



Instructions For Use

REF: LPH034

IGK Breakpart



PROFESSIONAL USE ONLY

ENGLISH/FRANÇAIS/ITALIANO/DEUTSCH/ESPAÑOL

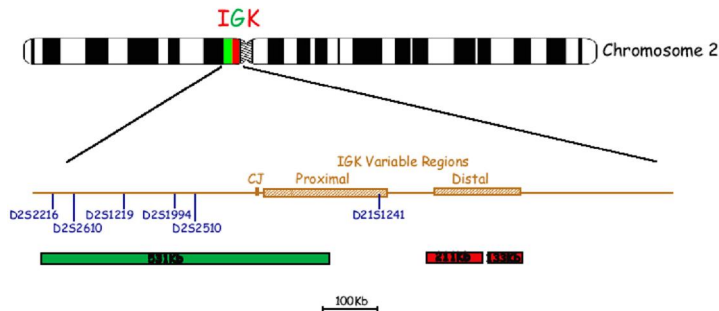
Further information available at www.cytocell.com

Fluorescence *In Situ* Hybridisation (FISH) is a technique that allows DNA sequences to be detected on metaphase chromosomes or in interphase nuclei of 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.

Translocations involving the immunoglobulin loci are recurring events in various subtypes of B cell lymphomas. In addition to translocations involving the IGH locus, variant translocations have been described in 5-10% of B cell neoplasms involving either the immunoglobulin kappa (IGK) light chain locus at 2p11.2 or the lambda light chain (IGL) at 22q11.1. The best known translocations involving IG light chain loci are the variant Burkitt's translocations t(2;8)(p12;q24) and t(8;22)(q24;q11), present in up to 25% of all Burkitt's lymphomas.² Other translocations involve the BCL6 oncogene: the t(2;3)(p12;q27) and t(3;22)(q27;q11) and BCL2 locus: t(2;18)(p12;q21) and t(18;22)(q21;q11).^{3,4} Translocations involving the IG light chain loci usually lead to breakage within the joining region of the respective locus.⁵ IGK has largely duplicated structure with duplicate gene regions being 96-100% identical. The IGK proximal copy is present in a 542 kb contig, with 22 potentially functional variable (IGKV) gene segments and 18 pseudogenes plus five joining (J)-segments and one IGK constant (IGKC) gene segment. The distal copy is a 433 kb contig, with 21 potentially functional IGKV gene segments and 15 pseudogenes. The two contigs. are separated by a DNA sequence of 800 kb without any IGKV segments.

Probe Specification

The IGK product consists of a 344 kb probe set labelled in red spanning the distal IGK variable region and 531 kb green probe spanning part of the proximal IGK variable region as well as the joining segments and a constant segment. In the normal cell, 2 red/green (can appear as yellow) signals are expected, (2Y). A translocation will result in 1 green and 1 red signal from the translocated chromosomes and 1 fused red/green signals (can appear as yellow) from the normal chromosome (1R, 1G, 1Y).



Materials Provided

Probe: 50µl per vial (5 tests) or 100µl per vial (10 tests)

Amount of IGK red probe: 40-50 ng/test

Amount of IGK green probe: 240-300 ng/test

The probes are provided pre-mixed and ready to use in hybridisation solution (Formamide; Dextran Sulphate; SSC).

Counterstain: 150 µl per vial (15 tests)

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

Warnings and Precautions

- For *in vitro* diagnostic use. For professional use only.
- Wear gloves when handling DNA probes and DAPI counterstain.
- Probe mixtures contain formamide which is a teratogen; do not breathe fumes or allow skin contact. Wear gloves, a lab coat, and handle in a fume hood. Upon disposal, flush with a large volume of water.
- DAPI is a potential carcinogen. Handle with care; wear gloves and a lab coat. Upon disposal, flush with a large volume of water.
- 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 -20°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

- Hotplate (with a solid plate and accurate temperature control up to 80°C)
- Variable volume micropipettes range 1 µl - 200 µl
- Water bath with accurate temperature control at 72°C
- Microcentrifuge tubes (0,5 ml)
- Fluorescence microscope (Please see Fluorescence Microscope Recommendation section)
- Plastic or glass coplin jars
- Forceps
- Fluorescence grade microscope lens immersion oil
- Bench top centrifuge

Fluorescence Microscope Recommendation

For optimal visualisation of the probe we recommend a 100 watt mercury lamp and plan apochromat objectives x 63 or x 100. The Triple bandpass filter DAPI/FITC/Texas Red is optimal for viewing all three probe fluorophores and DAPI simultaneously.

