

MetaSystems Probes GmbH  
1. Industriestr. 7, 68804 Altlussheim,  
Germany, Tel: +49 (0)6205 292760



**FORMAMIDE**  
**Danger.** May damage the unborn child. Suspected of causing cancer. May cause damage to organs through prolonged/repeated exposure. Obtain special instructions before use. Do not breathe vapours. Wear protective gloves/protective clothing. IF exposed or concerned: Get medical advice.

**Gefahr.** Kann das Kind im Mutterleib schädigen. Kann vermutlich Krebs erzeugen. Kann die Organe schädigen bei längerer/wiederholter Exposition. Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen. Dampf nicht einatmen. Schutzhandschuhe/Schutzkleidung tragen. Bei Exposition oder Verdacht: Ärztlichen Rat einholen.

**Danger.** Peut nuire au fœtus. Susceptible de provoquer le cancer. Risque présumé d'effets graves pour les organes à la suite d'expositions répétées ou d'une exposition prolongée. Se procurer les instructions avant utilisation. Ne pas respirer les vapeurs. Porter des gants de protection/ des vêtements de protection. EN CAS d'exposition prouvée ou suspectée: consulter un médecin.



## XCytting AneuScore Probes

Usage professionnel uniquement

Plus d'infos disponibles sur [www.metasystems-probes.com](http://www.metasystems-probes.com)

Produit	Marquage	No. Référence	Conditionnement
XA AneuScore III	orange/vert/bleu	D-5613-500-TC	2x (5x100µl)

Le kit de sondes XA Aneuscore III est composé de plusieurs sondes conditionnées en tubes distincts, destiné à la détection des aneuploïdies impliquant les chromosomes 13, 18, 21, X et Y.

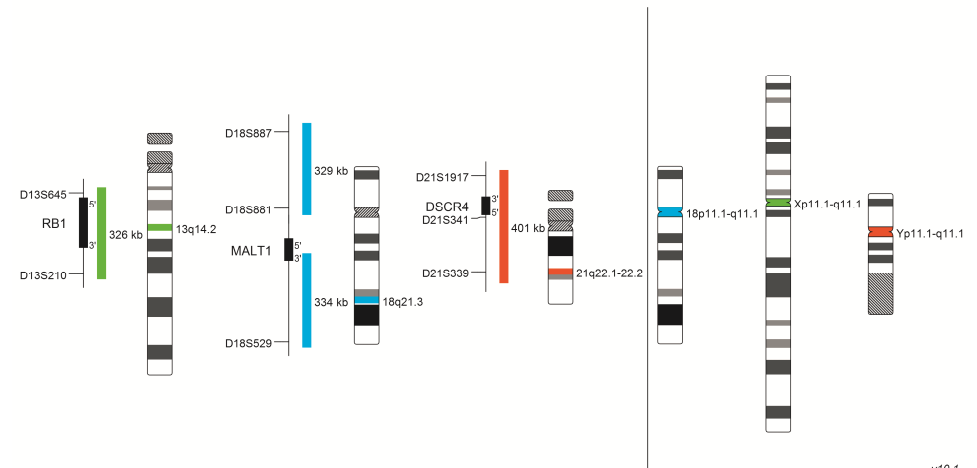
XA 13/18/21 (D-5607-100-TC):

Le mélange de sondes spécifiques XA 13/18/21 permet la détection des variations de nombre des chromosomes 13, 18, et 21. La sonde marquée en vert s'hybride à la région 13q14 incluant le locus RB1, la sonde marquée en bleu (aqua) s'hybride à un locus en 18q21 et la sonde marquée en orange s'hybride à la région 21q22 incluant le locus DSCR4 (région critique 4 pour le syndrome de Down).

XA X/Y/18 (D-5606-100-TC):

Le mélange de sondes spécifiques XA X/Y/18 permet la détection des variations de nombre des chromosomes X, Y, et 18. Le mélange de sondes est composé de séquences répétitives et s'hybride à la région centromérique des chromosomes X marquée en vert, Y marquée en orange et 18 marquée en bleu (aqua).

