

Instructions For Use

REF: LPS 008

EWSR1/ERG



FOR PROFESSIONAL USE ONLY

ENGLISH/FRANÇAIS/ITALIANO/DEUTSCH/ESPAÑOL

Further information available at www.cytocell.com

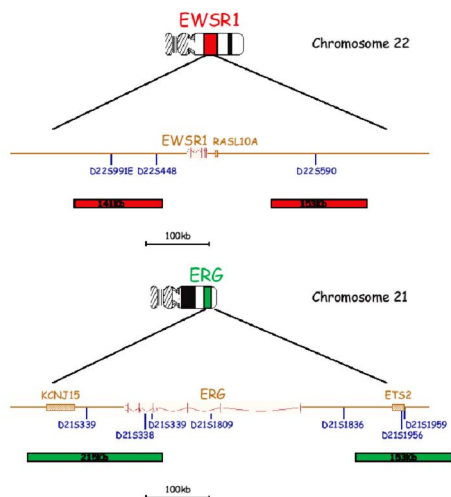
Fluorescence *In Situ* Hybridisation (FISH) has proven to be a vital adjunct to classical cytogenetics since 1986. More recently, because it can show specific changes in individual cells, it has become useful in the assessment of a vast number of clonal lymphoproliferative disorders as it can highlight DNA sequences in any cell, at any stage of its cell cycle. The process relies on the manipulation of the DNA helix inherent stability as a double stranded molecule to first separate the strands and then substitute one of them with a synthetic, fluorescently labelled strand of the same sequence. The helix readily rehybridises and thus labels the target sequence with a detectable fluorescent dye. Recent developments have meant that this valuable technique can now be applied to the assessment of solid tumour biopsies as well which can provide important information for prediction of tumour progression. Current methodologies, namely immunohistochemistry or Southern blotting can provide information at the gene expression level but, when carried out on tissue sections (either cryostat or paraffin embedded), FISH can provide information at a gene level, *in situ*, at the precise site within the tumour. This can reveal cell-to-cell heterogeneity and enable the detection of small clones of genetically distinct cells.

Probe Specification

EWSR1: Red

ERG: Green

Ewing's sarcoma is the second most frequent primary bone cancer in patients below 20 years of age¹. It is characterized mostly by translocation between the two genes EWSR1 (Ewing's Sarcoma Region 1) and FLI1 (Friend leukemia virus integration 1) in the t(11;22)(q24;q12) translocation, found in 85% of such tumours². Ten percent of Ewing's sarcoma cases have a translocation involving EWSR1 and ERG (t(21;22)(q22;q12)), and < 1% of Ewing's sarcomas harbour each of the 7p22 (ETV1), 17q12 (E1AF) and 2q36 (FEV) translocations with EWSR1. EWSR1 is also involved in translocations in desmoplastic small round cell tumour, a subset of angiomatoid fibrous histiocytomas and possibly in myxoid liposarcoma^{3,4}. FISH has been shown to be a more sensitive and reliable method than RT-PCR for the diagnosis of EWS in solid tissues⁵.



The EWSR1/ERG probe mix consists of green probes flanking the breakpoint region at the ERG gene locus and red probes flanking the breakpoint region at the EWSR1 locus. In the normal cell, these probes will appear as discreet red and green spots, one for each homologue (resulting in a 2G 2R conformation). In a t(21;22)(q22;q12) patient, two (yellow) fusion signals in addition to the red and green signals of the normal chromosomes 22 and 21 respectively (1R 1G 2Y) will appear.

Materials Provided

Probe: 100µl per vial (10 tests)

Amount of EWSR1: 160-200 ng/test

Amount of ERG: 480-600ng/test

The probes are provided premixed and ready to use in hybridisation solution (Formamide; Dextran Sulphate; SSC). The probe DNA is directly labelled: EWSR1 probe with a red fluorophore (specific to the Texas Red spectrum) and the ERG probe with a green fluorophore (specific to the FITC spectrum).

Counterstain: 150 µl per vial (15 tests)

The counterstain is DAPI antifade (ES: 0.125 µg/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 620°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

- a) Hotplate (with a solid plate and accurate temperature control up to 80°C)
- b) Variable volume micropipettes range 1 µl to 200 µl
- c) Water bath with accurate temperature control at 72°C
- d) Microcentrifuge tubes (0.5 ml)
- e) Fluorescence microscope (Please see Fluorescence Microscope Recommendation section)
- f) Plastic or glass coplin jars
- g) Forceps
- h) Fluorescence grade microscope lens immersion oil
- i) Bench top centrifuge

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 all fluorophores simultaneously.

Sample Preparation

The kit is designed for use on paraffin embedded tissue sections or tissue microarrays (TMA) and should be prepared according to the laboratory or institution guidelines.

