

Instructions For Use
REF: LPS 049-S / LPS 049

FOXO1 Breakapart Probe



PROFESSIONAL USE ONLY

ENGLISH/FRANÇAIS/ITALIANO/DEUTSCH/ESPAÑOL

Further information available at www.cytocell.com

Intended Use

This product is intended to identify, via fluorescence *in situ* hybridisation (FISH), rearrangements involving the FOXO1 region on chromosome 13 at location 13q14.1 in patients with solid tissue neoplasia. It is intended to be used on formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissues. This product is for professional use only and is intended to be an adjunct to clinical cytogenetics.

Background

Fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) is a technique that allows DNA sequences to be detected on metaphase chromosomes or in interphase nuclei from fixed cytogenetic samples. The technique uses DNA probes that hybridise to entire chromosomes or single unique sequences, and serves as a powerful adjunct to classic cytogenetics. Recent developments have meant that this valuable technique can now be applied to the assessment of solid tumour biopsies as well, which can provide important information for prediction of tumour progression. Current methodologies, namely immunohistochemistry or blotting can provide information at the gene expression level but, when carried out on tissue sections, FISH can provide information at a gene level, *in situ*, at the precise site within the tumour. This can reveal cell-to-cell heterogeneity and enable the detection of small clones of genetically distinct cells.

Probe Information

Translocations involving the FOXO1 (*forkhead box O1*) gene at 13q14.1 and either the PAX3 (*paired box 3*) gene at 2q36.1 or the PAX7 (*paired box 7*) gene at 1p36.1 are seen frequently in cases of alveolar rhabdomyosarcoma^{1,2}. Rhabdomyosarcoma is the most common soft-tissue sarcoma seen in children and younger adults with two major histological subtypes: alveolar rhabdomyosarcoma (ARMS) and embryonal rhabdomyosarcoma (ERMS)³. FOXO1 rearrangements are recognised recurrent abnormalities seen in ARMS, but not seen in ERMS^{1,2}.

Approximately 55% of cases of ARMS are associated with a PAX3-FOXO1 rearrangement via a t(2;13)(q36.1;q14) translocation and 22% of cases of ARMS are associated with a PAX7-FOXO1 rearrangement via a t(1;13)(p36;q14) translocation⁴. These translocations lead to the fusion of transcription factor FOXO1 to the transcription factors PAX3 and PAX7 located at 2q36.1 and 1p36.13 respectively².

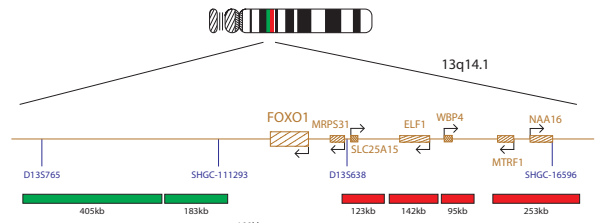
Studies have shown that ARMS patients with PAX-FOXO1 rearrangements have an inferior outcome compared to ERMS patients, whereas ARMS patients without PAX-FOXO1 rearrangements show similar outcomes to ERMS⁵.

A subset of patients with ARMS may show fusion gene amplification. This is most commonly associated with the presence of PAX7-FOXO1 rearrangements and has been shown to be associated with significantly improved outcome over ARMS patients with PAX-FOXO1 rearrangements without fusion gene amplification⁶.

This breakapart probe design allows the detection of FOXO1 rearrangements, irrespective of the partner gene involved.

Probe Specification

FOXO1, 13q14.1, Red
FOXO1, 13q14.1, Green



The FOXO1 Breakapart probe consists of two probes (405kb and 183kb), labelled in green, situated proximal to the FOXO1 gene and covering markers D13S765 and SHGC-111293 and four probes (123kb, 142kb, 95kb and 253kb), labelled in red, situated distal to the FOXO1 gene and covering markers D13S638 and SHGC-16596.

Materials Provided

Probe: 50µl per vial (5 tests) or 100µl per vial (10 tests)
Amount of Red FOXO1 probe: 34-59ng/test
Amount of Green FOXO1 probe: 342.5-512.5ng/test
The probes are provided premixed in hybridisation solution (Formamide; Dextran Sulphate; SSC) and are ready to use.

Counterstain: 150µl per vial (15 tests)

The counterstain is DAPI antifade (ES: 0.125µg/ml DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole)).

Warnings and Precautions

1. For *in vitro* diagnostic use. For professional use only.
2. Wear gloves when handling DNA probes and DAPI counterstain.
3. Probe mixtures contain formamide, which is a teratogen; do not breathe fumes or allow skin contact. Wear gloves, a lab coat, and handle in a fume hood. Upon disposal, flush with a large volume of water.
4. DAPI is a potential carcinogen. Handle with care; wear gloves and a lab coat. Upon disposal, flush with a large volume of water.
5. Dispose of all hazardous materials according to your institution's guidelines for hazardous waste disposal.
6. Operators must be capable of visually distinguishing between red, blue and green.
7. Failure to adhere to the protocol may affect the performance and lead to false positive/negative results.

Storage and Handling

Store the Aquarius® kit at -20°C until the expiry date indicated on the kit label. Store the probe and counterstain vials in the dark. Ensure that exposure of the probe and counterstain to laboratory lights is limited at all times.

Equipment Necessary but not Supplied

1. Hotplate (with a solid plate and accurate temperature control up to 80°C).
2. Variable volume micropipettes and tips range 1µl - 200µl.
3. Water bath with accurate temperature control at 72°C.
4. Microcentrifuge tubes (0.5ml).
5. Fluorescence microscope (Please see Fluorescence Microscope Recommendation section).
6. Plastic or glass coplin jars.
7. Forceps.
8. Fluorescence grade microscope lens immersion oil.
9. Bench-top centrifuge.
10. Microscope slides.
11. 24x24mm coverslips.
12. Timer.
13. 37°C incubator.
14. Rubber solution glue.
15. Aquarius® Tissue Pretreatment Kit (LPS 100).

Fluorescence Microscope Recommendation

Use a 100-watt mercury lamp and plan apochromat objectives x63 or x100 for optimal visualisation. Use a triple bandpass filter DAPI/FITC/Texas Red for optimal visualisation of the green and red fluorophores and DAPI simultaneously. Alternatively for viewing red and green fluorophores use dual bandpass filter FITC/Texas Red.

Check the fluorescence microscope before use to ensure it is operating correctly. Use immersion oil that is suitable for fluorescence microscopy and formulated for low autofluorescence. Follow manufacturers' recommendations in regards to the life of the lamp and the age of the filters.

Sample Preparation

The kit is designed for use on Formalin Fixed Paraffin Embedded (FFPE) tissue sections and should be prepared according to the laboratory or institution guidelines. Use 4µm - 6µm thick FFPE tissue sections for FISH.

Tissue Sample Pretreatment

Tissue sample pretreatment should be done according to the laboratory or institution guideline. Use the Aquarius® Tissue Pretreatment Kit (LPS 100) for optimal results.

