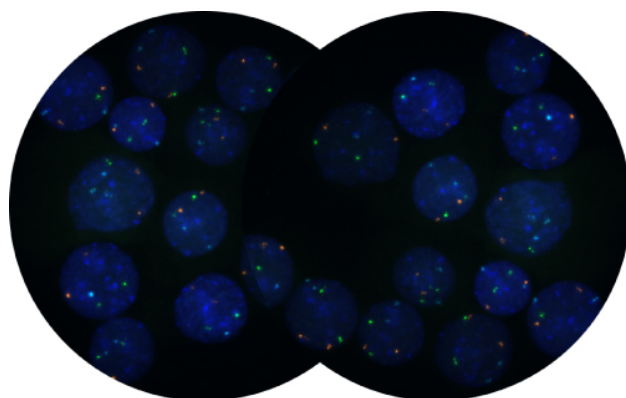


# CytoTest DNA FISH Sonde Gebruiksaanwijzing



CE **IVD**

**REF**

Van toepassing op volgende REF-groepen  
CT-PAC  
CT-LSP  
CT-CCP

## Inhoudsopgave

### Productinformatie

|  |   |
|--|---|
| Verklaring van de symbolen .....                         | 3 |
| Beoogde gebruiker .....                                  | 3 |
| Gebruikelijke productnaam .....                          | 3 |
| Beoogt gebruik .....                                     | 3 |
| Indicatie voor gebruik .....                             | 3 |
| Contra-indicaties .....                                  | 4 |
| Procedure beginselen .....                               | 4 |
| Beschrijving van het Product .....                       | 4 |
| Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen .....             | 5 |
| Opslag en Gebruik .....                                  | 5 |
| Verstreckte Materialen .....                             | 5 |
| Laboratoriumapparatuur vereist maar niet verstrekt ..... | 5 |

### Testprocedure

|   |    |
|---|----|
| <u>FISH Procedure voor FFPE Specimen</u>                      |    |
| Reagentia vereist maar Niet Verstrekt .....                   | 5  |
| Vorbereiding van Werkoplossingen .....                        | 6  |
| FISH Procedure voor Paraffine- ingebedde Weefselsecties ..... | 6  |
| <br>  |    |
| <u>FISH-Procedure voor Cytologische Specimen</u>              |    |
| Reagentia vereist maar Niet Verstrekt .....                   | 7  |
| Vorbereiding van Werkoplossingen .....                        | 7  |
| FISH Procedure voor Cytology .....                            | 9  |
| <br>  |    |
| <u>FISH Procedure voor vruchtwater vloeistof Specimens</u>    |    |
| Reagentia vereist maar Niet Verstrekt .....                   | 10 |
| Vorbereiding van Werkoplossingen .....                        | 10 |
| FISH Procedure voor Amniocyten .....                          | 12 |

### Interpretatie van het resultaat

|   |    |
|---|----|
| Signaalpatronen voor amplificatie/verwijdering Sondes ..... | 13 |
| Signaalpatronen voor Break-apart Sondes .....               | 13 |
| Signaalpatronen voor Fusie/Translocatie Sondes .....        | 13 |

### Supplementen

|  |    |
|--|----|
| Referenties.....                               | 14 |
| Informatie over de fabrikant .....             | 14 |
| Erkende EG Vertegenwoordigers Informatie ..... | 14 |

## PRODUCTINFORMATIE

### Verklaring van de Symbolen



Catalogus nummer



Naam en adres van de Fabrikant



*In vitro* diagnostisch medisch toestel



Gemachtigde vertegenwoordiger in de Europese Gemeenschap



Bevat voldoende reagens voor < n > testen



Biologische risico 's



Partijnummer



Raadpleeg de instructies voor gebruik



Gebruik voor JJJJ-MM-DD



Minimum/maximum temperatuur



Niet-steriel

### Beoogde gebruiker

CytoTest FISH-Sondes zijn enkel bedoeld voor **professioneel gebruik**.

### Gebruikelijke productnaam

DNA fluorescentie in situ hybridisatie (FISH) sondes Bedoeld

### Bedoeld Gebruik

De FISH-sonde is bedoeld voor gebruik bij een test voor het opsporen van een bekende of veronderstelde cytogenetische of chromosomale abnormaliteit.

### Indicaties voor gebruik

De initiële beoordeling van veel hematologische en andere maligniteiten bevat meestal morfologische, histologische, immunofenotypische (stroom cytometrische en/of immunohistochemische) en conventionele cytogenetische analyses. FISH-analyse kan een integraal onderdeel zijn van de evaluatie van diagnostische gegevens voor alle gewenste ziekten i.v.m. genomische afwijkingen, in aanvulling op of volgend na conventionele karyotypering, maar vooral in het geval van:

1. Afwijkingen met een lage frequentie, maar goed gedocumenteerd percentage, van valse-negatieve cytogenetische resultaten, met name in scenario's waar de klinische, hematologische en pathologische parameters een specifieke afwijking voorstellen
2. Afwijkingen met een hoge frequentie van "valse-negatieve" cytogenetica
3. Interfase analyse, wanneer conventionele cytogenetica mislukt of niet mogelijk is, bijvoorbeeld