**Schema de marquage:**



XA 13/18/21 (LOT xxxxx)

et XA X/Y/18 (LOT xxxxx)

## Conditionnement





2x (5x100µl) (∇ 2x50), XA 13/18/21 et XA X/Y/18 sont conditionnées en tubes distincts et sont censées être utilisées pour des hybridations séparées. Les sondes XA AneuScore III sont fournies prêtes à l'emploi dans la solution d'hybridation.

## Utilisation prévue

Toutes les sondes MetaSystems Probes sont destinées pour l'hybridation in situ en fluorescence (FISH) sur des préparations cytogénétiques. XA AneuScore III permet le diagnostic et l'identification des anomalies constitutionnelles p.ex. qui sont présentes dans toutes les cellules du corps (selon la Global Medical Device Nomenclature (GMDN) CT826). L'analyse FISH est utilisée en complément d'autres analyses de diagnostic et ne peut être utilisée seule dans le cadre de décisions de thérapie ou de diagnostic. XA AneuScore III n'est pas prévue pour la détection des anomalies de structure (e.g. translocations) des chromosomes cités ou anomalies de nombre concernant d'autres chromosomes.

## Safety Instructions

Toutes les sondes MetaSystems Probes sont destinées à un usage professionnel uniquement, et doivent être manipulées par du personnel qualifié et formé. Pour garantir la sécurité des opérations et la reproductibilité des résultats, veuillez observer les avertissements et consignes de sécurité ci-dessous:

	<b>DANGER: Le Formamide est un agent toxique et un tératogène potentiel !</b> Les sondes MetaSystems Probes contiennent du Formamide, substance classée comme toxique et tératogène. Peut nuire au fœtus. Ne pas respirer les vapeurs, évitez le contact avec la peau. Porter des gants et une blouse de laboratoire. En cas de contact avec la peau ou les yeux, rincer abondamment à l'eau.
	<b>DANGER: Bains-marie et plaques très chaudes !</b> Les étapes de dénaturation et d'hybridation utilisent des bains-marie et plaques chauffantes à une température >37°C. Veuillez à ne pas entrer en contact direct avec des surfaces ou liquides très chauds. Porter des gants et une blouse de laboratoire. En cas de contact avec la peau, refroidir immédiatement à l'eau froide.
	<b>ATTENTION: Bonnes pratiques de laboratoire!</b> Utiliser selon les principes des bonnes pratiques de laboratoire.
	<b>ATTENTION: Elimination des déchets!</b> Toutes matières dangereuses doivent être éliminées selon les réglementations en vigueur dans votre institution pour l'élimination des déchets dangereux.

## Conservation et Manipulation

Les sondes doivent être conservées à -20°C (±5°C). L'efficacité du produit a été montrée d'être inchangée jusqu'à 20 cycles de congélation et décongélation.

## Transport

Les sondes ADN MetaSystems Probes sont envoyées à température ambiante.

## Équipement nécessaire non fourni

- Bain-marie avec contrôle de température
- Plaque chauffante 75°C (±1°C), avec bloc et contrôle de la température jusqu'à 80°C
- Microscope à fluorescence associés avec des filtres adéquats (voir ci-dessous)
- Micropipettes à volume variable (de 1µl à 1ml) sont calibrées
- Congélateur -20°C (±5°C)
- Huile à immersion recommandée par le fournisseur microscope (au grade fluorescence)
- Thermomètre
- Chambre humide à 37°C (±1°C)
- Système d'imagerie, p.ex. Isis (MetaSystems)
- pH-mètre, calibré
- Forceps
- Lamelles en verre: 22 x 22 mm<sup>2</sup> et 24 x 32 mm<sup>2</sup>
- Minuteurs
- Gants
- Rubber Cement
- Jarres « coplin » en verre ou céramique
- Micro centrifugeuse de pailleasse
- DAPI/antifade

## Microscope et Filtres- Recommandations

- Source lumineuse: systèmes d'illumination à lampe métal halide ou lampes à mercure conventionnelles de 100 watts peut être utilisé.
- Objectifs: objectifs adaptées à l'épi-fluorescence.
- Filtres fluorescents: Utiliser pour la visualisation et/ou le comptage de spots un set de filtres MetaSystems triple ou un set de filtre quad passband. Pour la capture d'images, utiliser des filtres à bande-passante unique correspondant au fluorochrome utilisé. Se renseigner pour plus de détails.