FISH Protocol

(Note: Ensure that exposure of the probe and counterstain to laboratory lights is limited at all times)

Pre-Denaturation

1. Remove the probe from the freezer and allow it to warm to room

- temperature (RT). Briefly centrifuge tubes before use.
2. Ensure that the probe solution is uniformly mixed with a pipette.
 3. Remove 10µl - 15µl (depending on the size of the tissue) of probe per test, and transfer it to a microcentrifuge tube. Quickly return the remaining probe to -20°C.
 4. Place the probe and the sample slide to prewarm on a 37°C (+/- 1°C) hotplate for 5 minutes.
 5. Spot 10µl - 15µl of probe mixture onto the sample and carefully apply a coverslip. Seal with rubber solution glue and allow the glue to dry completely.

Denaturation

6. Denature the sample and probe simultaneously by heating the slide on a hotplate at 75°C (+/- 1°C) for 5 minutes.

Hybridisation

7. Place the slide in a humid, lightproof container at 37°C (+/- 1°C) overnight.

Post-Hybridisation Washes

8. Remove the coverslip and all traces of glue carefully.
9. Immerse the slide in 0.4xSSC (pH 7.0) at 72°C (+/- 1°C) for 2 minutes without agitation.
10. Drain the slide and immerse it in 2xSSC, 0.05% Tween-20 at RT (pH 7.0) for 30 seconds without agitation.
11. Drain the slide and apply 10µl - 15µl of DAPI antifade onto each sample.
12. Cover with a coverslip, remove any bubbles and allow the colour to develop in the dark for 10 minutes.
13. View with a fluorescence microscope.

Comments

Hybridisation efficiency and tissue morphology are usually negatively correlated. Aggressive pretreatment procedures improving hybridisation efficiency (e.g. an extended enzyme digestion time) tend to destroy cell structure and tissue morphology. However, mild pretreatment saving tissue structures may not be sufficient for probe penetration and successful FISH results.

The optimal length of heat pretreatment and enzyme digestion time will depend on the age of the block, the tissue composition, and quality of tissue fixation. Decrease enzyme digestion for core biopsies and any sections that contain few tumour cells or have large areas of necrosis. Handle these samples particularly carefully to avoid over-digestion.

Stability of Finished Slides

FISHed slides remain analysable for up to 1 month if stored in the dark below 4°C.

Procedural Recommendations

1. Hybridisation conditions may be adversely affected by the use of reagents other than those provided or recommended by CytoCell Ltd.
2. Use a calibrated thermometer for measuring temperatures of solutions, waterbaths and incubators as these temperatures are critical for optimum product performance.
3. The wash concentrations, pH and temperatures are important as low stringency can result in non-specific binding of the probe and too high stringency can result in a lack of signal.
4. Incomplete denaturation can result in lack of signal and over denaturation can also result in non-specific binding.
5. Over hybridisation can result in additional or unexpected signals.
6. Users should optimise the protocol for their own samples prior to using the test for diagnostic purposes.

Expected Results

In a normal cell, two red/green fusion signals are expected (2F). In a cell with a balanced FOXO1 rearrangement, the expected signal pattern will be 1 fusion, 1 red and 1 green (1R, 1G, 1F). In a cell with amplification of proximal FOXO1 the expected signal pattern will be 1 fusion, 1 red and amplified green. Other signal patterns are possible in aneuploid/unbalanced specimens.

Known Cross-Reactivity

No known cross-reactivity.

Limitations

Reporting and interpretation of FISH results should be consistent with professional standards of practice and should take into consideration other clinical and diagnostic information. This kit is intended as an adjunct to other diagnostic laboratory tests and therapeutic action should not be initiated on the basis of the FISH result alone.

Failure to adhere to the protocol may affect the performance and lead to false positive/negative results.

This kit has not been validated for purposes outside of the intended use stated.

Additional Information

For additional product information please contact the CytoCell Technical Support Department.

T: +44 (0)1223 294048

E: techsupport@cytozell.com

W: www.cytozell.com

FRANÇAIS

L'hybridation in situ par fluorescence (FISH) est une technique qui permet de détecter des séquences ADN sur les chromosomes métaphasiques ou sur les noyaux interphasiques d'échantillons cytogénétiques fixés. La technique s'appuie sur des sondes ADN qui s'hybrident aux chromosomes entiers ou à des séquences spécifiques, et représente un outil complémentaire très efficace pour la cytogénétique classique. De récents développements ont démontré que cette technique extrêmement utile peut maintenant être utilisée pour évaluer les biopsies de tumeurs solides et permettre l'obtention de données importantes pour la prédiction de la progression tumorale.

Les méthodologies actuelles, à savoir l'immunohistochimie ou le blot, peuvent fournir des informations au niveau de l'expression génique, mais la technique FISH, lorsqu'elle est appliquée à des coupes tissulaires, peut fournir des informations au niveau des gènes, in

situ, du site intratumoral précisément concerné. Ceci permet de détecter l'hétérogénéité entre les cellules et de détecter de petits clones de cellules génétiquement distinctes.

Caractéristiques de la sonde

Sonde de la région FOXO1, 13q14.1 en rouge

Sonde de la région FOXO1, 13q14.1 en vert

La sonde FOXO1 Breakpart se compose de deux sondes (405 kb et 183 kb), étiquetées en vert, situées près du centre du gène FOXO1 et recouvrant les marqueurs D13S765 et SHGC-111293, ainsi que de quatre sondes (123kb, 142kb, 95kb et 253kb), étiquetées en rouge, éloignées du gène FOXO1 et recouvrant les marqueurs D13S638 et SHGC-16596.

Conditionnement

Sonde : 50µl par tube (5 tests) ou 100µl par tube (10 tests)

Quantité de sonde FOXO1, rouge: 34-59ng/test

Quantité de sonde FOXO1, vert: 342.5-512.5ng/test.

La sonde est fournie prémélangée prête-à-l'emploi dans le tampon d'hybridation (formamide, sulfate de dextran, SSC).

Contre-colorant: 150µl par tube (15 tests)

Le contre-colorant est le DAPI antifade (ES: 0,125µg/ml DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole)).

Avertissements et précautions

1. Pour utilisation en diagnostic *in vitro*. Pour usage professionnel uniquement.
2. Porter des gants lors de la manipulation des sondes ADN et du contre-colorant DAPI.
3. La sonde contient de la formamide qui est un tératogène. Ne pas respirer les vapeurs. Ne pas mettre en contact avec la peau. Porter des gants, une blouse de laboratoire et manipuler sous une hotte. Après élimination, rincer abondamment avec de l'eau.
4. Le DAPI est un carcinogène potentiel. Manipuler avec précaution. Porter des gants et une blouse de laboratoire. Après élimination, rincer abondamment avec de l'eau.
5. Mettez au rebut toutes les matières dangereuses conformément aux directives de votre institution en matière de mise au rebut des déchets dangereux.
6. Les techniciens doivent être en mesure de distinguer le rouge, le bleu et le vert.
7. Si le protocole n'est pas respecté, la performance peut être affectée et des résultats erronés positifs/négatifs peuvent être obtenus.

