



A Sysmex Group Company



Instructions For Use
REF: LPS 021-S / LPS 021

TMPRSS2/ERG Deletion/Breakapart Probe



PROFESSIONAL USE ONLY

ENGLISH/FRANÇAIS/ITALIANO/DEUTSCH/ESPAÑOL

Further information available at www.ogt.com

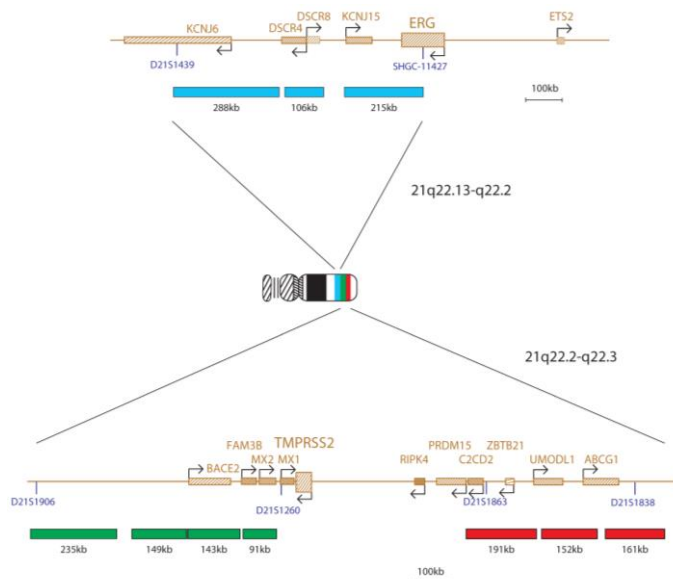
Fluorescence *In Situ* Hybridisation (FISH) is a technique that allows DNA sequences to be detected on metaphase chromosomes or in interphase nuclei from fixed cytogenetic samples. The technique uses DNA probes that hybridise to entire chromosomes or single unique sequences, and serves as a powerful 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 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 Information

Recent studies suggest that over 50% of prostate tumours may carry a chromosomal rearrangement of chromosome 21q22¹. The genes involved are the androgen-inducible TMPRSS2 (Transmembrane protease, serine 2 (21q22.3)) and an ETS (E-twenty six) family transcription factor, ERG (v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene like (21q22.2))¹. An apparent intrachromosomal deletion of 3Mb on chromosome 21 fuses TMPRSS2 to ERG. The rearrangement places ERG under the androgen-regulated transcriptional control of TMPRSS2². This fusion is associated with disease progression and the rearrangement in prostate cancer may account for molecular and clinical heterogeneity³. This represents an important subclassification of prostate cancer from a biological and a clinical standpoint³.

Probe Specification

TMPRSS2, 21q22.2-q22.3, Red
TMPRSS2, 21q22.2-q22.3, Green
ERG, 21q22.13-q22.2, Blue



The TMPRSS2/ERG Deletion/Breakapart probe is a three colour probe that consists of green probes and red probes positioned on each side of the

TMPRSS2 gene, as well as three blue probes that cover the centromeric region of the ERG gene, up to D21S1439 marker.

Materials Provided

Probe: 50µl per vial (5 tests) or 100µl per vial (10 tests)

Amount of Red TMPRSS2 probe: 84-105ng/test

Amount of Green TMPRSS2 probe: 300-375ng/test

Amount of Blue ERG probe: 358-448ng/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. All hazardous materials should be disposed of according to your institution's guidelines for hazardous waste disposal.

Storage and Handling

The kit should be stored between -25°C to -15 °C in a freezer 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

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. Tissue Pretreatment Kit (LPS 100).

Fluorescence Microscope Recommendation

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 and DAPI simultaneously. Alternatively for viewing red and green fluorophores use dual bandpass filter FITC/Texas Red. The blue fluorophore has specificity to the Aqua and DEAC spectrum (single bandpass Aqua or DEAC filter is required).

