



Instructions For Use
REF: LPE 008B/LPE 012B/LPE 017B

Satellite Enumeration Probes



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

Satellite probes are specific for human chromosomes. They are highly repeated human DNA sequences found in the centromere, pericentromeric or heterochromatic block of each of the 24 chromosomes. The probes enable the identification and enumeration of human chromosomes in interphase cells or metaphase chromosomes from peripheral blood samples.

Probe Specification

The probes are produced in a concentrated form to allow mixing, if required, of up to three probes in the same hybridisation, from CytoCell's range of concentrated Satellite probes. A final volume of 10µl of probe solution is required per hybridisation.

The probes are directly labelled with a blue fluorophore (Aqua or DEAC spectrum). For detailed probe specifications refer to Table 1.

Table 1: Probe Specifications

Chr	Catalogue Number*	Locus	Chromosome Region	DNA Class
8	LPE 008B	D8Z2	8p11.1-q11.1	α-satellite
12	LPE 012B	D12Z3	12p11.1-q11.1	α-satellite
17	LPE 017B	D17Z1	17p11.1-q11.1	α-satellite

*B specifies a blue label

This kit contains only one of the probes from the range of directly labelled blue human alpha satellite probes.

Materials Provided

Probe: 30µl per vial (10 tests)

Amount of blue D8Z2 probe: 63.5-91.5ng/test

Amount of blue D12Z3 probe: 19.2ng/test

Amount of blue D17Z1 probe: 14.4ng/test

The probe is produced in a concentrated form. It is provided in hybridisation solution (Formamide; Dextran Sulphate; SSC).

Hybridisation solution (Formamide; Dextran Sulphate; SSC): 150µl per vial

Counterstain: 150µl per vial (15 tests)

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

Warnings and Precautions

- For *in vitro* diagnostic use. For professional use only.
- Wear gloves when handling DNA probes and DAPI counterstain.
- 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.

- DAPI is a potential carcinogen. Handle with care; wear gloves and a lab coat. Upon disposal, flush with a large volume of water.
- Dispose of all hazardous materials according to your institution's guidelines for hazardous waste disposal.
- Operators must be capable of visually distinguishing between red, blue and green.

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. Store the probe and counterstain vials in the dark. Ensure that exposure of the probe and counterstain to laboratory lights is limited at all times.

Equipment Necessary but not Supplied

- Hotplate (with a solid plate and accurate temperature control up to 80°C).
- Variable volume micropipettes and tips range 1µl - 200µl.
- Water bath with accurate temperature control at 72°C.
- Microcentrifuge tubes (0.5ml).
- Fluorescence microscope (Please see Fluorescence Microscope Recommendation section).
- Plastic or glass coplin jars.
- Forceps.
- Fluorescence grade microscope lens immersion oil.
- Bench top centrifuge.
- Microscope slides.
- 24x24mm coverslips.
- Timer.
- 37°C incubator.
- 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 blue fluorophore has specificity to the Aqua and DEAC spectrum (single bandpass Aqua or DEAC filter is required). Check the fluorescence microscope before use to ensure it is operating correctly. Use immersion oil that is suitable for fluorescence microscopy and formulated for low autofluorescence. Follow manufacturers' recommendations in regards to the life of the lamp and the age of the filters.

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: Ensure that exposure of the probe and counterstain to laboratory lights is limited at all times).

Slide preparation

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

Pre-Denaturation

- Remove the probe from the freezer and allow it to warm to RT. Briefly centrifuge tubes before use.
- Ensure that the probe solution is uniformly mixed with a pipette.
- Using fresh pipette tips remove (final volume of 10µl of probe solution):
 - for a **single probe hybridisation**: 3µl of probe and 7µl of hybridisation solution per test
 - for a **two probe hybridisation**: 3µl of each probe and 4µl of hybridisation solution per test
 - for a **three probe hybridisation**: 3µl of each probe and 1µl of hybridisation solution per test
 and transfer it to a microcentrifuge tube, gently vortex to mix and pulse spin in a microcentrifuge. Quickly return the remaining probe to the freezer.
- Place the probe and the sample slide to prewarm on a 37°C (+/- 1°C) hotplate for 5 minutes.
- 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

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

Hybridisation

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

Post-Hybridisation Washes

- Remove the coverslip and all traces of glue carefully.
- Immerse the slide in 0.25xSSC (pH 7.0) at 72°C (+/- 1°C) for 2 minutes without agitation*.
- Drain the slide and immerse it in 2xSSC, 0.05% Tween-20 at RT (pH 7.0) for 30 seconds without agitation.
- Drain the slide and apply 10µl of DAPI antifade onto each sample.
- Cover with a coverslip, remove any bubbles and allow the colour to develop in the dark for 10 minutes.
- View with a fluorescence microscope.

