

Invitrogen SP•T-Light® Cyclin D1 Probe (84-1900)

I. INTENDED USE

For In Vitro Diagnostic Use

Invitrogen's SP•T-Light® Cyclin D1 Probe is intended to detect cyclin D1 gene amplification in formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissue sections using Chromogenic *In Situ* Hybridization (CISH™). Interpretation must be made within the context of the patient's clinical history by a qualified pathologist.

II. SUMMARY AND EXPLANATION

Background

Cyclin D1 (CCND1) gene is a 15kb gene located at chromosome 11q13.⁽¹⁾ Cyclin D1 is a key regulator of cell cycle especially for G1 to S phase progression.⁽¹⁾

Cyclin D1 gene amplification was found in 10-24% of breast cancers depending on the techniques used.^(2, 5-6, 9, 11, 14) Intratumoral heterogeneity of cyclin D1 amplification was common.⁽⁸⁾ Cyclin D1 gene amplification was significantly more common in hypodiploid breast cancers (60%) than in unselected breast cancers (15-20%).⁽¹⁴⁾ Cyclin D1 gene amplification was associated with lymph node metastases and poor prognosis.^(4, 12) Cyclin D1 gene amplification causes cyclin D1 overexpression,^(11, 15) and Cyclin D1 overexpression was found in 50% of breast cancers,^(2, 9) and occurs predominantly in estrogen (ER) positive tumors.^(4, 13, 15) Cyclin D1 overexpression without gene amplification was associated with longer survival time.^(4, 12) Therefore, cyclin D1 amplification divided overexpression tumors into two groups with opposite outcomes.⁽⁴⁾ A study has shown that cyclin D1 deficient mice are resistant to breast cancers induced by *neu* and *ras* oncogenes, thus an anti-cyclin D1 therapy might be highly specific in treating human breast cancers with activated neu-ras pathways.⁽¹⁶⁾

Studies have shown that cyclin D1 gene amplified in 18% of laryngeal squamous cell carcinoma⁽³⁾, 34.5% of squamous cell carcinomas of the head and neck (HNSCCs)⁽⁷⁾, and 50% of non-small cell lung cancer (NSCLC).⁽¹⁰⁾

Subtraction Probe Technology (SPT™)

Invitrogen's SPT™ is a proprietary and patented Invitrogen technology that creates specific probes by eliminating the repetitive sequences (e.g., Alu and LINE elements) found in human nucleic acids. Consequently, Invitrogen SPT™ probes are inherently specific and do not require repetitive sequence blocking, as required for traditional cytogenetic DNA probes. Invitrogen's SPT™ technology allows evaluation of genetic aberrations using chromogenic detection.

DNA Probe Description and Specificity

Invitrogen's SP•T-Light® Cyclin D1 Probe is a double-stranded DNA probe that has been labeled with digoxigenin. It is supplied as a liquid in hybridization buffer. This probe consists of a clone encompassed in the cyclin D1 gene on human chromosome 11q13. Repetitive nucleic acid sequences have been quantitatively removed from the probe by SPT™ technology.

Principle of CISH™ (Chromogenic In Situ Hybridization) Procedure

Chromogenic In Situ Hybridization (CISH™) allows detection of gene amplification, chromosome translocations, and chromosome number using conventional peroxidase reactions under the brightfield microscope on formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissues (4-5 µm thickness). The essence of CISH™ is the ability of labeled nucleic acid probes to hybridize (bind), *in situ*, to specific sections of complementary nucleic acid in the sample. Probe hybridization results may then be visualized within the context of the surrounding tissue morphology. Therefore, pathologists can view tissue morphology and gene aberrations simultaneously.

CISH™ staining results may be clearly visualized with a standard brightfield microscope and a 40x dry lens. As the DAB signal is permanent, results may be stored for a long period, creating a permanent test record. With the CISH™ immunodetection methodology, analysis of results is both fast and easy. The most important advantage of CISH™ is that detection of genetic aberrations as well as verification of histopathology can be done simultaneously.

Tumors with gene amplification typically appear as large peroxidase-positive intranuclear gene copy clusters, as numerous individual peroxidase-positive small signals, or as a mixture of clusters and individual gene copies. Tumors with gene amplification typically demonstrate 6 or up to dozens of gene copies per nucleus. Tumors with normal gene status typically exhibit 1 to 2 dots per nucleus, while tumors with chromosome polysomy typically have 3 to 5 gene copies per nucleus.

III. REAGENTS PROVIDED

- 0.4 mL digoxigenin-labeled SP●T-Light® Cyclin D1 probe (Ready-To-Use)

IV. REAGENTS/MATERIALS & EQUIPMENT REQUIRED BUT NOT PROVIDED

Ancillary Reagents/Materials

	Invitrogen Cat. No.
1. CISH™ Polymer Detection Kit	84-9246
2. 20x SSC Buffer	00-8400
3. Tissue Pretreatment Buffer (FFPE)	00-8401
4. Cell Pretreatment Kit (samples and metaphase chromosome samples only)	00-8402
5. SuperFrost Plus slides OR HistoGrip™ Slide Adhesive	00-8050
6. [Optional] Positive tissue control: FFPE tissue section with cyclin D1 gene amplification	
7. [Optional] Negative tissue control: FFPE tissue section without cyclin D1 gene amplification	
8. Deionized or distilled water (dH ₂ O)	
9. Xylene	
10. 70%, 85%, 95%, and 100% Ethanol (EtOH)	
11. Coverslips, Rubber cement, 18G ½" needle, and 5 ml syringe OR	
12. [Optional] UnderCover™ Slips (18x18 mm)	00-8403
13. [Optional] UnderCover™ Slips (22x22 mm)	00-8404
14. 30% Hydrogen Peroxide (H ₂ O ₂)	
15. 100% Methanol	
16. 50% Tween 20	00-3005

Equipment

1. Timer
2. Pipette (p20, p1000)
3. Pipette tips
4. Slide rack
5. Hot plate, aluminum foil, and 1 liter beaker
6. Slide warmer
7. 37°C Incubator
8. Heating block with digital temperature display and humidity slide box **OR**
9. PCR thermal cycler with a slide block
10. Water bath (capable of maintaining 75-80°C temperature range)
11. Coplin jars and staining jars
12. Brightfield microscope

V. STORAGE

Store SP●T-Light® Cyclin D1 Probe at -20°C

Please note that at -20°C, the SP●T-Light® Cyclin D1 will not freeze, as it remains in an aqueous state, so there are no associated freeze/thaw problems. Do not use kit after expiration date printed on label. If product is stored under any conditions other than those specified in the package insert, then those storage conditions must be verified by the user.

VI. INSTRUCTIONS FOR USE

A. SPECIMEN PREPARATION

Paraffin-Embedded Tissue Sections:

- i. Tissues fixed in neutral buffered formalin for 12-24 hours prior to paraffin embedding are suitable for use. Tissue sections (4-5 µm thick) must be mounted on HistoGrip™-treated or Superfrost/Plus microscope slides.
- ii. Air dry slides, or dry at 37°C, and then bake 2-4 hours at 60°C.

B. REAGENT PREPARATION

PBS (Phosphate Buffered Saline)

Add 1 pack of PBS powder to 1 L of dH₂O. Mix.

PBS/Tween 20 (0.025%) Buffer

Add 1 part 50% Tween-20 to 1999 parts of PBS. Mix.

Substrate-Chromogen Solution (DAB)

To make DAB, add 1 drop of each reagent (D1, D2, D3) to 1 mL dH₂O. Mix well. **This solution should be prepared immediately prior to use.**

Alcohol Series

Prepare 70%, 85%, 95% and 100% ethanol.

3% H₂O₂ in Absolute Methanol

www.invitrogen.com

Invitrogen Corporation • 542 Flynn Rd • Camarillo • CA 93012 • Tel: 800.955.6288 • E-mail: techsupport@invitrogen.com

Add 1 part of 30% H₂O₂ to 9 parts methanol.

0.5x SCC Buffer (Stringency Wash)

Add 1 part of 2x SSC buffer to 3 parts of dH₂O. Mix. Or add 1 part of 20x SSC buffer to 39 parts of dH₂O. Mix.

2x SCC Buffer (for cell spreads)

Add 1 part of 20x SSC buffer to 9 parts of dH₂O. Mix.

C. STANDARD CISH™ PROTOCOL FOR FFPE TISSUE SAMPLE

All reagents except Cyclin D1 probe should be equilibrated to room temperature (RT) (20-25°C) prior to use. The Cyclin D1 probe can be used cold and without equilibrating to room temperature. Each incubation should be performed at RT (20-25°C) unless otherwise indicated.

Throughout the entire procedure, unless otherwise indicated, it is important that the tissue section does not dehydrate.

1. Pretreatment (For FFPE Tissue Sections Only)

a) **Deparaffinization:**

Immerse in Xylene.	2 times, 5 min. each
Soak in 100% EtOH.	3 times, 3 min. each
Wash in dH ₂ O.	3 times, 2 min. each

(If next step cannot proceed immediately, air dry slides after soaking in 100% EtOH three times instead of washing slides in dH₂O three times.)

b) **Heat Pretreatment (The most critical step for successful CISH™ performance):**

The slides/ specimens must be boiled or heated above 98°C for 15 min. in CISH™ Tissue Heat Pretreatment Solution (00-8401). We recommend that the hotplate be used for this step. (For protocols using different equipment, please contact Invitrogen Technical Service at tech_support@invitrogen.com.)

- i. Place slides on slides rack.
- ii. Heat the Heat Pretreatment Solution (00-8401) in a beaker on a hotplate until it is steadily boiling, and at ≥ 98°C. To prevent buffer from evaporating, the beaker should be covered with either a glass cover or aluminum foil.
- iii. Place slides in the boiling solution, cover the beaker, and boil for 15 min.
- iv. Transfer slides immediately to dH₂O at RT (20-25°C) and wash three times, 2 min. each.

c) **Enzyme Digestion (A critical step for successful CISH™ performance):**

For most tissues, 10 min. enzyme digestion at room temperature will produce the best CISH results (add RT pepsin on the tissue section). Different enzyme incubation times (5-15 min.) may be required, depending on tissue type and fixation method.

- i. Equilibrate the Enzyme Pretreatment Reagent (00-8401) to RT (20-25°C).
- ii. Add enough Enzyme Pretreatment Reagent to cover the tissue section and incubate for 10 min. at RT.
- iii. Wash in dH₂O three times, 2 min. each.

d) **Dehydration in graded ethanol series:**

70% EtOH	2 min.
85% EtOH	2 min.
95 % EtOH	2 min.
100% EtOH	2 min.
100% EtOH	2 min.

- e) Air dry slides . ≥20 min.
- f) Label slides with pencil.

2. Denaturation and Hybridization

(Use either a PCR machine with slide block, **OR** heating block with digital temperature display and humidity slide chamber with 37°C incubator)

- a) Add 15 µL of probe to the center of the coverslip. (Depending on tissue size, more or less probe may be required.)
- b) Place coverslip, probe side down, on the appropriate area of the tissue sample on slide.
- c) Seal coverslip to prevent evaporation during incubation.
•Use a 5 mL syringe containing rubber cement and topped with an 18G ½” needle, carefully apply a thin layer of rubber cement to the edges of the coverslip, slightly overlapping onto the slide. Allow rubber cement to dry (~10 min.) to prevent coverslip from sliding off slide. **OR**
•Use Invitrogen UnderCover™ Slips peeling tape/coverslip off paper backing and sticking to the appropriate area of the slide, covering tissue sample. Press edges of tape to seal. (When using Invitrogen UnderCover™ Slips, DO NOT PRESS DOWN ON COVERSIP CENTER.)

www.invitrogen.com

Invitrogen Corporation • 542 Flynn Rd • Camarillo • CA 93012 • Tel: 800.955.6288 • E-mail: techsupport@invitrogen.com

- d) Denature probe by incubating slides at 94-95°C for 5 min. (To do this, place the slides in the slide block of a PCR machine set to at 94-95°C, or on a 94-95°C heating block with digital temperature display and incubate for 5 min.)
- e) Place slides in the slide block of a PCR machine set at 37°C and incubate for >10 hours (overnight). **OR**
Place slides in a humidity chamber set at 37°C for >10 hours (overnight).

3. Stringent wash:

- a) Prepare two Coplin jars containing 0.5x SSC buffer, one at room temperature (RT), the other heated to 75°C. (Increase temperature by 1°C per slide for more than 2 slides, **but do not exceed 80°C.**)
- b) After hybridization, carefully peel off rubber cement. Remove coverslip. (If using a Invitrogen UnderCover™ Slip, simply peel tape back from slide to remove coverslip.) Do not let the tissue section dry.
- c) Rinse slides briefly in the jar containing RT SSC, then immerse slides for 5 min. in the jar containing SSC at 75°C.
- d) Wash slides in dH₂O. 3 times, 2 min. each

4. Immunodetection Procedure:

- a) Immerse slides in 3% H₂O₂ in Absolute Methanol. 10 min.
- b) Wash in PBS/Tween 20 (0.025%). 3 times, 2 min. each
- c) Add CAS-Block™ (Reagent A): 2-3 drops/slide at RT. Soak. 10 min.
- d) Blot off blocking reagent. DO NOT RINSE.
- e) Add Mouse anti-Dig antibody (Reagent B): 2-3 drops/slide at RT. Soak. 30 min.
- f) Wash in PBS/Tween 20 (0.025%). 3 times, 2 min. each
- g) Add polymerized HRP-anti-Mouse antibody (Reagent C): 2-3drops/slide at RT. 30 min.
- h) Wash in PBS/Tween 20 (0.025%). 3 times, 2 min. each
- i) During the wash, prepare DAB by adding one drop of each reagent (D1-D3) to 1 mL of dH₂O.
- j) Add Substrate-Chromogen Solution (DAB): 2-3 drops/slide. Soak. 30 min.
- k) Place slides in slide rack.
- l) Wash with running tap water. 2 min.

5. Counterstaining and Coverslipping

- a) Counterstain tissue with hematoxylin. 6 sec – 1 min.
Counterstaining time is dependent on tissues used.
Dark counterstaining is not recommended, as it may obscure positive staining signals.
- b) Wash with running tap water. 2 min.
- c) Dehydrate in graded EtOH series. 2 min. each grade
(70%, 85%, 95%, 100%, 100%)
- d) Immerse in Xylene. 2 times, 2 min. each
- e) Coverslip, using Histomount™ Mounting Solution (Reagent E).

6. Brightfield Microscopy

Examine hybridization results and tissue morphology simultaneously using a brightfield microscope and a 40x dry objective.

D. CELL SAMPLE OR METAPHASE CHROMOSOME SAMPLE

1. Fix cell sample on HistoGrip™-treated or Superfrost/Plus coated glass slide.
2. Pretreatment
 - a) Immerse slides in 2x SSC at 37°C for 60 minutes.
 - b) (Optional) Pretreat cells with SP●T-Light® Cell Pretreatment Reagent (00-8400) for 5 minutes at 37°C (Note: incubation time (2-10 minutes) depends on cell type and slide-making conditions. Excessive enzyme digestion will cause loss of nuclei and chromosome structure while inadequate digestion may result in loss of signal.)
 - c) Wash slides in PBS for 3 x 1 minute at room temperature (RT)
 - d) (Optional) Immerse slides in 10% buffered formalin for 1 minute at RT
 - e) Wash slides in PBS for 3 x 1 minute at RT.
 - f) Dehydrate slides in 70%, 85%, 95%, and 100% ethanol for 2 minutes each, and then air dry.
Slides are now ready for ISH procedure (alternatively, slides can be stored in 70% ethanol at -20°C).
3. Denaturation and Hybridization
 - a) Add 15 ml of probe to the center of the sample and cover with a 22 x 22mm coverslip. (Use more probe for bigger sample and larger coverslip)
 - b) Seal edges of coverslip with thin layer of rubber cement to prevent evaporation of probe solution during incubation.
 - c) Denature the slides on a hot plate or on a slide warmer at 80°C for 3 minutes (2-5 minute range), or in the slide block of a PCR thermal cycler.
 - d) Place slide in a dark humidity box or in the slide block of a PCR thermal cycler for 16-24 hours at 37°C.
4. Stringency wash
 - a) Remove rubber cement and coverslip.
 - b) Immerse slides in 0.5x SCC buffer, using a Coplin jar, for 5 minutes at 72°C. (Note: this temperature is based on one slide, but each slide will cause a 1°C drop in solution temperature. Therefore, if you have more than one slide, adjust)

www.invitrogen.com

Invitrogen Corporation • 542 Flynn Rd • Camarillo • CA 93012 • Tel: 800.955.6288 • E-mail: techsupport@invitrogen.com

the water bath temperature accordingly. For example, if washing 4 slides, adjust the water bath temperature to 75°C. Do not go higher than 80°C).

c) Wash slides in PBS/Tween 20 buffer for 3 x 2 minutes at RT.

Proceed to Blocking and Quenching

E. INTERPRETATION OF CISH™ RESULTS

1. CISH™ Signals

In CISH™ an individual gene appears as a small, single dot. Gene amplification is typically visible as large DAB-stained gene clusters, multiple individual dots within the nucleus, or mixed clusters and multiple nuclear dots.

Table 1: Signal Visualization

Magnification	CISH Signal
10x	Individual signals are barely visible and easily overlooked.
20x	Individual signals are small but clearly discernible.
40x	Individual signals are easily identified.
60x or 100x	Not necessary.

2. Positive Control

The positive tissue control, a tissue known to contain cyclin D1 gene amplification, if used, should be examined first to ascertain that all reagents are functioning properly. The presence of gene clusters, or ≥ 6 individual signals, within the nuclei of a single cell is indicative of expected positive reactivity. If the positive control fails to demonstrate the presence of clusters or ≥ 6 signals per nucleus, results obtained for the specimens should be considered invalid.

In general, the presence of no more than two gene copies in the nuclei of the normal tissue counterpart of the positive tissue control confirms that the probe and immunodetection reagents are not cross-reacting with cellular or tissue components. If non-specific staining occurs in the nuclei of the normal tissue counterpart of the positive tissue control, results obtained for the specimens should be considered invalid.

If non-specific staining occurs, it usually exhibits a diffuse staining appearance. Occasionally, sporadic staining outside of nuclei may be observed in tissue sections that have been excessively formalin-fixed. Non-specific staining should not be confused with positive CISH™ signals.

3. Evaluation of Cyclin D1 gene status by CISH

Table 2: Assessment of gene status by CISH.

Amplification	>10 copies, or large clusters, of the gene present per nucleus in >50% cancer cells.
Low Amplification	6-10 copies of the gene, or a small gene cluster, present per nucleus in >50% cancer cells.
No Amplification	1-5 copies of the gene present per nucleus in >50% of cancer cells. The presence of 3-5 copies of the gene per nucleus may be due to polysomy of the chromosome.

Diploid cells normally have two cyclin D1 signals. It is expected that a small percentage of normal cells will display extra chromosomal signals due to mitosis, or may be missing expected chromosomal signals (this is particularly true for paraffin-embedded sections).

Aneuploid cells have either more or less than two cyclin D1 signals.

Cells that have amplified cyclin D1 may have as few as 6 copies of the gene or up to dozens of copies of the gene. Intermediate levels of amplification, i.e. 3-to-5 copies of cyclin D1, may result from cell polyploidization rather than targeted cyclin D1 amplification. The presence of one or more amplicons is clearly indicative of gene amplification.

VII. QUALITY CONTROL

Variation in tissue processing and technical procedures in the user's laboratory may produce significant variability in results, necessitating regular performance of in-house controls in addition to the following procedures.

The color and nature of the positive signal will depend on the detection method used. Refer to package insert of the detection kit for a description of the expected positive signal.

Positive (Amplification) Tissue Control: External positive tissue control materials should be taken from fresh autopsy/biopsy/surgical specimens that have been fixed, processed, and embedded in the same manner as the sample. Tissue specimens processed differently from the sample validate reagent performance only, and do not verify tissue preparation techniques. Positive tissue controls are indicative of correctly prepared tissues and proper staining techniques. One positive tissue control for each set of test conditions should be included in each run.

Tissues used for the positive control materials should be selected from specimens with well-characterized levels of cyclin D1 gene amplification.

