



A Sysmex Group Company



Instructions For Use
REF: LPE NOR-S / LPE NOR

Acro-P-Arm Probe



PROFESSIONAL USE ONLY

ENGLISH/FRANÇAIS/ITALIANO/DEUTSCH/ESPAÑOL

Further information available at www.ogt.com

Fluorescence *In Situ* Hybridisation (FISH) is a technique that allows DNA sequences to be detected on metaphase chromosomes or in interphase nuclei from fixed cytogenetic samples. The technique uses DNA probes that hybridise to entire chromosomes or single unique sequences, and serves as a powerful adjunct to classic cytogenetics. Recent developments have meant that this valuable technique can now be applied as an essential diagnostic tool in prenatal, haematological and pathological chromosomal analysis. Target DNA, after fixation and denaturation, is available for annealing to a similarly denatured, fluorescently labelled DNA probe, which has a complementary sequence. Following hybridisation, unbound and non-specifically bound DNA probe is removed and the DNA is counterstained for visualisation. Fluorescence microscopy then allows the visualisation of the hybridised probe on the target material.

Probe Information

The Nucleolar Organiser Regions (NOR) contain clusters of genes, which code for the three largest structural rRNA molecules (5.8S, 18S and 28S). These rRNA genes are critically important for the viability of the cell and represent around 0.5% of the human diploid genome. They are found in the short arm of the acrocentric chromosomes and are the region around which the nucleoli develop at the end of mitosis¹.

A NOR can translocate to a terminal region of another chromosome. In rare instances this can be pathogenic, particularly when the translocation has led to a deletion at the tip of the recipient chromosome². It has been suggested that the restructuring of the rRNA genes is the most common chromosomal alteration in adult solid tumours³.

In routine cytogenetic analysis, NOR can be used to delineate marker chromosomes through a process of silver staining the NOR (known as AgNOR staining⁴). However, the technique relies on translation of protein and if this is not present, conventional silver staining will not stain the NOR. CytoCell's FISH probe has been developed to overcome this problem so that presence of the acrocentric chromosomes in the marker can be accurately confirmed.

Probe Specification

NOR (Nucleolar Organizer Regions) probe is specific for rRNA genes located in the short arms of the acrocentric chromosomes (13, 14, 15, 21 and 22), labelled in red.

Materials Provided

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

Amount of red Acro-P-Arm probe: 20-25ng/test

The probe is provided premixed in hybridisation solution (Formamide; Dextran Sulphate; SSC) and is ready to use.

Counterstain: 150µl per vial (15 tests)

The counterstain is DAPI antifade (ES: 0.125µg/ml DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole)).

Warnings and Precautions

1. For *in vitro* diagnostic use. For professional use only.
2. Wear gloves when handling DNA probes and DAPI counterstain.
3. Probe mixtures contain formamide, which is a teratogen; do not breathe fumes or allow skin contact. Wear gloves, a lab coat, and handle in a fume hood. Upon disposal, flush with a large volume of water.
4. DAPI is a potential carcinogen. Handle with care; wear gloves and a lab coat. Upon disposal, flush with a large volume of water.
5. All hazardous materials should be disposed of according to your institution's guidelines for hazardous waste disposal.

Storage and Handling

The kit should be stored between -25°C to -15°C in a freezer until the expiry date indicated on the kit label. The probe and counterstain vials must be stored in the dark.

Equipment Necessary but not Supplied

1. Hotplate (with a solid plate and accurate temperature control up to 80°C).
2. Variable volume micropipettes and tips range 1µl - 200µl.
3. Water bath with accurate temperature control at 72°C.
4. Microcentrifuge tubes (0.5ml).
5. Fluorescence microscope (Please see Fluorescence Microscope Recommendation section).
6. Plastic or glass coplin jars.
7. Forceps.
8. Fluorescence grade microscope lens immersion oil.
9. Bench top centrifuge.
10. Microscope slides.
11. 24x24mm coverslips.
12. Timer.
13. 37°C incubator.
14. Rubber solution glue.

Fluorescence Microscope Recommendation

For optimal visualisation of the probe we recommend a 100-watt mercury lamp and plan apochromat objectives x63 or x100. The Triple bandpass filter DAPI/FITC/Texas Red is optimal for viewing red fluorophore and DAPI simultaneously.

Sample Preparation

The kit is designed for use on cultured peripheral blood cells fixed in Carnoy's fixative that should be prepared according to the laboratory or institution guidelines. Prepare air dried samples on microscope slides according to standard cytogenetic procedures.

FISH Protocol

(Note: Please ensure that exposure of the probe to laboratory lights is limited at all times).

Slide preparation

1. Spot the cell sample onto a glass microscope slide. Allow to dry.
2. Immerse the slide in 2xSSC for 2 minutes at room temperature (RT) without agitation.
3. Dehydrate in an ethanol series (70%, 85% and 100%), each for 2 minutes at RT.
4. Allow to dry.

Pre-Denaturation

5. Remove the probe from the freezer and allow it to warm to RT.
6. Ensure that the probe solution is uniformly mixed with a pipette.
7. Remove 10µl of probe per test, and transfer it to a microcentrifuge tube. Quickly return the remaining probe to the freezer.
8. Place the probe and the sample slide to prewarm on a 37°C (+/- 1°C) hotplate for 5 minutes.
9. Spot 10µl of probe mixture onto the cell sample and carefully apply a coverslip. Seal with rubber solution glue and allow the glue to dry completely.

