



A Sysmex Group Company



Instructions for Use

REF: RU-LPA 001

Prenatal Enumeration Probe kit

Research Use Only

Further information available at [www.ogt.com](http://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 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.

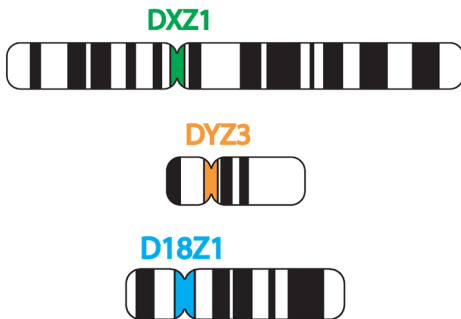
**Intended Use**

This product is intended to be used for research use only and is not for use in diagnostic procedures.

**Probe Specification**

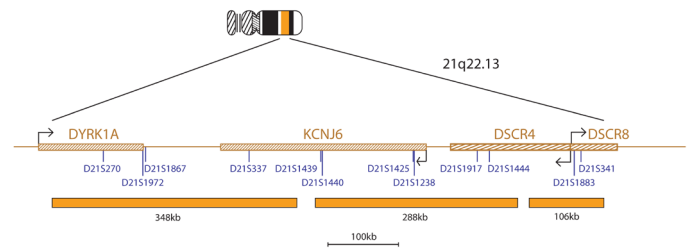
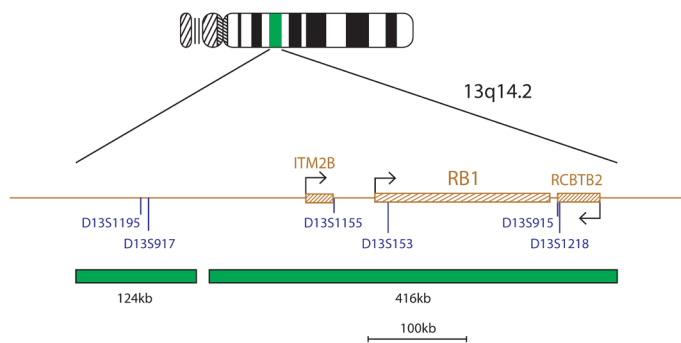
**Probe set 1**

X centromere, Xp11.1 – q11.1 (DXZ1) Green  
Y centromere, Yp11.1 – q11.1 (DYZ3) Orange  
18 centromere, 18p11.1 – q11.1 (D18Z1) Blue



**Probe set 2:**

13 unique sequence, 13q14.2 Green  
21 unique sequence, 21q22.13 Orange



The kit contains two probe sets for two separate hybridisations.

**Probe set 1**

The probe set X, Y and 18 is a mixture of green, orange and blue directly labelled fluorescent DNA probes specific for the alpha satellite DNA sequences at the DXZ1, DYZ3 and D18Z1 regions of the chromosomes X, Y and 18 respectively.

**Probe set 2**

The probe set 13 and 21 is a mixture of green and orange directly labelled fluorescent DNA probes containing unique sequences. The chromosome 13 probe includes RB1 gene as well as markers D13S1195, D13S1155 and D13S915. The chromosome 21 probe includes markers D21S270, D21S1867, D21S337, D21S1425, D21S1444 and D21S341.

**Materials Provided**

**Probe:** 50µl per vial, 100µl per vial, 300µl per vial or 500µl per vial

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

**Counterstain:** 150µl per vial, 500µl per vial, 1000µl per vial or 1200µl per vial

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

**Warnings and Precautions**

1. For research use only. Not for use in diagnostic procedures. 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.
6. Precautions should be taken to prevent contamination between the vials containing probe set 1 and probe set 2.

**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.

**Protocol Recommendations**

**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 37°C and 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/TRITC is optimal for viewing the green and orange fluorophores as well as counterstain simultaneously. The blue fluorophore has specificity to the Aqua and DEAC spectrum (single bandpass Aqua or DEAC filter is required). The triple bandpass filter DAPI/FITC/Texas Red can be used to view all three fluorophores and DAPI simultaneously.

**Sample Preparation**

Sample preparation should be performed according to the laboratory or institution guidelines.

Amniotic fluid samples that appear bloody or brown should not be used, since they may contain maternal blood and may lead to false results.

**Suggested Protocol**

**Preparation of fresh amniotic fluid samples for FISH:**

1. Centrifuge 2 – 5ml of whole amniotic fluid specimen for 7 minutes at 180xg, carefully remove the supernatant without disturbing the cell pellet.
2. Resuspend the pellet in 2ml of 0.075M KCl. Leave at room temperature (RT) for 5 minutes.
3. Add 2ml of fresh fixative (3:1 methanol:glacial acetic acid) to the cells/hypotonic solution, adding the first ml dropwise whilst continuously mixing. Mix well.

4. Centrifuge the suspension for 5 minutes at 280xg, carefully remove the supernatant and resuspend the pellet in 2ml of fresh fixative.
5. Fixed specimens can be stored at this stage in a freezer at -20°C.
6. If the sample is not to be frozen, centrifuge the tube at 280xg for 5 minutes. Remove as much supernatant as possible without disturbing the cell pellet. Flick the tube to resuspend the pellet in the small amount of fluid remaining.
7. To prepare slides for FISH, spot the cell suspension directly onto slide. Allow to air dry.

#### Recommended slide Pretreatment:

1. Immerse the slide prepared from uncultured amniocytes in 2xSSC for 1 hour at 37°C.
2. Place the slide in freshly made pepsin working solution (5mg of pepsin added to 100ml of 0.01M HCl) for 13 minutes at 37°C.
3. Immerse the slide in phosphate buffered saline (PBS) at RT for 5 minutes.
4. Immerse the slide in post fixation solution (0.95% formaldehyde: 1.0ml of 37% formaldehyde, 0.18g of MgCl<sub>2</sub> and 39.0ml of PBS) for 5 minutes at RT.
5. Immerse the slide in PBS at RT for 5 minutes.
6. Immerse the slide in 70% ethanol at RT. Allow the slide to stand in the ethanol wash for 1 minute.
7. Remove the slide from 70% ethanol. Repeat step 6 with 85% ethanol, followed by 100% ethanol.
8. Allow to air dry.

#### FISH Protocol

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

#### Slide preparation (skip this step if the slide was pretreated according to the protocol above)

1. Spot the cell sample onto a glass microscope slide. Allow to dry.
2. Immerse the slide in 2xSSC for 2 minutes at 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 hybridisation area.
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

##### Probe set 1:

A normal female cell should show 2 green and 2 blue signals (2G, 2B). A normal male cell should show 1 green, 1 orange and 2 blue signals (1G, 1O, 2B). Cells with an extra chromosome 18 should show 2 green and 3 blue signals (2G, 3B) for female samples and 1 green, 1 orange, 3 blue (1G, 1O, 3B) for male samples. There are multiple different combinations of signal patterns possible for the X and Y chromosomes other than those normal signal patterns outlined above. The DXZ1 probe may show cross-hybridisation to the centromeres of chromosome 11, 17 and Y

##### Probe set 2:

A normal cell should show 2 green and 2 orange signals (2G, 2O). Cells with an extra chromosome 13 should show 3 green and 2 orange signals (3G, 2O). Cells

with an extra chromosome 21 should show 2 green and 3 orange signals (2G, 3O).

