



Instructions For Use  
REF: LPT xxxR/G

### Subtelomere Specific Probes



PROFESSIONAL USE ONLY

ENGLISH/FRAANÇAIS/ITALIANO/DEUTSCH/ESPAÑOL

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

Fluorescence *In Situ* Hybridisation (FISH) is a technique that allows DNA sequences to be detected on metaphase chromosomes or in interphase nuclei from fixed cytogenetic samples. The technique uses DNA probes that hybridise to entire chromosomes or single unique sequences, and serves as a powerful adjunct to classic cytogenetics. Recent developments have meant that this valuable technique can now be applied as an essential 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

Chromosomal rearrangements involving the ends of chromosomes have emerged as an important cause of genetic disease given the gene-rich nature of the regions adjacent to the telomeres<sup>1</sup>. The importance of such subtelomeric chromosome rearrangements has been clearly shown by their observed association with unexplained mental retardation and congenital abnormalities<sup>2</sup>. Individual subtelomere specific probes have been used to focus on particular subtelomeric regions, and have resulted in the establishment of syndromes such as the chromosome 1p36 deletion syndrome<sup>3,10</sup> and the 22q13.3 deletion syndrome<sup>4</sup>. The probes are also finding applications in the investigation of autistic disorders<sup>5</sup>, recurrent miscarriages<sup>6</sup> and haematological malignancies<sup>7</sup>. CytoCell's subtelomere specific probes are located in the most distal region of chromosome specific DNA on each chromosome. Beyond this unique sequence material is the 100 to 300kb region of telomere associated repeat followed by the cap of between 3 to 20kb of tandemly repeated (TTAGGG)<sub>n</sub> sequence<sup>8</sup>. The probes have been chosen from the most distal unique sequence to provide the best possible specificity, whilst also being applicable for routine use for the examination of subtelomeric enumeration and integrity. The original second-generation set of probes is derived from PAC clones<sup>9</sup> and was established in conjunction with the Institute of Molecular Medicine, part of Oxford University, in the UK<sup>11</sup>. Continuing product improvements have led to some substitutions with alternative cosmid (35-40kb) or BAC (150kb) clones to give improved signal strength or chromosome specificity.

#### Probe Specification

The subtelomere specific probe range identifies 41 of the 46 human telomeres as it excludes the p-arm telomeres of the acrocentric chromosomes. The X and Y chromosome p-arms share the same subtelomere clone (839D20) as do the X and Y q-arms (C8.2/1 and 225F6) due to the pseudoautosomal nature of these regions. The probes are directly labelled with either a red or a green fluorophore. For detailed probe specifications refer to Table 1.

Table 1: Probe Specifications

Probe	Catalogue Number	Clone name	Marker	Accession Number (if available)
1p	LPT 01PR/G	CEB108	RH120573	-
1q	LPT 01QR/G	160H23	GDB:315525	D1S3739
2p	LPT 02PR/G	dJ892G20	D2S2983	D2S2983
2q NP	LPT 02QNP/R/G	172113	D2S447	D2S2986
3p	LPT 03PR/G	dJ1186B18	D3S4559	D3S4559
3q	LPT 03QR/G	196F4	D3S1272	D3S1272
4p	LPT 04PR/G	36P21	D4S3360	D4S3360
4q	LPT 04QR/G	963K6	D4S139	-
5p	LPT 05PR/G	189N21	RH120167	-
5q	LPT 05QR/G	240G13	D5S2907	D5S2907
6p	LPT 06PR/G	62111	STS-H99640	-
6q	LPT 06QR/G	57H24	D6S2522	D6S2522
7p	LPT 07PR/G	109a6	RH104000	RH104000
7q	LPT 07QR/G	2000a5	RH48601	RH48601
8p	LPT 08PR/G	dJ580L5	RH40619	D8S2333
8q	LPT 08QR/G	489D14	D8S595	D8S1925