For FISH, 4 to 6 µm thick formalin-fixed and paraffin-embedded tissue specimens should be used.

Paraffin Embedded Tissue Sections FISH Suggested Protocol

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

Reagents:

- > Hydrochloric acid (HCl)
- > 2xSSC (saline sodium citrate) wash buffer
- > Histoclear (e.g. Fisher Scientific (Prod. Code: HIS-010-010S))
- > 70%, 85%, 100% Ethanol
- > Lyophilized pepsin (e.g. SIGMA cat. number: P6887, 3200-4.500 U/mg)
- > Paraffin embedded tissue sections (PETS)
- > Sodium thiocyanate NaSCN (e.g. 81.07g/mol SIGMA cat. number: 251410)
- > 0.4xSSC pH 7.0 wash buffer
- > 2xSSC-0.05% Tween-20 pH 7.0 wash buffer

Reagent Preparation

1. Acid Pre-Treatment Solution
 - > Prepare 100ml of 1M NaSCN Pre-treatment solution by dissolving 8.1g in 100ml distilled water
 - > 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
 - > 2xSSC Buffer should be allowed to reach room temperature before use
3. Pepsin
 - > The 100ml Coplin jar of 0.01M HCl should be preheated in 37°C waterbath. Add 0.2g pepsin should be added and mixed **just before** immersing slides in the solution

De-paraffinisation sections (Fume Cabinet)

- > Mark probe target area with a diamond marker pen.
- > Pour 100 ml Histoclear into three ceramic or glass Coplin jars, labeled 010, 020 and 030. Leave the slides in jar 010 for 10 min. Repeat with jars 020 and 030.
- > Remove slides from jar 030 and remove excess solution by gently tapping the edges of each slide on a paper towel.
- > Pour the used Histoclear into waste bottles marked Histoclear 010, 020, 030 when finished. Change the Histoclear after 200 slides have been processed or if cloudy in appearance.

Re-hydration

- > Place slides in a plastic jar containing 50ml 100% ethanol (room temperature) for 2 min. pour off the ethanol into a suitable waste container.
- > Replace with fresh 100% ethanol. After 2 min pour off the ethanol into a suitable waste container.
- > Place slides in a plastic jar containing 50ml of 70% ethanol (room temperature) for 2 min. pour off the ethanol into a suitable waste container.
- > Replace with fresh 70% ethanol. After 2 min pour off the ethanol into a suitable waste container.
- > Air dry slides.

Acid treatment

- > Place slides in 100ml 0.1 M HCl for 20min.
- > Place slides in distilled water for 3 min.
- > Place slides in 2xSSC buffer for 3 min.

Pre-Treatment (Fume Cabinet)

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

Pepsin Digestion

- > Place slides in the pre-heated pepsin solution and incubate for 10-20 min. (Coplin jar).
- > Remove slides from the jar and gently tap the edges of each slide on a paper towel to remove the Pepsin.
- > Air dry slides.

- Déshydrater les coupes de tissu à travers la série éthanol (70%, 85% et 100%) dans des bocaux Coplin (température ambiante) en immergant les lames pendant 2 min. dans chacune.

Hybridisation

- Couvrir avec le couvre-lame.
- Ajouter 10µl de sonde sur la coupe (la quantité de sonde dépend de la taille de la coupe, ajouter plus si nécessaire)
- Appliquer une plaque de 24x24 et sceller avec une solution de colle.
- Placer la coupe sur une plaque chaude et dénaturer à 75°C pendant 5 min.
- Placer les coupes dans la 37°C incubateur pendant la nuit.

Post Hybridisation Washes

- Retirer le couvre-lame et toutes les traces de colle soigneusement.
- Laver la coupe dans 0,4xSSC (pH 7,0) à 72°C pendant 2 min.
- Rincer la coupe et laver dans 2xSSC/Tween (pH 7,0) à RT pendant 30 sec.
- Rincer la coupe et appliquer 10-15 µl d'ES DAPI antifading.

Comments:

Hybridisation efficiency and tissue morphology are usually negatively correlated. Aggressive pretreatment procedures improving hybridization efficiency (e.g. long incubation times of NaSCN or pepsin digestion) tend to destroy cell structure and tissue morphology. However, mild pretreatment washing 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.

Stability of Finished Slides

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

Procedural Recommendations

- The use of a calibrated thermometer is strongly recommended for measuring temperatures of solutions, waterbaths, and incubators, as these temperatures are critical for optimum product performance.
- The wash concentrations (stringency), pH and temperature 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.

Customer Support

Please contact the Cytocell Sales and Marketing Department.