#### 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 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 l'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 à fluorescence permet ensuite la visualisation de la sonde hybridée sur l'ADN cible.

#### Utilisation Prévue

Ce produit est destiné à être utilisé à des fins de recherche uniquement et n'est pas destiné à être utilisé dans les procédures de diagnostic.

#### Caractéristiques de la sonde

##### Sonde 1

Sonde de la région centromère X a-satellite Xp11.1 – q11.1 (DXZ1) en vert  
Sonde de la région centromère Y a-satellite Yp11.1 – q11.1 (DYZ3) en orange  
Sonde de la région centromère 18 a-satellite 18p11.1 – q11.1 (D18Z1) en bleu

##### Sonde 2

Sonde de la région 13 séquence unique 13q14.2 en vert  
Sonde de la région 21 séquence unique 21q22.13 en orange

Le kit contient deux sondes pour deux hybridations distinctes.

##### Sonde 1:

Les sondes des chromosomes X, Y et 18 sont un ensemble de sondes ADN directement marquées avec un fluorochrome vert, orange et bleu et qui sont spécialement conçues pour les séquences d'ADN par alpha satellite dans les régions DXZ1, DYZ3 et D18Z1 respectives des chromosomes X, Y et 18.

##### Sonde 2:

Les sondes des chromosomes 13 et 21 sont un ensemble de sondes ADN directement marquées avec un fluorochrome vert et orange et qui contiennent des séquences uniques. La sonde du chromosome 13 inclut le gène RB1 ainsi que les marqueurs D13S1195, D13S1155 et D13S915. La sonde du chromosome 21 inclut les marqueurs D21S270, D21S1867, D21S337, D21S1425, D21S1444 et D21S341.

#### Conditionnement

Sonde : 50µl par tube, 100µl par tube, 300µl par tube ou 500µl par tube

Contre-colorant: 150µl par tube, 500µl par tube, 1000µl par tube ou 1200µl par tube.

Le contre-colorant est le DAPI antifade (ES: 0,125µg/ml DAPI (4,6-diamidino-2-phénylindole)).

#### Avertissements et précautions

1. Pour la recherche uniquement. Pas destiné à être utilisé dans les procédures de diagnostic. 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 les matières dangereuses doivent être éliminées selon les réglementations concernant l'élimination des déchets dangereux en vigueur dans votre établissement.
6. Prendre toutes les précautions nécessaires lors du pipetage des sondes (sonde 1 et sonde 2) pour éviter tout risque de contamination croisée entre les contenus des deux tubes.

#### 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.

#### Recommandations sur les protocoles

##### Équipement nécessaire non fourni

1. Plaque chauffante (avec bloc et contrôle de la température jusqu'à 80°C).
2. Micropipettes de volume variable et gamme d'embouts de 1µl - 200µl.
3. Bain-marie avec contrôle précis de la température à 37°C et 72°C.
4. Tubes à microcentrifugation (0,5ml).
5. Microscope à fluorescence (Voir la section Microscope à fluorescence recommandés).
6. Bocal Coplin en plastique ou en verre.
7. Pincettes.
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 à base de caoutchouc.

##### Microscope à fluorescence recommandés

Pour une visualisation optimale de la sonde, nous recommandons l'utilisation d'une lampe à mercure de 100 watts et d'objectifs plan apochromatiques x63 ou x100. Le filtre triple bande DAPI/FITC/TRITC est optimal pour la visualisation des fluorochromes oranges et verts ainsi que des contre-colorant simultanément. Le fluorochrome bleu a une spécificité par rapport au spectre Aqua ou DEAC (un filtre triple bande Aqua ou DEAC est requis). Le filtre triple bande DAPI/FITC/Texas Red permet la visualisation des 3 fluorochromes et du DAPI simultanément.

##### Conformité de l'échantillon et collecte

La préparation de l'échantillon doit être effectuée conformément aux recommandations du guide des bonnes pratiques en cytogénétique. Les échantillons de liquide amniotique sanguins ou de couleur brune ne doivent pas être utilisés parce qu'ils pourraient contenir du sang maternel et risquent de fausser les résultats.

##### Recommandations de protocole

#### Préparation d'échantillons de liquide amniotique frais pour le test FISH :

1. Centrifuger 2 - 5ml de l'échantillon de liquide amniotique total pendant 7 minutes à 180xg, puis enlever avec précaution le liquide surnageant sans perturber le culot cellulaire.
2. Resuspendre le culot dans 2ml de 0,075 KCl. Laisser à température ambiante (TA) pendant 5 minutes.
3. Ajouter 2ml de fixatif frais (3:1 méthanol:acide acétique glacial) à la solution cellulaire/hypotonique en ajoutant le premier ml goutte par goutte tout en mélangeant l'ensemble en continu. Bien mélanger.
4. Centrifuger la suspension pendant 5 minutes à 280xg, enlever avec précaution le liquide surnageant et resuspendre le culot dans 2ml de fixatif frais.
5. Les échantillons fixés peuvent être conservés dans un réfrigérateur dans cet état à une température de -20°C.
6. Lorsque l'échantillon ne doit pas être gelé, centrifuger le tube à 280xg pendant 5 minutes. Enlever autant de liquide surnageant que possible sans perturber le culot cellulaire. Secouer le tube pour resuspendre le culot dans la faible quantité du liquide résiduel.
7. Pour préparer les lames pour le test FISH, déposer la suspension cellulaire directement sur la lame en deux zones d'hybridation. Laisser sécher à l'air.

#### Prétraitement des échantillons recommandé :

1. Immerger le échantillon préparés à partir d'amniocytes non cultivés dans du tampon 2xSSC pendant une heure à 37°C.
2. Mettre le échantillon dans une solution de pepsine fraîchement préparée (5mg de pepsine ajoutée dans 100ml de 0,01M HCl) pendant 13 minutes à une température de 37°C.
3. Immerger le échantillon dans une solution saline tamponnée au phosphate pendant 5 minutes à TA.
4. Immerger le échantillon dans la solution post-fixation (0,95% de formaldéhyde : 1,0ml de 37% de formaldéhyde, 0,18g MgCl<sub>2</sub> et 39,0ml de la solution saline tamponnée au phosphate) pendant 5 minutes à TA.
5. Immerger le échantillon dans une solution saline tamponnée au phosphate pendant 5 minutes à TA.
6. Immerger le échantillon dans de l'éthanol à 70% à TA. Laisser le échantillon dans la solution éthanol pendant une minute.
7. Sortir le échantillon de l'éthanol à 70%. Répéter l'étape 6 avec de l'éthanol à 85%, suivi par une procédure avec de l'éthanol à 100%.
8. Laisser sécher à l'air libre.

#### Protocole FISH

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

#### Préparation de la lame (sauter cette étape si la lame a été prétraitée conformément au protocole décrit ci-dessus)

1. Déposer l'échantillon cellulaire sur une lame en verre. Laisser sécher.
2. Plonger la lame dans du 2xSSC pendant 2 minutes à TA sans agiter.
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 de la colle à base de caoutchouc 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) dans un récipient humide et à l'abri de la lumière.

#### Lavages post-hybridation

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

#### Recommandations

1. Il est déconseillé de cuire ou vieillir les lames, ceci pouvant réduire l'intensité du signal de la fluorescence.
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, 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.

