



Instructions For Use

REF: LPA 005

Prenatal 13, 18 and 21 Enumeration Probe kit



FOR PROFESSIONAL USE ONLY

Further information available at www.cytocell.com

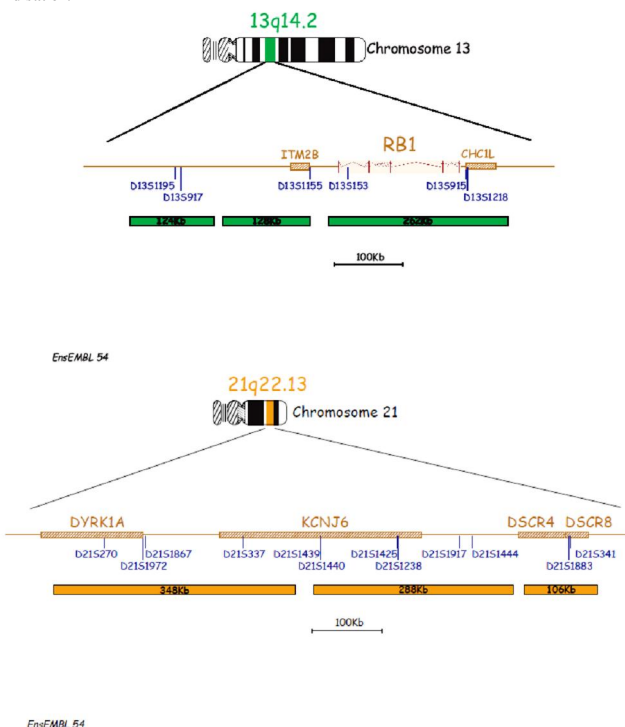
Fluorescence *In Situ* Hybridisation (FISH) is a technique that allows DNA sequences to be detected on metaphase chromosomes or in interphase nuclei from fixed cultured or uncultured cytogenetic samples. The technique uses DNA probes that hybridise to entire chromosomes or single unique sequences, and serves as a powerful adjunct to classic cytogenetics. 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 by a series of rapid formamide-free stringent washes and the DNA counterstained for visualisation. Fluorescence microscopy then allows the visualisation of the hybridised probe on the target material.

Probe Specification

13 unique sequence (13q14.2) Green
18 centromere 18p11.1 ó q11.1 (D18Z1) Blue
21 unique sequence (21q22.13) Orange

The 13, 18 and 21 probe kit is a prenatal assay for the rapid detection of trisomy 13, 18 and 21 present in Patau, Edward and Down syndrome respectively. The assay needs to be used in conjunction with foetal karyotype analysis, and has been designed for fluorescence *in situ* hybridisation of interphase nuclei of uncultured amniotic fluid cells. This will provide a result within 24 hours of receiving an amniocentesis sample. This test does not detect structural chromosome abnormalities, mosaicism and numerical abnormalities of other chromosomes. Reporting and interpretation of FISH should be consistent with professional standards of practice. The test is not designed to evaluate the risk of trisomy and therapeutic action should not be initiated on the basis of FISH result alone.

The probe set 13, 18 and 21 is a mixture of green, blue and orange directly labelled fluorescent DNA probes. The chromosome 13 probe includes the RB1 gene. The probe set is intended for the detection and quantification of chromosomes 13, 18 and 21 by fluorescence *in situ* hybridisation.



Materials provided

Probe: 100µl per vial (10 tests)

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

Probe Set:

13q14.2 unique sequence (including the markers D13S915, D13S1155, D13S1195) labelled with a Green fluorophore (FITC spectrum): 120-150 ng/test
D18Z1 (18 centromere α -satellite) labelled with a Blue fluorophore (Aqua spectrum): 112-140 ng/test
21q22.13 unique sequence (including the markers D21S270, D21S1867, D21S337, D21S1425, D21S1444, D21S341) labelled with an Orange fluorophore (TRITC/Orange spectrum): 40-50 ng/test

DAPI antifade ES: 0.125 µg/ml DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) in Vectashield, 150 µl per vial.

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 Aquarius kit should be stored at 620°C 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

- a) Hotplate (with a solid plate and accurate temperature control up to 80°C)
- b) Variable volume micropipettes range 1 µl ó 200 µl
- c) Water bath with accurate temperature control at 72°C
- d) Microcentrifuge tubes (0.5 ml)
- e) Fluorescence microscope (Please see Fluorescence Microscope Recommendation section)
- f) Plastic or glass coplin jars
- g) Forceps
- h) Fluorescence grade microscope lens immersion oil
- i) Bench top centrifuge

Fluorescence Microscope Recommendations

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 can be used to view all fluorophores simultaneously. The blue fluorophore has specificity to the aqua or DEAC spectrum (aqua filter is required).

Sample Suitability and collection

The 13, 18 and 21 kit is designed for use on uncultured amniotic fluid samples fixed in Carnoy's fixative (see procedure below). Amniotic fluid sample collection should be performed according to the institution guidelines.

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

Suggested Protocol

Preparation of fresh amniotic fluid samples for FISH:

- 1) Centrifuge 2-5 ml of whole amniotic fluid (AF) specimen for 7 minutes at 180xg, carefully remove the supernatant without disturbing the cell pellet.
- 2) Resuspend the pellet in 2ml of 0.075M KCl. Leave at room temperature for 5 minutes.
- 3) Add 2 ml of fresh fixative (3:1 methanol:glacial acetic acid) to the cells/hypotonic solution, adding the first ml dropwise whilst continuously mixing. Mix well.
- 4) Centrifuge the suspension for 5 minutes at 280xg, carefully remove the supernatant and resuspend the pellet in 2 ml fresh fixative.
- 5) Fixed specimens can be stored at this stage in a freezer at -20°C.
- 6) If the sample is not to be frozen, centrifuge tube at 280xg for 5 minutes. Remove as much supernatant as possible without disturbing the cell pellet. Flick the tube to resuspend the pellet in the small amount of fluid remaining.
- 7) To prepare slides for FISH, drop the cell suspension directly onto slide, making 2 hybridization areas. Allow to air dry.