* If final signal is poor, repeat FISH using 0.4xSSC post-hybridisation wash.

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 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. Use a calibrated thermometer 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.
6. Over hybridisation can result in additional or unexpected signals.
7. Users should optimise the protocol for their own samples prior to using the test for diagnostic purposes.

Expected Results for a single probe hybridisation

There will be differences in the relative size of signals observed between chromosomes due to the difference in copy number of repeat sequences between chromosomes. A diploid sample should show a fluorescent signal at the centromere of both of the corresponding chromosomes in 70 – 90% of cells analysed.

Known Cross-Reactivity

The LPE017B probe may show faint cross hybridisation to the centromeric region of chromosome 11.

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.

Failure to adhere to the protocol may affect the performance and results.

Additional Information

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

T: +44 (0)1223 294048

E: techsupport@cytoCELL.com

W: www.cgt.com

FRANÇAIS

L'hybridation *in situ* par fluorescence (FISH) est une technique qui permet de détecter des séquences ADN sur les chromosomes 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 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.

Informations concernant la sonde

Les sondes satellites sont spécialement conçues pour les chromosomes humains. Il existe un grand nombre de séquences d'ADN humain répétées dans le centromère, la région péri-centromérique ou hétérochromatique de chacun des 24 chromosomes. Ces sondes permettent l'identification et le dénombrement de chromosomes humains dans les cellules interphasiques ou les chromosomes en métaphase à partir de prélèvements sanguins périphériques.

Caractéristiques de la sonde

Ces sondes sont produites sous une forme concentrée afin de permettre dans la même hybridation le mélange, si nécessaire, d'un maximum de trois sondes, choisies parmi la gamme de sondes satellites concentrées CytoCell. Un volume final de 10 µl de solution de sonde est nécessaire pour l'hybridation.

Les sondes sont directement étiquetées avec un fluorophore bleu (spectre Aqua ou DEAC). Pour plus de détails sur les caractéristiques de la sonde, consulter le tableau 1.

Tableau 1 : Caractéristiques de la sonde

Chr	Numéro de référence*	Locus	Région du chromosome	Classe d'ADN
8	LPE 008B	D8Z2	8p11.1-q11.1	α-satellite
12	LPE 012B	D12Z3	12p11.1-q11.1	α-satellite
17	LPE 017B	D17Z1	17p11.1-q11.1	α-satellite

*B indique une étiquette bleue

Ce kit ne contient qu'une seule des sondes de la gamme de sondes satellites alpha humaines bleues.

Conditionnement

Sonde : 30µl par tube (10 tests)

Quantité de sonde bleue D8Z2 : 63.5-91.5ng/test

Quantité de sonde bleue D12Z3 : 19.2ng/test

Quantité de sonde bleue D17Z1 : 14.4ng/test

La sonde est produite sous une forme concentrée. Elle est fournie dans une solution d'hybridation (Formamide ; sulfate de dextran ; SSC).

Solution d'hybridation (Formamide ; sulfate de dextran ; SSC) : 150µl par tube

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. Mettez au rebut toutes les matières dangereuses conformément aux directives de votre institution en matière de mise au rebut des déchets dangereux.
6. Les techniciens doivent être en mesure de distinguer le rouge, le bleu et le vert.

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. Conservez la sonde et les flacons de contre-colorant à l'abri de la lumière. Assurez-vous que la sonde et la couleur de contraste ne sont exposées aux lumières de laboratoire que de façon limitée, à tout moment.

Équipement nécessaire non fourni

1. Plaque chauffante (avec bloc de 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. Jarres 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 or x100. Le fluorochrome bleu a une spécificité par rapport au spectre Aqua ou DEAC (un filtre triple bande Aqua ou DEAC est requis).

Vérifiez le fonctionnement du microscope à fluorescence avant usage. Utilisez de l'huile à immersion adaptée à la microscopie de fluorescence et formulée pour une autofluorescence basse. Respectez les recommandations du fabricant concernant la durée de vie de la lampe et le vieillissement des filtres.

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 : Assurez-vous que la sonde et la couleur de contraste ne sont exposées aux lumières de laboratoire que de façon limitée, à tout moment.)