#### Interprétation des résultats

La sensibilité et la spécificité du test FISH dépend de nombreux paramètres qui varient d'un type de cellule à l'autre, d'une sonde à l'autre, en fonction des techniques cellulaires utilisées et au sein d'un laboratoire particulier. Nous recommandons donc, pour l'utilisation du kit prénatal, que chaque laboratoire dispose de son propre matériel standard et qu'il détermine ses propres valeurs de découpe pour le test FISH pour des échantillons aneuploïdes et au caryotype normal (pour plus d'informations, contactez CytoCell).

#### Limitations

Ce test ne détecte pas les anomalies et la mosaïque chromosomiques structurelles. Il ne détecte pas les anomalies du nombre de chromosomes autres que celles testées. Ce test n'est pas conçu pour évaluer le risque de trisomie. Le reporting et l'interprétation du test FISH doivent être effectués conformément aux normes professionnelles pour la pratique et tout en prenant en compte d'autres informations cliniques et diagnostiques.

Le test été développé comme complément aux autres tests diagnostiques de laboratoire. Pour cette raison, des actions thérapeutiques ne doivent pas être lancées sur la seule base des résultats du test FISH.

#### Résultats attendus

##### Sonde 1:

Une cellule femelle normale doit présenter 2 signaux verts et 2 signaux bleus (2V, 2B). Une cellule mâle normale doit présenter 1 signal vert, 1 signal orange et 2 signaux bleus (1V, 1O, 2B). Les cellules porteuses d'un chromosome 18 supplémentaire doivent présenter 2 signaux verts et 3 signaux bleus (2V, 3B) pour les échantillons de cellules femelles et 1 signal vert, 1 signal orange et 3 signaux bleus (1V, 1O, 3B) pour les échantillons de cellules mâles. Il existe plusieurs combinaisons différentes de configurations de signaux possibles pour les chromosomes X et Y autres que les configurations de signaux normales définies ci-dessus.

La sonde de la région DXZ1 peut présenter une hybridation croisée avec les centromères des chromosomes 11, 17 et Y.

##### Sonde 2:

Une cellule normale doit présenter 2 signaux verts et 2 signaux orange (2V, 2O). Les cellules porteuses d'un chromosome 13 supplémentaire doivent présenter 3 signaux verts et 2 signaux orange (3V, 2O). Les cellules porteuses d'un chromosome 21 supplémentaire doivent présenter 2 signaux verts et 3 signaux orange (2V, 3O).

#### Informations supplémentaires

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

T: +44 (0)1223 294048

E: techsupport@cytozell.com

W: www.ogt.com

#### ITALIANO

L'ibridazione *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 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.

#### Destinazione d'uso

Questo prodotto è destinato ad essere utilizzato solo per scopi di ricerca e non per l'uso in procedure diagnostiche

#### Specifiche della sonda

##### Set di sonde 1

Regione X centromero  $\alpha$ -satellite Xp11.1 - q11.1 (DXZ1) verde  
Regione Y centromero  $\alpha$ -satellite Yp11.1 - q11.1 (DYZ3) arancione  
Regione 18 centromero  $\alpha$ -satellite 18p11.1 - q11.1 (D18Z1) blu

##### Set di sonde 2

Regione sequenza unica di 13q14.2 verde  
Regione sequenza unica di 21q22.13 arancione

Il kit contiene due set di sonde per due distinte ibridazioni.

##### Set di sonde 1:

Il set di sonde X, Y e 18 è una miscela di sonde di DNA fluorescenti marcate direttamente con fluorofori verdi, arancioni e blu e specifiche per le sequenze di DNA alfa-satellite presenti nelle regioni DXZ1, DYZ3 e D18Z1 dei cromosomi X, Y e 18, rispettivamente.

##### Set di sonde 2:

Il set di sonde 13 e 21 è una miscela di sonde fluorescenti di DNA marcate direttamente con fluorofori verdi e arancioni, e contenenti sequenze presenti in singola copia. La sonda per il cromosoma 13 comprende il gene RB1 e i marcatori D13S1195, D13S1155 e D13S915. La sonda per il cromosoma 21 comprende i marcatori D21S270, D21S1867, D21S337, D21S1425, D21S1444 e D21S341.

#### Materiali forniti

**Sonda:** 50µl per flaconcino, 100µl per flaconcino, 300µl per flaconcino o 500µl per flaconcino. Le sonde sono fornite premiscelate nella soluzione di ibridazione (formamide; destrano solfato; SSC) e pronte per l'uso.

**Colorante di contrasto:** 150µl per flaconcino, 500µl per flaconcino, 1000µl per flaconcino o 1200µl per flaconcino.

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

#### Avvertenze e precauzioni

1. Per uso ricerca. Non per l'uso in procedure diagnostiche. Solo per uso professionale.
2. Quando si maneggiano le sonde e il colorante di contrasto DAPI, è necessario indossare guanti.
3. Le miscele delle sonde contengono formamide, una sostanza teratogena. Non respirare i fumi ed evitare il contatto con la pelle. Indossare guanti e camicia da laboratorio e maneggiare sotto cappa chimica. Per lo smaltimento, sciacquare con grandi quantità di acqua.
4. Il DAPI è un potenziale cancerogeno. Maneggiare con cura, indossare guantecamicia da laboratorio. Per lo smaltimento, sciacquare con grandi quantità di acqua.
5. Lo smaltimento dei materiali pericolosi deve avvenire nel rispetto delle normative interne dell'istituzione relative allo smaltimento dei rifiuti pericolosi.
6. Dovranno essere prese precauzioni per evitare possibili contaminazioni tra le vials contenenti le sonde del Set 1 e le vials contenenti le sonde del Set 2.

#### Conservazione e manipolazione

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

#### Protocollo Raccomandazioni

##### Apparecchiature necessarie ma non fornite

1. Piastra riscaldante (dotata di superficie d'appoggio e controllo accurato della temperatura fino a 80°C).
2. Micropipette a volume variabile con capacità da 1µl a 200µl e relativi puntali.
3. Bagno termostatico con controllo accurato della temperatura a 37°C e 72°C.
4. Provette da microcentrifuga (0,5ml).
5. Microscopio a fluorescenza (fare riferimento alla sezione Caratteristiche consigliate per il microscopio a fluorescenza).
6. Vaschette di Coplinin plastica o in vetro.
7. Pinzette.
8. Olio di immersione per obiettivi per microscopia a fluorescenza.
9. Centrifuga da banco.

10. Vetrini per microscopia.
11. Vetrini coprioggetto da 24x24mm.
12. Timer.
13. Incubatore a 37°C.
14. Colla tipo mastice.

#### Caratteristiche consigliate per il microscopio a fluorescenza

Per una visualizzazione ottimale della sonda si consiglia di utilizzare una lampada al mercurio da 100 watt e obiettivi planapocromatici 63x o 100x. La soluzione ideale per visualizzare contemporaneamente i fluorofori verdi e arancioni e il colorante di contrasto è il triplo filtro passa-banda DAPI/FITC/TRITC. Il fluoroforo blu presenta specificità per lo spettro di Aqua e DEAC (è necessario un filtro passa-banda per Aqua o DEAC). Per visualizzare contemporaneamente tutti i tre fluorofori e il DAPI è possibile utilizzare il triplo filtro passabanda DAPI/FITC/Texas Red.