- voor vast weefsel
4. Voor het verduidelijken van abnormale of complexe conventionele karyotypische bevindingen; en
  5. Als een surrogaatmarker voor een primaire genetische gebeurtenis

#### Contra-indicaties

Het apparaat is onderworpen aan de volgende beperkingen:

1. Dit product is niet bedoeld voor risicovolle toepassingen zoals therapie selectie, therapeutische respons voorspelling of screening voor ziekten. Het gebruik van dit apparaat voor de beoordeling van risico's, monitoring van ziekten, diagnose en prognose is niet vastgesteld.
2. Klinische, pathologische en andere relevante informatie moeten altijd worden gecorreleerd met FISH-test resultaten op patiëntmonsters. De klinische patiëntstatus moet overwogen worden bij uitvoering van de test en bij het gebruik van de resultaten.
3. De FISH test is niet geschikt om de volgende afwijkingen te bepalen:
  - a. Een of meer puntmutaties in het doel-DNA, of
  - b. Elke andere enkele nucleotidische-niveau afwijkingen,
  - c. Kleine (onder kb-bereik) verwijderingen, invoegingen, inversies
  - d. Breekpunt identificatie op basisniveau nauwkeurigheid
4. Deze test staat geen bepaling van genexpressie niveau of transcripttype toe en bevat geen meting van een genproduct hoeveelheid of integriteit.
5. Interpretatie van de resultaten: ongebruikelijke vlek/signaal patronen kunnen worden waargenomen in zeldzame gevallen. Dergelijke onverwachte patronen hebben wellicht onbekende betekenis en kunnen niet worden geïnterpreteerd enkel door deze test. Metafase-analyse kan nuttig zijn in de karakterisering van sommige atypische of onverwachte signaalpatronen.
6. FISH-sonde prestatiekenmerken zijn gevalideerd op monsters van menselijke perifere bloedlymfocyten en weefselmonsters.
7. Gebruik van het apparaat voor het testen van andersoortige monsters kan niet uitvoerig zijn getest en kan protocolverbetering en aanpassing vereisen.

#### Procedure beginselen

Fluorescentie In situ hybridisatie (FISH) is een krachtige techniek ontworpen voor het opsporen van aanwezigheid of afwezigheid, locatie, integriteit en de hoeveelheid VAN DNA of RNA-sequenties in weefsels, cellen of chromosomen. FISH is gebaseerd op de opsporing van specifieke opeenvolgingen door koppeling van basen (hybridisatie) op aanvullende interne onderdelen van nucleïnezuur. In dit geval is het één van de strengen een fluorescent geëtiketteerd sequentiefragment (sonde) dat alleen aan die delen van het genoom bind met sequenties die sterk of volledig complementair zijn met de sonde sequentie en de andere streng is aanwezig in het monstermateriaal dat moet worden geanalyseerd. Hybridisatie in situ begint daarom met de voorbereiding van het monster dat moet worden geanalyseerd en met de voorbereiding van de sonde. Het typisch dubbelstrengs DNA in het monster moet worden gesmolten (gedenatureerd) in enkele onderdelen en de sonde moet worden voorzien van een fluorescerende label dat detectie mogelijk maakt.

#### Productbeschrijving

CytoTest FIS- sondes zijn medische hulpmiddelen voor in vitro diagnostiek en vervaardigd met genomisch DNA verkregen uit hetzij gemicrodissecteerde menselijke chromosomen of gekloonde DNA-fragmenten, afhankelijk van het type sonde.

Voor optimale resultaten, moeten microscoop filtersets gekozen worden die compatibel zijn met de fluorescentie van de sondes.

| Fluorofoor | Excitatie Peak (nm) | Emissie Peak (nm) | Compatibiliteit met andere kleurstoffen   |
|------------|---------------------|-------------------|---|
| CytoRed™   | 583                 | 605               | SpectrumRed<br>Propidium jodide (543-614) |

|             |     |     |   |
|-------------|-----|-----|---|
| CytoOrange™ | 551 | 575 | SpectrumOrange                                      |
| CytoGold™   | 523 | 549 | SpectrumGold  |
| CytoGreen™  | 495 | 518 | SpectrumGreen<br>Fluoresceïne-isothiocyanaat (FITC) |
| CytoAqua™   | 422 | 471 | SpectrumAqua  |
| CytoBlue™   | 402 | 421 | SpectrumBlue (400-450)                              |

#### Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen

Overmatige blootstelling aan licht kan de fluoroforen van de sonde fotobleken. Neem de nodige voorzorgsmaatregelen bij het verwerken van alle reagentia en slides met de sonde om directe en langdurige blootstelling aan licht te voorkomen. Het wordt aanbevolen om te voldoen aan de instructies beschreven in deze instructie voor gebruik bij het hanteren en gebruik van CytoTest FISH-sondes.