Sample Preparation

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

Tissue Sample Pretreatment

Tissue sample pretreatment should be done according to the laboratory or institution guideline. For optimal results use the Tissue Pretreatment Kit (LPS 100).

FISH Protocol

(Note: Please ensure that exposure of the probe 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).
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 the freezer.
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.

- Drain the slide and apply 10µl - 15µl of DAPI antifade onto each sample.
- Cover with a coverslip, remove any bubbles and allow the colour to develop in the dark for 10 minutes.
- 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. Enzyme digestion 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 below 4°C.

Procedural Recommendations

- Hybridisation conditions may be adversely affected by the use of reagents other than those provided or recommended by CytoCell Ltd.
- 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, 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.
- Incomplete denaturation can result in lack of signal and over denaturation can also result in non-specific binding.

Expected Results

In the normal cell, 2 red/green/blue (can appear as yellow, Y) signals are expected (2Y). A deletion of a probe target results in, 1 red/green/blue (can appear as yellow Y) and 1 red/blue (1RGB, 1RB). A translocation involving TMPRSS2 gene will result in, 1RGB, 1GB, 1R: 1 red and 1 green/blue from the derivative chromosome and 1 fused red/green/blue from the normal chromosome. A translocation involving ERG gene will result in, 1RGB, 1RG, 1B: 1 blue and 1 red/green from the derivative chromosome and 1 fused red/green/blue from the normal chromosome.

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.

Additional Information

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

T: +44 (0)1223 294048
E: techsupport@cytoCELL.com
W: www.cgt.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 transfert de Southern, peuvent fournir des informations au niveau de l'expression génique, mais la technique FISH, lorsqu'elle est appliquée à des coupes tissulaires (soit sur coupes au cryostat ou après inclusion dans la paraffine), peut fournir des informations au niveau des gènes, *in situ*, du site intratumoral précisément concerné. Ceci permet de déceler l'hétérogénéité entre les cellules et de détecter de petits clones de cellules génétiquement distinctes.

Caractéristiques de la sonde

Sonde de la région TMPRSS2, 21q22.2-q22.3, en Rouge
Sonde de la région TMPRSS2, 21q22.2-q22.3, en Vert
Sonde de la région ERG, 21q22.13-q22.2, en Bleu

La sonde TMPRSS2/ERG Deletion/Breakapart est une sonde tricolore qui se compose de sondes vertes et de sondes rouges positionnées de chaque côté du gène TMPRSS2, ainsi que de trois sondes bleues qui couvrent la région centromérique du gène ERG jusqu'au marqueur D21S1439.

Conditionnement

Sonde : 50µl par tube (5 tests) ou 100µl par tube (10 tests)
Quantité de sonde TMPRSS2, Rouge: 84-105ng/test
Quantité de sonde TMPRSS2, Vert: 300-375ng/test.
Quantité de sonde ERG, Bleu: 358-448ng/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-phénylindole)).

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 précaution. Porter des gants et une blouse de laboratoire. Après élimination, rincer abondamment avec de l'eau.

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

Conservation et manipulation

Le kit devra être stocké au congélateur entre -25°C et -15°C jusqu'à la date d'expiration figurant sur l'étiquette du kit. La sonde et le contre-colorant doivent être conservés à l'abri de la lumière.

Équipement nécessaire non fourni

- Plaque chauffante (avec bloc et contrôle de la température jusqu'à 80°C).
- Micropipettes de volume variable et gamme d'embouts de 1µl - 200µl.
- Bain-marie avec contrôle précis de la température à 72°C.
- Tubes à microcentrifugation (0,5ml).
- Microscope à fluorescence (Voir la section Microscope à fluorescence recommandés).
- Bocaux Coplin en plastique ou en verre.
- Pinces.
- Huile à immersion pour microscope à fluorescence.
- Centrifugeuse de paillasse.
- Lames de microscope.
- Lamelles 24x24mm.
- Chronomètre.
- Incubateur à 37°C.
- Colle à base de caoutchouc.
- Tissue Pretreatment Kit (LPS 100).