Denaturation

10. Denature the sample and probe simultaneously by heating the slide on a hotplate at 75°C (+/- 1°C) for 2 minutes.

Hybridisation

11. Place the slide in a humid, lightproof container at 37°C (+/- 1°C) overnight.

Post-Hybridisation Washes

12. Remove the coverslip and all traces of glue carefully.
13. Immerse the slide in 0.4xSSC (pH 7.0) at 72°C (+/- 1°C) for 2 minutes without agitation.
14. Drain the slide and immerse it in 2xSSC, 0.05% Tween-20 at RT (pH 7.0) for 30 seconds without agitation.
15. Drain the slide and apply 10µl of DAPI antifade onto each sample.
16. Cover with a coverslip, remove any bubbles and allow the colour to develop in the dark for 10 minutes.
17. View with a fluorescence microscope.

Stability of Finished Slides

FISHed slides remain analysable for up to 1 month if stored in the dark at/or below RT.

Procedural Recommendations

1. Baking or ageing of slides is not recommended as it may reduce signal fluorescence.
2. Hybridisation conditions may be adversely affected by the use of reagents other than those provided or recommended by CytoCell Ltd.
3. The use of a calibrated thermometer is strongly recommended for measuring temperatures of solutions, waterbaths, and incubators as these temperatures are critical for optimum product performance.
4. The wash concentrations, pH and temperatures are important as low stringency can result in non-specific binding of the probe and too high stringency can result in a lack of signal.
5. Incomplete denaturation can result in lack of signal and over denaturation can also result in non-specific binding.

Expected Results

Up to ten signals, which vary in size.

Limitations

Reporting and interpretation of FISH results should be consistent with professional standards of practice and should take into consideration other clinical and diagnostic information. This kit is intended as an adjunct to other diagnostic laboratory tests and therapeutic action should not be initiated on the basis of the FISH result alone.

Additional Information

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

T: +44 (0)1223 294048

E: techsupport@cytoCELL.com

W: www.ogt.com

FRANÇAIS

L'hybridation *in situ* par fluorescence (FISH) est une technique qui permet de détecter des séquences ADN sur les chromosomes en métaphase ou sur les noyaux interphasiques d'échantillons cytogénétiques fixés cultivés ou non cultivés. La technique utilise des sondes ADN qui s'hybrident aux chromosomes entiers ou à des séquences spécifiques, et sert de test complémentaire à la cytogénétique classique. De récents développements ont démontré que cette technique informative peut maintenant être utilisée comme un outil diagnostique essentiel lors de l'analyse des chromosomes en prénatal, hématologie et pathologie. L'ADN cible, après fixation, est traité par la chaleur et à la formamide pour dénaturer la double hélice, la rendant simple hélice. L'ADN cible est alors disponible pour hybridation avec une sonde ADN complémentaire simple brin, dénaturée de la même manière et marquée avec un fluorochrome. Après hybridation, l'ADN non hybridé et l'ADN non lié spécifiquement sont éliminés par une série de lavages stringents et l'ADN est ensuite contre-coloré. Un microscope par fluorescence permet ensuite la visualisation de la sonde hybridée sur l'ADN cible.

Informations sur les sondes

Les régions de l'organisateur nucléolaire (NOR) contiennent des groupes de gènes, qui codent pour les trois plus grandes molécules structurales de l'ARN ribosomique (ARNr) (5.8s, 18s et 28s).

Ces gènes codant l'ARNr sont extrêmement importants pour la viabilité de la cellule et représentent environ 0,5 % du génome diploïde humain. Ils sont présents dans le bras court des chromosomes acrocentriques et correspondent à la région autour de laquelle les nucléoles se développent en fin de mitose¹.

Une NOR peut faire l'objet d'une translocation vers une région terminale d'un autre chromosome. Dans de rares cas, cette translocation peut être pathogène, particulièrement lorsqu'elle entraîne une délétion de l'extrémité du chromosome receveur². Il a été suggéré que la reconstruction des gènes codant l'ARNr est la plus fréquente altération chromosomique dans les tumeurs solides de l'adulte³.

Dans une analyse cytogénétique de routine, la NOR peut être utilisée pour définir des chromosomes marqueurs via un processus de coloration à l'argent de la NOR (connu sous le nom de coloration AgNOR⁴). Toutefois, la technique repose sur la traduction d'une protéine et si celle-ci est absente, une coloration à l'argent classique ne marque pas la NOR. La sonde FISH de CytoCell a été développée pour surmonter ce problème, de sorte que la présence des chromosomes acrocentriques dans le marqueur puisse être confirmée avec rigueur.

Caractéristiques de la sonde

La sonde NOR (régions de l'organisateur nucléolaire) est spécifique des gènes codant l'ARNr se trouvant dans les bras courts des chromosomes acrocentriques (13, 14, 15, 21 et 22). Elle est marquée en rouge.

Conditionnement

Sonde 50µl par tube (5 tests) ou 100µl par tube (10 tests)

Quantité de sonde Acro-P-Arm marquée en rouge : 20-25ng/test

La sonde est fournie sous forme prémélangée, prête à l'emploi, dans une solution d'hybridation (formamide ; sulfate de dextrane ; SSC).

Contre-colorant : 150µl par tube (15 tests)

Le contre-colorant est le DAPI antifading (ES: 0.125µg/ml DAPI (4,6-diamidino-2-phénylindole)).

Avertissements et précautions

1. Pour utilisation en diagnostic *in vitro*. Pour usage professionnel uniquement.
2. Porter des gants lors de la manipulation des sondes ADN et du contre-colorant DAPI.
3. La sonde contient de la formamide qui est un tératogène. Ne pas respirer les vapeurs. Ne pas mettre en contact avec la peau. Porter des gants, une blouse de laboratoire et manipuler sous une hotte. Après élimination, rincer abondamment avec de l'eau.
4. Le DAPI est un carcinogène potentiel. Manipuler avec précaution. Porter des gants et une blouse de laboratoire. Après élimination, rincer abondamment avec de l'eau.
5. Toutes matières dangereuses doivent être éliminées selon les réglementations en vigueur dans votre institution pour l'élimination des déchets dangereux.