9p	LPT 09PR/G	43N6	RH65569	RH65569
9q	LPT 09QR/G	112N13	D9S2168	D9S2168
10p	LPT 10PR/G	306F7	STS-N35887	D10S2488
10q	LPT 10QR/G	137E24	RH44494	RH44494
11p	LPT 11PR/G	dJ908H22	D11S2071	D11S2071
11q	LPT 11QR/G	dJ770G7	D11S4974	D11S4974
12p	LPT 12PR/G	496A11	D12S200	D12S200
12q	LPT 12QR/G	221K18	RH81094	D12S2343
13q	LPT 13QR/G	163C9	D13S1825	D13S1825
14q	LPT 14QR/G	dJ820M16	D14S1420	D14S1420
15q	LPT 15QR/G	154P1	D15S936	D15S936
16p	LPT 16PR/G	121I4	SHGC-16929(UCSC)	D16S3400
16q	LPT 16QR/G	240G10	RH80305	RH80305
17p	LPT 17PR/G	202L17 2111b1	D17S2199	D17S2199
17q	LPT 17QR/G	362K4	362K4 For and Rev	D17S2200
18p	LPT 18PR/G	74G18	D18S552	D18S552
18q	LPT 18QR/G	dJ964M9	D18S1390	D18S1390
19p	LPT 19PR/G	dJ546C11	D19S676E	-
19q	LPT 19QR/G	F21283	RH102404	RH102404
20p	LPT 20PR/G	dJ1061L1	D20S210	D20S502
20q	LPT 20QR/G	81F12	RH10656	-
21q	LPT 21QR/G	63H24	D21S1446	D21S1575
22q	LPT 22QR/G	99K24 N85a3	D22S1726	D22S1726
XpYp	LPT XYPR/G	839D20	DXYS129	DXYS129
XqYq	LPT XYQR/G	225F6 C8.2/1	DXYS154 SYBL1	Z43206 -

R specifies a red label and G specifies a green label

\*\*This probe is specific for the p-arms of both X and Y.

\*\*\*This probe is specific for q-arms of both X and Y.

This kit contains only one of the probes from the range of directly labelled subtelomere specific probes.

#### Materials Provided

Probe: 15µl per vial (5 tests)

Amount of red or green subtelomere specific probe: minimum of 40ng/test

The probe is produced in a concentrated form. It is labelled with either a red or a green fluorophore. The probe 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.
6. Users of this product must be capable of visually distinguishing between the colours 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. 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.

The fluorescence microscope should be checked before use to ensure it is operating correctly. Immersion oil should be suitable for use in fluorescence microscopy and formulated for low autofluorescence. Manufacturers' recommendations should be followed 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: 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. Briefly centrifuge tubes before use.
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 testand transfer it to a microcentrifuge tube. Quickly return the remaining probe to the freezer.
8. Place the probe and the sample slide to prewarm on a 37°C (+/- 1°C) hotplate for 5 minutes.
9. Spot 10µl of probe mixture onto the cell sample and carefully apply a coverslip. Seal with rubber solution glue and allow the glue to dry completely.

### Denaturation

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

### Hybridisation

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

### Post-Hybridisation Washes

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

### Stability of Finished Slides

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

### Procedural Recommendations

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

### Expected Results for a single probe hybridisation

A normal sample will show a signal in the telomeric region of each of the relevant chromosome homologues, or 2 signals in interphase cells.

Probe	Catalogue Number	Known cross-hybridisations
8p	LPT08PR/G	8p with 1p and 3q
9q	LPT09QR/G	9q with 10p, 16p, 18p and XqYq
11p	LPT11PR/G	11p with 17p
11q	LPT11QR/G	11q with 12q (interstitial)
12p	LPT12PR/G	12p with 6p and 20q
14q	LPT14QR/G	14q with 16 centromere
17q	LPT17QR/G	17q with 1p, 5q, 6q and 11p
19p	LPT19PR/G	19p with 20q
20q	LPT20QR/G	20q with 6p
22q	LPT22QR/G	22q with 2q (interstitial)

### 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 alter the performance of the assay and may yield erroneous 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.oqt.com](http://www.oqt.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 réarrangements chromosomiques impliquant les extrémités des chromosomes se sont révélés être une cause importante de maladie génétique, en raison du caractère riche en gènes des régions adjacentes aux télomères. L'importance de ces réarrangements subtélomériques des chromosomes a été clairement démontrée par leur association observée avec des arriérations mentales et des anomalies congénitales inexplicables<sup>2</sup>. Des sondes individuelles, spécifiques pour les régions subtélomériques, ont été utilisées pour cibler des régions subtélomériques particulières, et elles ont donné lieu à la détermination de syndromes tels que la monosomie 1p36<sup>3,10</sup> et la monosomie 22q13<sup>4</sup>. Les sondes trouvent également des applications dans l'investigation des troubles autistiques<sup>5</sup>, des fausses couches récidivantes<sup>6</sup> et des hémopathies malignes<sup>7</sup>.