#### Preparazione del campione

La preparazione del campione deve essere eseguita secondo le linee guida del laboratorio o dell'istituzione.

Se il campione di liquido amniotico appare contaminato da sangue o di colore marrone, non deve essere utilizzato, in quanto potrebbe contenere sangue materno e, di conseguenza, fornire risultati errati.

#### Protocollo consigliato

##### Preparazione di campioni di liquido amniotico fresco per FISH:

1. Centrifugare 2 - 5ml del campione di liquido amniotico intero per 7 minuti a 180xg, rimuovere con la massima attenzione il soprannatante senza disturbare il pellet cellulare.
2. Risospendere il pellet in 2ml di KCl 0,075M. Lasciare a temperatura ambiente (TA) per 5 minuti.
3. Aggiungere 2ml di fissativo fresco (soluzione 3:1 di metanolo: acido acetico glaciale) alle cellule/soluzione ipotonica, aggiungendo il primo ml goccia a goccia mescolando costantemente. Mescolare bene.
4. Centrifugare la sospensione per 5 minuti a 280xg, rimuovere con la massima attenzione il soprannatante e risospendere il pellet in 2ml di fissativo fresco.
5. A questo punto della procedura i campioni fissati possono essere conservati in freezer a una temperatura di -20°C.
6. Se il campione non deve essere congelato, centrifugare la provetta a 280xg per 5 minuti. Rimuovere la maggiore quantità possibile di soprannatante senza disturbare il pellet cellulare. Agitare la provetta dando colpetti col dito per risospendere il pellet nella ridotta quantità di liquido rimasta.
7. Per preparare i vetrini per la FISH, collocare la sospensione cellulare direttamente sul vetrino. Lasciare asciugare all'aria.

##### Pretrattamento raccomandato per i vetrini:

1. Immergere il vetrino preparato a partire da ammicciati non cresciuti in coltura in SSC2X per 1 ora a 37°C.
2. Collocare il vetrino in una soluzione di lavoro di pepsina appena preparata (5mg di pepsina aggiunti a 100ml di HCl 0,01M) per 13 minuti a 37°C.
3. Immergere il vetrino in tampone fosfato salino (PBS) a TA per 5 minuti.
4. Immergere il vetrino in una soluzione post-fissazione (formaldeide allo 0,95%: 1,0 ml di formaldeide al 37%, 0,18g di MgCl<sub>2</sub> e 39,0ml di PBS) per 5 minuti a TA.
5. Immergere il vetrino in PBS a TA per 5 minuti.
6. Immergere il vetrino in una soluzione di etanolo al 70% a TA. Lasciare il vetrino nel lavaggio in etanolo per 1 minuto.
7. Rimuovere il vetrino dalla soluzione di etanolo al 70%. Ripetere il passaggio 6 con etanolo all'85% e poi con etanolo al 100%.
8. Lasciare asciugare all'aria.

#### Protocollo della FISH

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

##### Preparazione del vetrino (se il vetrino è stato sottoposto a pretrattamento come descritto nel protocollo riportato sopra, saltare questo passaggio)

1. Posizionare il campione cellulare su un vetrino per microscopia. Lasciare asciugare.
2. Immergere il vetrino in SSC2x per 2 minuti a TA senza agitazione.
3. Eseguire la disidratazione in una serie di soluzioni di etanolo a concentrazione crescente (70%, 85% e 100%), con immersioni di 2 minuti ciascuna a TA.
4. Lasciare asciugare il vetrino.

##### Pre-denaturazione

5. Rimuovere la sonda dal congelatore e lasciarla riscaldare a TA.
6. Accertarsi che la soluzione della sonda sia miscelata in modo uniforme mediante l'uso di una pipetta.
7. Pipettare 10µl di sonda per test e inserirli in una provetta da microcentrifuga. Riporre velocemente la sonda non utilizzata nel congelatore.
8. Pre-riscaldare la sonda e il vetrino con il campione su una piastra riscaldante a 37°C (+/- 1°C) per 5 minuti.
9. Collocare 10µl di miscela della sonda sul campione e cellulare e coprire delicatamente con un vetrino coprioggetto. Sigillare con una colla tipo mastice e attendere che la colla si asciughi completamente.

##### Denaturazione

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

##### Ibridazione

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

##### Lavaggi post-ibridazione

12. Rimuovere accuratamente il vetrino coprioggetto e qualsiasi residuo di colla.
13. Immergere il vetrino in SSC0,4x (pH 7,0) a 72°C (+/- 1°C) per 2 minuti senza agitazione.
14. Scolare il vetrino e immergerlo in SSC2x, Tween-20 0,05% (pH 7,0) a TA per 30 secondi senza agitazione.
15. Scolare il vetrino e applicare 10µl di DAPI antifade su ciascun campione.
16. Coprire con un vetrino coprioggetto, rimuovere eventuali bolle e attendere lo sviluppo del colore per 10 minuti lasciando il vetrino al buio.
17. Esaminare con un microscopio a fluorescenza.

##### Stabilità dei vetrini ultimati

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

##### Raccomandazioni per la procedura

1. L'eccessivo riscaldamento e l'invecchiamento dei vetrini sono sconsigliati in quanto potrebbero ridurre la fluorescenza del segnale.
2. Le condizioni di ibridazione potrebbero essere influenzate negativamente dall'impiego di reagenti diversi da quelli forniti o consigliati da CytoCell Ltd.
3. È fortemente consigliato l'uso di un termometro calibrato per la misurazione delle temperature delle soluzioni, dei bagni termostati e degli incubatori in quanto queste temperature sono di fondamentale importanza per il funzionamento ottimale del prodotto.
4. Le concentrazioni, il pH e la temperatura dei lavaggi sono di fondamentale importanza in quanto condizioni di stringenza blande possono favorire un legame aspecifico della

sonda, mentre condizioni di stringenza troppo elevate possono determinare l'assenza di segnale.

5. Una denaturazione incompleta può determinare l'assenza di segnale, mentre una denaturazione eccessiva può produrre un legame aspecifico.

#### Interpretazione dei risultati

La sensibilità e la specificità della FISH dipendono da un numero di parametri che variano da un tipo cellulare all'altro; da una sonda all'altra; a seconda delle tecniche cellulari utilizzate e all'interno del singolo laboratorio. Pertanto, per l'uso del kit prenatale è consigliabile che ogni laboratorio adoperi il proprio materiale standard e stabilisca i propri valori soglia per il saggio FISH per determinare quali campioni presentano un cariotipo normale e quali sono aneuploidi (per indicazioni contattare CytoCell).

#### Limitazioni

Questo test non è in grado di rilevare anomalie strutturali dei cromosomi o mosaicismi. Inoltre, non permette di individuare anomalie numeriche dei cromosomi diverse da quelle oggetto del saggio.

Il test non è indicato per valutare il rischio di trisomia.

La refertazione e l'interpretazione dei risultati della FISH devono rispettare gli standard professionali di pratica medica e devono tenere conto delle altre informazioni cliniche e diagnostiche.

Questo kit va utilizzato come strumento complementare ad altri test diagnostici di laboratorio e non devono essere prese decisioni terapeutiche sulla base del solo risultato della FISH.