For late gestational age specimens additional slide pretreatment may be beneficial:

- 1) Place slide(s) prepared from uncultured amniocytes, in 2x SSC for 1 hour at 37°C.
- 2) Place slide(s) in freshly made pepsin working solution (5 mg pepsin added to 100 ml of 0.01 M HCl) for 13 minutes at 37°C.
- 3) Rinse slide(s) in phosphate buffered saline (PBS) at room temperature for 5 minutes.
- 4) Place slide(s) in post fixation solution (0.95% formaldehyde: 1.0 ml of 37% formaldehyde, 0.18g MgCl₂ and 39.0 mL of PBS. Store at 4°C. Use within 1 month.) for 5 minutes at room temperature.
- 5) Rinse slide(s) in PBS at room temperature for 5 minutes.
- 6) Immerse slide(s) in 70% ethanol at room temperature. Allow the slide(s) to stand in the ethanol wash for 1 minute.
- 7) Remove the slide(s) from 70% ethanol. Repeat step 6 with 85% ethanol, followed by 100% ethanol.

FISH Protocol

Slide preparation:

- 1) Wash slide in 2xSSC for 2mins at room temperature.
- 2) Dehydrate in an ethanol series (70%, 85% and 100%), each for 2 mins.

Pre-Denaturation:

- 3) Remove probe from the -20°C freezer and allow to warm up to RT.
- 4) Ensure probe solution is uniform by repeated, gentle pipette mixing.
- 5) Remove 10 µl of probe per test, place in a microcentrifuge tube and return the remaining probe to -20°C freezer.
- 6) Place probe and sample slide to prewarm on a 37°C (+/- 1°C) hotplate for 5 mins.
- 7) Spot 10 µl of the probe mixture onto the cell sample and carefully apply 24 x 24 mm coverslip. Seal with rubber solution glue and allow to dry completely.

Denaturation:

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

Hybridisation:

- 9) Hybridise slide overnight in a humid, lightproof container at 37°C (+/-1°C).

Post-Hybridisation Washes:

- 10) Remove coverslip and all traces of glue carefully.
- 11) Wash slide in 0.4xSSC (pH 7.0) at 72°C (+/-1°C) for 2 mins.
- 12) Drain slide and wash in 2xSSC, 0.05% Tween-20 (pH 7.0) at RT for 30 seconds.
- 13) Drain the slide and apply 10 µl of DAPI antifade.
- 14) Cover with a coverslip and allow colour to develop in the dark for 10 mins.

- 15) View with fluorescence microscope.

Stability of Finished Slides

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

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 (stringency), pH and temperature 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.

Interpretation of Results

The sensitivity and specificity of FISH depends on a number of parameters, which vary from one cell type to another; from one probe to another; with the cell techniques used; and within the individual laboratory. Therefore we recommend for the use of the prenatal assay that each laboratory must have its own standard material and determine its own FISH assay cutoff values for karyotypically normal and aneuploid samples (for guidelines contact CytoCELL).

Customer Support

Please contact the CytoCELL Sales and Marketing Department by telephone or email probes@cytoCELL.com.

Patents and Trademarks

Aquarius and CytoCELL are registered trademarks of CytoCELL Ltd.

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. Le ADN cible, après fixation, est traité par la chaleur et à la formamide pour dénaturer la double hélice, la rendant simple hélice. Le ADN cible est alors disponible pour hybridation avec une sonde ADN complémentaire simple brin, dénaturée de la même manière et marquée avec un fluorochrome. Après hybridation, le ADN non hybridé et le ADN non lié spécifiquement sont éliminés par une série de lavages stringents et le ADN est ensuite contre-coloré. Un microscope à fluorescence permet ensuite la visualisation de la sonde hybridée sur le ADN cible.

Caractéristiques de la sonde

Le kit prénatal pour les chromosomes 13, 18 et 21 permet la détection rapide des trisomies 13, 18 et 21 retrouvées respectivement dans les syndromes Patau, Edward et Down.

Ce test doit être systématiquement associé à une analyse du caryotype fœtal, il a été développé pour la FISH sur les noyaux interphasiques de cellules non cultivées de liquide amniotique. Le kit permet l'obtention d'un résultat dans les 24 heures suivant la réception de l'échantillon d'amniocentèse. Le kit ne convient pas à la détection d'anomalies chromosomiques structurales, de mosaïque ou d'anomalies numériques d'autres chromosomes. Les résultats et l'interprétation de la FISH doivent être en accord avec le guide des bonnes pratiques en cytogénétique prénatale en vigueur. Le kit seul n'est pas destiné à l'évaluation du risque trisomique et aucune action thérapeutique ne peut être prise sur la seule base du résultat FISH.

Le kit prénatal pour les chromosomes 13, 18 et 21 est composé de trois sondes ADN directement marquées en vert (chr. 13), bleu (chr. 18) et orange (chr. 21). La sonde du chromosome 13 couvre le locus RB1. Ce kit est destiné à la détection et quantification par FISH des chromosomes 13, 18 et 21.

Conditionnement

Sonde : 100µl par tube (10 tests)

La sonde est fournie prête-à-l'emploi dans le tampon d'hybridation (formamide, sulfate de dextran, SSC).

13q14.3 séquence unique (y compris les marqueurs D13S915, D13S1155, D13S1195) marquée d'un fluorophore vert (spectre FITC) : 120-150 ng/test.

D18Z1 (centromère 18 α-satellite) marqué avec un fluorophore bleu (spectre aqua) : 112-140 ng/test.

21q22.2 séquence unique (y compris les marqueurs D21S270, D21S1867, D21S337, D21S1425, D21S1444, D21S341) marquée d'un fluorophore orange (spectre TRITC/orange) : 40-50 ng/test.

