

Instructions For Use

REF: LPH 050

TLX3 Breakpart Probe



PROFESSIONAL USE ONLY

ENGLISH/FRANÇAIS/ITALIANO/DEUTSCH/ESPAÑOL

Further information available at www.cytocell.com

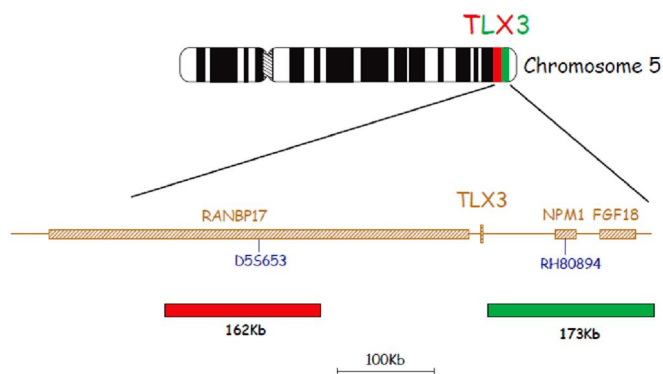
Fluorescence *In Situ* Hybridisation (FISH) is a technique that allows DNA sequences to be detected on metaphase chromosomes or in interphase nuclei from fixed cytogenetic samples. The technique uses DNA probes that hybridise to entire chromosomes or single unique sequences, and serves as a powerful 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

In common with other factors involved in T-ALL, the normal expression of TLX3 (T-Cell Leukaemia Homeobox 3) is disrupted by a chromosomal translocation¹. Unlike TLX1 (HOX11), however, the deregulation of TLX3 is not brought about by close juxtaposition with T-Cell receptor genes, rather, it is brought into contact with another gene which is highly expressed in normal T-cell differentiation, BCL11B (B-Cell Lymphoma 11B, or CTIP2) on chromosome 14q32.1¹. The translocation t(5;14)(q35;q32) is generally cryptic and does not actually disrupt TLX3, rather, it disrupts RANBP17 (Ran-Binding Protein 17) over a 110kb breakpoint region². However, this gene is very close to TLX3 and though RANBP17 expression is not affected by the translocation, TLX3 expression is. Deregulated expression of TLX3 is observed in around 20% of paediatric cases and around 13% of adult T-ALL patients^{3,4}.

Probe Specification

TLX3 region, centromeric 5q35, Red
TLX3 region, telomeric 5q35, Green



The TLX3 probe consists of a red probe (162kb) centromeric to the TLX3 gene and a green probe (173kb) telomeric to the gene. The red probe spans a 162kb proportion of the RANBP17 gene including the D5S653 marker and the green probe spans the NPM1 and FGF18 genes including the marker RH80894. This probe is designed to analyse the occurrence of translocations in this region in T-cell ALL.

Materials Provided

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

Amount of red TLX3 probe: 48-60 ng/test.

Amount of green TLX3 probe: 96-120 ng/test.

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

Counterstain: 150µl per vial (15 tests)

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

Warnings and Precautions

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

Storage and Handling

The 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

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. 24x24 mm coverslips.
12. Timer.
13. 37°C incubator.
14. Rubber solution glue.

Fluorescence Microscope Recommendation

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

Sample Preparation

The kit is designed for use on cultured peripheral blood cells or cultured bone marrow 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 should be limited at all times)

Slide preparation

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

Pre-Denaturation

5. Remove the probe from the freezer and allow it to warm to RT.
6. Ensure that the probe solution is uniformly mixed with a pipette.
7. Remove 10µl of probe per test, and transfer it to a microcentrifuge tube. Quickly return the remaining probe to -20°C.
8. Place the probe and the sample slide to prewarm on a 37°C (+/- 1°C) hotplate for 5mins.
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 2mins.

Hybridisation

11. Place 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 2mins without agitation.
14. Drain the slide and immerse in 2xSSC, 0.05% Tween-20 at RT (pH 7.0) for 30secs without agitation.
15. Drain the slide and apply 10µl of DAPI antifade onto each sample.
16. Cover with a coverslip, remove bubbles and allow colour to develop in the dark for 10mins.
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 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.