Conservation et manipulation

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

Équipement nécessaire non fourni

1. Plaque chauffante (avec bloc et contrôle de la température jusqu'à 80°C).
2. Micropipettes 1µl - 200µl.
3. Bain-marie avec contrôle de la température à 72°C.
4. Tubes à microcentrifugation (0,5ml).
5. Microscope à fluorescence (Voir la section Microscope et filtres).
6. Jars en plastique ou en verre.
7. Forceps.
8. Huile à immersion pour microscope à fluorescence.
9. Centrifugeuse de paillasse.
10. Lames de microscope.
11. Lamelles 24x24mm.
12. Chronomètre.
13. Incubateur à 37°C.
14. Colle Rubber cement.

Microscope et filtres

Pour une visualisation optimale de la sonde, nous recommandons l'utilisation d'une lampe à mercure de 100-watts et d'objectifs plan apochromatiques x63 ou x100. Le filtre triple passe-bande DAPI/FITC/Texas Red est optimal pour la visualisation du fluorochrome rouge et du fluorochrome DAPI simultanément.

Préparation des échantillons

Le kit a été développé pour utilisation sur les cellules du sang périphérique cultivées et fixées avec du fixateur Carnoy et doivent être préparées selon les protocoles en vigueur dans le laboratoire ou institution. Préparer les lames de microscope avec les échantillons séchés à l'air selon les procédures standard de cytogénétique.

Protocole FISH

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

Préparation de la lame échantillon

1. Déposer l'échantillon cellulaire sur une lame propre. Laisser sécher.
2. Plonger la lame dans du 2xSSC pendant 2 minutes à température ambiante sans agitation.
3. Déshydrater dans une série de bains éthanol (70%, 85% et 100%), 2 minutes dans chaque bain à température ambiante.
4. Laisser sécher.

Pré-dénaturation

5. Retirez la sonde du congélateur et laissez-la réchauffer à température ambiante.
6. Assurez-vous que la solution de la sonde est mélangée de manière homogène avec une pipette.
7. Retirez 10µl de sonde par test et transférez-les dans un tube de microcentrifugation. Remplacez rapidement le reste de sonde dans le congélateur.
8. Mettre la sonde et la lame échantillon à préchauffer sur une plaque chauffante à 37°C (+/1°C) pendant 5 minutes.
9. Déposer 10µl de sonde sur l'échantillon et couvrir avec une lamelle. Sceller avec du rubber cement et laisser sécher.

Dénaturation

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

Hybridation

11. Incuber la lame pendant une nuit à 37°C (+/1°C) à l'abri de la lumière et dans une chambre humide.

Lavages post-hybridation

12. Retirer la lamelle et éliminer toutes traces de rubber cement.
13. Laver la lame dans du tampon 0.4xSSC (pH 7.0) à 72°C (+/- 1°C) pendant 2 minutes.
14. Egoutter la lame et laver dans du tampon 2xSSC, 0.05% Tween-20 (pH 7.0) à température ambiante pendant 30 secondes sans agitation.
15. Sécher la lame et appliquer 10µl de DAPI antifading sur chaque échantillon.
16. Recouvrir d'une lamelle, enlever les bulles et laisser la coloration apparaître à l'abri de la lumière pendant 10 minutes.
17. Visualiser avec un microscope à fluorescence.

Stabilité des lames

Les lames FISH sont analysables pendant un mois si elles sont conservées à l'obscurité et à l'abri au-dessous de la température ambiante.

Recommandations

1. Cuire ou vieillir les lames n'est pas recommandé, ceci pouvant réduire l'intensité du signal.
2. Les conditions d'hybridation peuvent être affectées par l'utilisation de réactifs autres que ceux fournis ou recommandés par CytoCell Ltd.
3. L'utilisation d'un thermomètre calibré est fortement recommandée pour mesurer les températures des solutions, bains-marie et incubateurs. Ces températures sont essentielles pour une efficacité optimale du produit.
4. Les concentrations des lavages (stringence), pH et température sont importants. Une faible stringence peut résulter en une liaison non-spécifique de la sonde et une trop forte stringence peut résulter en une perte de signal.
5. Une dénaturation incomplète peut engendrer une perte de signal et une trop forte dénaturation une hybridation non-spécifique.

Résultats attendus

Jusqu'à dix signaux, dont la taille peut varier.

Limitations

La diffusion et l'interprétation du test FISH doivent être effectués conformément aux normes professionnelles mises en pratique et tout en prenant en considération les autres informations cliniques et diagnostiques disponibles. Ce kit est développé comme un test complémentaire à la cytogénétique classique, pour cette raison des actions thérapeutiques ne doivent pas être lancées sur la seule base des résultats du test FISH.

Informations supplémentaires

Pour plus d'informations sur le produit, veuillez contacter l'Assistance technique CytoCell.

T: +44 (0)1223 294048

E: techsupport@cytoCELL.com

W: www.ogt.com

ITALIANO

L'ibridazione *in situ* in fluorescenza (Fluorescence *In Situ* Hybridisation - FISH) è una tecnica che permette di rilevare sequenze di DNA su cromosomi in metafase o in nuclei in interfase di campioni citogenetici fissati, o in coltura dopo prelievo. La tecnica prevede l'utilizzo di sonde di DNA in grado di ibridare con l'intero cromosoma o con singole sequenze. La FISH costituisce quindi un potente strumento in aggiunta alle tecniche citogenetiche classiche. Recenti sviluppi hanno reso possibile che questa preziosa tecnica può ora essere applicata come strumento diagnostico essenziale nell'analisi cromosomica prenatale, ematologica e patologica. Il DNA bersaglio, dopo la fissazione, è sottoposto a denaturazione al calore in presenza di formamide: il DNA bersaglio è così disponibile per l'annealing con una sonda di DNA a singola elica a sequenza complementare, marcata con una sostanza fluorescente. Terminata l'ibridazione, la sonda di DNA non legata o legata in modo non specifico, è rimossa per mezzo di lavaggi stringenti ed il DNA è in seguito colorato con un colorante di contrasto. L'ibridazione della sonda viene infine analizzata con un microscopio a fluorescenza.

