche Entwicklungen haben gezeigt, dass diese nützliche Technik nun auch als essentielles Werkzeug für pränatale, hämatologische und pathologische Chromosomenanalysen eingesetzt werden kann. Nachdem die zu untersuchende DNA fixiert und denaturiert wurde, kann die Fluoreszenz markierte, einzelsträngige Sonde daran binden. Nach der Hybridisierung werden nicht gebundene sowie unspezifisch gebundene DNA-Sonden durch eine Reihe von Waschkübeln entfernt und die DNA zur Visualisierung gefärbt. Unter dem Fluoreszenzmikroskop wird dann die hybridisierte Sonde am Zielmaterial erkennbar.

Verwendungszweck

Dieses Produkt ist ausschließlich zur Forschungszwecken bestimmt und nicht für die Anwendung in diagnostischen Verfahren.

Sondenspezifikation

EGFR, 7p11.2 Region, Rot
D7Z1, 7p11.1-q11.1 Region, Grün

Die rot markierte EGFR Sonde mit einer Größe von 295kb deckt das EGFR Gen bei 7p11.2 ab. Die Centromersonde mit grüner Markierung dient zur Kontrolle für Chromosom 7.

Bestandteile des Kits

Sonde: 50µl pro Röhrchen oder 100µl pro Röhrchen
Die Sonden werden vorgemischt und gebrauchsfertig in Hybridisierungslösung geliefert (Formamid, Dextransulfat, SSC).

Farbstoff für die Gegenfärbung:

150µl pro Röhrchen
Der Farbstoff für die Gegenfärbung ist DAPI Antifade (ES: 0,125µg/ml DAPI (4,6-Diamidino-2-Phenylindol)).

Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen

- Nur für Forschungszwecke. Bestimmt nicht für die Anwendung in diagnostischen Verfahren. Durchführung ausschließlich durch qualifiziertes Laborpersonal.
- Beim Umgang mit DNA-Sonden und dem DAPI Farbstoff Handschuhe tragen.
- 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.
- DAPI ist ein potenzielles Karzinogen. Vorsichtig damit umgehen, Handschuhe und Labormantel tragen. Bei der Entsorgung mit viel Wasser nachspülen.
- 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.

Protokoll Empfehlungen

Für den Einsatz auf FFPE oder TMA.

Benötigte, aber nicht mitgelieferte Laborgeräte

- Heizplatte (mit stabiler Platte und genauer Temperatursteuerung bis 80°C).
- Micropipetten mit unterschiedlichen Volumen von 1µl - 200µl.
- Wasserbad mit genauer Temperatursteuerung bei 72°C.
- Mikrozentrifugenröhrchen (0,5ml).
- Fluoreszenzmikroskop (siehe auch „Empfehlungen zum Fluoreszenzmikroskop“).
- Coplin-Färbetrog aus Kunststoff oder Glas.
- Pinzette.
- Für Fluoreszenzobjektive geeignetes Immersionsöl.
- Tischzentrifuge.
- Objektträger für das Mikroskop.
- 24x24mm Deckgläser.
- Zeituhr.
- 37°C-Inkubator.
- Gummilösung zum Versiegeln der Deckglasränder.
- Tissue Pretreatment Kit (LPS 100).

Empfehlungen zum Fluoreszenzmikroskop

Für die optimale Visualisierung der Probe empfehlen wir die Verwendung planapochromatischer 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

Die Probenvorbereitung sollte entsprechend der Richtlinien des Labors, bzw. des Institutes durchgeführt werden.
Für FISH, sind 4µm - 6µm dicke formalinfixierte und paraffineingebettete Gewebeproben zu verwenden.

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.

FISH-Protokoll

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

Prä-denaturierung

- Nehmen Sie die Sonde aus dem Gefrierschrank und lassen Sie diese sich auf Zimmertemperatur aufwärmen.

- Mischar den Sondenlösung durch mehrmaliges Aufpipettieren
- 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.
- Sonde und Probenobjektträger 5 Minuten auf einer Heizplatte bei 37°C (+/- 1°C) vorwärmen.
- 10µl - 15µl Sondenmischung auf die Zellprobe auftragen und Deckglas sorgfältig auflegen. Mit Gummikleber-Lösung versiegeln und vollständig trocknen lassen.

Denaturierung

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

Hybridisierung

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

Waschen nach der Hybridisierung

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

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

- Durch die Verwendung von Reagenzien, die nicht von Cytocell Ltd. empfohlen sind, können die Hybridisierungsbedingungen negativ beeinflusst werden.
- 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.
- 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.
- Unvollständige Denaturierung kann zu einem Verlust des Signals führen und übermäßige Denaturierung kann zu nicht spezifischer Bindung der Sonde führen.

Zu erwartende Ergebnisse

Dabei sind in einer normalen Zelle zwei rote und zwei grüne Signale zu beobachten, wobei in einer Zelle mit einer Verstärkung des EGFR Genorts mehrere rote Signale auftreten.

Weitere Informationen:

Weitere Produktinformationen erhalten Sie vom Technischen Kundendienst von CytoCell.

