



FlexISH- FISH-Tissue Implementation Kit

REF	Z-2182-5	Σ	5
REF	Z-2182-20	Σ	20

Pour l'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH), utiliser n'importe quelle sonde FlexISH



Dispositif médical de diagnostic *in vitro*
En accord avec la directive européenne 98/79/CE

1. Utilisation prévue

FlexISH-Tissue Implementation Kit est prévu pour être utilisé avec les sondes FlexISH pour la détection des aberrations génétiques, par exemple, les translocations, les suppressions, les amplifications et les aneuploïdies chromosomiques, dans des échantillons fixés au formol et inclus en paraffine par hybridation *in situ* en fluorescence (FISH). L'interprétation des résultats doit être effectuée dans le contexte de l'histoire clinique du patient par rapport à d'autres données cliniques et pathologiques du patient par un pathologiste qualifié.

2. Pertinence clinique

Des aberrations génétiques, par exemple, les translocations chromosomiques, les suppressions et/ou les amplifications, sont associées à diverses tumeurs chez l'homme.

3. Principe du test

L'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) permet la détection et la visualisation de séquences d'acide nucléique spécifiques dans une préparation cellulaire. Les fragments d'ADN marqués par fluorescence, appelés sondes FISH, et leurs brins d'ADN complémentaires dans les échantillons sont dénaturés puis ré-appariés pendant l'hybridation. Par la suite, les fragments de sonde non spécifiques et non hybridés sont éliminés par des étapes de lavage stringent. Après une contre coloration de l'ADN avec du DAPI, les fragments de sondes hybridés sont visualisés au moyen d'un microscope à fluorescence équipé de filtres d'excitation et d'émission spécifiques aux fluorochromes avec lesquels les fragments de sondes FISH ont été marqués.

4. Réactifs fournis

Le FlexISH-Tissue Implementation Kit est composé de :

Code	Composant	Quantité		Contenant
		20	5	
PT1	<u>Heat Pretreatment Solution Citric</u>	500 ml	150 ml	Flacon avec bouchon à visser (grand)
ES1	<u>Pepsin Solution</u>	4 ml	1 ml	Flacon compte-gouttes, bouchon transparent
WB10	<u>5x FlexISH Wash Buffer</u>	500 ml	150 ml	Flacon avec bouchon à visser (grand)
MT7	<u>DAPI/DuraTect-Solution</u>	0,8	0,2	Cuve à réaction, couvercle bleu
	Mode d'emploi	1	1	

Z-2182-20 (20 tests) : Les composants **ES1** et **MT7** suffisent pour 20 réactions. Le composant **WB10** suffit pour 11 x 3 cuves à coloration de 70 ml chacune. Le composant **PT1** suffit pour 7 cuves à coloration de 70 ml chacune.

Z-2182-5 (5 tests) : Les composants **ES1** et **MT7** suffisent pour 5 réactions. Le composant **WB10** suffit pour 3 x 3 cuves à coloration de 70 ml chacune. Le composant **PT1** suffit pour 2 cuves à coloration de 70 ml chacune.

5. Matériel requis mais non fourni

- FlexISH probe
- Échantillons pour les contrôles positifs et négatifs
- Lames pour microscope, chargées positivement
- Bain-marie (37 °C, 98 °C)
- Plaque chauffante ou système d'hybridation
- Chambre humide + four à hybridation ou système d'hybridation
- Pipettes ajustables (10 µl, 30 µl)
- Pots ou bacs de coloration
- Chronomètre
- Thermomètre calibré
- Ethanol ou réactif à l'alcool
- Xylène
- Eau distillée ou déminéralisée
- Lamelles (22 mm x 22 mm, 24 mm x 60 mm)
- Ciment caoutchouc, par exemple : Fixogum Rubber Cement (Prod. N°E-4005-50/-125) ou similaire
- Microscope à fluorescence adéquatement entretenu (400-1000x)
- Huile à immersion compatible avec la microscopie à fluorescence
- Sets de filtres appropriés

6. Stockage et manipulation

Les composants du kit doivent être conservés entre 2 et 8 °C. En outre, la DuraTect/DAPI-Solution (**MT7**) doit être conservée à l'abri de la lumière. Remettre dans les conditions de stockage immédiatement après utilisation. Si ces conditions de stockage sont suivies, le kit fonctionnera, sans perte d'efficacité, au moins jusqu'à date de péremption imprimée sur l'étiquette. Ne pas utiliser les réactifs après leur date de péremption indiquée sur l'étiquette.

