



A Sysmex Group Company



Instructions For Use
REF: LPE xxxR/G

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

CytoCell's 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 either a red (Texas Red spectrum) or a green (FITC spectrum) fluorophore. For detailed probe specifications refer to Table 1.

Table 1: Probe Specifications

Chr	Catalogue Number*	Locus	Chromosome Region	DNA Class
1	LPE 001R/G	D1Z1	1q12	satellite III
2	LPE 002R/G	D2Z2	2p11.1-q11.1	α-satellite
3	LPE 003R/G	D3Z1	3p11.1-q11.1	α-satellite
4	LPE 004R/G	D4Z1	4p11.1-q11.1	α-satellite
1/5/19	LPE 005R/G	D1Z7 D5Z2 D19Z3	1p11.1-q11.1 5p11.1-q11.1 19p11.1-q11.1	α-satellite
6	LPE 006R/G	D6Z1	6p11.1-q11.1	α-satellite
7	LPE 007R/G	D7Z1	7p11.1-q11.1	α-satellite
8	LPE 008R/G	D8Z2	8p11.1-q11.1	α-satellite
9	LPE 009R/G	D9Z3	9q12	satellite III
10	LPE 010R/G	D10Z1	10p11.1-q11.1	α-satellite
11	LPE 011R/G	D11Z1	11p11.1-q11.1	α-satellite
12	LPE 012R/G	D12Z3	12p11.1-q11.1	α-satellite
13/21	LPE 013R/G	D13Z1 D21Z1	13p11.1-q11.1 21p11.1-q11.1	α-satellite
14/22	LPE 014R/G	D14Z1 D22Z1	14p11.1-q11.1 22p11.1-q11.1	α-satellite
15	LPE 015R/G	D15Z4	15p11.1-q11.1	α-satellite

16	LPE 016R/G	D16Z2	16p11.1-q11.1	α-satellite
17	LPE 017R/G	D17Z1	17p11.1-q11.1	α-satellite
18	LPE 018R/G	D18Z1	18p11.1-q11.1	α-satellite
20	LPE 020R/G	D20Z1	20p11.1-q11.1	α-satellite
X	LPE 0XR/G	DXZ1	Xp11.1-q11.1	α-satellite
Y	LPE 0YcR/G	DYZ3	Yp11.1-q11.1	α-satellite
Y	LPE 0YqR/G	DYZ1	Yq12	satellite III

*R specifies a red label and G specifies a green label

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

Materials Provided

Probe: 15µl per vial (5 tests)

Amount of red satellite probe: minimum of 3.33ng/test

Amount of green satellite probe: minimum of 6.67ng/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

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

Storage and Handling

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

Equipment Necessary but not Supplied

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

Fluorescence Microscope Recommendation

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

Sample Preparation

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

FISH Protocol

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

Slide preparation

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

Pre-Denaturation

5. Remove the probe from the freezer and allow it to warm to RT.
6. Ensure that the probe solution is uniformly mixed with a pipette.
7. 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. **For LPE005G, place the slide in a humid, lightproof container at 37°C (+/- 1°C) 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*. **For LPE005G, immerse the slide in 0.4xSSC (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

- Baking or ageing of slides is not recommended as it may reduce signal fluorescence.
- Hybridisation conditions may be adversely affected by the use of reagents other than those provided or recommended by CytoCell Ltd.
- 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.
- 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.
- Incomplete denaturation can result in lack of signal and over denaturation can also result in non-specific binding.

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.