Informazioni sulle sonde

Le regioni di organizzazione nucleolare (Nucleolar Organizer Regions, NOR) contengono cluster di geni, che codificano le tre molecole strutturali più grandi dell'rRNA (5.8S, 18S e 28S). Questi geni rRNA hanno un'importanza critica per la vitalità della cellula e rappresentano circa lo 0,5% del genoma diploide umano. Sono stati trovati nel braccio corto dei cromosomi acrocentrici e sono la regione attorno a cui si sviluppano i nucleoli alla fine della mitosi¹.

Una NOR può traslocare in una regione terminale di un altro cromosoma. In rari casi questo può essere patogenico, particolarmente quando la traslocazione ha portato a una delezione alla punta del cromosoma ricevente². È stato suggerito che la ristrutturazione dei geni rRNA sia l'alterazione cromosomica più comune nei tumori solidi negli adulti³.

Nell'analisi citogenetica di routine, la NOR può essere utilizzata per delineare cromosomi marcatori attraverso un processo di colorazione con l'argento della NOR (nota come colorazione AgNOR⁴). Tuttavia, la tecnica fa affidamento su una traslazione proteica e, se questa non è presente, la convenzionale colorazione con argento non colora la NOR. La sonda FISH di CytoCell è stata sviluppata per superare questo problema in modo che la presenza dei cromosomi acrocentrici nel marcatore possa essere accuratamente confermata.

Caratteristiche della sonde

La sonda NOR (regioni di organizzazione nucleolare) è specifica per geni rRNA che si trovano nei bracci corti dei cromosomi acrocentrici (13, 14, 15, 21 e 22), marcati in rosso.

Materiali forniti

Sonda: 50µl per provetta (5 test) o 100µl per provetta (10 test)

Quantità di sonda rossa Acro-P-Arm: 20-25ng/test

La sonda viene consegnata premiscelata in soluzione di ibridazione (Formamide; Dextran Solfato; SSC) ed è pronta all'uso.

Colorante di contrasto: 150µl per provetta (15 test)

Il colorante di contrasto è il DAPI antifade (ES: 0,125µg/ml DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindole)).

Avvertenze e misure precauzionali

1. Per uso diagnostico *in vitro*. Per uso professionale.
2. Quando si manipolano le sonde ed il colorante di contrasto DAPI è necessario indossare i guanti.

- Le miscele di sonda contengono formamide, una sostanza teratogena. Non respirare i fumi ed evitare il contatto con la pelle. Indossare guanti, camice da laboratorio e maneggiare in una cappa aspirante. Per lo smaltimento, lavare con grandi quantità di acqua.
- Il DAPI è un potenziale cancerogeno. Maneggiare con cura, indossare guanti ed un camice da laboratorio. Per lo smaltimento, lavare con grandi quantità di acqua.
- Eseguire lo smaltimento dei materiali pericolosi nel rispetto delle normative interne dell'istituzione relative allo smaltimento dei residui tossici.

Conservazione e utilizzo

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

Apparecchiature necessari non forniti

- Piastra riscaldante (con - un controllo accurato della temperatura fino ad 80°C).
- Micropipette a volume variabile compreso tra 1µl - 200µl.
- Bagno termostato con controllo accurato della temperatura a 72°C.
- Provette da microcentrifuga (0,5 ml).
- Microscopio a fluorescenza (riferirsi alla sezione Configurazione ottimale del microscopio e dei filtri).
- Contenitori di Coplin in plastica o vetro.
- Pinzette.
- Olio per lenti ad immersione del microscopio a fluorescenza.
- Centrifuga da banco.
- Vetrini da microscopia.
- 24x24 mm vetrini coprioggetto.
- Timer.
- Incubatore a 37°C.
- Colla per vetrini.

Configurazione ottimale del microscopio e dei filtri

Per una visualizzazione ottimale della sonda si raccomanda di utilizzare una lampada a mercurio da 100-watt ed obiettivi plan apochromat 63x e 100x. Il triplo filtro passa banda DAPI/FITC/Texas Red è ottimale per visualizzare fluoroforo rosso e DAPI simultaneamente.

Preparazione del campione

Il kit è stato progettato per l'utilizzo con cellule del sangue periferico coltivate, fissate nel fissativo di Carnoy e preparate secondo le linee guida del laboratorio o dell'istituzione. Stendere i campioni da analizzare su vetrini da microscopia secondo le procedure citogenetiche standard.

Protocollo

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

Preparazione del vetrino

- Caricare il campione cellulare su un vetrino da microscopia. Lasciare asciugare i vetrini.
- Immergere i vetrini in 2xSSC per 2 minuti a temperatura ambiente (TA) senza agitazione.
- Disidratare in una serie di diluizioni di etanolo (70%, 85% e 100%), ognuna per 2 minuti a TA.
- Lasciare asciugare il vetrino.

Pre-denaturazione

- Rimuovere la sonda dal congelatore e lasciarla riscaldare a TA.
- Accertarsi che la soluzione della sonda sia miscelata in modo uniforme mediante l'uso di una pipetta.
- Pipettare 10µl di sonda per test e inserirli in una provetta da microcentrifuga. Ripetere velocemente la sonda non utilizzata nel congelatore.
- Pre-riscaldare la sonda, il vetrino ed il coprioggetto su una piastra riscaldante a 37°C (+/- 1°C) per 5 minuti.
- Caricare 10µl di miscela della sonda sul campione cellulare e coprire delicatamente con il coprioggetto. Sigillare con soluzione collante gommosa e far asciugare completamente.