Uitvoerders van experimenten moeten geschikte beschermende kleding, handschoenen en bescherming van de ogen/het gezicht dragen. In FISH experiment gebruikte reagentia kunnen ogen en de huid irriteren. Vermijd contact met huid en ogen. Bij aanraking met de ogen onmiddellijk spoelen met overvloedig water en deskundig medisch advies inwinnen.

Onjuiste behandeling tijdens het transport of de opslag kan mogelijk degraderen of afbreuk doen aan de prestaties van het product. Elke gecompromitteerd producten moeten worden weggegooid in overeenstemming met de van toepassing zijnde wet- of regelgeving in uw instelling, regio en / of land, en de reagentia moeten niet gebruikt worden in elke test. Als u zich zorgen over de verslechtering van de kwaliteit of de prestaties van het product, neem dan contact op met de fabrikant of uw regionale distributeur(s).

#### Opslag en Gebruik

CytoTest FISH-sondes moeten worden opgeslagen bij -15 °C tot -25 °C en moeten beschermd worden tegen licht. Vermijd herhaalde vries / dooi cycli. Controleer de vervaldatum op het productetiket vóór gebruik. Deze opslag en gebruiksvoorwaarden gelden voor zowel geopend en ongeopende producten.

#### Verstreckte Materialen

CytoTest DNA FISH-sondes geleverd in kant-en-klare concentratie.

#### Laboratoriumapparatuur vereist maar niet verstrekt

- Microliter Pipet (1 tot en met 10 µL) en schone wattenstaafjes
- Polypropyleen microcentrifuge buisjes (0,5 ml. of 1,5 ml.)
- 22 x 22 mm glas dekglasjes
- Rubbercement
- Maatcilinder
- Van diamant voorziene pen
- Timer
- Pincet
- Coplin potjes
- Media flessen (250 ml)
- Gekalibreerde thermometer
- Vortex-mixer
- Microcentrifuge
- Waterbaden (37 ± 2°C, 72 ± 2°C, en 80 ± 2 °C)
- Lucht incubator (37 ± 2°C)
- Slideverwarmer
- Licht fasecontrastmicroscop  
Fluorescentiemicroscop uitgerust met aanbevolen filters

## **TESTPROCEDURE**

( De experimentele omstandigheden in deze gebruikershandleiding zijn algemene aanbevelingen en zijn onderhevig aan verandering, afhankelijk van de conditie van het monstermateriaal. Zij kunnen aanpassing vereisen voor bepaalde monstertypes.)

## FISH-Procedure voor FFPE-Specimen

### Reagentia vereist maar niet verstrekt

- Paraffine voorbehandeling reagentiapakket (Cat. nr. CT-ACC112-05):
  - o voorbehandelingsoplossing (50 ml): bewaren bij kamertemperatuur (KT)
  - Protease Buffer (62,5 ml, pH 2,0): bewaren bij KT
  - Protease (250 mg): gelyofiliseerde vorm, bewaren bij -20°
- FISH-Reagentiapakket (Cat nr. CT-ACC101-20):
  - 20 X natriumchloride-natrium Citraat Buffer (SSC) Zout: bewaren bij KT, Vermijd vochtigheid
  - 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) Tegenkleuring: bewaren bij 4° C in het
  - NP-40 (octylphenoxyethoxyethanol, of Nonidet P-40): bewaren bij KT
- Xyleen: bewaren bij KT
- Ethanol (100%): bewaren bij KT
- Gezuiverd water: bewaren bij kamer KT
- Geconcentreerd HCl (12N): bewaren bij kamer KT

### Vorbereitung van Werkoplossingen

#### 1. 20x SSC-oplossing (pH 7,0)

| Reagentia  | Toegevoegde hoeveelheid | Definitieve Concentratie |
|--|-------------------------|--------------------------|
| SSC Zout   | 66 gr.                  | 20X                      |
| Gedeïoniseerd H <sub>2</sub> O (dH <sub>2</sub> O) | 250 ml.                 |                          |
| TOTAAL   | 250 ml.                 |                          |

#### 2. Protease Oplossing

| Reagentia                      | Toegevoegde hoeveelheid | Definitieve Concentratie |
|--------------------------------|-------------------------|--------------------------|
| Protease, gelyofiliseerde vorm | 250 mg                  | 4 mg/ml                  |
| Protease Buffer                | 62,5 ml                 |                          |
| TOTAAL                         | 62,5 ml                 |                          |

#### 3. 90% Ethanol

| Reagentia         | Toegevoegde hoeveelheid | Definitieve Concentratie |
|-------------------|-------------------------|--------------------------|
| Ethanol (100%)    | 90 ml.                  | 90%                      |
| dH <sub>2</sub> O | 10 ml.                  |                          |
| TOTAAL            | 100 ml.                 |                          |

#### 4. 70% Ethanol

| Reagentia         | Toegevoegde hoeveelheid | Definitieve Concentratie |
|-------------------|-------------------------|--------------------------|
| Ethanol (100%)    | 70 ml.                  | 70%                      |
| dH <sub>2</sub> O | 30 ml.                  |                          |
| TOTAAL            | 100 ml.                 |                          |