7. Avertissements et précautions

- Lire les instructions avant utilisation !
- Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption.
- Ce produit contient des substances (en faibles concentrations et volumes) nocifs pour la santé et potentiellement infectieux. Éviter le contact direct avec ces réactifs. Prenez les mesures de protection appropriées (utilisez des gants jetables, des lunettes de protection et des vêtements de laboratoire).
- Si les réactifs entrent en contact avec la peau, rincer immédiatement avec beaucoup d'eau.
- Une fiche signalétique de sécurité à l'usage de l'utilisateur professionnel est disponible sur demande.
- Ne pas réutiliser les réactifs.

- Il ne faut pas laisser sécher les échantillons pendant l'hybridation et les étapes de lavage !
- DAPI/DuraTect-Solution (MT7) ne doit pas être exposée à la lumière, en particulier à une lumière intense, pendant longtemps ; c'est-à-dire que chaque étape doit être effectuée, si possible, dans l'obscurité et/ou en utilisant des récipients opaques !

Mentions de danger et conseils de prudence pour PT1 et WB10 :

Le composant dangereux déterminant est un mélange de 5-chloro-2-méthyl-4-isothiazoline-3-one [CE n°247-500-7] et 2-méthyl-2h-isothiazol-3-one [CE n° 220-239-6] (3:1).



Avertissement

H317	Peut provoquer une allergie cutanée.
P261	Éviter de respirer les poussières/fumées/gaz/brouillards/vapeurs/aérosols.
P272	Les vêtements de travail contaminés ne devraient pas sortir du lieu de travail.
P280	Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage.
P302+P352	EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU : Laver abondamment à l'eau et au savon.
P333+P313	En cas d'irritation ou d'éruption cutanée : Consulter un médecin.
P362+P364	Enlever les vêtements contaminés et les laver avant réutilisation.

8. Restrictions

- Destiné à une utilisation en diagnostic *in vitro*.
- Destiné à un usage professionnel uniquement.
- L'interprétation clinique de la présence ou de l'absence de marquage doit être faite en tenant compte du contexte Clinique, de la morphologie, et d'autres critères histo-pathologiques ainsi que d'autres tests diagnostiques. Il incombe à un pathologiste qualifié de connaître les sondes FISH, les réactifs, les tableaux de diagnostic et les méthodes utilisées pour produire la préparation colorée. La coloration doit être effectuée dans un laboratoire certifié et sous licence sous la supervision d'un pathologiste ayant la responsabilité d'examiner les lames colorées et d'assurer l'adéquation des contrôles positifs et négatifs.
- La coloration de l'échantillon, en particulier l'intensité du signal et le bruit de fond, dépend de la manipulation et de la préparation de l'échantillon avant marquage. Une mauvaise fixation, congélation, décongélation, un mauvais lavage, séchage, chauffage, de mauvaises coupes, ou une contamination avec d'autres échantillons ou fluides peut produire des artefacts et de faux résultats. Des résultats incohérents peuvent résulter des variations des méthodes de fixation et d'inclusion, ainsi que des irrégularités inhérentes à l'échantillon.
- Les performances ont été validées en utilisant les instructions décrites dans cette notice. Les modifications de ces procédures peuvent altérer les performances et doivent être validées par l'utilisateur.

9. Substances interférentes

Les globules rouges présents dans l'échantillon peuvent présenter une auto fluorescence qui entrave la reconnaissance du signal.

Les fixateurs suivants sont incompatibles avec la FISH :

- Fixateur de Bouin
- Fixateur B5
- Fixateurs acides comme l'acide picrique
- Fixateur de Zenker
- Alcools (lorsqu'ils sont utilisés seuls)
- Chlorure de mercure
- Fixateur formaldéhyde/zinc
- Fixateur de Hollande
- Formol non tamponné

10. Préparation des échantillons

Recommandations :

- Fixation dans 10 % de formol tamponné pendant 24 h à température ambiante (15 à 25 °C)
- Taille de l'échantillon $\leq 0,5 \text{ cm}^3$.
- Utiliser de la paraffine de bonne qualité
- L'inclusion doit être faite à une température inférieure à 65 °C.
- Préparer des sections de 2-4 μm .
- Utiliser des lames pour microscope chargées positivement.
- Fixer pendant 2 à 16 h à 50-60 %.