Microscope à fluorescence recommandés

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 et du DAPI simultanément. Pour la visualisation des fluorochromes rouge et vert, utiliser le filtre double bande FITC/Texas Red. Le fluorochrome bleu a une spécificité par rapport au spectre Aqua ou DEAC (un filtre triple bande Aqua ou DEAC est requis).

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 4µm - 6µm doivent être utilisés.

Prétraitement des échantillons de tissu

Le prétraitement des échantillons de tissu doit être effectué conformément aux directives du laboratoire ou de l'établissement. Pour de meilleurs résultats, utiliser le Tissue Pretreatment Kit (LPS 100).

Protocole FISH

(Remarque : Veuillez toujours vous assurer de limiter l'exposition de la sonde à l'éclairage du laboratoire)

Pré-dénaturation

- Retirer la sonde du congélateur et la laisser se remettre à température ambiante (TA).
- Bien homogénéiser la sonde en pipetant plusieurs fois.
- Prélever 10µl - 15µl (en fonction de la taille du tissu) de sonde par test et placer dans un tube à microcentrifugation. Remplacez rapidement le reste de sonde dans le congélateur.
- Mettre la sonde et la lame échantillon à préchauffer sur une plaque chauffante à 37°C (+/- 1°C) pendant 5 minutes.
- 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

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

Hybridation

- 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

- Retirer la lamelle et éliminer toute trace de colle à base de caoutchouc.
- Laver la lame dans du tampon 0,4xSSC (pH 7,0) à 72°C (+/- 1°C) pendant 2 minutes sans agiter.
- Egoutter la lame et laver dans du tampon 2xSSC, 0,05% Tween-20 (pH 7,0) à TA pendant 30 secondes sans agiter.
- Sécher la lame et appliquer 10µl - 15µl de DAPI antifade sur chaque échantillon.
- Récouvrir d'une lamelle, éliminer les bulles et laisser la coloration apparaître à l'abri de la lumière pendant 10 minutes.
- 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. La digestion enzymatique devrait être réduite 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 sont analysables pendant un mois si elles sont conservées à l'abri de la lumière et à au dessous de 4°C.

Recommandations

- Les conditions d'hybridation peuvent être affectées par l'utilisation de réactifs autres que ceux fournis ou recommandés par CytoCell Ltd.
- 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, 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.
- Une dénaturation incomplète peut engendrer une perte de signal et une trop forte dénaturation une hybridation non-spécifique.

Interprétation des résultats

Dans une cellule normale, 2 signaux rouge/vert/bleu (peuvent apparaître comme signal jaune, J) doivent apparaître (2J). La suppression d'une cible de la sonde génère 1 signal rouge/vert/bleu (peut apparaître comme signal jaune) et 1 signal rouge/bleu (1RVB, 1RB). Une translocation impliquant le gène TMPRSS2 génère 1RVB, 1VB, 1R : 1 signal rouge et 1 signal vert/bleu à partir du chromosome dérivé et 1 signal fusionné rouge/vert/bleu partir du

chromosome normal. Une translocation impliquant le gène ERG génère 1RVB, 1RV, 1B : 1 signal bleu et 1 signal rouge/vert à partir du chromosome dérivé et 1 signal fusionné rouge/vert/bleu partir du chromosome normal.

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.

Informations supplémentaires

Pour plus d'informations sur le produit, veuillez contacter l'Assistance technique CytoCell.
T: +44 (0)1223 294048
E: techsupport@cytozell.com
W: www.ogt.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 interfasi da campioni citogenetici fissati. La tecnica utilizza sonde di DNA che ibridano 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 valutazioni 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 Southern blotting, possono fornire informazioni a livello di espressione genica ma, quando eseguite su tessuto (sia al criostato che incluse in paraffina), la FISH può fornire informazioni a livello di gene, *in situ*, al sito preciso all'interno del tumore. Questo può rivelare l'eterogeneità tra cellule e consentire l'individuazione di piccoli cloni di cellule geneticamente distinte.