#### Risultati attesi

##### Set di sonde 1:

Una cellula femminile normale deve mostrare 2 segnali verdi e 2 blu (2V, 2B). Una cellula maschile normale deve mostrare 1 segnale verde, 1 arancione e 2 blu (1V, 1A, 2B). Le cellule con un cromosoma 18 in sovrannumero devono mostrare 2 segnali verdi e 3 blu (2V, 3B) nei campioni femminili e 1 segnale verde, 1 arancione e 3 blu (1V, 1A, 3B) nei campioni maschili. Oltre ai pattern di segnali normali descritti sopra, sono possibili varie altre combinazioni diverse per i cromosomi X e Y.

La sonda DXZ1 può mostrare un'ibridazione incrociata ai centromeri del cromosoma 11, 17 e Y.

##### Set di sonde 2:

Una cellula normale deve mostrare 2 segnali verdi e 2 arancioni (2V, 2A). Le cellule con un cromosoma 13 in sovrannumero devono mostrare 3 segnali verdi e 2 arancioni (3V, 2A). Le cellule con un cromosoma 21 in sovrannumero devono mostrare 2 segnali verdi e 3 arancioni (2V, 3A).

#### Informazioni aggiuntive

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

T: +44 (0)1223 294048

E: techsupport@cytozell.com

W: www.ogt.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 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 Waschvorgängen entfernt und die DNA zur Visualisierung gegengefärbt. Unter dem Fluoreszenzmikroskop wird dann die hybridisierte Sonde am Zielmaterial erkennbar.

#### Verwendungszweck

Dieses Produkt ist ausschließlich zu Forschungszwecken bestimmt und nicht für die Anwendung in diagnostischen Verfahren.

#### Sondenspezifikation

##### Sondensatz 1

X Centromer  $\alpha$ -Satellit Xp11.1 – q11.1 (DXZ1) grünen

Y Centromer  $\alpha$ -Satellit Yp11.1 – q11.1 (DYZ3) orangen

18 Centromer  $\alpha$ -Satellit 18p11.1 – q11.1 (D18Z1) blauen

##### Sondensatz 2

13q14.2 einmalige Sequenz grünen

21q22.13 einmalige Sequenz orangen

Das Kit enthält zwei Sondensätze für zwei separate Hybridisierungen.

##### Sondensatz 1:

Bei den Sondensätzen X, Y und 18 handelt es sich um Mischungen von direkt markierten, grün, orange und blau fluoreszierenden DNA-Sonden, die für die alpha-Satellit-DNA-Sequenzen an den Regionen DXZ1, DYZ3 und D18Z1 der Chromosomen X, Y bzw. 18 spezifisch sind.

##### Sondensatz 2:

Bei den Sondensätzen 13 und 21 handelt es sich um Mischungen von direkt markierten, grün und orange fluoreszierenden DNA-Sonden, die einmalige Sequenzen enthalten. Die Chromosom-13-Sonde enthält ein RB1-Gen sowie die Marker D13S1195, D13S1155 und D13S915. Die Chromosom-21-Sonde enthält die Marker D21S270, D21S1867, D21S337, D21S1425, D21S1444 und D21S341.

#### Bestandteile des Kits

**Sonde:** 50µl pro Röhrchen, 100µl pro Röhrchen, 300µl pro Röhrchen oder 500µl pro Röhrchen. Die Sonden werden vorgemischt und gebrauchsfertig in Hybridisierungslösung geliefert (Formamid, Dextransulfat, SSC).

**Farbstoff für die Gegenfärbung:** 150µl pro Röhrchen, 500µl pro Röhrchen, 1000µl pro Röhrchen oder 1200µl pro Röhrchen.

Der Farbstoff für die Gegenfärbung ist DAPI Antifade (ES: 0,125µg/ml DAPI (4,6-Diamidino-2-Phenylindol)).

#### Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen

1. Nur für Forschungszwecke. Bestimmt nicht für die Anwendung in diagnostischen Verfahren. Nur für die Verwendung durch Fachkräfte bestimmt.
2. Beim Umgang mit DNA-Sonden und dem DAPI Farbstoff Handschuhe tragen.
3. Sondenmischungen enthalten Formamid, das Teratogen ist. Keine Dämpfe einatmen und Hautkontakt vermeiden. Handschuhe und Labormantel tragen und unter einer Abzugshaube arbeiten. Bei der Entsorgung mit viel Wasser nachspülen.
4. DAPI ist ein potenzielles Karzinogen. Vorsichtig damit umgehen, Handschuhe und Labormantel tragen. Bei der Entsorgung mit viel Wasser nachspülen.
5. Alle Gefahrstoffe sollten gemäß den Leitlinien Ihrer Einrichtung zur Entsorgung von Sondermüll entsorgt werden.
6. Es sollten Vorkehrungen getroffen werden, die Kontamination zwischen den beiden Röhrchen mit der Sondenkombination 1 bzw. 2 zu verhindern.

## Lagerung und Handhabung

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 Durchstechflaschen mit den Sonden und dem Farbstoff werden lichtgeschützt aufbewahrt.

## Protokoll Empfehlungen

### Benötigte, aber nicht mitgelieferte Laborgeräte

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

### Empfehlungen zum Fluoreszenzmikroskop

Zur bestmöglichen Beobachtung der Probe empfehlen wir eine 100-Watt-Quecksilberdampfampe und Plan Achromat Objektive mit 63-facher oder 100-facher Vergrößerung. Das Dreifach-Bandpassfilter DAPI/FITC/TRITC ist für die simultane Beobachtung der grünen und orangen Fluorophore sowie der Gegenfärbung optimal geeignet. Das blaue Fluorophor hat eine Spezifität gegenüber dem Aqua- oder DEAC-Spektrum (ein Aqua- oder DEAC-Einfach-Bandpassfilter ist erforderlich). Das Dreifach-Bandpassfilter DAPI/FITC/Texasrot ist für die simultane Beobachtung aller drei Fluorophore und DAPI optimal geeignet.

### Probeneignung und Entnahme

Die Probenaufbereitung sollte entsprechend der Richtlinien des Labors, bzw. des Institutes durchgeführt werden.

Fruchtwasserproben, die blutig oder braun scheinen, sind nicht zu verwenden, da sie Blut der Mutter enthalten könnten und somit die Ergebnisse verfälscht werden könnten.

### Empfohlenes Protokoll

#### Vorbereitung von frischen Fruchtwasserproben für FISH:

1. Zentrifugieren Sie 2 - 5ml der gesamten Fruchtwasserprobe 7 Minuten lang bei 180xg; entfernen Sie dann vorsichtig den Überstand, ohne das Zellpellet aufzuwirbeln.
2. Resuspendieren Sie das Zellpellet in 2ml 0,075M KCl. Für 5 Minuten bei Zimmertemperatur stehen lassen.
3. Geben Sie 2ml frisches Fixativ (3:1 – Methanol:Eisessig) zu den Zellen/der hypotonischen Lösung, wobei Sie den ersten ml tropfenweise unter ständigem Rühren zugeben. Mischen Sie das Ganze gut.
4. Zentrifugieren Sie die Suspension für 5 Minuten bei 280xg, entfernen Sie den Überstand vorsichtig und resuspendieren Sie das Pellet in 2ml frischem Fixativ.
5. Fixierte Proben können in diesem Zustand bei -20°C in einem Gefrierschrank aufbewahrt werden.
6. Wenn die Probe nicht eingefroren werden soll, zentrifugieren Sie das Röhrchen bei 280xg für 5 Minuten. Entfernen Sie so viel Überstand wie möglich, ohne dabei das Zellpellet aufzuwirbeln. Schnippen Sie mit dem Finger gegen das Röhrchen, um das Pellet in der geringen Menge verbleibender Flüssigkeit zu resuspendieren.
7. Zur Vorbereitung von Objektträgern für FISH tropfen Sie die Zellsuspension direkt auf den Objektträger. An der Luft trocknen lassen.

