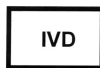


Instructions For Use

REF: LPS 018

FGFR1 Breakpart/Amplification



FOR PROFESSIONAL USE ONLY

ENGLISH/FRANÇAIS/ITALIANO/DEUTSCH/ESPAÑOL

Further information available at www.cytocell.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 as an essential diagnostic 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.

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

FGFR1 (Fibroblast Growth Factor Receptor 1) is a protein coding gene whose largest transcript features 18 exons, measures 5.6kb and is located on chromosome 8. FGFR1 was the first gene shown to be amplified in breast cancer¹ which is the case for around 10% of such tumours.² Amplification of the gene has been shown to provide a poor prognosis as it leads to early relapse because of the over expression of the amplified gene³.

Within the sequence of the gene is an open reading frame that encodes for a putative tyrosine kinase⁴ which is likely to be the causative factor within a number of stereotypic translocations which each give rise to a recognisable leukaemic syndrome called 8p11 myeloproliferative syndrome⁵. EMS or 8p11 myeloproliferative syndrome is often also referred to as Stem cell leukaemia/lymphoma syndrome (SCLL) and is a rare aggressive condition which usually features a BCR/ABL negative myeloproliferative disorder and a precursor T-cell lymphoblastic lymphoma. Patients often develop Acute Myeloid Leukaemia⁶ which is resistant to chemotherapy. There are at least 8 partner genes involved with FGFR1 in the disorder including: ZNF198 on 13q11-12 (the most common⁷), FOP on 6q27, CEP110 at 9q33, BCR at 22q11, HERV-K at 19q13, FGFR10P2 at 12p11, TIF1 at 7q34 and MYO18A at 17q23⁸. The breakpoints have been established for the ZNF198 translocation (t(8;13)(p11;q12)) as being in exon 8 of FGFR1 and result in fusing zinc finger proteins to the tyrosine kinase domain of FGFR1 and activating the tyrosine kinase activity, similar to the mechanism behind the BCR/ABL fusion of CML.⁸ This important gene is therefore involved in both breast cancer and a myeloproliferative disorder.

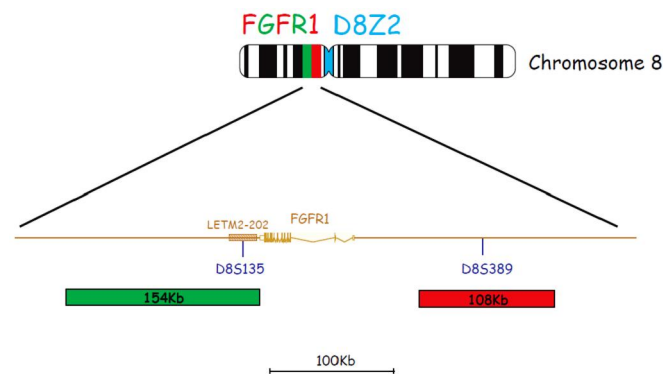
Cytocell has developed a three-colour combined breakpart and amplification FISH probe for FGFR1 which can be used in either bone marrow samples from EMS patients or tissue section in possibly amplified patients.

As it is the involvement of the FGFR1 tyrosine kinase domain that is important in EMS, detection of the partner gene involved is less important than establishing that there has been a translocation which has disrupted the FGFR1 gene. In these cases, the breakpart strategy will show the conventional split of one of the two fusion signals into a red and a green signal, along with a blue 8 centromere to enumerate chromosome 8. Although not strictly relevant in these cases, this additional probe may act as an extra enumerator in some cases.

In patients that are being tested for amplifications of FGFR1, the breakpart strategy is not relevant, but the un-translocated FGFR1 FISH signal will appear as a fusion probe and it is this fusion signal that will appear amplified. In order to properly enumerate this probe in tissue sections, the chromosome 8 centromere probe, included in a contrasting colour (blue), is useful.

Probe Specification

FGFR1 proximal, 8p11.2, Red
FGFR1 distal, 8p11.2, Green
8cen Blue



The FGFR1 probe mix consists of a green 154kb probe telomeric to the FGFR1 gene spanning the LETM2-202 gene and D8S135 marker. The red probe is 52kb centromeric to the FGFR1 gene spanning a 108kb region including the D8S389 marker.

Materials Provided

Probe: 100µl per vial (10 tests)

Amount of red FGFR1 probe: 110-138ng/test

Amount of green FGFR1 probe: 420-525ng/test

Amount of blue 8cen probe: 56-70ng/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 Aquarius kit should be stored at -20°C 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.

Fluorescence Microscope Recommendations

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 red and green fluorophores simultaneously. The blue fluorophore has specificity to the Aqua or DEAC spectrum (Aqua filter is required).

Sample Preparation

This kit is designed for use on cultured peripheral blood cells / cultured bone marrow cells fixed in Carnoy's fixative or paraffin-embedded tissue sections / tissue microarrays (TMA) which should be prepared according to the laboratory or institution guidelines.

For FISH on tissue sections 4-6 m thick formalin-fixed and paraffin-embedded tissue specimens should be used.

After mounting tissue section on slides, slides should be baked at 56°C overnight.

Paraffin-Embedded Tissue Sections FISH Suggested Protocol

Paraffin-embedded tissue sections require pre-treatment before hybridising with FISH probes i.e. removal of paraffin wax (de-paraffinisation), rehydration, acid treatment, pre-treatment and protein digestion.

Reagents:

1. Hydrochloric acid (HCl)
2. 2xSSC (saline sodium citrate) wash buffer

3. Histoclear (e.g. Fisher Scientific (Prod. Code: HIS-010-010S))
4. 70%, 85%, 100% Ethanol
5. Lyophilized pepsin (e.g. SIGMA cat. number: P6887, 3200-4500 U/mg)
6. Paraffin-embedded tissue sections (PETS)
7. Sodium thiocyanate NaSCN (e.g. 81.07g/mol SIGMA cat. number:251410)
8. 0.4xSSC pH 7.0 wash buffer
9. 2xSSC-0.05%Tween-20 pH 7.0 wash buffer

Reagent Preparation

1. Acid Pre-Treatment Solution
 - a. Prepare 100ml of 1M NaSCN Pre-treatment solution by dissolving 8.1g in 100ml distilled water.
 - b. Pour Pre-Treatment solution into 100ml ceramic or glass Coplin jar. Place into water bath and set the temperature at 80°C. Ensure that the temperature of the Pre-Treatment solution is equilibrated to 80°C before commencing the relevant steps.
2. 2xSSC Wash Buffer
 - a. 2xSSC Buffer should be allowed to reach room temperature before use.
3. 0.2% Pepsin in 0.01M HCl
 - a. Add 10ml of distilled water to 1g of pepsin, mix well and aliquot into five tubes (2ml per tube). Prepared 10% pepsin stock should be stored at -20°C.
 - b. Add 10ml of 0.1M HCl to 88ml of distilled water and preheat in a 37°C waterbath. 2ml of 10% pepsin stock should be added and mixed **just before** immersing slides in the solution.

De-paraffinisation of sections (Fume Cabinet)

1. Mark probe target area with a diamond marker pen.
2. Pour 100ml of Histoclear into three ceramic or glass Coplin jars, labeled %a+, %b+ and %c+. Leave the slides in jar %a+ for 10mins. Repeat with jars %b+ and %c+.
3. Remove slides from jar %a+ and remove excess solution by gently tapping the edges of each slide on a paper towel.
4. Pour the used Histoclear into waste bottles marked Histoclear %a+, %b+, %c+ when finished. Change the Histoclear after 200 slides have been processed or if cloudy in appearance.

Re-hydration

1. Place slides in a plastic jar containing 50ml of 100% ethanol (room temperature) for 2mins. Pour off the ethanol into a suitable waste container.
2. Replace with fresh 100% ethanol. After 2mins pour off the ethanol into a suitable waste container.
3. Place slides in a plastic jar containing 50ml of 70% ethanol (room temperature) for 2mins. Pour off the ethanol into a suitable waste container.
4. Replace with fresh 70% ethanol. After 2mins pour off the ethanol into a suitable waste container.
5. Air dry slides.

Acid treatment

1. Place slides in 100ml of 0.1 M HCl for 20mins.
2. Place slides in distilled water for 3mins.
3. Place slides in 2xSSC buffer for 3mins.

Pre-Treatment (Fume Cabinet)

1. Place slides in NaSCN Pre-Treatment solution pre-heated to 80°C in a waterbath and incubate for 30mins.
2. Remove slides from the jar and remove excess solution by gently tapping the edges of each slide on a paper towel.
3. Place slides in distilled water for 1min at room temperature (in a plastic jar).
4. Remove slides from the jar and place in 2xSSC Buffer for 3mins at room temperature. Pour off the buffer into a suitable waste container.
5. Replace with fresh 2xSSC buffer. After 3mins pour off the buffer into a suitable waste container.
6. Remove slides from the jar and remove the excess solution by gently tapping the edges of each slide on a paper towel.