Known positive tissue controls should only be utilized for monitoring the correct performance of processed tissues and test reagents, rather than as an aid in interpreting sample results. If the positive tissue controls fail to demonstrate positive staining, results obtained for the samples should be considered invalid.

VIII. PROCEDURAL TIPS AND TROUBLESHOOTING

1. Throughout the entire procedure, unless otherwise indicated, it is important that the tissue section does not dehydrate.
2. **Heat Pretreatment (The most critical step for successful CISH™ performance):**
The specimen must be boiled or heated above 98°C for 15 min. in Heat Pretreatment Solution (00-8401). See page 3.
3. **Enzyme Digestion (A critical step for successful CISH™ performance):** Different enzyme incubation times (5-15 min.) may be required, depending on tissue type and fixation method. **For most breast tissues, 10 min. enzyme digestion at room temperature (RT) will produce the best CISH™ results. Be sure to pre-warm the Enzyme Pretreatment Reagent (00-8401) to RT prior to adding to the tissue section.** Enzyme pretreatment of the specimen should be evaluated immediately at the completion of the CISH™ protocol. If nuclei are not counterstained and there is an absent or very weak CISH™ signal, this may be due to nuclear loss as the result of excessive digestion. If nuclei are strongly counterstained but a CISH™ signal is absent in the nuclei, this may be due to under-digestion during the pepsin pretreatment. As an alternative, enzyme pretreatment may also be performed at 37°C for 3 minutes if optimal results are not attained.
4. Probe denaturation at a temperature lower than recommended by the protocol may result in a weak or absent CISH™ signal.
5. Hybridization performed for shorter time periods, or stringent washes performed at higher temperatures, than recommended by the protocol may produce a decrease in or complete loss of the CISH™ signal.
6. Please contact your local distributor or Invitrogen Laboratories, Inc. at tech_support@invitrogen.com or 1-800-955-6288 for additional technical assistance or product literature.

IX. SAFETY AND PRECAUTIONS

1. Use ample precautions when handling reagents. Wear disposable gloves, coat, and safety glasses when handling suspected carcinogens.
2. Do not use this product after expiration date.
3. 3,3'-Diaminobenzidine tetrachloride (DAB) may be harmful if swallowed, inhaled, or absorbed through the skin, and may be irritating to eyes, skin, mucous membranes and upper respiratory tract. DAB is a suspected carcinogen; consult Federal, State, and/or local regulations for disposal recommendations.
4. The 0.1% sodium azide (NaN₃) used as a preservative in this kit is toxic if ingested. Sodium azide may react with lead and copper plumbing to form highly explosive metal azides. To prevent azide build-up in plumbing, flush with large volumes of water during disposal.
5. Avoid contact of this reagent with eyes and mucous membranes. If reagent comes into contact with sensitive areas, flush with generous amounts of water.
6. This product does not meet the Occupational Safety & Health Administration (OSHA) criteria for a hazardous substance, and therefore does not require a Material Safety Data Sheet (MSDS).
7. Consult local regulations for disposal of potentially toxic components.
8. Specimens and all materials coming into contact with them should be handled as if capable of transmitting infection, and disposed of with proper precautions. Never pipette by mouth. Avoid contact of probe and tissue specimens with skin and mucous membranes.
9. Minimize microbial contamination to avoid non-specific staining.
10. Use of incubation times, concentrations, or temperatures other than those specified may produce erroneous results. The user must validate any such changes.

X. LIMITATIONS

1. CISH™ is a multi-step procedure that requires specialized training in the selection of the appropriate reagents; tissue selection, fixation, and processing; preparation of the CISH™ slide; and interpretation of the staining results.
2. Tissue and cell staining is dependent upon the handling and processing of the tissue sample prior to staining. Improper fixation, freezing, thawing, washing, drying, heating, sectioning, or contamination with other tissues or fluids may produce artifacts, false-positive, or false-negative results. Inconsistent results may be due to variations in fixation and embedding methods, or to inherent irregularities within the tissue sample.
3. Excessive or incomplete counterstaining may compromise proper interpretation of results.
4. Any deviation from recommended test procedures may invalidate declared expected results; appropriate controls must be employed and documented. Users who deviate from recommended test procedures must accept responsibility for interpretation of specimen results under those circumstances.
5. Reagents may demonstrate unexpected reactions in previously untested tissues. The possibility of unexpected reactions, even in tested tissue groups, cannot be completely eliminated due to biological variability of tissues.
6. False-positive results may be produced by non-immunological binding of detection proteins or substrate reaction products. They may also be caused by pseudoperoxidase activity (erythrocytes) or endogenous peroxidase activity (cytochrome c).

www.invitrogen.com

Invitrogen Corporation • 542 Flynn Rd • Camarillo • CA 93012 • Tel: 800.955.6288 • E-mail: techsupport@invitrogen.com

PIN 31306

(Rev 08/08) DCC-08-1089

© 2007 Invitrogen Corporation. All right reserved. These products may be covered by one or more Limited Use Label Licenses (see the Invitrogen Catalog or www.invitrogen.com). By use of these products you accept the terms and conditions of all applicable Limited Use Label Licenses.

XI. REFERENCES

1. Hesketh, R. Second Edition. Academic Press. 139-146, 1997.
2. Barbareschi M, et al. *Int J Cancer* 74(2):171-174, 1997.
3. Bellacosa A, et al. *Clin Cancer Res.* 2(1):175-180, 1996.
4. Bieche I, et al. *Br J Cancer* 86(4):580-586, 2002.
5. Bukholm IK, et al. *Virchows Arch* 433(3):223-228, 1998.
6. Courjal F, et al. *Int J Cancer* 69(4):247-253, 1996.
7. Freier K, et al. *Cancer Res* 63(6):1179-1182, 2003.
8. Glockner S, et al. *Lab Invest* 82(10):1419-1426, 2002.
9. Kyomoto R, et al. *Int J Cancer* 74(6):576-581, 1997.
10. Marchetti A, et al. *Int J Cancer* 75(2):187-192, 1998.
11. Mrhalova M, et al. *Cas Lek Cesk* 141(22):708-714, 2002.
12. Naidu R, et al. *Oncol Rep* 9(2):409-416, 2002.
13. Spyrtos F, et al. *Int J Biol Markers* 15(3):210-214, 2000.
14. Tanner MM, et al. *Am J Pathol* 153(1):191-199, 1998.
15. Vos CB, et al. *J Pathol* 187(3):279-284, 1999.
16. Yu Q, et al. *Nature* 411(6841):1017-1021, 2001.

Other CISH™ References:

- Tanner M, et al. *Cancer Res* 61:5345-5348, 2001.
- Kumamoto H, et al. *Pathol Int* 51:579-584, 2001.
- Cell Markers and Cytogenetics Committees, College of American Pathologists. *Arch Pathol Lab Med* 126(7):803-808, 2002.
- Palmu S, et al. *Anticancer Res* 22:411-414, 2002.
- Savinainen KJ, et al. *Am J Pathol* 160(1):339-345, 2002.
- Dandachi N, et al. *Lab Invest* 82(8):1007-1014, 2002.
- Korsching E, et al. *Lab Invest* 82: 1525-33, 2002.
- van de Vijver M. *Oncology* 63 Suppl 1: 33-8, 2002.
- Gupta D, et al. *Am J Clin Pathol* 119(3): 381-7, 2003.
- Joensuu H, et al. *Clin Cancer Res* 9(3): 923-30, 2003.
- Park K, et al. *Eur J Can* 39: 631-634, 2003.
- Arnould L, et al. *Br J Can* 88: 1587-1591, 2003.

TRADEMARKS

CISH™, Clearmount™, HistoGrip™, Histomount™, SP●T-Light®, SPT™, and Zymed® are trademarks of Zymed Laboratories, Inc. SPT™ is a Zymed patented technology. CISH™ is a patent-pending technology.

Authorized Representative for IVDD 98/79/EC: Invitrogen Ltd., Inchinnan Business Park, 3 Fountain Drive, Paisley, PA4 9RF, UK

Invitrogen SP•T-Light® La Sonda Cyclin D1 (84-1900)

I. INDICACIONES

Para uso diagnóstico *in vitro*

SP•T-Light® la sonda Cyclin D1 de Invitrogen tiene como finalidad detectar la amplificación del gen cyclin D1 en cortes tisulares fijados en formalina e infiltrados en parafina (formalin-fixed paraffin embedded tissue, FFPE) usando hibridización cromogénica *in situ* (Chromogenic *In situ* Hybridization, CISH™). La interpretación la debe realizar un patólogo cualificado en el contexto del historial clínico del paciente.

II. RESUMEN Y EXPLICACIÓN

Subtraction Probe Technology (SPT™)

La SPT™ de Invitrogen es una tecnología patentada, propiedad de Invitrogen, que crea sondas específicas, eliminando así las secuencias repetitivas (p.ej., elementos Alu y LINE) que se encuentran en los ácidos nucleicos humanos. En consecuencia, las sondas SPT™ de Invitrogen son inherentemente específicas y no precisan el bloqueo de la secuencia repetitiva, como se requiere para las sondas de ADN citogénicas tradicionales. La tecnología SPT™ de Invitrogen permite la evaluación de aberraciones genéticas usando detección cromogénica.

Descripción de la sonda de ADN y especificidad

La sonda SP•T-Light® Cyclin D1 de Invitrogen es una sonda de ADN de doble ramal que ha sido etiquetada con digoxigenina. Se suministra en forma de líquido tampón de hibridización. Se ha demostrado que esta sonda se une específicamente al locus del gen cyclin D1 en la banda de cromosoma 11p13. Las secuencias de ácido nucleico repetitivas se han eliminado cuantitativamente de la sonda mediante tecnología SPT™.

Principio del procedimiento CISH™ (Chromogenic In Situ hybridization)

La hibridización cromogénica *in situ* (Chromogenic *In situ* hybridization, CISH™) permite la detección de la amplificación de genes, de las translocaciones de cromosomas, y del número de cromosoma usando reacciones peroxidasa convencionales bajo el microscopio de campo luminoso en tejidos fijados en formalina e infiltrados en parafina (FFPE) (4-5 µm de grosor). La base de la CISH™ es la capacidad de las sondas de ácido nucleico etiquetadas para hibridizar (unirse), *in situ*, a secciones específicas de ácido nucleico complementario en la muestra. Los resultados de la hibridización de la sonda pueden entonces visualizarse en el contexto de la morfología del tejido circundante. De ahí que los patólogos puedan ver la morfología del tejido y las aberraciones de los genes de forma simultánea.

Los resultados de tinción de la CISH™ pueden visualizarse con un microscopio de campo luminoso estándar y una lente seca de 40x. Dado que la señal DAB es permanente, los resultados pueden almacenarse durante un periodo largo, creando así un archivo de test permanente. Con la metodología de inmunodetección CISH™, el análisis de los resultados es rápido y sencillo. La ventaja más importante de la CISH™ es que la detección de las aberraciones genéticas y la verificación de la histopatología se pueden hacer de forma simultánea.

Los tumores con amplificación del gen cyclin D1 se presentan típicamente como grandes grupos de copias de genes intranucleares peroxidasa-positivos, como numerosas pequeñas señales individuales peroxidasa-positivas, o como una mezcla de grupos y de copias de genes individuales. Los tumores con una amplificación baja del cyclin D1 típicamente presentan entre 6 hasta docenas copias de genes por núcleo. Los tumores con estatus normal del gen cyclin D1 típicamente presentan 1 a 2 puntos por núcleo, mientras que los tumores con polisomía del cromosoma muestran de 3 a 5 copias del gen cyclin D1 por núcleo.

III. REACTIVOS SUMINISTRADOS

- Sonda SP•T-Light® Cyclin D1 de 0,4 ml digoxigenina-etiquetada

IV. REACTIVOS / MATERIALES Y EQUIPO NECESARIO PERO NO SUMINISTRADO

Reactivos / Materiales Auxiliares

Invitrogen Cat. N°

1. SP●T-Light® Equipo de detección para polímero en CISH	84-9246
2. SP●T-Light® Equipo para pretratamiento tisular FFPE	00-8401
3. SP●T-Light® Reactivo para pretratamiento celular	00-8402
4. Tampón SSC (20X)	00-8400
5. Portas SuperFrost Plus Q Adhesivo para portas HistoGrip™	00-8050
6. [Opcional] Tejido control positivo: corte tisular FFPE con amplificación del gen cyclin D1	
7. [Opcional] Tejido control negativo: corte tisular FFPE sin amplificación del gen cyclin D1	
8. Agua desionizada o destilada (dH ₂ O)	
9. Xileno	
10. Etanol (EtOH) 70%, 85%, 95%, y 100%	
11. Cubreobjetos, cemento de goma, aguja 18G ½" y jeringuilla de 5 ml Q	
12. [Opcional] UnderCover™ Slips (18x18 mm)	00-8403
13. [Opcional] UnderCover™ Slips (22x22 mm)	00-8404
14. Peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂) 30%	
15. 100% Metanol	
16. Tween 20 al 50%	00-3005
17. Hematoxilina Mayer	00-8011

Equipo

1. Cronómetro
2. Pipeta (p20, p1000)
3. Puntas de pipeta
4. Bandeja de portas
5. Calientaplatos, papel de aluminio, y vaso de precipitados de 1 litro
6. Calentador de portas
7. Incubadora a 37 °C
8. Bloque térmico con pantalla de temperatura digital y contenedor de humidificación de portas **Q**
Ciclador térmico PCR con un bloque de portas
9. Bañera de agua (capaz de mantener un rango de temperatura entre 75-80 °C)
10. Jarras Coplin y jarras de tinción
11. Microscopio de campo luminoso

V. ALMACENAMIENTO

Almacene la sonda SP●T-Light® Cyclin D1 a -20 °C

Tenga en cuenta que a -20 °C, la sonda SP●T-Light® Cyclin D1 no se congelará, ya que permanece en estado acuoso, de manera que no existen problemas asociados con la congelación/ descongelación. No utilice después de la fecha de caducidad impresa en la etiqueta. Si el producto se almacena en condiciones distintas a las especificadas en el prospecto del paquete, dichas condiciones de almacenamiento deben ser verificadas por el usuario.

VI. INSTRUCCIONES DE USO:

A. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Cortes tisulares infiltrados en parafina:

- i. Los tejidos fijados en formalina amortiguada neutra durante 12 a 24 horas antes de infiltrarlos en parafina son aptos para su uso. Los cortes tisulares (4-5 µm de grosor) deben montarse en portas de microscopio tratados con HistoGrip™ ó con Superfrost/Plus.
- ii. Secar los portas al aire, o secarlos a 37 °C, y luego calentarlos entre 2-4 horas a 60 °C.

B. PREPARACIÓN DEL REACTIVO

PBS (Phosphate Buffered Saline)

Agregar 1 paquete de polvo PBS a 1 l de dH₂O. Mezclar.

Tampón PBS/Tween 20 (0,025%)

Agregar 1 parte de Tween 20 al 50% a 1999 partes de PBS. Mezclar.

Substrate-Chromogen Solution (DAB)

Para preparar DAB, agregar 1 gota de cada reactivo (D1, D2, D3) a 1 ml dH₂O. Mezclar bien. **Esta solución debería prepararse inmediatamente antes de usarla.**

Serie de alcoholes

Preparar etanol al 70%, 85%, 95% y 100%.

www.invitrogen.com

Invitrogen Corporation • 542 Flynn Rd • Camarillo • CA 93012 • Tel: 800.955.6288 • E-mail: techsupport@invitrogen.com

3% H₂O₂ en Metanol Absoluto

Agregar 1 parte de 30% H₂O₂ a 9 partes de metanol.

0,5x SCC tampón (Lavado a Fondo)

Agregar 1 parte de tampón 2x SSC a 3 partes de dH₂O. Mezclar. O agregar 1 parte de tampón 20x SSC a 39 partes de dH₂O. Mezclar.

Tampón 2x SCC (para extensiones de células)

Agregar 1 parte de Tampón 20x SSC 9 partes de dH₂O. Mezclar.

C. PROTOCOLO CISH™ ESTÁNDAR PARA MUESTRA DE TEJIDO FFPE

Todos los reactivos excepto el sonda deberían equilibrarse a temperatura ambiente (RT) (20-25 °C) antes de su uso. La sonda puede usarse fría y sin necesidad de equilibrarla a la temperatura ambiente. Se debe realizar cada incubación a temperatura ambiente (RT) (20-25 °C) a menos que se indique lo contrario.

A menos que se indique lo contrario, es importante que no se seque el corte tisular durante todo el procesamiento.

1. Pre-tratamiento (sólo para cortes tisulares FFPE)

a) Desparafinación:

Sumergir en Xyleno.

2 veces, 5 min. cada vez

Empapar en 100% EtOH.

3 veces, 3 min. cada vez

Lavar en dH₂O.

3 veces, 2 min. cada vez

(Si el paso siguiente no se puede realizar de forma inmediata, secar los portas al aire tras empaparlos en 100% EtOH tres veces en lugar de lavar los portas en dH₂O tres veces.)

b) Pre-tratamiento por calor

(El paso más importante para el funcionamiento satisfactorio de CISH™):

Los portas/especímenes deben hervirse o calentarse por encima de 98 °C durante 15 min. en solución de pre-tratamiento por calor de los tejidos CISH™. Recomendamos que se use el calentaplatos para este paso. (Para protocolos que usen un equipo diferente, por favor comuníquese con el Servicio Técnico de Invitrogen en tech_support@invitrogen.com.)

i. Coloque los portas en la bandeja de portas.

ii. Caliente la solución de pre-tratamiento por calor en un vaso de precipitados sobre un calentaplatos hasta que hierva alcanzando una temperatura = 98 °C. Para evitar que se evapore el tampón, el vaso de precipitados debe cubrirse con una tapa de vidrio o con papel de aluminio.

iv. Coloque los portas en la solución que está hirviendo, cubra el vaso de precipitados, y hiérvalos durante 15 min.

v. Transfiera los portas a dH₂O a temperatura ambiente (RT) (20-25 °C) y lave tres veces, 2 min. cada vez.

c) Digestión enzimática

(Un paso fundamental para el funcionamiento satisfactorio de CISH™):

Para la mayoría de tejidos de mama, 10 min. de digestión enzimática a temperatura ambiente producirá los mejores resultados de CISH (agregar pepsina a temperatura ambiente (RT) al corte tisular). Pueden ser necesarios distintos tiempos de incubación de las enzimas (5-15 min.), dependiendo del tipo de tejido y del método de fijación.

i. Equilibre el reactivo de pre-tratamiento enzimático a temperatura ambiente (RT) (20-25 °C).

ii. Agregar suficiente reactivo F para cubrir el corte tisular e incubar durante 10 min. a temperatura ambiente (RT).

iii. Lavar en dH₂O tres veces, 2 min. cada vez.

d) Deshidratación en la serie graduada de etanol:

70% EtOH

2 min.

85% EtOH

2 min.

95 % EtOH

2 min.

100% EtOH

2 min.

100% EtOH

2 min.

e) Secar los portas al aire.

≥ 20 min.

f) Marcar los portas con lápiz.

2. Desnaturalización e hibridización

(Usar una máquina PCR con bloque de portas, **Q** un bloque térmico con pantalla de temperatura digital y contenedor de humidificación de portas con incubadora a 37 °C)

- Agregar 15 µl de sonda al centro del cubreobjetos. (Dependiendo del tamaño del tejido, puede ser necesaria más o menos sonda.)
- Colocar el cubreobjetos, con el lado de la sonda hacia abajo, sobre la zona apropiada de la muestra de tejido en el porta.
- Sellar el cubreobjetos para evitar la evaporación durante la incubación.
 - Usar una jeringuilla de 5 ml que contenga cemento de goma con una aguja de 18G ½". Aplicar cuidadosamente una delgada capa de cemento de goma a los bordes del cubreobjetos, traslapándola ligeramente sobre el portas. Dejar que el cemento de goma se seque (~10 min.) para evitar que el cubreobjetos se desplace fuera del portas. **Q**
 - Use Invitrogen UnderCover™ Slips quitando el protector de papel y pegando en la zona apropiada del portas, cubriendo la muestra de tejido. Presione los bordes de la cinta adhesiva para sellar. (Cuando use Invitrogen UnderCover™ Slips, NO PRESIONE HACIA ABAJO SOBRE LA PARTE CENTRAL DEL CUBREOBJETOS.)
- Desnaturalice la sonda incubando los portas a 94-95 °C durante 5 min. (Para hacerlo, coloque los portas en el bloque de portas de una máquina PCR a 94-95 °C, ó en un bloque térmico con indicación digital de temperatura a 94-95 °C e incube durante 5 min.)
- Coloque los portas en el bloque de portas de una máquina PCR a 37 °C e incube durante >10 horas (durante la noche). **Q**
Coloque los portas en un contenedor de humidificación a 37 °C durante >10 horas (durante la noche).