#### Empfohlene Vorbehandlung des Objektträgers:

1. Tauchen Sie den aus nicht kultivierten Amnocyten gewonnenen Objektträger 1 Stunde lang bei 37°C in 2xSSC.
2. Legen Sie den Objektträger dann 13 Minuten lang bei 37°C in frisch vorbereitete Pepsin-Arbeitslösung (5mg Pepsin werden in 100ml 0,01M HCl gegeben).
3. Tauchen Sie den Objektträger bei Zimmertemperatur für 5 Minuten in phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS).
4. Tauchen Sie den Objektträger für 5 Minuten bei Zimmertemperatur in Nachfixierungslösung (0,95% Formaldehyd; 1,0ml 37% Formaldehyd, 0,18g MgCl<sub>2</sub> und 39,0ml PBS).
5. Tauchen Sie den Objektträger bei Zimmertemperatur für 5 Minuten in PBS.
6. Tauchen Sie den Objektträger bei Zimmertemperatur in 70%iges Ethanol. Lassen Sie den Objektträger 1 Minute lang in der Ethanol-Waschlösung stehen.
7. Nehmen Sie den Objektträger aus dem 70%igen Ethanol. Wiederholen Sie Schritt 6 mit 85%igem Ethanol und dann mit 100%igem Ethanol.
8. An der Luft trocknen lassen.

#### FISH-Protokoll

(Hinweis: Bitte stellen Sie sicher, dass die Sonde nur in begrenztem Umfang der Strahlung von Laborlampen ausgesetzt ist.)

#### Vorbereitung des Objektträgers (überspringen Sie diesen Schritt, wenn der Objektträger gemäß dem obigen Protokoll vorbehandelt wurde)

1. Zellprobe auf gereinigten Mikroskop-Objektträger auftropfen Trocknen lassen.
2. Objektträger bei Zimmertemperatur 2 Minuten lang ohne Schütteln in 2xSSC eintauchen.
3. Entwässern in Alkoholreihe (70%, 85% und 100%), jeweils 2 Minuten bei Zimmertemperatur.
4. Trocknen lassen.

#### Vordenaturierung

5. Entnehmen Sie die Probe aus dem Gefrierschrank und lassen Sie sie Raumtemperatur annehmen.
6. Stellen Sie sicher, dass die Probenlösung gleichmäßig mit einer Pipette gemischt wird.
7. Entnehmen Sie pro Test 10µl der Probe und füllen Sie sie in ein Mikrozentrifugengefäß um. Stellen Sie die restliche Probe schnell wieder zurück in den Gefrierschrank.
8. Sonde und Probenobjektträger zum Vorwärmen 5 Minuten lang auf eine 37°C (+/- 1°C) warme Heizplatte stellen.
9. 10µl Sondenmischung auf die Zellprobe auftropfen und Deckglas sorgfältig auflegen. Mit Gummikleber-Lösung versiegeln und vollständig trocknen lassen.

#### Denaturierung

10. Probe und Sonde gleichzeitig durch 2 Minuten langes Erwärmen des Objektträgers auf einer 75°C (+/- 1°C) warmen Heizplatte denaturieren.

#### Hybridisierung

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

#### Waschen nach der Hybridisierung

12. Deckglas und alle Kleberspuren vorsichtig entfernen.
13. Objektträger 2 Minuten lang bei 72°C (+/- 1°C) in 0,4xSSC (pH 7,0) waschen.
14. Objektträger abtropfen lassen und 30 Sekunden bei Zimmertemperatur in 2xSSC, 0,05% Tween-20 (pH 7,0), waschen.
15. Objektträger abtropfen lassen und 10µl DAPI Antifade zu jeder Probe geben.

16. Mit einem Deckglas abdecken, die Luftblasen entfernen and die Farbe 10 Minuten lang im Dunkeln 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 Zimmertemperatur aufbewahrt werden.

#### Empfehlungen zur Durchführung

1. Wärmebehandlung oder Reifung der Proben ist nicht empfehlenswert, da dies zu einer verminderten Signalfuoreszenz führen kann.
2. Durch die Verwendung von Reagenzien, die nicht von Cytocell Ltd. empfohlen sind, 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 Konzentration der Waschlösungen, pH und Temperatur sind wichtig, da niedrig stringente Bedingungen zu nicht spezifischer Bindung der Sonde führen kann und zu hohe Stringenz zum Verlust des Signals.
5. Unvollständige Denaturierung kann zu einem Verlust des Signals führen und übermäßige Denaturierung kann zu nicht spezifischer Bindung der Sonde führen.

#### Interpretation der Ergebnisse

Die Empfindlichkeit und Spezifität des FISH Tests hängt von einer Reihe von Parametern ab, die von Zelltyp zu Zelltyp, von Sonde zu Sonde sowie entsprechend den verwendeten Zelltechniken und dem jeweiligen Labor unterschiedlich sind. Wir empfehlen daher, dass das Pränatalkit verwendet wird und dass jedes Labor seine eigenen Standardmaterialien verwenden und seine eigenen Cutoff-Werte für karyotypisch normale und aneuploide Zellproben für den FISH Assay bestimmen sollte (erfragen Sie Richtlinien direkt von CytoCell).

#### Einschränkungen

Dieser Test weist weder strukturelle Chromosomanomalien noch Mosaizismen nach. Er weist auch keine numerischen Aberrationen von Chromosomen nach, auf die nicht getestet wird.

Der Test ist nicht zur Einschätzung des Risikos einer Trisomie geeignet.

Protokollierung und Interpretation der FISH-Tests müssen den fachlichen Standards für die Praxis entsprechen und unter Berücksichtigung anderer klinischer und diagnostischer Informationen erfolgen.

Der Test ist als Ergänzung zur klassischen Zytogenetik gedacht. Daher sollten therapeutische Maßnahmen nicht allein auf Grundlage der FISH-Ergebnisse eingeleitet werden.

#### Zu erwartende Ergebnisse

##### Sondensatz 1:

Eine normale weibliche Zelle sollte 2 grüne und 2 blaue Signale (2G, 2B) aufweisen. Eine normale männliche Zelle sollte 1 grünes, 1 oranges und 2 blaue Signale (1G, 1O, 2B) aufweisen. Zellen mit einem zusätzlichen Chromosom 18 sollten 2 grüne und 3 blaue Signale (2G, 3B) bei weiblichen Proben und 1 grünes, 1 oranges, 3 blaue (1G, 1O, 3B) bei männlichen Proben aufweisen. Mehrere unterschiedliche Kombinationen von Signalnummern sind bei X- und Y-Chromosomen möglich, die sich von den oben dargestellten normalen Signalnummern unterscheiden.

