

Protocole SONDE LOCUS SPECIFIQUE (Pour la recherche uniquement)

Présentation de la sonde

Sonde fournie dans un tube de 1,5 ml (transparent, bouchon coloré) + 1 tube de tampon d'hybridation (1x). L'étiquette sur le tube de la sonde mentionne le gène, la référence de la sonde, la couleur du marquage fluorescent, le numéro de lot et la date d'expiration*. L'étiquette sur le tube de tampon d'hybridation mentionne le numéro de lot et la date d'expiration.

Certificat d'analyse de lot inclus avec la sonde.

*STABILITE : 3 ans à partir de la date de fabrication.

Conditionnement

Sonde concentrée : 40 µl par tube (pour 20 tests)

Tampon d'hybridation 1x : 200 µl par tube

La sonde est directement marquée en rouge, orange, gold et/ou Aqua.

Table des filtres recommandés : voir page 2

Avertissements et précautions (voir Fiche de Données de Sécurité, nous consulter)

1. Pour utilisation en recherche uniquement. 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. Toutes matières dangereuses doivent être éliminées selon les réglementations en vigueur dans votre institution pour l'élimination des déchets dangereux.

Conservation et manipulation

Sonde livrée à température ambiante. **Dès réception, la sonde et le tampon d'hybridation doivent être conservés à -20°C, à l'abri de la lumière, jusqu'à la date d'expiration indiquée sur les tubes.**

Equipement/réactifs nécessaires non fournis

- a) Plaque chauffante avec bloc et contrôle de la température jusqu'à 90°C
- b) Micropipettes 1µl - 200µl
- c) Bain Marie avec contrôle de la température à 73°C
- d) Tubes à microcentrifugation (0,5 ml)
- e) Microscope à fluorescence (Voir la section Microscope et filtres)
- f) Jarres en plastique ou en verre
- g) Forceps
- h) Huile à immersion pour microscope à fluorescence
- i) Centrifugeuse de paillasse
- j) DAPI (MetaSystems - Réf. D-0902-500-DA)
- k) Rubber cement (disponible chez Amplitech ; Réf. PCA006)
- l) Kit de déparaffinage ; kit de prétraitement (MetaSystems – Réf. D-0905-025-TF) pour les coupes FFPE.

Préparation des échantillons

Les sondes Empire Genomics (EG) peuvent être utilisées sur métaphases ou noyaux interphasiques de chromosomes humains préparés selon le protocole en vigueur dans le laboratoire ou sur coupes de tissu inclus en paraffine (FFPE) prétraitées.

Protocole FISH de co-dénaturation

Préparation de la lame échantillon

1. Déposer l'échantillon cellulaire sur une lame propre.
2. Plonger la lame dans du 2xSSC, pH 7.0 pendant 2 minutes.
3. Déshydrater dans une série de bains éthanol (70%, 85% et 100%), 1 minute dans chaque bain.

Préparation de la sonde EG

4. Retirer la sonde du congélateur à -20°C et la laisser préchauffer à température ambiante.

5. Centrifuger le tube avant ouverture, bien homogénéiser la sonde en pipetant plusieurs fois.

(Remarque : Veuillez toujours vous assurer de limiter l'exposition de la sonde à l'éclairage du laboratoire et minimisez les cycles de congélation-décongélation)

6. Prélever 2 µl de sonde et diluer dans 8 µl de tampon d'hybridation (fourni avec la sonde) :

NOTE : la sonde contient de l'ADN Cot-1 (15 µg / 5 tests : 3 µg / réaction FISH)

7. Déposer 10 µl du mélange sonde/tampon d'hybridation sur la lame échantillon, et couvrir avec une lamelle en verre 22 x 22 mm. Sceller avec du rubber cement et laisser sécher.

Co-Dénaturation sonde/échantillon

Pour un échantillon de type sang périphérique

8. Placer la lame sur une plaque chauffante à **73°C (+/- 1°C)** et dénaturer pendant **2 minutes** ou placer sur un système multi lames programmable.

Pour un échantillon de type coupe FFPE

Après l'étape de prétraitement

8. Placer la lame sur une plaque chauffante à **75°C (+/- 1°C)** et dénaturer pendant **7 minutes** ou placer sur un système multi lames programmable.

Hybridation

9. Incuber la lame pendant **au moins 16h à 37°C (+/- 1°C)** à l'abri de la lumière dans une chambre humide ou dans un système d'hybridation programmable.

Lavages post-hybridation (maximum 4 lames à la fois)

10. Préchauffer la **solution de lavage 1 (0,4xSCC/0,3% NP-40, pH7.0)** à **73°C (+/- 1°C)**.

11. Retirer la lamelle et éliminer toute trace de rubber cement

12. Laver la lame dans la solution de lavage 1 (0,4xSCC/0,3% NP-40, pH7.0) à **73°C (+/- 1°C)** sous agitation 10-15 secondes et laisser ensuite dans cette même solution de lavage pendant exactement 2 minutes.

13. Egoutter la lame et laver dans la **solution de lavage 2 (2xSSC/0,1% NP-40, pH7.0)** à **température ambiante pendant 2 minute.**

14. Egoutter et bien sécher la lame sur du papier type Whatman à l'abri de la lumière avant de déposer 10 µl de DAPI antifading. Eviter la formation de bulles qui pourraient gêner la visualisation.

15. Couvrir avec une lamelle 22x22 mm et sceller. Laisser la coloration se développer dans l'obscurité pendant 15-20 minutes.

16. Visualiser avec un microscope à épifluorescence.

Détection

Consulter la table des fluorochromes et longueurs d'ondes ci-dessous pour une visualisation optimale des sondes

FLUOROCROME	COULEUR	Ex _{max} (nm)	Em _{max} (nm)
5-ROX (5-Carboxyl-x-rhodamine)	Rouge	580	603
5-Fluoresceine	Vert	496	520
5-TAMRA	Orange	552	576
Carboxyrhodamine 6G	Gold	525	551
Aqua	Bleu	431	480

Stabilité des lames

Les lames FISH sont analysables pendant 1 à 6 mois si elles sont conservées à l'obscurité et à -20°C dans une boîte à l'abri de l'humidité.

Recommendations

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 :

Liste des sondes « locus spécifique » d'EG disponible sur demande, nous contacter.

Veuillez contacter AmpliTech, Département Ventes/Marketing pour plus d'informations.

Note de version :

Modification lors du passage de la version Version 4_042019 à la version Version 5_082021 :

- Co-Dénaturation sonde/échantillon : Passage de 83°C pendant 3 minutes à 75°C pendant 7 minutes
- Lavage n°2 : passage du temps de lavage de 1 min à 2 min

Version 5_082021