3. Lavado a fondo:

- Prepare dos jarras Coplin que contengan tampón SSC, una de ellas a temperatura ambiente (RT), y la otra calentada a 75 °C. (Incrementemente la temperatura en 1 °C por porta en más de dos portas, **pero no supere los 80 °C**.)
- Tras la hibridización, quite con cuidado el cemento de goma. Retire el cubreobjetos. (Si usa un Invitrogen UnderCover™ Slip, simplemente quite la cinta del porta para retirar el cubreobjetos.) No deje que el corte tisular se seque.
- Aclare los portas en la jarra que contiene SSC a temperatura ambiente, y luego sumerja los portas durante 5 min. en la jarra que contiene SSC a 75 °C.
- Lave los portas en dH₂O. 3 veces, 2 min. cada vez

4. Procedimiento de Inmunodetección usando el Kit de Detección de Amplificación CISH (cat. N° 84-9246):

- Sumerja los portas en 3% H₂O₂ en Metanol Absoluto. 10 min.
- Lave en PBS/Tween 20 (0,025%). 3 veces, 2 min. cada vez
- Agregue CAS-Block™ (Reactivo A): 2-3 gotas/porta a temperatura ambiente. Empape. 10 min.
- Seque el reactivo de bloqueo. NO ACLARE.
- Agregue anticuerpo ratón anti-Dig (Reactivo B): 2-3 gotas/porta a temperatura ambiente. Empape. 30 min.
- Lave en PBS/Tween 20 (0,025%). 3 veces, 2 min. cada vez
- Agregue anticuerpo polimerizado HRP-anti-ratón (Reactivo C): 2-3 gotas/porta a temperatura ambiente. 30 min.
- Lavar en PBS/Tween 20 (0,025%). 3 veces, 2 min. cada vez
- Durante el lavado, prepare DAB agregando una gota de cada reactivo (D1-D3) a 1 ml de dH₂O.
- Agregar Substrate-Chromogen Solution (DAB): 2-3 gotas/porta. Empapar. 30 min.
- Coloque los portas en la bandeja de portas.
- Lavar con agua del grifo. 2 min.

5. Contra tinción y uso de cubreobjetos

- Contra teñir el tejido con hematoxilina. 6 seg – 1 min.
El tiempo de contra tinción depende de los tejidos usados.
No se recomienda la contra tinción oscura ya que puede oscurecer las señales positivas de tinción.
- Lavar con agua corriente del grifo. 2 min.
- Deshidratar en la serie graduada de EtOH. 2 min. cada uno
(70%, 85%, 95%, 100%, 100%)
- Sumergir en Xyleno. 2 veces, 2 min. cada vez
- Cubrir usando Histomount™ Mounting Solution (Reactivo D).

6. Microscopio de campo luminoso

Examine los resultados de la hibridización y la morfología tisular simultáneamente usando un microscopio de campo luminoso con un objetivo seco de 40x.

www.invitrogen.com

Invitrogen Corporation • 542 Flynn Rd • Camarillo • CA 93012 • Tel: 800.955.6288 • E-mail: techsupport@invitrogen.com

D. MUESTRA CELULAR O MUESTRA DE CROMOSOMA EN METAFASE

1. Fijar la muestra celular sobre un porta de vidrio tratado con HistoGrip™ o revestido con Superfrost/Plus.
2. Pretratamiento
 1. Sumergir los portas en 2x SSC a 37 °C durante 60 minutos.
 2. (Opcional) Pretratar las células con SP●T-Light® Reactivo para pretratamiento celular durante 5 minutos a 37 °C (Nota: el tiempo de incubación (entre 2 y 10 minutos) depende del tipo de célula y de las condiciones de producción del porta. La digestión enzimática excesiva puede causar la pérdida de la estructura de núcleos y cromosomas, mientras que la digestión inadecuada puede resultar en la pérdida de la señal).
 3. Lavar los portas en PBS durante 3 x 1 minuto a temperatura ambiente (TA).
 4. (Opcional) Sumergir los portas en formalina amortiguada al 10% durante 1 minuto a temperatura ambiente.
 5. Lavar los portas en PBS durante 3 x 1 minuto a temperatura ambiente.
 6. Deshidratar los portas en etanol al 70%, 85%, 95% y 100% durante 2 minutos cada uno y luego secar al aire.

Ahora, los portas están listos para el procedimiento ISH (otra posibilidad es almacenar los portas en etanol 70% a -20°C).

3. Desnaturalización e hibridización

1. Agregar 15 µL de sonda al centro de la muestra y tapar con un cubreobjetos de 22 x 22 mm. (Para una muestra más grande, úsese más sonda y un cubreobjetos más grande).
2. Sellar los bordes del cubreobjetos con una fina capa de cemento de goma para evitar la evaporación de la solución de la sonda durante la incubación.
3. Desnaturalizar los portas en un calentaplatos o en un calentaportas a 80 °C durante 3 minutos (entre 2 y 5 minutos), o en el bloque de portas de un ciclador térmico PCR.
4. Colocar el porta en una caja húmeda oscura o en el bloque de portas de un ciclador térmico PCR durante entre 16 y 24 horas a 37 °C.

4. Lavado a fondo

1. Retirar el cemento de goma y el cubreobjetos.
2. Sumergir los portas en 0,5 x SSC tampón, usando una jarra Coplin, durante 5 minutos a 72 °C. (Nota: esta temperatura está basada en un porta, pero cada porta provocará un descenso de 1°C en la temperatura de la solución. Por ello, si tiene más de un porta, ajuste la temperatura del baño de agua adecuadamente. Por ejemplo, si lava 4 portas, ajuste la temperatura del baño de agua a 75°C. No supere los 80°C).
3. Lavar los portas en tampón PBS/Tween 20 durante 3 x 2 minutos a temperatura ambiente.

Prosiga con Bloqueo y Enfriamiento

E. INTERPRETACIÓN DE CISH™

1. Señales CISH™

En CISH™ un gen individual cyclin D1 aparece como un pequeño punto.

Tabla 1: Visualización de la señal

Aumento	Señal CISH
10x	Las señales individuales apenas son visibles y se pueden pasar fácilmente por alto
20x	Las señales individuales son pequeñas pero claramente apreciables
40x	Las señales individuales son fácilmente identificables.
60x ó 100x	No es necesario.

2. Control positivo

El tejido control positivo, un tejido que se sabe contiene amplificación del gen cyclin D1, en el caso de usarse, debería examinarse previamente con el fin de averiguar si todos los reactivos funcionan debidamente. La presencia de grupos de genes, o de ≥6 señales individuales, en el núcleo de una única célula es indicativo de que puede esperarse reactividad positiva. Si el control positivo no consigue demostrar la presencia de grupos o de ≥6 señales por núcleo, los resultados obtenidos para el espécimen deberían considerarse no válidos.

En general, la presencia de no más de dos copias de genes en la mayoría de las células en el control tisular negativo confirma que la sonda y los reactivos para detección inmunológica no están reaccionando de manera cruzada con componentes celulares o tisulares. Si tiene lugar una tinción no específica en el control tisular negativo, los resultados obtenidos para los especímenes deberían considerarse no válidos.

Si se produce una tinción no específica, generalmente presenta un aspecto de tinción difusa. En ocasiones, la tinción esporádica fuera de los núcleos puede observarse en cortes tisulares que han sido excesivamente fijados en formalina. La tinción no específica no debe confundirse con señales CISH™ positivas.

3. Evaluación del estatus del gen cyclin D1 por CISH

Tabla 2: Evaluación del estatus del gen cyclin D1 por CISH

Amplificación alta	Un gran grupo de copias de genes (amplicón) o >10 copias separadas de genes por núcleo en más del 50% de las células cancerosas.
Baja Amplificación	De 6-10 señales por núcleo en >50% de células cancerosas.
Ausencia de Amplificación	De 1-5 señales por núcleo* en >50% de células cancerosas. La presencia de 3-5 copias del gen cyclin D1 por núcleo se debe a la polisomía del cromosoma.

* Puede faltar una copia de gen en células normales debido a la pérdida de material nuclear durante la preparación de los cortes.

Número de copia del gen cyclin D1 normal (diploide):

Las células diploides tienen normalmente dos genes cyclin D1. Un porcentaje pequeño de células normales puede mostrar señales cromosómicas adicionales debidas a la mitosis o no mostrar señales cromosómicas esperadas (sobre todo en cortes de tejido infiltrados en parafina).

Número de copia del gen cyclin D1 aneuploides:

Las células aneuploides tienen, ya sea más o menos de dos señales del cyclin D1.

Células con gen cyclin D1 amplificado:

Las células que tienen cyclin D1 amplificado pueden presentar desde 6 copias del gen hasta docenas de copias del mismo. Los niveles intermedios de amplificación, es decir, de 3-a-5 copias de cyclin D1, pueden ser resultado de la poliploidización celular más que de la amplificación del cyclin D1 diana. La presencia de uno o más amplímeros es claramente indicativa de la amplificación del gen.

VII. CONTROL DE CALIDAD

La variación en el procesamiento de los tejidos y en los procedimientos técnicos del laboratorio del usuario pueden ocasionar variaciones significativas en los resultados, con lo que se hacen necesarios los controles regulares de funcionamiento interno además de los procedimientos siguientes.

El color y la naturaleza de la señal positiva dependerán del método de detección utilizado. Para la descripción de la señal positiva prevista, consulte el prospecto del paquete del equipo de detección utilizado.

Control tisular positivo (Amplificación): Los materiales de control tisular positivo externos deben tomarse de autopsias/especímenes quirúrgicos recientes que hayan sido fijados, procesados, e infiltrados de la misma manera que la muestra. Los especímenes tisulares procesados de forma distinta a la muestra sólo validan el funcionamiento del reactivo, y no verifican las técnicas de preparación tisular. Los controles tisulares positivos son indicativos de la correcta preparación de los tejidos y de técnicas de tinción apropiadas. Debería incluirse un control tisular positivo para cada conjunto de condiciones de test en cada secuencia.

Los tejidos usados para los materiales de control positivo deberían seleccionarse a partir de especímenes con niveles bien caracterizados de amplificación del gen cyclin D1.

Los controles tisulares positivos conocidos sólo deberían utilizarse para monitorizar el correcto funcionamiento de los tejidos procesados y los reactivos de los tests, y no como ayuda para interpretar los resultados de las muestras. Si los controles tisulares positivos no logran demostrar la tinción positiva, los resultados obtenidos para las muestras deberían considerarse no válidos.

VIII. CONSEJOS DE PROCESAMIENTO Y RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS

1. Excepto indicación en contrario, es importante que no se seque el corte tisular a lo largo del procesamiento.
2. **Pre-tratamiento por calor (El paso más importante para el funcionamiento satisfactorio de CISH™):**
Los portas/especímenes deben hervirse o calentarse por encima de 98 °C durante 15 min. en solución de pre-tratamiento por calor. Ver página 10.
3. **Digestión enzimática (Un paso esencial para el correcto funcionamiento de CISH™):** Pueden ser necesarios distintos tiempos de incubación enzimática (5-15 min.) dependiendo del tipo de tejido y del método de fijación. **Para la mayoría de tejidos de mama, 10 min. de digestión enzimática a temperatura ambiente (RT) producirán los mejores resultados de CISH™. Asegúrese de precalentar el Reactivo de Pre-tratamiento enzimático (Reactivo F) a temperatura ambiente antes de agregarla al corte tisular.** El pre-tratamiento enzimático del espécimen debería evaluarse inmediatamente tras la finalización del protocolo CISH™. Si los núcleos no están contra teñidos y no aparece señal CISH™ o ésta es muy débil, ello puede deberse a la pérdida nuclear como resultado de la digestión excesiva. Si los núcleos están fuertemente contra teñidos pero no aparece señal CISH™ en los núcleos, ello puede deberse a la infra-digestión durante el pre-tratamiento de pepsina. Como alternativa, el pre-tratamiento enzimático también puede realizarse a 37 °C durante 3 minutos si no se obtienen resultados óptimos.
4. La desnaturalización de la sonda a una temperatura inferior a la recomendada por el protocolo puede dar como resultado una señal CISH™ débil o ausente.
5. La hibridización realizada durante períodos de tiempo más cortos, o los lavados realizados a temperaturas más elevadas que las recomendadas para el protocolo pueden producir una disminución o la pérdida total de la señal CISH™.

www.invitrogen.com

Invitrogen Corporation • 542 Flynn Rd • Camarillo • CA 93012 • Tel: 800.955.6288 • E-mail: techsupport@invitrogen.com

6. Por favor, póngase en contacto con su distribuidor local o con Invitrogen Laboratories, Inc. en tech_support@invitrogen.com ó llame al 1-800-955-6288 para solicitar asistencia técnica adicional o la literatura del producto.

IX. SEGURIDAD Y PRECAUCIONES

1. Sea muy precavido cuando maneje reactivos. Use guantes desechables, bata y gafas de seguridad cuando maneje materiales que se sospecha son carcinógenos.
2. No utilice este producto después de su fecha de caducidad.
3. 3,3'-Diaminobenzidine tetrachloride (DAB) puede ser dañino si se ingiere, se inhala o se absorbe a través de la piel, y puede causar irritación en los ojos, en la piel, en las membranas mucosas y en el tracto respiratorio superior. Se sospecha que DAB es un carcinógeno; consulte la normativa nacional, regional y/o local para conocer las recomendaciones para su eliminación.
4. La azida de sodio (NaN₃) 0,1% usada como conservante en este kit es tóxica por ingestión. La azida de sodio puede reaccionar con el plomo y el cobre de las cañerías formando azidas metálicas altamente explosivas. Para impedir la acumulación de azidas en las cañerías, limpie con abundantes volúmenes de agua para su eliminación.
5. Evite el contacto de este reactivo con los ojos y con las membranas mucosas. Si el reactivo entra en contacto con zonas sensibles, limpie con abundantes cantidades de agua.
6. Este producto no cumple los criterios de la Occupational Safety & Health Administration (OSHA) para sustancias peligrosas, y por consiguiente no precisa hoja de datos para seguridad de materiales (Material Safety Data Sheet, MSDS).
7. Consulte la normativa local para la eliminación de componentes potencialmente tóxicos.
8. Los especímenes y todos los materiales que entren en contacto con ellos deberían manejarse como si fueran susceptibles de transmitir infecciones, y deberían eliminarse usando las debidas precauciones. No pipetee con la boca. Evite el contacto de la sonda y de los especímenes tisulares con la piel y las membranas mucosas.
9. Minimice la contaminación microbiana para evitar la tinción no específica.
10. El uso de tiempos de incubación, concentraciones o temperaturas distintas a las especificadas pueden producir resultados erróneos. El usuario debe validar cualquiera de los cambios.

X. LIMITACIONES

1. CISHTM es un procesamiento de varios pasos que requiere formación especializada en la selección de los reactivos apropiados; selección de tejidos, fijación, procesamiento; preparación del porta CISHTM; e interpretación de los resultados de tinción.
2. La tinción de los tejidos y de las células depende del manejo y procesamiento de la muestra de tejido antes de la tinción. La fijación inapropiada, la congelación, la descongelación, el lavado, el secado, el calentamiento, el corte, o la contaminación con otros tejidos o fluidos puede producir resultados artificiales, resultados positivos falsos, o resultados negativos falsos. Los resultados desiguales pueden deberse a variaciones en los métodos de fijación e inclusión, o a irregularidades inherentes a la muestra de tejido.
3. La contra tinción excesiva o incompleta puede comprometer la correcta interpretación de los resultados.
4. Cualquier desviación de los procedimientos de test recomendados puede invalidar resultados previstos declarados. Deben utilizarse y documentarse controles apropiados. Los usuarios que se desvíen de los procedimientos de test recomendados deben responsabilizarse de la interpretación de los resultados de los especímenes bajo dichas circunstancias.
5. Los reactivos pueden tener reacciones inesperadas en tejidos no testados previamente. La posibilidad de reacciones inesperadas, incluso en grupos de tejido testados, no puede eliminarse totalmente debido a la variabilidad biológica de los tejidos.
6. Pueden producirse resultados positivos falsos por la unión no inmunológica de proteínas de detección o por productos de reacción sustrato. También pueden producirse por la actividad de pseudoperoxidasa (eritrocitos) o actividad endógena de peroxidasa (citocromo c).

MARCAS REGISTRADAS

CISHTM, ClearmountTM, HistoGripTM, HistomountTM, SP[●]T-Light[®], SPTTM, y Zymed[®] son marcas registradas de Zymed laboratories, Inc. SPTTM es una tecnología de Zymed patentada. CISHTM es una tecnología cuya patente está en trámite.

Representante autorizado de IVDD 98/79/EC: Invitrogen Ltd.
 Inchinnan Business Park
 3 Fountain Drive
 Paisley
 PA4 9RF
 UK

www.invitrogen.com

Invitrogen Corporation • 542 Flynn Rd • Camarillo • CA 93012 • Tel: 800.955.6288 • E-mail: techsupport@invitrogen.com

PIN 31306

(Rev 08/08) DCC-08-1089

© 2007 Invitrogen Corporation. All right reserved. These products may be covered by one or more Limited Use Label Licenses (see the Invitrogen Catalog or www.invitrogen.com). By use of these products you accept the terms and conditions of all applicable Limited Use Label Licenses.

Sonde d'ADN Cyclin D1 SP•T-Light® (84-1900)

I. UTILISATION PRÉVUE

Pour le diagnostic in vitro

La sonde d'ADN Cyclin D1 SP•T-Light® de Invitrogen a été conçue pour la détection de l'amplification du gène cyclin D1 dans des sections de tissu fixées dans du formol et incorporée dans de la paraffine (formalin-fixed paraffin embedded tissue, FFPE) par l'Hybridation chromogénique *in situ* (Chromogenic *In Situ* Hybridization, CISH™). Les résultats doivent être interprétés par un pathologiste qualifié en tenant compte des antécédents cliniques du patient.

II. SOMMAIRE ET DESCRIPTION

Subtraction Probe Technology (SPT™)

SPT™ de Invitrogen est une technologie brevetée de Invitrogen qui crée des sondes spécifiques en éliminant les séquences répétitives (par exemple, Alu et éléments LINE) présents dans les acides nucléiques chez l'homme. Par conséquent, les sondes SPT™ de Invitrogen sont spécifiques de par leur nature et ne requièrent aucun blocage de séquences répétitives, comme c'est le cas pour les sondes ADN cytogénétiques traditionnelles. La technologie SPT™ de Invitrogen permet d'évaluer les aberrations génétiques grâce à une détection chromogénique.

Description et spécificité de la sonde ADN

La sonde Cyclin D1 SP•T-Light® de Invitrogen est une sonde ADN double brin marqué à la digoxigénine. Elle est fournie sous forme d'un liquide dans un tampon d'hybridation. Il a été prouvé que cette sonde s'attache de façon spécifique au locus du gène cyclin D1 sur la bande de chromosome 11p13. Les séquences répétitives d'acide nucléique ont été ôtées quantitativement de la sonde grâce à la technologie SPT™.

Principe de la procédure CISH™ (Chromogenic In Situ hybridization)

L'hybridation chromogénique in situ (Chromogenic In Situ Hybridization, CISH™) permet de détecter les amplifications de gènes, les translocations de chromosomes et le nombre de chromosomes en utilisant des réactions catalysées par peroxydase sous le microscope à fond clair sur des tissus fixés dans du formol et incorporés dans de la paraffine (FFPE) d'une épaisseur de 4 à 5 µm. Le caractère essentiel de CISH™ est la capacité des sondes à acide nucléique marquées de s'hybrider (se lier), *in situ*, à des sections spécifiques supplémentaires d'acide nucléique dans l'échantillon. Les résultats d'hybridation avec sonde peuvent ensuite être examinés en tenant compte de la morphologie des tissus environnants. Les pathologistes peuvent donc visualiser simultanément la morphologie des tissus et les aberrations des gènes.