Specifiche della sonda

Regione TMPRSS2, 21q22.2-q22.3, Rosso
Regione TMPRSS2, 21q22.2-q22.3, Verde
Regione ERG, 21q22.13-q22.2, Blu

La sonda TMPRSS2/ERG Deletion/Breakapart è una sonda a tre colori costituita da sonde verdi e sonde rosse su ciascun lato del gene TMPRSS2, e da tre sonde blu che coprono la regione centromerica del gene ERG fino al marcatore D21S1439.

Materiali forniti

Sonda: 50µl per flaconcino (5 test) o 100µl per flaconcino (10 test)
Quantità di sonda TMPRSS2, Rosso: 84-105ng/test
Quantità di sonda TMPRSS2, Verde: 300-375ng/test
Quantità di sonda ERG, Blu: 358-448ng/test
Le sonde sono fornite premiscelate nella soluzione di ibridazione (formamide; destrano solfato; SSC) e pronte per l'uso.

Colorante di contrasto:

150µl per flaconcino (15 test)
Il colorante di contrasto è costituito da DAPI antifade (ES: 0,125µg/ml DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindolo)).

Avvertenze e precauzioni

- Per uso diagnostico *in vitro*. Solo per uso professionale.
- Quando si maneggiano le sonde e il colorante di contrasto DAPI, è necessario indossare guanti.
- Le miscele delle sonde contengono formamide, una sostanza teratogena. Non respirare i fumi ed evitare il contatto con la pelle. Indossare guanti e camicia da laboratorio e maneggiare sotto cappa chimica. Per lo smaltimento, sciacquare con grandi quantità di acqua.
- Il DAPI è un potenziale cancerogeno. Maneggiare con cura, indossare guanti e camicia da laboratorio. Per lo smaltimento, sciacquare con grandi quantità di acqua.
- Lo smaltimento dei materiali pericolosi deve avvenire nel rispetto delle normative interne dell'istituzione relative allo smaltimento dei rifiuti pericolosi.

Conservazione e manipolazione

Conservare il kit in congelatore a una temperatura compresa tra -25°C e -15°C fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta. I flaconcini della sonda e del colorante di contrasto devono essere conservati al buio.

Apparecchiature necessarie ma non fornite

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

Caratteristiche consigliate per il microscopio a fluorescenza

Per una visualizzazione ottimale della sonda si consiglia di utilizzare una lampada al mercurio da 100 watt e obiettivi planapocromatici 63x o 100x. Il filtro triplo DAPI/FITC/Texas Red è ottimale per visualizzare contemporaneamente tutti e tre i fluorofori e il DAPI. In alternativa, utilizzare il doppio filtro passabanda FITC/Texas Red per visualizzare i fluorofori rosso e verde. Il fluoroforo blu presenta specificità per lo spettro di Aqua e DEAC (è necessario un filtro passabanda per Aqua o DEAC).

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 4µm - 6µm.

Pretrattamento del campione di tessuto

Il pretrattamento del campione di tessuto deve essere eseguito secondo il protocollo in uso nel proprio laboratorio o istituzione. Per risultati ottimali utilizzare il Tissue Pretreatment Kit (LPS100).

Protocollo della FISH

(Nota: limitare l'esposizione della sonda alle luci del laboratorio durante l'intera procedura)

Pre-denaturazione

- Rimuovere la sonda dal congelatore e attendere che raggiunga la temperatura ambiente (TA).
- Mescolare con una pipetta la soluzione della sonda in modo da renderla omogenea.
- Trasferire in una provetta da microcentrifuga 10µl - 15µl (a seconda delle dimensioni del tessuto) di sonda per ciascun test da eseguire. Riporre velocemente la sonda non utilizzata nel congelatore.
- Pre-riscaldare la sonda e il vetrino con il campione su una piastra riscaldante a 37°C (+/- 1°C) per 5 minuti.
- 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