Les sondes de CytoCell, spécifiques pour les régions subtélomériques, sont positionnées dans la région la plus distale de l'ADN chromosomique spécifique de chaque chromosome. Au-delà de ce matériel de séquence unique, se trouve le segment de 100 à 300Kb constitué de séquences répétitives associées au télomère, suivi de la séquence terminale de 3 à 20Kb constituée de répétitions en tandem (TTAGGG)<sup>8</sup>.

Les sondes ont été choisies à partir de la séquence la plus distale afin de produire la meilleure spécificité possible, tout en permettant également leur utilisation systématique pour l'analyse du dénombrement et de l'intégrité des subtélomères.

Le jeu de sondes original de deuxième génération est dérivé de clones PAC<sup>9</sup> et a été élaboré conjointement avec l'Institute of Molecular Medicine, qui fait partie de l'université d'Oxford, au Royaume-Uni<sup>11</sup>. L'amélioration constante des produits a entraîné certaines substitutions par d'autres cosmidés (35-40Kb) ou clones BAC (150Kb) afin d'obtenir une meilleure intensité du signal ou une meilleure spécificité chromosomique.

### Caractéristiques de la sonde

La gamme de sondes spécifiques pour les régions subtélomériques identifie 41 des 46 télomères humains, étant donné qu'elle exclut les télomères du bras court (p) des chromosomes acrocentriques. Les bras courts (p) des chromosomes X et Y partagent le même clone subtélomérique (839D20), tout comme les bras longs (q) de X et Y (C8.2/1 et 225F6) en raison de la nature pseudo-autosomique de ces régions. Les sondes sont marquées directement avec un fluorochrome rouge ou vert. Pour les caractéristiques détaillées de la sonde, voir le Tableau 1.

### Conditionnement

**Sonde** : 15µl par tube (5 tests)

Quantité de sonde spécifique pour les régions subtélomériques, marquée en rouge ou vert : 40ng/test au minimum

La sonde est fournie sous forme concentrée. Elle est marquée avec un fluorochrome rouge ou vert. La sonde est fournie dans une solution d'hybridation (formamide ; sulfate de dextrane ; SSC).

**Solution d'hybridation** (formamide, sulfate de dextran, SSC) (150 µl 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

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

### Équipement nécessaire non fourni

1. Plaque chauffante (avec bloc et contrôle de la température jusqu'à 80°C).
2. Micropipettes 1µl - 200µl.
3. Bain-marie avec contrôle de la température à 72°C.
4. Tubes à microcentrifugation (0.5ml).
5. Microscope à fluorescence (Voir la section Microscope et filtres).
6. Jarses en plastique ou en verre.
7. Forceps.
8. Huile à immersion pour microscope à fluorescence.
9. Centrifugeuse de paillasse.
10. Lames de microscope.
11. Lamelles 24x24mm.
12. Chronomètre.
13. Incubateur à 37°C.
14. Colle Rubber cement.

### Microscope et filtres

Pour une visualisation optimale de la sonde, nous recommandons l'utilisation d'une lampe à mercure de 100-watts et d'objectifs plan apochromatiques x63 ou x100. Le filtre triple bande DAPI/FITC/Texas Red est optimal pour la visualisation des 3 fluorochromes simultanément.

Le microscope à fluorescence doit être vérifié avant utilisation, afin de s'assurer qu'il fonctionne correctement. L'huile d'immersion doit être adaptée à une utilisation en microscope par fluorescence et formulée pour une auto-fluorescence faible. Il convient de respecter les recommandations du fabricant concernant la durée de vie de la lampe et l'âge 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 : Veuillez toujours vous assurer de limiter l'exposition de la sonde à l'éclairage du laboratoire)

### Préparation de la lame échantillon

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

### Pré-dénaturation

5. Retirer la sonde du congélateur à -20°C et la laisser préchauffer à température ambiante. Centrifuger brièvement les tubes avant ouverture.
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 testet 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 rubber cément et laisser sécher.

### Dénaturation

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

### Hybridation

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

### Lavages post-hybridation

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

### Stabilité des lames

Les lames FISH sont analysables pendant un mois si elles sont conservées à l'obscurité et/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 affectées 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

Un échantillon normal présentera un signal sur la région télomérique étudiée sur chaque chromosome homologue, ou 2 signaux sur des cellules en interfase.