Pepsin Digestion

1. Place slides in the pre-heated pepsin solution and incubate for 10-30mins. (Coplin jar).
2. Remove slides from the jar and gently tap the edges of each slide on a paper towel to remove the Pepsin.
3. Air dry slides.
4. Dehydrate tissue sections through the ethanol series (70%, 85% and 100%) in Coplin jars (room temperature) immersing the slides for 2mins in each.

Hybridisation

1. Add 10µl of probe per section (the amount of probe depends on a size of a section, add more if needed).
2. Apply a coverslip and seal with rubber solution glue.
3. Place the slide on a hot plate and denaturate at **75°C for 5mins**.
4. Place the slides in the 37°C incubator overnight.

Post-Hybridisation Washes

1. Remove coverslip and all traces of glue carefully.
2. Wash the slide in 0.4xSSC (pH 7.0) at 72°C for 2mins.
3. Drain the slide and wash in 2xSSC/0.05% Tween (pH 7.0) at RT for 30secs.
4. Drain the slide and apply 10-15 I ES DAPI antifade onto each sample.
5. Cover with the coverslip, remove bubbles and allow colour to develop in the dark for 10mins.
6. View with fluorescence microscope.

Comments

Hybridisation efficiency and tissue morphology are usually negatively correlated. Aggressive pretreatment procedures improving hybridisation efficiency (e.g. long incubation times of NaSCN or pepsin digestion) 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 protease treatment time will depend on the age of the block, the tissue composition, and quality of tissue fixation. Protease treatment 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.

Lymphocyte or Bone Marrow FISH Suggested Protocol FISH Protocol

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

Slide preparation

1. Spot the cell sample onto a glass microscope slide. Allow to dry.
2. Immerse slide in 2xSSC for 2mins at room temperature (RT) without agitation.
3. Dehydrate in an ethanol series (70%, 85% and 100%), each for 2mins 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 -20°C.
8. Place the probe and the sample slide to prewarm on a 37°C (+/- 1°C) hotplate for 5mins.
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 2mins.

Hybridisation

11. Place 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 2mins without agitation.
14. Drain the slide and immerse in 2xSSC, 0.05% Tween-20 at RT (pH 7.0) for 30secs without agitation.
15. Drain the slide and apply 10µl of DAPI antifade onto each sample.
16. Cover with a coverslip, remove bubbles and allow colour to develop in the dark for 10mins.
17. View with a fluorescence microscope.

Stability of Finished Slides

FISHed slides remain analysable for up to 1 month if stored in the dark at or below room temperature.

Procedural Recommendations

1. Hybridisation conditions may be adversely affected by the use of reagents other than those provided or recommended by Cytocell Ltd.
2. 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.
3. 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.
4. Incomplete denaturation can result in lack of signal and over denaturation can also result in non-specific binding.

Expected Results

In a normal cell due to the close juxtaposition of the probes, 2 yellow fusion and 2 blue control signals will be observed (2Y, 2B). In the event of a 8p11 translocation one split and one fused signal will be observed resulting in 1 yellow, 1 red, 1 green, 2 blue conformation (1Y, 1R, 1G, 2B). In the event of an amplification of the FGFR1 gene 3 or more yellow fusion and 2 blue control signals will be observed (3+Y, 2B).

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 classic cytogenetics and therapeutic action should not be initiated on the basis of the FISH result alone.

Customer Support

Please contact the Cytocell Sales and Marketing Department by telephone or email probes@cytocell.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 de cellules 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 diagnostic

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.

Les méthodologies actuelles, à savoir l'immunohistochimie ou le Southern blot, sont capables de fournir des informations au niveau de l'expression des gènes, mais la technique FISH, lorsqu'elle est effectuée sur des coupes tissulaires (soit à l'aide d'un cryostat ou par inclusion dans la paraffine), peut fournir des informations au niveau des gènes eux-mêmes, in situ, au site précis concerné dans la tumeur. Ceci permet de révéler l'hétérogénéité entre les cellules et de détecter de petits clones de cellules génétiquement distinctes.

Caractéristiques de la sonde

Sonde proximale de la région FGFR1 (8p11.2) en rouge
Sonde distale de la région FGFR1 (8p11.2) en vert
Sonde centromérique du chromosome 8 en bleu

La sonde FGFR1 est constituée d'une sonde marquée en vert (154kb) située dans la région distale du gène FGFR1, incluant le gène LETM2-202 et le marqueur D8S135, et d'une sonde marquée en rouge située à 52kb de la partie proximale de FGFR1 recouvrant une région de 108 kb incluant le marqueur D8S389.

Conditionnement

Sonde : 100µl par tube (10 tests)
Concentration de sonde FGFR1 rouge: 110-138 ng/test
Concentration de sonde FGFR1 vert: 420-525 ng/test
Concentration de sonde centromérique bleu : 56-70 ng/test
La sonde est fournie 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 antifading (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 matières dangereuses doivent être éliminées selon les réglementations en vigueur dans votre institution pour l'élimination des déchets dangereux.

Conservation et manipulation

Le kit Aquarius doit être conservé à -20°C jusqu'à la date d'expiration indiquée sur le kit. La sonde et le contre-colorant doivent être conservés à l'abri de la lumière.

Équipement nécessaire non fourni

- a) Plaque chauffante (avec bloc et contrôle de la température jusqu'à 80°C)
- b) Micropipettes 1µl - 200µl
- c) Bain-marie avec contrôle de la température à 72°C
- d) Tubes à microcentrifugation (0.5ml)
- e) Microscope à fluorescence (Voir la section Microscope et filtres)
- f) Jattes en plastique ou en verre
- g) Forceps
- h) Huile à immersion pour microscope à fluorescence
- i) Centrifugeuse de paillasse
- j) Lames de microscope
- k) Lamelles 24x24mm
- l) Chronomètre
- m) Incubateur à +37°C
- n) Colle Rubber cement

Microscope et filtres

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/TRITC est optimal pour la visualisation des fluorochromes oranges et verts simultanément. Le fluorophore bleu a une spécificité par rapport au spectre Aqua ou DEAC (un filtre Aqua est requis).

Préparation des échantillons

Le kit a été développé pour utilisation des cellules du sang périphérique / de moelle osseuse cultivées et fixées avec du fixateur Carnoy ou des coupes de tissu inclus en paraffine / de microrayons de tissu (TMA) et doit être préparé selon les protocoles en vigueur dans le laboratoire ou institution.

Pour FISH, des échantillons fixés au formol et inclus en paraffine d'une épaisseur de 4 à 6 µm doivent être utilisés.

Une fois les coupes tissulaires montées sur lames, ces dernières doivent être chauffées à 56°C pendant une nuit.

Protocole FISH pour les coupes de tissu inclus en paraffine

Les coupes de tissu inclus en paraffine demandent un prétraitement avant l'hybridation avec les sondes FISH, p.ex. enlèvement de la cire de paraffine (deparaffinage), réhydratation, traitement acide et digestion des protéines.

Réactifs :

- a) Acide chlorhydrique
- b) 2xSSC (citrate de sodium salin) tampon de lavage
- c) HistoClear (p.ex. Fisher Scientific (code de prod. : HIS-010-010S))
- d) Ethanol à 70%, à 85%, à 100%
- e) Pepsine lyophilisée (p.ex. SIGMA N° de catalogue: P6887, 3200-4.500 U/mg)
- f) Coupes de tissu inclus en paraffine (PETS)
- g) Thiocyanate de sodium NaSCN (p.ex. 81,07 g/mol SIGMA N° de catalogue: 541410)
- h) 0,4xSSC pH 7,0 tampon de lavage
- i) 2xSSC-0,05% Tween-20 pH 7,0 tampon de lavage

Préparation des réactifs

- 1) Solution de prétraitement acide
 - a. Préparer 100ml de 1 M NaSCN de solution de prétraitement en dissolvant 8,1 g dans 100 ml d'eau distillée.
 - b. Verser la solution de prétraitement dans une jarre de Coplin de 100ml en céramique ou verre. Mettre les échantillons dans un bain-marie et régler la température à 80°C. Assurer que la température de la solution de prétraitement est équilibrée à 80°C avant de commencer avec les étapes correspondantes.
- 2) Tampon de lavage 2xSSC
 - a) Le tampon de lavage 2xSSC devrait avoir atteint la température ambiante avant d'être utilisé.
- 3) 0,2 % de pepsine dans de l'HCl à 0,01 M

- a) Ajouter 10 ml d'eau distillée à 1 g de pepsine, bien mélanger et distribuer dans cinq tubes par aliquots de 2 ml. Le stock préparé de pepsine à 10 % doit être conservé à -20 °C.
- b) Ajouter 10 ml d'HCl à 0,1 M à 88 ml d'eau distillée et préchauffer au bain-marie à 37 °C. 2 ml du stock de pepsine à 10 % doivent être ajoutés et mélangés **juste avant** d'immerger les lames dans la solution.