##### Sondensatz 2:

Eine normale Zelle sollte 2 grüne und 2 rote Signale (2G, 2O) aufweisen. Zellen mit einem zusätzlichen Chromosom 13 sollten 3 grüne und 2 orange Signale (3G, 2O) aufweisen. Zellen mit einem zusätzlichen Chromosom 21 sollten 2 grüne und 3 orange Signale (2G, 3O) aufweisen.

#### Weitere Informationen:

Weitere Produktinformationen erhalten Sie vom Technischen Kundendienst von CytoCell.

T: +44 (0)1223 294048

E: techsupport@cytozell.com

W: www.ogt.com

## ESPAÑOL

La hibridación *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 prenatal, hematológico y patológico. Después de la fijación, el ADN diana se trata con calor para desnaturalizar el ADN bicatenario haciendo que resulte monocatenario. El ADN diana queda entonces disponible para hibridarlo con una sonda de ADN igualmente desnaturalizado, 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.

#### Uso Previsto

Este producto está diseñado para ser utilizado en investigación y no en procedimientos de diagnóstico.

#### Especificaciones de las sondas

##### Conjunto de sondas 1

Región satélite  $\alpha$  del centrómero de X Xp11.1 – q11.1 (DXZ1) verde  
Región satélite  $\alpha$  del centrómero de Y Yp11.1 – q11.1 (DYZ3) naranja  
Región satélite  $\alpha$  del centrómero de 18 18p11.1 – q11.1 (D18Z1) azul

##### Conjunto de sondas 2

Región secuencia única 13q14.2 verde  
Región secuencia única 21q22.13 naranja

El kit contiene dos conjuntos de sondas para realizar dos hibridaciones diferentes.

##### Conjunto de sondas 1:

El conjunto de sondas X, Y y 18 es una mezcla de sondas de ADN fluorescentes directamente marcadas de color verde, naranja y azul específicas para las secuencias de ADN satélite alfa de las regiones DXZ1, DYZ3 y D18Z1 de los cromosomas X, Y y 18 respectivamente.

##### Conjunto de sondas 2:

El conjunto de sondas 13 y 21 es una mezcla de sondas de ADN fluorescentes directamente marcadas de color verde y naranja que contienen secuencias únicas. La sonda del cromosoma 13 incluye el gen RB1 además de los marcadores D13S1195, D13S1155 y D13S915. La sonda del cromosoma 21 incluye los marcadores D21S270, D21S1867, D21S337, D21S1425, D21S1444 y D21S341.

#### Material incluido

Sonda: 50µl por vial, 100µl por vial, 300µl por vial o 500µl por vial.

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

Contratención: 150µl por vial, 500µl por vial, 1000µl por vial o 1200µl por vial.

La tinción se realiza con DAPI Antifade (ES: 0,125µg/ml de DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol)).

#### Advertencias y precauciones

1. Para uso en investigación. No en procedimientos de diagnóstico. Sólo para uso profesional.
2. Utilizar guantes al manipular las sondas de ADN y la contratinción DAPI.
3. Las soluciones de las sondas contienen formamida, que es teratogena; no respire los vapores y evite el contacto con la piel. Utilice guantes y bata de laboratorio con una campana de ventilación. Al desechar, lave abundantemente con agua.
4. El DAPI puede producir cáncer. Manipúlelo con cuidado; utilice guantes y bata de laboratorio. Al desechar, lave abundantemente con agua.
5. Las sustancias peligrosas deben eliminarse de acuerdo con las directrices de su institución sobre la eliminación de residuos peligrosos.
6. Debe tomar precaución para evitar la contaminación entre los viales que contienen la sonda 1 y la sonda 2.

#### Almacenamiento y manipulación

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

#### Protocolo Recomendado

##### Material necesario pero no incluido

1. Placa calefactora (con una placa estable y un control de temperatura preciso hasta 80°C).
2. Micropipetas y puntas de volumen variable (de 1µl a 200µl).
3. Baño maría con control preciso de temperatura a 37°C y 72°C.
4. Tubos de microcentrifugación (0,5ml).
5. Microscopio de fluorescencia (véase la sección Recomendaciones sobre el microscopio de fluorescencia).
6. Cubetas Coplin de cristal y de plástico.
7. Pinzas.
8. Aceite de inmersión para objetivos de microscopio de fluorescencia.
9. Centrífuga sobremesa.
10. Portaobjetos para microscopio.
11. Cubreobjetos de 24x24mm.
12. Temporizador.
13. Incubadora a 37°C.
14. Pegamento de solución de caucho.

##### Recomendaciones sobre el microscopio de fluorescencia

Para una visualización óptima de la sonda, se recomienda utilizar una lámpara de mercurio de 100 vatios y objetivos Plan-Apochromat de 63 o 100 aumentos. El triple filtro pasabanda DAPI/FITC/TRITC es la mejor solución para visualizar simultáneamente los fluorocromos naranja y verde y la contratinción. El fluorocromo azul tiene especificidad por el espectro Aqua o DEAC (se necesita filtro pasabanda sencillo Aqua o DEAC). El triple filtro pasabanda DAPI/FITC/Texas Red puede emplearse para visualizar simultáneamente los tres fluorocromos y DAPI.

##### Preparación de las muestras

La preparación de la muestra se debe realizar de acuerdo con las instrucciones del laboratorio o la institución. Las muestras de líquido amniótico que presenten un aspecto sanguinolento o marrón no deben utilizarse, ya que pueden contener sangre materna y pueden producir resultados incorrectos.

##### Protocolo propuesto

##### Preparación de muestras de líquido amniótico recientes para FISH:

1. Centrifugue 2 - 5ml extraídos de la muestra total del líquido amniótico durante 7 minutos a 180xg, extraiga con cuidado el sobrenadante sin afectar al sedimento celular.
2. Resuspenda el sedimento en 2ml de KCl a 0,075M. Deje reposar a temperatura ambiente (TA) durante 5 minutos.
3. Añada 2ml de fijador reciente (metanol:ácido acético glacial en proporción 3:1) a las células/solución hipotónica, agregando el primer ml gota a gota mientras se sigue mezclando sin parar. Mezcle bien.
4. Centrifugue la suspensión durante 5 minutos a 280xg, retirando con cuidado el sobrenadante y resuspendiendo el sedimento en 2ml de fijador reciente.
5. En este punto, las muestras fijadas pueden almacenarse en un congelador a -20°C.
6. Si la muestra no va a congelarse, centrifugue el tubo a 280xg durante 5 minutos. Retire todo el sobrenadante que pueda sin afectar al sedimento celular. Sacuda el tubo para resuspender el sedimento en la pequeña cantidad de líquido restante.
7. Para preparar los portaobjetos para FISH, vierta la suspensión celular directamente sobre el portaobjetos. Deje que se seque al aire.