Sonde	Numéro de catalogue	Hybridations croisées connues
8p	LPT08PR/G	8p avec 1p et 3q
9q	LPT09QR/G	9q avec 10p, 16p, 18p et XqYq
11p	LPT11PR/G	11p avec 17p
11q	LPT11QR/G	11q avec 12q (interstitielle)
12p	LPT12PR/G	12p avec 6p et 20q
14q	LPT14QR/G	14q avec centromère 16
17q	LPT17QR/G	17q avec 1p, 5q, 6q et 11p
19p	LPT19PR/G	19p avec 20q
20q	LPT20QR/G	20q avec 6p
22q	LPT22QR/G	22q avec 2q (interstitielle)

### 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. Le non-respect du protocole peut altérer la performance du test et peut donner lieu à des résultats erronés.

### Informations supplémentaires

Pour plus d'informations sur le produit, veuillez contacter l'Assistance technique CytoCell.  
T: +44 (0)1223 294048  
E: techsupport@cytozell.com  
W: [www.oqt.com](http://www.oqt.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

Riarrangiamenti cromosomici che interessano le estremità dei cromosomi sono emersi come una causa importante di malattie genetiche data la natura ricca di geni delle regioni adiacenti ai telomeri<sup>1</sup>. L'importanza di tali riarrangiamenti cromosomici subtelomerici è stata chiaramente dimostrata dall'osservazione della loro associazione con ritardo mentale non spiegato e anomalie congenite<sup>2</sup>.

Singole sonde subtelomeriche specifiche sono state utilizzate per concentrarsi su particolari regioni subtelomeriche e hanno avuto come risultato la definizione di sindromi come la sindrome da delezione del cromosoma 1p36<sup>3,10</sup> e la sindrome da delezione del cromosoma 22q13.3<sup>4</sup>. Le sonde stanno anche trovando applicazione negli studi di disturbi autistici<sup>5</sup>, aborti ricorrenti<sup>6</sup> e neoplasie ematologiche<sup>7</sup>.

Le sonde subtelomeriche specifiche CytoCell sono posizionate nella regione più distale del DNA specifico del cromosoma di ciascun cromosoma. Al di là di questo materiale per sequenza unica c'è la regione da 100 a 300kb della ripetizione telomero associata seguita dal cap della sequenza ripetuta in tandem da 3 a 20kb (TTAGGG)<sup>8</sup>.

Le sonde sono state scelte dalla sequenza unica più distale per assicurare la migliore specificità possibile oltre ad essere applicabili per uso di routine per l'esame di enumerazione e integrità subtelomerica.

Il set di sonde originali di seconda generazione deriva da cloni PAC<sup>9</sup> e fu creato in collaborazione con l'Institute of Molecular Medicine, che fa parte della Oxford University, nel Regno Unito<sup>11</sup>. Continui miglioramenti al prodotto hanno portato ad alcune sostituzioni con cosmidie alternativo (35-40kb) o cloni BAC (150kb) per dare forza del segnale o specificità cromosomica migliori.

### Specifiche della sonda

La gamma di sonde subtelomeriche specifiche identifica 41 dei 46 telomeri umani poiché esclude i telomeri del braccio p dei cromosomi acrocentrici. I bracci p dei cromosomi X e Y condividono lo stesso clone subtelomerico (839D20) e lo stesso accade per i bracci q degli stessi cromosomi (C8.2/1 e 225F6) e ciò a causa della natura pseudoautosomica di queste regioni. Le sonde sono direttamente marcate o con un fluoroforo rosso o con un fluoroforo verde. Per le specifiche dettagliate della sonda vedere la tabella 1.

### Materiali forniti

**Sonda:** 15µl per provetta (5 test)

Quantità di sonda subtelomerica specifica rossa o verde: minimo 40ng/test

La sonda è prodotta in forma concentrata. È marcata o con un fluoroforo rosso o con un fluoroforo verde. La sonda è consegnata in soluzione di ibridazione (Formamide; Dextran 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 uncamiche 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.
6. Coloro che utilizzano questo prodotto devono essere in grado di distinguere visivamente i colori 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. 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.