#### 5. Post-hydridisatie Wasoplossing (pH 7,0)

| Reagentia         | Toegevoegde hoeveelheid | Definitieve Concentratie |
|-------------------|-------------------------|--------------------------|
| 20x SSC Oplossing | 10 ml.                  | 2X                       |
| NP-40             | 300 µl                  | 0.3%                     |
| dH <sub>2</sub> O | 90 ml.                  |                          |
| TOTAAL            | 100 ml.                 |                          |

#### FISH-Procedure voor paraffine-ingebedde weefselsecties

##### *Slide voorbehandeling*

1. Slides onderdompelen in xyleen bij KT gedurende 10 minuten. Herhaal elke keer tweemaal met verse xyleen.
2. Dehydrateer de slides in 100% ethanol bij een kamertemperatuur gedurende 5 minuten. Herhaal 1 keer met verse 100% ethanol.
3. Laat de slides drogen gedurende 2-5 minuten, indien gewenst.
4. Dompel de slides onder in de voorverwarmde voorbehandelingsoplossing bij 80 °C gedurende 10 minuten.
5. Dompel de slides onder in gezuiverd water bij KT gedurende 3 minuten.

##### *Protease Voorbehandeling*

1. Dompel onder slides in Protease oplossing bij 37°C gedurende 10-60 minuten (afhankelijk van de conditie van de monsters) en controleer de conditie van de cellen onder een lichtmicroscop.
2. Dompel de slides onder in gezuiverd water bij KT gedurende 3 minuten.
3. Luchtdroog de slides gedurende 2-5 minuten.

##### *Dehydratie van de Slide*

1. Dompel de slides onder in 70% ethanol gedurende 3 minuten.
2. Dompel slides onder in 90% ethanol gedurende 3 minuten.
3. Dompel de slides onder in 100% ethanol gedurende 3 minuten.
4. Luchtdroog de slides..

##### *Vorbereiding van de Sonde.*

1. Verwarm de sonde voor bij KT gedurende 20-30 minuten.
2. Vortex de sonde en keer deze om voor een korte tijd.

##### *Co-denaturatie & Hybridisatie*

1. Breng 10 µl van de sonde aan op elk hybridisatiegebied en bedek met een dekglasje van 22 x 22 mm. Verzegel het dekglasje(s) met rubbercement.
2. Co-denatureer de slides met sonde bij 72 ° C gedurende 5 minuten.
3. Plaats slides in een voorverwarmde bevochtigde hybridisatiekamer en incubeer de slides 's nachts (16 uur).bij 37 ° C

##### *Post-hybridisatie Was*

1. Markeer elk hybridisatie gebied op de achterkant van de slides met een pen voorzien van diamant.
2. Verwijder voorzichtig het rubbercement.
3. I Dompel de slides onder in Post-hybridisatie Wasoplossing bij KT los om de dekglasjes te lossen. Schud voorzichtig om de dekglasjes te verwijderen; Trek de dekglasjes niet bruusk los.
4. Dompel de slides onder in de voorverwarmde Post-Hybridisatie Wasoplossing bij 72 °C gedurende 2 minuten.

##### *Dehydratie van de Slide*

1. Dompel de slides onder in 70% ethanol gedurende 2 minuten.
2. Dompel de slides onder in 90% ethanol gedurende 2 minuten.
3. Dompel de slides onder in 100% ethanol gedurende 2 minuten.

4. Luchtdroog de slides in het donker.

#### Visualisatie

1. Breng DAPI tegenkleuring aan bedek de dekglasjes.
2. Onderzoek de slides onder een fluorescentiemicroscop met goede filtersets.

### FISH Procedure voor Cytologische Specimen

#### Reagentia vereist maar niet verstrekt

- FISH Reagenspakket (Cat nr: CT-ACC101-20):
  - 20X SSC Zout: bewaren bij KT, Vermijd vochtigheid
  - DAPI Tegenkleuring: bewaren bij 4° C in het donker
  - NP-40: opslag bij KT
- Pepsine (gelyofiliseerd): opslaan bij j-20 °C of lager
- Zoutzuur (1N): bewaren bij KT
- Formaldehyde (37%): bewaren bij KT
- 10X fosfaatgebufferde zoutoplossing (PBS) Oplossing: bewaren bij KT
- Ethanol (100%): opslag bij KT

#### Vorbereitung van Werkoplossingen

1. 20X SSC-oplossing (pH 7,0)

| Reagentia         | Toegevoegde hoeveelheid | Definitieve Concentratie |
|-------------------|-------------------------|--------------------------|
| SSC Zout          | 66 g                    | 20X                      |
| dH <sub>2</sub> O | 250 ml                  |                          |
| TOTAAL            | 250 ml                  |                          |

2. Pepsine-basisoplossing

| Reagentia                     | Toegevoegde hoeveelheid | Definitieve Concentratie |
|-------------------------------|-------------------------|--------------------------|
| Pepsine, gelyofiliseerde vorm | 100 mg.                 | 100 mg./ml.              |
| dH <sub>2</sub> O             | 1 ml.                   | dH <sub>2</sub> O        |
| TOTAAL                        | 1 ml.                   | TOTAAL                   |

Opmerking: Bewaar op ijs. Maak 20 µl aliquots aan, bewaar bij -20 °C.