Conservation et manipulation

Conservez le kit Aquarius® à -20°C jusqu'à la date d'expiration indiquée sur l'étiquette. Conservez la sonde et les flacons de contre-colorant à l'abri de la lumière. Assurez-vous que la sonde et la couleur de contraste ne sont exposées aux lumières de laboratoire que de façon limitée, à tout moment.

Équipement nécessaire non fourni

1. Plaque chauffante (avec bloc et contrôle de la température jusqu'à 80°C).
2. Micropipettes de volume variable et gamme d'embouts de 1µl - 200µl.
3. Bain-marie avec contrôle précis de la température à 72°C.
4. Tubes à microcentrifugation (0,5ml).
5. Microscope à fluorescence (Voir la section Microscope à fluorescence recommandés).
6. Bocal Coplin en plastique ou en verre.
7. Pinces.
8. Huile à immersion pour microscope à fluorescence.
9. Centrifugeuse de paillasse.
10. Lames de microscope.
11. Lames 24x24mm.
12. Chronomètre.
13. Incubateur à 37°C.
14. Colle à base de caoutchouc.
15. Aquarius® Tissue Pretreatment Kit (LPS 100).

Microscope à fluorescence recommandés

Utiliser une lampe à mercure de 100 watts ainsi que des objectifs plan apochromatique x63 ou x100 pour une visualisation optimale. Utiliser un filtre triple bande DAPI/FITC/Texas Red pour une visualisation simultanée des fluorochromes vert et rouge et du DAPI optimale. Pour la visualisation des fluorochromes rouge et vert, utiliser le filtre double bande FITC/Texas Red. Vérifiez le fonctionnement du microscope à fluorescence avant usage. Utilisez de l'huile à immersion adaptée à la microscopie de fluorescence et formulée pour une autofluorescence basse. Respectez les recommandations du fabricant concernant la durée de vie de la lampe et le vieillissement des filtres.

Préparation des échantillons

Ce kit est conçu pour être utilisé sur des sections de tissus FFPE (fixation au formol, inclusion en paraffine) et doit être préparé conformément aux directives des établissements ou des laboratoires.

Utilisez entre 4 µm et 6 µm de sections de tissus FFPE épaisses pour l'hybridation in situ en fluorescence (FISH).

Prétraitement des échantillons de tissu

Le prétraitement des échantillons de tissu doit être effectué conformément aux directives du laboratoire ou de l'établissement. Utilisez Aquarius® Tissue Pretreatment Kit (LPS 100) pour obtenir les meilleurs résultats.

Protocole FISH

(Remarque : Assurez-vous que la sonde et la couleur de contraste ne sont exposées aux lumières de laboratoire que de façon limitée, à tout moment.)

Pré-dénaturation

1. Retirer la sonde du congélateur et la laisser se remettre à température ambiante (TA). Centrifugez brièvement les tubes avant usage.
2. Bien homogénéiser la sonde en pipetant plusieurs fois.
3. Prélever 10µl - 15µl (en fonction de la taille du tissu) de sonde par test et placer dans un tube à microcentrifugation. Remettre rapidement le tube avec le restant de sonde à -20°C.
4. Mettre la sonde et la lame échantillon à préchauffer sur une plaque chauffante à 37°C (+/-1°C) pendant 5 minutes.
5. Déposer 10µl - 15µl de sonde sur l'échantillon et couvrir avec une lamelle. Sceller avec de la colle à base de caoutchouc et laisser sécher.

Dénaturation

6. Dénaturer simultanément la sonde et l'échantillon en plaçant la lame sur une plaque chauffante à 75°C (+/-1°C) pendant 5 minutes.

Hybridation

7. Incuber la lame pendant une nuit à 37°C (+/-1°C) dans un récipient humide et à l'abri de la lumière.

Lavages post-hybridation

8. Retirer la lamelle et éliminer toute trace de colle à base de caoutchouc.
9. Laver la lame dans du tampon 0,4xSSC (pH 7,0) à 72°C (+/-1°C) pendant 2 minutes sans agiter.
10. Egoutter la lame et laver dans du tampon 2xSSC, 0,05% Tween-20 (pH 7,0) à TA pendant 30 secondes sans agiter.
11. Sécher la lame et appliquer 10µl - 15µl de DAPI antifade sur chaque échantillon.
12. Recouvrir d'une lamelle, éliminer les bulles et laisser la coloration apparaître à l'abri de la lumière pendant 10 minutes.
13. Visualiser avec un microscope à fluorescence.

Commentaires:

L'efficacité de l'hybridation et la morphologie du tissu d'habitude ont une corrélation négative. Les méthodes de prétraitement agressives améliorant l'efficacité d'hybridation (p.ex. un long temps de digestion enzymatique) 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 durée optimale de prétraitement thermique et de digestion enzymatique dépendra de l'âge du bloc, de la composition du tissu et de la qualité de la fixation du tissu. Réduisez la digestion d'enzymes pour les biopsies au trocar ainsi que pour toutes les sections qui comportent peu de cellules tumorales ou de grandes zones nécrosées. Manipulez ces échantillons avec beaucoup de précautions afin d'éviter une surdigestion.

Stabilité des lames

Les lames sont analysables pendant un mois si elles sont conservées à l'abri de la lumière et à au dessous de 4°C.

Recommandations

1. Les conditions d'hybridation peuvent être affectées par l'utilisation de réactifs autres que ceux fournis ou recommandés par CytoCELL Ltd.
2. Utilisez un thermomètre étalonné pour mesurer les températures des solutions, des bains d'eau et des incubateurs, car ces températures sont essentielles à la performance optimale du produit.
3. Les concentrations des lavages, 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.
4. Une dénaturation incomplète peut engendrer une perte de signal et une trop forte dénaturation une hybridation non-spécifique.
5. Une hybridation trop importante peut entraîner des signaux supplémentaires ou inattendus.
6. Les utilisateurs doivent optimiser le protocole en fonction de leurs propres échantillons avant d'utiliser ce test à des fins de diagnostic.

Interprétation des résultats

Dans une cellule normale, il devrait y avoir deux signaux de fusion rouge/vert (2F). Dans une cellule avec un réarrangement équilibré du gène FOXO1, le modèle de signal attendu sera 1 fusion, 1 rouge et 1 vert (1R, 1V, 1F). Dans une cellule avec une amplification du gène FOXO1 proche, le modèle de signal attendu sera 1 fusion, 1 rouge et vert amplifié. D'autres modèles de signal sont possibles dans des spécimens aneuploïdes/déséquilibrés.

Réactivité croisée connue

Aucune réactivité croisée connue.

Limitations

La diffusion et l'interprétation du test FISH doivent être effectués conformément aux normes professionnelles mises en pratique et tout en prenant en considération les autres informations cliniques et diagnostiques disponibles. Ce kit est développé comme un test complémentaire à la cytogénétique classique, pour cette raison des actions thérapeutiques ne doivent pas être lancées sur la seule base des résultats du test FISH.

Si le protocole n'est pas respecté, la performance peut être affectée et des résultats erronés positifs/négatifs peuvent être obtenus.

