

Résolution de problèmes

Problème	Cause(s) probables	Solutions recommandées
Absence de signaux FISH au microscope.	<ul style="list-style-type: none"> Obturateur fermé / tirette d'arrêt dans le trajet optique. Lampe à fluorescence éteinte. Mauvais cube de filtre dans le trajet optique. Objectifs mal positionnés. Phototube en position camera. 	<ul style="list-style-type: none"> Ouvrir l'obturateur / dégager la tirette du trajet optique. Allumer la lampe. Positionner le cube correct dans le trajet optique. Positionner l'objectif sur le trajet optique. Diriger la lumière vers les oculaires.
Signaux faiblissent au bout d'un certain temps.	<ul style="list-style-type: none"> L'huile à immersion s'est infiltrée entre lame et lamelle. 	<ul style="list-style-type: none"> Remonter la lame. Utiliser des lamelles 24 x 32 mm² même si la région hybridée est petite.
Signaux diffus.	<ul style="list-style-type: none"> Eclairage inadéquat de la lame. La mise au point ne peut être faite correctement. La couche de solution de montage est trop épaisse. 	<ul style="list-style-type: none"> Vérifier le trajet optique du microscope. Ajuster la lampe UV correctement. Vérifier la durée de vie de la lampe. Utiliser suffisamment d'huile à immersion. Ne pas mélanger des huiles différentes. Utiliser une huile à immersion spécifique pour la fluorescence. Ne pas mettre trop de solution DAPI/antifade. 10 µl par lame (lamelle de 24 mm x 32 mm) suffisent.
Signaux faibles.	<ul style="list-style-type: none"> Lames trop anciennes. Dénaturation des chromosomes inadéquate. 	<ul style="list-style-type: none"> Les lames doivent être âgées de moins de 3 semaines. Des procédures de vieillissement, cuisson ou post-fixation des préparations peuvent nuire à l'hybridation en ne sont pas recommandées.
Bruit de fond intense et diffus en filtre vert.	<ul style="list-style-type: none"> Le pH des solutions de lavage est trop bas. Concentration en DAPI trop élevée provoquant interférence sur le spectre vert. 	<ul style="list-style-type: none"> 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. Réduire la concentration du DAPI/antifade.
Si les solutions proposées ne corrigent pas le problème, ou si le problème ne figure pas sur la liste, veuillez contacter MetaSystems Probes.		

Support Client

Veuillez contacter MetaSystems Probes GmbH (coordonnées ci-dessous) ou nos représentants distributeurs dans votre pays. La société MetaSystems 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: Rev A 160908

Symboles Utilisés

Symbole	Description		
	Ce symbole marque un produit comme « Dispositif Médical de diagnostic In Vitro ».		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.
	Fabriquant		Référence numéro
	Numéro de tests		Numéro de lot
	Date de péremption		Limites de température de conservation

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.

XCP Y orange
Sondes de Peinture Chromosomique

50µl (V5)

REF D-0324-050-OR

LOT XXXXX
XXXX-XX

-25°C -15°C

XCyting Sondes de Peinture Chromosomique

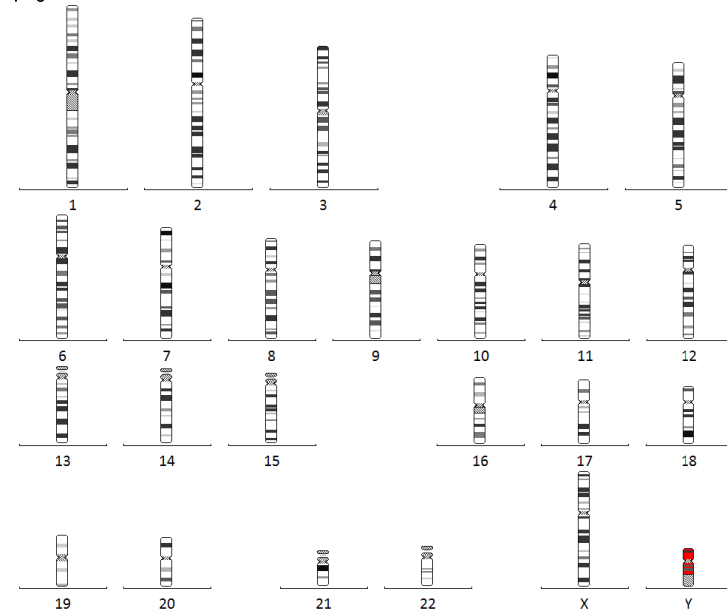
Usage professionnel uniquement

Plus d'infos disponibles sur www.metasystems-probes.com

Produit	Marquage	No. Référence	Conditionnement
XCP Y orange	orange	D-0324-050-OR	50µl

XCyting Sondes de Peinture spécifique pour chromosome Y marquée avec un fluorochrome orange. Une hybridation croisée sur la région pseudoautosomique en Xp22.3 et sur la région homologique XY en Xq21.3 peut être observée. Il est possible de combiner jusqu'à quatre sondes XCP dans une même analyse, ce qui produira des signaux faibles quoique légèrement atténués par rapport à une application simple.