DAPI/antifading ES: 0.125 µg/ml DAPI (4,6-diamidino-2-phénylindole) dans du Vectashield, 500 µl par tube

Avertissements et précautions

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

Conservation et manipulation

Le kit Aquarius doit être conservé à -20°C jusqu'à la date d'expiration indiquée sur le kit. La sonde et le contre-colorant doivent être conservés à l'abri de la lumière.

Équipement nécessaire non fourni

- a) Plaque chauffante (avec bloc et contrôle de la température jusqu'à 80°C)
- b) Micropipettes 1µl - 200µl
- c) Bain-marie avec contrôle de la température à 72°C
- d) Tubes à microcentrifugation (0,5 ml)
- e) Microscope à fluorescence (Voir la section Microscope et filtres)
- f) Jars en plastique ou en verre
- g) Forceps
- h) Huile à immersion pour microscope à fluorescence
- i) Centrifugeuse de paillasse

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/TRITC est optimal pour la visualisation des fluorochromes oranges et verts simultanément. Le fluorophore bleu a une spécificité par rapport au spectre Aqua ou DEAC (un filtre Aqua est requis).

Conformité de l'échantillon et collecte

Le kit 13/18/21 a été développé pour utilisation sur des échantillons de liquide amniotique non cultivés qui sont fixés avec du fixateur Carnoy (voir la procédure ci-après). Les échantillons de liquide amniotique doivent être préparés selon les protocoles en vigueur dans le laboratoire ou institution. Les échantillons de liquide amniotique sanguins ou de couleur brune ne doivent pas être utilisés parce qu'ils pourraient contenir du sang maternel et risquent de fausser les résultats.

Recommandations de protocole

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

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

Pour les échantillons à âge gestationnel élevé, un prétraitement additionnel des échantillons serait favorable :

- 1) Mettre le/les échantillon(s) préparés à partir d'amniocytes non cultivés dans du tampon 2x SSC pendant une heure à 37°C.
- 2) Mettre le/les échantillon(s) dans une solution de pepsine fraîchement préparée (5 mg de pepsine ajoutée dans 100 ml de 0,01 M HCl) pendant 13 minutes à une température de 37°C.
- 3) Rincer le/les échantillon(s) dans une solution saline tamponnée au phosphate pendant 5 minutes à température ambiante.
- 4) Mettre le/les échantillon(s) dans la solution post-fixation (0,95% de formaldéhyde : 1.0 ml de 37% de formaldéhyde, 0.18g MgCl₂ et 39.0 ml de la solution saline tamponnée au phosphate. Conserver les échantillons à 4°C. Les utiliser dans un délai d'un mois.) pendant 5 minutes à température ambiante.
- 5) Rincer le/les échantillon(s) dans une solution saline tamponnée au phosphate pendant 5 minutes à température ambiante.
- 6) Immerger le/les échantillon(s) dans de l'éthanol à 70% à température ambiante. Laisser le/les échantillon(s) dans la solution éthanol pendant une minute.
- 7) Sortir le/les échantillon(s) de l'éthanol à 70%. Répéter l'étape 6 avec de l'éthanol à 85%, suivi par une procédure avec de l'éthanol à 100%.

Protocole FISH

Préparation de la lame échantillon

1. Plonger la lame dans du 2 x SSC, pH 7.0 pendant 2 minutes à température ambiante.
2. Déshydrater dans une série de bains éthanol (70%, 85% et 100%), 2 minutes dans chaque bain à température ambiante. Laisser sécher.

Pré-dénaturation

3. Retirer la sonde du congélateur à -20°C et la laisser préchauffer à température ambiante.
4. Bien homogénéiser la sonde en pipetant plusieurs fois.
5. Prélever 10 µl de sonde par test et placer dans un tube à microcentrifugation.
6. Mettre la sonde, la lame échantillon et une lamelle 24 mm x 24 mm à préchauffer sur une plaque chauffante à 37°C (+/-1°C) pendant 10 minutes.
7. Déposer 10 µl de sonde sur l'échantillon et couvrir avec une lamelle. Sceller avec du rubber cément et laisser sécher.

Dénaturation

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

Hybridation

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

Lavages post-hybridation

10. Retirer la lamelle et éliminer toutes traces de rubber cément.
11. Laver la lame dans du tampon 0,4 x SSC (pH 7.0) à 72°C (+/- 1°C) pendant 2 minutes.
12. Egoutter la lame et laver dans du tampon 2 x SSC, 0,05% Tween-20 (pH 7.0) à température ambiante pendant 30 secondes.
13. Egoutter la lame et déposer 10 µl de DAPI antifading.
14. Couvrir avec une lamelle et laisser la coloration se développer à l'obscurité pendant 10 minutes.
15. Visualiser avec un microscope à fluorescence.

Raccomandazioni per l'uso

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

Interprétation des résultats

La sensibilité et la spécificité de FISH peut dépendre de nombreux paramètres pouvant varier d'un type de cellule à l'autre, d'un échantillon à l'autre, avec les techniques cellulaires utilisées et même au sein des laboratoires individuels. Pour cette raison, nous recommandons pour l'application du kit AneuCyte que chaque laboratoire utilise ses propres matériaux standard et détermine ses propres valeurs de consigne pour le test FISH pour les échantillons de carotype normal et les échantillons aneuploïdes (contacter CytoCELL pour les réglementations respectives).

Stabilité des lames

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

Support Client

Veillez contacter le Département Ventes/Marketing de CytoCELL ou votre agent local.

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. 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.

Specifiche della sonda

Il kit di sonde 13, 18 e 21 è un test prenatale per la diagnosi rapida delle trisomie 13, 18 e 21 presenti nelle sindromi di Patau, Edward e Down rispettivamente. Il test deve essere usato in congiunzione con l'analisi del cariotipo fetale, ed è stato sviluppato per ibridazione fluorescente *in situ* su nuclei in interfase di cellule non coltivate del liquido amniotico. Questo kit garantisce risultati in 24 ore dal ricevimento del campione dopo amniocentesi. Il test non rivela anomalie cromosomiche strutturali, mosaicità o anomalie numeriche di altri cromosomi. Il referto e l'interpretazione della FISH dovrebbe essere coerente con gli standard delle linee Guida in vigore. Il test non è progettato per valutare il rischio di trisomia, azioni terapeutiche non dovrebbero essere prese sulla base del solo risultato della FISH.