11. Traitement préparatoire du produit

5x FlexISH Wash Buffer (WB10) doivent être prétraités conformément aux instructions indiquées au point 12, « Protocole ». Tous les autres réactifs du kit sont prêts à l'emploi. Il n'est pas nécessaire de le reconstituer, le mélanger ou le diluer.

12. Protocole

12.1 1^{er} jour

Étapes préparatoires

- (1) Préparation d'une série d'éthanol (solutions d'éthanol à 70 %, 90 % et 100 %) : Diluer de l'éthanol à 100 % avec de l'eau distillée ou désionisée. Ces solutions peuvent être stockées dans des récipients adaptés et peuvent être réutilisées jusqu'à 160 fois.
- (2) Heat Pretreatment Solution Citric (PT1) : Remplir une cuve à coloration et chauffer à 98 °C.
- (3) FlexISH Probe : Amener à température ambiante avant utilisation, à l'abri de la lumière. Avant d'ouvrir le tube, mélanger à l'aide d'un vortexeur et centrifuger brièvement.

Prétraitement (déparaffinage/protéolyse)

- (1) Effectuer l'incubation des lames pendant 2 x 5 min dans du xylène.
- (2) Effectuer l'incubation dans de l'éthanol à 100 %, 100 %, 90 %, et 70 %, pendant 2 min à chaque fois.
- (3) Laver 2 x 2 min dans de l'eau distillée ou désionisée.
- (4) Effectuer l'incubation pendant 20 min dans la Heat Pretreatment Solution Citric (PT1) préchauffée à 98 °C.

Il n'est pas recommandé d'utiliser plus de huit lames par cuve à coloration. Après avoir immergé les lames, vérifier la température de la Heat Pretreatment Solution Citric dans la cuve et démarrer le minuteur dès que la solution a atteint une température d'au moins 95 °C.

- (5) Transférer les lames immédiatement dans l'eau distillée ou désionisée, laver pendant 2 x 2 min et drainer ou éponger l'eau.
- (6) Appliquer (en gouttelettes) la Pepsin Solution (ES1) aux échantillons et effectuer l'incubation pendant 15 min à 37 °C dans une chambre humide.

En fonction de plusieurs facteurs, tels que la nature et la durée de fixation, l'épaisseur des coupes, et la nature des échantillons, différents temps d'incubation peuvent être nécessaires. Concernant l'incubation, nous recommandons d'appliquer un temps d'incubation de 2 à 30 minutes. En règle générale, nous recommandons de déterminer le moment optimal pour la protéolyse dans des tests préliminaires.

- (7) Laver 2 x 2 min dans de l'eau distillée ou désionisée.
- (8) Déshydratation : dans l'éthanol à 70 %, 90 % et 100 % pendant 1 min.
- (9) Sécher à l'air les coupes.

Il faut s'assurer de sécher complètement les coupes avant l'application de la sonde car des traces d'humidité pourraient réduire l'intensité du signal et/ou modifier la morphologie des tissus.

Dénaturation et hybridation

- (1) Mettre 10 μl de FlexISH Probe sur chaque échantillon prétraité.

Éviter une longue exposition de la sonde à la lumière.

- (2) Couvrir les échantillons avec des lamelles de 22 mm x 22 mm (en évitant les bulles) et sceller les lamelles.

Nous recommandons d'utiliser un ciment caoutchouc (par exemple le Fixogum) pour sceller.

- (3) Placer les lames sur une plaque chauffante ou dans un système d'hybridation pour dénaturer les échantillons pendant 10 min à 75 °C.
- (4) Procéder à l'hybridation pendant 2 à 16 heures (toute la nuit) à 37 °C, en transférant les lames soit dans un système d'hybridation soit dans une chambre humide et dans un four à hybridation.

Il est essentiel que les échantillons ne sèchent pas pendant l'étape d'hybridation.