Denaturazione

- Denaturare simultaneamente il campione e la sonda riscaldando il vetrino su una piastra riscaldante a 75°C (+/- 1°C) per 2 minuti.

Ibridazione

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

Lavaggi post-ibridazione

- Rimuovere accuratamente il vetrino coprioggetto e tutte le tracce di colla.
- Lavare il vetrino in 0,4xSSC (pH 7,0) a 72°C (+/- 1°C) per 2 minuti, senza agitazione.
- Scolare il vetrino e lavare in 2xSSC, Tween-20 0,05% (pH 7,0) a TA per 30 secondi senza agitazione.
- Scolare i vetrini e applicare 10µl di DAPI antifade su ciascun campione.
- Coprire con un vetrino coprioggetto, rimuovere eventuali bolle e attendere 10 minuti lasciando il vetrino al buio.
- Analizzare con il microscopio a fluorescenza.

Stabilità del vetrino finito

I vetrini FISH restano analizzabili per circa 1 mese se conservati al buio a temperatura ambiente o inferiore.

Raccomandazioni per l'uso

- L'eccessivo riscaldamento o l'invecchiamento dei vetrini non è raccomandato in quanto potrebbe ridurre la fluorescenza del segnale.
- Le condizioni di ibridazione potrebbero essere influenzate negativamente dall'impiego di reagenti differenti rispetto a quelli forniti o raccomandati da CytoCell Ltd.
- L'utilizzo di un termometro calibrato è fortemente raccomandato per la misurazione delle temperature delle soluzioni, dei bagni termostati e degli incubatori in quanto queste temperature sono di fondamentale importanza per la performance ottimale del prodotto.
- Le concentrazioni del lavaggio (stringenza), il pH e la temperatura sono di fondamentale importanza in quanto condizioni di stringenza blande possono favorire un legame non specifico della sonda e condizioni di stringenza troppo elevate possono condurre alla perdita del segnale.
- La denaturazione incompleta può tradursi in una perdita del segnale mentre una denaturazione eccessiva può anche tradursi in un legame non specifico.

Risultati attesi

Fino a dieci segnali, che possono variare nelle dimensioni.

Limitazioni

La refertazione e l'interpretazione dei risultati della FISH devono essere coerenti con gli standard professionali della pratica medica e dovrebbe prendere in considerazione altre informazioni cliniche e diagnostiche. Questo kit è concepito in aggiunta alla tecnica citogenetica classica e azione terapeutica non deve essere messa in atto esclusivamente sulla base del risultato di FISH.

Informazioni aggiuntive

Per informazioni aggiuntive sul prodotto contattare il Dipartimento di Assistenza Tecnica CytoCell.

T: +44 (0)1223 294048

E: techsupport@cytozell.com

W: www.oqt.com

DEUTSCH

Die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) ist eine Technik, mit der DNA-Sequenzen auf Metaphase-Chromosomen oder Interphase-Kernen in fixierten zytogenetischen Proben nachgewiesen werden können. Dabei werden DNA-Sonden verwendet, die an ganze Chromosomen oder einzelne, einmalige Sequenzen hybridisieren. Kürzliche Entwicklungen haben gezeigt, dass diese nützliche Technik nun auch als essentielles diagnostisches Werkzeug für pränatale, hämatologische und pathologische Chromosomenanalysen eingesetzt werden kann. Nachdem die zu untersuchende DNA fixiert und denaturiert wurde, kann die Fluoreszenz markierte, einzelsträngige Sonde daran binden. Nach der Hybridisierung werden nicht gebundene sowie unspezifisch gebundene DNA-Sonden durch eine Reihe von Waschküngen entfernt und die DNA zur Visualisierung gefärbt. Unter dem Fluoreszenzmikroskop wird dann die hybridisierte Sonde am Zielmaterial erkennbar.

Sondeninformation

Die Nucleolar Organizer Regions (NOR) enthalten Gencluster, die die drei größten Struktur-rRNA-Moleküle (5.8S, 18S und 28S) kodieren.

Diese rRNA-Gene sind für die Lebensfähigkeit der Zelle von entscheidender Bedeutung und stellen ungefähr 0,5 % des menschlichen diploiden Genoms. Sie befinden sich im kurzen Arm der akrozentrischen Chromosomen und sind die Region, um die herum sich am Ende der Mitose die Nucleoli entwickeln¹.

Eine NOR kann an eine terminale Region eines anderen Chromosoms translozieren. Dies kam in seltenen Fällen pathogen sein, speziell wenn die Translokation zu einer Deletion an der Spitze des Empfängerchromosoms geführt hat². Es gibt Hinweise darauf, dass die Umstrukturierung der rRNA-Gene die häufigste chromosomale Veränderung in adulten soliden Tumoren ist³.

Die NOR kann in zytogenetischen Routineanalysen verwendet werden, um Marker-Chromosomen durch einen Prozess der Silberfärbung der NOR darzustellen (bekannt als AgNOR-Färbung⁴). Diese Technik basiert jedoch auf der Translation von Protein, und falls dies nicht vorhanden ist, wird die konventionelle Silberfärbung die NOR nicht anfärben. Zur Lösung dieses Problems wurde die FISH-Sonde von CytoCell entwickelt, so dass die Anwesenheit der akrozentrischen Chromosomen in dem Marker genau bestätigt werden kann.

Sondenspezifikation

Die NOR (Nucleolar Organizer Regions)-Sonde ist spezifisch für rRNA-Gene, die in den kurzen Armen der akrozentrischen Chromosomen (13, 14, 15, 21 und 22) lokalisiert sind, und ist rot markiert.

Kitkomponenten

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

Menge der roten Acro-P-Arm-Sonde: 20-25 ng/Test

Die Sonde wird vorgemischt in Hybridisierungslösung (Formamid; Dextransulfat; SSC) geliefert und ist gebrauchsfertig.