Il kit di sonde 13, 18 e 21 è una miscela di sonde DNA fluorescenti direttamente marcate nei colori verde, blu e arancione. La sonda per il cromosoma 13 include il gene RB1. Il kit è destinato all'individuazione e quantificazione dei cromosomi 13, 18 e 21 con ibridazione fluorescente *in situ*.

Materiali forniti

Sonda 100µl per fiala (10 test)

1 kit sonda vengono forniti premiscelati e pronti all'uso all'interno della soluzione di ibridazione (Formaldeide; Destrano Solfato; SSC).

sequenza unica di 13q14.3 (ivi compresi i marker D13S915, D13S1155, D13S1195) etichettato con fluoroforo Verde (spettro FITC): 120-150 ng/test

D18Z1 (18 centromero α-satellite) etichettato con fluoroforo Blu (spettro Aqua): 112-140 ng/test

sequenza unica di 21q22.2 (ivi compresi i marker D21S270, D21S1867, D21S337, D21S1425, D21S1444, D21S341) etichettato con fluoroforo Arancione (spettro TRITC/Arancione): 40-50 ng/test

DAPI/Antifade ES: 0.125 µg/ml DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindole) in Vectashield, 500 µl per fiala

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 Aquarius a 620°C fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta. I racconci della sonda e del colorante di contrasto devono essere conservati al buio.

Apparecchiature necessari non forniti

- a) Piastra riscaldante (con - un controllo accurato della temperatura fino ad 80°C).
- b) Micropipette a volume variabile compreso tra 1µl e 200µl.
- c) Bagno termostato con controllo accurato della temperatura a 72°C.
- d) Provette da microcentrifuga (0,5 ml)
- e) Microscopio a fluorescenza (riferirsi alla sezione Configurazione ottimale del microscopio e dei filtri)

- f) Contenitori di Coplin in plastica o vetro.
- g) Pinzette.
- h) Olio per lenti ad immersione del microscopio a fluorescenza.
- i) Centrifuga da banco.

Raccomandazioni relative al Microscopio a fluorescenza

Per una visualizzazione ottimale della sonda si raccomanda di utilizzare una lampada a mercurio da 100 watt e obiettivi plan apochromat x63 oppure x100. Il filtro a Tripla banda passante DAPI/FTTC/TRITC è la soluzione ideale per la visualizzazione simultanea di fluorofori arancioni e verdi. Il fluorofluoro blu ha una specificità nei confronti dello spectrum Aqua o DEAC (è necessario un filtro Aqua).

Idoneità e raccolta del campione

Il kit 13/18/21 è stato concepito per l'utilizzo su campioni di liquido amniotico fissati in nel fissativo di Carnoy (vedere procedura descritta in seguito). La raccolta del campione di liquido amniotico deve essere eseguita conformemente alle linee guida istituzionali.

I campioni di liquido amniotico che appaiono insanguinati o marroni non devono essere utilizzati in quanto potrebbero di contenere sangue materno e, di conseguenza, fornirebbero falsi risultati.

Protocollo suggerito

Preparazione di campioni di liquido amniotico fresco per FISH:

- 1) Centrifugare 2-5 ml di campione di liquido amniotico (AF) per 7 minuti a 180 xg, rimuovere con la massima attenzione il soprannatante senza disturbare il pellet cellulare.
- 2) Risospesare il pellet cellulare in 2 ml di (0,075M KCl). Lasciare a temperatura ambiente per 5 minuti.
- 3) Aggiungere 2 ml di fissativo fresco (soluzione 3:1 di metanolo: acido acetico glaciale) alle cellule/soluzione ipotonica, aggiungendo i primi ml a gocce continuando a miscelare. Miscelare il tutto.
- 4) Miscelare la sospensione per 5 minuti a 280 xg, rimuovere con la massima attenzione il soprannatante e risospesare il pellet in due ml di fissativo fresco.
- 5) I campioni fissati possono essere conservati a questo punto all'interno di un freezer a una temperatura di 620°C.
- 6) Se il campione non deve essere congelato, centrifugare la provetta a 280 xg per 5 minuti. Rimuovere la quantità maggiore possibile di soprannatante senza disturbare il pellet cellulare. Agitare la provetta per risospesare il pellet all'interno della quantità limitata di liquido rimasta.
- 7) Al fine di preparare i vetrini per FISH, fare gocciolare la sospensione cellulare direttamente sul vetrino, creando due aree di ibridazione. Lasciare asciugare all'aria.

Per i campioni di età gestazionale tardiva un pretrattamento ulteriore del vetrino potrebbe risultare vantaggioso:

- 1) Posizionare il(i) vetrino(i) preparati a partire da amniociti senza coltura all'interno di 2x SSC per 1 ora a 37°C.
- 2) Posizionare il(i) vetrino(i) in una soluzione di lavoro di pepsina (5 mg di pepsina aggiunti a 100 ml di M HCl 0,01) per 13 minuti a 37°C.
- 3) Fare asciugare il(i) vetrino(i) all'interno di soluzione salina tamponata con fosfato (PBS) a temperatura ambiente per 5 minuti.
- 4) Posizionare il(i) vetrino(i) in una soluzione post fissaggio (formaldeide allo 0,95%, 1,0 ml di formaldeide concentrata al 37%, 0,18g di MgCl₂ e 39,0 ml di PBS. Conservare a 4°C. (Utilizzare entro 1 mese) per 5 minuti a temperatura ambiente.
- 5) Fare asciugare il(i) vetrino(i) all'interno di soluzione salina tamponata con fosfato (PBS) a temperatura ambiente per 5 minuti.
- 6) Immergere il(i) vetrino(i) in una soluzione di etanolo al 70% a temperatura ambiente. Consentire al(i) vetrino(i) di rimanere nella soluzione di etanolo per 1 minuto.
- 7) Rimuovere il vetrino(i) dalla soluzione di etanolo al 70%. Ripetere il passaggio 6 con letanolo in soluzione allo 85%, seguito da etanolo al 100%.