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

Ibridazione

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

Lavaggi post-ibridazione

- Rimuovere accuratamente il vetrino copri oggetto e qualsiasi residuo di colla.
- Lavare il vetrino in 0,4xSSC (pH 7.0) a 72°C (+/- 1°C) per 2 minuti, senza agitazione.
- Scolare il vetrino e lavare in 2xSSC, Tween-20 0,05% (pH 7.0) a TA per 30 secondi senza agitazione.
- Scolare il vetrino e applicare 10µl - 15µl di DAPI antifade su ciascun campione.
- Coprire con un vetrino copri oggetto, rimuovere eventuali bolle e attendere lo sviluppo del colore per 10 minuti lasciando il vetrino al buio.
- 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. La digestione enzimatica deve essere ridotta 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 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

- Le condizioni di ibridazione potrebbero essere influenzate negativamente dall'impiego di reagenti diversi da quelli forniti o consigliati da CytoCell Ltd.
- È fortemente consigliato l'uso di un termometro calibrato per la misurazione delle temperature delle soluzioni, dei bagni termostati e degli incubatori in quanto queste temperature sono di fondamentale importanza per il funzionamento ottimale del prodotto.
- Le concentrazioni, il pH e la temperatura dei lavaggi sono di fondamentale importanza in quanto condizioni di stringenza blande possono favorire un legame aspecifico della sonda, mentre condizioni di stringenza troppo elevate possono determinare l'assenza di segnale.
- Una denaturazione incompleta può determinare l'assenza di segnale, mentre una denaturazione eccessiva può produrre un legame aspecifico.

Interpretazione dei risultati

Nelle cellule normali è prevista la comparsa di 2 segnali rosso/verde/blu (che possono mostrarsi con aspetto giallo, G) (2G). La delezione di un bersaglio della sonda produrrà 1 segnale rosso/verde/blu (può apparire come giallo) e 1 segnale rosso/blu (1RVB, 1RB). Una traslocazione a carico del gene TMPRSS2 produrrà 1RGB, 1GB, 1R: 1 segnale rosso e 1 segnale verde/blu derivanti dal cromosoma derivativo e 1 segnale fuso rosso/verde/blu derivante dal cromosoma normale. Una traslocazione a carico del gene ERG darà come risultato 1RVB, 1RG, 1B: 1 segnale blu e 1 segnale rosso/verde derivanti dal cromosoma derivativo e 1 segnale fuso rosso/verde/blu derivante dal cromosoma normale.

Limitazioni

La referenziazione 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 alle tecniche citogenetiche classiche e azione terapeutica non deve essere messa in atto esclusivamente sulla base del risultato di FISH.

Informazioni aggiuntive

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

DEUTSCH

Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) ist eine Technik, mit der der Nachweis von DNA-Sequenzen auf Metaphasechromosomen oder in Interphasezellkernen fixierter zygotenischer 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 Tumorphase liefert. Aktuelle Methoden, wie z. B. Immunhistochemie oder Southern-Blotting, können Informationen auf Geneexpressionsniveau bereitstellen. Mit der FISH-Technik hingegen erhält man, sofern diese entweder am Kryostat oder an in Paraffin eingebetteten 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

TMPRSS2, 21q22.2-q22.3, Region, Rot
TMPRSS2, 21q22.2-q22.3, Region, Grün
ERG, 21q22.13-q22.2, Region, Blau
Die TMPRSS2/ERG Deletion/Breakapart-Sonde ist eine dreifarbige Sonde, die aus grünen und roten Sonden, die auf jeder Seite des TMPRSS2-Gens angeordnet sind, sowie drei blauen Sonden besteht, welche die Zentromerregion des ERG-Gens bis zum Marker D21S1439 abdecken.