Deparaffinage des coupes (armoire à ventilation)

- 1) Marquer la région cible de la sonde avec le marqueur à pointe en diamant.
- 2) Verser 100 ml de HistoClear dans trois jarres de Coplin en céramique ou verre marquées de « 1 », « 2 » et « 3 ». Laisser les échantillons dans la jarre « 1 » pendant 10 minutes. Répéter la procédure avec les jarres « 2 » et « 3 ».
- 3) Sortir les échantillons de la jarre « 3 » et enlever la solution excédentaire en tapant doucement les arêtes de chaque lame sur une serviette en papier.
- 4) Verser l'HistoClear usé dans les bouteilles déchets marquées de HistoClear « 1 », « 2 », « 3 » lorsque la procédure est finie. Échanger l'HistoClear après avoir traité 200 échantillons ou lorsque la solution a un aspect troublé.

Réhydratation

- 1) Mettre les échantillons dans une jarre en plastique contenant 50ml d'éthanol à 100% (température ambiante) pendant 2 minutes. Verser l'éthanol dans un conteneur à déchets adéquat.
- 2) Remplir la jarre de l'éthanol à 100% frais. Après 2 minutes, verser l'éthanol dans un conteneur à déchets adéquat.
- 3) Mettre les échantillons dans une jarre en plastique contenant 50ml d'éthanol à 70% (température ambiante) pendant 2 minutes. Verser l'éthanol dans un conteneur à déchets adéquat.
- 4) Remplir la jarre de l'éthanol à 70% frais. Après 2 minutes, verser l'éthanol dans un conteneur à déchets adéquat.
- 5) Laisser sécher les lames à l'air.

Traitement acide

- 1) Mettre les échantillons dans 100ml de 0,1 M HCl pendant 20 minutes.
- 2) Mettre les échantillons dans de l'eau distillée pendant 3 minutes.
- 3) Mettre les échantillons dans un tampon de lavage 2xSSC pendant 3 minutes.

Prétraitement (armoire à ventilation)

- 1) Mettre les échantillons dans une solution de prétraitement NaSCN qui a été préchauffée à 80°C dans un bain-marie et les incubent pendant 30 minutes.
- 2) Sortir les échantillons de la jarre et enlever la solution excédentaire en tapant doucement les arêtes de chaque lame sur une serviette en papier.
- 3) Mettre les échantillons dans de l'eau distillée pendant 1 minute à température ambiante (dans une jarre en plastique).
- 4) Sortir les échantillons de la jarre et les mettre dans le tampon de lavage 2xSSC pendant 3 minutes à température ambiante. Verser le tampon de lavage dans un conteneur à déchets adéquat.
- 5) Remplir le tampon de lavage 2xSSC. Après 3 minutes, verser le tampon de lavage dans un conteneur à déchets adéquat.
- 6) Sortir les échantillons de la jarre et enlever la solution excédentaire en tapant doucement les arêtes de chaque lame sur une serviette en papier.

Digestion par pepsine

- 1) Mettre les échantillons dans une solution de pepsine préchauffée et les incubent pendant 10-20 minutes (jarre de Coplin).
- 2) Sortir les échantillons de la jarre et taper doucement les arêtes de chaque lame sur une serviette de papier pour enlever la pepsine.
- 3) Laisser sécher les lames à l'air.
- 4) Déshydrater les coupes de tissu en passant la série d'éthanol (à 70%, à 85% et à 100%) dans une jarre de Coplin (température ambiante) ; mettre les échantillons dans chaque jarre pendant 2 minutes.

Hybridation

- 1) Mettre 10µl de la sonde sur la coupe de tissu (la quantité de la sonde dépend de la taille de la coupe, ajouter plus si nécessaire)
- 2) Couvrir avec une lamelle de 24x24 et sceller avec du rubber cément.
- 3) Mettre la lame sur une plaque chaude et la dénaturer à 75°C pendant 5 minutes.
- 4) Mettre les lames dans l'incubateur pendant la nuit à une température de 37°C.

Lavages post-hybridation

- 1) Retirer la lamelle et éliminer toutes traces de rubber cément.
- 2) Laver la lame dans du tampon 0,4xSSC (pH 7,0) à 72°C pendant 2 minutes.
- 3) Egoutter la lame et laver dans du tampon 2xSSC/Tween (pH 7.0) à température ambiante pendant 30 secondes.
- 4) Egoutter la lame et déposer 10-15 µl d'ES DAPI antifading.
- 5) Recouvrir d'une lamelle, enlever les bulles et laisser la coloration apparaître à l'abri de la lumière pendant 10 minutes.
- 6) 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. longs temps d'incubation de NaSCN ou digestion par pepsine) 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 longueur optimale du temps de traitement protéasique dépendra de l'âge du bloc, de la composition du tissu et de la qualité de la fixation du tissu. Le traitement protéasique devrait être réduit pour les biopsies au trocart 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 FISH

(Note: Éviter toute exposition de la sonde à la lumière du jour dans la mesure du possible pour ne pas altérer la durée de vie des fluorochromes)

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 pipétant plusieurs fois.
7. Prélever 10µl de sonde par test et placer dans un tube à microcentrifugation. Remettre le tube avec le restant de sonde à -20°C.
8. Mettre la sonde, 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

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

Hybridation

- 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

- Retirer la lamelle et éliminer toutes traces de rubber cément.
- Laver la lame dans du tampon 0,4xSSC (pH 7.0) à 72°C (+/- 1°C) pendant 2 minutes.
- Égoutter la lame et laver dans du tampon 2xSSC, 0.05% Tween-20 (pH 7.0) à température ambiante pendant 30 secondes sans agitation.
- Sécher la lame et appliquer 10µl de DAPI antifading sur chaque échantillon.
- Recouvrir d'une lamelle, enlever les bulles et laisser la coloration apparaître à l'abri de la lumière pendant 10 minutes.
- Visualiser avec un microscope à fluorescence.

Stabilité des lames

Les lames FISH sont analysables pendant un mois si elles sont conservées à l'obscurité et à/ou au-dessous de la température ambiante.

Recommandations

- Cuire ou vieillir les lames n'est pas recommandé, ceci pouvant réduire l'intensité du signal.
- 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 (stringence), 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.

Résultats attendus

Dans une cellule normale, les sondes étant juxtaposées à proximité les unes des autres, 2 signaux de fusion jaunes et 2 signaux de contrôle bleus seront observés (2Y, 2B). Dans le cas d'une translocation 8p11, un signal de doublement et un signal de fusion seront observés, entraînant une conformation à 1 signal jaune, 1 rouge, 1 vert, 2 bleus (1Y, 1R, 1G, 2B). Dans le cas d'une amplification du gène FGFR1, 3 signaux de fusion jaunes ou plus et 2 signaux de contrôle bleus seront observés (3+Y, 2B).

Limitations

Le reporting et l'interprétation du test FISH devraient être effectués conformément aux normes professionnelles pour la pratique et tout en prenant en considération autre information cliniques et diagnostiques. Le test est développé comme un complémentaire à la cytogénétique classique, pour cette raison des actions thérapeutiques ne devraient pas être lancées sur la seule base des résultats du test FISH.

Support Client

Veuillez contacter Cytocell, Département Ventes/Marketing ou votre agent local.

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 diagnostico 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.

Le metodologie correnti, ovvero immunostochimica o Southern blotting, possono fornire informazioni a livello di espressione genica, tuttavia se applicata su sezioni di tessuto (in criostato o incluse in paraffina), la metodologia FISH è in grado di fornire informazioni, in situ, a livello del gene e nella posizione precisa nell'ambito del tumore. Questo consente di rilevare eventuali eterogeneità cellula-cellula e la presenza di piccoli cloni di cellule geneticamente distinte.

Specifiche della sonda

Regione FGFR1, centromerica 8p11.2, Rossa
Regione FGFR1, telomerica 8p11.2, Verde
Centromero 8, Blu

Il mix di sonde per FGFR1 consiste in una sonda verde di 154kb telomerica rispetto al gene FGFR1, mappa sul gene LETM2-202 e il marcatore D8S135. La sonda rossa è 52kb telomerica rispetto al gene FGFR1, lunga 108kb include il marcatore D8S389.

Materiali forniti

Sonda: 100µl per provetta (10 test)
Quantità di FGFR1 rosso probe: 110-138 ng/test
Quantità di FGFR1 verde probe: 420-525 ng/test
Quantità di FGFR1 blu probe: 56-70 ng/test

La sonda è fornita già miscelata e pronta per l'uso nella soluzione di ibridazione (Formamide; Destrano solfato; SSC).

Colorante di contrasto:

150µl per provetta (15 test)
Il colorante di contrasto è il DAPI antifade (ES: 0,125µg/ml DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindole))

Avvertenze e misure precauzionali

- Per uso diagnostico *in vitro*. Per uso professionale.
- Quando si manipolano le sonde ed il colorante di contrasto DAPI è necessario indossare i guanti.
- Le miscele di sonda contengono formamide, una sostanza teratogena. Non respirare i fumi ed evitare il contatto con la pelle. Indossare guanti, camicia da laboratorio e maneggiare in una cappa aspirante. Per lo smaltimento, lavare con grandi quantità di acqua.
- Il DAPI è un potenziale cancerogeno. Maneggiare con cura, indossare guanti ed un camice da laboratorio. Per lo smaltimento, lavare con grandi quantità di acqua.
- Eseguire lo smaltimento dei materiali pericolosi nel rispetto delle normative interne dell'istituzione relative allo smaltimento dei residui tossici.