Prima dell'uso il microscopio a fluorescenza deve essere controllato per garantire che funzioni correttamente. L'olio a immersione deve essere adatto per l'uso con i microscopi a fluorescenza e progettato con una bassa autofluorescenza. Seguire le raccomandazioni del produttore sulla 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: 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-dénaturation

1. Rimuovere la sonda dal congelatore a -20°C e lasciarla riscaldare a TA. Centrifugare brevemente i tubi prima dell'uso.
2. Accertarsi che la soluzione della sonda sia uniforme pipettando ripetutamente con delicatezza.
3. 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
- 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.
- Pre-riscaldare la sonda, il vetrino ed il coprioggetto su una piastra riscaldante a 37°C (+/- 1°C) per 5 minuti.
  - Caricare 10µl di miscela della sonda sul campione cellulare e coprire delicatamente con il coprioggetto. Sigillare con soluzione collante gommosa e far asciugare completamente.

#### Denaturazione

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

#### Ibridazione

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

#### Lavaggi post-ibridazione

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

#### Stabilità del vetrino finito

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

#### Raccomandazioni per l'uso

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

#### Risultati attesi

Un campione normale mostrerà un segnale in prossimità della regione telomerica di ognuno dei due cromosomi omologhi o, nel caso di cellule in interfase, due segnali.

Sondea	Numero di catalogo	Cross ibridazioni note
8p	LPT08PR/G	8p con 1p e 3q
9q	LPT09QR/G	9q con 10p, 16p, 18p e XqYq
11p	LPT11PR/G	11p con 17p
11q	LPT11QR/G	11q con 12q (interstiziale)
12p	LPT12PR/G	12p con 6p e 20q
14q	LPT14QR/G	14q con 16 centromero
17q	LPT17QR/G	17q con 1p, 5q, 6q e 11p
19p	LPT19PR/G	19p con 20q
20q	LPT20QR/G	20q con 6p
22q	LPT22QR/G	22q con 2q (interstiziale)

#### Limitazioni

La referenziazione e l'interpretazione dei risultati della FISH devono essere coerenti con gli standard professionali della pratica medica e dovrebbe prendere in considerazione altre informazioni cliniche e diagnostiche. Questo kit è concepito in aggiunta alla tecnica citogenetica classica e azione terapeutica non deve essere messa in atto esclusivamente sulla base del risultato di FISH. La mancata adesione al protocollo può alterare le prestazioni del saggio e condurre a risultati errati.

#### Informazioni aggiuntive

Per informazioni aggiuntive sul prodotto contattare il Dipartimento di Assistenza Tecnica CytoCell.  
T: +44 (0)1223 294048  
E: techsupport@cytoCELL.com  
W: [www.oct.com](http://www.oct.com)

### DEUTSCH

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

#### Sondeninformation

Chromosomenumlagerungen, an denen die Enden der Chromosomen beteiligt sind, haben sich als wichtige Ursache genetischer Erkrankungen herausgestellt, da die Regionen neben den Telomeren besonders reich an Genen sind<sup>1</sup>. Die Bedeutung dieser subtelomeren Chromosomenumlagerungen wurde durch ihren beobachteten Zusammenhang mit ungeklärter mentaler Retardierung und angeborenen Anomalien eindeutig nachgewiesen<sup>2</sup>. Für einzelne Subtelomere wurden spezifische Sonden zur Konzentration auf spezielle subtelomere Regionen eingesetzt, und diese haben zur Ermittlung von Syndromen wie dem Chromosom 1p36 Deletionssyndrom<sup>3,10</sup> und dem 22q13.3 Deletionssyndrom geführt<sup>4</sup>. Die Sonden werden auch zur Untersuchung autistischer Störungen<sup>5</sup>, wiederholter Fehlgeburten<sup>6</sup> und bösartiger hämatologischer Erkrankungen verwendet<sup>7</sup>. Subtelomerspezifische Sonden von CytoCell befinden sich in der distalen Region der chromosomenspezifischen DNA auf jedem Chromosom. Jenseits dieses eindeutigen Sequenzmaterials liegt die 100 bis 300kb Region des telomerassoziierten Repeats, gefolgt von der zwischen 3 und 20kb liegenden Kappe der doppelt wiederholten (TTAGGG)<sub>n</sub> Sequenz<sup>8</sup>. Die Sonden wurden aus der distalsten eindeutigen Sequenz gewählt, um die bestmögliche Spezifität zu liefern, während sie auch für die Routineanwendung zur Untersuchung von

subtelomerer Aufzählung und Integrität anwendbar sind.

Der Originalsondensatz der zweiten Generation stammt aus PAC-Klonen<sup>9</sup> und wurde in

Zusammenarbeit mit dem Institute of Molecular Medicine, das zur Oxford University in Großbritannien gehört, entwickelt<sup>11</sup>. Weitere Produktverbesserungen führten zu einigen Substitutionen durch alternative Cosmid- (35-40kb) oder BAC- (150kb) Klone, um verbesserte Signalstärke oder Chromosomenspezifität zu ergeben.