Les résultats de coloration du CISH™ sont bien visibles sous un microscope à fond clair standard pourvu d'une lentille sèche 40x. Comme le signal DAB est permanent, les résultats peuvent être enregistrés à long terme, créant ainsi un document d'essai permanent. Grâce à la méthodologie d'immunodétection CISH™, l'analyse des résultats est facile et rapide. Le principal avantage du CISH™ est le fait de pouvoir détecter les aberrations génétiques et vérifier l'histopathologie en même temps.

En général, les tumeurs présentant une amplification du gène cyclin D1 apparaissent sous forme de grands groupes de gènes intranucléaires positifs à la peroxydase, de nombreux petits signaux individuels positifs à la peroxydase ou d'un mélange de groupes et de copies de gènes individuels. En général, les tumeurs à faible amplification du cyclin D1 présentent entre 6 jusqu'aux douzaines copies de gènes par noyau. En général, les tumeurs dont l'état du gène cyclin D1 est normal manifestent 1 à 2 points par noyau, alors que les tumeurs ayant une polysomie du chromosome manifestent entre 3 et 5 copies de gène cyclin D1 par noyau.

III. RÉACTIFS FOURNIS

- 0,4 ml de sonde à Cyclin D1 SP•T-Light® marquée à la digoxigénine

IV. RÉACTIFS/MATÉRIAUX & ÉQUIPEMENTS NÉCESSAIRES MAIS NON FOURNIS

Réactifs auxiliaires/Matériaux

	No de Cat. Invitrogen
1. Kit de détection de polymère CISH SP●T-Light®	84-9246
2. Kit de prétraitement de tissu FFIP SP●T-Light®	00-8401
3. Réactif de prétraitement de cellules SP●T-Light®	00-8402
4. Solution tampon SSC (20X)	00-8400
5. Lames SuperFrost Plus OU Adhésif à lames HistoGrip™	00-8050
6. [Facultatif] Tissu témoin positif : section de tissu FFPE avec amplification du gène cyclin D1	
7. [Facultatif] Tissu témoin négatif : section de tissu FFPE sans amplification du gène cyclin D1	
8. Eau désionisée ou distillée (dH ₂ O)	
9. Xylène	
10. Éthanol à 70 %, 85 %, 95 %, et 100 % (EtOH)	
11. Lamelles couvre-objet, colle de caoutchouc, aiguille 18G ½" et seringue de 5 ml OU	
12. [Facultatif] Lamelles UnderCover™ (18 x 18 mm)	00-8403
13. [Facultatif] Lamelles UnderCover™ (22 x 22 mm)	00-8404
14. Peroxyde d'hydrogène à 30 % (H ₂ O ₂)	
15. Méthanol à 100 %	
16. Tween 20 à 50 %	00-3005
17. D'hématoxyline de Mayer	00-8011

Équipement

1. Minuterie
2. Pipette (p20, p1000)
3. Embouts pour pipette
4. Porte-lames
5. Plaque chauffante, papier d'aluminium et 1 vase à bec de un litre
6. Réchauffeur de lames
7. Incubateur à 37 °C
8. Bloc chauffant à affichage numérique de la température et boîte d'humidification des lames **OU**
9. Cycleur thermique ACP avec bloc à lames
10. Bain d'eau (capable de maintenir une température entre 75 et 80 °C)
11. Jarres de Coplin et jarres à coloration
12. Microscope à fond clair

V. STOCKAGE

Conserver la sonde à Cyclin D1 SP●T-Light® à -20 °C

Veuillez noter que, à -20 °C, la sonde à Cyclin D1 SP●T-Light® gèlera pas. Comme elle reste dans un état aqueux il n'y aura aucun problème associé à la congélation/décongélation. Ne pas utiliser après la date de péremption imprimée sur l'étiquette. Si le produit est conservé dans des conditions autres que celles spécifiées dans la notice de conditionnement, les conditions en question devront être vérifiées par l'utilisateur.

VI. MODE D'EMPLOI

A. PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON

Sections de tissu incorporées dans de la paraffine :

- i. Des tissus fixés dans du formol tamponné neutre pendant 12 à 24 heures avant d'être incorporés dans la paraffine peuvent être utilisés. Les sections de tissu (d'une épaisseur de 4 à 5 µm) doivent être fixées sur des lames de microscope traitées au HistoGrip™ ou des lames Superfrost/Plus.
- ii. Sécher les lames à l'air ou à 37 °C, puis les cuire entre 2 et 4 heures à 60 °C.

B. PRÉPARATION DU RÉACTIF

PBS (Soluté de tampon phosphate)

Ajouter 1 paquet de poudre de PBS à 1 l de dH₂O. Mélanger.

Tampon PBS/Tween 20 (0,025 %)

Ajouter 1 part Tween 20 à 50 % à 1999 parts de PBS. Mélanger.

Solution de substrat-chromogène (DAB)

Pour préparer la solution DAB, ajouter 1 goutte de chacun des réactifs (D1, D2, D3) à 1 ml de dH₂O. Bien mélanger. **Cette solution doit être préparée juste avant d'être utilisée.**

Séries d'alcools

Préparer de l'éthanol à 70 %, 85 %, 95 %, et 100 %.

www.invitrogen.com

Invitrogen Corporation • 542 Flynn Rd • Camarillo • CA 93012 • Tel: 800.955.6288 • E-mail: techsupport@invitrogen.com

H₂O₂ à 3 % dans du méthanol absolu

Ajouter une part de H₂O₂ à 30 % à 9 parts de méthanol.

Solution tampon 2x SSC

Ajouter 1 partie de solution tampon 20x SSC à 9 parties de dH₂O. Mélanger.

Solution tampon 0,5x SCC (lavage de stringence)

Ajouter 1 partie de solution tampon 2x SSC à 3 parties de dH₂O. Mélanger. Ou ajouter 1 partie de solution tampon 20x SSC à 39 parties de dH₂O. Mélanger.

C. PROTOCOLE CISH™ STANDARD POUR LES ÉCHANTILLONS DE TISSU FFPE

Tous les réactifs à l'exception du sonde doivent être amenés à température ambiante (TA) (20 à 25 °C) avant d'être utilisés. La sonde peut être utilisée à froid et sans être amenée à température ambiante. Chaque incubation doit être effectuée à TA (20 à 25 °C) sauf indication contraire.

Tout au long de cette procédure, sauf indication contraire, il est important que la section de tissu ne se dessèche pas.

1. Prétraitement (Pour les sections de tissu FFPE uniquement)

a) Déparaffinage :

Submerger dans du xylène.

2 fois, 5 min chacun

Tremper dans de l'EtOH à 100 %.

3 fois, 3 min chacun

Laver dans du dH₂O.

3 fois, 2 min chacun

(Si la prochaine étape ne peut être entamée immédiatement, sécher les lames à l'air après les avoir trempées trois fois dans de l'EtOH à 100 % au lieu de les laver trois fois dans du dH₂O.)

b) Prétraitement à la chaleur (L'étape la plus importante pour une performance CISH™ réussie) :

Les lames/échantillons doivent être bouillis ou chauffés à plus de 98 °C pendant 15 min dans une solution CISH™ de prétraitement des tissus à la chaleur. Nous recommandons l'utilisation d'une plaque chauffante pour cette étape. (Pour les protocoles qui utilisent un équipement différent, veuillez contacter le Service technique de Invitrogen à l'adresse électronique suivante : tech_support@invitrogen.com.)

i. Placer les lames sur le porte-lames.

ii. Chauffer la solution de prétraitement à la chaleur dans un vase à bec sur une plaque chauffante jusqu'à ébullition et à ≥ 98 °C. Pour empêcher l'évaporation de la solution tampon, le vase à bec doit être couvert d'un couvercle en verre ou de papier d'aluminium.

iii. Placer les lames dans la solution en ébullition, couvrir le vase à bec et faire bouillir pendant 15 min.

iv. Transférer immédiatement les lames dans du dH₂O à TA (20 à 25 °C) et laver trois fois, 2 min chacun.

c) Digestion enzymatique (Une étape essentielle pour une performance CISH™ réussie) :

Pour la plupart des tissus du sein, une digestion enzymatique de 10 min à température ambiante donnera les meilleurs résultats CISH (ajouter de la pepsine à TA sur la section de tissu). Différents temps d'incubation de l'enzyme (5 à 15 min) seront peut-être nécessaires en fonction du type de tissu et de la méthode de fixation utilisés.

i. Équilibrer le réactif de prétraitement enzymatique à TA (20 à 25 °C).

ii. Ajouter une quantité suffisante de réactif F pour recouvrir la section de tissu et incubé pendant 10 min à TA.

iii. Laver trois fois dans du dH₂O, 2 min chacun.

d) Déshydratation dans une série d'éthanol classés :

EtOH à 70 %

2 min

EtOH à 85 %

2 min

EtOH à 95 %

2 min

EtOH à 100 %

2 min

EtOH à 100 %

2 min

e) Sécher les lames à l'air.

≥ 20 min

f) Marquer les lames à l'aide d'un crayon.

2. Dénaturation et hybridation

(Utiliser soit une machine ACP avec bloc à lames, SOIT un bloc chauffant à affichage de température numérique et chambre d'humidification pour lames avec un incubateur à 37 °C)

a) Ajouter 15 µl de sonde au centre de la lamelle couvre-objet. (Selon la taille du tissu, il sera peut-être nécessaire d'utiliser plus ou moins de sonde.)

b) Placer la lamelle couvre-objet, côté sonde vers le bas, sur la partie appropriée de l'échantillon tissulaire sur la lame.

c) Sceller la lamelle couvre-objet pour empêcher une évaporation pendant l'incubation.

• Utiliser une seringue de 5 ml contenant de la colle de caoutchouc et munie d'une aiguille 18G ½", appliquer avec soin une fine couche de colle de caoutchouc sur les bords de la lamelle couvre-objet, en débordant légèrement sur la

www.invitrogen.com

Invitrogen Corporation • 542 Flynn Rd • Camarillo • CA 93012 • Tel: 800.955.6288 • E-mail: techsupport@invitrogen.com

lame. Laisser sécher la colle de caoutchouc (~10 min) afin d'empêcher que la lamelle couvre-objet ne glisse de la lame. **OU**

- Utiliser les lamelles UnderCover™ de Zymed en retirant le ruban adhésif/lamelle du fond en papier et en le collant sur la partie appropriée de la lame, couvrant l'échantillon tissulaire. Appuyer sur les bords du ruban adhésif pour sceller. (Lorsque les lamelles UnderCover™ de Zymed sont utilisées, NE PAS APPUYER SUR LE CENTRE DE LA LAMELLE COUVRE-OBJET.)
- d) Dénaturer la sonde en incubant les lames entre 94 et 95 °C pendant 5 min. (Pour ce faire, placer les lames dans le bloc à lames d'une machine ACP réglée sur 94 à 95 °C, ou sur un bloc chauffant à affichage de température numérique à 94 à 95 °C et incubé pendant 5 min.)
- e) Placer les lames dans le bloc à lames d'une machine ACP réglée sur 37 °C et incubé pendant > 10 heures (jusqu'au lendemain). **OU**
Placer les lames dans une chambre d'humidification réglée sur 37 °C pendant > 10 heures (jusqu'au lendemain).

3. Lavage rigoureux :

- a) Préparer deux jarres de Coplin contenant une solution tampon SSC, l'une à température ambiante (TA), l'autre chauffée à 75 °C. (Augmenter la température de 1 °C par lame lorsqu'il y a plus de 2 lames, **sans toutefois dépasser 80 °C.**)
- b) Après l'hybridation, retirer avec soin la colle de caoutchouc. Retirer la lamelle couvre-objet. (Si une lame UnderCover™ de Invitrogen est utilisée, retirer tout simplement le ruban adhésif au dos de la lame pour ôter la lamelle couvre-objet.) Ne pas laisser la section de tissu se dessécher.
- c) Rincer brièvement les lames dans la jarre contenant le SSC à TA, ensuite submerger les lames pendant 5 min dans la jarre contenant le SSC à 75 °C.
- d) Laver les lames dans du dH₂O. 3 fois, 2 min chacun

4. Procédure d'immunodétection :

- a) Submerger les lames dans du H₂O₂ à 3 % dans du méthanol absolu. 10 min
- b) Laver dans du PBS/Tween 20 (0,025 %). 3 fois, 2 min chacun
- c) Ajouter du CAS-Block™ (réactif A) : 2 à 3 gouttes/lame à TA. Tremper. 10 min
- d) Éponger le réactif bloquant. NE PAS RINCER.
- e) Ajouter l'anticorps anti-dig de souris (réactif B) : 2 à 3 gouttes/lame à TA. Tremper. 30 min
- f) Laver dans du PBS/Tween 20 (0,025 %). 3 fois, 2 min chacun
- g) Ajouter l'anticorps HRP anti-souris polymérisé (réactif C) : 2 à 3 gouttes/lame à TA. 30 min
- h) Laver dans du PBS/Tween 20 (0,025 %). 3 fois, 2 min chacun
- i) Pendant le lavage, préparer le DAB en ajoutant une goutte de chacun des réactifs (D1 à D3) à 1 ml de dH₂O.
- j) Ajouter la solution de substrat-chromogène (DAB) : 2 à 3 gouttes/lame. Tremper. 30 min
- k) Placer les lames dans le porte-lames.
- l) Laver sous l'eau du robinet. 2 min

5. Coloration de contraste et usage des lamelles couvre-objet

- a) Contre-colorer avec de l'hématoxyline. 6 sec à 1 min
Le temps de coloration de contraste est fonction des tissus utilisés.
Une coloration de contraste foncée n'est pas recommandée car elle risque d'obscurcir les signaux de coloration positifs.
- b) Laver sous l'eau du robinet. 2 min
- c) Déshydrater dans une série d'EtOH classé. 2 min chaque classe
(70 %, 85 %, 95 %, 100 %, 100 %)
- d) Submerger dans du xylène. 2 fois, 2 min chacun
- e) Couvrir d'une lamelle couvre-objet en utilisant une solution de fixation Histomount™ (réactif E).

6. Microscopie à fond clair

Examiner simultanément les résultats de l'hybridation et la morphologie des tissus à l'aide d'un microscope à fond clair et d'un objectif sec 40x.

D. ÉCHANTILLON DE CELLULE OU ÉCHANTILLON DE CHROMOSOME EN METAPHASE

1. Attacher l'échantillon à une lame traitée à l'HistoGrip™ ou à une lame en verre enduite de Superfrost/Plus.
2. Prétraitement
 1. Plonger les lames dans 2x SSC à 37 °C pendant 60 minutes.
 2. (Facultatif) Prétraiter les cellules avec un réactif de prétraitement de cellules SPOT-Light® pendant 5 minutes à 37 °C (Remarque : la durée de l'incubation [2 à 10 minutes] dépend du type de cellule et des conditions de préparation des lames. Une digestion enzymatique excessive entraînera une perte de noyaux et de la structure chromosomique alors qu'une digestion inadéquate entraînera une perte du signal.)
 3. Laver les lames dans un soluté tampon de phosphate pendant 3 x 1 minute à température ambiante (TA)

www.invitrogen.com

Invitrogen Corporation • 542 Flynn Rd • Camarillo • CA 93012 • Tel: 800.955.6288 • E-mail: techsupport@invitrogen.com

4. (Facultatif) Plonger les lames dans du formol tamponné à 10 % pendant 1 minute à TA
5. Laver les lames dans un soluté tampon de phosphate pendant 3 x 1 minute à TA.
6. Déshydrater les lames dans de l'éthanol à 70 %, 85 %, 95 % et 100 % pendant 2 minutes chacune et les sécher ensuite à l'air.

Les lames sont prêtes pour la procédure ISH (ou, elles peuvent être conservées dans de l'éthanol à 70 % à -20 °C). Passer à la dénaturation de l'échantillon.

3. Dénaturation et hybridation

1. Ajouter 15 µL de sonde au centre de l'échantillon et couvrir avec une lamelle couvre-objet de 22 x 22 mm. (Utiliser plus de sonde pour un échantillon plus grand et une lamelle couvre-objet plus grande)
2. Sceller les bords de la lamelle couvre-objet avec une fine couche de colle de caoutchouc afin d'empêcher toute évaporation de la solution de sonde pendant l'incubation.
3. Dénaturer les lames sur une plaque chauffante ou un chauffe-lames à 80 °C pendant 3 minutes (entre 2 et 5 minutes), ou dans le bloc à lames d'un cycleur thermique PCR.
4. Placer la lame dans une boîte d'humidification sombre ou dans le bloc à lames d'un cycleur thermique PCR pendant 16 à 24 heures à 37 °C.

4. Lavage de rigueur

1. Retirer la colle caoutchouc et la lamelle couvre-objet.
2. Plonger les lames dans la solution tampon 0,5x SCC, en utilisant une cuve à rainure, pendant 5 minutes à 72 °C. (Remarque : cette température est basée sur une lame, mais chaque lame entraînera une chute de température de la solution de 1 °C. S'il y a plus d'une lame, régler la température du bain d'eau en conséquence. Par exemple, s'il y a 4 lames, régler la température du bain d'eau à 75 °C. Ne pas aller au-delà de 80 °C).
3. Laver les lames dans un tampon PBS/Tween 20 pendant 3 x 2 minutes à TA.

Passer au blocage et au refroidissement

E. INTERPRETATION DES RESULTATS DU CISH™

1. Signaux CISH™

Dans le CISH™, un gène cyclin D1 individuel apparaît comme un seul petit point.

Tableau 1 : visualisation du signal

Grossissement	Signal CISH
10x	Les signaux individuels sont à peine visibles et il est facile de les ignorer.
20x	Les signaux individuels sont petits mais sont bien perceptibles.
40x	Les signaux individuels sont faciles à identifier.
60x ou 100x	N'est pas nécessaire.

2. Témoin positif

S'il est utilisé, le témoin tissulaire positif, un tissu dont on sait qu'il contient une amplification du gène cyclin D1 devrait d'abord être examiné afin de vérifier que tous les réactifs fonctionnent de façon appropriée. La présence de groupes de gènes ou ≥ 6 signaux individuels au sein du noyau d'une seule cellule indique qu'une réactivité positive est probable. Si le témoin positif ne manifeste pas la présence de groupes ou ≥ 6 signaux par noyau, les résultats obtenus pour ces échantillons devraient être considérés comme erronés.

En général, la présence de deux copies de gènes maximum dans le noyau de la contrepartie du tissu sain du témoin tissulaire positif confirme que la sonde et les réactifs d'immunodétection n'ont pas de réaction croisée avec les composants cellulaires ou tissulaires. Si une coloration non-spécifique a lieu dans la contrepartie du tissu sain du témoin tissulaire positif, les résultats obtenus pour les échantillons doivent être considérés comme étant erronés.

En général, si une coloration non-spécifique a lieu, elle manifeste une apparence de coloration diffuse. Parfois une coloration sporadique à l'extérieur du noyau sera remarquée dans des sections de tissu fixées dans du formol de façon excessive. Ne pas confondre une coloration non-spécifique avec des signaux CISH™ positifs.

3. Évaluation de l'état du gène Cyclin D1 par CISH

Table 2: Évaluation de l'état du gène cyclin D1 par CISH

Amplification	> 10 copies, ou grands groupes, du gène cyclin D1 présents par noyau dans > 50 % des cellules cancéreuses.
Amplification faible	6 à 10 copies du gène cyclin D1, ou un petit groupe de gènes cyclin D1, présents par noyau dans > 50 % des cellules cancéreuses.
Aucune amplification	1 à 5 copies du gène cyclin D1 présentes par noyau dans > 50 % des cellules cancéreuses. La présence de 3 à 5 copies du gène par noyau peut être le résultat d'une polysomie du chromosome.

www.invitrogen.com

Invitrogen Corporation • 542 Flynn Rd • Camarillo • CA 93012 • Tel: 800.955.6288 • E-mail: techsupport@invitrogen.com

Nombre normal de copies de gènes cyclin D1 (diploïde) :

Normalement les cellules diploïdes ont deux gènes cyclin D1. Un petit pourcentage de cellules normales peuvent afficher des signaux chromosomiques supplémentaires dus à la mitose ou des signaux chromosomiques prévus peuvent leur manquer (particulièrement dans les sections de tissu incorporées dans de la paraffine).