FRANÇAIS

Depuis 1986, l'hybridation fluorescente *in situ* (FISH) fait preuve d'être un supplément utile pour la cytogénétique classique. Ces derniers temps, le test est, en raison de sa capacité d'identification des changements spécifiques dans les cellules individuelles, devenu utile pour l'analyse d'un grand nombre de syndromes lymphoprolifératifs chroniques, parce qu'il est en mesure de « détecter » les séquences d'ADN dans toutes les cellules et à chaque stade cellulaire. Le processus est basé sur la manipulation de la matrice ADN comme une molécule double-brin. Dans ce cas, les brins d'abord sont séparés et puis un deuxième sera substitué par un brin synthétique marqué avec un fluorochrome de la même séquence. L'adéx se rehybride facilement et ainsi marque la séquence cible avec un colorant fluorescent visible. Les développements récents ont permis que cette technique utile maintenant soit appliquée pour l'analyse de biopsies pour tumeur solide pouvant fournir des informations importantes pour la prédiction sur la progression de la tumeur. Les méthodologies récentes, à savoir l'immunohistochimie ou le transfert de Southern peuvent fournir des informations sur le niveau d'expression du gène, mais le test FISH peut, une fois qu'il est effectué sur des coupes de tissu (soit cryostat, soit tissu inclus en paraffine), fournir des informations au niveau de gène, *in situ*, à l'endroit précis dans la tumeur. Cela permet de révéler une hétérogénéité cellulaire ainsi que de détecter de petits clones de cellules génétiquement différents.

Caractéristiques de la sonde

EWSR1 6 Fluorochrome rouge
ERG6 Fluorochrome vert

Le mélange de sonde EWSR1/ERG consiste de sondes vertes flanquant le point de cassure au locus du gène ERG et de sondes rouges flanquant le point de cassure au locus du gène EWSR1. Dans une cellule normale, ces sondes apparaîtront sous la forme de points rouges et verts individuels, un pour chaque chromosome homologue (conduisant à une conformation 2G 2R). Chez un patient présentant une translocation t(21;22)(q22;q12), deux signaux de fusion (jaunes) en plus des signaux verts et rouges des chromosomes 22 et 21 normaux respectivement (1R 1G 2Y) apparaîtront.

Conditionnement

Sonde : 100µl par tube (10 tests)
Concentration de sonde EWSR1: 160-200 ng/test
Concentration de sonde ERG : 480-600 ng/test
La sonde est fournie prête-à-l'emploi dans le tampon d'hybridation (formamide, sulfate de dextran, SSC). La sonde ADN est directement marquée : la sonde EWSR avec un fluorochrome rouge (spectre Texas Red) et la sonde de ERG avec un fluorochrome vert (spectre FITC).

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

- Pour utilisation en diagnostic *in vitro*. Pour usage professionnel uniquement.
- Porter des gants lors de la manipulation des sondes ADN et du contre-colorant DAPI.
- La sonde contient de la formamide qui est un tératogène. Ne pas respirer les vapeurs. Ne pas mettre en contact avec la peau. Porter des gants, une blouse de laboratoire et manipuler sous une hotte. Après élimination, rincer abondamment avec de l'eau.
- Le DAPI est un carcinogène potentiel. Manipuler avec précautions. Porter des gants et une blouse de laboratoire. Après élimination, rincer abondamment avec de l'eau.
- 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.

Matériel nécessaire non fourni

Équipement

- Plaque chauffante (avec bloc et contrôle de la température jusqu'à 80°C)
- Micropipettes 1µl - 200µl
- Bain-marie avec contrôle de la température à 72°C
- Tubes à microcentrifugation (0,5 ml)
- Microscope à fluorescence (Voir la section Microscopes et Filtres)
- Jarres en plastique ou en verre
- Forçeps
- Huile à immersion pour microscope à fluorescence
- Centrifugeuse de paillasse

Microscopes 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/Texas Red est optimal pour la visualisation des 3 fluorochromes simultanément.

Préparation des échantillons

Le kit a été développé pour utilisation sur des coupes de tissu inclus en paraffine ou de microarrays 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.

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 (déparaffinage), réhydratation, traitement acide et digestion des protéines.

Réactifs :

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

Préparation des réactifs

- Solution de prétraitement acide

- Préparer 100ml de 1 M NaSCN de solution de prétraitement en dissolvant 8,1 g dans 100 ml d'eau distillée.
- 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

- Le tampon de lavage 2xSSC devrait avoir atteint la température ambiante avant d'être utilisé.

3. Pepsine

- La jarre de Coplin de 100ml de 0,0M HCl doit être préchauffée dans un bain-marie de 37°C. Ajouter 0,2g de pepsine dans la solution et la bien mélanger *juste avant* d'immerger les lames.