3. Pepsine-werkoplossing

| Reagentia              | Toegevoegde hoeveelheid | Definitieve Concentratie |
|------------------------|-------------------------|--------------------------|
| HCl (1N)               | 1 ml.                   | 0,01N                    |
| Pepsine-basisoplossing | 20 µl                   | 0,02 µg/µl               |
| dH <sub>2</sub> O      | 99 ml.                  |                          |
| TOTAAL                 | 100 ml.                 |                          |

4. 2x SSC-oplossing

| Reagents          | Amount added | Final Concentration |
|-------------------|--------------|---------------------|
| 20X SSC Solution  | 10 ml        | 2X                  |
| dH <sub>2</sub> O | 90 ml        |                     |
| TOTAL             | 100 ml       |                     |



| 5. 1x PBS oplossing |                         |                          |
|---------------------|-------------------------|--------------------------|
| Reagentia           | Toegevoegde hoeveelheid | Definitieve Concentratie |
| 10x PBS-oplossing   | 10 ml.                  | 1 X                      |
| dH <sub>2</sub> O   | 90 ml.                  |                          |
| TOTAAL              | 100 ml.                 |                          |

| 6. Formaldehyde Oplossing |                         |                          |
|---------------------------|-------------------------|--------------------------|
| Reagentia                 | Toegevoegde hoeveelheid | Definitieve Concentratie |
| Formaldehyde (37%)        | 2.7 ml.                 | 1%                       |
| 10x PBS-oplossing         | 10 ml.                  | 1X                       |
| dH <sub>2</sub> O         | 89 ml.                  |                          |
| TOTAAL                    | 100 ml.                 |                          |

| 7. 90% Ethanol    |                         |                          |
|-------------------|-------------------------|--------------------------|
| Reagentia         | Toegevoegde hoeveelheid | Definitieve Concentratie |
| Ethanol (100%)    | 90 ml.                  | 90%                      |
| dH <sub>2</sub> O | 10 ml.                  |                          |
| TOTAAL            | 100 ml.                 |                          |

| 8. 70% Ethanol    |                         |                          |
|-------------------|-------------------------|--------------------------|
| Reagentia         | Toegevoegde hoeveelheid | Definitieve Concentratie |
| Ethanol (100%)    | 70 ml.                  | 70%                      |
| dH <sub>2</sub> O | 30 ml.                  |                          |
| TOTAAL            | 100 ml.                 |                          |

| 9. Post-Hybridisatie Wasoplossing 1 |                         |                          |
|-------------------------------------|-------------------------|--------------------------|
| Reagentia                           | Toegevoegde hoeveelheid | Definitieve Concentratie |
| 20x SSC Oplossing                   | 2 ml.                   | 0,4X                     |
| NP-40                               | 300 µl                  | 0,3%                     |
| dH <sub>2</sub> O                   | 98 ml.                  |                          |
| TOTAAL                              | 100 ml.                 |                          |

| 10. Post-Hybridisatie Wasoplossing 2 |                         |                          |
|--------------------------------------|-------------------------|--------------------------|
| Reagentia                            | Toegevoegde hoeveelheid | Definitieve Concentratie |
| 20x SSC Oplossing                    | 10 ml.                  | 2X                       |
| NP-40                                | 100 µl                  | 0,1%                     |
| dH <sub>2</sub> O                    | 90 ml.                  |                          |
| TOTAAL                               | 100 ml.                 |                          |

## FISH-Procedure voor Cytologie

### Voorbereiden van slides

1. Stabiliseer de slides in een 2 X SSC Oplossing bij KT gedurende 2 minuten.

2. Dompel de slides onder in een voorverwarmde Pepsine-oplossing bij 37° C gedurende 1-10 minuten (afhankelijk van de conditie van de monsters) en controleer de conditie van de cellen onder een lichtmicroscop.
3. Was de slides in een 1 X PBS-oplossing bij KT gedurende 5 minuten.
4. Post-fixereer de slides in een Formaldehyde oplossing bij KT gedurende 5 minuten
5. Was de slides in een 1 X PBS-oplossing bij KT gedurende 5 minuten

#### *Dehydratie van de Slide*

1. Dompel de slides onder in 70% ethanol gedurende 3 minuten
2. Dompel de slides onder in 90% ethanol gedurende 3 minuten
3. Dompel de slides onder in 100% ethanol gedurende 3 minuten
4. Luchtdroog de slides.