Cellules au cyclin D1 aneuploïdes : Les cellules aneuploïdes présentent soit plus soit moins de deux signaux de cyclin D1.

Cellules au n-myc amplifié : Les cellules ayant un cyclin D1 amplifié peuvent avoir entre 6 copies du gène et des douzaines de copies du gène. Des niveaux intermédiaires d'amplification, soit entre 3 et 5 copies du cyclin D1, peuvent provenir d'une polyploïdisation cellulaire plutôt que d'une amplification ciblée de n-myc. La présence d'un ou de plusieurs amplicons est clairement l'indication d'une amplification du gène.

VII. CONTRÔLE DE LA QUALITÉ

Les différences dans le traitement du tissu ou les procédures techniques effectuées dans le laboratoire de l'utilisateur peuvent entraîner des résultats très variés, nécessitant dès lors des contrôles internes en plus des procédures suivantes.

La couleur et la nature du signal positif seront fonction de la méthode de détection utilisée. Se reporter à la notice de conditionnement du kit de détection pour une description du signal positif prévu.

Témoin tissulaire positif (amplification) : les matériaux de témoins tissulaires externes positifs doivent être prélevés de spécimens d'autopsie/de biopsie/de chirurgie frais ayant été fixés, traités et enrobés de la même façon que l'échantillon. Les spécimens tissulaires qui sont traités d'une façon différente de l'échantillon prouvent le bien fondé de la performance du réactif uniquement et ne vérifient pas les techniques de préparation du tissu. Des témoins tissulaires positifs indiquent que les tissus ont été préparés de façon adéquate et que les techniques de coloration étaient appropriées. Un témoin tissulaire positif pour chaque ensemble de conditions d'essai doit faire partie de chaque analyse.

Les tissus utilisés pour les matériaux de témoin positif doivent être sélectionnés de spécimens ayant des niveaux bien caractérisés d'amplification du gène cyclin D1. Environ 25 % du neuroblastome comprend une amplification du gène n-myc¹; ceci peut être une source utile de tissu témoin positif.

Les témoins tissulaires positifs connus doivent uniquement être utilisés pour contrôler la bonne performance des tissus traités et des réactifs d'essai, et non pour aider à interpréter les résultats des échantillons. Si les témoins tissulaires positifs ne manifestent pas de coloration positive, les résultats obtenus pour les échantillons doivent être considérés comme étant erronés.

VIII. CONSEILS DE PROCÉDURE ET DE DÉPANNAGE

1. Tout au long de cette procédure, sauf indication contraire, il est important que la section de tissu ne se dessèche pas.
2. **Prétraitement à la chaleur (L'étape la plus importante pour une performance CISH™ réussie) :**
Le spécimen doit être bouilli ou chauffé à plus de 98 °C pendant 15 min dans une solution de prétraitement à la chaleur. Voir page 18.
3. **Digestion enzymatique (Une étape importante pour une performance CISH™ réussie) :** des temps d'incubation différents (5 à 15 min) seront peut-être nécessaires en fonction du type de tissu et de la méthode de fixation. **Pour la plupart des tissus du sein, une digestion enzymatique de 10 min à température ambiante (TA) donnera les meilleurs résultats du CISH™. Ne pas oublier de préchauffer le réactif de prétraitement enzymatique (réactif F) à TA avant d'ajouter la section de tissu.** Le prétraitement enzymatique du spécimen doit être évalué dès que le protocole du CISH™ est terminé. Si les noyaux ne manifestent pas de coloration de contraste et qu'il n'y a pas de signal CISH™ ou que ce dernier est très faible, c'est peut-être dû à une perte nucléaire suite à une digestion excessive. Si les noyaux manifestent une forte coloration de contraste mais qu'il n'y a pas de signal CISH™ dans les noyaux, c'est peut-être dû à une sous digestion lors du prétraitement à la pepsine. Une alternative serait d'effectuer le prétraitement enzymatique à 37 °C pendant 3 minutes si des résultats optimaux n'ont pas été obtenus.
4. Une dénaturation de la sonde à une température inférieure à celle que recommande le protocole risque d'avoir pour résultat un signal CISH™ faible ou absent.
5. Une hybridation effectuée pendant des périodes plus courtes que celles recommandées par le protocole ou des lavages rigoureux effectués à des températures supérieures à celles recommandées risquent d'entraîner une réduction ou une perte totale du signal CISH™.
6. Veuillez contacter votre distributeur local ou Invitrogen Laboratories, Inc. à tech_support@invitrogen.com ou au +1-800-955-6288 pour toute aide technique ou des documents sur nos produits.

www.invitrogen.com

Invitrogen Corporation • 542 Flynn Rd • Camarillo • CA 93012 • Tel: 800.955.6288 • E-mail: techsupport@invitrogen.com

PIN 31306

(Rev 08/08) DCC-08-1089

© 2007 Invitrogen Corporation. All right reserved. These products may be covered by one or more Limited Use Label Licenses (see the Invitrogen Catalog or www.invitrogen.com). By use of these products you accept the terms and conditions of all applicable Limited Use Label Licenses.

IX. SÛRETÉ ET PRÉCAUTIONS

1. Faire très attention lors de la manipulation des réactifs. Porter des gants, un tablier et des lunettes de protection jetables lors de la manipulation de cancérogènes présumés.
2. Ne pas utiliser ce produit au-delà de sa date de péremption.
3. La 3,3'-tétrachlorure diaminobenzidine (DAB) peut être nocive si elle est avalée, inhalée ou absorbée par la peau, elle peut également irriter les yeux, la peau, les muqueuses et les voies respiratoires supérieures. Le DAB est un cancérogène présumé ; consulter les règles fédérales, d'État et/ou locales pour des recommandations sur la façon d'en disposer.
4. L'azoture de sodium à 0,1 % (NaN₃) utilisé comme agent conservateur dans ce kit est toxique en cas d'ingestion. L'azoture de sodium peut réagir avec les canalisations en plomb et en cuivre et former des azotures métalliques très explosives. Afin d'empêcher une accumulation d'azoture dans les tuyauteries, nettoyer à grande eau pendant l'évacuation.
5. Éviter tout contact avec les yeux et les muqueuses. En cas contact du réactif avec des zones sensibles, laver à grande eau.
6. Ce produit ne satisfait pas aux critères de l'Administration responsable de la sécurité et la salubrité du travail (Occupational Safety & Health Administration, OSHA) des substances dangereuses, par conséquent, une fiche signalétique n'est pas requise.
7. Veuillez consulter la réglementation locale portant sur l'élimination des composants potentiellement toxiques.
8. Les échantillons et tous les matériaux avec lesquels ils entrent en contact doivent être manipulés comme étant susceptibles de transmettre une infection et doivent être éliminés en prenant les précautions nécessaires. Ne jamais remplir une pipette oralement. Éviter tout contact de la sonde et des échantillons de tissu avec la peau et les muqueuses.
9. Minimiser la contamination microbienne afin d'éviter les colorations non spécifiques.
10. Des temps d'incubation, concentrations ou températures autres que ceux spécifiés risquent d'entraîner des résultats erronés. L'utilisateur doit valider de telles modifications.

X. LIMITATIONS

1. CISH™ est une procédure à étapes multiples pour laquelle une formation spécialisée dans le domaine de la sélection des réactifs appropriés, de la sélection, la fixation et le traitement des tissus, de la préparation de la lame CISH™ et de l'interprétation des résultats de coloration est nécessaire.
2. Les tissus et la coloration cellulaire dépendent de la manipulation et du traitement de l'échantillon tissulaire précédant la coloration. Une mauvaise fixation, congélation, décongélation, un mauvais lavage, séchage, chauffage, sectionnement ou une contamination avec d'autres tissus ou liquides risquent d'entraîner des artéfacts ou de faux résultats positifs ou négatifs. Des résultats non homogènes peuvent être dus à une modification de la méthode de fixation ou de l'enrobage ou à des irrégularités propres à l'échantillon tissulaire.
3. Une coloration de contraste excessive ou incomplète risque de compromettre une interprétation exacte des résultats.
4. Toute modification apportée aux procédures d'essai risque de rendre les résultats prévus non valides. Des témoins appropriés doivent être employés et documentés. Tout utilisateur qui s'écarte des procédures d'essai recommandées doit se porter responsable de l'interprétation des résultats dans ces conditions.
5. Les réactifs peuvent manifester des réactions inattendues dans des tissus qui n'ont pas été testés auparavant. L'éventualité de réactions inattendues, même dans des groupes de tissu testés, ne peut être éliminée dans sa totalité vu la variabilité biologique des tissus.
6. De faux résultats positifs peuvent être le résultat d'une fixation non immunologique de protéines de détection ou produits de réaction substrats. Ils peuvent également être dus à une activité pseudoperoxydase (erythrocytes) ou une activité peroxydase endogène (cytochrome c).

MARQUES DE COMMERCE

CISH™, Clearmount™, HistoGrip™, Histomount™, SP●T-Light®, SPT™, et Zymed® sont des marques de commerce de Zymed Laboratories, Inc. SPT™ est une technologie brevetée de Zymed. CISH™ est une technologie en instance de brevet.

Représentant Autorisé pour IVDD 98/79/EC: Invitrogen Ltd.
Inchinnan Business Park
3 Fountain Drive
Paisley
PA4 9RF
UK

www.invitrogen.com

Invitrogen Corporation • 542 Flynn Rd • Camarillo • CA 93012 • Tel: 800.955.6288 • E-mail: techsupport@invitrogen.com

PIN 31306

(Rev 08/08) DCC-08-1089

© 2007 Invitrogen Corporation. All right reserved. These products may be covered by one or more Limited Use Label Licenses (see the Invitrogen Catalog or www.invitrogen.com). By use of these products you accept the terms and conditions of all applicable Limited Use Label Licenses.

Sonda per Cyclin D1 SP●T-Light® (84-1900)

I. SCOPO D'UTILIZZO

Per uso diagnostico in vitro

La Sonda per Cyclin D1 SP●T-Light® di Invitrogen è previsto per la rilevazione dell'amplificazione del gene cyclin D1 in sezioni tissutali fissate in formalina ed incluse in paraffina (formalin-fixed paraffin embedded tis-sue, FFPE) mediante ibridizzazione cromogenica in situ (Chromogenic *In Situ* Hybridization, CISH™). L'inter-pretazione deve essere effettuata da un patologo qualificato entro il contesto dell'anamnesi clinica del paziente.

II. SUNTO E SPIEGAZIONE

Subtraction Probe Technology (SPT™)

La SPT™ di Invitrogen è una tecnologia brevettata di proprietà esclusiva di Invitrogen per la creazione di sonde specifiche mediante l'eliminazione delle sequenze ridondanti (ad es. elementi Alu e LINE) rinvenibili negli acidi nucleici umani. Conseguentemente, le sonde create con la SPT™ di Invitrogen sono innatamente specifiche e non richiedono pertanto il blocco delle sequenze ridondanti richiesto invece dalle tradizionali sonde DNA citogeniche. La tecnologia SPT™ di Invitrogen consente di valutare eventuali aberrazioni genetiche mediante rilevazione cromogenica.

Descrizione e specifiche tecniche della Sonda DNA

La sonda SP●T-Light® Cyclin D1 di Invitrogen è una sonda DNA a duplice filamento marcata con digossigenina. È fornita in forma liquida in una soluzione tamponata per l'ibridizzazione. Si è dimostrato che questa sonda si lega specificatamente al locus del gene cyclin D1 nella banda cromosomica 11p13. Le sequenze ridondanti degli acidi nucleici sono state quantitativamente eliminate dalla sonda mediante la tecnologia SPT™.

Principio della procedura CISH™ (Chromogenic In Situ hybridization)

L'ibridizzazione cromogenica in situ (Chromogenic *In situ* hybridization, CISH™) consente la rilevazione di amplificazione genetica, traslocazioni cromosomiche e numero di cromosomi per mezzo dell'analisi convenzionale con microscopio a campo chiaro delle reazioni perossidasiche nei tessuti fissati in formalina ed inclusi in paraffina (FFPE) (con uno spessore di 4-5 µm). L'essenza della CISH™ consiste nella capacità da parte delle sonde marcate con acido nucleico di ibridizzarsi (legarsi), *in situ*, con sezioni specifiche dell'acido nucleico complementare contenuto nel campione. I risultati dell'ibridizzazione della sonda possono poi essere visualizzati entro il contesto morfologico del tessuto circostante. Pertanto, i patologi possono contemporaneamente osservare sia la morfologia dei tessuti che le aberrazioni genetiche.

I risultati della colorazione CISH™ possono essere visualizzati chiaramente usando un microscopio standard a campo chiaro ed una lente asciutta 40x. Giacché il segnale DAB è permanente, i risultati possono essere conservati per periodi di tempo estesi, consentendo quindi la creazione di una documentazione permanente delle prove condotte. La metodologia di immunorilevazione CISH™ rende l'analisi dei risultati rapida ed agevole. Il vantaggio più importante derivato dalla CISH™ consiste nella facoltà di rilevare eventuali aberrazioni genetiche eseguendo al tempo stesso una verifica istopatologica.

I tumori che presentano una amplificazione del gene cyclin D1 di norma si presentano sotto forma di grandi cluster di copie del gene intranucleare positivi alla perossidasi, numerosi piccoli segnali singoli positivi alla perossidasi o come combinazione di cluster e copie genetiche singole. I tumori che presentano una bassa amplificazione del gene cyclin D1 mostrano tipicamente un numero di copie cellulari per nucleo compreso tra 6 e fino alle dozzine. I tumori con uno stato del gene cyclin D1 normale presentano solitamente 1 o 2 puntini per nucleo, mentre i tumori caratterizzati da polisomia del cromosoma presentano da 3 a 5 copie del gene cyclin D1 per nucleo.

III. REAGENTI ACCLUSI

- Sonda SP●T-Light® per la rilevazione di Cyclin D1 marcata con 0,4 ml di digossigenina

IV. REAGENTI/MATERIALI E APPARECCHIATURE OCCORRENTI MA NON ACCLUSI

Reagenti/Materiali accessori

	N. Cat. Invitrogen
1. Kit di rilevazione del polimere CISH SP●T-Light®	84-9246
2. Kit per il trattamento preliminare dei tessuti SP●T-Light® FFPE	00-8401
3. Reagente per il trattamento preliminare delle cellule SP●T-Light®	00-8402
4. Tampone di SSC (20X)	00-8400
5. Vetrini SuperFrost Plus OPPURE Adesivo per vetrini HistoGrip™	00-8050
6. [Facoltativo] Controllo tissutale positivo: sezione tissutale FFPE con amplificazione del gene cyclin D1	
7. [Facoltativo] Controllo tissutale negativo: sezione tissutale FFPE senza amplificazione del gene cyclinD1	
8. Acqua deionizzata o distillata (dH ₂ O)	
9. Xilene	
10. Etanolo al 70%, 85%, 95% e 100% (EtOH)	
11. Coprivetrini, mastice, ago 18G da 12,7 mm e siringa da 5 ml OPPURE	
12. [Facoltativo] Coprivetrini UnderCover™ (18 x 18 mm)	00-8403
13. [Facoltativo] Coprivetrini UnderCover™ (22 x 22 mm)	00-8403
14. Perossido di idrogeno al 30% (H ₂ O ₂)	
15. Metanolo al 100%	
16. Tween 20 al 50%	00-3005
17. Ematossilina di Mayer	00-8011

Apparecchiature

1. Temporizzatore
2. Pipetta (p20, p1000)
3. Punte per pipetta
4. Portavetrini
5. Piastra riscaldante, carta stagnola e becher da 1 litro
6. Scaldavetrini
7. Incubatore da 37°C
8. Blocco riscaldante con visualizzatore della temperatura digitale e scatola di controllo dell'umidità oscura **OPPURE** Ciclatore termico PCR con blocco per vetrini
9. Bagnomaria (in grado di preservare una temperatura compresa tra 75 - 80°C)
10. Vaschette di Coplin e vaschette per la colorazione
11. Microscopio a campo chiaro

V. CONSERVAZIONE

Conservare la Sonda SP●T-Light® Cyclin D1 a -20°C

Pregasi notare che ad una temperatura di -20°C, la Sonda SP●T-Light® Cyclin D1 non si congela poiché rimane allo stato acquoso, avviando pertanto ad eventuali problemi annessi al congelamento/ scongelamento. Non usare il kit dopo la data di scadenza riportata sull'etichetta. Qualsiasi altra condizione di conservazione che si discosti da quelle specificate nel foglietto illustrativo accluso alla confezione deve essere convalidata dall'utente.

VI. ISTRUZIONI PER L'USO

A. PREPARAZIONE DEI PROVINI

Sezioni tissutali incluse in paraffina:

i. I tessuti fissati in formalina tamponata neutra per 12-24 ore prima dell'inclusione in paraffina risultano idonei all'uso. Le sezioni tissutali (con uno spessore di 4-5 µm) devono essere fissate su vetrini da microscopio trattati con HistoGrip™ o su vetrini da microscopio Superfrost/Plus.

ii. Lasciare asciugare i vetrini spontaneamente o asciugarli a 37°C, quindi seccarli in stufa per 2-4 ore a 60°C.

B. PREPARAZIONE DEI REAGENTI

Soluzione fisiologica tamponata a base di fosfato (Phosphate Buffered Saline, PBS)

Aggiungere una compressa di polvere di PBS (Reagente E) in 1 l di dH₂O. Miscelare.

Tampone di PBS/Tween 20 (allo 0.025%)

Aggiungere 1 parte di Tween 20 al 50% per ogni 1999 parti di PBS. Miscelare.

Soluzione cromogenica di substrato (DAB)

Per preparare la DAB, aggiungere 1 goccia di ciascun reagente (D1, D2, D3) per ogni ml di dH₂O. Miscelare accuratamente.

Questa soluzione deve essere preparata immediatamente prima dell'uso.

Serie di alcoli

Preparare dell'etanolo al 70%, 85%, 95% e 100%

H₂O₂ al 3% in Metanolo assoluto

www.invitrogen.com

Invitrogen Corporation • 542 Flynn Rd • Camarillo • CA 93012 • Tel: 800.955.6288 • E-mail: techsupport@invitrogen.com

Aggiungere 1 parte di H₂O₂ al 30% per ogni 9 parti di Metanolo.

Tampone SSC 2x

Aggiungere una parte di tampone SSC 20x per ogni 9 parti di dH₂O. Miscelare.

Tampone SCC 0.5x (lavaggio di astringenza)

Aggiungere una parte di tampone SSC 2x per ogni 3 parti di dH₂O. Miscelare. Aggiungere una parte di tampone SSC 20x per ogni 39 parti di dH₂O. Miscelare.

C. PROTOCOLLO CISH™ STANDARD PER CAMPIONI DI TESSUTI FFPE

Tutti i reagenti, ad eccezione del Sonda, dovrebbero essere equilibrati a temperatura ambiente (TA) (20-25°C) prima dell'uso. La sonda per la rilevazione può essere utilizzata a freddo senza equilibratura a temperatura ambiente. Salvo indicazione contraria, tutte le procedure d'incubazione dovrebbero essere eseguite a temperatura ambiente (20-25°C).

Salvo indicazione contraria, è importante prevenire l'essiccamento della sezione tissutale nel corso dell'intera procedura.