Préparation de la lame échantillon

1. Déposer l'échantillon cellulaire sur une lame propre. Laisser sécher.
2. Plonger la lame dans du 2xSSC pendant for 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. Retirer la sonde du congélateur et la laisser se remettre à TA. Centrifugez brièvement les tubes avant usage.
 6. Bien homogénéiser la sonde en pipetant plusieurs fois.
 7. En utilisant un nouveau cône, prélever (un volume final de 10µl de sonde est nécessaire) :
 - pour l'hybridation d'une seule sonde : 3µl de sonde et 7µl de solution d'hybridation par test
 - pour l'hybridation de deux sondes : 3µl de chaque sonde et 4µl de solution d'hybridation par test
 - pour l'hybridation de trois sondes : 3µl de chaque sonde et 1µl de solution d'hybridation par test
- Placer dans un tube à microcentrifugation, vortexer doucement puis centrifuger pendant 2-3 secondes. 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 ruban adhésif 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 1h ou jusqu'à 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 cément.
13. Laver la lame dans du tampon 0.25xSSC (pH 7.0) à 72°C (+/- 1°C) pendant 2 minutes sans agitation*.
14. Egoutter la lame et laver dans du tampon 2xSSC, 0.05% Tween-20 (pH 7.0) à température ambiante pendant 30 seconde 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.

* Si le signal final est faible, refaire le FISH en utilisant un lavage post-hybridation à 0,4 x SSC.

Stabilité des lames

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

Recommandations

1. La cuisson ou le vieillissement des lames peut 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. Utilisez un thermomètre étalonné pour mesurer les températures des solutions, des bains d'eau et des incubateurs, car ces températures sont essentielles à la performance 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.
6. Une hybridation trop importante peut entraîner des signaux supplémentaires ou inattendus.
7. Les utilisateurs doivent optimiser le protocole en fonction de leurs propres échantillons avant d'utiliser ce test à des fins de diagnostic.

Résultats attendus pour une hybridation avec une seule sonde

Des différences en termes de taille relative des signaux seront observées entre les chromosomes du fait de la différence de numéro de copie des séquences répétées entre les chromosomes. Un échantillon diploïde doit montrer un signal fluorescent au niveau du centromère des chromosomes correspondants dans 70-90% des cellules analysées.

Réactivité croisée connue

La sonde LPE017B peut présenter une faible hybridation croisée sur la région centromérique du chromosome 11.

Limitations

Le reporting et l'interprétation du test FISH devraient être effectués conformément aux normes professionnelles pour la pratique et tout en prenant en considération autre information clinique et diagnostiques. Le test est développé comme un complément à la cytogénétique classique pour cette raison des actions thérapeutiques ne devraient pas être lancées sur la seule base des résultats du test FISH.

Si le protocole n'est pas respecté, la performance et les résultats peuvent être affectés.

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, ematologia 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 sonde satellite sono specifiche per i cromosomi umani; sono costituite da sequenze di DNA umano altamente ripetitive situate in corrispondenza del centromero, delle regioni pericentromeriche o eterocromatiche di ciascuno dei 24 cromosomi. Le sonde consentono di identificare e contare i cromosomi umani in cellule interfasiche o in cromosomi metafisici provenienti da campioni di sangue periferico.

Specifiche delle sonde

Le sonde sono prodotte in forma concentrata per consentire, se necessario, l'uso nella stessa ibridazione di fino a tre sonde della gamma CytoCell di sonde satellite concentrate. Per l'ibridazione è necessario un volume finale di 10µl di soluzione della sonda. Le sonde sono direttamente marcate con un fluoroforo blu (spettro DEAC o Aqua). Per le specifiche dettagliate delle sonde vedere la Tabella 1.

Tabella 1: Specifiche delle sonde

Crom.	Numero di catalogo*	Locus	Regione cromosomica	Classe di DNA
8	LPE 008B	D8Z2	8p11.1-q11.1	α-satellite
12	LPE 012B	D12Z3	12p11.1-q11.1	α-satellite
17	LPE 017B	D17Z1	17p11.1-q11.1	α-satellite

*La lettera B indica una marcatura blu

Questo kit contiene soltanto una delle sonde della gamma di sonde alfa-satellite blu per cromosomi umani marcate direttamente.

Materiali forniti

Sonda: 30µl per provetta (10 test)

Quantità di sonda D8Z2 blu: 63.5-91.5ng/test

Quantità di sonda D12Z3 blu: 19.2ng/test

Quantità di sonda D17Z1 blu: 14.4ng/test

La sonda è prodotta in forma concentrata. È fornita in soluzione di ibridazione (formamide; destrano solfato; SSC).