#### Sondenspezifikation

Der subtelomerspezifische Sondenbereich identifiziert 41 der 46 menschlichen Telomere, da die p-Arm-Telomere der akrozentrischen Chromosomen ausgeschlossen werden. Die p-Arme der X- und Y-Chromosomen nutzen aufgrund der pseudoautosomalen Beschaffenheit dieser Regionen denselben Subtelomerklon (839D20) wie die q-Arme von X und Y (C8.2/1 und 225F6). Die Sonden sind direkt mit einem roten oder einem grünen Fluorophor markiert. Detaillierte Sondenspezifikationen siehe Tabelle 1.

#### Kitkomponenten

**Sonde:** 15µl pro Röhrchen (5 tests)

Menge der roten oder grünen subtelomerspezifischen Sonde: Mindestens 40ng/Test

Die Sonde wird in konzentrierter Form hergestellt. Sie ist mit einem roten oder einem grünen Fluorophor markiert. Die Sonde wird in Hybridisierungslösung geliefert (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 Laborpersonal.
- 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 potentielles Karzinogen. Vorsichtig damit umgehen, Handschuhe und Labormantel tragen. Bei der Entsorgung mit viel Wasser nachspülen.
- Alle Gefahrstoffe sollten gemäß den Ihren hausinternen Richtlinien zur Gefahrstoffentsorgung entsorgt werden.
- 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 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. Das Fluoreszenzmikroskop muss vor dem Gebrauch auf seine korrekte Funktion 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 vor Licht zu schützen.)

#### Vorbereitung des Objektträgers

- Zellprobe auf 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 Gefrierschrank und lassen Sie diese sich auf Zimmertemperatur aufwärmen. Röhrchen kurz zentrifugieren vor dem Einsatz.
- Mischen der Sondenlösung erfolgt 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

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

#### Waschen nach der Hybridisierung

- Deckgläsern und alle Kleberreste vorsichtig entfernen.

- Objekträger 2 Minuten in 0,4 x SSC (pH 7,0) bei 72°C (+/- 1°C) waschen.
- Objekträger abtropfen lassen und 30 Sekunden in 2 x SSC, 0,05% Tween-20 bei RT, (pH 7,0), waschen.
- Den Objekträger 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.

#### Stabilität der fertigen Objekträger

Objekträger 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 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 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.

#### Zu erwartende Ergebnisse

Eine normale Probe wird im Telomerbereich jedes der entsprechenden homologen Chromosome ein Signal zeigen, bzw. zwei Signale in Interphase-Zellen.

Sonden	Katalog-Nummer	Bekanntes Kreuzhybridisierungen
8p	LPT08PR/G	8p mit 1p und 3q
9q	LPT09QR/G	9q mit 10p, 16p, 18p und XqYq
11p	LPT11PR/G	11p mit 17p
11q	LPT11QR/G	11q mit 12q (interstitiell)
12p	LPT12PR/G	12p mit 6p und 20q
14q	LPT14QR/G	14q mit 16 Zentromer
17q	LPT17QR/G	17q mit 1p, 5q, 6q und 11p
19p	LPT19PR/G	19p mit 20q
20q	LPT20QR/G	20q mit 6p
22q	LPT22QR/G	22q mit 2q (interstitiell)

#### 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 sollte therapeutische Maßnahmen nicht allein auf Grundlage der FISH-Ergebnisse veranlassen. Die Nichteinhaltung des Protokolls kann die Leistung des Tests beeinträchtigen und zu fehlerhaften Ergebnissen führen.

#### Weitere Informationen:

Weitere Produktinformationen erhalten Sie vom Technischen Kundendienst von CytoCell.  
: +44 (0)1223 294048  
E: techsupport@cytozell.com  
W: [www.oqi.com](http://www.oqi.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

Se ha observado que las reorganizaciones cromosómicas que afectan a los extremos de los cromosomas son una causa importante de enfermedad genética debido a la naturaleza rica en genes de las regiones adyacentes a los telómeros<sup>1</sup>. La importancia de dichas reorganizaciones cromosómicas subteloméricas se ha demostrado claramente al observar su asociación con el retraso mental no explicado y las anomalías congénitas<sup>2</sup>.