12.2 1^{er} jour ou 2^e jour

Étapes préparatoires

- (1) Préparation de 1 x tampon de lavage FlexISH : Diluer 1 volume de 5x FlexISH Wash Buffer (WB10) avec 4 volumes d'eau distillée ou désionisée. Remplir trois cuves à coloration avec le tampon de lavage FlexISH. Préchauffer une des cuves à 72 °C et conserver les deux autres à température ambiante.
- (2) DAPI/DuraTect-Solution (MT7) : Amener à température ambiante avant utilisation, à l'abri de la lumière.

Post-hybridation et détection

- (1) Retirer délicatement la colle caoutchouc ou la colle.
- (2) Retirer les lamelles en les plongeant dans 1 x FlexISH Wash Buffer à température ambiante pendant 1 à 2 min.

Pour faciliter le retrait de la lamelle, cette étape peut également être effectuée pendant 2 minutes à 37 °C.

- (3) Laver à l'aide de 1 x FlexISH Wash Buffer pendant 10 minutes à 72 °C.

Le 1 x FlexISH Wash Buffer doit être préchauffé. Vérifier avec un thermomètre si nécessaire. Il n'est pas recommandé d'utiliser plus de huit lames par cuve à coloration.

- (4) Laver à l'aide de 1 x FlexISH Wash Buffer pendant 3 minutes à température ambiante.
- (5) Effectuer l'incubation des lames dans de l'éthanol à 70 %, 90 % et 100 %, pendant 1 min à chaque fois.
- (6) Sécher à l'air les échantillons à l'abri de la lumière.
- (7) Mettre 25 µl de DuraTect/DAPI-Solution (MT7) sur les lames. Couvrir les échantillons avec une lamelle (24 mm x 60 mm) en évitant les bulles. Effectuer l'incubation dans l'obscurité pendant 15 min.

L'utilisation d'un embout de pipette qui a été coupé afin d'augmenter la taille de l'ouverture peut simplifier le processus de pipetage. Éviter une longue exposition de la sonde à la lumière.

- (8) Stocker la lame dans l'obscurité. Pendant des périodes de stockage plus longues, le stockage doit se faire entre 2 et 8 °C.
- (9) L'évaluation de l'échantillon est réalisée par microscopie à fluorescence. Les sets de filtres pour les plages de longueurs d'onde suivantes sont requis :

Colorant fluorescent	Excitation	Émission
ZyBlue	418 nm	467 nm
ZyGreen	503 nm	528 nm
ZyGold	532 nm	553 nm
ZyOrange	547 nm	572 nm
ZyRed	580 nm	599 nm

13. Interprétation des résultats

En utilisant des sets de filtres appropriés en interfases ou métaphases des cellules normales ou des cellules sans aberrations des chromosomes, deux signaux par sonde/marque en fluorescence apparaissent, à l'exception des sondes ciblant les chromosomes X et/ou Y, ayant pour résultat zéro à deux signaux par sonde/marque en fluorescence, en fonction du sexe. Dans les cellules présentant des aberrations chromosomiques, un modèle de signal différent peut être visible en interfases ou métaphases. Pour obtenir plus de détails sur l'interprétation des résultats, consulter le manuel de sonde respectif.

14. Procédures de contrôle qualité recommandées

Afin de surveiller les performances correctes des spécimens traités et des réactifs d'essai, chaque dosage doit être accompagné de contrôles internes et externes. Si les contrôles internes et/ou externes n'indiquent pas une coloration appropriée, les résultats avec les échantillons de patients doivent être considérés comme invalides.

Contrôle interne : Cellules non néoplasiques dans l'échantillon qui présentent un motif de signal normal, par exemple des fibroblastes.

Contrôle externe : Echantillons contrôles négatifs et positifs validés.

15. Caractéristiques de performances

Consultez le manuel d'utilisation de la sonde respective.

16. Elimination

L'élimination des réactifs doit être effectuée conformément à la réglementation locale.

17. Assistance

Tout écart par rapport au mode d'emploi peut conduire à des résultats de coloration inférieurs ou à aucune coloration du tout.