Ce kit n'a pas été validé en vue d'une utilisation autre que celle indiquée.

Informations supplémentaires

Pour plus d'informations sur le produit, veuillez contacter l'Assistance technique CytoCELL.

T: +44 (0)1223 294048

E: techsupport@cytoCELL.com

W: www.cytoCELL.com

ITALIANO

L'ibridazione fluorescente *in situ* (Fluorescence *In Situ* Hybridisation, FISH) è una tecnica che consente di rilevare le sequenze del DNA su cromosomi metafasi o in nuclei interfasci da campioni citogenetici fissati. La tecnica utilizza sonde di DNA che ibridizzano con gli interi cromosomi o con singole sequenze e fungono da potente aggiunta alla citogenetica classica. Recenti sviluppi hanno fatto sì che ora questa valida tecnica possa essere applicata anche alla valutazione di biopsie di tumori solidi, il che può fornire importanti informazioni per la previsione della progressione del tumore stesso. Le metodologie attuali, vale a dire all'immunocitochimica o il blotting possono fornire informazioni a livello di espressione genica ma, quando eseguite su sezioni di tessuto, la FISH può fornire informazioni a livello di gene, *in situ*, al sito preciso all'interno del tumore. Questo può rivelare l'eterogeneità tra cellula e cellula e consentire l'individuazione di piccoli cloni di cellule geneticamente distinte.

Specifiche della sonda

Regione FOXO1 13q14.1, rosso

Regione FOXO1 13q14.1, verde

La sonda FOXO1 Breakapart si compone di due sonde (405kb e 183kb), etichettate in verde, situate in posizione prossimale rispetto al gene FOXO1 e comprendenti i marcatori D13S765 e SHGC-111293, e quattro sonde (123kb, 142kb, 95kb e 253kb), marcate in rosso, situate in posizione distale rispetto al gene FOXO1 e comprendenti i marcatori D13S638 e SHGC-16596.

Materiali forniti

Sonda: 50µl per provetta (5 test) o 100µl per provetta (10 test)

Quantità di sonda FOXO1 rosso: 34.59ng/test

Quantità di sonda FOXO1 verde: 342.5-512.5ng/test

Le sonde sono fornite premiscelate nella soluzione di ibridazione (formammide; destrano solfato; SSC) e pronte per l'uso.

Colorante di contrasto: 150µl per provetta (15 test)

Il colorante di contrasto è costituito da DAPI antifade (ES: 0,125µg/ml DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindolo)).

Avvertenze e precauzioni

1. Per uso diagnostico *in vitro*. Solo per uso professionale.
2. Quando si maneggiano le sonde e il colorante di contrasto DAPI, è necessario indossare guanti.
3. Le miscele delle sonde contengono formammide, una sostanza teratogena. Non respirare i fumi ed evitare il contatto con la pelle. Indossare guanti e camice da laboratorio e maneggiare sotto cappa chimica. Per lo smaltimento, sciogliere con grandi quantità di acqua.
4. Il DAPI è un potenziale cancerogeno. Maneggiare con cura, indossare guanti e camice da laboratorio. Per lo smaltimento, sciogliere con grandi quantità di acqua.
5. Smaltire tutti i materiali pericolosi secondo le direttive del proprio istituto per lo smaltimento dei rifiuti pericolosi.
6. Gli operatori devono poter distinguere visivamente fra rosso, blu e verde.
7. Il mancato rispetto del protocollo può influire sulle prestazioni e generare risultati falsi positivi/negativi.

Conservazione e manipolazione

Conservare il kit Aquarius® a -20°C fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta del kit. Conservare la sonda e i flaconi del controcolorante al buio. Assicurare che l'esposizione della sonda e della colorazione di contrasto alle luci di laboratorio sia sempre limitata.

Apparecchiature necessarie ma non fornite

1. Piastra riscaldante (dotata di superficie d'appoggio e controllo accurato della temperatura fino a 80°C).
2. Micropipette a volume variabile con capacità da 1µl a 200µl e relativi puntali.
3. Bagno termostato con controllo accurato della temperatura a 72°C.
4. Provette da microcentrifuga (0,5ml).
5. Microscopio a fluorescenza (fare riferimento alla sezione Caratteristiche consigliate per il microscopio a fluorescenza).
6. Vaschette di Coplin in plastica o in vetro.
7. Pinzette.
8. Olio di immersione per obiettivi per microscopia a fluorescenza.
9. Centrifuga da banco.
10. Vetrini per microscopia.
11. Vetrini copri oggetto da 24x24mm.
12. Timer.
13. Incubatore a 37°C.
14. Colla tipo mastice.
15. Aquarius® Tissue Pretreatment Kit (LPS 100).

Caratteristiche consigliate per il microscopio a fluorescenza

Utilizzare una lampada al mercurio da 100 watt e obiettivi apocromatici x63 o x100 per una visione ottimale. Utilizzare un filtro triplo passa banda DAPI/FITC/Texas Red per la visione ottimale di DAPI e fluorofori verdi e rosso e contemporaneamente. In alternativa, utilizzare il doppio filtro passabanda FITC/Texas Red per visualizzare i fluorofori rosso e verde. Verificare il microscopio a fluorescenza prima dell'uso per garantire che funzioni correttamente. Usare olio di immersione adatto al microscopio a fluorescenza e formulato per fluorescenza bassa. Seguire le raccomandazioni del produttore su durata della lampadina e dei filtri.

Preparazione del campione

Il kit è progettato per l'uso con sezioni di tessuto FFPE e deve essere preparato in conformità alle linee guida del laboratorio o dell'istituto. Usare sezioni di tessuto in FFPE di 4µm-6µm di spessore per FISH.

Pretrattamento del campione di tessuto

Il pretrattamento del campione di tessuto deve essere eseguito secondo il protocollo in uso nel proprio laboratorio o istituzione. Utilizzare l'Aquarius® Tissue Pretreatment Kit (LPS 100) al fine di ottenere risultati ottimali.

Protocollo della FISH

(Nota: Assicurare che l'esposizione della sonda e della colorazione di contrasto alle luci di laboratorio sia sempre limitata.)

Pre-denaturazione

1. Rimuovere la sonda dal congelatore e attendere che raggiunga la temperatura ambiente (TA). Centrifugare brevemente le provette prima dell'uso.
2. Mescolare con una pipetta la soluzione della sonda in modo da renderla omogenea.
3. Trasferire in una provetta da microcentrifuga 10µl - 15µl (a seconda delle dimensioni del tessuto) di sonda per ciascun test da eseguire. Riporre rapidamente la sonda non utilizzata a -20°C.
4. Pre-riscaldare la sonda e il vetrino con il campione su una piastra riscaldante a 37°C (+/- 1°C) per 5 minuti.
5. Collocare 10µl - 15µl di miscela della sonda sul campione e cellulare e coprire delicatamente con un vetrino copri oggetto. Sigillare con una colla tipo mastice e attendere che la colla si asciughi completamente.

Denaturazione

6. Denaturare contemporaneamente il campione e la sonda riscaldando il vetrino su una piastra riscaldante a 75°C (+/- 1°C) per 5 minuti.