1. Pretrattamento (solo per le sezioni tissutali fissate in formalina ed incluse in paraffina)

a) Deparaffinizzazione:

Immergere in xilene.	2 volte, 5 min. a volta
Saturare in EtOH al 100%.	3 volte, 3 min. a volta
Lavare in dH ₂ O.	3 volte, 2 min. a volta

(Se la fase successiva non può essere eseguita immediatamente, lasciare asciugare spontaneamente i vetrini dopo averli saturati in EtOH al 100% per tre volte anziché lavarli in dH₂O per tre volte).

b) Pretrattamento termico (trattasi della fase più importante ai fini di una performance soddisfacente della CISH™):

I vetrini/ provini devono essere bolliti o scaldati ad una temperatura superiore ai 98°C per 15 min. nella Soluzione per il pretrattamento termico del tessuto CISH™. Per l'esecuzione della fase in oggetto, si raccomanda l'uso di una piastra riscaldante. (Per i protocolli che prevedono l'uso di altre apparecchiature, pregasi rivolgersi al Reparto di assistenza tecnica Invitrogen all'indirizzo tech_support@invitrogen.com).

- i. Inserire i vetrini nel portavetrini.
- ii. Riscaldare la Soluzione per il pretrattamento termico dei tessuti in un becher su una piastra riscaldante fino a bollitura costante e a = 98°C. Onde prevenire l'evaporazione della soluzione tamponata, il becher dovrebbe essere coperto con un coperchio di vetro o con carta stagnola.
- iii. Immergere i vetrini nella soluzione in ebollizione, coprire il becher e bollire per 15 minuti.
- iv. Trasferire immediatamente i vetrini in dH₂O a temperatura ambiente (20-25°C) e lavare tre volte, 2 min. a volta

c) Digestione enzimatica (una fase importante ai fini di una performance soddisfacente della CISH™):

Per la maggior parte dei tessuti mammari, una digestione enzimatica da 10 minuti a temperatura ambiente produce i migliori risultati di ibridizzazione cromogenica in situ (aggiungere della pepsina a temperatura ambiente sulla sezione tissutale). Il tempo di incubazione (5-15 min.) enzimatica necessario potrebbe variare a seconda del tipo di tessuto e del metodo di fissaggio impiegati.

- i. Equilibrare il Reagente per il pretrattamento enzimatico a temperatura ambiente (20-25°C).
- ii. Aggiungere un quantitativo di Reagente F sufficiente a ricoprire la sezione tissutale e quindi incubare per 10 min. a temperatura ambiente.
- iii. Lavare in dH₂O tre volte, 2 min. a volta

d) Disidratazione in serie graduata di alcoli:

EtOH al 70%	2 min.
EtOH all'85%	2 min.
EtOH al 95%	2 min.
EtOH al 100%	2 min.
EtOH al 100%	2 min.

- e) Lasciare asciugare i vetrini spontaneamente . ≥ 20 min.
- f) Etichettare i vetrini con una matita.

2. Denaturazione e ibridizzazione

(Usare un ciclatore termico PCR con blocco per vetrini OPPURE un blocco riscaldante con visualizzatore della temperatura digitale e scatola di controllo dell'umidità oscura con incubatore da 37°C)

www.invitrogen.com

Invitrogen Corporation • 542 Flynn Rd • Camarillo • CA 93012 • Tel: 800.955.6288 • E-mail: techsupport@invitrogen.com

- a) Aggiungere 15 µl di sonda nel centro del coprivetrino. (Il quantitativo di sonda dipende dalle dimensioni del tessuto).
- b) Porre il coprivetrino, con il lato della sonda rivolto verso il basso, sull'area apposita del campione tissutale sul vetrino.
- c) Sigillare il coprivetrino per prevenire l'evaporazione durante l'incubazione.
 - Usando una siringa da 5 ml con un ago 18G da 12,7 mm contenente mastice applicare, esercitando la debita cautela, uno strato sottile di mastice sulle estremità del coprivetrino, ricoprendo leggermente il vetrino. Lasciare asciugare il mastice (10 min. circa) onde prevenire che il coprivetrino scivoli via dal vetrino. **OPPURE**
 - Usare i coprivetrini UnderCover™ di Invitrogen rimuovendo la pellicola di carta dal nastro adesivo/coprivetrino per poi attaccare quest'ultimo sull'area apposita del vetrino, ricoprendo il campione tissutale. Premere i bordi del nastro per sigillare. (Quando si usano i coprivetrini UnderCover™ di Invitrogen, **NON PREMERE NEL CENTRO DEL COPRIVETRINO**).
- d) Denaturare la sonda incubando i vetrini a 94-95°C per 5 min. (A tal fine, inserire i vetrini nell'apposito blocco di un ciclatore termico PCR impostato ad una temperatura di 94-95°C o appoggiarli su un blocco riscaldante a 94-95°C con visualizzatore della temperatura digitale ed incubare per 5 min.).
- e) Inserire i vetrini nell'apposito blocco di un ciclatore termico PCR impostato su una temperatura di 37°C ed incubare per 10 ore (tutta la notte). **OPPURE**
Inserire i vetrini in una scatola di controllo dell'umidità impostata su una temperatura di 37°C per > 10 ore (tutta la notte).

3. Lavaggio di astringenza:

- a) Preparare due vaschette di Coplin contenenti il Tampone di citrato di sodio salinico, una a temperatura ambiente (TA) e l'altra riscaldata a 75°C. (Alzare la temperatura di 1°C per vetrino se il numero di vetrini è superiore a 2, **ma non eccedere gli 80°C**).
- b) In seguito all'ibridizzazione rimuovere, esercitando la debita cautela, lo strato di mastice. Rimuovere il coprivetrino. (Se si è utilizzato un coprivetrino UnderCover™ di Invitrogen, per rimuovere il coprivetrino staccare semplicemente il nastro adesivo dal vetrino). Non lasciare che la sezione tissutale si secchi.
- c) Risciacquare brevemente i vetrini nella vaschetta contenente il citrato di sodio salinico a temperatura ambiente, quindi immergere i vetrini per 5 min. nella vaschetta contenente il citrato di sodio salinico riscaldato a 75°C.
- d) Lavare i vetrini in dH₂O. 3 volte, 2 min. a volta

4. Procedura per l'immunorilevazione:

- a) Immergere i vetrini in H₂O₂ al 3% in Metanolo assoluto. 10 min.
- b) Lavare in PBS/Tween 20 (allo 0,025%). 3 volte, 2 min. a volta
- c) Aggiungere il CAS-Block™ (Reagente A): 2-3 gocce/vetrino a temperatura ambiente. Saturare. 10 min.
- d) Asciugare il reagente bloccante. **NON RISCACQUARE**.
- e) Aggiungere l'anticorpo anti-Dig di topo (Reagente B): 2-3 gocce/vetrino a temperatura ambiente. Saturare. 30 min.
- f) Lavare in PBS/Tween 20 (allo 0,025%). 3 volte, 2 min. a volta
- g) Aggiungere l'anticorpo anti-topo-HRP polimerizzato (Reagente C): 2-3 gocce/vetrino a temperatura ambiente. 30 min.
- h) Lavare in PBS/Tween 20 (allo 0,025%). 3 volte, 2 min. a volta
- i) Durante il lavaggio, preparare la DAB aggiungendo una goccia di ciascun reagente (D1-D3) per ogni ml di dH₂O.
- j) Aggiungere la Soluzione cromogenica di substrato (DAB): 2-3 gocce/vetrino. Saturare. 30 min.
- k) Inserire i vetrini nel portavetrini.
- l) Lavare con acqua di rubinetto corrente. 2 min.

5. Controcolorazione ed inserimento nel coprivetrino

- a) Controcolorare il tessuto con Ematossilina. 6 sec – 1 min.
Il tempo da osservarsi per la controcolorazione dipende dal tipo di tessuto usato.
La controcolorazione scura è sconsigliata giacché potrebbe oscurare i segnali di colorazione positivi.
- b) Lavare con acqua di rubinetto corrente. 2 min.
- c) Disidratare in una serie graduata di EtOH. (70%, 85%, 95%, 100%, 100%) 2 min. per ciascuna gradazione
- d) Immergere in xilene. 2 volte, 2 min. a volta
- e) Inserire nel coprivetrino, utilizzando la soluzione fissativa HistoMount™ (Reagente E).

6. Microscopia a campo chiaro

Esaminare contemporaneamente i risultati dell'ibridizzazione e la morfologia del tessuto usando un microscopio a campo chiaro ed un obiettivo asciutto 40x.

www.invitrogen.com

Invitrogen Corporation • 542 Flynn Rd • Camarillo • CA 93012 • Tel: 800.955.6288 • E-mail: techsupport@invitrogen.com

D. CAMPIONE CELLULARE O CAMPIONE DI CROMOSOMA DI METAFASE

1. Fissare il campione cellulare su un vetrino trattato con HistoGrip™ o su un vetrino Superfrost/Plus.
2. Trattamento preliminare
 - a) Immergere i vetrini in SSC 2x a 37 °C per 60 minuti.
 - b) (Facoltativo) Pretrattare le cellule con il Reagente per il trattamento preliminare delle cellule SPOT-Light® per 5 minuti a 37 °C (Nota: il tempo di incubazione (2-10 min.) dipende dal tipo di cellula e dalle condizioni di preparazione del vetrino. La digestione enzimatica eccessiva comporta la perdita di nuclei e della struttura cromosomica. Una digestione insufficiente potrebbe causare la perdita del segnale.)
 - c) Lavare in PBS per 3 x 1 minuti a temperatura ambiente (TA).
 - d) (Facoltativo) Immergere i vetrini in formalina tamponata al 10% per 1 minuto a temperatura ambiente
 - e) Lavare in PBS per 3 x 1 minuti a temperatura ambiente.
 - f) Disidratare i vetrini in etanolo al 70%, 85%, 95% e 100% per 2 minuti ciascuno, quindi lasciare asciugare all'aria.

I vetrini sono ora pronti per la procedura di ibridizzazione in situ (quale alternativa, i vetrini possono essere conservati in etanolo al 70% a -20 °C).

3. Denaturazione e ibridizzazione

- a) Aggiungere 15 ml di sonda nel centro del campione ed inserire in un coprivetrino da 22 x 22 mm. (Usare un quantitativo di sonda superiore ed un coprivetrino più grande per campioni di dimensioni maggiori)
- b) Sigillare le estremità del coprivetrino con uno strato sottile di mastice onde prevenire che la soluzione nella sonda evapori durante l'incubazione.
- c) Denaturare i vetrini su una piastra riscaldante o su un riscaldatore per vetrini a 80 °C per 3 minuti (l'intervallo è da 2 a 5 minuti) o inserirli nell'apposito blocco di un ciclatore termico PCR.
- d) Inserire il vetrino in una scatola di controllo dell'umidità oscura o nel blocco vetrini di un ciclatore termico PCR per 16-24 ore a 37 °C.

4. Lavaggio di astringenza

- a) Rimuovere il mastice ed il coprivetrino.
- b) Immergere i vetrini in tampone SSC 0,5x, usando una vaschetta di Coplin, per 5 minuti a 72 °C. (Nota: la temperatura sopraindicata si riferisce ad un singolo vetrino, ma ciascun vetrino aggiuntivo causa un calo di 1 °C della temperatura della soluzione. Pertanto, se si intende utilizzare più di un vetrino, regolare di conseguenza la temperatura del bagnomaria. A titolo esemplificativo, se si lavano 4 vetrini, impostare la temperatura del bagnomaria su 75 °C. Non superare gli 80 °C).
- c) Lavare i vetrini in tampone PBS/Tween 20 per 3 x 2 minuti a temperatura ambiente.

Eseguire le procedure di blocco e quenching

E. INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI DELLA CISH™

1. Segnali CISH™

Nella CISH™ un singolo gene cyclin D1 appare quale piccolo puntino singolo.

Tabella 1: visualizzazione del segnale

ingrandimento	segnale CISH
10x	i singoli segnali sono appena visibili ed è pertanto arduo rilevarli
20x	i singoli segnali sono piccoli ma sono facilmente distinguibili
40x	i singoli segnali sono facilmente identificabili
60x o 100x	non necessario

2. Controllo positivo

In caso di controllo tissutale positivo, in un tessuto in cui sia stata accertata la presenza di amplificazione del gene cyclin D1, se usato, bisognerebbe dapprima effettuare un esame per accertare il debito funzionamento di tutti i reagenti. La presenza di cluster genetici ≥ 6 segnali singoli entro il nucleo di una singola cellula è indicativa della reattività positiva attesa. Se il controllo tissutale positivo non rivela la presenza di cluster o di ≥ 6 segnali per nucleo, i risultati ottenuti per i provini interessati dovrebbero essere ritenuti non validi.

In genere, la presenza di un numero di copie genetiche non superiore a due nei nuclei del duplicato di tessuto normale del controllo tissutale positivo conferma la mancata cross-reazione della sonda e dei reagenti di immunorilevazione con componenti cellulari o tissutali. Qualora si verifici una colorazione aspecifica dei nuclei del duplicato di tessuto normale del controllo tissutale positivo, i risultati ottenuti per i provini dovrebbero essere ritenuti non validi.

Se si dovesse verificare una colorazione aspecifica, essa si manifesta solitamente quale colorazione diffusa. In taluni casi si potrebbe osservare una colorazione sporadica al di fuori dei nuclei in sezioni tissutali con eccessivo fissaggio in formalina. La colorazione aspecifica non deve essere confusa con segnali di CISH™ positivi.

3. Valutazione dello stato del gene cyclin D1 mediante CISH

Table 2: Valutazione dello stato del gene cyclin D1 mediante CISH

Amplificazione	>10 copie, o grandi cluster, del gene cyclin D1 per nucleo in >50% delle cellule cancerose.
Bassa amplificazione	6-10 copie del gene cyclin D1, o un piccolo cluster del gene cyclin D1, per nucleo in >50% delle cellule cancerose.
Nessuna amplificazione	1-5 copie del gene cyclin D1 per nucleo in >50% delle cellule cancerose La presenza di 3-5 copie del gene per nucleo potrebbe essere attribuibile a polisomia del cromosoma.

Numero normale (diploide) di copie del gene cyclin D1:

Le cellule diploidi presentano normalmente due geni cyclin D1. Una percentuale ridotta di cellule normali potrebbe mostrare segnali cromogenici aggiuntivi riconducibili a mitosi o l'assenza dei segnali cromogenici attesi (soprattutto nelle sezioni tissutali incluse in paraffina).

Cellule con cyclin D1 aneuploides:

Le cellule aneuploidi presentano un numero di segnali del cyclin D1 superiore o inferiore a due.

Cellule con cyclin D1 amplificato:

Le cellule che presentano un'amplificazione del gene cyclin D1 potrebbero mostrare un numero di copie del gene da solo 4 a una dozzina. Un livello di amplificazione intermedio, ovvero da 3 a 5 copie del gene cyclin D1, potrebbe essere imputabile a poliploidizzazione piuttosto che all'amplificazione del gene cyclin D1. La presenza di una o più sequenze amplificate è una chiara indicazione di amplificazione genetica.

VII. CONTROLLO DELLA QUALITÀ

Giacché i risultati ottenuti potrebbero variare considerevolmente a seconda delle prassi di preparazione dei tessuti e delle procedure tecniche osservate presso il laboratorio dell'utente, oltre alle procedure riportate qui di seguito è necessario condurre regolarmente controlli interni.

Il colore e la natura del segnale positivo dipende dal metodo di rilevazione utilizzato. Per una descrizione del segnale positivo atteso, pregasi consultare il foglietto illustrativo accluso alla confezione del kit di rilevazione.

Controllo tissutale positivo (Amplificazione): i materiali esterni impiegati per il controllo tissutale positivo dovrebbero essere tratti da provini autoptici/bioptici/chirurgici freschi fissati, preparati ed inclusi osservando gli stessi metodi utilizzati per il campione. I provini tissutali preparati con metodi che si discostano da quelli osservati per il campione possono convalidare esclusivamente la performance dei reagenti senza verificare la correttezza delle tecniche osservate per la preparazione del tessuto. I controlli tissutali positivi sono indicativi della preparazione corretta del tessuto e dell'osservanza delle debite tecniche di colorazione. Un controllo tissutale positivo dovrebbe essere previsto per ciascun set di condizioni di test per ciascuna prova.

I tessuti utilizzati per i materiali del controllo positivo dovrebbero essere selezionati da provini in cui siano stati rilevati dei livelli ben caratterizzati di amplificazione del gene cyclin D1.

I controlli tissutali positivi noti dovrebbero essere utilizzati solo per accertare la debita performance dei tessuti preparati e dei reagenti piuttosto che quale mezzo ausiliare per l'interpretazione degli esiti derivati dal campione. Se i controlli tissutali positivi non mostrano una colorazione positiva, i risultati ottenuti per i provini interessati dovrebbero essere ritenuti non validi.

VIII. RISOLUZIONE DEI PROBLEMI E CONSIGLI PER L'ESECUZIONE DELLE PROCEDURE

1. Salvo indicazione contraria, è importante prevenire l'essiccamento della sezione tissutale nel corso dell'intera procedura.
2. **Pretrattamento termico (trattasi della fase più importante ai fini di una performance soddisfacente della CISH™):** i vetrini/provini devono essere bolliti o scaldati ad una temperatura superiore ai 98°C per 15 min. nella Soluzione per il pretrattamento termico. Pregasi consultare la pagina 26.
3. **Digestione enzimatica (una fase importante ai fini di una performance soddisfacente della CISH™):** il tempo di incubazione (5-15 min.) enzimatica necessario potrebbe variare a seconda del tipo di tessuto e del metodo di fissaggio impiegati. **Per la maggior parte dei tessuti mammari, una digestione enzimatica da 10 minuti a temperatura ambiente consente di conseguire i migliori risultati per CISH™. Accertarsi di preriscaldare il Reagente enzimatico per il pretrattamento (Reagente F) a temperatura ambiente prima di applicarlo sulla sezione tissutale.** Il pretrattamento enzimatico del provino dovrebbe essere valutato immediatamente al completamento del protocollo CISH™. Se i nuclei non sono controcolorati e se il segnale CISH™ è assente o molto debole, ciò potrebbe essere riconducibile ad una perdita di nuclei causata da una digestione eccessiva. Se i nuclei presentano una forte controcolorazione, ma in essi non vi è alcun segnale CISH™, ciò potrebbe essere riconducibile ad una digestione insufficiente durante il trattamento preliminare con la Pepsina. Quale alternativa, se non si conseguono dei risultati ottimali, si può anche usare la digestione a 37°C per 3 minuti.
4. Una denaturazione della sonda ad una temperatura inferiore a quella raccomandata dal protocollo potrebbe causare la perdita o l'indebolimento del segnale della CISH™.

www.invitrogen.com

Invitrogen Corporation • 542 Flynn Rd • Camarillo • CA 93012 • Tel: 800.955.6288 • E-mail: techsupport@invitrogen.com

PIN 31306

(Rev 08/08) DCC-08-1089

© 2007 Invitrogen Corporation. All right reserved. These products may be covered by one or more Limited Use Label Licenses (see the Invitrogen Catalog or www.invitrogen.com). By use of these products you accept the terms and conditions of all applicable Limited Use Label Licenses.

5. L'esecuzione dell'ibridizzazione per un periodo di tempo inferiore a quello raccomandato dal protocollo o l'esecuzione di un lavaggio di astringenza ad una temperatura superiore a quella raccomandata dal protocollo potrebbe causare la perdita o l'indebolimento del segnale della CISH™.
6. Per ricevere ulteriore assistenza tecnica o del materiale informativo sui prodotti, pregasi rivolgersi al proprio distributore di zona o a Invitrogen Laboratories, Inc. inviando un messaggio di posta elettronica all'indirizzo tech_support@invitrogen.com chiamando il numero +1 (800) 955-6288.