- Using one of the satellite probes for the chromosomes 1-12 and 15-20 (except 1/5/19 probe) a diploid sample should show a fluorescent signal at the centromere of both of the corresponding chromosomes.
- Using the probe for chromosomes 1/5/19 a diploid sample should show a fluorescent signal at the centromere of each of the chromosomes 1, 5 and 19.
- Using the probe for chromosomes 13/21 or 14/22 a diploid sample should show a fluorescent signal at the centromere of both of the chromosomes for chromosomes 13 and 21 or 14 and 22.
- The chromosome 1 satellite III probe may show faint cross-hybridisation to the pericentromeric region of chromosome 9. This may be reduced when using a 0.25xSSC stringent wash, compared to a 0.4xSSC stringent wash.
- The chromosome 2 α -satellite probe may show faint cross-hybridisation to the centromere of an F group chromosome. This may be reduced when using a 0.25xSSC stringent wash, compared to a 0.4xSSC stringent wash.
- The chromosome 4 α -satellite probe may show faint cross-hybridisation to the centromeric region of a C group chromosome. This may be reduced when using a 0.25xSSC stringent wash, compared to a 0.4xSSC stringent wash.

Limitations

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

Additional Information

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

T: +44 (0)1223 294048
E: techsupport@cytoCELL.com
W: www.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 sur les sondes

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 péracentromérique 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 marquées directement avec un fluorochrome rouge (spectre Texas Red) ou vert (spectre FITC). Pour les caractéristiques détaillées de la sonde, voir le Tableau 1.

Le kit contient seulement une sonde de la gamme de sondes alpha-satellites et satellites classiques directement marquées.

Conditionnement

Sonde : 15µl par tube (5 tests)

Quantité de sonde satellite marquée en rouge : 3.33ng/test au minimum

Quantité de sonde satellite marquée en vert : 6.67ng/test au minimum

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-phenylindole)).

Avertissements et précautions

- Pour utilisation en diagnostic *in vitro*. Pour usage professionnel uniquement.
- Porter des gants lors de la manipulation des sondes ADN et du contre-colorant DAPI.
- 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.
- 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.
- Toutes matières dangereuses doivent être éliminées selon les réglementations en vigueur dans votre institution pour l'élimination des déchets dangereux.

Conservation et manipulation

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

Équipement nécessaire non fourni

- Plaque chauffante (avec bloc et contrôle de la température jusqu'à 80°C).
- Micropipettes 1µl - 200µl.
- Bain-marie avec contrôle de la température à 72°C.
- Tubes à microcentrifugation (0.5ml).
- Microscope à fluorescence (Voir la section Microscope et filtres).
- Jarres en plastique ou en verre.
- Forceps.
- Huile à immersion pour microscope à fluorescence.
- Centrifugeuse de paillasse.
- Lames de microscope.
- Lamelles 24x24mm.
- Chronomètre.
- Incubateur à 37°C.
- 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 filtre triple bande DAPI/FITC/Texas Red est optimal pour la visualisation des 3 fluorochromes simultanément.

Préparation des échantillons

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

Protocole FISH

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

Préparation de la lame échantillon

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

Pré-dénaturation

- Retirer la sonde du congélateur à -20°C et la laisser préchauffer à température ambiante.
- Bien homogénéiser la sonde en pipetant plusieurs fois.
- 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 testet placer dans un tube à microcentrifugation, vortexer doucement puis centrifuger pendant 2-3 secondes. Remplacer rapidement le reste de sonde dans le congélateur.
- Mettre la sonde et la lame échantillon à préchauffer sur une plaque chauffante à 37°C (+/1°C) pendant 5 minutes.
- Déposer 10µl de sonde sur l'échantillon et couvrir avec une lamelle. Sceller avec du rubber cement et laisser sécher.

Dénaturation

- 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 dans une chambre humide et à l'abri de la lumière, à 37°C (+/- 1°C), pendant 1 heure à une nuit. Pour LPE005G, incuber la lame dans une chambre humide et à l'abri de la lumière, à 37°C (+/- 1°C), pendant une nuit.