Gegenfärbung: 150µl pro Röhrchen (15 Tests)

Die Gegenfärbung besteht aus DAPI antifade (ES: 0.125µg/ml DAPI (4,6-Diamidino-2-Phenylindol)).

Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen

- Zur Verwendung in der *in vitro* Diagnostik. Durchführung ausschließlich durch qualifiziertes Laborpersonal.
- Beim Umgang mit DNA-Sonden und der DAPI-Gegenfärbung Handschuhe tragen.
- Sonneneinstrahlung enthalten Formamid, das teratogen ist. Keine Dämpfe einatmen und nicht mit der Haut in Berührung bringen. Handschuhe und Labormantel tragen und unter einer Abzugshaube arbeiten. Bei der Entsorgung mit viel Wasser nachspülen.
- DAPI ist ein potentiell Karzinogen. Vorsichtig damit umgehen, Handschuhe und Labormantel tragen. Bei der Entsorgung mit viel Wasser nachspülen.
- Alle Gefahrstoffe sollten gemäß den Ihren hausinternen Richtlinien zur Gefahrstoffentsorgung entsorgt werden.

Lagerung und Behandlung

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

Benötigte, aber nicht mitgelieferte Laborgeräte

- Heizplatte (mit stabiler Heizplatte und genauer Temperaturregelung bis 80°C).
- Micropipetten mit variablem Volumen von 1µl - 200µl.
- Wasserbad mit genauer Temperaturkontrolle bei 72°C.
- Mikro-Zentrifugenröhrchen (0,5ml).
- Fluoreszenzmikroskop (siehe auch "Empfehlungen zum Fluoreszenzmikroskop").
- Coplin-Färbetrog aus Kunststoff oder Glas.
- Pinzette.
- Für Fluoreszenzobjektive geeignetes Immersionsöl.
- Tischzentrifuge.
- Objektträger für das Mikroskop.
- 24x24mm Deckgläser.
- Timer.
- 37°C Inkubator.
- Gummilösung zum Versiegeln der Deckglasränder.

Empfehlungen zum Fluoreszenzmikroskop

Zur bestmöglichen Beobachtung der Probe empfehlen wir die Verwendung einer 100-watt Quecksilberdampfampe und von Plan Achromat Objektiven mit 63-facher oder 100-facher Vergrößerung. Der Dreifachbandfilter DAPI/FITC/Texas Rot ist optimal, um gleichzeitig rotes Fluorophor und DAPI anzuzeigen.

Probenvorbereitung

Der Kit ist für Verwendung an kultivierten, peripheren Blutzellen die in Carnoy's Fixativ fixiert sind, ausgelegt. Die Vorbereitung erfolgt entsprechend der Laborrichtlinien. Fertigen Sie die luftgetrockneten Proben auf Objektträgern entsprechend der zytogenetischen Standardvorschriften an.

FISH-Protokoll

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

Vorbereitung des Objektträgers

- Zellprobe auf Objektträger auftragen und trocknen lassen.
- Den Objektträger in 2xSSC für 2 Minuten bei RT eintauchen (schütteln nicht notwendig).
- Dehydratation mittels Alkoholreihe (70%, 85% und 100%), jeweils für 2 Minuten bei RT.
- Trocknen lassen.

Prä-denaturierung

- Entnehmen Sie die Probe aus dem Gefrierschrank und lassen Sie sie Raumtemperatur annehmen.
- Stellen Sie sicher, dass die Probenlösung gleichmäßig mit einer Pipette gemischt wird.

7. Entrenen Sie pro Test 10µl der Probe und fñllen Sie sie in ein Mikrozentrifugengefäß um. Stellen Sie die restliche Probe schnell wieder zurück in den Gefrierschrank.
8. Sonda und Probenobjektträger 5 Minuten auf einer Heizplatte bei 37°C (+/- 1°C) vorwärmen.
9. 10µl Sondenmischung auf die Zellprobe auftropfen und Deckglas sorgfältig auflegen. Mit Gummikleber-Lösung versiegeln und vollständig trocknen lassen.

Denaturierung

10. Denaturieren sie Probe und Sonda gleichzeitig durch 2 minütiges Erwärmen des Objektträgers auf einer Heizplatte bei 75°C (+/- 1°C).

Hybridisierung

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

Waschen nach der Hybridisierung

12. Deckgläschen und alle Kleberspuren vorsichtig entfernen.
13. Objektträger 2 Minuten in 0,4 x SSC (pH 7,0) bei 72°C (+/- 1°C) waschen.
14. Objektträger abtropfen lassen und 30 Sekunden in 2 x SSC, 0,05% Tween-20 bei RT, (pH 7,0), waschen.
15. Den Objektträger abtropfen lassen und 10µl des DAPI Antifade zu jeder Probe geben.
16. Mit einem Deckglas abdecken, die Luftblasen entfernen and 10 Minuten unter Lichtschutz entwickeln lassen.
17. Unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachten.

Stabilität der fertigen Objektträger

Objektträger mit FISH-Proben können bis zu einem Monat lang analysiert werden, wenn sie im Dunkeln bei oder unter Raumtemperatur gelagert werden.

Empfehlungen zur Durchführung

1. Es wird empfohlen, die Auswertung prompt durchzuführen, da das Fluoreszenzsignal mit der Zeit abnimmt. Wärme kann ebenfalls zur Abnahme der Fluoreszenz führen.
2. Durch die Verwendung von anderen Reagenzien, als den von CytoCell Ltd. empfohlenen, können die Hybridisierungsbedingungen negativ beeinflusst werden.
3. Es wird dringend empfohlen, zur Temperaturmessung von Lösungen, Wasserbädern und Inkubatoren ein geeichtes Thermometer zu verwenden, da diese Temperaturen für die optimale Leistung des Produkts ausschlaggebend sind.
4. Die Konzentrationen der Waschlösungen (Stringenz), pH und Temperatur sind wichtig, da niedrig stringente Bedingungen zu nicht-spezifischer Bindung der Sonden führen kann und zu hohe Stringenz zum Verlust des Signals.
5. Unvollständige Denaturierung kann zu einem Verlust des Signals führen und übermäßige Denaturierung kann zu nicht-spezifischer Bindung der Sonda führen.