Bestandteile des Kits

Sonde: 50µl pro Röhrchen (5 Tests) oder 100µl pro Röhrchen (10 Tests)

Menge an TMPRSS2, Rot Sonde: 84-105ng/Test

Menge an TMPRSS2, Grün Sonde: 300-375ng/Test

Menge an ERG, Blauen Sonde: 358-448ng/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

1. Zur Verwendung in der *in vitro* Diagnostik. Durchführung ausschließlich durch qualifiziertes Laborpersonal.
2. Beim Umgang mit DNA-Sonden und dem DAPI Farbstoff Handschuhe tragen.
3. 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.
4. DAPI ist ein potenzielles Karzinogen. Vorsichtig damit umgehen, Handschuhe und Labormantel tragen. Bei der Entsorgung mit viel Wasser nachspülen.
5. Alle Gefahrstoffe sollten gemäß den Ihren hausinternen Richtlinien zur Gefahrstoffentsorgung entsorgt werden.

Lagerung und Behandlung

Das Kit sollte bis zum Verfallsdatum, welches auf dem Etikett angegeben ist, in einem Gefrierschrank bei einer Temperatur zwischen -25 C und -15 C gelagert werden. Die Röhrchen mit den Sonden und der Gegenfärbung müssen im Dunkeln aufbewahrt werden.

Benötigte, aber nicht mitgelieferte Laborgeräte

1. Heizplatte (mit stabiler Platte und genauer Temperaturregelung bis 80°C).
2. Mikropipetten mit unterschiedlichen Volumen von 1µl - 200µl.
3. Wasserbad mit genauer Temperaturregelung bei 72°C.
4. Mikrozentrifugenröhrchen (0,5ml).
5. Fluoreszenzmikroskop (siehe auch „Empfehlungen zum Fluoreszenzmikroskop“).
6. Coplin-Färbetrog aus Kunststoff oder Glas.
7. Pinzette.
8. Für Fluoreszenzobjektive geeignetes Immersionsöl.
9. Tischzentrifuge.
10. Objektträger für das Mikroskop.
11. 24x24mm Deckgläser.
12. Zeituhr.
13. 37°C-Inkubator.
14. Gummilösung zum Versiegeln der Deckglasränder.
15. Tissue Pretreatment Kit (LPS 100).

Empfehlungen zum Fluoreszenzmikroskop

Für die optimale Visualisierung der Probe empfehlen wir die Verwendung plan-apochromatischer Objektive mit 63-facher oder 100-facher Vergrößerung sowie einer 100-Watt Quecksilberlampe. Das Dreifach-Bandpassfilter DAPI/FITC/Texasrot ist für die simultane Beobachtung aller drei Fluorophore und DAPI optimal geeignet. Alternativ dazu kann zur Beobachtung des roten und des grünen Fluorophors ein Zweifach-Bandpassfilter FITC/Texas Red verwendet werden. Das blaue Fluorophor hat eine Spezifität gegenüber dem Aqua- oder DEAC-Spektrum (ein Aqua- oder DEAC-Einfach-Bandpassfilter ist erforderlich).

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 4µm - 6µm dicke formalinfixierte und paraffineingebettete Gewebeproben zu verwenden.

Vorbehandlung von Gewebeproben

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

FISH-Protokoll

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

Prä-denaturierung

1. Nehmen Sie die Sonde aus dem Gefrierschrank und lassen Sie diese sich auf Zimmertemperatur aufwärmen.
2. Mischen der Sondenlösung durch mehrmaliges Aufpipettieren
3. Pro Test 10µl - 15µl (je nach Größe des Gewebes) Sonde entnehmen und in ein Mikrozentrifugenröhrchen geben. Stellen Sie die restliche Probe schnell wieder zurück in den Gefrierschrank.
4. Sonde und Probenobjektträger 5 Minuten auf einer Heizplatte bei 37°C (+/- 1°C) vorwärmen.
5. 10µl - 15µl Sondenmischung auf die Zellprobe auftropfen und Deckglas sorgfältig auflegen. Mit Gummikleber-Lösung versiegeln und vollständig trocknen lassen.