Déparaffinage des coupes (armoire à ventilation)

- Marquer la région cible de la sonde avec le marqueur à pointe en diamant.
- 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 ».
- 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.
- Verser l'Histoclear usé dans les bouteilles déchets marquées d'Histoclear « 1 », « 2 », « 3 » lorsque la procédure est finie. Échanger l'Histoclear après avoir traité 200 échantillons ou lorsque la solution a un aspect trouble.

Réhydratation

- 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.
- Remplir la jarre de l'éthanol à 100% frais. Après 2 minutes, verser l'éthanol dans un conteneur à déchets adéquat.
- 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.
- Remplir la jarre de l'éthanol à 70% frais. Après 2 minutes, verser l'éthanol dans un conteneur à déchets adéquat.
- Laisser sécher les lames à l'air.

Traitement acide

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

Prétraitement (armoire à ventilation)

- 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.
- Sortir les échantillons de la jarre et enlever la solution excédentaire en tapant doucement les arêtes de chaque lame sur une serviette en papier.
- Mettre les échantillons dans de l'eau distillée pendant 1 minute à température ambiante (dans une jarre en plastique).
- 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.
- Remplir le tampon de lavage 2xSSC. Après 3 minutes, verser le tampon de lavage dans un conteneur à déchets adéquat.
- 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

- Mettre les échantillons dans une solution de pepsine préchauffée et les incubent pendant 10-20 minutes (jarre de Coplin).
- Sortir les échantillons de la jarre et taper doucement les arêtes de chaque lame sur une serviette en papier pour enlever la pepsine.
- Laisser sécher les lames à l'air.
- 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

- 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)
- Couvrir avec une lamelle de 24x24 et sceller avec du rubber cément.
- Mettre la lame sur une plaque chaude et la dénaturer à 75°C pendant 5 minutes.
- Mettre les lames dans l'incubateur pendant la nuit à une température de 37°C.

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 pendant 2 minutes.
- Egoutter la lame et laver dans du tampon 2xSSC/Tween (pH 7,0) à température ambiante pendant 30 secondes.
- Egoutter la lame et déposer 10-15 µl d'ES DAPI antifading.
- Couvrir avec une lamelle.

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.

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

- 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.

Support Client

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

ITALIANO

L'ibridazione *In situ* in fluorescenza (FISH) ha dimostrato di essere un'aggiunta di vitale importanza alla citogenetica classica. Negli ultimi anni, in particolare modo, in virtù della sua capacità di mostrare le specifiche modifiche all'interno delle singole cellule, si è rivelata estremamente utile nella valutazione di un vasto numero di disordini linfoproliferativi clonali in quanto in grado di evidenziare le sequenze di DNA in ciascuna cellula e in ciascuno stadio del relativo ciclo cellulare. Il processo si connette alla manipolazione della stabilità concernente l'etica del DNA come una molecola a doppio filamento per separare per prima cosa i filamenti e quindi per sostituire uno di loro con un filamento sintetico etichettato in modo fluorescente della medesima sequenza. L'etica immediatamente si reibrida e quindi etichetta la sequenza target con un colorante fluorescente individuabile. Recenti sviluppi hanno dimostrato che questa tecnica efficace ora può essere applicata alla valutazione di biopsie di tumori solidi in quanto suscettibile di fornire importanti informazioni in merito alla predizione della progressione tumorale. Le moderne metodologie, in particolare modo l'immunohistochimica o la Southern Blotting possono fornire informazioni a livello di espressione del gene ma, quando eseguite su sezioni tissutali (sia che questi siano sezionati con criostat o inclusi in paraffina), FISH è in grado di fornire informazioni a livello del gene, *in situ*, in corrispondenza del sito preciso all'interno del tumore. Questo è suscettibile di rivelare la eterogeneità cellulare per cellula e di consentire altresì il rilevamento di piccoli cloni di cellule geneticamente distinte.

Specifiche della sonda

EWSR Rosso

ERG Verde

La miscela di sonde EWSR1/ERG consiste di sonde verdi che costeggiano la regione di breakpoint in corrispondenza dell'ubicazione del gene ERG e sonde rosse che costeggiano la regione di breakpoint in corrispondenza dell'ubicazione del gene EWSR1. Nella normale cellula queste sonde appariranno come dei discreti punti rossi e verdi, uno per ciascun omologo (risultante in una conformazione di 2G 2R). In un paziente t(21;22)(q22;q12), saranno presenti due segnali in fusione (giallo) oltre ai segnali rossi e verdi dei normali cromosomi, rispettivamente 22 e 21 (1R 1G 2Y).