Lavages post-hybridation

12. Retirer la lamelle et éliminer toutes traces de rubber cément.
13. Plonger la lame dans 0,25xSSC (pH 7,0), à 72°C (+/- 1°C), pendant 2 minutes et sans agitation*. Pour LPE005G, plonger la lame dans 0,4xSSC (pH 7,0), à 72°C (+/- 1°C), pendant 2 minutes et 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. Cuire ou vieillir les lames n'est pas recommandé, ceci pouvant réduire l'intensité du signal.
2. Les conditions d'hybridation peuvent être affectée par l'utilisation de réactifs autres que ceux fournis ou recommandés par CytoCell Ltd.
3. L'utilisation d'un thermomètre calibré est fortement recommandé pour mesurer les températures des solutions, bains-marie et incubateurs. Ces températures sont essentielles pour une efficacité optimale du produit.
4. Les concentrations des lavages (stringence), pH et température sont importants. Une faible stringence peut résulter en une liaison non-spécifique de la sonde et une trop forte stringence peut résulter en une perte de signal.
5. Une dénaturation incomplète peut engendrer une perte de signal et une trop forte dénaturation une hybridation non-spécifique.

Résultats attendus pour une seule hybridation de la sonde

On peut observer des différences dans la taille relative des signaux entre les chromosomes. Ceci est dû à la différence du nombre de copies des séquences répétées entre les chromosomes.

1. Pour les sondes satellites des chromosomes 1 à 12 et 15 à 20 (excepté la sonde 15/19), un échantillon diploïde présentera un signal fluorescent au niveau du centromère des 2 chromosomes homologues étudiés dans 70-90% des cellules analysées.
2. Pour la sonde 15/19, un échantillon diploïde présentera un signal fluorescent au niveau du centromère de chaque chromosome pour les chromosomes 1, 5 et 19 dans 70-90% des cellules analysées.
3. Pour les sondes 13/21 et 14/22, un échantillon diploïde présentera un signal fluorescent au niveau du centromère des 2 chromosomes pour les chromosomes 13 et 21 ou 14 et 22 dans 70-90% des cellules analysées.
4. La sonde satellite III du chromosome 1 peut avoir une faible hybridation croisée avec la région péri-centromérique du chromosome 9. Ceci peut être réduit lorsqu'un lavage stringent à 0,25 x SSC est utilisé en comparaison avec un lavage à 0,4 x SSC.
5. La sonde alpha-satellite du chromosome 2 peut avoir une faible hybridation croisée avec le centromère des chromosomes du groupe F. Ceci peut être réduit lorsqu'un lavage stringent à 0,25 x SSC est utilisé en comparaison avec un lavage à 0,4 x SSC.
6. La sonde alpha-satellite du chromosome 4 peut avoir une faible hybridation croisée avec la région centromérique des chromosomes du groupe C. Ceci peut être réduit lorsqu'un lavage stringent à 0,25 x SSC est utilisé en comparaison avec un lavage à 0,4 x SSC.

Limitations

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

Informations supplémentaires

Pour plus d'informations sur le produit, veuillez contacter l'Assistance technique CytoCell.
T: +44 (0)1223 294048
E: techsupport@cytoCELL.com
W: www.ogt.com

ITALIANO

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

Informazioni sulle sonde

Le 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 della sonda

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 o rosso (spettro Texas Red) o verde (spettro FITC). Per le specifiche dettagliate della sonda vedere la tabella 1. Il kit contiene solo una delle sonde appartenenti alla gamma di sonde umane satellite, alfa classiche, direttamente marcate.

Materiali forniti

Sonda: 15µl per provetta (5 test)
Quantità di sonda satellite rossa: minimo 3.33ng/test
Quantità di sonda satellite verde: minimo 6.67ng/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. Eseguire lo smaltimento dei materiali pericolosi nel rispetto delle normative interne dell'istituzione relative allo smaltimento dei residui tossici.

Conservazione e utilizzo

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

Apparecchiature necessari non forniti

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 filtro triplo DAPI/FITC/Texas Red è ottimale per visualizzare tutti e tre i fluorofori contemporaneamente.