Ibridazione

7. Disporre il vetrino in una camera umida, non permeabile alla luce, a 37°C (+/- 1°C) per tutta la notte.

Lavaggi post-ibridazione

8. Rimuovere accuratamente il vetrino copri oggetto e qualsiasi residuo di colla.
9. Lavare il vetrino in 0,4xSSC (pH 7,0) a 72°C (+/- 1°C) per 2 minuti, senza agitazione.
10. Scolare il vetrino e lavare in 2xSSC, Tween-20 0,05% (pH 7,0) a TA per 30 secondi senza agitazione.
11. Scolare il vetrino e applicare 10µl - 15µl di DAPI antifade su ciascun campione.
12. Coprire con un vetrino copri oggetto, rimuovere eventuali bolle e attendere lo sviluppo del colore per 10 minuti lasciando il vetrino al buio.
13. Esaminare con un microscopio a fluorescenza.

Commenti:

L'efficacia dell'ibridazione e la morfologia tissutale sono solitamente correlate in modo negativo. Procedure di pretrattamento aggressivo che aumentano l'efficacia dell'ibridazione (ad es., tempi prolungati di digestione enzimatica) 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 durata ottimale del pretrattamento al calore e della digestione enzimatica dipenderà dall'età del blocco, dalla composizione tissutale e dalla qualità del fissaggio tissutale. Ridurre la digestione enzimatica per biopsie di base ed eventuali sezioni che contengono poche cellule tumorali o che hanno grandi aree di necrosi. Maneggiare questi campioni con particolare attenzione per evitare una digestione eccessiva.

Stabilità dei vetrini ultimati

I vetrini sottoposti a FISH restano analizzabili per circa 1 mese se conservati al buio se conservata al buio sotto i 4°C

Raccomandazioni per la procedura

1. Le condizioni di ibridazione potrebbero essere influenzate negativamente dall'impiego di reagenti diversi da quelli forniti o consigliati da CytoCELL Ltd.
2. Usare un termometro calibrato per misurare la temperatura delle soluzioni, dell'acqua e degli incubatori, poiché queste temperature sono fondamentali per ottimizzare le prestazioni del prodotto.
3. Le concentrazioni, il pH e la temperatura dei lavaggi sono di fondamentale importanza in quanto condizioni di stringenza blande possono favorire un legame specifico della sonda, mentre condizioni di stringenza troppo elevate possono determinare l'assenza di segnale.
4. Una denaturazione incompleta può determinare l'assenza di segnale, mentre una denaturazione eccessiva può produrre un legame aspecifico.
5. L'eccessiva ibridazione può provocare segnali aggiuntivi o imprevisti.
6. Gli utenti devono sviluppare il protocollo per propri campioni prima di utilizzare il test a scopi diagnostici.

Interpretazione dei risultati

In una cellula normale, sono previsti due segnali di fusione rosso/verde (2F). In una cellula con riorganizzazione FOXO1 equilibrata, il pattern del segnale previsto sarà 1 di fusione, 1 rossa e 1 verde (1R, 1G, 1F). In una cellula con amplificazione di FOXO1 prossimale, il pattern del segnale previsto sarà 1 di fusione, 1 rossa e verde amplificato. Altri pattern di segnale sono possibili in campioni aneuploidi/sbilanciati.

Reaktivität crociata nota
Nessuna reattività crociata nota.

Limitazioni

La refertazione e l'interpretazione dei risultati della FISH devono essere coerenti con gli standard professionali della pratica medica e dovrebbe prendere in considerazione altre informazioni cliniche e diagnostiche.

Questo kit è concepito in aggiunta alla tecnica citogenetica classica e azione terapeutica non deve essere messa in atto esclusivamente sulla base del risultato di FISH. Il mancato rispetto del protocollo può influire sulle prestazioni e generare risultati falsi positivi/negativi. Questo kit non è stato convalidato per scopi diversi dalla destinazione d'uso.

Informazioni aggiuntive

Per informazioni aggiuntive sul prodotto con contattare il Reparto di Assistenza Tecnica Cytocell.
T: +44 (0)1223 294048
E: techsupport@cytozell.com
W: www.cytozell.com

DEUTSCH

Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) ist eine Technik, mit der der Nachweis von DNA-Sequenzen auf Metaphasechromosomen oder in Interphasezellkernen fixierter zytogenetischer Proben erbracht werden kann. Die Technik nutzt DNA-Sonden, die auf ganze Chromosomen oder einzelne eindeutige Sequenzen hybridisieren, und dient als leistungsfähige Ergänzung zur klassischen Zytogenetik. Seit Kurzem ist es möglich, diese wertvolle Technik nun auch für die Auswertung von Biopsien solider Tumore anzuwenden, was wichtige Informationen für die Vorhersage der Tumorprogression liefert. Aktuelle Methoden, wie z. B. Immunhistochemie oder Blotting können Informationen auf Genexpressionsniveau bereitstellen. Mit der FISH-Technik hingegen erhält man, sofern diese an Gewebeschnitten durchgeführt wird, Informationen auf Genniveau an genau der untersuchten Stelle innerhalb des Tumors (*in situ*). Hierdurch können Heterogenitäten zwischen den einzelnen Zellen sowie kleine Klone genetisch verschiedenartiger Zellen aufgezeigt werden.

Sondenspezifikation

FOXO1 13q14.1 Region, rot
FOXO1 13q14.1 Region, grün

Die FOXO1 Breakpart-Sonde besteht aus zwei Sonden (405kb und 183kb), die grün markiert sind, sich proximal zum FOXO1-Gen befinden und die Marker D13S765 und SHGC-111293 umfassen, und aus vier Sonden (123kb, 142kb, 95kb und 253kb), die rot markiert sind, sich distal zum FOXO1-Gen befinden und die Marker D13S638 und SHGC-16596 umfassen.

Bestandteile des Kits

Sonde: 50µl pro Röhrchen (5 Tests) oder 100µl pro Röhrchen (10 Tests)
Menge an FOXO1 rot Sonde: 34-59ng/Test
Menge an FOXO1 grün Sonde: 342.5-512.5ng/Test
Die Sonden werden vorgemischt und gebrauchsfertig in Hybridisierungslösung geliefert (Formamid, Dextransulfat, SSC).

Farbstoff für die Gegenfärbung: 150µl pro Röhrchen (15 Tests)
Der Farbstoff für die Gegenfärbung ist DAPI Antifade (ES: 0,125µg/ml DAPI (4,6-Diamidino-2-Phenylindol)).

Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen

- Zur Verwendung in der *in vitro* Diagnostik. Durchführung ausschließlich durch qualifiziertes Laborpersonal.
- Beim Umgang mit DNA-Sonden und dem DAPI Farbstoff Handschuhe tragen.
- Sondenmischungen enthalten Formamid, das Teratogen ist. Keine Dämpfe einatmen und Hautkontakt vermeiden. Handschuhe und Labormantel tragen und unter einer Abzugshaube arbeiten. Bei der Entsorgung mit viel Wasser nachspülen.
- DAPI ist ein potenzielles Karzinogen. Vorsichtig damit umgehen, Handschuhe und Labormantel tragen. Bei der Entsorgung mit viel Wasser nachspülen.
- Die Entsorgung aller gefährlichen Materialien erfolgt in Übereinstimmung mit den Richtlinien Ihrer Einrichtung zur Entsorgung von gefährlichen Abfällen.
- Die Anwender dieses Produkts müssen in der Lage sein, optisch zwischen den Farben rot, blau und grün zu unterscheiden.
- Eine mangelnde Einhaltung des Protokolls kann die Leistung beeinträchtigen und zu falschen positiven/negativen Ergebnissen führen.

Lagerung und Behandlung

Das Aquarius®-Kit wird bis zum Ablauf des auf dem Etikett angegebenen Haltbarkeitsdatums bei -20°C gelagert. Die Durchstechflaschen mit den Sonden und dem Farbstoff müssen lichtgeschützt aufbewahrt werden. Bitte versuchen Sie nach Möglichkeit, die Sonde und die Kontrastfärbung vor Licht zu schützen.

Benötigte, aber nicht mitgelieferte Laborgeräte

- Heizplatte (mit stabiler Platte und genauer Temperatursteuerung bis 80°C).
- Mikropipetten mit unterschiedlichen Volumen von 1µl - 200µl.
- Wasserbad mit genauer Temperatursteuerung bei 72°C.
- Mikrozentrifugenröhrchen (0,5ml).
- Fluoreszenzmikroskop (siehe auch „Empfehlungen zum Fluoreszenzmikroskop“).
- Coplin-Färbetrog aus Kunststoff oder Glas.
- Pinzette.
- Für Fluoreszenzobjektive geeignetes Immersionsöl.
- Tischzentrifuge.
- Objektträger für das Mikroskop.
- 24x24mm Deckgläser.
- Zeituhr.
- 37°C-Inkubator.
- Gummilösung zum Versiegeln der Deckglasränder.
- Aquarius® Tissue Pretreatment Kit (LPS 100).

Empfehlungen zum Fluoreszenzmikroskop

Zur bestmöglichen Darstellung empfehlen wir eine 100-Watt-Quecksilberlampe und Planachromat-Objektive mit 63-facher oder 100-facher Vergrößerung. Verwenden Sie einen Dreifach-Bandpass-Filter DAPI/FITC/Texas Red zur optimalen und simultanen Darstellung der grünen und roten Fluorophore und DAPI-Färbung. Alternativ dazu kann zur Beobachtung des roten und des grünen Fluorophors ein Zweifach-Bandpassfilter FITC/Texas Red verwendet werden.

Das Fluoreszenzmikroskop muss vor dem Gebrauch auf korrekte Funktionsweise überprüft werden. Das Immersionsöl muss für die Verwendung in der Fluoreszenzmikroskopie geeignet und für geringe Autofluoreszenz formuliert sein. Den Herstellerempfehlungen zur Lebensdauer der Lampe und zum Alter der Filter ist Folge zu leisten.

Probenvorbereitung

Das Set ist für die Verwendung für formalinfixierte paraffineingebettete (FFPE) Gewebeschnitte vorgesehen und sollte entsprechend der Richtlinien des Labors oder der Einrichtung präpariert werden. Es dient der Verwendung bei FFPE-Gewebeschnitten für FISH mit einer Dicke von 4 µm - 6 µm.

Vorbereitung von Gewebeproben

Gewebeproben werden gemäß den Richtlinien des Labors oder der Einrichtung vorbereitet. Optimale Ergebnisse werden mit dem Aquarius® Tissue Pretreatment Kit (LPS 100) erzielt.

FISH-Protokoll

(Hinweis: Bitte versuchen Sie nach Möglichkeit, die Sonde und die Kontrastfärbung vor Licht zu schützen.)

Prä-denaturierung

- Nehmen Sie die Sonde aus dem Gefrierschrank und lassen Sie diese sich auf Zimmertemperatur aufwärmen. Die Röhrchen vor der Anwendung kurz zentrifugieren.
- Mischen der Sondenlösung durch mehrmaliges Aufpipettieren.
- Pro Test 10µl - 15µl (je nach Größe des Gewebes) Sonde entnehmen und in ein Mikrozentrifugenröhrchen geben. Bewahren Sie die restliche Sonde bei -20°C auf.
- Sonde und Probenobjektträger 5 Minuten auf einer Heizplatte bei 37°C (+/- 1°C) vorwärmen.
- 10µl - 15µl Sondenmischung auf die Zellprobe auftropfen und Deckglas sorgfältig auflegen. Mit Gummikleber-Lösung versiegeln und vollständig trocknen lassen.

Denaturierung

- Denaturieren sie Probe und Sonde gleichzeitig durch 5 minutiges Erwärmen des Objektträgers auf einer Heizplatte bei 75°C (+/- 1°C).

Hybridisierung

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

Waschen nach der Hybridisierung

- Deckglas und alle Kleberspuren vorsichtig entfernen.
- Objektträger 2 Minuten lang bei 72°C (+/- 1°C) in 0,4xSSC (pH 7,0) waschen.
- Objektträger abtropfen lassen und 30 Sekunden bei Zimmertemperatur in 2xSSC, 0,05% Tween-20 (pH 7,0), waschen.
- Objektträger abtropfen lassen und 10µl - 15µl DAPI Antifade zu jeder Probe geben.
- Mit einem Deckglas abdecken, die Luftblasen entfernen und 10 Minuten unter Lichtschutz entwickeln lassen.
- Unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachten.

Bemerkungen:

Wirkungsgrad der Hybridisierung und Gewebemorphologie stehen gewöhnlich in negativem Zusammenhang. Aggressive Vorbehandlungsmethoden, die zu einem erhöhten Wirkungsgrad der Hybridisierung beitragen (z.B. eine verlängerte Enzymverdauungszeit), 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 Wärmeverhandlung und Enzymverdauung hängt vom Alter des Blocks, der Gewebeszusammensetzung und der Qualität der Gewebefixierung ab. Die Enzymverdauung für Stanzbiopsien sowie Schnitte mit wenig Tumorzellen oder großen nekrotischen Bereichen sind zu verringern. Mit diesen Proben ist besonders vorsichtig umzugehen, um Überverdauung 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 4°C aufbewahrt werden.

Empfehlungen zur Durchführung

- Durch die Verwendung von Reagenzien, die nicht von Cytocell Ltd. empfohlen sind, können die Hybridisierungsbedingungen negativ beeinflusst werden.
- Es wird dringend empfohlen, zur Temperaturmessung von Lösungen, Wasserbädern und Inkubatoren ein geeichtes Thermometer zu verwenden, da diese Temperaturen für die optimale Leistung des Produkts ausschlaggebend sind.
- Die Konzentration der Waschlösungen, pH und Temperatur sind wichtig, da niedrig stringente Bedingungen zu nicht spezifischer Bindung der Sonde führen kann und zu hohe Stringenz zum Verlust des Signals.
- Unvollständige Denaturierung kann zu einem Verlust des Signals führen und übermäßige Denaturierung kann zu nicht spezifischer Bindung der Sonde führen.
- Bei übermäßiger Hybridisierung kann es zu zusätzlichen oder unerwarteten Signalen kommen.
- Die Anwender sollten das Protokoll für ihre eigenen Proben optimieren, bevor sie den Test zu diagnostischen Zwecken verwenden.