Conservazione e utilizzo

Conservare il kit Aquarius a 20°C fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta. I flaconcini della sonda e del colorante di contrasto devono essere conservati al buio.

Apparecchiature necessari non forniti

- Piastra riscaldante (con - un controllo accurato della temperatura fino ad 80°C).
- Micropipette a volume variabile compreso tra 1µl e 200µl.
- Bagno termostato con controllo accurato della temperatura a 72°C.
- Provette da microcentrifuga (0,5 ml)
- Microscopio a fluorescenza (riferirsi alla sezione Configurazione ottimale del microscopio e dei filtri)
- Contenitori di Coplin in plastica o vetro.
- Pinzette.
- Olio per lenti ad immersione del microscopio a fluorescenza.
- Centrifuga da banco.
- Vetrini da microscopia
- 24x24 mm vetrini coprioggetto
- Timer
- Incubatore a 37°C
- Colla per vetrini

Raccomandazioni relative al Microscopio a fluorescenza

Per una visualizzazione ottimale della sonda si raccomanda di utilizzare una lampada a mercurio da 100 watt e obiettivi plan apochromat x63 oppure x100. Il filtro a Tripla banda passante DAPI/FITC/TRITC è la soluzione ideale per la visualizzazione simultanea di fluorofori arancioni e verdi. Il fluorofluoro blu ha una specificità nei confronti dello spectrum Aqua o DEAC (è necessario un filtro Aqua).

Preparazione del campione

Il kit è stato progettato per l'utilizzo con cellule del sangue periferico / cellule di midollo osseo coltivate, fissate nel fissativo di Carnoy o di sezioni tissutali incluse in paraffina / matrici tissutali ad alta densità (TMA) e deve essere preparato conformemente alle linee guida del laboratorio o di tipo istituzionale.

Per FISH devono essere utilizzati campioni di tessuto fissati in formalina e inclusi in paraffina con uno spessore da 4 a 6 µm. Dopo aver collocato la sezione di tessuto sui vetrini, questi ultimi dovranno essere posti in forno a 56°C per l'intera notte.

Protocollo suggerito da FISH per le sezioni tissutali incluse in paraffina

Le sezioni di tessuto incluse in paraffina richiedono un pretrattamento prima dell'ibridazione con sonde FISH, ovvero la rimozione della cera di paraffina (deparaffinazione), disidratazione, trattamento con acido, pre-trattamento e digestione ad opera della proteina.

Reagenti:

- Acido idroclorico (HCl)
- Soluzione tampone di lavaggio 2XSSC (citrato di sodio salino)
- Histoclear (p.e. Fisher Scientific (Codice Prod: HIS-010-010S))
- Etanolo al 70%, 85%, 100%
- Pepsina liofilizzata (p.e. SIGMA num. Cat.: P6887, 3200-4.500 U/mg)
- Sezioni di tessuto incluse in paraffina (PETS)
- Tiocianato di sodio NaSCN (p.e. 81,07g/mol SIGMA numero cat.:251410)
- soluzione tampone di lavaggio 0,4xSSC pH 7.0
- soluzione tampone di lavaggio 2xSSC-0.05%Tween-20 pH 7.0

Preparazione del reagente

- Soluzione per Pre-trattamento Acido
 - Preparare 100 ml di soluzione di Pre-trattamento 1M NaSCN mediante dissoluzione di 8,1 grammi in 100 ml di acqua distillata
 - Versare la soluzione di Pre-trattamento all'interno di una vaschetta di ceramica o di una vaschetta di Coplin di vetro da 100 ml. Posizionare all'interno di una bagnomaria e impostare la temperatura a 80°C. Accertarsi che la temperatura della soluzione del Pre-trattamento sia stabile a 80°C prima di iniziare a cominciare le relative fasi.
- Soluzione tampone di lavaggio 2xSSC
 - La soluzione tampone 2xSSC deve raggiungere la temperatura ambiente prima dell'uso
- 0,2% di pepsina in 0,01 M di HCl
 - Aggiungere 10 ml di acqua distillata a 1 g di pepsina, mescolare bene e distribuire equamente nelle cinque provette (2 ml per provetta). La scorta di pepsina preparata al 10% deve essere conservata a -20°C.
 - Aggiungere 10 ml di HCl a 0,1 M a 88 ml di acqua distillata e preriscaldare a 37°C in bagnomaria. È necessario aggiungere 2 ml di pepsina al 10% e mescolare immediatamente prima di immergere i vetrini nella soluzione.

Sezione di deparaffinazione (Cabina ad assorbimento molecolare)

- Marcare l'area target della sonda con in evidenziatore indelebile.
- Versare 100 ml di Histoclear all'interno di tre vasi di ceramica o vaschette di Coplin di vetro, etichettati %a, %b e %c. Lasciare i vetrini all'interno della vaschetta %a per 10 minuti. Ripetere la medesima procedura con le vaschette %b e %c.
- Rimuovere i vetrini dalla vaschetta %a e rimuovere la soluzione in eccesso battendo delicatamente le estremità di ciascun vetrino su un asciugamano di carta.
- Versare l'Histoclear utilizzato all'interno di bottiglie contenenti gli scarti contrassegnate come Histoclear %a, %b e %c una volta terminato. Sostituire l'Histoclear dopo che sono stati trattati 200 vetrini o se l'aspetto risulta opaco.

Reidratazione

- Posizionare i vetrini all'interno di una vaschetta di plastica contenente 50 ml di etanolo al 100% (temperatura ambiente) per 2 minuti; versare l'etanolo all'interno di un idoneo contenitore per rifiuti speciali.
- Sostituire con etanolo al 100% nuovo. Dopo 2 minuti versare l'etanolo usato all'interno di un idoneo contenitore per i rifiuti speciali.
- Posizionare i vetrini all'interno di una vaschetta di plastica contenente 50 ml di etanolo al 70% (temperatura ambiente) per 2 minuti; versare l'etanolo all'interno di un idoneo contenitore per rifiuti speciali.
- Sostituire con etanolo al 70% nuovo. Dopo 2 minuti versare l'etanolo usato all'interno di un idoneo contenitore per i rifiuti speciali.
- Fare asciugare i vetrini all'aria.

Trattamento con acido

- Posizionare i vetrini all'interno di 100 ml di 0,1 MHC1 per 20 minuti.
- Posizionare i vetrini in acqua distillata per 3 minuti.
- Posizionare i vetrini all'interno di soluzione tampone 2xSSC per 3 minuti.

Pre-trattamento (Cabina ad assorbimento molecolare)

- Posizionare i vetrini all'interno di una soluzione di Pre-trattamento NaSCN preriscaldata a 80°C a bagnomaria e incubare per 30 minuti.
- Rimuovere i vetrini dalla vaschetta e rimuovere la soluzione in eccesso battendo delicatamente le estremità di ciascun vetrino su un asciugamano di carta.
- Posizionare i vetrini all'interno di acqua distillata per 1 minuto a temperatura ambiente (all'interno di una vaschetta di plastica)
- Rimuovere i vetrini dalla vaschetta e posizionare all'interno della soluzione Tampone 2xSSC per 3 minuti a temperatura ambiente. Versare la soluzione tampone usata all'interno di un idoneo contenitore per rifiuti speciali.
- Sostituire con soluzione tampone 2xSSC nuova. Dopo 3 minuti versare la soluzione tampone usata all'interno di un idoneo contenitore per i rifiuti speciali.

6. Rimuovere i vetrini dalla vaschetta e rimuovere la soluzione in eccesso battendo delicatamente le estremità di ciascun vetrino su un asciugamano di carta.

Digestione ad opera della pepsina

1. Posizionare i vetrini all'interno di una soluzione di pepsina preriscaldata e incubare per 10-29 minuti (vaschetta di Coplin).
2. Rimuovere i vetrini dalla vaschetta e battere delicatamente le estremità di ciascun vetrino su un asciugamano di carta per rimuovere la Pepsina.
3. Fare asciugare i vetrini all'aria.
4. Disidratare le sezioni di tessuto attraverso le serie di etanolo (70%, 85% e 100%) all'interno di vaschette di Coplin (temperatura ambiente) immergendo i vetrini per 2 minuti all'interno di ciascuna vaschetta.

Ibridazione

1. Aggiungere 10µl di sonda sulla sezione (la quantità di sonda dipende dalla dimensione di una sezione, aggiungere una quantità maggiore laddove necessario)
2. Applicare un foglio protettivo 24x24 e sigillare con colla in soluzione di gomma.
3. Posizionare il vetrino su una piastra riscaldante e denaturare a **75°C per 5 minuti**.
4. Posizionare i vetrini all'interno dell'incubatore a 37°C per tutta la notte.