Materiali forniti

Sonda: 100µl per provetta (10 test)
Quantità di EWSR probe: 160-200 ng/test
Quantità di ERG: 480-600 ng/test
La sonda è fornita già miscelata e pronta per l'uso nella soluzione di ibridazione (Formamide; Destrano solfato; SSC). Il DNA della sonda è marcato direttamente: EWSR probe marcata con un fluoroforo rosso (specificità nello spettro Texas Red) e ERG control probe marcata con un fluoroforo verde (specificità nello spettro FITC).

Colorante di contrasto :

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

Avvertenze e misure precauzionali

1. Per uso diagnostico in vitro. Per uso professionale.
2. Quando si manipolano le sonde ed il colorante di contrasto DAPI è necessario indossare i guanti.
3. Le miscele di sonda contengono formamide, una sostanza cancerogena. 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.
4. Il DAPI è un potenziale cancerogeno. Maneggiare con cura, indossare guanti ed un camicia da laboratorio. Per lo smaltimento, lavare con grandi quantità di acqua.
5. 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 620°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

- a) Piastra riscaldante (con una piastra solida ed un controllo accurato della temperatura fino a 80°C).
- b) Micropipette a volume variabile compreso tra 1µl e 200µl.
- c) Bagnomaria Bagno termostato con controllo accurato della temperatura a 72°C
- d) Provette da microcentrifuga (0,5 ml)
- e) Microscopio a fluorescenza (riferirsi alla sezione Configurazione ottimale del microscopio e dei filtri)
- f) Contenitori di Coplin in plastica o vetro
- g) Pinzette
- h) Olio per lenti ad immersione del microscopio a fluorescenza
- i) Centrifuga da banco

Configurazione ottimale del microscopio e dei filtri

Per una visualizzazione ottimale della sonda si raccomanda di utilizzare una lampada a mercurio da 100 watt ed obiettivi plan apochromat 63x e 100x. Il filtro triplo DAPI/FITC/Texas Red è ottimale per visualizzare tutti e tre i fluorofori contemporaneamente.

Preparazione del campione

Il kit è stato progettato per l'utilizzo di sezioni tissutali incluse in paraffina o 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 m.

Protocollo suggerito da FISH per le sezioni tissutali incluse in paraffina

Le sezioni di tessuto incluso 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)
- > Tioiocianato 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

1. 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 un 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.
2. Soluzione tampone di lavaggio 2xSSC
 - > La soluzione tampone 2xSSC deve raggiungere la temperatura ambiente prima dell'uso
3. Pepsina
 - > La vaschetta di Coplin da 100 ml di 0,01 M HCl deve essere pre-riscaldata in bagnomaria a 37°C. Aggiungere 0,2 grammi di pepsina che deve essere aggiunta e miscelata *immediatamente prima* di immergere i vetrini all'interno della 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 01a, 02a e 03a. Lasciare i vetrini all'interno della vaschetta 01a per 10 minuti. Ripetere la medesima procedura con le vaschette 02a e 03a.
- > Rimuovere i vetrini dalla vaschetta 03a 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 01a, 02a e 03a, 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 M HCl 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 pre-riscaldata 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 dalla 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.
- > 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

- > Posizionare i vetrini all'interno di una soluzione di pepsina preriscaldata e incubare per 10-29 minuti (vaschetta di Coplin).
- > Rimuovere i vetrini dalla vaschetta e battere delicatamente le estremità di ciascun vetrino su un asciugamano di carta per rimuovere la Pepsina.
- > Fare asciugare i vetrini all'aria.
- > 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

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

Lavaggi Post-Ibridazione

- > Rimuovere la protezione e tutte le tracce di colla prestando la massima attenzione.
- > Lavare il vetrino all'interno di 0,4xSSC (pH 7.0) a 72°C per 2 minuti.
- > Scolare il vetrino e lavarlo all'interno di 2xSSC/Tween (pH 7.0) a temp. ambiente per 30 secondi.
- > Scolare il vetrino e applicare 10-15 l di antifade ES DAPI.
- > Coprire con un foglio protettivo.

Commenti:

L'efficacia dell'ibridazione e la morfologia tissutale sono solitamente correlate a 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.

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. Si raccomanda fortemente l'utilizzo di un termometro calibrato per misurare la temperatura delle soluzioni, dei bagni termostati e degli incubatori in quanto critiche per il funzionamento ottimale del prodotto.
2. Le concentrazioni del lavaggio (stringenza), il pH e la temperatura sono importanti in quanto condizioni di stringenza blande possono favorire un legame non specifico della sonda e condizioni di stringenza troppo alte possono portare alla perdita del segnale.

Assistenza clienti

Contattare l'Ufficio Commerciale e Vendita della Cytocell.