Zu erwartende Ergebnisse

In einer normalen Zelle werden zwei rote/grüne Fusionssignale erwartet (2F). In einer Zelle mit einer ausgeglichenen FOXO1-Neuanordnung lautet das erwartete Signalmuster 1 Fusion, 1 rot und 1 grün (1R, 1G, 1F). In einer Zelle mit einer Verstärkung des proximalen FOXO1 lautet das erwartete Signalmuster 1 Fusion, 1 rot und verstärkt grün. Andere Signalmuster sind bei aneuploiden/unausgeglichenen Proben möglich.

Bekannte Kreuzreaktivität

Keine Kreuzreaktivität bekannt.

Einschränkungen

Protokollierung und Interpretation der FISH-Tests müssen den fachlichen Standards für die Praxis entsprechen und unter Berücksichtigung anderer klinischer und diagnostischer Informationen erfolgen.

Der Test ist als Ergänzung zur klassischen Zytogenetik zu verstehen. Daher sollten therapeutische Maßnahmen nicht allein auf Grundlage der FISH-Ergebnisse veranlasst.

Eine mangelnde Einhaltung des Protokolls kann die Leistung beeinträchtigen und zu falschen positiven/negativen Ergebnissen führen.

Dieses Kit wurde nicht für andere Zwecke als die vorgesehene Verwendung validiert.

Weitere Informationen:

Weitere Produktinformationen erhalten Sie vom Technischen Kundendienst von Cytocell.
T: +44 (0)1223 294048
E: techsupport@cytozell.com
W: www.cytozell.com

ESPAÑOL

La hibridación fluorescente *in situ* (FISH) es una técnica que permite detectar secuencias de ADN en cromosomas metafásicos o núcleos interfásicos de muestras citogenéticas fijas. La técnica utiliza sondas de ADN que hibridan con cromosomas enteros o secuencias únicas individuales, y constituye una potente herramienta auxiliar para la citogenética clásica. En recientes desarrollos se ha señalado que esta valiosa técnica puede aplicarse también ahora para evaluar las biopsias de tumores sólidos, que pueden aportar información importante para predecir la progresión tumoral. Las metodologías actuales, como la inmunohistoquímica o la técnica de pueden proporcionar datos a nivel de expresión génica, aunque, si se realizan cortes de tejido, con la FISH se puede obtener información a nivel génico, *in situ*, en el punto exacto en el interior del tumor. Esto puede poner de manifiesto la heterogeneidad intercelular y permitir la detección de pequeños clones de células genéticamente distintas.

Especificaciones de las sondas

Región FOXO1 13q14.1 en rojo
Región FOXO1 13q14.1 en verde

La sonda FOXO1 Breakapart consta de dos sondas (405kb y 183kb), marcadas en verde, situadas de forma proximal respecto al gen FOXO1, que cubren los marcadores D13S765 y SHGC-112293; y de otras cuatro sondas (123kb, 142kb, 95kb y 253kb), marcadas en rojo, situadas de forma distal al gen FOXO1 y que cubren los marcadores D13S638 y SHGC-16596.

Material incluido

Sonda: 50µl por vial (5 análisis) o 100µl por vial (10 análisis)

Cantidad de FOXO1 roja sonda: 34-59ng/análisis

Cantidad de FOXO1 verde sonda: 342.5-512.5ng/análisis

Las sondas se presentan premezcladas en la solución de hibridación (formamida; sulfato de dextrano; SSC) y listas para usar.

Contratinción: 150µl por vial (15 análisis)

La tinción se realiza con DAPI Antifade (ES: 0,125µg/ml de DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol)).

Advertencias y precauciones

1. Para diagnóstico in vitro. Sólo para uso profesional.
2. Utilizar guantes al manipular las sondas de ADN y la contratinción DAPI.
3. La sonda contiene formamida, que es teratogénica; no respire los vapores y evite el contacto con la piel. Utilizar guantes, bata de laboratorio y manipular utilizando la campana de humos. Para eliminarla, aclarar con abundante agua.
4. La contratinción DAPI puede producir cáncer. Manipular con cuidado; utilizar guantes y bata de laboratorio. Para eliminarla, aclarar con abundante agua.
5. Deseche todos los materiales peligrosos conforme a las directrices de su institución respecto a la eliminación de residuos peligrosos.
6. Los operadores deben ser capaces de diferenciar visualmente los colores rojo, azul y verde.
7. No seguir el protocolo puede influir en el rendimiento y causar resultados falsos positivos/negativos.

Almacenamiento y manipulación

Almacene el kit Aquarius® a -20°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del kit. Almacene la sonda y los viales de contraste en un lugar oscuro. Asegúrese de limitar la exposición de la sonda y del contracolorante a las luces del laboratorio en todo momento.

Material necesario pero no incluido

1. Placa calefactora (con una placa estable y un control de temperatura preciso hasta 80°C).
2. Micropipetas y puntas de volumen variable (de 1µl a 200µl).
3. Baño maría con control preciso de temperatura a 72°C.
4. Tubos de microcentrifugación (0,5ml).
5. Microscopio de fluorescencia (véase la sección Recomendaciones sobre el microscopio de fluorescencia).
6. Cubetas Coplin de cristal y de plástico.
7. Pinzas.
8. Aceite de inmersión para objetivos de microscopio de fluorescencia.
9. Centrífuga sobremesa.
10. Portaobjetos para microscopio.
11. Cubreobjetos de 24x24mm.
12. Temporizador.
13. Incubadora a 37°C.
14. Pegamento de solución de caucho.
15. Aquarius® Tissue Pretreatment Kit (LPS 100).

Recomendaciones sobre el microscopio de fluorescencia

Use una lámpara de mercurio de 100 vatios y equípese con objetivos apocromáticos x63 o x100 para una óptima visualización. Use un triple filtro de paso de banda DAPI/FITC/Texas Red para una visualización simultánea óptima de los fluoróforos verde y rojo y DAPI. Para los fluorocromos rojo y verde debe emplearse el doble filtro pasabanda FITC/Texas Red. Compruebe el microscopio de fluorescencia antes de usarlo para asegurarse de que funciona correctamente. Utilice un aceite de inmersión que sea adecuado para el microscopio de fluorescencia y esté formulado para una baja autofluorescencia. Siga las recomendaciones de los fabricantes respecto a la vida útil de la lámpara y la edad de los filtros.

Preparación de la muestra

Este kit está diseñado para ser utilizado en muestras de tejido fijadas en formalina y embebidas en parafina (FFPE) y debe ser preparado siguiendo las pautas del laboratorio o la institución.

Use secciones de tejido FFPE de 4-6 µm de grosor para FISH.