#### *Voorbereiding van de Sonde*

1. Verwarm de sonde voor bij KT gedurende 20-30 minuten.
2. Vortex de sonde en keer deze om voor een korte tijd .

#### *Co-denaturatie & Hybridisatie*

1. Breng 10 µl van de sonde aan op elk hybridisatiegebied en bedek met een dekglasje van 22 x 22 mm. Verzegel het dekglasje(s) met rubbercement.
2. Co-denatureer de slides met sonde bij 72 ° C gedurende 2 minuten.
3. Plaats slides in een voorverwarmde bevochtigde hybridisatiekamer en incubeer de slides 's nachts (16 uur) bij 37 ° C.

#### *Post-hybridisatie Was*

1. Markeer het hybridisatie gebied op de achterkant van de slides met een diamant-tip pen.
2. Verwijder voorzichtig het rubbercement
3. Dompel de slides on in 2 X SSC Oplossing bij KT voor het losmaken van de dekglasjes. Trek de dekglasjes niet bruusk los).
4. Dompel de slides onder in de voorverwarmde Post-Hybridisatie Was- oplossing bij 72 °C gedurende 2 minuten
5. Dompel de Slides onder in een Post-Hybridisatie Wasoplossing 2 bij KT gedurende 2 minuten
6. Luchtdroog de slides .

#### *Visualisatie*

1. Breng DAPI tegenkleuring aan bedek met de dekglasjes.
2. E Onderzoek de slides onder een fluorescentiemicroscop met goede filtersets.

### **FISH-Procedure voor Vruchtwater Specimens**

#### Reagentia vereist maar niet geboden

- FISH-Reagenspakket:
  - 20X SSC Zout: bewaren bij KT, Vermijd vochtigheid
  - DAPI Tegenkleuring: bewaar bij 4° C in het donker
  - NP-40: opslag bij KT
- Pepsine (gelyofiliseerd): opslaan bi j-20 °C of lager
- Zoutzuur (1N): bewaren bij KT
- Formaldehyde (37%): bewaren bij KT
- 10X PBS-oplossing: bewaren bij KT
- Ethanol (100%): opslag bij KT

#### Voorbereiding van Werkoplossingen

1. 20X SSC -oplossing (pH 7,0)

| Reagentia | Toegevoegde hoeveelheid | Definitieve Concentratie |
|-----------|-------------------------|--------------------------|
|-----------|-------------------------|--------------------------|

|                   |         |     |
|-------------------|---------|-----|
| SSC Zout          | 66 gr.  | 20X |
| dH <sub>2</sub> O | 250 ml. |     |
| TOTAAL            | 250 ml. |     |

2. Pepsine-basisoplossing

| Reagentia                     | Toegevoegde hoeveelheid | Definitieve Concentratie |
|-------------------------------|-------------------------|--------------------------|
| Pepsine, gelyofiliseerde vorm | 100 mg.                 | 100 mg./ml.              |
| dH <sub>2</sub> O             | 1 ml.                   |                          |
| TOTAAL                        | 1 ml.                   |                          |

Opmerking: Bewaar op ijs. Maak 20 µl aliquots aan, bewaar bij -20 °C.

3. Pepsine Werkoplossing 1 (voor ongekweekte specimen)

| Reagentia              | Toegevoegde hoeveelheid | Definitieve Concentratie |
|------------------------|-------------------------|--------------------------|
| HCl (1N)               | 1 ml.                   | 0,01N                    |
| Pepsine-basisoplossing | 50 µl                   | 0,05 µg/µl               |
| dH <sub>2</sub> O      | 99 ml.                  |                          |
| TOTAAL                 | 100 ml.                 |                          |

4. Pepsine werkoplossing 2 (voor gekweekte specimen)

| Reagentia              | Toegevoegde hoeveelheid | Definitieve Concentratie |
|------------------------|-------------------------|--------------------------|
| HCl (1N)               | 1 ml.                   | 0,01N                    |
| Pepsine-basisoplossing | 20 µl                   | 0,02 µg/µl               |
| dH <sub>2</sub> O      | 99 ml.                  |                          |
| TOTAAL                 | 100 ml.                 |                          |

5. 2X SSC-oplossing

| Reagentia         | Toegevoegde hoeveelheid | Definitieve Concentratie |
|-------------------|-------------------------|--------------------------|
| 20X SSC-oplossing | 10 ml.                  | 2X                       |
| dH <sub>2</sub> O | 90 ml.                  |                          |
| TOTAAL            | 100 ml.                 |                          |

6. 1X PBS oplossing

| Reagentia         | Toegevoegde hoeveelheid | Definitieve Concentratie |
|-------------------|-------------------------|--------------------------|
| 10X PBS-oplossing | 10 ml.                  | 1X                       |
| dH <sub>2</sub> O | 90 ml.                  |                          |
| TOTAAL            | 100 ml.                 |                          |

7. Formaldehyde oplossing

| Reagentia          | Toegevoegde hoeveelheid | Definitieve Concentratie |
|--------------------|-------------------------|--------------------------|
| Formaldehyde (37%) | 2,7 ml.                 | 1%                       |
| 10X PBS-oplossing  | 10 ml.                  | 1X                       |

|                   |         |
|-------------------|---------|
| dH <sub>2</sub> O | 89 ml.  |
| TOTAAL            | 100 ml. |