Zu erwartende Ergebnisse

Bis zu zehn Signale mit unterschiedlicher Größe.

Einschränkungen

Protokollierung und Interpretation der FISH Tests sollte nach professionellen Standards für die Praxis und unter Berücksichtigung anderer klinischer und diagnostischer Informationen. Der Test ist als Ergänzung zur klassischen Zytogenetik zu verstehen. Daher sollten therapeutische Maßnahmen nicht allein auf Grundlage der FISH-Ergebnisse veranlasst.

Weitere Informationen:

Weitere Produktinformationen erhalten Sie vom Technischen Kundendienst von CytoCell.

T: +44 (0)1223 294048

E: techsupport@cytoCELL.com

W: www.ogt.com

ESPAÑOL

La hibridación *in situ* fluorescente (FISH) es una técnica que permite detectar secuencias de ADN en cromosomas metafásicos o núcleos interfásicos en muestras citogenéticas y fijadas. En la técnica se utiliza una sonda de ADN que hibrida los cromosomas completos o las secuencias únicas simples y es un complemento útil para la citogenética clásica. Recientes estudios indican que esta es una técnica que puede aplicarse como herramienta esencial de diagnóstico prenatal, hematológico y patológico. Después de la fijación, el ADN diana se trata con calor para desnaturar el ADN bicatenario haciendo que resulte monocatenario. El ADN diana queda entonces disponible para hibridarlo con una sonda de ADN igualmente desnaturado, monocatenario marcado con fluorescencia que tiene una secuencia complementaria. Después de la hibridación la sonda de ADN no específicamente hibridada y no hibridada se elimina y se aplica un contraste al ADN para su visualización. El uso de un microscopio de fluorescencia permite la visualización de la sonda hibridada en el material utilizado.

Información sobre las sondas

Las regiones organizadoras nucleolares (del inglés, NOR) contienen complejos génicos que codifican las tres moléculas de ARNr de mayor estructura (5,8 S, 18 S y 28 S). Estos genes del ARNr poseen una importancia crucial para la viabilidad de la célula y representan aproximadamente el 0,5% del genoma diploide humano. Se encuentran en el brazo corto de los cromosomas acrocéntricos y constituyen la región alrededor de la cual se desarrollan los nucleolos al final de la mitosis¹.

Una NOR se puede translocar a una región terminal de otro cromosoma. Rara vez es patógena en concreto, cuando la translocación ha dado lugar a una delección en la punta del cromosoma receptor². Se ha sugerido que la reestructuración de los genes del ARNr es la alteración cromosómica más frecuente en los tumores sólidos de adultos.³ En los análisis citogenéticos de rutina, las NOR se pueden usar para delimitar cromosomas marcadores a través de un proceso de tinción argéntica de la NOR (conocida como tinción AgNOR⁴). No obstante, esta técnica depende de la traducción de la proteína y, si esta no existe, la tinción argéntica convencional no tendrá la NOR. Para superar este problema CytoCell desarrolló la sonda FISH, de modo que se pueda confirmar con precisión la presencia de los cromosomas acrocéntricos en el marcador.

Especificaciones de la sonda

La sonda para NOR (regiones organizadoras nucleolares) es específica de los genes de ARNr localizados en los brazos cortos de los cromosomas acrocéntricos (13, 14, 15, 21 y 22) marcados en rojo.

Material proporcionado

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

Cantidad de la sonda roja para brazos p de cromosomas acrocéntricos (Acro-P-Arm): 20-25 ng/reacción

La sonda se presenta premezclada en solución de hibridación (formamida; sulfato de dextran SSC), lista para usar.

Contraste: 150µl por vial (15 reacciones)

DAPI Antifade (ES: 0.125µg/ml DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol)).

Avisos y precauciones

1. Para diagnóstico *in vitro*. Sólo para uso profesional.
2. Utilizar guantes al manipular las sondas de ADN y la contraindicación DAPI.
3. La sonda contiene formamida, que es teratogénica; no respire los vapores y evite el contacto con la piel. Utilizar guantes, bata de laboratorio y manipular utilizando la campana de humos. Para eliminarla, aclarar con abundante agua.

4. La contraindicación DAPI puede producir cáncer. Manipular con cuidado; utilizar guantes y bata de laboratorio. Para eliminarla, aclarar con abundante agua.
5. Las sustancias peligrosas deben eliminarse de acuerdo con las instrucciones de su institución en relación con la eliminación de sustancias peligrosas.

Almacenamiento y manejo

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

Equipo necesario pero no proporcionados

1. Placa caliente (con una placa sólida y un control de temperatura preciso hasta 80°C).
2. Micropipetas de volumen variable (rango 1µl - 200µl).
3. Baño de agua con control preciso de temperatura a 72°C.
4. Tubos de microcentrifugado (0,5ml).
5. Microscopio de fluorescencia (lea la sección Recomendaciones para el microscopio de fluorescencia).
6. Recipientes de cristal y de plástico.
7. Pinzas.
8. Microscopio de fluorescencia con objetivo de inmersión en aceite.
9. Centrifuga de banco.
10. Portaobjetos para microscopio.
11. Cubreobjetos de 24x24mm.
12. Cronómetro.
13. Incubador 37°C.
14. Pegamento.

Recomendaciones para el microscopio de fluorescencia

Para una visualización óptima de la sonda, se recomienda utilizar una lámpara de mercurio de 100 vatios y objetivos x63 o x100 Plan-Apochromat. El filtro de triple banda DAPI/FITC/Texas Red es óptimo para ver simultáneamente los tres fluorocromos.