##### Pretratamiento del portaobjetos recomendado:

1. Sumerja el portaobjetos preparado a partir de amniocitos no cultivados en 2xSSC durante una hora a 37°C.
2. Coloque el portaobjetos en solución de trabajo de pepsina recién preparada (5mg de pepsina añadidos a 100ml de HCl a 0,01M) durante 13 minutos a 37°C.
3. Sumerja el portaobjetos en solución salina con tampón fosfato (PBS) a TA durante 5 minutos.
4. Sumerja el portaobjetos en solución de posfijación (formaldehído a 0,95%: 1,0ml de formaldehído a 37%, 0,18g de MgCl<sub>2</sub> y 39,0ml de PBS) durante 5 minutos a TA.
5. Sumerja el portaobjetos con PBS a TA durante 5 minutos.
6. Sumerja el portaobjetos en etanol al 70% a TA. Deje el portaobjetos sumergido en el baño de etanol durante 1 minuto.
7. Retire el portaobjetos del etanol al 70%. Repita el paso 6 con etanol al 85%, seguido de etanol al 100%.
8. Deje secar al aire.

##### Protocolo para la FISH

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

##### Preparación de los portaobjetos (omite este paso si el portaobjetos ha sido pretratado según el protocolo anterior)

1. Vierta la muestra de células sobre un portaobjetos. Deje secar.
2. Sumerja el portaobjetos en 2xSSC durante 2 minutos a TA sin agitar.
3. Deshidrate en soluciones graduales de etanol (70%, 85% y 100%), durante 2 minutos en cada una a TA.
4. Deje 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 transfírela a un tubo de microcentrífuga. Vuelva a colocar la solución que quede en la sonda al congelador.
8. Precaliente la sonda y el portaobjetos de la muestra en una placa calefactora a 37°C (+/- 1°C) durante 5 minutos.

9. Vierta 10µl de la solución de la sonda sobre la muestra de células y coloque cuidadosamente un cubreobjetos. Selle con pegamento de solución de caucho y deje que el pegamento se seque completamente.

##### Desnaturalización

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

##### Hibridación

11. Introduzca el porta en un recipiente húmedo y opaco a 37°C (+/- 1°C) y déjelo toda la noche.

##### Lavados posthibridación

12. Quite el cubreobjetos y los restos del pegamento cuidadosamente.
13. Sumerja el portaobjetos en 0,4xSSC (pH 7,0) a 72°C (+/- 1°C) durante 2 minutos sin agitar.
14. Deje escurrir el portaobjetos y sumérjalo en 2xSSC, 0,05% de Tween-20 (pH 7,0) a TA durante 30 segundos sin agitar.
15. Escurra el portaobjetos y añada 10µl de DAPI antifade sobre cada muestra.
16. Coloque un cubreobjetos, extraiga las burbujas y deje revelar el color en un lugar oscuro durante 10 minutos.
17. Visualice con un microscopio de fluorescencia.

##### Estabilidad de los portaobjetos terminados

Los portaobjetos sometidos a la técnica FISH pueden analizarse durante 1 mes si se conservan en un lugar oscuro y a TA o inferior.

##### Recomendaciones para los procedimientos

1. No se recomienda calentar ni dejar envejecer los portaobjetos ya que se podría reducir la fluorescencia de la señal.
2. Las condiciones de hibridación pueden verse afectadas negativamente si se emplean reactivos distintos de los suministrados o recomendados por CytoCell Ltd.
3. Se recomienda encarecidamente el uso de un termómetro de precisión para medir las temperaturas de soluciones, baños maría e incubadores ya que estas temperaturas son cruciales para un resultado óptimo del producto.
4. Las concentraciones de los lavados, el pH y las temperaturas son importantes ya que unas condiciones poco rigurosas pueden provocar una hibridación inespecífica de la sonda y unas condiciones demasiado rigurosas pueden derivar en una falta de señal.
5. Una desnaturalización incompleta puede provocar falta de señal y una desnaturalización excesiva también puede originar una hibridación inespecífica.

##### Interpretación de los resultados

La sensibilidad y la especificidad de la FISH dependen de varios parámetros, que difieren dependiendo del tipo celular, de la sonda, de las técnicas celulares y del laboratorio en que se realice. Por lo tanto, a la hora de emplear el kit prenatal, se recomienda que cada laboratorio prepare su propio material estándar y que determine sus propios valores de corte de la prueba FISH para las muestras cariotípicamente normales y aneuploides (si desea que se le faciliten pautas, póngase en contacto con CytoCell).

##### Limitaciones

Esta prueba no detecta las anomalías cromosómicas estructurales ni el mosaicismo. Tampoco detecta las anomalías numéricas de los cromosomas que no se analizan. La prueba no está diseñada para valorar el riesgo de trisomía. Los informes y la interpretación de los resultados de los análisis FISH deben respetar las normas de la práctica profesional y deben tomar en consideración otros informes clínicos y diagnósticos. Este kit se ha concebido como una prueba complementaria a otros análisis de laboratorio y no deben tomarse medidas terapéuticas basándose únicamente en el resultado de la FISH.

##### Resultados esperados

###### Conjunto de sondas 1:

Una célula femenina normal debe mostrar 2 señales verdes y 2 azules (2V, 2A). Una célula masculina normal debe mostrar 1 señal verde, 1 naranja y 2 azules (1V, 1N y 2A). Las células con un cromosoma 18 adicional deben mostrar 2 señales verdes y 3 azules (2V, 3A) para las muestras femeninas y 1 verde, 1 naranja, 3 azules (1V, 1N, 3A) para las muestras masculinas. Existen muchas combinaciones diferentes de patrones de señales posibles para los cromosomas X e Y además de los patrones normales indicados anteriormente. Es posible que la sonda DXZ1 muestre hibridación cruzada en los centrómeros de los cromosomas 11, 17 e Y.

###### Conjunto de sondas 2:

Una célula normal debe mostrar 2 señales verdes y 2 naranjas (2V, 2N). Las células con un cromosoma 13 adicional deben mostrar 3 señales verdes y 2 naranjas (3V, 2N). Las células con un cromosoma 21 adicional deben mostrar 2 señales verdes y 3 naranjas (2V, 3N).





##### 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

<b>REF</b>	<b>EN:</b> Catalogue number <b>DE:</b> Bestellnummer <b>FR:</b> Référence du catalogue <b>IT:</b> Riferimento di Catalogo <b>ES:</b> Número de catálogo
<b>LOT</b>	<b>EN:</b> Batch code <b>DE:</b> Loscode <b>FR:</b> Code du lot <b>IT:</b> Codice di lotto <b>ES:</b> Código
	<b>EN:</b> Consult instructions for use <b>DE:</b> Gebrauchsanweisung beachten <b>FR:</b> Consulter la notice d'utilisation <b>IT:</b> Consultare le istruzioni per l'uso <b>ES:</b> Consultarse las instrucciones de uso
	<b>EN:</b> Manufacturer <b>DE:</b> Hersteller <b>FR:</b> Fabricant <b>IT:</b> Fabbricante <b>ES:</b> Fabricante
	<b>EN:</b> Use by <b>DE:</b> Verwendbar bis <b>FR:</b> Utiliser jusqu'au <b>IT:</b> Utilizzare entro <b>ES:</b> Fecha de caducidad
	<b>EN:</b> Temperature limitation <b>DE:</b> Temperaturbegrenzung <b>FR:</b> Limites de température <b>IT:</b> Limiti di temperatura <b>ES:</b> Limitación de temperatura
<b>CONT</b>	<b>EN:</b> Contents <b>DE:</b> Inhalt <b>FR:</b> Contenu <b>IT:</b> Contenuto <b>ES:</b> Contenido

#### Patents and Trademarks

CytoCell is a registered trademark of CytoCell Ltd.



**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