Protocollo

Preparazione del vetrino

1. Lavare il vetrino in SSC 2x per 2 minuti a temperatura ambiente (TA).
2. Disidratare in una serie di diluizioni di etanolo (70%, 85% e 100%), ognuna per 2 minuti a TA. Lasciare asciugare il vetrino.

Pre-denaturazione

3. Rimuovere la sonda dal congelatore a -20°C e lasciarla riscaldare a TA
4. Accertarsi che la soluzione della sonda sia uniforme pipettando ripetutamente con delicatezza
5. Pipettare 10µl di sonda per test ed inserirli in una provetta da microcentrifuga
6. Pre-riscaldare la sonda, il vetrino ed il coprioggetto da 24 x 24mm su una piastra riscaldante a 37°C (+/- 1°C) per 10 minuti
7. 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

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

Ibridazione

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

Lavaggi post-ibridazione

10. Rimuovere accuratamente il vetrino coprioggetto e tutte le tracce di colla
11. Lavare il vetrino in SSC 0,4x (pH 7,0) a 72°C (+/- 1°C) per 2 minuti
12. Scolare il vetrino e lavare in SSC 2x, Tween-20 0,05% (pH 7,0) a TA per 30 secondi
13. Coprire con un vetrino coprioggetto e far svuotare il colore al buio per 10 minuti
15. Analizzare con il microscopio a fluorescenza

Raccomandazioni procedurali

1. L'eccessivo riscaldamento o 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.
4. Le concentrazioni del lavaggio (stringenza), il pH e la temperatura sono di fondamentale importanza in quanto condizioni di stringenza blande possono favorire un legame non specifico della sonda e condizioni di stringenza troppo elevate possono condurre alla perdita del segnale.
5. La denaturazione incompleta può tradursi in una perdita del segnale mentre una denaturazione eccessiva può anche tradursi in un legame non specifico.

Interpretazione dei risultati

La sensibilità e la specificità di FISH dipende da un determinato numero di parametri che possono variare da un tipo di cellula all'altra, da una sonda all'altra, dalle tecniche cellulari adottate e dal singolo laboratorio all'interno del quale viene realizzato il test. Di conseguenza si raccomanda di AneuCyte che ciascun laboratorio sia in possesso del proprio materiale standard e che vengano stabiliti i propri personali valori limite del test FISH per campioni normali dal punto di vista del cariotipo e per campioni aneuploidi (per le linee guida si prega di contattare Cytocell).

Stabilità del vetrino finito

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

Assistenza clienti

Contattare l'Ufficio Commerciale e Vendita della Cytocell.

DEUTSCH

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

Sondenspezifikation

Der 13, 18 und 21 Sonden Kit ist ein pränataler Test für die rasche Detektion von Trisomie 13, 18 und 21 (Patau, Edward und Down Syndrom). Der Test ist gemeinsam mit Analysen des fötalen Karyotyps durchzuführen und ist für die Fluoreszenz in situ Hybridisierung von Interphase Kernen von unkultivierten Zellen aus dem Fruchtwasser designed. Das Testergebnis liegt innerhalb von 24 Stunden nach Erhalt der Fruchtwasserprobe vor. Der Test detektiert keine strukturellen Chromosomenanomalien, Mosaikismus und Anomalien anderer Chromosomen. Die Ergebnisinterpretation von FISH soll den professionellen Standards entsprechend durchgeführt werden. Der Test ist nicht für die Beurteilung des Trisomie Risikos geeignet, weitere Maßnahmen sollten nicht alleine auf Grund des FISH Ergebnisses gesetzt werden.

Das Sonden Set 13, 18 und 21 ist eine Mischung von grünen, blauen und orangen direkt gelabelten Fluoreszenz DNA Sonden. Die Chromosom 13 Sonde enthält das Rb1 Gen. Das Sonden Set dient zur Detektion und Quantifizierung der Chromosomen 13, 18 und 21 mittels Fluoreszenz in situ Hybridisierung.

Kitkomponenten

Sonde: 100µl pro Röhrchen (10 Tests)

Die Sondenkits werden vorgemischt und gebrauchsfertig in Hybridisierungslösung geliefert (Formamid, Dextransulfat, SSC).

13q14.3 einmalige Sequenz (einschließlich der Marker D13S915, D13S1155, D13S1195) mit grünem Fluorophor markiert (FTC Spektrum): 120-150 ng/Test

D18Z1 (18 Centromer α-Satellit) mit einem blauen Fluorophor markiert (Aqua Spektrum): 112-140 ng/Test

21q22.2 einmalige Sequenz (einschließlich der Marker D21S270, D21S1867, D21S337, D21S1425, D21S1444, D21S341) mit einem orangen Fluorophor markiert (TRITC/oranges Spektrum): 40-50 ng/Test

DAPI/Anifade ES: 0.125 µg/ml DAPI (4,6-Diamidino-2-Phenylindol) in Vectashield, 500 µl pro Röhrchen

Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen

1. Zur Verwendung in der *in vitro* Diagnostik. Nur für die professionelle Verwendung
2. Beim Umgang mit DNA-Sonden und der DAPI-Gegenfärbung Handschuhe tragen.
3. 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.
4. DAPI ist ein potentielles Karzinogen. Vorsichtig damit umgehen, Handschuhe und Labormantel tragen. Bei der Entsorgung mit viel Wasser nachspülen.
5. Alle Gefahrstoffe sollten gemäß den Richtlinien Ihrer Einrichtung zur Gefahrstoffentsorgung entsorgt werden.