Pretratamiento de las muestras de tejido

El pretratamiento de las muestras de tejido debe realizarse de acuerdo con los protocolos del laboratorio o institución. Use el Aquarius® Tissue Pretreatment Kit (LPS 100) para obtener unos resultados óptimos.

Protocolo para la FISH

(Observación: Asegúrese de limitar la exposición de la sonda y del contracolorante a las luces del laboratorio en todo momento.)

Antes de la desnaturalización

1. Saque la sonda del congelador y deje que se caliente a temperatura ambiente (TA). Centrifugue brevemente los tubos antes de su uso.
2. Asegúrese de que la solución de la sonda queda homogéneamente mezclada con una pipeta.
3. Extraiga 10µl - 15µl (dependiendo del tamaño de la muestra) de la sonda por análisis e introdúzcalos en un tubo de microcentrifugación. Rápidamente vuelva a almacenar el resto de la sonda a -20°C.
4. Precaliente la sonda y el portaobjetos de la muestra en una placa calefactora a 37°C (+/- 1°C) durante 5 minutos.
5. Vierta 10µl - 15µl de la solución de la sonda sobre la muestra de células y coloque cuidadosamente un cubreobjetos. Selle con pegamento de solución de caucho y deje que el pegamento se seque completamente.

Desnaturalización

6. Desnaturalice la muestra y la sonda simultáneamente calentando el porta sobre la placa calefactora a 75°C (+/- 1°C) durante 5 minutos.

Hibridación

7. Introduzca el porta en un recipiente húmedo y opaco a 37°C (+/- 1°C) y déjelo toda la noche.

Lavados post-hibridación

8. Quite el cubreobjetos y los restos del pegamento cuidadosamente.
9. Sumerja el portaobjetos en 0,4xSSC (pH 7,0) a 72°C (+/- 1°C) durante 2 minutos sin agitar.
10. Deje escurrir el portaobjetos y sumérjalo en 2xSSC, 0,05% de Tween-20 (pH 7,0) a TA durante 30 segundos sin agitar.
11. Escurra el portaobjetos y añada 10µl - 15µl de DAPI antifade sobre cada muestra.
12. Coloque un cubreobjetos, extraiga las burbujas y deje revelar el color en un lugar oscuro durante 10 minutos.
13. Visualice con un microscopio de fluorescencia.

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, un tiempo de digestión enzimática más prolongado) 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 pretratamiento térmico y de la digestión enzimática dependerá de la edad del bloque, la composición del tejido y la calidad de la fijación tisular. La digestión enzimática 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 sometidos a la técnica FISH pueden analizarse durante 1 mes si se conservan en un lugar oscuro debajo de 4°C.

Recomendaciones para los procedimientos

1. Las condiciones de hibridación pueden verse afectadas negativamente si se emplean reactivos distintos de los suministrados o recomendados por CytoCell Ltd.
2. Use un termómetro calibrado para medir la temperatura de las soluciones, de los baños maría y de las incubadoras, ya que estas temperaturas son cruciales para un rendimiento óptimo del producto.
3. Las concentraciones de los lavados, el pH y las temperaturas son importantes ya que unas condiciones poco rigurosas pueden provocar una hibridación inespecífica de la sonda y unas condiciones demasiado rigurosas pueden derivar en una falta de señal.
4. Una desnaturalización incompleta puede provocar falta de señal y una desnaturalización excesiva también puede originar una hibridación inespecífica.
5. La hibridación excesiva puede producir señales adicionales o inesperadas.
6. Se recomienda a los usuarios optimizar el protocolo para sus propias muestras antes de usar la prueba con fines de diagnóstico.

Interpretación de los resultados

En una célula normal, se esperan dos señales de fusión roja/verde (2F). En una célula con un reordenamiento equilibrado de FOXO1, el patrón de señal esperado será 1 fusión, 1 roja y 1 verde (1F, 1R, 1V). En una célula con amplificación de FOXO1 proximal, el patrón de señal esperado será 1 fusión, 1 roja y verde amplificada. En muestras aneuploides/desequilibradas se pueden producir otros patrones de señal.

Reactividad cruzada conocida

No presenta reactividad cruzada conocida.

Limitaciones

La comunicación y la interpretación de FISH debe ser conforme a los estándares de prácticas profesionales, y debe tener en consideración otra información clínica y de diagnóstico. Esta prueba está diseñada como un complemento de la citogenética clásica y no deben tomarse medidas terapéuticas basándose únicamente en el resultado de FISH. No seguir el protocolo puede influir en el rendimiento y causar resultados falsos positivos/negativos.

Este kit no ha sido validado para fines distintos al uso destinado especificado.

Información adicional

Si desea obtener información adicional sobre el producto, póngase en contacto con el Departamento de soporte técnico de CytoCell.









T: +44 (0)1223 294048

E: techsupport@cytoCell.com

W: www.cytoCell.com

Referencias/Bibliographie/Bibliographia/Literatur/Bibliografia

1. Anderson *et al.*, Am J Pathol. 2001 Sep;159(3):1089-96
2. Jothi *et al.*, Mol Cancer Ther. 2013 Dec;12(12):2663-74
3. Ognjanovic *et al.*, Cancer 2009; 115(18): 4218-4226.
4. Sorensen *et al.*, J Clin Oncol. 2002;20(11):2672-9
5. Skapek *et al.*, Pediatr Blood Cancer. 2013 Sep;60(9):1411-7
6. Duan *et al.*, Genes Chromosomes Cancer. 2012 Jul; 51(7):662-674

| | |
|---|--|
| REF | EN: Catalogue number DE: Bestellnummer FR: Référence du catalogue IT: Numero di catalogo ES: Número de catálogo |
|  | EN: <i>In vitro</i> diagnostic device DE: <i>In-vitro</i> -Diagnostikum FR: Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i> IT: Dispositivo medico-diagnostico <i>in vitro</i> ES: Producto sanitario para diagnóstico <i>in vitro</i> |
|  | EN: Batch code DE: Loscode FR: Code du lot IT: Codice lotto ES: Código de lote |
|  | EN: Consult instructions for use DE: Gebrauchsanweisung beachten FR: Consulter la notice d'utilisation IT: Consultare le istruzioni per l'uso ES: Consulte las instrucciones de uso |
|  | EN: Manufacturer DE: Hersteller FR: Fabricant IT: Prodotto da ES: Fabricante |
|  | EN: Use by DE: Haltbarkeitsdatum FR: A utiliser avant IT: Scadenza ES: Fecha de caducidad |
|  | EN: Temperature limitation DE: Temperaturbegrenzung FR: Limites de température IT: Limiti di temperatura ES: Limitación de temperatura |
|  | EN: Sufficient for <n> tests DE: Ausreichend für <n> Tests FR: Suffisant pour <n> tests IT: Sufficiente per <n> test ES: Válido para <n> análisis |
|  | EN: Contents DE: Inhalt FR: Contenu IT: Contenuto ES: Contenido |

Patents and Trademarks

Aquarius and Cytocell are registered trademarks of Cytocell Ltd.
This product contains technology licensed from Life Technologies Corporation
that is available for human diagnostics or life science research use only.



Cytocell Ltd.
3-4 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