Sample Preparation

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

FISH Protocol

Slide preparation

- Spot cell sample onto microscope glass slide. Allow to dry.
- Wash slide in 2 x SSC for 2 minutes at room temperature (RT).
- Dehydrate in an ethanol series (70%, 85% and 100%), each for 2 mins at RT. Allow to dry.

Pre-Denaturation

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

Denaturation

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

Hybridisation

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

Post-Hybridisation Washes

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

- The use of a calibrated thermometer is strongly recommended for measuring temperatures of solutions, waterbaths, and incubators, as these temperatures are critical for optimum product performance.
- The wash concentrations (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.

Customer Support

Please contact the Cytocell Sales and Marketing Department by telephone or e-mail. probes@cytocell.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 de cellules 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 mélange de sondes IGK est constitué d'une sonde marquée en rouge de 344 kb couvrant la partie distale de la région Variable du IGK et d'une sonde marquée en vert de 531 kb couvrant une partie de la région proximale du segment Variable du IGK, les séquences juxtaposées et le segment constant.

Dans une cellule normale, 2 spots rouge/vert (ou jaunes) sont observés (2Y). Dans le cas d'une translocation, 1 spot vert et 1 spot rouge provenant des chromosomes transloqués sont observés, ainsi qu'un spot de fusion rouge/vert (ou jaune) correspondant au chromosome normal (1R, 1V, 1Y).

Conditionnement

Sonde : 50µl par tube (5 tests) ou 100µl par tube (10 tests)

Concentration de sonde IGK rouge: 40-50 ng/test

Concentration de sonde IGK vert: 240-300 ng/test.

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

Contre-colorant: 150 µl par tube (15 tests)

Le contre-colorant est le DAPI antifading (ES : 0.125µg/ml DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole)).

Avertissements et précautions

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

Conservation et manipulation

Le kit 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

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

Microscopio e filtres

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

Préparation des échantillons

Le kit a été développé pour utilisation sur les cellules du sang périphérique ou de moelle osseuse 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

Préparation de la lame échantillon

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

Pré-dénaturation

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

Dénaturation

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

Hybridation

10. 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

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

Recommandations

1. 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.
2. 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.

Support Client

Veillez contacter Cytocell, Département Ventes/Marketing 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 prodotto IGK consiste in un set di sonde 344 kb etichettate in rosso che coprono la regione variabile IGK distale e una sonda verde 531 kb che copre parte della regione variabile IGK proximale, nonché i segmenti congiunti e un segmento costante. In una cellula normale, compaiono 2 segnali rosso/verde (che possono apparire gialli) (2Y). Una traslocazione risultante nell'attenuamento di 1 segnale verde e 1 segnale rosso dai cromosomi traslocati e 1 segnale rosso/verde fuso (che può apparire giallo) dal cromosoma normale (1R, 1G, 1Y).

Materiali forniti

Sonda: 50µl per provetta (5 test) o 100µl per provetta (10 test)

Quantità di IGK rosso probe: 40-50 ng/test

Quantità di IGK verde probe: 240-300 ng/test

La sonda è fornita già miscelata e pronta per l'uso nella soluzione di ibridazione (Formamide; Destrano solfato; SSC).

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-fenilindolo))

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, camicia 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 una camicia 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 flaconcini 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.

Configurazione ottimale del microscopio e dei filtri

Per una visualizzazione ottimale della sonda si raccomanda di utilizzare una lampada a mercurio da 100 watt ed obiettivi plan apochromat 63x e 100x. Il filtro triplo DAPI/FITC/Texas Red è ottimale per visualizzare tutti e tre i fluorofori contemporaneamente.

Preparazione del campione

Il kit è stato progettato per l'utilizzo con cellule del sangue periferico coltivate o cellule di midollo osseo 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

Preparazione del vetrino

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

Pre-dénaturation

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

8. 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

9. Denaturare simultaneamente il campione e la sonda riscaldando il vetrino su una

piastra riscaldante a 75°C (+/- 1°C) per 2 minuti

Ibridazione

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

per tutta la notte

Lavaggi post-ibridazione

11. Rimuovere accuratamente il vetrino coprioggetto e tutte le tracce di colla
12. Lavare il vetrino in SSC 0,4x (pH 7,0) a 72°C (+/- 1°C) per 2 minuti
13. Scolare il vetrino e lavare in SSC 2x, Tween-20 0,05% (pH 7,0) a TA per 30 secondi
14. Scolare il vetrino e applicare 10µl di DAPI antifade
15. Coprire con un vetrino coprioggetto e far sviluppare il colore al buio per 10 minuti
16. 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