DEUTSCH

Fluoreszenz *In Situ* Hybridisierung (FISH) hat sich seit 1986 als hilfreiche Ergänzung zur klassischen Zellgenetik bewährt. In jüngster Zeit ist der Test auch dadurch, dass er spezifische Veränderungen in den einzelnen Zellen anzeigen kann, besonders für die Analyse einer Reihe vieler verschiedener klonaler, lymphgewebsbildender Erkrankungen sehr hilfreich, da er DNA-Sequenzen in jeder gewünschten Zelle und in jeder Phase der Zelle "erhellend" kann. Das Verfahren basiert auf der Manipulation der inhärenten Stabilität der DNA-Helix als doppelsträngiges Molekül, dabei werden zunächst die zwei Stränge getrennt und dann wird einer davon durch einen synthetischen fluoreszenz markierten Strang der gleichen Sequenz ersetzt. Die Helix rehybridisiert sich dann ohne Weiteres und markiert somit die Zielsequenz mit einer sichtbaren fluoreszierenden Farbe.

Jüngste Entwicklungen haben dazu beigetragen, dass diese wertvolle Methode nun auch für die Analyse von Tumorgewebebiopsien verwendet werden kann, die dann wichtige Informationen für die Vorhersage von Tumorwachstum liefert. Aktuelle Techniken wie die Immunohistochemie oder Southern Blotting können Informationen auf der Stufe der Genexpression liefern, wenn jedoch FISH an Gewebeschnitten (entweder im Kryomikrotom oder in Paraffineinbettung) angewendet wird, kann die Analyse in-situ Ergebnisse auf Gen-Niveau präzise an der gewünschten Stelle innerhalb des Tumors liefern. Dies kann Heterogenitäten von Zelle zu Zelle aufdecken und die Identifikation kleiner Klone von genetisch einzigartigen Zellen ermöglichen.

Sondenspezifitation

Das /EWSR1/ERG Sondenset besteht aus grünen Sonden, die die Brechpunktregion des ERG Genorts flankieren und roten Sonden, die die Brechpunktregion des EWSR1 Genorts flankieren. In einer normalen Zelle erscheinen diese Sonden als diskrete rote und grüne Flecke, je einer für jedes Homolog (was eine 2G 2R Anordnung ergibt). Bei einem t(21;22)(q22;q12) Patienten, sollten zwei (gelbe) Fusionsignale zusätzlich zu den grünen und den roten Signalen der normalen Chromosom 22 und 21 (1R 1G 2Y) zu sehen sein.

Kitkomponenten

Sonde: 100µl pro Röhrchen (10 Tests)

Menge an EWSR: 160-200 ng/Test

Menge an ERG: 480-600 ng/Test

Die Sonden wird 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. Sondernomien 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 620°C gelagert werden. Die Röhrchen mit den Sonden und der Gegenfärbung müssen im Dunkeln aufbewahrt werden.

Benötigte, aber nicht mitgelieferte Laborgeräte

- a) Heizplatte (mit stabiler Heizplatte und genauer Temperaturregelung bis 80°C)
- b) Mikropipetten mit variablem Volumen von 1 µl - 6 200 µl
- c) Wasserbad mit genauer Temperaturkontrolle bei 72°C.
- d) Mikro-Zentrifugenröhrchen (0,5 ml).
- e) Fluoreszenzmikroskop (siehe auch Empfehlungen zum Fluoreszenzmikroskop).
- f) Coplin-Färbetrog aus Kunststoff oder Glas.
- g) Pinzette.
- h) Für Fluoreszenzobjektive geeignetes Immersionsöl.
- i) Tischzentrifuge.

Empfehlungen zum Fluoreszenzmikroskop

Zur bestmöglichen Beobachtung der Probe empfehlen wir die Verwendung einer 100 Watt Quecksilberdampfampe und von Plan Achromat Objektiven mit 63-facher oder 100-facher Vergrößerung. Das Dreifach-Bandpassfilter DAPI/FITC/Texasrot ist für die simultane Beobachtung aller drei Fluorophore optimal geeignet.

Probenvorbereitung

Das Kit ist für die Verwendung mit paraffineingebetteten Gewebeschnitten oder Tissue-microarrays (TMA) konzipiert und sollte gemäß den Richtlinien des Labors oder der Einrichtung vorbereitet werden.

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

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 Proteinverdaung.

Reagenzien:

- > Salzsäure (HCl)
- > 2xSSC (salzhaltiges Natriumciträt) 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

1. 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.
2. 2xSSC Waschlösung
 - > 2xSSC Waschlösung sollte vor Verwendung Zimmertemperatur erreicht haben.
3. Pepsin
 - > Der 100ml Coplin-Färbetrog mit 0.01M HCl sollte im Wasserbad auf 37°C erwärmt werden. *Kurz bevor* Sie dann die Proben in die Lösung tauchen, geben Sie 0,2g Pepsin hinzu und rühren es ein.