Lagerung und Behandlung

Das Aquarius-Kit sollte bis zum Ablaufdatum, das auf dem Kietikett angegeben ist, bei 620°C gelagert werden. Die Röhrchen mit den Sonden und der Gegenfärbung müssen im Dunkeln aufbewahrt werden.

Benötigte, aber nicht mitgelieferte Laborgeräte

- a) Heizplatte (mit stabiler Heizplatte und genauer Temperaturregelung bis 80°C)
- b) Mikropipetten mit variablem Volumen von 1 µl -6 200 µl
- c) Wasserbad mit genauer Temperaturkontrolle bei 72°C.
- d) Mikro-Zentrifugenröhrchen (0,5 ml).
- e) Fluoreszenzmikroskop (siehe auch Empfehlungen zum Fluoreszenzmikroskop).
- f) Coplin-Färbetrog aus Kunststoff oder Glas.
- g) Pinzette.
- h) Für Fluoreszenzobjektive geeignetes Immersionsöl.
- i) Tischzentrifuge.

Empfehlungen zum Fluoreszenzmikroskop

Zur bestmöglichen Beobachtung der Probe empfehlen wir die Verwendung einer 100 Watt Quecksilberampflampe und von Plan Achromat Objektiven mit 63-facher oder 100-facher Vergrößerung. Das Dreifach-Bandpassfilter DAPI/FTTC/TRITC ist für die simultane Beobachtung der orangen und grünen Fluorophore optimal geeignet. Das blaue Fluorophor hat eine Spizität gegenüber dem Aqua- oder DEAC-Spektrum (ein Aqua-Filter ist erforderlich).

Probeneignung und Entnahme

Das 13/18/21 ist für die Verwendung an nicht kultivierten Fruchtwasserproben, die in Carnoy's Fixativ fixiert sind, ausgelegt. Die Entnahme von Fruchtwasserproben sollte gemäß den Richtlinien der jeweiligen Einrichtung erfolgen. Fruchtwasserproben, die blutig oder braun scheinen sind nicht zu verwenden, da sie Blut der Mutter enthalten könnten und somit die Ergebnisse verfälscht würden.

Protokoll-Empfehlungen

Vorbereitung von frischen Fruchtwasserproben für FISH:

1. Zentrifugieren Sie 2-5 ml der gesamten Fruchtwasserprobe sieben Minuten lang bei 180xg; Entfernen Sie dann vorsichtig den Überstand, ohne das Zellsediment aufzuwirbeln.
2. Lösen Sie das Zellpellet in 2ml 0,075M KCl. Für 5 Minuten bei Raumtemperatur stehen lassen.
3. Geben Sie 2 ml frisches Fixativ (3:1 ö Methanol:Eisessig) zu der hypotonischen Zellslösung, wobei Sie den ersten ml tropfenweise unter ständigem Rühren zugeben. Mischen Sie das Ganze gut.
4. Zentrifugieren Sie die Suspension für 5 Minuten bei 280xg, entfernen Sie den Überstand vorsichtig und geben Sie zum Zellsediment erneut 2ml frisches Fixativ zu.
5. Fixierte Proben können in diesem Zustand bei -20°C in einem Gefrierschrank aufbewahrt werden.
6. Wenn die Probe nicht eingefroren werden soll, zentrifugieren Sie das Röhrchen bei 280xg für 5 Minuten. Entfernen Sie so viel Überstand wie möglich, ohne dabei das Zellpellet aufzuwirbeln. Schütteln Sie das Röhrchen, um das Pellet mit der geringen Menge verbleibender Flüssigkeit zu mischen.
7. Zur Vorbereitung der Proben für FISH, troffen Sie die Zellsuspension direkt auf den Objektträger in zwei verschiedene Hybridisierungsbereiche. An der Luft trocknen lassen.

Bei Proben mit hohem Gestationalalter ist eine zusätzliche Vorbehandlung der Proben von Vorteil:

1. Legen Sie die aus nicht kultivierten Amniocyten gewonnene(n) Probe(n) 1 Stunde lang bei 37°C in 2-faches SSC. Legen Sie die Probe(n) dann 13 Minuten lang bei 37°C in frisch vorbereitete Pepsin-Arbeitslösung (5mg Pepsin werden in 100 ml 0,01 M HCl gegeben).
3. Waschen Sie die Probe(n) bei Raumtemperatur für 5 Minuten in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS).
4. Legen Sie die Probe(n) für 5 Minuten bei Raumtemperatur in Nachfixierungslösung (0,95% Formaldehyd: 1,0 ml 37%iges Formaldehyd, 0,18g MgCl₂ und 39,0 ml PBS. Lagern Sie die Proben bei 4°C und verbrauchen sie innerhalb eines Monats).
5. Waschen Sie die Probe(n) bei Raumtemperatur für 5 Minuten in PBS.
6. Tauchen Sie die Probe(n) bei Raumtemperatur in 70%iges Ethanol. Lassen Sie die Probe(n) etwa 1 Minute lang in der Ethanol-Waschlösung stehen.
7. Nehmen Sie die Probe(n) aus dem 70%igen Ethanol. Wiederholen Sie Schritt 6 mit 85%igem Ethanol und dann mit 100%igem Ethanol.

FISH-Protokoll

Vorbereitung des Objektträgers

1. Objektträger für 2 Minuten in 2 x SSC bei Raumtemperatur waschen (RT)
2. Entwässern in Alkoholreihe (70%, 85% und 100%), jeweils für 2 Min. bei RT. Trocknen lassen.

Vordenaturierung

3. Nehmen Sie die Sonde aus dem 620°C Gefrierschrank und lassen Sie diese sich auf Raumtemperatur aufwärmen.
4. Durch wiederholtes, sanftes Mischen in der Pipette sicherstellen, dass die Sondenlösung homogen gemischt ist.
5. Pro Test 10µl Sonde entnehmen und in ein Mikrozentrifugenröhrchen geben.
6. Sonde, Probenobjektträger und 24x24 Glasdeckplättchen zum Vorwärmen 10 Minuten auf eine Heizplatte mit 37°C (+/- 1°C) geben.
7. 10µl Sondenmischung auf die Zellprobe auftropfen und Deckplättchen sorgfältig auflegen. Mit Gummikleber-Lösung versiegeln und vollständig trocknen lassen.