Preparazione del campione

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

Protocollo

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

Preparazione del vetrino

1. Caricare il campione cellulare su un vetrino da microscopia. Lasciare asciugare il vetrino.
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 a -20°C e lasciarla riscaldare a TA.
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 testin 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. Mettere il vetrino in un contenitore umido, non permeabile alla luce a 37°C (+/- 1°C) per da 1 ora a tutta la notte. Per LPE005G, mettere il vetrino in un contenitore umido, non permeabile alla luce a 37°C (+/- 1°C) per tutta la notte

Lavaggi post-ibridazione

12. Rimuovere accuratamente il vetrino coprioggetto e tutte le tracce di colla.
13. Immergere il vetrino in 0,25xSSC (pH 7,0) a 72°C (+/- 1°C) per 2 minuti senza agitare*. Per LPE005G, immergere il vetrino in 0,4xSSC (pH 7,0) a 72°C (+/- 1°C) per 2 minuti senza agitare.
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. L'eccessivo riscaldamento o l'invecchiamento dei vetrini non è raccomandato in quanto suscettibili di ridurre la fluorescenza del segnale.
2. Le condizioni di ibridazione potrebbero essere influenzate negativamente dall'impiego di reagenti differenti rispetto a quelli forniti o raccomandati da CytoCell Ltd.
3. L'utilizzo di un termometro calibrato è fortemente raccomandato per la misurazione delle temperature delle soluzioni, dei bagni termostati e degli incubatori in quanto queste temperature sono di fondamentale importanza per la performance ottimale del prodotto.

- Le Konzentrationen des Waschlösungs (stringenz), der pH und die Temperatur sind von grundlegender Bedeutung, da unter diesen Bedingungen stringenz-empfindliche Verbindungen nicht gebildet werden können.
- Die Denaturierung ist unvollständig, wenn die Denaturierungstemperatur zu niedrig ist oder die Denaturierungszeit zu kurz ist.

Ergebnisse der FISH-Analyse

Die Unterschiede in der Intensität der Signale, die bei der FISH-Analyse beobachtet werden, können auf eine ungleiche Verteilung der Sonden auf den Chromosomen hindeuten.

- Bei einer Analyse von 15/19 Chromosomen (15/19) sollte ein Signal für die Sonden 1 und 2 beobachtet werden, wenn die Sonden 1 und 2 auf demselben Chromosom liegen.
- Bei einer Analyse von 13/21 oder 14/22 Chromosomen sollte ein Signal für die Sonden 1 und 2 beobachtet werden, wenn die Sonden 1 und 2 auf demselben Chromosom liegen.
- Bei einer Analyse von 13/21 oder 14/22 Chromosomen sollte ein Signal für die Sonden 1 und 2 beobachtet werden, wenn die Sonden 1 und 2 auf demselben Chromosom liegen.
- Bei einer Analyse von 13/21 oder 14/22 Chromosomen sollte ein Signal für die Sonden 1 und 2 beobachtet werden, wenn die Sonden 1 und 2 auf demselben Chromosom liegen.
- Bei einer Analyse von 13/21 oder 14/22 Chromosomen sollte ein Signal für die Sonden 1 und 2 beobachtet werden, wenn die Sonden 1 und 2 auf demselben Chromosom liegen.
- Bei einer Analyse von 13/21 oder 14/22 Chromosomen sollte ein Signal für die Sonden 1 und 2 beobachtet werden, wenn die Sonden 1 und 2 auf demselben Chromosom liegen.

Limitationen

Die Referenzwerte und die Interpretation der Ergebnisse der FISH-Analyse müssen mit den klinischen Befunden korrelieren. Die FISH-Analyse ist ein diagnostisches Werkzeug für präinatale, hämatologische und pathologische Chromosomenanalysen.

Informationsaggiuntive

Für weitere Informationen zum Produkt kontaktieren Sie das Fachpersonal. Kontaktinformationen: 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 Interphasen-Kernen in fixierten zytogenetischen Proben nachgewiesen werden können. Dabei werden DNA-Sonden verwendet, die an ganze Chromosomen oder einzelne, einmalige Sequenzen hybridisieren. Kürzliche Entwicklungen haben gezeigt, dass diese nützliche Technik nun auch als essentielles diagnostisches Werkzeug für präinatale, 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 Waschküchen entfernt und die DNA zur Visualisierung gefärbt. Unter dem Fluoreszenzmikroskop wird dann die hybridisierte Sonde als Zielmaterial erkennbar.