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 stützen.
- > 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 Kunststofftrög 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 Kunststofftrög 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 destiliiertes Wasser.
- > Legen Sie die Proben für 3 Minuten in 2xSSC Waschlösung

Vorbehandlung (Abzugsschrank)

- > Legen 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 Trog und schütteln die überschüssige Lösung ab, indem Sie die Kanten eines jeden Objektträgers vorsichtig auf ein Papiertuch stützen.
- > Legen Sie die Proben für 1 Minute bei Zimmertemperatur in destiliiertes Wasser (in einen Kunststoffrog).
- > Entnehmen Sie die Proben aus dem Trog 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 Trog und schütteln die überschüssige Lösung ab, indem Sie die Kanten eines jeden Objektträgers vorsichtig auf ein Papiertuch stützen.

Pepsinverdauung

- > Legen Sie die Proben in die vorgewärmte Pepsin-Lösung und inkubieren Sie sie für 10 bis 20 Minuten (Coplin-Färbetrog).
- > Entnehmen Sie die Proben aus dem Trog und stützen 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 Trog.

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.

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

1. 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.
2. 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.

Kundendienst

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

ESPÄÑOL

Desde 1986 la hibridación *in situ* fluorescente (FISH) ha demostrado ser un complemento vital para la citogenética clásica. Más recientemente, puesto que puede indicar cambios específicos en células individuales, ha ganado utilidad en la evaluación de un gran número de trastornos clonales linfoproliferativos pues puede delimitar secuencias de ADN en cualquier célula y en cualquier fase de su ciclo celular. El proceso se basa en la manipulación de la estabilidad inherente de la hélice de ADN como molécula de doble cadena para separar primero las cadenas y luego sustituir una de ellas con una cadena de la misma secuencia sintética y etiquetada con fluorescencia. La hélice en seguida se rehibridiza y, de este modo, etiqueta la secuencia meta con una tinción fluorescente detectable. Los recientes avances han supuesto la aplicación de esta valiosa técnica también para la evaluación de biopsias de tumores sólidos, lo cual proporciona una importante información para predecir la evolución de los tumores. Las metodologías actuales, en concreto la inmunohistoquímica o la transferencia southern, pueden dar información a escala de expresión génica pero, cuando se realizan con secciones de tejido (ya estén embebidos en parafina o criostato), FISH puede suministrar información a escala de gen, *in situ*, en el lugar exacto dentro del tumor. De este modo, puede revelarse heterogeneidad célula a célula y se consiguen detectar pequeños clones de células distintas genéticamente.

Especificaciones de la sonda

La combinación de sondas EWSR1/ERG está compuesta de sondas verdes que flanquean la región de punto de ruptura en el locus del gen ERG y sondas rojas que flanquean la región de punto de ruptura en el locus EWSR1. En una célula normal, estas sondas aparecerán como puntos discretos rojos y verdes, uno por cada homólogo (creando una conformación 2G 2R). En un paciente t(21;22)(q22;q12), aparecerán dos señales de fusión (amarillo) además de las señales roja y verde de los cromosomas normales 22 y 21 respectivamente (1R 1G 2Y).

Material proporcionado

Sonda: 100µl por vial (10 reacciones)
Sonda de la región de EWSR: 160-200 ng/reacción
Sonda de la región de ERG: 480-600 ng/reacción
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 contraindicación 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. 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

- a) Placa caliente (con una placa sólida y un control de temperatura preciso hasta 80°C).
- b) Micropipetas de volumen variable (rango 1µl -200µl)
- c) Baño de agua con control preciso de temperatura a 72°C
- d) Tubos de microcentrifugado (0,5 ml)
- e) Microscopio de fluorescencia (lea la sección Recomendaciones para el microscopio de fluorescencia)
- f) Recipientes de cristal y de plástico
- g) Pinzas
- h) Microscopio de fluorescencia con objetivo de inmersión en aceite
- i) Centrífuga de banco

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-Apochromat. El filtro de triple banda DAPI/FITC/Texas Red es óptimo para ver simultáneamente los tres fluorocromos.

Preparación de la muestra

El kit está diseñado para su uso en secciones de tejido embebido en parafina o 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.