1. Si raccomanda fortemente l'utilizzo di un termometro calibrato per misurare la temperatura delle soluzioni, dei bagni termostati e degli incubatori in quanto critico per il funzionamento ottimale del prodotto.
2. Le concentrazioni del lavaggio (stringenza), il pH e la temperatura sono importanti in quanto condizioni di stringenza blande possono favorire un legame non specifico della sonda e condizioni di stringenza troppo alte possono portare alla perdita del segnale.

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 Waschwärgängen unter stringenter Bedingungen entfernt und die DNA zum Sichtbarmachen gegengefärbt. Unter dem Fluoreszenzmikroskop wird dann die hybridisierte Sonde am Zielmaterial erkennbar.

Sondenspezifitation

IGK Produkt besteht aus einem Set von in Rot markierten Sonden von 344 kb, welche die distale variable IGK-Region überspannen, und der grünen Sonde von 531 kb, welche einen Teil der proximalen variablen IGK-Region ebenso wie die $\text{J}\alpha\text{1}$ Segmente und ein konstantes Segment überspannt. In der normalen Zelle werden 2 rote/grüne Signale (können als gelb erscheinen) (2Y) erwartet. Eine Translokation führt zu 1 grünen und 1 roten Signal von den translozierten Chromosomen und 1 fusionierten roten/grünen Signal (kann als gelb erscheinen) vom normalen Chromosom (1R, 1G, 1Y).

Kitkomponenten

Sonde: 50µl pro Röhrchen (5 tests) oder 100µl pro Röhrchen (10 Tests)

Menge an IGK rot: 40-50 ng/Test

Menge an IGK grün: 240-300 ng/Test

Die Sonden wird vorgemischt und gebrauchsfertig in Hybridisierungslösung geliefert (Formamid, Dextransulfat, SSC).

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

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. Vorsicht 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 Kitetikett 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 - 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 Quecksilberdampflampe und von Plan Achromat Objektiven mit 63-facher oder 100-facher Vergrößerung. Das Dreifach-Bandpassfilter DAPI/FITC/Texasrot ist für die simultane Beobachtung aller drei Fluorophore optimal geeignet.

Probenvorbereitung

Das Kit ist für Verwendung an kultivierten, peripheren Blutzellen und Knochenmark, die in Carnoy's Fixativ fixiert sind, ausgelegt und sollte nach den Richtlinien des Labors oder der Einrichtung vorbereitet werden. Fertigen Sie die luftgetrockneten Proben auf Objektträgern entsprechend der zytogenetischen Standardvorschriften an.

FISH-Protokoll

Vorbereitung des Objektträgers

1. Zellprobe auf gereinigten Mikroskop-Objektträger auftropfen Trocknen lassen.
2. Objektträger für 2 Minuten in 2 x SSC bei Zimmertemperatur waschen (RT)
3. Entwässern in Alkoholreihe (70%, 85% und 100%), jeweils für 2 Min. bei RT. Trocknen lassen.

Vordenaturierung

4. Nehmen Sie die Sonde aus dem 620°C Gefrierschrank und lassen Sie diese sich auf Zimmertemperatur aufwärmen.
5. Durch wiederholtes, sanftes Mischen in der Pipette sicherstellen, dass die Sondenlösung homogen gemischt ist.
6. Pro Test 10µl Sonde entnehmen und in ein Mikrozentrifugenröhrchen geben. Bewahren Sie die restliche Sonde bei -20°C auf.
7. Sonde, Probenobjektträger zum Vorwärmen 10 Minuten auf eine Heizplatte mit 37°C (+/- 1°C) geben.
8. 10µl Sondenmischung auf die Zellprobe auftropfen und Deckplättchen sorgfältig auflegen. Mit Gummikleber-Lösung versiegeln und vollständig trocknen lassen.

Denaturierung

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

Hybridisierung

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

Waschen nach der Hybridisierung

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

Stabilität der fertigen Objektträger

Objektträger mit FISH-Proben können bis zu einem Monat lang analysiert werden, wenn sie im Dunkeln bei oder unter Raumtemperatur gelagert werden.

Empfehlungen zur Durchführung

1. 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.
2. 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.