Lavaggi Post-Ibridazione

1. Rimuovere la protezione e tutte le tracce di colla prestando la massima attenzione.
2. Lavare il vetrino all'interno di 0.4xSSC (pH 7.0) a 72°C per 2 minuti.
3. Scolare il vetrino e lavarolo all'interno di 2xSSC/Tween (pH 7.0) a temp. ambiente per 30 secondi.
4. Scolare il vetrino e applicare 10-15 l di antifade ES DAPI.
5. Coprire con un vetrino coprioggetto, rimuovere eventuali bolle e attendere 10 minuti lasciando il vetrino al buio
6. Analizzare con il 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 (p.e. tempi di incubazione prolungata di NaSCN o digestione ad opera della pepsina) 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 lunghezza ottimale del trattamento di proteasi dipenderà dall'età del blocco, dalla composizione tissutale e dalla qualità del fissaggio tissutale. Il trattamento di proteasi deve essere ridotto 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.

Protocollo

(Nota: Fare attenzione a limitare il più possibile l'esposizione della sonda alla luce del laboratorio)

Preparazione del vetrino

1. Caricare il campione cellulare su un vetrino da microscopia. Lasciare asciugare il vetrino.
2. Immergere i vetrini in 2xSSC per 2 min a temperatura ambiente (RT) 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 la sonda non utilizzata a -20°C.
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. Denaturare 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
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 del vetrino finito

I vetrini FISH restano analizzabili per circa 1 mese se conservati al buio a temperatura ambiente o inferiore.

Raccomandazioni per l'uso

1. L'eccessivo riscaldamento o invecchiamento dei vetrini non è raccomandato in quanto suscettibili di ridurre la fluorescenza del segnale.
2. Le condizioni di ibridazione potrebbero essere influenzate negativamente dall'impiego di reagenti differenti rispetto a quelli forniti o raccomandati da Cytocell Ltd.
3. L'utilizzo di un termometro calibrato è fortemente raccomandato per la misurazione delle temperature delle soluzioni, dei bagni termostati e degli incubatori in quanto queste temperature sono di fondamentale importanza per la performance ottimale del prodotto.
4. Le concentrazioni del lavaggio (stringenza), il pH e la temperatura sono di fondamentale importanza in quanto condizioni di stringenza blande possono favorire un legame non specifico della sonda e condizioni di stringenza troppo elevate possono condurre alla perdita del segnale.
5. La denaturazione incompleta può tradursi in una perdita del segnale mentre una denaturazione eccessiva può anche tradursi in un legame non specifico.

Risultati attesi

In una cellula normale, a causa dell'accostamento ravvicinato delle sonde, si osserveranno 2 segnali di fusione (giallo) e 2 segnali di controllo (blu), ovvero 2Y, 2B. Nell'eventualità di una traslocazione di 8p11, si osserveranno un segnale ripartito e un segnale fuso da cui deriveranno una conformazione: 1 giallo, 1 rosso, 2 blu (1Y, 1R, 1G, 2B). Nell'eventualità di un'amplificazione del gene FGFR1, si osserveranno 3 o più segnali di fusione (giallo) e 2 segnali di controllo (blu), da cui 3+Y, 2B.

Limitazioni

Il reporting e l'interpretazione di FISH devono essere coerente con gli standard professionali della pratica medica e dovrebbe prendere in considerazione altre informazioni cliniche e diagnostiche. Questo kit è concepito in aggiunta alle tecniche citogenetiche classiche e azione terapeutica non deve essere messa in atto esclusivamente sulla base del risultato di FISH.

Assistenza clienti

Contattare l'Ufficio Commerciale e Vendita della Cytocell.

DEUTSCH

Die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) ist eine Technik, mit der DNA-Sequenzen auf Metaphase-Chromosomen oder Interphase-Kernen bei fixierten Kulturen oder nicht in Kultur gezüchteten zytogenetischen Proben nachgewiesen werden können. Die Technik verwendet DNA-Sonden, die an gesamte Chromosomen oder an einzelne, einmalige Sequenzen hybridisieren und dient als leistungsstarke Ergänzung zur klassischen Zytogenetik. Kürzliche Entwicklungen haben gezeigt, dass diese nützliche Technik nun auch als essentielles diagnostisches Werkzeug für pränatale, hämatologische und pathologische Chromosomenanalysen eingesetzt werden kann. Die Ziel-DNA wird zum Denaturieren der doppelsträngigen DNA nach dem Fixieren mit Hitze und Formamid behandelt, wodurch sie einzelsträngig wird. So kann sich die Ziel-DNA an eine ebenso denaturierte, einzelsträngige fluoreszenzmarkierte DNA-Sonde mit komplementärer Sequenz anlagern. Nach der Hybridisierung werden nichtgebundene und nicht spezifisch gebundene DNA-Sonden durch eine Reihe von Waschvorgängen unter stringenten Bedingungen entfernt und die DNA zum Sichtbarmachen gefärbt. Unter dem Fluoreszenzmikroskop wird dann die hybridisierte Sonde am Zielmaterial erkennbar.

Aktuelle Methodologien, genauer gesagt die Immunhistochemie oder die Southern-Blot-Analysen, können zwar Informationen auf der Ebene der Genexpression liefern, doch wenn diese an Gewebeabschnitten (entweder Kryostat- oder Paraffin-eingebetteten Geweben) vorgenommen werden, kann FISH Informationen auf einer Genebene *in situ* liefern, d. h. an der exakten Stelle innerhalb des Tumors. Dies kann eine Heterogenität von einer zu einer anderen benachbarten Zelle deutlich machen und die Erkennung kleiner Klone genetisch verschiedener Zellen ermöglichen.

Sondenspezifikation

FGFR1 Region, zentromerisch 8p11.2, Rot
FGFR1 Region, telomerisch 8p11.2, Grün
8cen, Blau

Der FGFR1 Sonden-Mix besteht aus einer grünen 154kb Telomer-Sonde des FGFR1 Gens, die auch das LETM2-202 Gen umfasst, und dem D8S135 Marker. Die rote 52kb Telomer-Sonde des FGFR1 Gens umfasst die 108 kb Region, einschließlich den D8S389 Marker.

Kitkomponenten

Sonde: 50µl pro Röhrchen (5 tests) oder 100µl pro Röhrchen (10 tests)
Menge an FGFR1 rot: 110-138 ng/Test
Menge an FGFR1 grün: 420-525 ng/Test
Menge an FGFR1 blau: 56-70 ng/Test

Die Sonden sind vorgemischt und gebrauchsfertig in Hybridisierungslösung geliefert (Formamid, Dextransulfat, SSC).

Gegenfärbung: 150µl pro Röhrchen (15 Tests)

Die Gegenfärbung besteht aus DAPI antifade (ES: 0.125µg/ml DAPI (4,6-Diamidino-2-Phenylindol)).

Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen

1. Zur Verwendung in der *in vitro* Diagnostik. Nur für die professionelle Verwendung
2. Beim Umgang mit DNA-Sonden und der DAPI-Gegenfärbung Handschuhe tragen.
3. Sondenmischungen enthalten Formamid, das teratogen ist. Keine Dämpfe einatmen und nicht mit der Haut in Berührung bringen. Handschuhe und Labormantel tragen und unter einer Abzugshaube arbeiten. Bei der Entsorgung mit viel Wasser nachspülen.
4. DAPI ist ein potentielles Karzinogen. Vorsichtig damit umgehen, Handschuhe und Labormantel tragen. Bei der Entsorgung mit viel Wasser nachspülen.
5. Alle Gefahrstoffe sollten gemäß den Richtlinien Ihrer Einrichtung zur Gefahrstoffentsorgung entsorgt werden.

Lagerung und Behandlung

Das Aquarius-Kit sollte bis zum Ablaufdatum, das auf dem Kietikett angegeben ist, bei 20°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 Heizplatte und genauer Temperaturregelung bis 80°C)
2. Mikropipetten mit variablem Volumen von 1 µl - 200 µl
3. Wasserbad mit genauer Temperaturkontrolle bei 72°C.
4. Mikro-Zentrifugenröhrchen (0,5 ml).
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. 24x24 mm Deckgläser.
12. Timer.
13. 37°C Inkubator.
14. Gummilösung zum Versiegeln der Deckglasränder.

Empfehlungen zum Fluoreszenzmikroskop

Zur bestmöglichen Beobachtung der Probe empfehlen wir die Verwendung einer 100 Watt Quecksilberdampflampe und von Plan Achromat Objektiven mit 63-facher oder 100-facher Vergrößerung. Das Dreifach-Bandpassfilter DAPI/FITC/TRITIC ist für die simultane Beobachtung der orangen und grünen Fluorophore optimal geeignet. Das blaue Fluorophor hat eine Spezifität gegenüber dem Aqua- oder DEAC-Spektrum (ein Aqua-Filter ist erforderlich).

Probenvorbereitung

Das Kit ist für die Verwendung an kultivierten, peripheren Blutzellen und Knochenmark, die in Carnoy's Fixativ fixiert sind oder mit paraffineingebetteten Gewebeschnitten / Tissue-arrays (TMA) konzipiert und sollte gemäß den Richtlinien des Labors oder der Einrichtung vorbereitet werden.

Für FISH, sind 4 bis 6 µm dicke formalinfixierte und paraffineingebettete Gewebeproben zu verwenden.