IX. SICUREZZA E PRECAUZIONI

1. Esercitare molta cautela durante la manipolazione dei reagenti. Indossare guanti monouso, un camice e occhiali protettivi durante la manipolazione di sostanze di cui si sospetta la cancerogenicità.
2. Non usare il presente prodotto dopo la data di scadenza.
3. Il tetracloruro di diaminobenzidina 3,3 (DAB) potrebbe essere nocivo se ingerito, inalato o assorbito dalla cute e potrebbe causare irritazioni agli occhi, alla cute e alle membrane mucose e delle vie respiratorie superiori. La DAB è una sostanza di cui si sospetta la cancerogenicità; per lo smaltimento pregasi osservare le raccomandazioni sancite dai regolamenti federali, statali e/o locali.
4. L'azoturo di sodio allo 0,1% (NaN₃) usato nel presente kit quale conservante è tossico se ingerito. L'azoturo di sodio potrebbe reagire con il piombo ed il rame delle tubature generando degli azoturi metallici altamente esplosivi. Onde prevenire l'accumulo di azoturi nelle tubature, risciacquare con acqua abbondante durante lo smaltimento.
5. Evitare il contatto del presente reagente con gli occhi o con le membrane mucose. In caso di contatto accidentale del reagente con aree sensibili, risciacquare con acqua abbondante.
6. Il presente prodotto non è conforme ai criteri sanciti dalla OSHA (Occupational Safety & Health Administration, Ufficio per la sicurezza e la salute sul posto di lavoro) per la categorizzazione quale sostanza pericolosa e, pertanto, non è richiesta la compilazione di un modulo MSDS (Materia Safety Data Sheet) per la registrazione dei dati relativi alla sicurezza del materiale.
7. Pregasi fare riferimento alla normativa locale vigente in materia di smaltimento di sostanze potenzialmente tossiche.
8. I provini e tutti i materiali che entrano in contatto con essi devono essere manipolati quali materiali potenzialmente infettivi e quindi smaltiti adottando le debite precauzioni. Non pipettare mai con la bocca. Evitare il contatto della sonda e dei provini tissutali con la cute e le membrane mucose.
9. Ridurre al massimo la contaminazione microbica onde prevenire colorazioni aspecifiche.
10. L'uso di tempi di incubazione, concentrazioni e temperature che si discostano da quelli specificati potrebbero dar adito a risultati scorretti. Le eventuali modifiche devono essere convalidate dall'utente.

X. LIMITAZIONI

1. CISH™ è una procedura plurifase che richiede una formazione specializzata per la selezione dei reagenti indicati; la selezione del tessuto, il fissaggio, la lavorazione e la preparazione del vetrino CISH™; nonché per l'interpretazione degli esiti della colorazione.
2. La colorazione dei tessuti e delle cellule dipende dalle modalità osservate per la manipolazione e la lavorazione del campione tissutale prima della colorazione. Il fissaggio, congelamento, scongelamento, lavaggio, asciugatura, riscaldamento, sezionatura scorretti o la contaminazione da altri tessuti o liquidi potrebbero produrre dei risultati falsi-positivi o falsi-negativi. Il conseguimento di risultati incoerenti potrebbe essere imputabile a modifiche apportate ai metodi di fissaggio o inclusione o ad anomalie insite a carico del campione tissutale utilizzato.
3. Una colorazione eccessiva o incompleta potrebbe compromettere la correttezza dell'interpretazione dei risultati.
4. Qualsiasi eventuale scostamento dalle procedure raccomandate per la conduzione dei test potrebbe invalidare i risultati attesi dichiarati; si devono eseguire e documentare controlli adeguati. Gli utenti che osservano procedure per l'esecuzione dei test che si discostano da quelle raccomandate si assumono la responsabilità dell'interpretazione dei risultati tratti dai provini in dette circostanze.
5. I reagenti potrebbero produrre reazioni inattese nei tessuti non testati precedentemente. La possibilità che si verifichino delle reazioni inattese, anche nei gruppi di tessuti testati, non può essere completamente esclusa in considerazione della variabilità biologica dei tessuti.
6. I risultati falsi-positivi potrebbero esser attribuibili al legame non immunologico delle proteine di rilevazione o dei prodotti reattivi di substrato. Questi potrebbero inoltre essere causati da attività pseudoperossidasi (eritrociti) o attività perossidasi endogene (citocromo c).

MARCHI COMMERCIALI

CISH™, Clearmount™, HistoGrip™, Histomount™, SP•T-Light®, SPT™ e Zymed® sono marchi commerciali di proprietà di Zymed Laboratories, Inc. SPT™ è una tecnologia brevettata da Zymed. CISH™ è una tecnologia con brevetto in corso di omologazione.

Rappresentante Autorizzato per IVDD 98/79/EC: Invitrogen Ltd.
Inchinnan Business Park
3 Fountain Drive
Paisley
PA4 9RF
UK

www.invitrogen.com

Invitrogen Corporation • 542 Flynn Rd • Camarillo • CA 93012 • Tel: 800.955.6288 • E-mail: techsupport@invitrogen.com

PIN 31306

(Rev 08/08) DCC-08-1089

© 2007 Invitrogen Corporation. All right reserved. These products may be covered by one or more Limited Use Label Licenses (see the Invitrogen Catalog or www.invitrogen.com). By use of these products you accept the terms and conditions of all applicable Limited Use Label Licenses.

Die Invitrogen SP●T-Light® Cyclin D1 Sonde (84-1900)

I. VERWENDUNGSZWECK

Für In Vitro Diagnostischem Gebrauch

Die SP●T-Light® Cyclin D1 DNA-Sonde ist bestimmungsgemäß zur Detektion der cyclin D1-Genamplifikation in formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten (FFPE) Gewebeschnitten unter Anwendung der Chromogenic *In Situ* Hybridization (CISH™) vorgesehen. Die Interpretation muss im Kontext der klinischen Anamnese des Patienten durch einen qualifizierten Pathologen erfolgen.

II. ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

Subtraction Probe Technology (SPT™)

SPT™ von Invitrogen ist eine proprietäre und patentierte Invitrogen-Technologie, mit der spezifische Sonden durch Elimination der repetitiven Sequenzen (z.B. Alu- und LINE-Elemente) in humanen Nukleinsäuren hergestellt werden. Invitrogen SPT™ Sonden sind daher inhärent spezifisch und erfordern kein Blocking repetitiver Sequenzen, wie dies bei traditionellen, zytogenetischen DNA-Sonden der Fall ist. Invitrogens SPT™ Technologie ermöglicht die Beurteilung genetischer Aberrationen mit Hilfe chromogener Detektion.

Beschreibung und Spezifität der DNA-Sonde

Invitrogens SP●T-Light® Cyclin D1 Sonde ist eine doppelsträngige, mit Digoxigenin markierte DNA-Sonde. Sie wird in flüssiger Form in einem Hybridisierungspuffer geliefert. Diese Sonde bindet sich nachweislich spezifisch an den cyclin D1-Genlocus auf dem Chromosomenband 11p13. Repetitive Nukleinsäuresequenzen wurden mit Hilfe der SPT™-Technologie quantitativ aus der Sonde entfernt.

Verfahrensprinzip von CISH™ (Chromogenic In Situ Hybridization)

Die Chromogenic In Situ Hybridization (CISH™) ermöglicht die Detektion von Genamplifikationen, Chromosomentranslokationen und Chromosomenanzahl mittels konventioneller Peroxidasereaktionen unter dem Hellfeldmikroskop an formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten (FFPE) Geweben (4-5 µm Dicke). Das Konzept der CISH™ besteht in der Fähigkeit markierter Nukleinsäuresonden *in situ* zu hybridisieren, d.h. sich an spezifische Bereiche der komplementären Nukleinsäure in der Gewebeprobe zu binden. Die Ergebnisse der Sondenhybridisierung können dann im Kontext der umgebenden Gewebemorphologie dargestellt werden. Aus diesem Grund kann der Pathologe die Gewebemorphologie und Genaberrationen gleichzeitig ansehen.

CISH™ Färbungsergebnisse können mit einem Standard-Hellfeldmikroskop und einer 40x-Trockenlinse klar dargestellt werden. Da das DAB-Signal permanent ist, können die Ergebnisse langfristig gespeichert werden und stellen damit eine permanente Aufzeichnung des Tests dar. Die CISH™ Immundetektionsmethodik macht die Analyse der Ergebnisse sowohl schnell als auch einfach. Der wichtigste Vorteil der CISH™ besteht darin, dass die Detektion genetischer Aberrationen sowie die Verifizierung der Histopathologie gleichzeitig durchgeführt werden kann.

Tumore mit cyclin D1-Genamplifikation erscheinen typischerweise als große, Peroxidase-positive Clusters von Genkopien im Zellkern, in der Form zahlreicher, individueller Peroxidase-positiver kleiner Signale oder als Mischung von Clusters und individuellen Genkopien. Tumore mit geringer cyclin D1-Amplifikation weisen typischerweise 6 bis zu den Dutzenden Genkopien pro Zellkern auf. Tumore mit normalem cyclin D1-Genstatus weisen typischerweise 1 bis 2 Dots pro Zellkern auf, während Tumore mit Polysomie des Chromosoms von 3 bis 5 cyclin D1-Genkopien pro Zellkern aufweisen.

III. MITGELIEFERTE REAGENZIEN

- 0,4 ml Digoxigenin-markierte SP●T-Light® Cyclin D1 Sonde

IV. ERFORDERLICHE, JEDOCH NICHT MITGELIEFERTE REAGENZIEN/ MATERIALIEN UND GERÄTE

Zusätzliche Reagenzien/Materialien

	Invitrogen Kat. Nr.
1. SP●T-Light® CISH Polymerdetektionskit	84-9246
2. SP●T-Light® FFPE Gewebevorbehandlungskit	00-8401
3. SP●T-Light® Zellvorbehandlungsreagenz	00-8402
4. SSC-Puffer (20X)	00-8400
5. SuperFrost Plus Objektträger ODER HistoGrip™ Objektträgeradhäsiv	00-8050
6. [Optional] Positive Gewebekontrolle: FFPE-Gewebeschnitt mit cyclin D1-Genamplifikation	
7. [Optional] Negative Gewebekontrolle: FFPE-Gewebeschnitt ohne cyclin D1-Genamplifikation	
8. Entionisiertes oder destilliertes Wasser (dH ₂ O)	
9. Xylol	

www.invitrogen.com

Invitrogen Corporation • 542 Flynn Rd • Camarillo • CA 93012 • Tel: 800.955.6288 • E-mail: techsupport@invitrogen.com

- | | |
|----------------------------------------------------------------------------|---------|
| 10. 70-, 85-, 95- und 100-%iger Ethanol (EtOH) | |
| 11. Deckgläser, Gummileim, 18G 1,25 cm Kanüle und 5 ml Spritze ODER | |
| 12. [Optional] UnderCover™ Slips Deckgläser (18 x 18 mm) | 00-8403 |
| 13. [Optional] UnderCover™ Slips Deckgläser (22 x 22 mm) | 00-8404 |
| 14. 30 %iges Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂) | |
| 15. 100 %iges Methanol | |
| 16. 50 %iges Tween 20 | 00-3005 |
| 17. Hämatoxylin nach Mayer | 00-8011 |

Geräte/Instrumente

1. Zeitgeber
2. Pipette (p20, p1000)
3. Pipettenspitzen
4. Objektträger-Gestell
5. Heizplatte, Aluminiumfolie und 1 l Becherglas
6. Objektträger-Wärmer
7. 37°C Inkubator
8. Heizblock mit digitaler Temperaturanzeige und Objektträger-Feuchtigkeitsbox **ODER**
9. PCR-Thermocycler mit einem Objektträgerblock
10. Wasserbad (das einen Temperaturbereich von 75-80°C aufrechterhalten kann)
11. Coplin-Tröge und Färbetröge
12. Hellfeldmikroskop

V. AUFBEWAHRUNG

Die SP●T-Light® Cyclin D1 Sonde bei -20°C aufbewahren

Es ist zu beachten, dass bei -20°C die SP●T-Light® Cyclin D1 Sonde nicht gefriert, sondern in wässrigem Zustand verbleibt, d.h. es treten keine Gefrier-/Auftauprobleme auf. Das Kit darf nicht nach dem auf dem Etikett aufgedruckten Verfalldatum verwendet werden. Falls das Produkt unter anderen als auf der Packungsbeilage angegebenen Bedingungen aufbewahrt wird, muss der Anwender validieren, dass die jeweiligen Aufbewahrungsbedingungen zulässig sind.

VI. GEBRAUCHSANLEITUNG

A. PROBENVORBEREITUNG

In Paraffin eingebettete Gewebeschnitte:

- i. Es können Gewebe verwendet werden, die 12-24 Stunden vor der Paraffin-Einbettung in neutralem gepuffertem Formalin fixiert wurden. Die Gewebeschnitte (4-5 µm dick) müssen auf mit HistoGrip™ behandelten oder auf Superfrost/Plus Mikroskop-Objektträgern eingedeckt werden.
- ii. Die Objektträger lufttrocknen oder bei 37°C trocknen lassen und dann 2-4 Stunden bei 60°C backen.

B. REAGENZVORBEREITUNG

PBS (phosphatgepufferte Salzlösung)

1 l dH₂O 1 Packung PBS-Pulver (Reagenz E) zusetzen. Mischen.

PBS/Tween 20 (0,025 %iger)-Puffer

1.999 Teilen PBS 1 Teil 50 %iges Tween-20 zusetzen. Mischen.

Substrat-Chromogen-Lösung (DAB)

Zur Herstellung von DAB, je 1 Tropfen aller Reagenzien (D1, D2, D3) zu 1 ml dH₂O zugeben. Gut mischen. **Diese Lösung sollte unmittelbar vor dem Gebrauch zubereitet werden.**

Alkoholreihe

70-, 85-, 95- und 100-%igen Ethanol zubereiten.

3 %iges H₂O₂ in absolutem Methanol

1 Teil 30 %iges H₂O₂ zu 9 Teilen Methanol hinzugeben.

2x SSC-Puffer

1 Teil 20x SSC-Puffer auf 9 Teile dH₂O. Mischen.

0,5x SCC-Puffer (Stringenzwäsche)

1 Teil 2x SSC-Puffer auf 3 Teile dH₂O hinzugeben. Mischen. Oder 1 Teil 20x SSC-Puffer auf 39 Teile dH₂O hinzugeben. Mischen.

www.invitrogen.com

Invitrogen Corporation • 542 Flynn Rd • Camarillo • CA 93012 • Tel: 800.955.6288 • E-mail: techsupport@invitrogen.com

C. CISH™ STANDARDPROTOKOLL FÜR FFPE-GEWEBEPROBE

Außer die Sonde sollten alle Reagenzien vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur (RT) (20-25°C) gebracht werden. Die Sonde kann kalt, ohne Angleichung an die Raumtemperatur verwendet werden. Falls nicht anders angegeben, sollten die Inkubationen alle bei RT (20-25°C) durchgeführt werden.

Wenn nicht anders angegeben, muss während des gesamten Verfahrens darauf geachtet werden, dass der Gewebeschnitt nicht austrocknet.

1. Vorbehandlung (nur für FFPE-Gewebeschnitte)

- a) **Entparaffinisierung:**

In Xylol einweichen.	2 Mal, jeweils 5 Min
In 100 %igem EtOH einweichen.	3 Mal, jeweils 3 Min
In dH ₂ O waschen.	3 Mal, jeweils 2 Min

(Falls der nächste Schritt nicht sofort durchgeführt werden kann, die Präparate nach dreimaligem Einweichen in 100 %igem EtOH anstatt dreimaligem Waschen in dH₂O lufttrocknen lassen.)
- b) **Wärmeverbehandlung (entscheidendster Schritt für erfolgreiche Durchführung der CISH™):**

Die Objektträger/Gewebeproben müssen 15 Minuten lang in CISH™ Gewebe-Wärmeverbehandlungslösung gekocht oder bei über 98°C erhitzt werden. Wir empfehlen, für diesen Schritt die Heizplatte zu verwenden. (Für Protokolle, die andere Geräte verwenden, bitte den Invitrogen Technical Service unter tech_support@invitrogen.com verständigen.)

 - i. Die Objektträger auf das Objektträger-Gestell geben.
 - ii. Die Wärmeverbehandlungslösung in einem Becherglas auf einer Heizplatte erhitzen, bis sie stetig kocht und eine Temperatur von 98°C aufweist. Um eine Verdampfung des Puffers zu vermeiden, sollte das Becherglas entweder mit einem Glasdeckel oder Aluminiumfolie abgedeckt werden.
 - vi. Die Objektträger in die kochende Lösung geben, das Becherglas abdecken und 15 Minuten lang kochen.
 - iv. Die Objektträger unmittelbar in das dH₂O (bei RT, 20-25°C) geben und drei Mal jeweils 2 Minuten lang waschen.
- c) **Enzymatische Digestion (ein entscheidender Schritt für die erfolgreiche Durchführung der CISH™):**

Für die meisten Brustgewebe werden die besten CISH-Ergebnisse bei 10-minütiger enzymatischer Digestion bei Raumtemperatur erhalten (Pepsin mit RT dem Gewebeschnitt hinzugeben).

Je nach Gewebetyp und Fixierungsmethode können verschiedene Enzyminkubationszeiten erforderlich sein (5-15 Min).

 - i. Das Enzymvorbehandlungsreagenz auf RT (20-25°C) kommen lassen.
 - ii. Genug Reagenz F hinzufügen, um den Gewebeschnitt zu überdecken und 10 Minuten lang bei RT inkubieren.
 - iii. Drei Mal jeweils 2 Minuten lang in dH₂O waschen.
- d) **Dehydrierung in abgestufter Ethanolreihe:**

70 %iger EtOH	2 Min
85 %iger EtOH	2 Min
95 %iger EtOH	2 Min
100 %iger EtOH	2 Min
100 %iger EtOH	2 Min
- e) Die Objektträger lufttrocknen. ≥ 20 Min
- f) Objektträger mit Bleistift beschriften.

2. Denaturierung und Hybridisierung

(Entweder ein PCR-Gerät mit Objektträgerblock **ODER** einen Heizblock mit digitaler Temperaturanzeige und Objektträger-Feuchtigkeitskammer mit 37°C Inkubator verwenden)

- a) 15 µl Sonde auf die Mitte des Deckblatts geben. (Je nach Gewebegröße kann mehr oder weniger Sonde erforderlich sein.)
- b) Deckglas mit der SONDENSEITE nach unten weisend über den entsprechenden Bereich der Gewebeprobe auf dem Objektträger platzieren.

www.invitrogen.com

Invitrogen Corporation • 542 Flynn Rd • Camarillo • CA 93012 • Tel: 800.955.6288 • E-mail: techsupport@invitrogen.com

- c) Um während der Inkubation eine Verdampfung zu verhindern, das Deckglas versiegeln.
 - Mit einer mit Gummilösung gefüllten 5-ml-Spritze mit 18G 1,25-cm-Kanüle vorsichtig eine dünne Gummilösungsschicht so auf die Deckglasränder auftragen, dass diese Schicht den Objektträger etwas überlappt. Die Gummilösung (ca. 10 Minuten) trocknen lassen, um zu verhindern, dass das Deckglas vom Objektträger abrutscht. **ODER**
 - Invitrogen UnderCover™ Slips Deckgläser verwenden, wobei Klebeband/Deckglas vom Abziehpapier abgezogen und so auf den entsprechenden Bereich des Objektträgers aufgebracht werden, dass die Gewebeprobe überdeckt wird. Zum Versiegeln die Ränder des Klebebandes andrücken. (Bei Verwendung von Invitrogen UnderCover™ Slips NICHT AUF DIE DECKGLASMITTE DRÜCKEN.)
- d) Die Sonde durch Inkubation der Objektträger (5 Min bei 94-95°C) denaturieren. (Dazu die Objektträger in den Objektträgerblock eines auf 94-95°C eingestellten PCR-Gerätes bzw. auf einen Heizblock (94-95°C) mit digitaler Temperaturanzeige setzen und 5 Minuten lang inkubieren.)
- e) Die Objektträger in den Objektträgerblock eines PCR-Gerätes, das auf 37°C eingestellt wurde, platzieren und mehr als 10 Stunden (übernacht) inkubieren. **ODER**
Objektträger mehr als 10 Stunden (übernacht) in eine auf 37°C eingestellte Feuchtigkeitskammer platzieren.