Kundendienst

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

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 diana se trata con calor y formamida para desnaturalizar el ADN bicatenario haciendo que resulte monocatenario. El ADN diana queda entonces disponible para hibridarlo con una sonda de ADN igualmente desnaturalizado, monocatenario marcado con fluorescencia que tiene una secuencia complementaria. Después de la hibridación la sonda de ADN no específicamente hibridada y no hibridada se elimina tras varios lavados y se aplica un contraste al ADN para su visualización. El uso de un microscopio de fluorescencia permite la visualización de la sonda hibridada en el material utilizado.

Especificaciones de la sonda

La sonda IGK esta constituida por una sonda roja de 344 kb de extensión, que abarca la parte distal del segmento variable de IGK y una sonda verde de 531 kb, que abarca parte de la región proximal a la región variable del gen IGK, además de abarcar parte de la región constante.

En una célula normal, se verán 2 señales rojo/verde o amarillas (2Y). En un paciente con traslocación, se observaran 1 señal roja (1R), 1 señal verde (1G), correspondientes a la rotura provocada por la traslocación y 1 señal rojo/verde o amarilla (1Y), correspondiente al alelo no traslocado.

Material proporcionado

Sonda: 50µl por vial (5 reacciones) o 100µl por vial (10 reacciones)

Sonda de la región de IGK rojo: 40-50 ng/reacción

Sonda de la región de IGK verde: 240-300 ng/reacción

La sonda se proporciona mezclada previamente y lista para utilizar en la solución de hibridación (Formamida; sulfato de dextrano; SSC).

Contraste: 150µl por vial (15 reacciones)

DAPI Antifade (ES: 0.125µg/ml DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol)).

Avisos y precauciones

1. Para diagnóstico *in vitro*. Sólo para uso profesional.
2. Utilizar guantes al manipular las sondas de ADN y la contratención DAPI. La solución de hibridación contiene formamida, que es teratogena; 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 El 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) Centrifuga 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-Apochromat. El filtro de triple banda DAPI/FITC/Texas Red es óptimo para ver simultáneamente los tres fluorocromos.

Preparación de la muestra

El kit está diseñado para su uso en células sanguíneas periféricas cultivadas y fijadas o en células de médula ósea 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

Preparación del portaobjetos

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

Antes de la desnaturalización

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

Desnaturalización

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

Hibridación

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

Baños posthibridación

11. Quite el cubreobjetos y los restos de goma cuidadosamente
12. Lave el portaobjetos en 0,4 x SSC (pH 7,0) a 72°C (+/- 1°C) durante 2 minutos
13. Seque el portaobjetos y lávelo en 2 x SSC, 0,05% Tween-20 (pH 7,0) a TA durante 30 segundos
14. Seque el portaobjetos y aplique 10µl del DAPI Antifade
15. Cubra con el cubreobjetos y deje que la preparación en la oscuridad durante 10 minutos para estabilizar el DAPI
16. 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

1. Se recomienda encarecidamente el uso de un termómetro calibrado para medir la temperatura de las soluciones, baños de agua e incubadores ya que estas temperaturas son cruciales para el rendimiento óptimo del producto.
2. Las concentraciones de lavado, el pH y la temperatura son importantes puesto que un rigor escaso en el lavado puede resultar en una fijación no específica de la sonda mientras que demasiada puede dar como resultado la falta de señal.

Ayuda al cliente

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

Referencias/Bibliographie/Literatur/Bibliografía

1. Ong ST *et al* (1998) *Semin Oncol* 25: 447-60
2. Kornblau SM *et al* (1991) *Hematol Oncol* 9: 63-78
3. Chaganti SR *et al* (1998) *Genes Chroms Cancer* 23: 323-7
4. Tashiro S *et al* (1992) *Oncogene* 7:573-7
5. Martin-Subero JI *et al* (2002) *Int J Cancer* 98:470-474

Patents and Trademarks

Aquarius and Cytocell are registered trademarks of Cytocell Ltd. Any cyanine dyes used in this Product are manufactured on behalf of Amersham Pharmacia Biotech Inc. under an exclusive license from Carnegie Mellon University and are covered by US Patent Number 5 268 486 and other patents pending. The Compound in this Product is manufactured by NEN Life Science Products, Inc. under US Patent Numbers 5 047 519 and 5 151 507. Use of the Product for commercial purposes is strictly forbidden without written permission from Amersham Pharmacia Biotech Inc. and NEN Life Science Products, Inc.



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