Soluzione di ibridazione (formamide; destrano solfato; SSC): 150µl per provetta

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.
3. 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.
4. 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.
5. Smaltire tutti i materiali pericolosi secondo le direttive del proprio istituto per lo smaltimento dei rifiuti pericolosi.
6. Gli operatori devono poter distinguere visivamente fra rosso, blu e verde.

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. Conservare la sonda e i fiaschi del controcolorante al buio. Assicurare che l'esposizione della sonda e della colorazione di contrasto alle luci di laboratorio sia sempre limitata.

Apparecchiature necessari non forniti

1. Piastra riscaldante (con - un controllo accurato della temperatura fino ad 80°C).

2. Micropipette a volume variabile compreso tra 1µl - 200µl.
3. Bagno termostato con controllo accurato della temperatura a 72°C.
4. Provette da microcentrifuga (0,5 ml).
5. Microscopio a fluorescenza (riferirsi alla sezione Configurazione ottimale del microscopio e dei filtri).
6. Contenitori di Coplin in plastica o vetro.
7. Pinzette.
8. Olio per lenti ad immersione del microscopio a fluorescenza.
9. Centrifuga da banco.
10. Vetrini da microscopia.
11. 24x24 mm vetrini coprioggetto.
12. Timer.
13. Incubatore a 37°C.
14. 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 fluoroforo blu presenta specificità per lo spettro di Aqua e DEAC (è necessario un filtro passa-banda per Aqua o DEAC). Verificare il microscopio a fluorescenza prima dell'uso per garantire che funzioni correttamente. Usare olio a immersione adatto al microscopio a fluorescenza e formulato per fluorescenza bassa. Seguire le raccomandazioni del produttore su durata della lampadina e dei filtri.

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: Assicurare che l'esposizione della sonda e della colorazione di contrasto alle luci di laboratorio sia sempre limitata.)

Preparazione del vetrino

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

Pre-denaturazione

5. Rimuovere la sonda dal congelatore e attendere che raggiunga la temperatura ambiente (TA). Centrifugare brevemente le provette prima dell'uso.
6. Accertarsi che la soluzione della sonda sia uniforme pipettando ripetutamente con delicatezza.
7. Utilizzando puntali monouso prelevare (un volume finale pari a 10µl di soluzione della sonda):
 - per una **ibridazione con una singola sonda**: 3µl di sonda e 7µl di soluzione di ibridazione per test
 - per una **ibridazione con due sonde**: 3µl di ciascuna sonda e 4µl di soluzione di ibridazione per test
 - per una **ibridazione con tre sonde**: 3µl di ciascuna sonda e 1µl di soluzione di ibridazione per test
- Inserire i 10µl di soluzione della sonda in una provetta da microcentrifuga, miscelare agitando delicatamente su un vortex e centrifugare brevemente in una microcentrifuga. Riporre velocemente la sonda non utilizzata nel congelatore.
8. Pre-riscaldare la sonda, il vetrino ed il coprioggetto su una piastra riscaldante a 37°C (+/- 1°C) per 5 minuti.
9. 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

10. Denaturare simultaneamente 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 1 ora a tutta la notte.

Lavaggi post-ibridazione

12. Rimuovere accuratamente il vetrino coprioggetto e tutte le tracce di colla.
13. Lavare il vetrino in 0,25xSSC (pH 7,0) a 72°C (+/- 1°C) per 2 minuti senza agitazione*.
14. Scolare il vetrino e lavare in 2xSSC, Tween-20 0,05% (pH 7,0) a TA per 30 secondi senza agitazione.
15. Scolare i vetrini e applicare 10µl di DAPI antifade su ciascun campione.
16. Coprire con un vetrino coprioggetto, rimuovere eventuali bolle e attendere 10 minuti lasciando il vetrino al buio.
17. Analizzare con il microscopio a fluorescenza.

* In caso di segnale debole ripetere la FISH utilizzando SSC 0,4x per i lavaggi post-ibridazione.

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

1. Se il vetrino si invecchia o si invecchia, la fluorescenza del segnale può diminuire.
2. Le condizioni di ibridazione potrebbero essere influenzate negativamente dall'impiego di reagenti differenti rispetto a quelli forniti o raccomandati da CytoCell Ltd.
3. Usare un termometro calibrato per misurare la temperatura delle soluzioni, dell'acqua e degli incubatori, poiché queste temperature sono fondamentali per ottimizzare le prestazioni del prodotto.
4. 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.
5. La denaturazione incompleta può tradursi in una perdita del segnale mentre una denaturazione eccessiva può anche tradursi in un legame non specifico.
6. L'eccessiva ibridazione può provocare segnali aggiuntivi o imprevisti.
7. Gli utenti devono sviluppare il protocollo per propri campioni prima di utilizzare il test a scopi diagnostici.