## Spécification du Fluorochrome

Marquage	Absorption max.	Émission max.
Blue ( aqua)	426 nm	480 nm
Green	505 nm	530 nm
Orange	552 nm	576 nm

## Support Client

Veuillez contacter MetaSystems Probes GmbH (coordonnées ci-dessous) ou nos représentants distributeurs dans votre pays. La société MetaSystems Probes renonce à tout titre de propriété sur les marques et noms de produits autres que les siens.



MetaSystems Probes GmbH

1. Industriestraße 7

68804 Altlussheim

Germany

Tel: +49 (0)6205 292760

Fax: +49 (0)6205 2927629

email: info@metasystems-probes.com









URL: www.metasystems-probes.com

Revision: RevB181002-180419v10.1

## Résolution de problèmes

Problème	Cause(s) probables	Solutions recommandées
Absence de signaux FISH au microscope.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Obturbateur fermé / tirette d'arrêt dans le trajet optique.</li> <li>Lampe à fluorescence éteinte.</li> <li>Mauvais cube de filtre dans le trajet optique.</li> <li>Objectifs mal positionnés.</li> <li>Phototube en position camera.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Ouvrir l'obturbateur / dégager la tirette du trajet optique.</li> <li>Allumer la lampe.</li> <li>Positionner le cube correct dans le trajet optique.</li> <li>Positionner l'objectif sur le trajet optique.</li> <li>Diriger la lumière vers les oculaires.</li> </ul>
Signaux faiblissent au bout d'un certain temps.	<ul style="list-style-type: none"> <li>L'huile à immersion s'est infiltrée entre lame et lamelle.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Remonter la lame. Utiliser des lamelles 24 x 32 mm<sup>2</sup> même si la région hybridée est petite.</li> </ul>
Signaux diffus.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Eclairage inadéquat de la lame.</li> <li>La mise au point ne peut être faite correctement.</li> <li>La couche de solution de montage est trop épaisse.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Vérifier le trajet optique du microscope. Ajuster la lampe UV (à fluorescence) correctement. Vérifier la durée de vie de la lampe.</li> <li>Utiliser suffisamment d'huile à immersion. Ne pas mélanger des huiles différentes. Utiliser une huile à immersion spécifique pour la fluorescence.</li> <li>Ne pas mettre trop de solution DAPI/antifade. 10 µl par lame (lamelle de 24 mm x 32 mm) suffisent.</li> </ul>
Signaux faibles.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Lames trop anciennes.</li> <li>Dénaturation des chromosomes inadéquate.</li> <li>Un filtre fluorescence multibande doit être utilisé pour la visualisation.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Les lames doivent être âgées de moins de 3 semaines.</li> <li>Des procédures de vieillissement, cuisson ou post-fixation des préparations peuvent nuire à l'hybridation en ne sont pas recommandées.</li> <li>Utiliser un filtre fluorescence multibande spécifique.</li> </ul>
Bruit de fond intense et diffus en filtre vert.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Le pH des solutions de lavage est trop bas.</li> <li>Concentration en DAPI trop élevée provoquant interférence sur le spectre vert.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>S'assurer que le pH des solutions est compris entre 7.0 and 7.5. Les fluorochromes FITC sont sensibles à un pH inférieur à 7.</li> <li>Réduire la concentration du DAPI/antifade.</li> </ul>
Bruit de fond non-spécifique et intense	<ul style="list-style-type: none"> <li>La présence de protéines cytoplasmiques résiduelles peut diminuer la qualité de l'hybridation.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Prétraiter avec pepsine.</li> </ul>
Si les solutions proposées ne corrigent pas le problème, ou si le problème ne figure pas sur la liste, veuillez contacter MetaSystems Probes.		

