

Résolution de problèmes

Problème	Cause(s) probables	Solutions recommandées
Absence de signaux FISH au microscope.	<ul style="list-style-type: none"> Obturateur fermé / tirette d'arrêt dans le trajet optique. Lampe à fluorescence éteinte. Mauvais cube de filtre dans le trajet optique. Objectifs mal positionnés. Phototube en position camera. 	<ul style="list-style-type: none"> Ouvrir l'obturateur / dégager la tirette du trajet optique. Allumer la lampe. Positionner le cube correct dans le trajet optique. Positionner l'objectif sur le trajet optique. Diriger la lumière vers les oculaires.
Signaux faiblissent au bout d'un certain temps.	<ul style="list-style-type: none"> L'huile à immersion s'est infiltrée entre lame et lamelle. 	<ul style="list-style-type: none"> Remonter la lame. Utiliser des lamelles 24 x 32 mm² même si la région hybride est petite.
Signaux diffus.	<ul style="list-style-type: none"> Eclairage inadéquat de la lame. La mise au point ne peut être faite correctement. La couche de solution de montage est trop épaisse. 	<ul style="list-style-type: none"> Vérifier le trajet optique du microscope. Ajuster la lampe UV correctement. Vérifier la durée de vie de la lampe. Utiliser suffisamment d'huile à immersion. Ne pas mélanger des huiles différentes. Utiliser une huile à immersion spécifique pour la fluorescence. Ne pas mettre trop de solution DAPI/antifade. 10 µl par lame (lamelle de 24 mm x 32 mm) suffisent.
Signaux faibles.	<ul style="list-style-type: none"> Lames trop anciennes. Dénaturation des chromosomes inadéquate. 	<ul style="list-style-type: none"> Les lames doivent être âgées de moins de 3 semaines. Des procédures de vieillissement, cuisson ou post-fixation des préparations peuvent nuire à l'hybridation en ne sont pas recommandées.
Bruit de fond intense et diffus en filtre vert.	<ul style="list-style-type: none"> Le pH des solutions de lavage est trop bas. Concentration en DAPI trop élevée provoquant interférence sur le spectre vert. 	<ul style="list-style-type: none"> S'assurer que le pH des solutions est compris entre 7.0 and 7.5. Les fluorochromes FITC sont sensibles à un pH inférieur à 7. Réduire la concentration du DAPI/antifade.

Si les solutions proposées ne corrigent pas le problème, ou si le problème ne figure pas sur la liste, veuillez contacter MetaSystems Probes.

Support Client

Veuillez contacter MetaSystems Probes GmbH (coordonnées ci-dessous) ou nos représentants distributeurs dans votre pays. La société MetaSystems renonce à tout titre de propriété sur les marques et noms de produits autres que les siens.

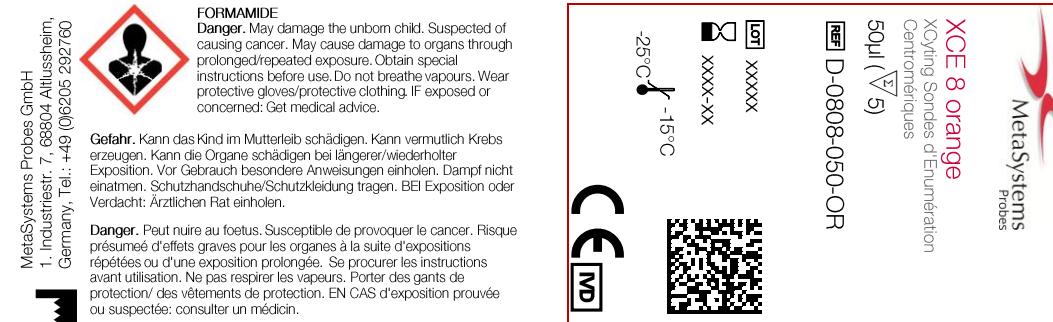


MetaSystems Probes GmbH
1. Industriestraße 7
68804 Altlussheim
Germany
Tel.: +49 (0)6205 292760
Fax: +49 (0)6205 2927629
email: info@metasystems-probes.com
URL: www.metasystems-probes.com

Revision: Rev A 160908

Symboles Utilisés

Symbole Description			
	Ce symbole marque un produit comme « Dispositif Médical de diagnostic In Vitro ». La procédure IVD est utilisée selon la directive 98/79EC.		Tous les avertissements sont signalés par un triangle contenant un point d'exclamation. En fonction de leur nature ils sont complétés avec les mots ATTENTION ou DANGER.
	Fabriquant		Référence numéro
	Numéro de tests		Numéro de lot
	Date de péremption		Limites de température de conservation



XCyting Sondes d'Enumération Centromérique

Usage professionnel uniquement

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

Produit	Marque	No. Référence	Conditionnement
XCE 8 orange	orange	D-0808-050-OR	50µl

La sonde XCE 8 est composée de séquences répétitives spécifiques à la région centromérique du chromosome 8 marquée en orange. Les sondes XCE de MetaSystems ont été optimisées pour un temps d'hybridation de 1 heure.

Schéma de marquage:



V130227

Chromosome 8

Conditionnement

50μl of XCE 8 orange, est fournie prête à l'emploi dans le tampon d'hybridation.

Utilisation prévue

conçue pour l'hybridation in situ en fluorescence (FISH), est utilisé dans l'analyse des aberrations chromosomiques sur des échantillons cytogénétiques fixés obtenus à partir de tissus humains tels que lymphocytes, amniocytes, moelle osseuse ou tout autre tissu permettant une étude cytogénétique. Elle s'hybride spécifiquement aux séquences hautement répétitives de la région centromérique du chromosome respectif et permet l'analyse des variations du nombre de copies.