Nachdem ein Gewebeabschnitt auf Objektträgern platziert worden ist, sollten die Objektträger über Nacht bei 56°C inkubiert werden.

FISH-Protokoll für paraffineingebettete Gewebeschnitte

Für paraffineingebettete Gewebeschnitte ist vor der Hybridisierung mit FISH Sonden eine Vorbehandlung erforderlich, d.h. das Paraffin ist zu entfernen (Entparaffinierung), Rehydratisierung, Säurebehandlung, Vorbehandlung und Proteinverdauung.

Reagenzien:

1. Salzsäure (HCl)
2. 2xSSC (salzhaltiges Natriumcitrat) Waschlösung

- Histoclear (z.B. Fisher Scientific (Artikelnummer: HIS-010-010S))
- 70%, 85%, 100% Ethanol
- Gefriergetrocknetes Pepsin (z.B. SIGMA Katalognummer: P6887, 3200-4.500 U/mg)
- Paraffineingebettete Gewebeschnitte (PETS)
- Natriumthiocyanat NaSCN (z.B. 81.07g/mol SIGMA Katalognummer:251410)
- 0.4xSSC pH 7.0 Waschlösung
- 2xSSC-0.05%Tween-20 pH 7.0 Waschlösung

Reagenzienpräparation

- Lösung zur Säurevorbehandlung
 - Bereiten Sie 100ml 1M NaSCN Vorbehandlungslösung vor indem Sie 8.1g in 100ml destilliertem Wasser lösen.
 - Gießen Sie die Vorbehandlungslösung in einen 100ml Coplin-Färbetrog aus Keramik oder Glas. Legen Sie die Proben in ein Wasserbad und Stellen Sie die Temperatur auf 80°C ein. Vergewissern Sie sich, dass die Temperatur der Vorbehandlungslösung genau bei 80°C liegt, bevor Sie die entsprechenden Schritte beginnen.
- 2xSSC Waschlösung
 - 2xSSC Waschlösung sollte vor Verwendung Zimmertemperatur erreicht haben.
- 0,2 % Pepsin in 0,01 M HCl
 - Fügen Sie 1 g Pepsin 10 ml destilliertes Wasser hinzu, vermischen Sie beides gut miteinander und aliquotieren Sie es in fünf Röhren (2 ml pro Röhren). Ein vorbereiteter 10 % Pepsin Stock sollte bei -20°C gelagert werden.
 - Fügen Sie 88 ml destilliertem Wasser 10 ml 0.1 M HCl hinzu und wärmen Sie es in einem 37°C warmen Wasserbad vor. 2 ml eines 10 % Pepsin Stock sollte hinzugefügt und untergemischt werden, **kurz bevor** die Objektträger in die Lösung getaucht werden.

Entparaffinierung der Schnitte (Abzugsschrank)

- Markieren Sie die Zielregion der Sonde mit einem Diamant-Marker.
- Gießen Sie 100ml Histoclear in drei Coplin-Färbetroge aus Keramik oder Glas, die mit 1, 2, und 3 gekennzeichnet sind. Legen Sie die Proben für 10 Minuten in Trog 1. Wiederholen Sie diesen Schritt mit Trog 2 und 3.
- Entnehmen Sie die Proben aus Trog 3, schütteln Sie die überschüssige Lösung ab, indem Sie die Kanten eines jeden Objektträgers vorsichtig auf ein Papiertuch stippen.
- Gießen Sie nach Abschluss dieses Schritts das Histoclear in Abfallbehälter, die mit Histoclear 1, 2, 3, gekennzeichnet sind. Erneuern Sie das Histoclear nach 200 Proben oder sobald es trüb wird.

Rehydratisierung

- Legen Sie die Proben 2 Minuten lang in einen Kunststofftroge mit 50ml 100%igem Ethanol (Zimmertemperatur). Gießen Sie das Ethanol in einen geeigneten Abfallbehälter ab.
- Gießen Sie frisches 100%iges Ethanol auf. Nach weiteren 2 Minuten, gießen Sie das Ethanol wieder in einen geeigneten Abfallbehälter ab.
- Legen Sie die Proben dann 2 Minuten lang in einen Kunststofftroge mit 50ml 70%igem Ethanol (Zimmertemperatur). Gießen Sie das Ethanol in einen geeigneten Abfallbehälter ab.
- Gießen Sie frisches 70%iges Ethanol auf. Nach weiteren 2 Minuten, gießen Sie das Ethanol wieder in einen geeigneten Abfallbehälter ab.
- Lassen Sie die Proben an der Luft trocknen.

Säurebehandlung

- Leben Sie die Proben für 20 Minuten in 100ml 0.1 M HCl.
- Leben Sie die Proben für 3 Minuten in destilliertes Wasser.
- Legen Sie die Proben für 3 Minuten in 2xSSC Waschlösung

Vorbehandlung (Abzugsschrank)

- Geben Sie die Proben in NaSCN Vorbehandlungslösung, die im Wasserbad auf 80°C vorgewärmt ist und inkubieren Sie sie für 30 Minuten.
- Entnehmen Sie die Proben aus dem Troge und schütteln die überschüssige Lösung ab, indem Sie die Kanten eines jeden Objektträgers vorsichtig auf ein Papiertuch stippen.
- Legen Sie die Proben für 1 Minute bei Zimmertemperatur in destilliertes Wasser (in einen Kunststofftroge).
- Entnehmen Sie die Proben aus dem Troge und legen Sie sie bei Zimmertemperatur für 3 Minuten in 2xSSC Waschlösung. Gießen Sie die Waschlösung in einen geeigneten Abfallbehälter ab.
- Gießen Sie frische 2xSSC Waschlösung auf. Nach weiteren 3 Minuten, gießen Sie die Waschlösung wieder in einen geeigneten Abfallbehälter ab.
- Entnehmen Sie die Proben aus dem Troge und schütteln die überschüssige Lösung ab, indem Sie die Kanten eines jeden Objektträgers vorsichtig auf ein Papiertuch stippen.

Pepsinverdauung

- Legen Sie die Proben in die vorgewärmte Pepsin-Lösung und inkubieren Sie sie für 10 bis 20 Minuten (Coplin-Färbetroge).
- Entnehmen Sie die Proben aus dem Troge und stippen Sie die Objektträger vorsichtig auf ein Papiertuch, um das überschüssige Pepsin zu entfernen.
- Lassen Sie die Proben an der Luft trocknen.
- Dehydrieren Sie die Gewebeschnitte, indem Sie die Ethanol-Serie in Coplin-Färbetrogen (bei Zimmertemperatur) durchlaufen (70%, 85% und 100%); leben Sie die Proben für 2 Minuten in jeden Troge.

Hybridisierung

- Geben 10µl der Sonde auf den Gewebeschnitt (die Menge der Sonde hängt von der Größe des Schnitts ab, falls erforderlich, geben Sie mehr hinzu).
- Geben Sie ein 24 x 24 Deckgläschen darauf und versiegeln Sie es mit Gummikleber-Lösung
- Geben Sie die Proben auf eine Wärmplatte und denaturieren Sie sie für **5 Minuten bei 75°C**.
- Legen Sie die Proben bei 37°C über Nacht in den Inkubator.

Waschen nach der Hybridisierung

- Deckgläschen und alle Kleberspuren vorsichtig entfernen.
- Waschen Sie die Probe für 2 Minuten bei 72°C in 0.4xSSC (pH 7.0).
- Objektträger abtropfen lassen und 30 Sekunden in 2xSSC/Tween (pH 7.0) bei Zimmertemperatur waschen.
- Objektträger abtropfen lassen und 10-15µl ES DAPI antifade auftragen.
- Mit dem Deckgläschen abdecken.

Bemerkungen:

Wirkungsgrad der Hybridisierung und Gewebemorphologie stehen gewöhnlich in negativem Zusammenhang. Aggressive Vorbehandlungsmethoden, die zu einem erhöhten Wirkungsgrad der Hybridisierung beitragen (z.B. lange Inkubationszeiten des NaSCN oder Pepsinverdauung) 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 Proteasebehandlung hängt vom Alter des Blocks, der Gewebeszusammensetzung und der Qualität der Gewebefixierung ab. Die Proteasebehandlung 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.

FISH-Protokoll

Bitte beachten Sie jederzeit, dass die Sonden dem Laborlicht nur für eine möglichst kurze Zeit ausgesetzt sind.

Vorbereitung des Objektträgers

- Zellprobe auf gereinigten Mikroskop-Objektträger auftropfen Trocknen lassen.
- Den Objektträger in 2xSSC für 2 Min bei RT ohne Schütteln eintauchen.
- Entwässern in Alkoholreihe (70%, 85% und 100%), jeweils für 2 Min. bei RT.
- Trocknen lassen.