Denaturierung

8. Denaturieren sie Probe und Sonde gleichzeitig durch zweiminütiges Erwärmen des Objektträgers auf einer Heizplatte mit 75°C (+/- 1°C).

Hybridisierung

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

Waschen nach der Hybridisierung

10. Deckgläschen und alle Kleberspuren vorsichtig entfernen.
11. Objektträger 2 Minuten in 0,4 x SSC (pH 7,0) bei 72 C (+/- 1°C) waschen.
12. Objektträger abtropfen lassen und 30 Sekunden in 2 x SSC, 0,05% Tween -20 bei RT, (pH 7,0), waschen.
13. Objektträger abtropfen lassen und 10µl DAPI antifade auftragen.
14. Mit Deckgläschen abdecken und zur Farbentwicklung 10 Minuten im Dunkeln lagern.
15. Unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachten.

Empfehlungen zur Durchführung

1. Wärmebehandlung oder Reifung der Proben ist nicht empfehlenswert, da dies zu einer verminderten Signalfuoreszenz führen kann.
2. Durch die Verwendung von anderen Reagenzien, als den von Cytocell Ltd. empfohlenen, können die Hybridisierungsbedingungen negativ beeinflusst werden.
3. Es wird dringend empfohlen, zur Temperaturmessung von Lösungen, Wasserbädern und Inkubatoren ein geeichtes Thermometer zu verwenden, da diese Temperaturen für die optimale Leistung des Produkts ausschlaggebend sind.
4. Die Konzentrationen der Waschlösungen (Stringenz), pH und Temperatur sind wichtig, da niedrig stringente Bedingungen zu nicht-spezifischer Bindung der Sonde führen kann und zu hohe Stringenz zum Verlust des Signals.
5. Unvollständige Denaturierung kann zu einem Verlust des Signals führen und übermäßige Denaturierung kann zu nicht-spezifischer Bindung der Sonde führen.

Interpretación de los resultados

Die Empfindlichkeit und Spezifität des FISH Tests hängt von einer Reihe von Kennzahlen ab, die von Zelltyp zu Zelltyp, von Sonde zu Sonde, entsprechend den verwendeten Zellverfahren und sogar innerhalb der einzelnen Labors unterschiedlich sind. Daher empfehlen wir, dass jedes Labor für den Einsatz von AneuCyte seine eigenen Standard-Materialien verwendet und seine eigenen Grenzwerte für den FISH Versuch für karyotypisch normale und aneuploide Proben bestimmt (bezüglich Richtlinien), wenden Sie sich bitte an Cytocell).

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.

Kundendienst

Bitte wenden Sie sich an die Verkaufs- und Marketingabteilung von Cytocell.

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 cultivadas o no cultivadas y fijadas. En la técnica se utiliza una sonda de ADN que hibrida los cromosomas completos o las secuencias únicas simples y es un complemento útil para la citogenética clásica. Después de la fijación, el ADN diama se trata con calor y formamida para desnaturalizar el ADN bicatenario haciendo que resulte monocatenario. El ADN diama queda entonces disponible para hibridarlo con una sonda de ADN igualmente desnaturalizado, monocatenario marcado con fluorescencia que tiene una secuencia complementaria. Después de la hibridación la sonda de ADN no específicamente hibridada y no hibridada se elimina tras varios lavados y se aplica un contraste al ADN para su visualización. El uso de un microscopio de fluorescencia permite la visualización de la sonda hibridada en el material utilizado.

Especificaciones de la sonda

La sonda 13, 18, 21 consiste en una determinación rápida prenatal de trisomías 13, 18 y 21, presentes en los síndromes de Patau, Edward y Down, respectivamente. Este estudio debe ser utilizado en combinación con análisis de cariotipo fetal y ha sido diseñado en FISH (Fluorescente In Situ Hybridisation) de células en interfase a partir de muestras sin cultivar de líquido amniótico. Se pueden obtener resultados dentro de las primeras 24 horas posteriores a la amniocentesis.

Este kit no detecta anomalías cromosómicas estructurales, mosaicismos y anomalías numéricas de otros cromosomas. Los resultados arrojados por este estudio deberán ir acompañados de buenas prácticas profesionales. Este test no está diseñado para la evaluación de riesgo de trisomía y no debe llevarse a cabo acción alguna teniendo en cuenta únicamente esta prueba.

El kit de sonda para cromosomas 13, 18 y 21 es una mezcla de sonda verde, azul y naranja, directamente marcada fluorescentemente. El cromosoma 13 incluye el gen RB1. Este kit está diseñado para la detección y cuantificación de los cromosomas 13, 18 y 21 mediante FISH (Fluorescente In Situ Hybridisation).

Material proporcionado

Sonda: 100µl por vial (10 pruebas)

Los juegos de sondas se suministran premezclados y listos para su uso en la solución de hibridación (Formamida; sulfato de dextrano; SSC).

Secuencia única 13q14.3 (que incluye los marcadores D13S915, D13S1155, D13S1195) etiquetada con fluorocromo verde (espectro FITC): 120-150 ng/prueba

D18Z1 (satélite α del centrómero de 18) etiquetado con fluorocromo azul (espectro Agua): 112-140 ng/prueba

Secuencia única 21q22.2 (que incluye los marcadores D21S270, D21S1867, D21S337, D21S1425, D21S1444, D21S341) etiquetada con fluorocromo naranja (espectro TRITC/Naranja): 40-50 ng/prueba

ES DAPI/Antifade: 0,125 µg/ml DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol) en vectashield, 500 µl por vial

Avisos y precauciones

1. Para diagnóstico *in vitro*. Sólo para uso profesional.
2. Utilizar guantes al manipular las sondas de ADN y la contratiación DAPI.
La solución de hibridación contiene formamida, que es teratogénica; no respire los vapores y evite el contacto con la piel. Manipular con cuidado; utilizar guantes y bata de laboratorio. Al eliminarla, rociar con gran cantidad de agua.
3. La Et DAPI y PI puede producir cáncer. Manipular con cuidado; utilizar guantes y bata de laboratorio. Al eliminarla, rociar con gran cantidad de agua.
4. 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 Aquarius debe almacenarse a -20°C hasta la fecha de caducidad que se indica en la etiqueta del kit. Los viales de contraste y de sonda deben almacenarse en un lugar oscuro.