Consignes de sécurité

Toutes les sondes MetaSystems Probes sont destinées à un usage professionnel uniquement, et doivent être manipulées par du personnel qualifié et formé. Pour garantir la sécurité des opérations et la reproductibilité des résultats, veuillez observer les avertissements et consignes de sécurité ci-dessous :



DANGER: Le Formamide est un agent toxique et un tératogène potentiel !

Les sondes MetaSystems Probes contiennent du Formamide, substance classée comme toxique et tératogène. Peut nuire au fœtus. Ne pas respirer les vapeurs, évitez le contact avec la peau. Porter des gants et une blouse de laboratoire. En cas de contact avec la peau ou les yeux, rincer abondamment à l'eau.



DANGER: Bains-marie et plaques très chaudes !

Les étapes de dénaturation et d'hybridation utilisent des bains-marie et plaques chauffantes à une température >37°C. Veuillez à ne pas entrer en contact direct avec des surfaces ou liquides très chauds. Porter des gants et une blouse de laboratoire. En cas de contact avec la peau, refroidir immédiatement à l'eau froide.



ATTENTION: Bonnes pratiques de laboratoire!

Utiliser selon les principes des bonnes pratiques de laboratoire.



ATTENTION: Elimination des déchets!

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

Conservation et Manipulation

Les sondes ADN doivent être conservées à -20°C (±5°C). L'efficacité du produit a été montrée d'être inchangée jusqu'à 20 cycles de congélation et décongélation.

Transport

Les sondes ADN MetaSystems Probes sont envoyées à température ambiante.

Équipement nécessaire non fourni

- Bain-marie avec contrôle de température
- Micropipettes à volume variable (de 1μl à 1ml) sont calibrées
- Thermomètre
- pH-mètre, calibré
- Minuteurs
- Jarres « coplin » en verre ou céramique
- Plaque chauffante 75°C (±1°C), avec bloc et contrôle de la température jusqu'à 80°C
- Congélateur -20°C (±5°C)
- Chambre humide à 37°C (±1°C)
- Forceps
- Gants
- Micro centrifugeuse de paillasse
- Microscope à fluorescence associés avec des filtres adéquats (voir ci-dessous)
- Huile d'immersion pour fluorescence recommandée par le fournisseur microscope (au grade fluorescence)
- Système d'imagerie, p.ex.. Isis (MetaSystems)
- Lamelles en verre:
22 x 22 mm² and 24 x 32 mm²
- Rubber Cement
- DAPI/antifade

Recommendations pour le Microscope et les Filtres

- Source lumineuse: systèmes d'illumination à lampe métal halide ou lampes à mercure conventionnelles de 100 watts peut être utilisé.
- Objectifs: objectifs adaptées à l'épi-fluorescence.
- Filtres fluorescents : Utiliser pour la visualisation et/ou le comptage de spots un set de filtres MetaSystems triple ou un set de filtre quad passband. Pour la capture d'images, utiliser des filtres à bande-passante unique correspondant au fluorochrome utilisé. Se renseigner pour plus de détails.

Spécification du Fluorochrome

Marquage	Absorption max.	Émission max.
Blue (aqua)	426 nm	480 nm
Green	505 nm	530 nm
Orange	552 nm	576 nm

Préparation des échantillons

Remarques générales

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

Stabilité des lames hybridées

Les lames FISH hybridées sont analysables pendant au moins 6 mois si elles sont conservées à l'abri de la lumière et à -20°C (±5°C).

Recommandations supplémentaires

- L'usage d'un thermomètre calibré est fortement recommandé. En effet, la température des solutions, du bain-marie et des incubateurs sont des paramètres essentiels pour une efficacité optimale du produit.
- Vérifier soigneusement la température des solutions préchauffées.
- Contrôler soigneusement le pH de toutes les solutions utilisées. Il doit se trouver entre 7.0 et 7.5 à température ambiante.
- La concentration en sels des solutions de lavage (stringence), ainsi que le pH et la température sont critiques. Une stringence faible peut provoquer des hybridations non-spécifiques, et une stringence trop forte peut affaiblir le signal.
- Avant d'ouvrir: centrifuge brièvement l'échantillon de la sonde afin que tout son volume se retrouve dans le culot.

Protocole FISH pour sondes ADN MetaSystems Probes

Préparation des lames

1. Etaler la suspension cellulaire sur une lame propre. Sécher à l'air. Si les lames ne sont pas utilisées immédiatement, conserver à -20°C (+5°C).
2. Déposer 10 μl de sonde par lame .
3. Couvrir avec une lamelle 22 x 22 mm².
4. Sceller avec du rubber cement.

Dénaturation

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

Hybridation

1. Incuber dans une chambre humide à 37°C (+/- 1°C) au moins pendant 1 heure ou pendant la nuit (overnight).

Lavages post-hybridation

Solutions requises

- 0.4 x SSC (pH 7.0 – 7.5) à 72°C (+/- 1°C)
- 2 x SSC /0.05% Tween-20 (pH 7.0) à température ambiante

Procédure

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

Contre-coloration

Solutions requises:

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

Procédure:

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

Résultats attendus

XCE 8 orange hybride à une préparation métaphasique humaine normale présente 2 signaux distincts, chacun sur un homologue du chromosome respectif. Sur les échantillons de noyaux interphasiques normaux, chaque région centromérique du chromosome respectif est représentée par un signal, résultant en 2 signaux au total. Les gains ou pertes de signaux indiquent des anomalies de nombre des chromosomes respectifs. Une faible hybridation non-spécifique sur les régions centromériques d'autres chromosomes peut éventuellement être observée. Ceci peut être réduit en augmentant la stringence des lavages post-hybridation , soit par élévation de la température (74°C pendant 4 min), soit par diminution de la concentration en sels du tampon (0.25xSSC).