Vordenaturierung

- Nehmen Sie die Sonde aus dem -20°C Gefrierschrank und lassen Sie diese sich auf Zimmertemperatur aufwärmen.
- Durch wiederholtes, sanftes Mischen in der Pipette sicherstellen, dass die Sondenlösung homogen gemischt ist.
- Pro Test 10µl Sonde entnehmen und in ein Mikrozentrifugenröhrchen geben. Bewahren Sie die restliche Sonde bei -20°C auf. Sonde,
- Probenobjektträger zum Vorwärmen 5 Minuten auf eine Heizplatte mit 37°C (+/- 1°C) geben.
- 10µl Sondenmischung auf die Zellprobe auftropfen und Deckplättchen sorgfältig auflegen. Mit Gummikleber-Lösung versiegeln und vollständig trocknen lassen.

Denaturierung

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

Hybridisierung

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

Waschen nach der Hybridisierung

- Deckgläschen und alle Kleberspuren vorsichtig entfernen.
- Objektträger 2 Minuten in 0,4 x SSC (pH 7,0) bei 72 C (+/- 1°C) waschen.
- Objektträger abtropfen lassen und 30 Sekunden in 2 x SSC, 0,05% Tween -20 bei RT, (pH 7,0), waschen.
- Den Objektträger abtropfen lassen und 10µl des DAPI Antifade zu jeder Probe geben.
- Mit einem Deckglas abdecken, die Luftblasen entfernen and die Farbe 10 Min im Dunkeln entwickeln lassen.
- 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 Raumtemperatur gelagert werden.

Empfehlungen zur Durchführung

- Wärmebehandlung oder Reifung der Proben ist nicht empfehlenswert, da dies zu einer verminderten Signalfuoreszenz führen kann.
- Durch die Verwendung von anderen Reagenzien, als den von Cytocell Ltd. empfohlenen, 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 Konzentrationen der Waschlösungen (Stringenz), 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

Aufgrund des unmittelbaren Nebeneinanderliegens der Proben können in einer normalen Zelle 2 gelbe und 2 blaue Kontrolllichter beobachtet werden (2Y, 2B). Im Falle einer 8p11-Translokation können ein geteiltes und ein fusioniertes Signal beobachtet werden, die zu 1 gelben, 1 roten, 1 grünen und 2 blauen Konformationen führen (1Y, 1R, 1G, 2B). Im Falle einer Amplifikation des FGFR1-Gens können 3 oder mehr gelbe Fusions- und 2 blaue Kontrollsignale beobachtet werden (3+Y, 2B).

Einschränkungen

Protokollierung und Interpretation der FISH Tests sollte nach professionellen Standards für die Praxis und unter Berücksichtigung anderer klinischer und diagnostischer Informationen . Der Test ist als Ergänzung zur klassischen Zytogenetik. Daher sollten therapeutische Maßnahmen nicht allein auf Grundlage der FISH-Ergebnisse veranlasst.

Kundendienst

Bitte wenden Sie sich an die Verkaufs- und Marketingabteilung von Cytocell.

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 cultivadas o no cultivadas 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 diagnóstico prenatal, hematológico y patológico. Después de la fijación, el ADN diana se trata con calor y formamida para desnaturar el ADN bicatenario haciendo que resulte monocatenario. El ADN diana queda entonces disponible para hibridarlo con una sonda de ADN igualmente desnaturado, 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 tras varios lavados 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.

Las metodologías actuales, concretamente la inmunohistoquímica o la hibridación Southern, pueden proporcionar información relacionada con la expresión génica, sin embargo, cuando se llevan a cabo en secciones de tejido (ya sean tejidos embebidos en parafina o criostato), FISH puede proporcionar información a nivel genético, in situ, en el punto específico del tumor. Este proceso puede detectar heterogeneidad celular y permite la detección de pequeños clones de células genéticamente distintas.

Especificaciones de la sonda

FGFR1 proximal, 8p11.2 en rojo
FGFR1 distal, 8p11.2 en verde
Centrómero 8 en azul

La sonda FGFR1 consiste en una señal verde de 154 kb de tamaño que se encuentra telomérica al gen FGFR1, abarcando al gen LETM2-202 y el marcador D8S135, una señal roja que esta a 52 kb, abarca 108 kb y esta centromérica al gen FGFR1. Contiene al marcador D8S389.

Material proporcionado

Sonda: 50µl por vial (5 reacciones) o 100µl por vial (10 reacciones)
Sonda de la región de FGFR1 rojo: 32-40 ng/reacción
Sonda de la región de FGFR1 verde: 96-120 ng/reacción
Sonda de la centromero 8 en azul: 56-70ng/test

La sonda se proporciona mezclada previamente y lista para utilizar en la solución de hibridación (Formamida; sulfato de dextrano; SSC).

Contraste: 150µl por vial (15 reacciones)

DAPI Antifade (ES: 0.125µg/ml DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol)).

Avisos y precauciones

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

Almacenamiento y manejo

El kit Aquarius debe almacenarse a -20°C hasta la fecha de caducidad que se indica en la etiqueta del kit. Los viales de contraste y de sonda deben almacenarse en un lugar oscuro.

Equipo necesarios pero no proporcionados

1. Placa caliente (con una placa sólida y un control de temperatura preciso hasta 80°C).
2. Micropipetas de volumen variable (rango 1µl -200µl)
3. Baño de agua con control preciso de temperatura a 72°C
4. Tubos de microcentrifugado (0.5ml)
5. Microscopio de fluorescencia (lea la sección Recomendaciones para el microscopio de fluorescencia)
6. Recipientes de cristal y de plástico
7. Pinzas
8. Microscopio de fluorescencia con objetivo de inmersión en aceite
9. Centrífuga de banco
10. Portaobjetos para microscopio
11. Cubreobjetos de 24x24mm
12. Cronómetro
13. Incubador 37°C
14. Pegamento

Recomendaciones para el microscopio de fluorescencia

Para una visualización óptima de la sonda, se recomienda utilizar una lámpara de mercurio de 100 vatios y objetivos x63 o x100 Plan-Achromat. El filtro triple banda DAPI/FITC/TRITC es óptimo para ver simultáneamente los fluorocromos naranja y verde. El fluorocromo azul tiene especificidad al espectro Aqua o DEAC (se necesita filtro Aqua).

Preparación de la muestra

El kit está diseñado para su uso en células sanguíneas periféricas cultivadas y fijadas / en células de médula ósea cultivadas y fijadas en fijador de Carnoy o en secciones de tejido embebido en parafina / matrices tisulares (TMA) y debe prepararse según las directrices del laboratorio o la institución.

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

Tras colocar la sección de tejido sobre las muestras, estas deben calentarse a 56 °C durante la noche.

Protocolo FISH para secciones de tejido embebido en parafina

Las secciones de tejido embebido en parafina requieren un tratamiento previo a la hibridación con sondas FISH, es decir, la retirada de la cera de la parafina (desparafinización), rehidratación, tratamiento ácido y digestión de proteínas.

Reactivos:

1. Ácido clorhídrico (HCl)
2. Tampón de lavado 2xSSC (citrate de sodio salino)
3. Histoclear (por ejemplo Fisher Scientific (código prod.: HIS-010-010S))
4. Etanol al 70%, 85% y 100%
5. Pepsina liofilizada (por ejemplo SIGMA, n.º cat.: P6887, 3200-4.500 U/mg)
6. Secciones de tejido embebido en parafina (PETS)
7. Tiocianato de sodio NaSCN (por ejemplo 81,07g/mol SIGMA n.º cat: 251410)
8. Tampón de lavado 0,4xSSC pH 7.0
9. Tampón de lavado 2xSSC-0,05% Tween-20 pH 7.0

Preparación de los reactivos

1. Solución ácida de pretratamiento
 - a) Prepare 100 ml de solución de pretratamiento de NaSCN a 1M disolviendo 8,1 g en 100 ml de agua destilada.
 - b) Eche la solución de pretratamiento en un vaso de Coplin de cerámica o vidrio de 100 ml. Colóquelo en un baño de agua y fije la temperatura a 80°C. Asegúrese de que la temperatura de la solución de pretratamiento está equilibrada a 80 °C antes de comenzar con los pasos importantes.
2. Tampón de lavado 2xSSC
 - a) El tampón 2xSSC debe alcanzar la temperatura ambiente antes de usarse
3. 0,2% de pepsina en HCl 0,01 M
 - a) Añada 10 ml de agua destilada a 1 g de pepsina, mezcle bien y distribuya la solución en cinco tubos (2 ml por tubo). La solución stock preparada con un 10% de pepsina debe almacenarse a -20 °C.
 - b) Añada 10 ml de HCl 0,1 M a 88 ml de agua destilada y precaliente esta solución sumergiéndola en agua a 37 °C. Debe añadir 2 ml de la solución stock con un 10% de pepsina y mezclarla **justo antes** de sumergir las muestras en la solución.

Desparafinización de las secciones (armario de extracción de humo)

1. Marque la zona meta de la sonda con un marcador de diamante.
2. Eche 100 ml de Histoclear en tres vasos de Coplin de cerámica o vidrio etiquetados con los números 1, 2 y 3. Deje los portaobjetos en el vaso 1 durante 10 minutos. Repita el procedimiento con los vasos 2 y 3.
3. Retire los portaobjetos del vaso 1 y elimine el exceso de solución dando un golpecito suave en los bordes de cada portaobjetos sobre un paño de papel.
4. Vierta el Histoclear utilizado en botellas de agua marcadas como Histoclear 1, 2 y 3 cuando haya acabado. Cambie el Histoclear después de haber procesado 200 portaobjetos o si presenta un aspecto nebuloso.