Risultati attesi per l'ibridazione con una singola sonda

Si osserveranno differenze nelle dimensioni relative dei segnali tra i diversi cromosomi a causa del differente numero di copie di sequenze ripetute presenti. Un campione diploide dovrebbe presentare un segnale fluorescente in corrispondenza del centromero di entrambi i cromosomi nel 70 - 90% delle cellule analizzate.

Reattività crociata nota

La sonda LPE017B potrebbe mostrare una lieve ibridazione crociata verso la regione centromerica del cromosoma 11.

Limitazioni

Il reporting e l'interpretazione di FISH devono essere coerente con gli standard professionali della pratica medica e dovrebbe prendere in considerazione altre informazioni cliniche e diagnostiche. Questo kit è concepito in aggiunta alle tecniche citogenetiche classica e azione terapeutica non deve essere messa in atto esclusivamente sulla base del risultato di FISH. Il mancato rispetto del protocollo può influire sulle prestazioni e sui risultati.

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.ogt.com

DEUTSCH

Die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) ist eine Technik, mit der DNA-Sequenzen auf Metaphase-Chromosomen oder Interphase-Kernen bei fixierten Kulturen oder nicht in Kultur gezüchteten zytogenetischen Proben nachgewiesen werden können. Die Technik verwendet DNA-Sonden, die an gesamte Chromosomen oder an einzelne, einmalige Sequenzen hybridisieren und dient als leistungsstarke Ergänzung zur klassischen Zytogenetik. Kürzliche Entwicklungen haben gezeigt, dass diese nützliche Technik nun auch als essentielles diagnostisches Werkzeug für pränatale, hämatologische und pathologische Chromosomenanalysen eingesetzt werden kann. Die Ziel-DNA wird zum Denaturieren der doppelsträngigen DNA nach dem Fixieren mit Hitze und Formamid behandelt, wodurch sie einzelsträngig wird. So kann sich die Ziel-DNA an eine ebenso denaturierte, einzelsträngige fluoreszenzmarkierte DNA-Sonde mit komplementärer Sequenz anlagern. Nach der Hybridisierung werden nichtgebundene und nicht spezifisch gebundene DNA-Sonden durch eine Reihe von Waschvorgängen unter stringenten Bedingungen entfernt und die DNA zum Sichtbarmachen gegengefärbt. Unter dem Fluoreszenzmikroskop wird dann die hybridisierte Sonde am Zielmaterial erkennbar.

Sondeninformationen

Satellitensonden sind für menschliche Chromosomen spezifisch. Sie sind hochrepetitive menschliche DNA-Sequenzen, die sich im zentromeren, perizentromeren oder heterochromatischen Block jedes der 24 Chromosomen finden. Die Sonden ermöglichen die Identifizierung und Aufzählung von menschlichen Chromosomen in Interphasenzellen oder Metaphase-Chromosomen aus peripheren Blutproben.

Sondenspezifikation

Die Sonden werden in konzentrierter Form produziert, damit bei Bedarf in der gleichen Hybridisierung bis zu drei Sonden aus CytoCells Angebot an konzentrierten Satellitensonden gemischt werden können. Pro Hybridisierung ist ein Endvolumen von 10 µl Sondenlösung erforderlich.

Die Sonden sind direkt mit einem blauen Fluorophor (Aqua oder DEAC-Spektrum) markiert. Detaillierte Sondenspezifikationen finden Sie in Tabelle 1.

Tabelle 1: Sondenspezifikationen

Chr	Katalognummer*	Locus	Chromosomenregion	DNA-Klasse
8	LPE 008B	D8Z2	8p11.1-q11.1	α-Satellit
12	LPE 012B	D12Z3	12p11.1-q11.1	α-Satellit
17	LPE 017B	D17Z1	17p11.1-q11.1	α-Satellit

*B gibt eine blaue Markierung an.

Dieses Kit enthält nur eine der Sonden aus dem Angebot an direkt markierten blauen menschlichen alpha-Satellitensonden.