Faible signal ou aucun signal

Cause possible	Action
Pas de séquence cible disponible	Utiliser les contrôles appropriés
Les échantillons de cellules ou de tissus n'ont pas été fixés correctement	Modifier le temps de fixation et le fixateur
Le prétraitement à la chaleur, la protéolyse, la dénaturation, l'hybridation ou le lavage stringent ont été faits à une mauvaise température	Vérifier la température de tous vos instruments utilisés, en utilisant un thermomètre calibré
Le prétraitement protéolytique n'est pas effectué correctement	Optimiser le temps d'incubation de la pepsine, l'augmenter ou le diminuer si nécessaire
Evaporation de la sonde	Lors de l'utilisation d'un système d'hybridation, l'utilisation des bandes humides/réservoirs remplis d'eau est obligatoire. Lors de l'utilisation d'un four à hybridation, il faut utiliser une chambre humide. En outre, la lamelle doit être complètement scellée, par exemple avec du <u>Fixogum</u> , afin d'empêcher le séchage de l'échantillon lors de l'hybridation.
Le tampon de lavage FlexISH a une concentration trop basse	Vérifier la concentration du tampon de lavage FlexISH.
Anciennes solutions de déshydratation	Préparer des nouvelles solutions de déshydratation
Microscope à fluorescence mal réglé	Régler correctement
Mauvais sets de filtres utilisés	Utiliser les sets de filtres appropriés aux fluorochromes de la sonde. <i>Les sets de filtres à bande triple offrent moins de luminosité par rapport aux sets de filtres à bande unique ou double bande. Par conséquent, les signaux peuvent sembler plus faibles en utilisant les sets de filtres à bande triple.</i>

Exposition à la lumière trop forte pendant la manipulation des sondes/lames	Effectuer les étapes d'hybridation et de lavage dans l'obscurité
---	--

Morphologie fissulaire dégradée

Cause possible	Action
Les échantillons de cellules ou de tissus n'ont pas été fixés correctement	Modifier le temps de fixation et le fixateur
Le prétraitement protéolytique n'est pas effectué correctement	Modifier le temps d'incubation de la pepsine
Séchage insuffisant avant l'application de la sonde	Prolonger le séchage à l'air

Signaux d'hybridation croisée ; bruit de fond

Cause possible	Action
Déparaffinage incomplet	Utiliser de nouvelles solutions ; vérifier le temps de déparaffinage
Prétraitement protéolytique trop fort	Modifier le temps d'incubation de la pepsine
Volume de sonde par zone trop important	Réduire le volume de sonde par coupe/zone, distribuer la sonde en gouttelettes pour éviter la concentration locale
Les lames sont refroidies à température ambiante avant l'hybridation	Transférer les lames rapidement à 37 °C
Concentration du tampon de lavage FlexISH trop élevée	Vérifier la concentration du tampon de lavage FlexISH.
Température de l'étape de lavage suivant l'hybridation trop basse	Vérifier la température et l'augmenter si nécessaire
Déshydratation des coupes entre les différentes étapes d'incubation	Eviter la déshydratation en scellant les lames et en effectuant les étapes d'incubation dans un environnement humide

Signaux se chevauchant

Cause possible	Action
Epaisseur inappropriée des sections de tissu	Préparer des coupes au microtome de 2-4 µm d'épaisseur

Echantillon glissant sur la lame

Cause possible	Action
Revêtement antidérapant inadéquat	Utiliser des lames appropriées pour microscope chargées positivement
Prétraitement protéolytique trop fort	Réduire le temps d'incubation de la pepsine

Contre coloration faible

Cause possible	Action
Solution DAPI faiblement concentrée	Utiliser à la place le produit <u>DAPI/DuraTect-Solution (ultra)</u> (Prod. N° MT-0008-0.8)
Temps d'incubation avec le DAPI trop court	Ajuster le temps d'incubation avec le DAPI

18. Bibliographie

- T. Kievits et al. (1990) *Cytogenet Cell Genet* 53 : 134-6.
- Wilkinson DG : *In Situ Hybridization, A Practical Approach*, Oxford University Press (1992) ISBN 0 19 963327 4.

Nos experts sont disponibles pour répondre à vos questions.
Merci de nous contacter à help@zytovision.com



ZytoVision GmbH
Fischkai 1
27572 Bremerhaven/Allemagne
Téléphone : +49 471 4832-300
Fax : +49 471 4832-509
www.zytovision.com
Courriel : info@zytovision.com

Marques déposées :

ZytoVision® et FlexISH® sont des marques déposées de ZytoVision GmbH.