3. Stringenz-Wäsche:

- a) Zwei Coplin-Tröge mit SSC-Puffer vorbereiten: einer bei Raumtemperatur (RT), der andere auf 75°C erhitzt. (Bei mehr als 2 Objektträgern die Temperatur um 1°C pro Objektträger erhöhen, **jedoch nicht 80°C überschreiten**.)
- b) Nach der Hybridisierung vorsichtig die getrocknete Gummilösung abziehen. Deckglas abnehmen. (Bei Verwendung eines Invitrogen UnderCover™ Slip einfach das Klebeband vom Objektträger abziehen, um das Deckglas zu entfernen.) Die Gewebeprobe nicht austrocknen lassen.
- c) Objektträger kurz in einem Behälter SSC-Puffer mit RT spülen, dann Objektträger 5 Minuten lang im Behälter mit 75°C warmen SSC-Puffer einweichen.
- d) Objektträger im dH₂O waschen. 3 Mal, jeweils 2 Min

4. Durchführung der Immundetektion:

- a) Objektträger in 3 %iger H₂O₂ in absolutem Methanol einweichen. 10 Min
- b) In PBS/Tween 20 (0,025 %ig) einweichen. 3 Mal, jeweils 2 Min
- c) CAS-Block™ (Reagenz A) zugeben: 2-3 Tropfen/Objektträger bei RT. Einweichen. 10 Min
- d) Blocking-Reagenz abtupfen. NICHT ABSPÜLEN.
- e) Anti-Dig-Antikörper (Maus) (Reagenz B) zugeben: 2-3 Tropfen/Objektträger bei RT. Einweichen. 30 Min
- f) In PBS/Tween 20 (0,025 %ig) einweichen. 3 Mal, jeweils 2 Min
- g) Polymerisierten HRP-Anti-Maus-Antikörper (Reagenz C) zugeben: 2-3 Tropfen/Objektträger bei RT. 30 Min
- h) In PBS/Tween 20 (0,025 %ig) waschen. 3 Mal, jeweils 2 Min
- i) Während der Wäsche DAB durch Zugabe eines Tropfens jedes Reagenzes (D1-D3) zu 1 ml dH₂O zubereiten.
- j) Substrat-Chromogen-Lösung (DAB) zugeben: 2-3 Tropfen/Objektträger. Einweichen. 30 Min
- k) Objektträger in Objektträger-Gestell platzieren.
- l) Mit laufendem Leitungswasser waschen. 2 Min

5. Gegenfärbung und Aufbringung der Deckgläser

- a) Das Gewebe mit Hämatoxylin gegenfärben. 6 Sek – 1 Min
Die Gegenfärbungszeit hängt von den benutzten Geweben ab. Eine dunkle Gegenfärbung ist nicht empfohlen, da dies die positiven Färbungssignale verdecken könnte.
- b) Mit laufendem Leitungswasser waschen. 2 Min
- c) In der abgestuften EtOH-Reihe dehydrieren. 2 Min pro Stufe
(70, 85, 95-, 100-, 100-%ig)
- d) In Xylol einweichen. 2 Mal, jeweils 2 Min
- e) Deckglas mit Hilfe von Histomount™ Eindeckungslösung (Reagenz E) aufsetzen.

6. Hellfeldmikroskopie

Die Hybridisierungsergebnisse und Gewebemorphologie gleichzeitig mit einem Hellfeldmikroskop und einer 40x Trockenlinse untersuchen.

D. ZELLPROBE ODER METAPHASENCHROMOSOMPROBE

1. Die Zellproben auf mit HistoGrip™-behandelten oder Superfrost/Plus-beschichteten Glasobjektträgern fixieren.
2. Vorbehandlung
 - a) Die Objektträger für 60 Minuten in 2x SSC bei 37°C eintauchen.
 - b) (Optional) Die Zellen mit SP●T-Light® Zellvorbehandlungsreagenz für 5 Minuten bei 37°C vorbehandeln (Hinweis: Die Inkubationszeit (2-10 Minuten) ist je nach Zelltyp und Objektträgerzustand unterschiedlich. Übermäßige Enzymdigestion bewirkt einen Verlust der Nuklei und Chromosomenstruktur. Eine unangemessene Digestion kann zu einem Signalverlust führen.)
 - c) Die Objektträger für 3 x 1 Minute bei Raumtemperatur (RT) in PBS waschen.
 - d) (Optional) Die Objektträger für 1 Minute bei RT in 10% gepuffertes Formalin eintauchen.
 - e) Die Objektträger für 3 x 1 Minute bei RT in PBS waschen.
 - f) Die Objektträger in 70%, 85%, 95% und 100% Ethanol für jeweils 2 Minuten dehydrieren und dann lufttrocknen.

Die Objektträger sind jetzt für das ISH-Verfahren bereit (oder Sie können bei -20°C in 70% Ethanol aufbewahrt werden).

3. Denaturierung und Hybridisierung
 - a) 15 µl der Sonde in den Mittelpunkt der Probe pipettieren und mit einem 22 x 22 mm großen Deckgläschen abdecken (bei größeren Proben mehr Sonde und ein größeres Deckgläschen verwenden).
 - b) Die Kanten des Deckgläschen mit einer dünnen Schicht Gummileim versiegeln, um die Evaporation der Probenlösung während der Inkubation zu verhindern.
 - c) Die Objektträger auf einer Heizplatte oder einem Objektträgerwärmer bei 80°C für 3 Minuten (2-5 Minutenbereich) oder im Objektträgerblock eines PCR Thermal Cyclers denaturieren. Den Objektträger in eine dunkle feuchte Kammer oder in den Objektträgerblock eines PCR Thermal Cyclers für 16-24 Stunden bei 37°C geben.
4. Stringenzwäsche
 - a) Den Gummileim und das Deckgläschen entfernen.
 - b) Unter Verwendung eines Coplin-Färbetrogs die Objektträger in einen 0,5x SCC Puffer eintauchen, und zwar für 5 Minuten bei 72°C. (Hinweis: Diese Temperatur bezieht sich auf einen Objektträger, jeder weitere Objektträger wird jedoch einen Lösungstemperaturabfall von 1°C bewirken. Wird also mehr als ein Objektträger verwendet, die Temperatur des Wasserbads entsprechend anpassen. Zum Beispiel beim Eintauchen von 4 Objektträgern die Temperatur des Wasserbads auf 75°C einstellen. 80°C jedoch nicht überschreiten).
 - c) Die Objektträger für 3 x 2 Minuten bei RT in PBS/Tween 20 Puffer waschen.

Zu Blocking und Löschung weitergehen

E. INTERPRETATION DER CISH™-ERGEBNISSE

1. CISH™-Signale

Bei der CISH™ erscheint ein individuelles einzelnes cyclin D1-Gen als kleiner, einzelner Dot.

Tabelle 1: Signaldarstellung

Vergrößerung	CISH-Signal
10x	Individuelle Signale sind kaum zu erkennen und leicht zu übersehen.
20x	Individuelle Signale sind klein, jedoch klar wahrnehmbar.
40x	Individuelle Signale können einfach identifiziert werden.
60x oder 100x	Nicht erforderlich.

2. Positive Kontrolle

Wird eine positive Gewebekontrolle benutzt, d.h. ein Gewebe, von dem bekannt ist, dass es die cyclin D1 Genamplifikation enthält, sollte diese zuerst untersucht werden, um sicherzustellen, dass alle Reagenzien ordnungsgemäß funktionieren. Das Vorhandensein von Gen-Clusters oder ≥6 individuellen Signalen im Zellkern einer einzigen Zelle weist auf eine erwartete positive Reaktivität hin. Falls die positive Kontrolle keine Anwesenheit von Clusters oder ≥6 Signalen pro Zellkern feststellt, sind die für die Gewebeproben ermittelten Ergebnisse als ungültig zu bewerten.

Im Allgemeinen bestätigt die Anwesenheit von nicht mehr als zwei Genkopien in den Zellkernen des Normalgewebeteils der positiven Gewebekontrolle, dass keine Kreuzreaktion der Sonde und der Immundetektionsreagenzien mit den Zell- oder Gewebekomponenten stattfindet. Falls in den Zellkernen des Normalgewebeteils der positiven Gewebekontrolle eine nichtspezifische Färbung stattfindet, sind die Ergebnisse für diese Gewebeproben als ungültig zu bewerten.

Falls eine nichtspezifische Färbung stattfindet, sieht diese normalerweise diffus aus. Gelegentlich wird in Gewebeschnitten mit übermäßiger Formalinfixierung eine sporadische Färbung außerhalb der Zellkerne beobachtet. Eine nichtspezifische Färbung darf nicht mit positiven CISH™-Signalen verwechselt werden.

3. Evaluierung des cyclin D1-Genstatus mittels CISH

Table 2: Evaluierung des cyclin D1-Genstatus mittels CISH

Amplifikation	> 10 Kopien oder große Clusters des cyclin D1-Gens pro Zellkern in mehr als 50 % der Krebszellen anwesend.
Geringe Amplifikation	6-10 Kopien des cyclin D1-Gens oder ein kleines Cluster des cyclin D1-Gens pro Zellkern in >50 % der Krebszellen anwesend.
Keine Amplifikation	1-5 Kopien des cyclin D1-Gens pro Zellkern in >50 % der Krebszellen anwesend. Die Anwesenheit von 3-5 Kopien des Gens pro Zellkern ist auf eine Polysomie des Chromosoms zurückzuführen.

Anzahl der Kopien des normalen (diploiden) cyclin D1-Gens:

Diploide Zellen haben normalerweise zwei cyclin D1-Gene. Ein kleiner Prozentsatz normaler Zellen kann auf Grund von Mitose zusätzliche chromosomale Signale aufweisen oder erwartete chromosomale Signale vermissen (insbesondere in paraffin-eingebetteten Gewebeschnitten).

Zellen mit amplifiziertem cyclin D1-Gen:

Aneuploide Zellen haben entweder mehr oder weniger als zwei cyclin D1-Signale

Zellen mit aneuploides cyclin D1-Gen:

Zellen mit amplifiziertem cyclin D1 können vier bis Dutzende Kopien des Gens haben. Mittlere Amplifikationsebenen, z.B. 3-5 Kopien des cyclin D1-Gens, können durch Zellpolyploidisierung anstatt gezielte cyclin D1-Amplifikation hervorgerufen werden. Das Vorhandensein eines oder mehrerer Amplimere zeigt eindeutig eine Genamplifikation.

VII. QUALITÄTSKONTROLLE

Eine Variation bei der Gewebeerarbeitung und den technischen Verfahren im Labor des Benutzers kann eine signifikante Variabilität der Ergebnisse zur Folge haben und neben den folgenden Verfahren auch eine regelmäßige Durchführung interner Kontrollen erfordern.

Farbe und Wesen des positiven Signals hängt von der benutzten Detektionsmethode ab. Eine Beschreibung des zu erwartenden positiven Signals ist in der Packungsbeilage des Detektionskits zu finden.

Positive (Amplifikations-) Gewebekontrolle: Externe positive Gewebekontrollmaterialien sollten von frischen Autopsie-, Biopsie- oder Operationsproben stammen, die auf die gleiche Weise wie die Gewebeprobe fixiert, verarbeitet und eingebettet wurden. Gewebepben, die anders als die Testprobe verarbeitet wurden, validieren nur die Reagenzleistung und bestätigen nicht die Gewebepvorbereitungstechniken. Positive Gewebekontrollen weisen auf korrekt vorbereitete Gewebe und korrekte Färbungstechniken hin. Jede Testserie sollte eine positive Gewebekontrolle für jeden Satz von Testbedingungen umfassen.

Die für die positiven Kontrollmaterialien verwendeten Gewebe sollten aus Proben mit gut charakterisierten cyclin D1-Genamplifikationswerten ausgewählt werden. Ca. 25 % von Neuroblastoma weisen die cyclin D1-Genamplifikation¹ auf und können eine nützliche Quelle positiver Kontrollgewebe darstellen.

Als positiv bekannte Gewebekontrollen sollten nur zur Überwachung der korrekten Leistung der verarbeiteten Gewebe und Testreagenzien benutzt werden und nicht als Hilfe zur Interpretation von Probenergebnissen. Falls die positiven Gewebekontrollen keine positive Färbung aufzeigen, sollten die für die Proben erhaltenen Ergebnisse als ungültig betrachtet werden.

VIII. TIPPS UND FEHLERBEHEBUNG FÜR DAS VERFAHREN

1. Wenn nicht anders angegeben, muss während des gesamten Verfahrens darauf geachtet werden, dass der Gewebeschnitt nicht austrocknet.
2. **Wärmeverbehandlung (entscheidendster Schritt für erfolgreiche Durchführung der CISH™):** Die Probe muss in der Wärmeverbehandlungslösung 15 Minuten lang gekocht oder bei über 98°C erhitzt werden. Siehe Seite 35.
3. **Enzymatische Digestion (ein entscheidender Schritt für die erfolgreiche Durchführung der CISH™):** Je nach Gewebetyp und Fixierungsmethode können verschiedene Enzyminkubationszeiten (5-15 Min) erforderlich sein. **Für die meisten Brustgewebe werden die besten CISH™-Ergebnisse bei 10-minütiger enzymatischer Digestion bei Raumtemperatur erhalten. Sicherstellen, dass das Enzymvorbehandlungsreagenz (Reagenz F) vor der Zugabe an den Gewebeschnitt auf RT aufgewärmt wird.** Die Enzymvorbehandlung der Probe sollte bei Abschluss des CISH™-Protokolls sofort beurteilt werden. Falls die Zellkerne nicht gegengefärbt sind und das CISH™-Signal fehlt oder sehr schwach ist, kann dies auf Zellkernverlust aufgrund übermäßiger Digestion zurückführbar sein. Falls die Zellkerne stark gegengefärbt sind, aber in den Zellkernen kein CISH™-Signal vorhanden ist, kann dies auf eine Unterdigestion während der Pepsinvorbehandlung zurückführbar sein. Wenn keine optimalen Ergebnisse erhalten werden, kann die Enzymvorbehandlung alternativ auch 3 Minuten lang bei 37°C durchgeführt werden.
4. Eine Probenidentifizierung bei einer niedrigeren Temperatur als protokollgemäß empfohlen kann zu einem schwachen bzw. fehlenden CISH™-Signal führen.

www.invitrogen.com

Invitrogen Corporation • 542 Flynn Rd • Camarillo • CA 93012 • Tel: 800.955.6288 • E-mail: techsupport@invitrogen.com

PIN 31306

(Rev 08/08) DCC-08-1089

© 2007 Invitrogen Corporation. All right reserved. These products may be covered by one or more Limited Use Label Licenses (see the Invitrogen Catalog or www.invitrogen.com). By use of these products you accept the terms and conditions of all applicable Limited Use Label Licenses.

5. Hybridisierungen, die kürzer als protokollgemäß sind, oder Stringenz-Wäschen, die bei höheren Temperaturen als protokollgemäß durchgeführt werden, können eine Abnahme oder einen vollständigen Verlust des CISH™-Signals verursachen.
6. Weitere technische Unterstützung bzw. Produktliteratur sind von Ihrem örtlichen Vertrieb oder von Invitrogen Laboratories, Inc. unter tech_support@invitrogen.com oder +1 (800) 955-6288 erhältlich.

IX. SICHERHEIT UND VORSICHTSMASSNAHMEN

1. Bei der Handhabung der Reagenzien ausreichende Sicherheitsmaßnahmen ergreifen. Beim Umgang mit angenommenen Karzinogenen Einweghandschuhe, Laborkittel und Augenschutz tragen.
2. Dieses Produkt nicht nach dem Verfalldatum verwenden.
3. 3,3'-Diaminobenzidintetrachlorid (DAB) kann bei Verschlucken, Einatmen oder Hautabsorption gesundheitsschädlich sein und kann Augen, Haut, Schleimhäute und die oberen Atemwege reizen. Es besteht der Verdacht, dass DAB ein Karzinogen ist. Zur Entsorgung die einschlägigen Bundes-, Länder- und/oder lokalen Bestimmungen beachten.
4. Das in diesem Kit als Konservierungsmittel benutzte 0,1 %ige Natriumazid (NaN₃) ist bei Verschlucken giftig. Natriumazid kann mit Blei- und Kupferrohrleitungen reagieren und hochexplosive Metallazide bilden. Um eine Azidbildung in Rohrleitungen zu vermeiden, während der Entsorgung mit viel Wasser nachspülen.
5. Einen Kontakt dieses Reagenz mit Augen und Schleimhäuten vermeiden. Falls das Reagenz mit empfindlichen Bereichen in Kontakt kommt, mit großen Mengen Wasser spülen.
6. Dieses Produkt erfüllt nicht die Kriterien der Occupational Safety & Health Administration (OSHA) der USA bzgl. gefährlicher Substanzen, und es ist daher kein Sicherheitsdatenblatt erforderlich.
7. Bzgl. der Entsorgung potenziell giftiger Komponenten die lokalen Bestimmungen beachten.
8. Proben und alle Materialien, die mit diesen in Kontakt kommen, sollten als möglicherweise infektiös gehandhabt und mit angebrachten Sicherheitsvorkehrungen entsorgt werden. Niemals durch Ansaugen mit dem Mund pipettieren. Einen Kontakt der Sonde und der Gewebeproben mit Haut und Schleimhäuten vermeiden.
9. Um eine nichtspezifische Färbung zu vermeiden, mikrobielle Kontaminationen minimieren.
10. Die Anwendung von anderen Inkubationszeiten, Konzentrationen oder Temperaturen als den angegebenen kann zu falschen Ergebnissen führen. Der Benutzer muss alle solche Änderungen validieren.

X. LEISTUNGSGRENZEN

1. CISH™ ist ein mehrschrittiges Verfahren, das eine Sonderausbildung für die Auswahl der geeigneten Reagenzien, Gewebeauswahl, Fixierung und Verarbeitung, Vorbereitung der CISH™-Objektträger sowie der Interpretation der Färbungsergebnisse erfordert.
2. Die Gewebe- und Zellfärbung hängt von der Handhabung und Verarbeitung der Gewebeprobe vor der Färbung ab. Ein nicht ordnungsgemäßes Vorgehen beim Fixieren, Einfrieren, Auftauen, Waschen, Trocknen, Erhitzen, Anfertigen der Schnitte oder eine Kontamination mit anderen Geweben oder Flüssigkeiten kann Artefakte, falsch positive oder falsch negative Ergebnisse verursachen. Nicht konsistente Ergebnisse können durch Variationen der Fixierungs- und Einbettungsmethoden bzw. durch Unregelmäßigkeiten der Gewebeprobe selbst verursacht werden.
3. Eine übermäßige oder unvollständige Gegenfärbung kann die richtige Interpretation der Ergebnisse beeinträchtigen.
4. Jede Abweichung von empfohlenen Testverfahren kann die angegebenen erwarteten Ergebnisse ungültig machen. Es müssen daher angemessene Kontrollen verwendet und dokumentiert werden. Benutzer, die von den empfohlenen Testverfahren abweichen, müssen unter diesen Bedingungen Verantwortung für die Interpretation der Probenergebnisse übernehmen.
5. Reagenzien können in vorher ungetesteten Geweben unerwartete Reaktionen hervorrufen. Aufgrund der biologischen Variabilität kann die Möglichkeit unerwarteter Reaktionen selbst in getesteten Gewebegruppen nicht vollständig ausgeschlossen werden.
6. Falsch positive Ergebnisse können durch eine nicht-immunologische Bindung der Detektionsproteine oder Substratreaktionsprodukte hervorgerufen werden. Sie können auch durch eine Pseudoperoxidaseaktivität (Erythrozyten) oder endogene Peroxidaseaktivität (Zytochrom c) verursacht werden.

MARKEN

CISH™, Clearmount™, HistoGrip™, Histomount™, SP●T-Light®, SPT™ und Zymed® sind Marken von Zymed Laboratories, Inc. SPT™ ist eine von Zymed patentierte Technologie. CISH™ ist eine Technologie, für die ein Patent angemeldet wurde.

Bevollmächtigter Repräsentant für IVDD 98/79/EC: Invitrogen Ltd.
Inchinnan Business Park
3 Fountain Drive
Paisley
PA4 9RF
UK

www.invitrogen.com

Invitrogen Corporation • 542 Flynn Rd • Camarillo • CA 93012 • Tel: 800.955.6288 • E-mail: techsupport@invitrogen.com

PIN 31306

(Rev 08/08) DCC-08-1089

© 2007 Invitrogen Corporation. All right reserved. These products may be covered by one or more Limited Use Label Licenses (see the Invitrogen Catalog or www.invitrogen.com). By use of these products you accept the terms and conditions of all applicable Limited Use Label Licenses.