Kitkomponenten

Sonde: 30µl pro Röhrchen (10 tests)
Menge der blauen D8Z2-Sonde: 63.5-91.5ng/Test
Menge der blauen D12Z3-Sonde: 19.2ng/Test
Menge der blauen D17Z1-Sonde: 14.4ng/Test
Die Sonde wird in konzentrierter Form produziert. Sie wird in Hybridisierungslösung bereitgestellt (Formamid, Dextransulfat, SSC).

Hybridisierungslösung (Formamid, Dextransulfat, SSC): 150µl pro Röhrchen

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. Nur für die professionelle Verwendung.
- Beim Umgang mit DNA-Sonden und der DAPI-Gegenfärbung Handschuhe tragen.
- Sondenmischungen 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.
- Die Entsorgung aller gefährlichen Materialien erfolgt in Übereinstimmung mit den Richtlinien Ihrer Einrichtung zur Entsorgung von gefährlichen Abfällen.
- Die Anwender dieses Produkts müssen in der Lage sein, optisch zwischen den Farben rot, blau und grün zu unterscheiden.

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 Durchstechflaschen mit den Sonden und dem Farbstoff müssen lichtgeschützt aufbewahrt werden. Bitte versuchen Sie nach Möglichkeit, die Sonde und die Kontrastfärbung vor Licht zu schützen.

Bitte versuchen Sie nach Möglichkeit, die Sonde und die Kontrastfärbung vor Licht zu schützen

Benötigte, aber nicht mitgelieferte Laborgeräte

- Heizplatte (mit stabiler Heizplatte und genauer Temperaturregelung bis 80°C).
- Mikropipetten 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 Deckgläseränder.

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. Das blaue Fluorophor hat eine Spezifität gegenüber dem Aqua- oder DEAC-Spektrum (ein Aqua- oder DEAC-Einfach-Bandpassfilter ist erforderlich). Das Fluoreszenzmikroskop muss vor dem Gebrauch auf korrekte Funktionsweise überprüft werden. Das Immersionsöl muss für die Verwendung in der Fluoreszenzmikroskopie geeignet und für geringe Autofluoreszenz formuliert sein. Den Herstellerempfehlungen zur Lebensdauer der Lampe und zum Alter der Filter ist Folge zu leisten.

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 und die Kontrastfärbung vor Licht zu schützen.)

Vorbereitung des Objektträgers

- Zellprobe auf gereinigten Mikroskop-Objektträger auftropfen. Trocknen lassen.
- Den Objektträger in 2xSSC für 2 Minuten bei RT ohne Schütteln eintauchen.
- Entwässern in Alkoholareihe (70%, 85% und 100%), jeweils für 2 Minuten bei RT.
- Trocknen lassen.

Vordenaturierung

- Nehmen Sie die Sonde aus dem Gefrierschrank und lassen Sie diese sich auf Zimmertemperatur aufwärmen. Die Röhrchen vor der Anwendung kurz zentrifugieren.
- Durch wiederholtes, sanftes Mischen in der Pipette sicherstellen, dass die Sondenlösung homogen gemischt ist.
- Mit frischen Pipettenspitzen entnehmen (Endmenge von 10µl Sondenlösung):
 - für eine **Einzelsondenhybridisierung**: 3µl Sonden- und 7µl Hybridisierungslösung pro Test
 - für eine **Zwei-Sondenhybridisierung**: jeweils 3µl Sonden- und 4µl Hybridisierungslösung pro Test
 - für eine **Drei-Sondenhybridisierung**: jeweils 3µl Sonden- und 1µl Hybridisierungslösung pro TestEntnehmen und in ein einziges Mikrozentrifugenröhrchen geben, vorsichtig durchmischen (Vortex) und kurz zentrifugieren. Stellen Sie die restliche Probe schnell wieder zurück in den Gefrierschrank.
- Sonde und Probenobjektträger zum Vorwärmen 5 Minuten auf eine Heizplatte mit 37°C (+/- 1°C) geben.
- 10µl Sondenmischung auf die Zellprobe auftropfen und Deckplättchen sorgfältig auflegen. Mit Gummikleber-Lösung versiegeln und vollständig trocknen lassen.

Denaturierung

- Denaturieren Sie Probe und Sonde gleichzeitig durch 2 Minuten Erwärmen des Objektträgers auf einer Heizplatte mit 75°C (+/- 1°C).

Hybridisierung

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

Waschen nach der Hybridisierung

- Deckgläschen und alle Kleberspuren vorsichtig entfernen.
- Objektträger 2 Minuten in 0,25 x SSC (pH 7,0) bei 72°C (+/- 1°C) waschen*.
- Objektträger abtropfen lassen und 30 Sekunden in 2 x SSC, 0,05% Tween-20 bei RT, (pH 7,0), waschen.
- Den Objektträger abtropfen lassen und 10µl des DAPI Antifade zu jeder Probe geben.
- Mit einem Deckglas abdecken, die Luftblasen entfernen und die Farbe 10 Minuten im Dunkeln entwickeln lassen.
- Unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachten.