Sondeninformation

Satellitensonden sind für menschliche Chromosomen spezifisch. Sie sind hochrepetitive menschliche DNA-Sequenzen, die sich im Zentrum, perizentromer 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 roten (Texas Rot-Spektrum) oder einem grünen (FITC-Spektrum) Fluorophor markiert. Detaillierte Sondenspezifikationen siehe Tabelle 1.

Dieses -Kit enthält nur eine der Sonden aus der Produktpalette der direkt markierten humanen Alpha- und klassischen Satellitensonden.

Kitkomponenten

Sonde: 15µl pro Röhrchen (5 tests)
Menge der roten Satellitensonde: Mindestens 3.33ng/Test
Menge der grünen Satellitensonde: Mindestens 6.67ng/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. Durchführung ausschließlich durch qualifiziertes Personal.
- 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 potenzielles Karzinogen. Vorsichtig damit umgehen, Handschuhe und Labormantel tragen. Bei der Entsorgung mit viel Wasser nachspülen.
- Alle Gefahrstoffe sollten gemäß den Richtlinien Ihrer Einrichtung zur Gefahrstoffentsorgung entsorgt werden.

Lagerung und Behandlung

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

Benötigte, aber nicht mitgelieferte Laborgeräte

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

Empfehlungen zum Fluoreszenzmikroskop

Für die optimale Visualisierung der Probe empfehlen wir die Verwendung planapochromatischer Objektive mit 63-facher oder 100-facher Vergrößerung sowie einer 100-Watt Quecksilberlampe. Das Dreifach-Bandpassfilter DAPI/FITC/Texasrot ist für die simultane Beobachtung aller drei Fluorophore optimal geeignet.

Probenvorbereitung

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

FISH-Protokoll

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

Vorbereitung des Objektträgers

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

Prä-denaturierung

- Nehmen Sie die Sonde aus dem -20°C Gefrierschrank und lassen Sie diese sich auf Zimmertemperatur aufwärmen.
- Mischen der Sondenlösung durch mehrmaliges Aufpipettieren.
- 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 Test
 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 5 Minuten auf einer Heizplatte bei 37°C (+/- 1°C) vorwärmen.
- 10µl Sondenmischung auf die Zellprobe auftropfen und Deckglas sorgfältig auflegen. Mit Gummikleber-Lösung versiegeln und vollständig trocknen lassen.

Denaturierung

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

Hybridisierung

- Legen Sie den Träger 1 Stunde bis über Nacht bei 37°C (+/- 1°C) in einen feuchten lichtgeschützten Behälter. Legen Sie den Träger für LPE005G bei 37°C (+/- 1°C) über Nacht in einen feuchten lichtgeschützten Behälter.

Waschen nach der Hybridisierung

- Deckgläschen und alle Kleberspuren vorsichtig entfernen.
- Tauchen Sie den Träger 2 Minuten lang ohne Durchmischen bei 72°C (+/- 1°C) in 0,25 x SSC (pH 7,0) ein*. Tauchen Sie für LPE005G den Träger 2 Minuten lang ohne Durchmischen bei 72°C (+/- 1°C) in 0,4 x SSC (pH 7,0) ein.
- 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 10 Minuten unter Lichtschutz 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

- Es wird empfohlen, die Auswertung prompt durchzuführen, da das Fluoreszenzsignal mit der Zeit abnimmt. Wärme kann ebenfalls zur Abnahme der Fluoreszenz führen.
- Durch die Verwendung von anderen Reagenzien, als den von Cytozell 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 Konzentrationen der Waschlösungen (Stringenz), 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.

Erwartete Ergebnisse für eine Einzelsondenhybridisierung

Aufgrund des Unterschieds in der Kopienanzahl der repetitiven Sequenzen wird es zwischen Chromosomen Unterschiede bei der relativen Stärke der beobachteten Signale geben.