8. 90% Ethanol

| Reagentia         | Toegevoegde hoeveelheid | Definitieve Concentratie |
|-------------------|-------------------------|--------------------------|
| Ethanol (100%)    | 90 ml.                  | 90%                      |
| dH <sub>2</sub> O | 10 ml.                  |                          |
| TOTAAL            | 100 ml.                 |                          |

9. 70% Ethanol

| Reagentia         | Toegevoegde hoeveelheid | Definitieve Concentratie |
|-------------------|-------------------------|--------------------------|
| Ethanol (100%)    | 70 ml.                  | 70%                      |
| dH <sub>2</sub> O | 30 ml.                  |                          |
| TOTAAL            | 100 ml.                 |                          |

10. Post-hybridisatie Wasoplossing 1

| Reagentia         | Toegevoegde hoeveelheid | Definitieve Concentratie |
|-------------------|-------------------------|--------------------------|
| 20X SSC Oplossing | 2 ml.                   | 0,4X                     |
| NP-40             | 300 µl                  | 0,3%                     |
| dH <sub>2</sub> O | 98 ml.                  |                          |
| TOTAAL            | 100 ml.                 |                          |

11. Post-hybridisatie Wasoplossing 2

| Reagentia         | Toegevoegde hoeveelheid | Definitieve Concentratie |
|-------------------|-------------------------|--------------------------|
| 20X SSC Oplossing | 10 ml.                  | 2X                       |
| NP-40             | 100 µl                  | 0,1%                     |
| dH <sub>2</sub> O | 90 ml.                  |                          |
| TOTAAL            | 100 ml.                 |                          |

### FISH Procedure voor Amniocyten

#### *Vorbereiden van slides*

##### Niet-gekweekte Specimen:

1. Stabiliseer de slides in 2X SSC oplossing bij 37°C gedurende 1 uur.
2. Dompel de slides onder in een voorverwarmde Pepsine-Werkoplossing bij 37°C gedurende 1-10 minuten (afhankelijk van de conditie van de monsters) en controleer de conditie van de cellen onder een lichtmicroscop.
3. Was de slides in een 1X PBS-oplossing bij KT gedurende 5 minuten.
4. Post-fixeer de slides in een Formaldehyde oplossing bij KT gedurende 5 minuten.
5. Was slides in een 1X PBS-oplossing bij KT gedurende 5 minuten.

##### Gekweekte Specimen:

1. Stabiliseer de slides in 2X SSC Oplossing bij KT gedurende 2 minuten.
2. Dompel de slides onder in een voorverwarmde Pepsine-Werkoplossing 2 bij 37°C gedurende 1-10 minuten (afhankelijk van de conditie van de monsters) en controleer de conditie van de cellen

onder een lichtmicroscop.

3. Was de slides in een 1X PBS-oplossing bij RT gedurende 5 minuten.
4. Post-fixeer de slides in een Formaldehyde oplossing bij RT gedurende 5 minuten.
5. Was de slides in een 1X PBS-oplossing bij RT gedurende 5 minuten.

#### *Dehydratie van de Slide*

1. Dompel de slides onder in 70% ethanol gedurende 3 minuten.
2. Dompel slides onder in 90% ethanol gedurende 3 minuten.
3. Dompel de slides onder in 100% ethanol gedurende 3 minuten.
4. Luchtdroog de slides.

#### *Vorbereiding van de Sonde*

1. Verwarm de sonde voor bij RT gedurende 20-30 minuten.
2. Vortex de sonde en keer deze om voor een korte tijd.

#### *Co-denaturatie & Hybridisatie*

1. A Breng 10 µl van de sonde aan op elk hybridisatiegebied en bedek met een dekglasje van 22 x 22 mm. Verzegel het(de) dekglasje(s) met rubbercement.
2. Co-denature er de slides met sonde bij 72 °C gedurende 2 minuten.
3. Plaats slides in een voorverwarmde bevochtigde hybridisatie kamer en incubeer slides bij 37 °C.

#### *Post-hybridisatie Was*

1. Markeer de hybridisatie gebieden op de achterkant van de slides met een diamant-tip pen
2. Verwijder voorzichtig de rubbercement.
3. Dompel de slides on in 2X SSC Oplossing bij RT voor het losmaken van de dekglasjes. Trek de dekglasjes niet bruusk los.
4. Dompel de slides onder in de voorverwarmde Post-Hybridisatie Was oplossing bij 72 °C gedurende 2 minuten.
5. Dompel de Slides onder in een Post-Hybridisatie na hybridisatie Wasoplossing 2 bij RT gedurende 2 minuten.
6. Luchtdroog de slides.

#### *Visualisatie*

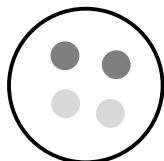
1. Breng DAPI tegenkleuring aan bedek met de dekglasjes.
2. Onderzoek de slides onder een fluorescentiemicroscop met goede filtersets.