Se han usado sondas individuales específicas del subtelómero dirigidas a regiones subteloméricas concretas, lo que ha dado lugar a establecer síndromes como el de delección de 1p36<sup>3,10</sup> y el de delección de 22q13.3<sup>4</sup>. Las sondas también tienen aplicaciones útiles en la investigación de trastornos de autismo<sup>5</sup>, abortos espontáneos recurrentes<sup>6</sup> y neoplasias malignas hematológicas<sup>7</sup>.

Las sondas específicas del subtelómero de CytoCell se localizan en la región más distal del ADN específico de cada cromosoma. Más allá de esta secuencia única hay una región de 100a 300kb de una repetición asociada con el telómero, seguida de un capuchón de entre 3 a 20kb de una secuencia (TTAGGG)<sub>n</sub> repetida en tándem<sup>8</sup>.

Las sondas se han elegido de la secuencia única más distal para proporcionar la mejor especificidad posible y servir al mismo tiempo para el uso rutinario en la exploración de la enumeración e integridad subteloméricas.

El conjunto de sondas original de segunda generación procede de los clones PAC<sup>9</sup> y se estableció en colaboración con el Institute of Molecular Medicine perteneciente a la Universidad de Oxford del Reino Unido<sup>11</sup>. Las continuas mejoras del producto han conducido a algunas sustituciones con un cósmido alternativo (35-40kb) o clones BAC (150kb) para dotar mayor fuerza a la señal o mayor especificidad cromosómica.

#### Especificaciones de la sonda

El rango de la sonda específica del subtelómero identifica 41 de los 46 telómeros humanos, ya que excluye los telómeros del brazo p de los cromosomas acrocéntricos. Los brazos p de los cromosomas X e Y comparten el mismo clon subtelomérico (839D20), al igual que los brazos q de estos mismos cromosomas (C8.2/1 y 225F6) debido a la naturaleza pseudoautosómica de estas regiones. Las sondas están marcadas directamente con un fluoróforo rojo o verde. En la Tabla 1 se detallan las especificaciones de las sondas.

#### Material proporcionado

Sonda: 15µl por vial (5 reacciones)

Cantidad de la sonda roja o verde específica del subtelómero: mínimo de 40ng/reacción

La sonda se produce en una forma concentrada. Está marcada con un fluoróforo rojo o uno verde. La sonda se presenta en solución de hibridación (formamida; sulfato de dextrano; SSC).

Solución de hibridación (formamida, dextrano sulfato, 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

- Para diagnóstico *in vitro*. Sólo para uso profesional.
- Utilizar guantes al manipular las sondas de ADN y la contracción DAPI.
- 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.
- La contracción DAPI puede producir cáncer. Manipular con cuidado; utilizar guantes y bata de laboratorio. Para eliminarla, aclarar con abundante agua.
- Las sustancias peligrosas deben eliminarse de acuerdo con las instrucciones de su institución en relación con la eliminación de sustancias peligrosas.
- Las personas que utilicen este producto 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. Los viales de contraste y de sonda deben almacenarse en un lugar oscuro.

#### Equipo necesario pero no proporcionados

- Placa caliente (con una placa sólida y un control de temperatura preciso hasta 80°C).
- Micropipetas de volumen variable (rango 1µl - 200µl).
- Baño de agua con control preciso de temperatura a 72°C.
- Tubos de microcentrifugado (0.5ml).
- Microscopio de fluorescencia (lea la sección Recomendaciones para el microscopio defluorescencia).
- Recipientes de cristal y de plástico.
- Pinzas.
- Microscopio de fluorescencia con objetivo de inmersión en aceite.
- Centrífuga de banco.
- Portaobjetos para microscopio.
- Cubreobjetos de 24x24mm.
- Cronómetro.
- Incubador 37°C.
- 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.

Se debe comprobar el microscopio de fluorescencia antes de su uso para confirmar que funciona correctamente. El aceite de inmersión debe ser adecuado para la microscopía de fluorescencia y presentar baja autofluorescencia. Se deben seguir las recomendaciones del fabricante relativas a la vida de la lámpara y la antigüedad 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 a las luces del laboratorio en todo momento)

#### Preparación del portaobjetos

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

#### Antes de la desnaturalización

Saque la sonda del congelador a -20°C y deje que se caliente a TA. Dar un pulso de centrifuga a los tubos antes de su uso.

- Asegúrese de que la solución de la sonda es uniforme mezclando varias veces con lapipeta.
- 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 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.