- Bei Verwendung einer der Satellitensonden für die Chromosome 1-12 und 15-20 (ausgenommen bei der 15/19 Sonde) sollte eine diploide Probe bei 70 - 90% der analysierten Zellen ein Fluoreszenzsignal am Zentromer des entsprechenden Chromosoms an beiden Chromosomen zeigen.
- Wird die Sonde für die Chromosomen 15/19 verwendet, sollte eine diploide Probe bei 70 - 90% der analysierten Zellen am Zentromer jedes Chromosoms bei den Chromosomen 1, 5 und 19 ein Fluoreszenzsignal zeigen.
- Wird die Sonde für die Chromosomen 13/21, oder 14/22 verwendet, sollte eine diploide Probe bei 70 - 90% der analysierten Zellen am Zentromer beider Chromosomen für die Chromosome 13 und 21, oder 14 und 22 ein Fluoreszenzsignal zeigen.
- Die Chromosom 1 Satelliten-III-Sonde kann mit der Perizentromer-Region von Chromosom 9 eine schwache Kreuzhybridisierung aufweisen. Das kann durch einen Waschküch mit 0,25 x SSC unter stringente Bedingungen statt durch Waschen mit 0,4 x SSC unter stringente Bedingungen reduziert werden.
- Die Chromosom 2 α-Satellitensonde kann mit dem Zentromer eines F-Gruppen-Chromosoms eine schwache Kreuzhybridisierung zeigen. Das kann durch einen Waschküch mit 0,25 x SSC unter stringente Bedingungen statt durch Waschen mit 0,4 x SSC unter stringente Bedingungen reduziert werden.
- Die Chromosom 4 α-Satellitensonde kann mit der Zentromerregion eines C-Gruppen-Chromosoms eine schwache Kreuzhybridisierung zeigen. Das kann durch einen Waschküch mit 0,25 x SSC unter stringente Bedingungen statt durch Waschen mit 0,4 x SSC unter stringente Bedingungen reduziert werden.

Einschränkungen

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

Weitere Informationen:

Weitere Produktinformationen erhalten Sie vom Technischen Kundendienst von CytoCell.
T: +44 (0) 1223 294048
E: techsupport@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 diagnóstico prenatal, hematológico y patológico. Después de la fijación, el ADN diana se trata con calor para desnaturar el ADN bicatenario haciendo que resulte monocatenario. El ADN diana queda entonces disponible para hibridarlo con una sonda de ADN igualmente desnaturado, monocatenario marcado con fluorescencia que tiene una secuencia complementaria. Después de la hibridación la sonda de ADN no específicamente hibridada y no hibridada se elimina y se aplica un contraste al ADN para su visualización. El uso de un microscopio de fluorescencia permite la visualización de la sonda hibridada en el material utilizado.

Información sobre las sondas

Las 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 la sonda

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 fluoróforo rojo (espectro de rojo Texas) o verde (espectro de FITC). En la Tabla 1 se detallan las especificaciones de las sondas.

Cada kit contiene sólo una de las sondas de la gama de sondas centroméricas marcadas directamente.

Material proporcionado

Sonda: 15µl por vial (5 reacciones)
Cantidad de la sonda satélite roja: mínimo de 3.33ng/reacción
Cantidad de la sonda satélite verde: mínimo de 6.67ng/reacción
La sonda se produce en forma concentrada. Se presenta en una solución para hibridación (formamida; sulfato de dextrano; SSC).

Solución de hibridación (formamida, dextrano sulfato, SSC) (150 µl 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 sonda contiene formamida, que es teratógena; no respire los vapores y evite el contacto con la piel. Utilizar guantes, bata de laboratorio y manipular utilizando la campana de humos. Para eliminarla, aclarar con abundante agua.
4. La contratención DAPI puede producir cáncer. Manipular con cuidado; utilizar guantes y bata de laboratorio. Para eliminarla, aclarar con abundante agua.
5. Las sustancias peligrosas deben eliminarse de acuerdo con las instrucciones de su institución en relación con la eliminación de sustancias peligrosas.

Almacenamiento y manejo

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

Equipo 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 filtro de triple banda DAPI/FITC/Texas Red es óptimo para ver simultáneamente los tres fluorocromos.