Schéma de marquage:



V 130502

Conditionnement




50µl of XCP Y orange, est fournie prête à l'emploi dans le tampon d'hybridation.

Utilisation prévue

conçue pour l'hybridation in situ en fluorescence (FISH), est utilisé dans l'analyse des aberrations chromosomiques sur des échantillons cytogénétiques fixés obtenus à partir de tissus humains tels que les lymphocytes, amniocytes, moelle osseuse ou tout autre tissu permettant une étude cytogénétique. Hybridé à des chromosomes métaphasiques, elle permet la détection d'anomalies chromosomiques innées ou acquises (e.g. translocations, délétions). La résolution est de l'ordre des fragments chromosomiques détectables au microscope (environ 5MB), mais peut varier en fonction du degré de la condensation chromosomique et de la taille du chromosome étudié. La norme IVD est appliquée selon la directive 98/79EC.

Consignes de sécurité

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 :

	DANGER: Le Formamide est un agent toxique et un tératogène potentiel ! 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.
	DANGER: Bains-marie et plaques très chaudes ! 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.
	ATTENTION: Bonnes pratiques de laboratoire! Utiliser selon les principes des bonnes pratiques de laboratoire.
	ATTENTION: Elimination des déchets! 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 ADN 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.

Equipement 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
- Congélateur -20°C (±5°C)
- Microscope à fluorescence associés avec des filtres adéquats (voir ci-dessous)
- Huile d'immersion pour fluorescence recommandée par le fournisseur microscope (au grade fluorescence)
- Système d'imagerie, p.ex.. Isis (MetaSystems)
- Lamelles en verre: 22 x 22 mm² and 24 x 32 mm²
- Rubber Cement
- DAPI/antifade
- Thermomètre
- Chambre humide à 37°C (±1°C)
- Forceps
- Gants
- Micro centrifugeuse de paillasse
- pH-mètre, calibré
- Minuteurs
- Jarres « coplin » en verre ou céramique

Recommandations pour le Microscope et les Filtres

- 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

Préparation des échantillons

Remarques générales

- Les sondes MetaSystems ont été développées pour utilisation sur des préparations cytogénétiques fixes avec 3 : 1 méthanol/acide acétique et doivent être réalisées selon les protocoles en vigueur dans le laboratoire ou institution.
- Préparer l'échantillon selon des techniques de Cytogénétique standard.

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 sont des paramètres essentiels pour une efficacité optimale du produit.
- Vérifier 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 (stringence), ainsi que le pH et la température sont critiques. Une stringence faible peut provoquer des hybridations non-spécifiques, et une stringence trop forte peut affaiblir le signal.
- Avant d'ouvrir: centrifuger 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

- Etaler la suspension cellulaire sur une lame propre. Sécher à l'air. Si les lames ne sont pas utilisées immédiatement, conserver à -20°C (±5°C).
- Déposer 10 µl de sonde par lame Pour une analyse bicolore, prendre 5 µl de chaque sonde de peinture et mélanger bien avant d'appliquer. Pour un marquage de 3 chromosomes différents, utiliser 2.5 µl du premier XCP-vert, 2.5 µl du second XCP-orange, et un mélange composé de 2.5 µl vert + 2.5 µl orange pour le troisième chromosome. Bien mélanger. Le résultat, une classe de chromosomes verts, une classe de chromosomes orange et une troisième classe jaune, est visible au filtre triple du microscope, ou à l'écran Isis après capture.
- .
- Couvrir avec une lamelle 22 x 22 mm².
- Sceller avec du rubber cement.

Dénaturation

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

Hybridation

- Incuber dans une chambre humide à 37°C (+/- 1°C) pendant 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

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

Contre-coloration

Solutions requises:

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

Procédure:

- Appliquer 10 µl de la solution DAPI/antifade et couvrir avec une lamelle 24 x 32 mm².
- Laisser imprégner à l'abri de la lumière pendant **10min**.
- Procéder à l'aide de la microscopie et de l'analyse.
- Conservser les lames à l'obscurité et à -20°C (±5°C). Les signaux seront ainsi visibles pendant au moins six mois.

Résultats attendus

XCP Y orange hybridée à des métaphases masculines normales humaines présente des signaux d'hybridation sur toute sa longueur de l'unique chromosome Y. Au niveau des régions centromériques et hétérochromatiques, les signaux sont atténués voire absents. Une hybridation croisée sur la région pseudo-autosomique en Xp22.3 ainsi que sur la région d'homologie XY (XY-HR) en Xq21.3 peut être observée. Des translocations impliquant le chromosome Y résultent en des signaux discontinus et des chromosomes présentant des régions non-marquées. Hybridée à des métaphases féminines normales humaines, seul le marquage croisé sur les régions en Xp22.3 et Xq21.3 peut éventuellement être observé.