* Wenn das resultierende Signal schwach ist, FISH wiederholen, nach der Hybridisierung mit 0,4 x SSC waschen.

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

- Die Wärmebehandlung oder Reifung der Objektträger kann die Signalfluoreszenz vermindern.
- Durch die Verwendung von anderen Reagenzien, als den von CytoCell Ltd. empfohlenen, können die Hybridisierungsbedingungen negativ beeinflusst werden.
- 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.
- 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.
- Unvollständige Denaturierung kann zu einem Verlust des Signals führen und übermäßige Denaturierung kann zu nicht spezifischer Bindung der Sonde führen.
- Bei übermäßiger Hybridisierung kann es zu zusätzlichen oder unerwarteten Signalen kommen.
- Die Anwender sollten das Protokoll für ihre eigenen Proben optimieren, bevor sie den Test zu diagnostischen Zwecken verwenden.

Erwartete Ergebnisse einer Einzelsondenhybridisierung

Da Chromosomen unterschiedliche Kopienzahl der Repetitionssequenzen aufweisen, werden bei Chromosomen unterschiedliche relative Signalgrößen beobachtet. Bei diploiden Proben sollten 70 bis 90% der analysierten Zellen ein Fluoreszenzsignal im Zentromer beider Chromosomen eines Satzes zeigen.

Bekannte Kreuzreaktivität

Die LPE017B-Sonde kann eine schwache Kreuzhybridisierung zum zentromerischen Bereich von Chromosom 11 aufweisen.

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. Daher sollten therapeutische Maßnahmen nicht allein auf Grundlage der FISH-Ergebnisse veranlasst. Eine mangelnde Einhaltung des Protokolls kann die Leistung und Ergebnisse beeinträchtigen.

Weitere Informationen:

Weitere Produktinformationen erhalten Sie vom Technischen Kundendienst von CytoCell.
T: +44 (0) 1223 294048
E: techsupport@cytozell.com
W: www.ogt.com

La hibridación *in situ* fluorescente (FISH) es una técnica que permite detectar secuencias de ADN en cromosomas metafásicos o núcleos interfásicos en muestras citogenéticas cultivadas o no cultivadas 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 y formamida 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 tras varios lavados 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 sondas satélite son específicas para los cromosomas humanos. Son secuencias de ADN humano altamente repetidas que se encuentran en los bloques centromérico, pericentromérico o heterocromático de cada uno de los 24 cromosomas. Las sondas permiten identificar y enumerar los cromosomas humanos en células de muestras de sangre periférica en interfase o metafase.

Especificaciones de las sondas

Las sondas se producen en forma concentrada para que, en caso necesario, puedan mezclarse en la misma hibridación hasta tres sondas de la gama de sondas satélite de CytoCell. Para cada hibridación se necesita un volumen final de 10 µl de solución de sondas. Las sondas están marcadas directamente con un fluorocromo azul (de la gama Aqua o DEAC). Las especificaciones detalladas de cada sonda se incluyen en la Tabla 1.

Tabla 1: Especificaciones de las sondas

Crom.	Número de referencia *	Locus	Región del cromosoma	Clase de ADN
8	LPE 008B	D8Z2	8p11.1-q11.1	α-satélite
12	LPE 012B	D12Z3	12p11.1-q11.1	α-satélite
17	LPE 017B	D17Z1	17p11.1-q11.1	α-satélite

*B denota un marcador azul

Este kit de contiene solo una de las sondas de la gama de sondas alfa satélite humanas marcadas directamente en azul.

Material proporcionado

Sonda: 30µl por vial (5 reacciones)

Cantidad de sonda azul D8Z2: 63.5-91.5ng/reacción

Cantidad de sonda azul D12Z3: 19.2ng/reacción

Cantidad de sonda azul D17Z1: 14.4ng/reacción

La sonda se produce en forma concentrada. Se presenta en una solución para hibridación (formamida; sulfato de dextrano; SSC).