Rehidratación

1. Coloque los portaobjetos en un vaso de plástico que contenga 50ml de etanol al 100% (temperatura ambiente) durante 2 minutos. Descarte el etanol en un contenedor de residuos adecuado.
2. Sustitúyalo por etanol fresco al 100%. Tras 2 minutos, descarte el etanol en un contenedor de residuos adecuado.
3. Coloque los portaobjetos en un vaso de plástico que contenga 50ml de etanol al 70% (temperatura ambiente) durante 2 minutos. Descarte el etanol en un contenedor de residuos adecuado.
4. Sustitúyalo por etanol fresco al 70%. Tras 2 minutos, descarte el etanol en un contenedor de residuos adecuado.
5. Deje secar los portaobjetos al aire.

Tratamiento ácido

1. Coloque los portaobjetos en 100ml de HCl a 0,1 M durante 20 min.

2. Coloque los portaobjetos en agua destilada durante 3 min.
3. Coloque los portaobjetos en tampón 2xSSC durante 3 min.

Pretratamiento (armario de extracción de humos)

1. Coloque los portaobjetos en solución de pretratamiento de NaSCN precalentada a 80 °C en un baño de agua e incube durante 30 min.
2. Retire los portaobjetos del vaso y elimine el exceso de solución dando un golpecito suave en los bordes de cada portaobjetos sobre un paño de papel.
3. Coloque los portaobjetos en agua destilada durante 1 min a temperatura ambiente (en un vaso de plástico)
4. Saque los portaobjetos del vaso y colóquelos en tampón 2xSSC durante 3 min a temperatura ambiente. Descarte el tampón en un contenedor de residuos adecuado.
5. Sustitúyalo por tampón 2xSSC fresco. Tras 3 minutos, descarte el tampón en un contenedor de residuos adecuado.
6. Retire los portaobjetos del vaso y elimine el exceso de solución dando un golpecito suave en los bordes de cada portaobjetos sobre un paño de papel.

Digestión con pepsina

1. Coloque los portaobjetos en la solución de pepsina precalentada e incube durante 10-20 min (vaso de Coplin).
2. Retire los portaobjetos del vaso y dé un golpecito suave en los bordes de cada portaobjetos sobre un paño de papel para eliminar la pepsina.
3. Deje secar los portaobjetos al aire.
4. Deshidrate las secciones de tejido con la serie de etanoles (al 70%, 85% y 100%) en vasos de Coplin (temperatura ambiente) sumergiendo los portaobjetos durante 2 min en cada caso.

Hibridación

1. Añada 10 l de sonda sobre la sección (la cantidad de sonda depende del tamaño de la sección; añada más si es necesario).
2. Aplique un cubreobjetos de 24x24 y selle con pegamento de solución de goma.
3. Coloque el portaobjetos en una plancha caliente y desnaturalícelo a **75 °C durante 5 min.**
4. Coloque los portaobjetos en el incubador a 37 °C durante la noche.

Lavados posteriores a la hibridación

1. Retire los cubreobjetos y todos los restos de pegamento con cuidado.
2. Lave el portaobjetos en 0,4xSSC (pH 7.0) a 72 °C durante 2 min.
3. Escurra el portaobjetos y lávelo en 2xSSC/Tween (pH 7.0) a temperatura ambiente durante 30 segundos.
4. Escurra el portaobjetos y aplique 10-15 l de ES DAPI Antifade.
5. Cúbralo con el cubreobjetos.

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, períodos de incubación prolongados de NaSCN o digestión por pepsina) 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 tratamiento con proteasa dependerá de la edad del bloque, la composición del tejido y la calidad de la fijación tisular. El tratamiento con proteasa 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.

Protocolo FISH

(Nota: Por favor asegúrese que la exposición de la sonda a las luces del laboratorio sea lo mas limitada posible)

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 almacenar el resto de la sonda a -20°C
8. 0
9. Precaliente el portaobjetos y la muestra en una placa caliente a 37°C (+/- 1°C) durante 5 minutos
10. Ponga 10µl de sonda sobre el portaobjetos y aplique cuidadosamente el cubreobjetos. Selle con solución de goma y deje secar completamente

Desnaturalización

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

Hibridación

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

Baños posthibridación

13. Quite el cubreobjetos y los restos de goma cuidadosamente
14. Lave el portaobjetos en 0,4xSSC (pH 7.0) a 72°C (+/- 1°C) durante 2 minutos
15. Seque el portaobjetos y lávelo en 2 x SSC, 0,05% Tween-20 (pH 7.0) a TA durante 30 segundos sin agitación
16. Escurra el portaobjetos y añada 10ul de DAPI antifade sobre cada muestra
17. Aplique un cubreobjetos, elimine burbujas y deje reposar en oscuridad durante 10 minutos
18. Obsérvelo con el microscopio de fluorescencia

Estabilidad de los portaobjetos terminados

Los portaobjetos de FISH permanecen analizables durante 1 mes si se han almacenado en la oscuridad y por debajo de la temperatura ambiente.

Recomendaciones de procedimiento

1. No se recomienda calentar ni envejecer los portaobjetos ya que se podría reducir la fluorescencia de la señal.
2. Las condiciones de hibridación pueden verse afectadas negativamente con el uso de reactivos distintos de los suministrados o recomendados por Cytocell Ltd.
3. Se recomienda encarecidamente el uso de un termómetro calibrado para medir las temperaturas de soluciones, baños de agua e incubadores ya que estas temperaturas son cruciales para el rendimiento óptimo del producto.
4. Las concentraciones del lavado (estrिंगencia), el pH y la temperatura son importantes ya que una estrिंगencia baja puede provocar una fijación no específica de la sonda y demasiada estrिंगencia puede derivar en una falta de señal.
5. Una desnaturalización incompleta puede provocar falta de señal y una desnaturalización excesiva también puede originar una fijación no específica.

Resultados esperados

En una célula normal, dada la cercana yuxtaposición de las sondas, se observarán 2 señales de fusión amarillas y 2 señales de control azules (2A, 2Az). En el caso de una translocación 8p11, se observarán una señal de separación y una señal de fusión que darán como resultado una conformación de 1 señal amarilla, 1 roja, 1 verde y 2 azules (1A, 1R, 1V, 2Az). En el caso de una amplificación del gen FGFR1, observará 3 o más señales de fusión amarillas y 2 señales de control azules (3+A, 2Az).

Limitaciones

La comunicación y la interpretación de FISH debe ser conforme a los estándares de prácticas profesionales, y debe tener en consideración otros 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.

Ayuda al cliente

Póngase en contacto con el departamento de marketing y ventas de Cytocell.

Reference/Bibliographie/Literatur/Bibliografía

1. Theillet,C., Adelaide,J., Louason,G. *et al.* FGFR1 and PLAT genes and DNA amplification at 8p12 in breast and ovarian cancers. *Genes Chromosomes and Cancer* 1993;7:219-26
2. Courjal,F., Cuny,M., Simony-Lafontaine, J., *et al.* Mapping of DNA amplifications at 15 chromosomal locations in 1875 Breast tumours: definition of phenotypic groups. *Cancer Research* 1997;57:4360-7
3. Turner,N., Pearson,A., Sharpe,R., *et al.* FGFR1 amplification drives endocrine therapy resistance and is a therapeutic target in breast cancer. *Cancer Res.* 2010 March 1; 70(5): 2085. 2094.
4. Ruta, M., Howk, R., Ricca, G., *et al.* A novel protein tyrosine kinase gene whose expression is modulated during endothelial cell differentiation. *Oncogene* 3: 9-15, 1988.
5. Macdonald, D., Aguiar, R. C., Mason, *et al.* A new myeloproliferative disorder associated with chromosomal translocations involving 8p11: a review. *Leukemia* 9: 1628-1630, 1995.
6. Goradia, A., Bayerl, M. and Cornfield, D. The 8p11 myeloproliferative syndrome: review of literature and an illustrative case report. *Int. J. Clin. Exp. Path.* 1: 448-456, 2008.
7. Xiao, S., Nalabolu, S. R., Aster, J. C., *et al.* FGFR1 is fused with a novel zinc-finger gene, ZNF198, in the t(8;13) leukaemia/lymphoma syndrome. *Nature Genet.* 18: 84-87, 1998.
8. Smedley, D., Hamoudi, R., Clark, J., *et al.* The t(8;13)(p11;q11-12) rearrangement associated with an atypical myeloproliferative disorder fuses the fibroblast growth factor receptor 1 gene to a novel gene RAMP. *Hum. Molec. Genet.* 7: 637-642, 1998.

Patents and Trademarks

Aquarius and Cytocell are registered trademarks of Cytocell Ltd.



Cytocell Ltd.
4 Technopark
Newmarket Road
Cambridge, CB5 8PB, UK.
T: +44(0)1223 294048
F: +44(0)1223 294986
E: probes@cytocell.com
W: www.cytocell.com