## Symboles Utilisés

Symbol	Description
	Ce symbole marque un produit comme « Dispositif Médical de diagnostic In Vitro ».
	Fabriquant
	Tous les avertissements sont signalés par un triangle contenant un point d'exclamation. En fonction de leur nature ils sont complétés avec les mots ATTENTION ou DANGER
	Référence Numéro
	Numéro de lot
	Limites de température de conservation. Les limites inférieures et supérieures sont indiquées.
	No de tests
	Date de péremption

## Préparation des échantillons

### Solutions requises (non-fournies) :

- Eau bi-distillée
- Trypsine/EDTA (Trypsine 0.05%, EDTA\* 4Na 0,02% dans du Hanks s/ Ca<sup>2+</sup> et Mg<sup>2+</sup>, 37°C),
- KCl 0.075 M, 37°C
- Fixateur de Carnoy (Méthanol/Acide Acétique 3:1, ex-tempo, -20°C)
- Lames pour microscopie
- SSC 2X à 37°C
- Une série de solutions d'EtOH : 100%, 85%, 70%, température ambiante.

### Procédure:

- Centrifuger 2-5 ml de liquide amniotique (non-sanglant) 8min à 1000 rpm.
- Aspirer le surnageant et resuspendre délicatement le culot en tapotant le tube.
- Ajouter 5 ml de solution de Trypsine/EDTA et incubé 30 min à 37°C (±1°C).
- Centrifuger 8 min à 1000 rpm, aspirer le surnageant et resuspendre le culot comme précédemment.
- Ajouter 5 ml de sol. KCL 0.075M et incubé 20 min à 37°C (±1°C).
- Ajouter doucement 2 ml de fixateur (Méthanol/Acide Acétique 3:1, -20°C) et mélanger.
- Centrifuger 8 min à 1000 rpm, aspirer le surnageant et resuspendre le culot comme précédemment.
- Ajouter 5 ml de fixateur et incubé 30 min au réfrigérateur (2°-6°C).
- Centrifuger 8 min à 1000 rpm, aspirer le surnageant et resuspendre le culot comme précédemment.
- Ajouter 50-100 µl de fixateur et resuspendre délicatement le culot.
- Déposer 10 µl de suspension par surface sur une lame nettoyée et dégraissée (surface délimitée par un stylo graveur à lame diamant). Des résultats optimaux sont obtenus à 20-25°C et 45-55% d'hygrométrie. Laisser sécher à l'air à température ambiante et contrôler la densité cellulaire au microscope.
- Si la densité cellulaire est insuffisante, rajouter 10µl de suspension et laisser sécher.
- Incuber les lames dans du SSC 2X 15-30 min à 37°C (±1°C).
- Déshydrater les lames dans une série de solutions d'EtOH (70%, 85%, and 100%), 2 min chaque fois. Laisser sécher à l'air.
- Procéder au protocole FISH fourni avec la sonde ou kit de sondes correspondant.

### Remarques générales

- Les sondes MetaSystems Probes ont été développées pour utilisation sur des préparations cytogénétiques fixes avec du fixateur Carnoy et doivent être réalisées selon les protocoles en vigueur dans le laboratoire ou institution.
- Les lames d'échantillon doivent être préparées selon les techniques standards de cytogénétique.

### Stabilité des lames hybridées

- Les lames FISH hybridées sont analysables pendant au moins 6 mois si elles sont conservées à l'abri de la lumière et à -20°C (±5°C).

### Recommandations supplémentaires

- L'usage d'un thermomètre calibré est fortement recommandé. En effet, la température des solutions, du bain-marie et des incubateurs est un paramètre essentiel pour une efficacité optimale du produit.
- Vérifiez soigneusement la température des solutions préchauffées.
- Contrôler soigneusement le pH de toutes les solutions utilisées. Il doit se trouver entre 7.0 et 7.5 à température ambiante.
- La concentration en sels des solutions de lavage, ainsi que le pH et la température (stringence du système) sont critiques. Une faible stringence peut provoquer des hybridations non-spécifiques, et une trop forte stringence peut affaiblir le signal.
- Avant d'ouvrir: centrifuge brièvement l'échantillon de la sonde afin que tout son volume se retrouve dans le culot.