Denaturierung

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

Hybridisierung

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

Waschen nach der Hybridisierung

8. Deckglas und alle Kleberspuren vorsichtig entfernen.
9. Objektträger 2 Minuten lang bei 72°C (+/- 1°C) in 0,4xSSC (pH 7,0) waschen.
10. Objektträger abtropfen lassen und 30 Sekunden bei Zimmertemperatur in 2xSSC, 0,05% Tween-20 (pH 7,0), waschen.
11. Objektträger abtropfen lassen und 10µl - 15µl DAPI Antifade zu jeder Probe geben.
12. Mit einem Deckglas abdecken, die Luftblasen entfernen und 10 Minuten unter Lichtschutz entwickeln lassen.
13. 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 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 4°C aufbewahrt werden.

Empfehlungen zur Durchführung

1. Durch die Verwendung von Reagenzien, die nicht von CytoCell Ltd. empfohlen sind, können die Hybridisierungsbedingungen negativ beeinflusst werden.
2. 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.
3. 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.
4. Unvollständige Denaturierung kann zu einem Verlust des Signals führen und übermäßige Denaturierung kann zu nicht spezifischer Bindung der Sonde führen.

Zu erwartende Ergebnisse

Bei einer normalen Zelle werden 2 rot-grüne-blaues (können auch als gelb erscheinen, Y) Signale erwartet (2Y). Bei einer Deletion eines Sondenziels wird 1 rot-grün-blaues (können auch als gelb erscheinen, Y) und 1 rot-blaues Signal (1RGB, 1RB) erhalten. Bei einer Translokation unter Beteiligung des TMPRSS2-Gens wird 1 RGB, 1GB, 1R erhalten: 1 rotes und 1 grün-blaues Signal von dem derivativen Chromosom und 1 vermischtes rot-grün-blaues Signal von dem normalen Chromosom. Bei einer Translokation unter Beteiligung des ERG-Gens wird 1 RGB, 1RG, 1B erhalten: 1 blaues und 1 rot-grünes Signal von dem derivativen Chromosom und 1 vermischtes rot-grün-blaues Signal von dem normalen Chromosom.

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.

Weitere Informationen:

Weitere Produktinformationen erhalten Sie vom Technischen Kundendienst von CytoCell.

T: +44 (0)1223 294048

E: techsupport@cytozell.com

W: www.ogt.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 Southern, pueden proporcionar datos a nivel de expresión génica, aunque, si se realizan cortes de tejido (criostato o inclusión en parafina), 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 TMPRSS2, 21q22.2-q22.3, en Rojo

Región TMPRSS2, 21q22.2-q22.3, en Verde

Región ERG, 21q22.13-q22.2, en Azul

La sonda TMPRSS2/ERG Deletion/Breakapart es una sonda de tres colores que está formada por sondas de color verde y sondas de color rojo que se sitúan a cada lado del gen TMPRSS2, así como tres sondas de color azul que abarcan la región telomérica del gen ERG hasta el marcador D21S1439.

Material incluido

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

Cantidad de Rojo, TMPRSS2 sonda: 84-105ng/análisis

Cantidad de Verde, TMPRSS2 sonda: 300-375ng/análisis

Cantidad de Azul, ERG sonda: 358-448ng/análisis

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

Contratención: 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 contratención DAPI.
3. La sonda contiene formamida, que es teratogena; 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 contratención DAPI puede producir cáncer. Manipular con cuidado; utilizar guantes y bata de laboratorio. Para eliminarla, aclarar con abundante agua.
5. Las sustancias peligrosas deben eliminarse de acuerdo con las instrucciones de su institución en relación con la eliminación de sustancias peligrosas.

Almacenamiento y manipulación

El kit debe almacenarse en un congelador a una temperatura comprendida entre -25°C y -15°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del kit. Los viales de las sondas y de la contratención deben almacenarse en un lugar oscuro.

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. Tissue Pretreatment Kit (LPS 100).