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:

- > Ácido clorhídrico (HCl)
- > Tampón de lavado 2xSSC (citrate de sodio salino)
- > Histoclear (por ejemplo Fisher Scientific (código prod.: HIS-010-010S)

- > Etanol al 70%, 85% y 100%
- > Pepsina liofilizada (por ejemplo SIGMA, n.º cat.: P6887, 3200-4.500 U/mg)
- > Secciones de tejido embebido en parafina (PETS)
- > Trociano de sodio NaSCN (por ejemplo 81.07g/mol SIGMA n.º cat.: 251410)
- > Tampón de lavado 0.4xSSC pH 7.0
- > Tampón de lavado 2xSSC-0.05%Tween-20 pH 7.0

Preparación de los reactivos

1. Solución ácida de pretratamiento
 - > Prepare 100 ml de solución de pretratamiento de NaSCN a 1M disolviendo 8,1 g en 100 ml de agua destilada.
 - > 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
 - > El tampón 2xSSC debe alcanzar la temperatura ambiente antes de usarse
3. Pepsina
 - > El vaso de Coplin de 100 ml de HCl a 0,01M debe precalentarse en un baño de agua 37 °C. Los 0,2g de pepsina deben añadirse y mezclarse **justo antes** de sumergir los portaobjetos en la solución.

Desparafinización de las secciones (armario de extracción de humo)

- > Marque la zona meta de la sonda con un marcador de diamante.
- > Eche 100 ml de Histoclear en tres vasos de Coplin de cerámica o vidrio etiquetados con los números ó10, ó20 y ó30. Deje los portaobjetos en el vaso ó10 durante 10 minutos. Repita el procedimiento con los vasos ó20 y ó30.
- > Retire los portaobjetos del vaso ó30 y elimine el exceso de solución dando un golpecito suave en los bordes de cada portaobjetos sobre un paño de papel.
- > Vierta el Histoclear utilizado en botellas de agua marcadas como Histoclear ó10, ó20 y ó30 cuando haya acabado. Cambie el Histoclear después de haber procesado 200 portaobjetos o si presenta un aspecto nebuloso.

Rehidratación

- > 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.
- > Sustitúyalo por etanol fresco al 100%. Tras 2 minutos, descarte el etanol en un contenedor de residuos adecuado.
- > 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.
- > Sustitúyalo por etanol fresco al 70%. Tras 2 minutos, descarte el etanol en un contenedor de residuos adecuado.
- > Deje secar los portaobjetos al aire.

Tratamiento ácido

- > Coloque los portaobjetos en 100ml de HCl a 0,1 M durante 20 min.
- > Coloque los portaobjetos en agua destilada durante 3 min.
- > Coloque los portaobjetos en tampón 2xSSC durante 3 min.

Pretratamiento (armario de extracción de humos)

- > Coloque los portaobjetos en solución de pretratamiento de NaSCN precalentada a 80 °C en un baño de agua e incube durante 30 min.
- > 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.
- > Coloque los portaobjetos en agua destilada durante 1 min a temperatura ambiente (en un vaso de plástico)
- > 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.
- > Sustitúyalo por tampón 2xSSC fresco. Tras 3 minutos, descarte el tampón en un contenedor de residuos adecuado.
- > 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

- > Coloque los portaobjetos en la solución de pepsina precalentada e incube durante 10-20 min (vaso de Coplin).
- > 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.
- > Deje secar los portaobjetos al aire.
- > 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

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

Lavados posteriores a la hibridación

- > Retire los cubreobjetos y todos los restos de pegamento con cuidado.
- > Lave el portaobjetos en 0.4xSSC (pH 7.0) a 72 °C durante 2 min.
- > Escurre el portaobjetos y lávelo en 2xSSC/Tween (pH 7.0) a temperatura ambiente durante 30 segundos.
- > Escurre el portaobjetos y aplique 10-15 l de ES DAPI Antifade.
- > 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, periodos 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 tenga zonas vastas de necrosis. Estas muestras deben manipularse con especial atención para evitar una digestión excesiva.

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. Se recomienda encarecidamente el uso de un termómetro calibrado para medir la temperatura de las soluciones, baños de agua e incubadores ya que estas temperaturas son cruciales para el rendimiento óptimo del producto.
2. Las concentraciones de lavado, el pH y la temperatura son importantes puesto que un rigor escaso en el lavado puede resultar en una fijación no específica de la sonda mientras que demasiada puede dar como resultado la falta de señal.

Ayuda al cliente

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

Patents and Trademarks

Aquarius and Cytocell are registered trademarks of Cytocell Ltd.

Reference/Bibliographie/Literatur/Bibliografia

1. Bernstein M. et al. 2006 Oncologist 11(5):503-19
2. Turc-Carel C. et al. 1988 Canc Genet Cytogenet 32:229-238
3. Borden EC et al. 2003 Clin Canc Res. 9:1941-1956
4. Sandberg AA & Bridge JA 2000 Cancer Genet Cytogenet 123:1-26
5. Bridge RS et al 2006 Modern Pathology 19: 1-8

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

001/2010-06-24

DSM/126/CE