Solución para hibridación (formamida; sulfato de dextrano; SSC): 150µl por vial

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 contratención DAPI.
3. La solución de hibridación contiene formamida, que es teratogénica; no respire los vapores y evite el contacto con la piel. Manipular con cuidado; utilizar guantes y bata de laboratorio. Al eliminarla, rociar con gran cantidad de agua.
4. La El DAPI y PI puede producir cáncer. Manipular con cuidado; utilizar guantes y bata de laboratorio. Al eliminarla, rociar con gran cantidad de agua.
5. Deseche todos los materiales peligrosos conforme a las directrices de su institución respecto a la eliminación de residuos peligrosos.
6. Los operadores deben ser capaces de diferenciar visualmente los colores rojo, azul y verde.

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. Almacene la sonda y los viales de contraste en un lugar oscuro. Asegúrese de limitar la exposición de la sonda y del contracolorante a las luces del laboratorio en todo momento.

Equipo necesarios 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 fluorocromo azul tiene especificidad por el espectro Aqua o DEAC (se necesita filtro pasabanda sencillo Aqua o DEAC). Compruebe el microscopio de fluorescencia antes de usarlo para asegurarse de que funciona correctamente. Utilice un aceite de inmersión que sea adecuado para el microscopio de fluorescencia y esté formulado para una baja autofluorescencia. Siga las recomendaciones de los fabricantes respecto a la vida útil de la lámpara y la edad de los filtros.

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 y del contracolorante 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. Dehydrate en una serie de etanol (70%, 85% y 100%), 2 minutos en cada una a TA.
4. Dejarlo secar.

Antes de la desnaturalización

5. Saque la sonda del congelador y deje que se caliente a temperatura ambiente (TA). Centrifugue brevemente los tubos antes de su uso.
6. Asegúrese de que la solución de la sonda es uniforme mezclando varias veces con la pipeta.
7. Con una punta de pipeta nueva extraiga (un volumen final de 10µl de solución de sonda):
 - para una **hibridación con una sonda** : 3µl de solución de sonda y 7µl de solución de hibridación por reacción.
 - para una **hibridación con dos sondas** : 3µl de solución de sonda y 4µl de solución de hibridación por reacción.
 - para una **hibridación con tres sondas** : 3µl de solución de sonda y 1µl de solución de hibridación por reacción..

Y colóquelo en un único tubo de microcentrifuga, girar suavemente para mezclar y efectuar pulsos de giro en la microcentrifuga. Vuelva a colocar la solución que quede 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. Introduzca el portaobjetos en un recipiente húmedo y opaco a 37 °C (+/- 1 °C) durante un periodo comprendido entre 1 hora y toda la noche.

Lavados post-hibridación

12. Quite el cubreobjetos y los restos de goma cuidadosamente.
13. Lave el portaobjetos en 0.25xSSC (pH 7.0) a 72°C (+/- 1°C) durante 2 minutos sin agitación*.
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.

* Si la señal final es mala, repita la FISH usando un lavado post-hibridación de 0.4 x SSC.

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. El endurecimiento o envejecimiento de las diapositivas puede 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. Use un termómetro calibrado para medir la temperatura de las soluciones, de los baños maría y de las incubadoras, ya que estas temperaturas son cruciales para un 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.
6. La hibridación excesiva puede producir señales adicionales o inesperadas.
7. Se recomienda a los usuarios optimizar el protocolo para sus propias muestras antes de usar la prueba con fines de diagnóstico.

Resultados esperados para la hibridación de sonda sencilla

Se encontrarán diferencias en el tamaño relativo de las señales observadas entre los cromosomas debido al distinto número de copias de las secuencias repetidas entre los cromosomas. Una muestra diploide debe mostrar una señal fluorescente en el centrómero de los dos cromosomas correspondientes en el 70 – 90% de las células analizadas.

Reactividad cruzada conocida






La sonda LPE017B puede mostrar hibridación cruzada débil para la región centromérica del cromosoma 11.

Limitaciones

La comunicación y la interpretación de FISH debe ser conforme a los estándares de prácticas profesionales, y debe tener en consideración otros 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. No seguir el protocolo puede influir en el rendimiento y los resultados.

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@cytozell.com
 W: www.ogt.com

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: Fabbricante ES: Fabricante
	EN: Use by DE: Verwendbar bis FR: Utiliser jusqu'au IT: Utilizzare entro ES: Fecha de caducidad
	EN: Temperature limitation DE: Temperaturbegrenzung FR: Limites de température IT: Limiti di temperatura ES: Limitación de temperatura
	EN: Sufficient for <n> tests DE: Ausreichend für FR: Suffisant pour IT: Sufficiente per ES: Válido para
CONT	EN: Contents DE: Inhalt FR: Contenu IT: Contenuto ES: 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