Recomendaciones sobre el microscopio de fluorescencia

Para una visualización óptima de la sonda, se recomienda utilizar una lámpara de mercurio de 100 vatios y objetivos Plan-Apochromat de 63 o 100 aumentos. El triple filtro pasabanda

DS163/CE v009.00/2020-12-01 (S022 v6)

DAPI/FITC/Texas Red es óptimo para ver simultáneamente los tres fluorocromos y DAPI. Para los fluorocromos rojo y verde debe emplearse el doble filtro pasabanda FITC/Texas Red. El fluorocromo azul tiene especificidad por el espectro Aqua o DEAC (se necesita filtro pasabanda sencillo Aqua o DEAC).

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 4µm - 6µm de grosor.

Pretratamiento de las muestras de tejido

El pretratamiento de las muestras de tejido debe realizarse de acuerdo con los protocolos del laboratorio o institución. Para un mejor resultado utilice el Tissue Pretreatment Kit (LPS 100).

Protocolo para la FISH

(Observación: asegúrese de limitar la exposición de la sonda a las luces del laboratorio en todo momento)

Antes de la desnaturalización

1. Saque la sonda del congelador a -20°C y deje que se caliente a temperatura ambiente (TA).
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. Vuelva a colocar la solución que quede en la sonda al congelador.
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 sumérgalo en 2xSSC, 0,05% de Tween-20 (pH 7,0) a TA durante 30 segundos sin agitar.
11. Escorra 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 tengan 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. Se recomienda encarecidamente el uso de un termómetro de precisión para medir las temperaturas de soluciones, baños maría e incubadores ya que estas temperaturas son cruciales para un resultado 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.

Interpretación de los resultados

En una célula normal, deben aparecer 2 señales roja/verde/azul (puede aparecer como amarillo), (2Am). Una delección de una de las dianas de las sondas produce 1 señal roja/verde/azul (puede aparecer como amarillo, Y) y 1 roja/azul (1RVAz, 1RAz). Una translocación en el gen TMRSS2 produce 1RVAz, 1VAz, 1R: 1 señal roja y 1 verde/azul del cromosoma derivado y 1 señal roja/verde/azul fusionada del cromosoma normal. Una translocación en el gen ERG produce 1RVAz, 1RV, 1Az: 1 señal azul y 1 roja/azul del cromosoma derivado y 1 señal roja/verde/azul fusionada del cromosoma normal.

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.









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.ogt.com

Referencias/Bibliographie/Bibliografia/Literatur/Bibliografía

1. Saramaki *et al.*, Clin Cancer Res 2008;14(11):3395-3400.
2. Lapointe *et al.*, Modern Pathology 2007;20(4):467-473.
3. Perner *et al.*, Cancer Res 2006;66(17):8337-8341.

	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 di lotto ES: Código
	EN: Consult instructions for use DE: Gebrauchsanweisung beachten FR: Consulter la notice d'utilisation IT: Consultare le istruzioni per l'uso ES: Consultarse las instrucciones de uso
	EN: Manufacturer DE: Hersteller FR: Fabricant IT: Fabbricante ES: Fabricante
	EN: Use by DE: Verwendbar bis FR: Utiliser jusqu'au IT: Utilizzare entro 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 FR: Suffisant pour IT: Sufficiente per ES: Válido para
	EN: Contents DE: Inhalt FR: Contenu IT: Contenuto ES: Contenido

Patents and Trademarks

CytoCell is a registered trademark of CytoCell Ltd.

This product contains technology licensed from Life Technologies Corporation and is available for human diagnostics or life science research use only.



CytoCell Ltd.

Oxford Gene Technology,
418 Cambridge Science Park,
Milton Road,
Cambridge, CB4 0PZ, UK
T: +44(0)1223 294048
F: +44(0)1223 294986
E: probes@cytoCell.com
W: www.ogt.com

REF	EN: Catalogue number DE: Bestellnummer FR: Référence du catalogue IT: Riferimento di Catalogo
------------	--