## INTERPRETATIE VAN DE RESULTATEN

### Signaalpatronen voor amplificatie/verwijdering van de Sondes

#### *Normale patronen*

- 2 oranje signalen + 2 groene signalen (2O2G)



#### Kleurcode

- Oranje signalen vertegenwoordigd door donker grijze stippen
- Groene signalen vertegenwoordigd door licht grijze stippen

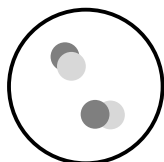
#### *Abnormaal patronen*

- Eventuele andere patronen

### Signaalpatronen voor Break-apart Sondes

#### *Normale patronen*

- 2 oranje-groen overlapt signalen (2OG)



#### Kleurcode

- Oranje signalen vertegenwoordigd door donker grijze stippen
- Groene signalen vertegenwoordigd door licht grijze stippen
- Overlappende oranje en groene signalen kunnen worden weergegeven als geel.

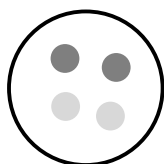
#### *Abnormale Patronen*

- Eventuele andere patronen

### Signaalpatronen voor Fusie/Translocatie Sondes

#### *Normaal Patronen*

- 2 oranje signalen + 2 groene signalen (2O2G)



#### Kleurcode

- Oranje signalen vertegenwoordigd door donker grijze stippen
- Groene signalen vertegenwoordigd door licht grijze stippen

#### *Abnormale Patronen*

- Eventuele andere patronen. Gefuseerde signalen (overlapping van Oranje en Groene signalen) kunnen worden weergegeven als gele signalen.

## VERWIJZINGEN

1. Andersson S, et al. *Am J Pathol.* 175(5): 1831–1847 (2009).
2. Blackburn EH. *Nature.* 350(6319):569-73 (1991).
3. Cairns P, et al. *Cancer Res.* 57(22):4997-5000 (1997).
4. Chiarle R, et al. *Nat Rev Cancer.* 8(1):11-23 (2008).
5. Chu EC & Tarnawski AS. *Med Sci Monit.* 10(10):RA235-41 (2004).
6. Coussens L, et al. *Science.* 230(4730):1132-9 (1985).
7. Djulbegovic M, et al. *BMJ.* 341:c4543 (2010).
8. Druker BJ, et al. *N Engl J Med.* 355(23):2408-17 (2006).
9. Ernst T, et al. *Hematol Oncol Clin North Am.* 25(5):997-1008, v-vi (2011).
10. Foulkes WD, et al. *Mol Med.* 3(1):5-20 (1997).
11. Gonzalez S, et al. *Nature.* 440(7084):702-6 (2006).
12. Heselmeyer K, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93(1):479-84 (1996).
13. Heselmeyer-Haddad K, et al. *Cancer Res.* 62(8):2365-9 (2002).
14. Heselmeyer-Haddad K, et al. *Am J Pathol.* 166(4): 1229–1238 (2005).
15. Kamb A, et al. *Science.* 264(5157):436-40 (1994).
16. Kwak EL, et al. *N Engl J Med.* 363(18):1693-703 (2010).
17. Krimpenfort P, et al. *Nature.* 413(6851):83-6 (2001).
18. Landstrom AP & Tefferi A. *Leuk Lymphoma.* 47(3):397-402 (2006).
19. Minoo P & Wang HY. *Int J Clin Exp Pathol.* 5(5):397-410 (2012).
20. Nowell PC, Hungerford DA. *J Natl Cancer Inst.* 25:85-109 (1960).
21. Pathmanathan N & Bilous AM. *Pathology.* 44(7):587-95 (2012).
22. Pauletti G, et al. *J Clin Oncol.* 18(21):3651-64 (2000).
23. Rowley JD. *Nature.* 243(5405):290-3 (1973).
24. Salido M, et al. *J Thorac Oncol.* 6(1):21-7 (2011).
25. Sasaki T, et al. *Eur J Cancer.* 46(10):1773-80 (2010).
26. Sharpless E & Chin L. *Oncogene.* 22(20):3092-8 (2003).
27. Shay JW & Bacchetti S. *Eur J Cancer.* 33(5):787-91 (1997).
28. Slamon DJ, et al. *Science.* 235(4785):177-82 (1987).
29. Steck PA, et al. *Nat Genet.* 1997 Apr; 15(4):356-62 (1997).
30. Yoshimoto M, et al. *Br J Cancer.* 97(5):678–685 (2007).

### Fabrikant



CytoTest Inc.  
9430 Key West  
Suite 210  
Rockville, MD 20850  
USA

Tel: +1-202-688-1188  
Fax: +1-301-296-6950  
Email: sales@cytotest.com

### Erkende EG Vertegenwoordigers



Obelis S.A.  
Bd. General Wahis 53  
1030 Brussels  
België

Tel: +32-2-732-59-54  
Fax: +32-2-732-60-03  
Email: mail@obelis.net

Copyright © 2015 CytoTest, Inc.  
Alle rechten voorbehouden.  
www.cytotest.com