Preparación de la muestra

El kit está diseñado para su uso en células sanguíneas periféricas cultivadas y fijadas en fijador de Carnoy, y deben prepararse de acuerdo con las instrucciones del laboratorio o la institución. Prepare extensiones celulares sobre portaobjetos para microscopio de acuerdo con los procedimientos generales utilizados en citogenética.

Protocolo FISH

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

Preparación del portaobjetos

1. Extender la muestra en un portaobjetos. Dejarlo secar.
2. Sumerja el portaobjetos en 2xSSC durante 2 minutos a temperatura ambiente sin agitación.
3. Deshidrate en una serie de etanol (70%, 85% y 100%), 2 minutos en cada una a TA.
4. Dejarlo secar.

Antes de la desnaturalización

5. Retire la sonda del congelador y deje que alcance la temperatura ambiente.
6. Asegúrese de que la solución de la sonda quede homogéneamente mezclada con una pipeta.
7. Retire 10µl de la sonda en cada prueba y transféralo a un tubo de microcentrifuga. Vuelva a colocar la solución que queda en la sonda al congelador.
8. Precaliente el portaobjetos y la muestra en una placa caliente a 37°C (+/- 1°C) durante 5 minutos.
9. Ponga 10µl de sonda sobre el portaobjetos y aplique cuidadosamente el cubreobjetos. Selle con solución de goma y deje secar completamente.

Desnaturalización

10. Desnaturalice la muestra y la sonda simultáneamente calentando el porta en la placa caliente a 75°C (+/- 1°C) durante 2 minutos.

Hibridación

11. Ponga el porta en un contenedor húmedo a prueba de luz a 37°C (+/- 1°C) toda la noche.

Lavados post-hibridación

12. Quite el cubreobjetos y los restos de goma cuidadosamente.
13. Lave el portaobjetos en 0,4xSSC (pH 7,0) a 72°C (+/- 1°C) durante 2 minutos.
14. Seque el portaobjetos y lávelo en 2 x SSC, 0,05% Tween-20 (pH 7,0) a TA durante 30 segundos sin agitación.
15. Escurra el portaobjetos y añada 10µl de DAPI antifade sobre cada muestra.
16. Aplique un cubreobjetos, elimine burbujas y deje reposar en oscuridad durante 10 minutos.
17. Obsérvelo con el microscopio de fluorescencia.

Estabilidad de los portaobjetos terminados

Los portaobjetos de FISH permanecen analizables durante 1 mes si se han almacenado en la oscuridad y por debajo de la temperatura ambiente.

Recomendaciones de procedimiento

1. No se recomienda calentar ni envejecer los portaobjetos ya que se podría reducir la fluorescencia de la señal.
2. Las condiciones de hibridación pueden verse afectadas negativamente con el uso de reactivos distintos de los suministrados o recomendados por CytoCell Ltd.
3. Se recomienda encarecidamente el uso de un termómetro calibrado para medir las temperaturas de soluciones, baños de agua e incubadores ya que estas temperaturas son cruciales para el rendimiento óptimo del producto.
4. Las concentraciones del lavado (estringencia), el pH y la temperatura son importantes ya que una estringencia baja puede provocar una fijación no específica de la sonda y demasiada estringencia puede derivar en una falta de señal.
5. Una desnaturalización incompleta puede provocar falta de señal y una desnaturalización excesiva también puede originar una fijación no específica.

Resultados esperados

Hasta diez señales de tamaño variable.

Limitaciones

La comunicación y la interpretación de FISH debe ser conforme a los estándares de prácticas profesionales, y debe tener en consideración otra información clínica y de diagnóstico. Esta prueba está diseñada como un complemento de la citogenética clásica y no deben tomarse medidas terapéuticas basándose únicamente en el resultado de FISH.

Información adicional






Si desea obtener información adicional sobre el producto, póngase en contacto con el Departamento de soporte técnico de CytoCell.

T: +44 (0)1223 294048

E: techsupport@cytoCELL.com

W: www.ogt.com

1. McClintock B, Z Zellforsch Mikrosk Anat 1934;21:294-328
2. Gardner RJM, Grant R Sutherland. Chromosome abnormalities and genetic counseling, Oxford University Press p240 2004
3. Stults DM *et al.*, Cancer Res 2009;69(23):9096-104
4. Goodpasture C, Bloom SE, Chromosoma 1975;53:37-50

REF	EN: Catalogue number DE: Bestellnummer FR: Référence du catalogue IT: Riferimento di Catalogo ES: Número de catálogo
IVD	EN: <i>In vitro</i> diagnostic device DE: <i>In-vitro</i> -Diagnostikum FR: Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i> IT: Dispositivo medico-diagnostico <i>in vitro</i> ES: Producto sanitario para diagnóstico <i>in vitro</i>
LOT	EN: Batch code DE: Loscode FR: Code du lot IT: Codice di lotto ES: Código
	EN: Consult instructions for use DE: Gebrauchsanweisung beachten FR: Consulter la notice d'utilisation IT: Consultare le istruzioni per l'uso ES: Consúltense las instrucciones de uso
	EN: Manufacturer DE: Hersteller FR: Fabricant IT: Fabbicante ES: Fabricante
	EN: Use by DE: Verwendbar bis FR: Utiliser jusqu'au IT: Utilizzare entro ES: Fecha de caducidad
	EN: Temperature limitation DE: Temperaturbegrenzung FR: Limites de température IT: Limiti di temperatura ES: Limitación de temperatura
	EN: Sufficient for <n> tests DE: Ausreichend für FR: Suffisant pour IT: Sufficiente per ES: Válido para
CONT	EN: Contents DE: Inhalt FR: Contenu IT: Contenuto ES: Contenido

Patents and Trademarks

CytoCell is a registered trademark of CytoCell Ltd.

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



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