# Protocole FISH pour sondes ADN MetaSystems Probes

## Préparation des lames

1. Utiliser la lame préparée selon la préparation des échantillons.
2. Déposer 10 µl de sonde par lame.
3. Couvrir avec une lamelle 22 x 22 mm<sup>2</sup>.
4. Sceller avec du rubber cement.

## Dénaturation

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

## Hybridation

1. Incuber dans une chambre humide à 37°C (+/- 1°C) pour la nuit (overnight).

## Lavages post-hybridation

### Solutions requises

- 0.4 x SSC (pH 7.0 – 7.5) à 72°C (+/- 1°C)
- 2 x SSC, 0.05% Tween-20 (pH 7.0) à température ambiante

### Procédure

1. Décoller le rubber cement et retirer délicatement la lamelle.
2. Laver la lame dans 0.4 x SSC (pH 7.0) à 72°C (+/- 1°C) pendant 2 minutes.
3. Egoutter la lame et laver ensuite dans 2 x SSC, 0.05% Tween-20 (pH 7.0) à température ambiante pendant 30 secondes.
4. Rinsér la lame brièvement avec de l'eau distillé pour éviter la formation de cristaux, et laisser sécher.

## Contre-coloration, montage, visualisation

### Solutions requises:

- DAPI/antifade (p.ex. MetaSystems Probes DAPI/antifade, D-0902-500-DA)

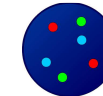
### Procédure:

1. Appliquer 10 µl de la solution DAPI/antifade et couvrir avec une lamelle 24 x 32 mm<sup>2</sup>.
2. Laisser imprégner la solution DAPI/antifade pendant 10min.
3. Continuer à visualiser et analyser avec un microscope à fluorescence.
4. Conserver les lames à l'obscurité et à -20°C (±5°C). Les signaux seront ainsi visibles pendant au moins six mois.

## Résultats attendus

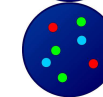
### XA 13/18/21

Cellule normale: Deux signaux verts (2V), deux oranges (2O), et deux bleus (2B).



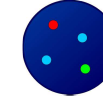
### XA 13/18/21

Cellule anormale: Trisomie 13; trois signaux verts (3V), deux oranges (2O), et deux bleus (2B).



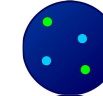
### XA X/Y/18

Cellule normale mâle: Un vert (1V), un orange (1O), et deux signaux bleus (2B).



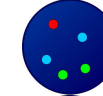
### XA X/Y/18

Cellule normale féminine: Deux verts (2V), et deux signaux bleus (2B).



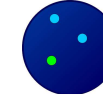
### XA X/Y/18

Cellule anormale mâle: 47,XXY Deux verts (2V), un orange (1O) et deux signaux bleus (2B).



### XA X/Y/18

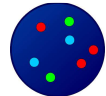
Cellule anormale féminine: 45,X0 Un vert (1V) et deux signaux bleus (2B).



Seule la combinaison la plus fréquente est montrée, d'autres formes significatives peuvent être observées.

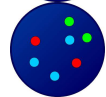
### XA 13/18/21

Cellule anormale: Trisomie 21; deux signaux verts (2V), trois oranges (3O), et deux bleus (2B).



### XA 13/18/21

Cellule anormale: Trisomie 18; deux signaux verts (2V), deux oranges (2O), et trois bleus (3B).



### XA X/Y/18

Cellule anormale mâle: Trisomie 18 Un vert (1V), un orange (1O), et trois signaux bleus (3B).



### XA X/Y/18

Cellule normale féminine: Trisomie 18 Deux verts (2V), et trois signaux bleus (3B).