- Pre caliente el portaobjetos y la muestra en una placa caliente a 37°C (+/- 1°C) durante 5 minutos.
- Ponga 10µl de sonda sobre el portaobjetos y aplique cuidadosamente el cubreobjetos. Selle con solución de goma y deje secar completamente.

#### Desnaturalización

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

#### Hibridación

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

#### Lavados post-hibridación

- Quite el cubreobjetos y los restos de goma cuidadosamente.
- Lave el portaobjetos en 0.4xSSC (pH 7.0) a 72°C (+/- 1°C) durante 2 minutos.
- Seque el portaobjetos y lávelo en 2 x SSC, 0.05% Tween-20 (pH 7.0) a TA durante 30 segundos sin agitación.
- Escurra el portaobjetos y añada 10µl de DAPI antifade sobre cada muestra.
- Aplique un cubreobjetos, elimine burbujas y deje reposar en oscuridad durante 10 minutos.
- Obsérvelo con el microscopio de fluorescencia.

#### Estabilidad de los portaobjetos terminados

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

#### Recomendaciones de procedimiento

- No se recomienda calentar ni envejecer los portaobjetos ya que se podría reducir la fluorescencia de la señal.
- Las condiciones de hibridación pueden verse afectadas negativamente con el uso de reactivos distintos de los suministrados o recomendados por Cytocell Ltd.
- 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.
- Las concentraciones del lavado (estringencia), el pH y la temperatura son importantes ya que una estringencia baja puede provocar una fijación no específica de la sonda y demasiada estringencia puede derivar en una falta de señal.

5. Una desnaturalización incompleta puede provocar falta de señal y una desnaturalización excesiva también puede originar una fijación no específica.

#### Resultados esperados

Una muestra normal mostrará una señal de la región telomérica de cada uno de los homólogos cromosómicos relevantes, o dos señales en las células en interfase.

Sonda	Número de catálogo	Hibridaciones cruzadas conocidas
8p	LPT08PR/G	8p con 1p y 3q
9q	LPT09QR/G	9q con 10p, 16p, 18p y XqYq
11p	LPT11PR/G	11p con 17p
11q	LPT11QR/G	11q con 12q (intersticial)
12p	LPT12PR/G	12p con 6p y 20q
14q	LPT14QR/G	14q con el centrómero 16
17q	LPT17QR/G	17q con 1p, 5q, 6q y 11p
19p	LPT19PR/G	19p con 20q
20q	LPT20QR/G	20q con 6p
22q	LPT22QR/G	22q con 2q (intersticial)

#### 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. Si no se sigue el protocolo, se pueden alterar los resultados del test y obtener resultados erróneos.

#### 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](mailto:techsupport@cytozell.com)

W: [www.oqt.com](http://www.oqt.com)

#### References/Bibliographie/Bibliographia/Literatur/Bibliografia

- Saccone S *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 1992;89:4913-7
- Flint J *et al.*, Nat Genet 1997;15(3):252-7
- Heilstedt HA *et al.*, Clin Genet 2003;64(4):310-6
- Luciani JJ *et al.*, J Med Genet 2003;40(9):690-6
- Wolff DJ *et al.*, Genet in Med 2002;4(1):10-4
- Yakut S *et al.*, Clin Genet 2002;61(1):26-31
- Tosi S *et al.*, Genes Chrom Cancer 1999;25(4):384-92
- Moyzis RK *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 1988;85:6622-6
- Knight SJL *et al.*, Am J Hum Genet 2000;67:320-32
- Institute of Molecular Medicine and National Institute of Health Collaboration, Nat Genet 1997;14:86-9
- Knight SJL *et al.*, Eur J Hum Genet 1997;5:1-6
- Macina RA *et al.*, Hum Mol Genet 1994;3(10):1847-53
- Fan YS *et al.*, Genet Med 2001;3(6):416-21
- Knight SJ, Flint J, J Med Genet 2000;37(6):401-9

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
	EN: Contents DE: Inhalt FR: Contenu IT: Contenuto ES: Contenido

#### Patents and Trademarks

CytoCell is a registered trademark of Cytozell Ltd.



#### Cytozell Ltd.

Oxford Gene Technology,  
418 Cambridge Science  
Park, Milton Road,  
Cambridge, CB4 0PZ,  
UKT: +44(0)1223  
294048  
F: +44(0)1223 294986  
E: [probes@cytozell.com](mailto:probes@cytozell.com)  
W: [www.oqt.com](http://www.oqt.com)