- The use of a calibrated thermometer is strongly recommended for measuring temperatures of solutions, waterbaths, and incubators as these temperatures are critical for optimum product performance.
- The wash concentrations, pH and temperatures are important as low stringency can result in non-specific binding of the probe and too high stringency can result in a lack of signal.
- Incomplete denaturation can result in lack of signal and over denaturation can also result in non-specific binding.

Expected Results

In the normal cell due to the close juxtaposition of the probes expect to see the two homologues as either two fused yellow signals (2Y) or two red/green signals (2RG). In the event of a monoallelic translocation you will see one fused yellow signal (1Y) or a red/green signal (1RG) and one distinct one red (1R) one green (1G) split signal. In the event of a biallelic translocation no fused signals would be present and you will observe two red (2R) and two green (2G) signals.

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 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.

Caractéristiques de la sonde

Sonde proximale de la région TLX3 5q35 en rouge
Sonde distale de la région TLX3 5q35 en vert

La sonde TLX3 est composée d'une sonde en rouge (162kb) proximale du gène TLX3 et d'une sonde en vert (173kb) distale du gène TLX3. La sonde en rouge couvre une portion de 162kb du gène RANBP17, incluant le marqueur D5S653. La sonde en vert couvre les gènes NPM1 et FGF18, incluant le marqueur RH80894. Cette sonde TLX3 breakapart permet l'analyse des translocations dans la région TLX3 chez les patients ayant une leucémie aiguë lymphoblastique à cellules T (LAL-T).

Conditionnement

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

Concentration de sonde TLX3 rouge: 48-60 ng/test

Concentration de sonde TLX3 vert: 96-120 ng/test.

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

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

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

Avertissements et précautions

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

Conservation et manipulation

Le kit 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 (0.5ml)
- Microscope à fluorescence (Voir la section Microscope et filtres)
- Jarres en plastique ou en verre
- Forceps
- Huile à immersion pour microscope à fluorescence
- Centrifugeuse de paillasse
- Lames de microscope
- Lamelles 24x24mm
- Chronomètre
- Incubateur à +37°C
- Colle Rubber cement

Microscope et filtres

Pour une visualisation optimale de la sonde, nous recommandons l'utilisation d'une lampe à mercure de 100 watts et d'objectifs plan apochromatiques x63 ou 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

(Note: Éviter toute exposition de la sonde à la lumière du jour dans la mesure du possible pour ne pas altérer la durée de vie des fluorochromes)

Préparation de la lame échantillon

- Déposer l'échantillon cellulaire sur une lame propre. Laisser sécher.

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

Pré-dénaturation

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

Dénaturation

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

Hybridation

- 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

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

Recommandations

- Cuire ou vieillir les lames n'est pas recommandé, ceci pouvant réduire l'intensité du signal.
- Les conditions d'hybridation peuvent être affectées par l'utilisation de réactifs autres que ceux fournis ou recommandés par CytoceLL Ltd.
- 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.
- 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.
- Une dénaturation incomplète peut engendrer une perte de signal et une trop forte dénaturation une hybridation non-spécifique.

Résultats attendus

Dans une cellule normale, les sondes étant étroitement juxtaposées, les spots sur chacun des deux chromosomes apparaîtront comme 2 signaux jaunes (2 spots de fusion 2Y), ou 2 signaux rouge/vert (2RG). Dans le cas d'une translocation monoallélique, on observe 1 spot de fusion jaune (1Y) ou 1 spot rouge/vert (1RG) et un signal split bien distinct avec 1 spot rouge (1R) et 1 spot vert (1G). Dans le cas d'une translocation biallélique, aucun spot de fusion présent et on observe 2 spots rouges (2R) et 2 spots verts (2G).

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. 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.

Specifiche della sonda

Regione TLX3, centromerica 5q35. Rossa
Regione TLX3, telomerica 5q35. Verde

La sonda TLX3 consiste di una sonda rossa (162kb) centromerica rispetto al gene TLX3 e una sonda verde (173kb) telomerica a questo gene. La sonda rossa ibrida una porzione pari a 162kb del gene RANBP17 che include il marcatore D5S653, la sonda verde ricopre i geni NPM1 e FGF18 includendo il marcatore RH80894. La sonda è disegnata per evidenziare eventuali traslocazioni in questa regione in cellule T di pazienti affetti da ALL.