Equipo necesarios pero no proporcionados

- a) Placa caliente (con una placa sólida y un control de temperatura preciso hasta 80°C).
- b) Micropipetas de volumen variable (rango 1µl -200µl)
- c) Baño de agua con control preciso de temperatura a 72°C
- d) Tubos de microcentrifugado (0,5 ml)
- e) Microscopio de fluorescencia (lea la sección Recomendaciones para el microscopio de fluorescencia)
- f) Recipientes de cristal y de plástico
- g) Pinzas
- h) Microscopio de fluorescencia con objetivo de inmersión en aceite
- i) Centrífuga de banco

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-Achromat. El filtro triple banda DAPI/FITC/TRITC es óptimo para ver simultáneamente los fluorocromos naranja y verde. El fluorocromo azul tiene especificidad al espectro Agua o DEAC (se necesita filtro Agua).

Adecuación y obtención de las muestras

El kit 13/18/21 está diseñado para su uso con muestras de líquido amniótico no cultivadas fijadas con fijador de Carnoy (véase el procedimiento más abajo). La obtención de las muestras de líquido amniótico debe realizarse de conformidad con las directrices de la institución.

Aquellas muestras de líquido amniótico que presenten un aspecto sanguinolento o marrón no deben utilizarse, ya que pueden contener sangre materna y pueden producir resultados incorrectos.

Protocolo sugerido

Preparación de muestras de líquido amniótico frescas para FISH:

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

En caso de muestras de edad gestacional tardía, un pretratamiento adicional del portaobjetos puede resultar beneficioso:

1. Coloque el portaobjetos o los portaobjetos preparados a partir de amniocitos no cultivados en 2x SSC durante una hora a 37 °C.
2. Coloque el portaobjetos o los portaobjetos en solución de trabajo de pepsina recién preparada (5 mg de pepsina añadidos a 100 ml de HCl a 0,01 M) durante 13 minutos a 37 °C.
3. Aclare el portaobjetos o los portaobjetos en solución salina con tampón fosfato (PBS) a temperatura ambiente durante 5 minutos.
4. Coloque el portaobjetos o los portaobjetos en solución de postfijación (formaldehído a 0,95%: 1,0 ml de formaldehído a 37%, 0,18 g MgCl₂ y 39,0 ml de PBS. Almacenar a 4 °C. Utilizar en 1 mes.) durante 5 minutos a temperatura ambiente.
5. Aclare el portaobjetos o los portaobjetos con PBS a temperatura ambiente durante 5 minutos.
6. Sumerja el portaobjetos o los portaobjetos en etanol al 70% a temperatura ambiente. Deje que el portaobjetos o los portaobjetos permanezcan en el lavado de etanol durante 1 minuto.
7. Retire el portaobjetos o los portaobjetos del etanol al 70%. Repita el paso 6 con etanol al 85%, seguido de etanol al 100%.

Protocolo FISH

Preparación del portaobjetos

1. Lave el porta en 2 x SSC durante 2 minutos a temperatura ambiente (TA)
2. Deshidrate en una serie de etanol (70%, 85% y 100%), 2 minutos en cada una a TA. Dejarlo secar

Antes de la desnaturalización

3. Saque la sonda del congelador a -20°C y deje que se caliente a TA
4. Asegúrese de que la solución de la sonda es uniforme mezclando varias veces con la pipeta
5. Extraiga 10 µl de la sonda por prueba, poner en un tubo de microcentrífuga
6. Precaliente el portaobjetos y el cubreobjetos de cristal de 24 x 24 mm con la sonda y la muestra en una placa caliente a 37°C (+/- 1°C) durante 10 minutos
7. Ponga 10µl de sonda sobre el portaobjetos y aplique cuidadosamente el cubreobjetos. Selle con solución de goma y deje secar completamente

Desnaturalización

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

Hibridación

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

Baños posthibridación

10. Quite el cubreobjetos y los restos de goma cuidadosamente
11. Lave el portaobjetos en 0,4 x SSC (pH 7,0) a 72°C (+/- 1°C) durante 2 minutos
12. Seque el portaobjetos y lávelo en 2 x SSC, 0,05% Tween-20 (pH 7,0) a TA durante 30 segundos
13. Seque el portaobjetos y aplique 10µl del DAPI Antifade
14. Cubra con el cubreobjetos y deje que la preparación en la oscuridad durante 10 minutos para estabilizar el DAPI
15. Obsérvelo con el microscopio de fluorescencia

Recomendaciones de procedimiento

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

Interpretación de los resultados

La sensibilidad y la especificidad de FISH dependen de una serie de parámetros, que son distintos según el tipo celular; según la sonda concreta; según las técnicas celulares empleadas, y dentro de un mismo laboratorio. Por tanto, recomendamos que al emplear AneuCyte cada laboratorio adopte su propio material estándar y determine sus propios valores de corte del ensayo FISH para el resultado cariotípicamente normal y las muestras aneuploides (póngase en contacto con Cytocell si desea recibir directrices).

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.

Ayuda al cliente

Póngase en contacto con el departamento de marketing y ventas de Cytocell.



Cytocell Ltd.
4 Technopark
Newmarket Road
Cambridge, CB5 8PB, UK.
T: +44(0)1223 294048
F: +44(0)1223 294986
E: probes@cytocell.com
W: www.cytocell.com

001/2010-22-07

DS144/CE