Preparación de la muestra

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

Protocolo FISH

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

Preparación del portaobjetos

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

Antes de la desnaturalización

5. Saque la sonda del congelador a -20°C y deje que se caliente a TA.
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 l 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 reacciónY 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. Colocar el porta en un recipiente húmedo opaco a 37°C (± 1°C) **1 hora durante la noche. Para LPE005G, colocar el porta en un recipiente húmedo opaco a 37°C (± 1°C) durante la noche.**

Lavados posthibridación

12. Quite el cubreobjetos y los restos de goma cuidadosamente
13. Sumergir el porta en **0,25xSSC** (pH 7,0) a 72°C (± 1°C) durante 2 minutos sin agitación* . **Para LPE005G, sumergir el porta en 0,4xSSC (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 posthibridación 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. No se recomienda calentar ni envejecer los portaobjetos ya que se podría reducir la fluorescencia de la señal.
2. Las condiciones de hibridación pueden verse afectadas negativamente con el uso de reactivos distintos de los suministrados o recomendados por CytoCell Ltd.
3. Se recomienda encarecidamente el uso de un termómetro calibrado para medir las temperaturas de soluciones, baños de agua e incubadores ya que estas temperaturas son cruciales para el rendimiento óptimo del producto.
4. Las concentraciones del lavado (estringsencia), el pH y la temperatura son importantes ya que una estringsencia baja puede provocar una fijación no específica de la sonda y demasiada estringsencia puede derivar en una falta de señal.
5. Una desnaturalización incompleta puede provocar falta de señal y una desnaturalización excesiva también puede originar una fijación no específica.

Resultados previstos para hibridación con una sonda

Habrán diferencias en el tamaño relativo de las señales observadas entre los cromosomas debido a la diferencia en el número de copias de secuencias repetidas entre cromosomas.









1. Con una de las sondas satélite para los cromosomas 1-12 y 15-20 (salvo la sonda 1/5/19) una muestra diploide debe mostrar una señal fluorescente en el centrómero de cada uno de los cromosomas correspondientes en el 70% - 90% de las células analizadas.
2. Con la sonda de cromosomas 1/5/19 una muestra diploide debe mostrar una señal fluorescente en el centrómero de cada cromosoma para los cromosomas 1, 5 y 19 en un 70% - 90% de las células analizadas.
3. Con la sonda de los cromosomas 13/21 ó 14/22 una muestra diploide debe mostrar una señal fluorescente en el centrómero de cada cromosoma para los cromosomas 13 y 21 ó 14 y 22 en un 70% - 90% de las células analizadas.
4. La sonda satélite III del cromosoma 1 puede mostrar una hibridación cruzada tenue en la región pericentromérica del cromosoma 9. Esto puede reducirse si se utiliza un lavado de estringsencia con 0.25 x SSC, comparado con un lavado de estringsencia con 0.4 x SSC.
5. La sonda α-satélite del cromosoma 2 puede mostrar una hibridación cruzada tenue en el centrómero de un cromosoma del grupo F. Esto puede reducirse si se utiliza un lavado concienzudo con 0.25 x SSC, comparado con un lavado concienzudo con 0.4 x SSC.
6. La sonda á-satélite del cromosoma 4 puede mostrar una hibridación cruzada tenue en la región centromérica de un cromosoma del grupo C. Esto puede reducirse si se utiliza un lavado concienzudo con 0.25 x SSC, comparado con un lavado concienzudo con 0.4 x SSC.

Limitaciones

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

Información adicional

Si desea obtener información adicional sobre el producto, póngase en contacto con el Departamento de soporte técnico de CytoCell.
T: +44 (0) 1223 294048
E: techsupport@cytozell.com
W: www.ogt.com

REF	EN: Catalogue number DE: Bestellnummer FR: Référence du catalogue IT: Riferimento di Catalogo ES: Número de catálogo
	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>
	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: Consultense las instrucciones de uso
	EN: Manufacturer DE: Hersteller FR: Fabricant IT: Fabricante 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
	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