T: +44 (0) 1223 294048

E: techsupport@cytozell.com

W: www.ogt.com

ESPAÑOL

La hibridación *in situ* fluorescente (FISH) es una técnica que permite detectar secuencias de ADN en cromosomas metafásicos o núcleos interfásicos en muestras citogenéticas y fijadas. En la técnica se utiliza una sonda de ADN que hibrida los cromosomas completos o las secuencias únicas simples y es un complemento útil para la citogenética clásica. Recientes estudios indican que esta es una técnica que puede aplicarse como herramienta esencial de prenatal, hematológico y patológico. Después de la fijación, el ADN diana se trata con calor para desnaturalizar el ADN bicatenario haciendo que resulte monocatenario. El ADN diana queda entonces disponible para hibridarlo con una sonda de ADN igualmente desnaturalizado, monocatenario marcado con fluorescencia que tiene una secuencia complementaria. Después de la hibridación la sonda de ADN no específicamente hibridada y no hibridada se elimina y se aplica un contraste al ADN para su visualización. El uso de un microscopio de fluorescencia permite la visualización de la sonda hibridada en el material utilizado.

Uso Previsto

Este producto está diseñado para ser utilizado en investigación y no en procedimientos de diagnóstico.

Especificaciones de las sondas

Región EGFR, 7p11.2 en Rojo

Región D7Z1, 7p11.1-q11.1 en Verde

La sonda EGFR de 295kb, etiqueta en rojo, cubre el gen EGFR en 7p11.2. La sonda centromérica verde actúa como control para el cromosoma 7.

Material incluido

Sonda: 50µl por vial o 100µl por vial

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

Contratención:

150µl por vial
La tinción se realiza con DAPI Antifade (ES: 0,125µg/ml de DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol)).

Advertencias y precauciones

- Para uso en investigación. No en procedimientos de diagnóstico. Sólo para uso profesional.
- Utilizar guantes al manipular las sondas de ADN y la contratención DAPI.
- La sonda contiene formamida, que es teratogena; 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.
- La contratención DAPI puede producir cáncer. Manipular con cuidado; utilizar guantes y bata de laboratorio. Para eliminarla, aclarar con abundante agua.
- 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 contratención deben almacenarse en un lugar oscuro.

Protocolo Recomendado

Para uso en FFPE o TMA.

Material necesario pero no incluido

- Placa calefactora (con una placa estable y un control de temperatura preciso hasta 80°C).
- Micropipetas y puntas de volumen variable (de 1µl a 200µl).
- Baño maría con control preciso de temperatura a 72°C.
- Tubos de microcentrifugación (0,5ml).
- Microscopio de fluorescencia (véase la sección Recomendaciones sobre el microscopio de fluorescencia).
- Cubetas Coplin de cristal y de plástico.
- Pinzas.
- Aceite de inmersión para objetivos de microscopio de fluorescencia.
- Centrifuga sobremesa.
- Portaobjetos para microscopio.
- Cubreobjetos de 24x24mm.
- Temporizador.
- Incubadora a 37°C.
- Pegamento de solución de caucho.
- 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 la muestra

La preparación de la muestra se debe realizar de acuerdo con las instrucciones del laboratorio o la institución.

En el caso de FISH, deben emplearse muestras de tejido embebido en parafina y fijado en formalina de entre 4µm - 6µm de grosor.

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).

Protocolo para la FISH

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

Antes de la desnaturalización

- Saque la sonda del congelador a -20°C y deje que se caliente a temperatura ambiente (TA).
- Asegúrese de que la solución de la sonda queda homogéneamente mezclada con una pipeta.
- 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.
- Pre caliente la sonda y el portaobjetos de la muestra en una placa calefactora a 37°C (+/- 1°C) durante 5 minutos.
- 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

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

Hibridación

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

Lavados post-hibridación

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

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





- Las condiciones de hibridación pueden verse afectadas negativamente si se emplean reactivos distintos de los suministrados o recomendados por CytoCell Ltd.
- 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.
- 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.
- 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, se observan dos señales rojas y dos verdes, mientras que en una célula con amplificación del locus EGFR se detectarán múltiples señales rojas.

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

REF	EN: Catalogue number DE: Bestellnummer FR: Référence du catalogue IT: Riferimento di Catalogo ES: Número de catálogo
LOT	EN: Batch code DE: Loscode FR: Code du lot IT: Codice di lotto ES: Código
	EN: Consult instructions for use DE: Gebrauchsanweisung beachten FR: Consulter la notice d'utilisation IT: Consultare le istruzioni per l'uso ES: Consúltense las instrucciones de uso
	EN: Manufacturer DE: Hersteller FR: Fabricant IT: Fabbricante ES: Fabricante
	EN: Use by DE: Verwendbar bis FR: Utiliser jusqu'au IT: Utilizzare entro ES: Fecha de caducidad
	EN: Temperature limitation DE: Temperaturbegrenzung FR: Limites de température IT: Limiti di temperatura ES: Limitación de temperatura
CONT	EN: Contents DE: Inhalt FR: Contenu IT: Contenuto ES: Contenido

Patents and Trademarks

CytoCell is a registered trademark of CytoCell Ltd.
This product contains technology licensed from Life Technologies Corporation and is available for 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