Materiali forniti

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

Quantità di TLX3 rosso probe: 48-60 ng/test

Quantità di TLX3 verde probe: 96-120 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 antifading (ES: 0.125µg/ml DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindole))

Avvertenze e misure precauzionali

- Per uso diagnostico *in vitro*. Per uso professionale.
- Quando si manipolano le sonde ed il colorante di contrasto DAPI è necessario indossare i guanti.
- 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.
- Il DAPI è un potenziale cancerogeno. Maneggiare con cura, indossare guanti ed un camicia da laboratorio. Per lo smaltimento, lavare con grandi quantità di acqua.
- 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 +20°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 e 200µl.
3. Bagno termostato con controllo accurato della temperatura a 72°C.
4. Provette da microcentrifuga (0,5 ml)
5. Microscopio a fluorescenza (riferirsi alla sezione Configurazione ottimale del microscopio e dei filtri)
6. Contenitori di Coplin in plastica o vetro.
7. Pinzette.
8. Olio per lenti ad immersione del microscopio a fluorescenza.
9. Centrifuga da banco.
10. Vetrini da microscopia
11. 24x24 mm vetrini coprioggetto
12. Timer
13. Incubatore a 37°C
14. Colla per vetrini

Configurazione ottimale del microscopio e dei filtri

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

Preparazione del campione

Il kit è stato progettato per l'utilizzo con cellule del sangue periferico coltivate 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

(Nota: Fare attenzione a limitare il più possibile l'esposizione della sonda alla luce del laboratorio)

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 min a temperatura ambiente (RT) senza agitazione.
3. Disidratare in una serie di diluizioni di etanolo (70%, 85% e 100%), ognuna per 2 minuti a TA.
4. Lasciare asciugare il vetrino.

Pre-denaturazione

5. Rimuovere la sonda dal congelatore a -20°C e lasciarla riscaldare a TA.
6. Accertarsi che la soluzione della sonda sia uniforme pipettando ripetutamente con delicatezza
7. Pipettare 10µl di sonda per test ed inserirli in una provetta da microcentrifuga. Riporre la sonda non utilizzata a -20°C.
8. Pre-riscaldare la sonda, il vetrino ed il coprioggetto su una piastra riscaldante a 37°C (+/- 1°C) per 5 minuti
9. Caricare 10µl di miscela della sonda sul campione cellulare e coprire delicatamente con il coprioggetto. Sigillare con soluzione collante gommosa e far asciugare completamente

Denaturazione

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

Ibridazione

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

Lavaggi post-ibridazione

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

Stabilità del vetrino finito

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

Raccomandazioni per l'uso

1. L'eccessivo riscaldamento o 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.

Risultati attesi

In cellule normali, in seguito alla giustapposizione delle sonde ci aspettiamo di vedere i due omologhi come due segnali di fusione (2G) o due rosso/verde molto vicini (2RV). Nel caso di una traslocazione monoallelica vedremo un segnale di fusione (1G) o un rosso/verde (1RV), un segnale distinto rosso (1R) uno verde (1V) segnali di split. Nell'eventualità di una traslocazione bialelica non ci saranno segnali di fusione e si osserveranno due segnali rossi (2R) e due verdi (2V).

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 hybridieren und dient als leistungsstarke Ergänzung zur klassischen Zytogenetik. Kürzliche Entwicklungen haben gezeigt, dass diese nützliche Technik nun

auch als essentielles diagnostisches Werkzeug für pränatale, hämatologische und pathologische Chromosomenanalysen eingesetzt werden kann. Die Ziel-DNA wird zum Denaturieren der doppelsträngigen DNA nach dem Fixieren mit Hitze und Formamid behandelt, wodurch sie einzelsträngig wird. So kann sich die Ziel-DNA an eine ebenso denaturierte, einzelsträngige fluoreszenzmarkierte DNA-Sonde mit komplementärer Sequenz anlagern. Nach der Hybridisierung werden nichtgebundene und nicht spezifisch gebundene DNA-Sonden durch eine Reihe von Waschvorgängen unter stringenten Bedingungen entfernt und die DNA zum Sichtbarmachen gegengefärbt. Unter dem Fluoreszenzmikroskop wird dann die hybridisierte Sonde am Zielmaterial erkennbar.

Sondenspezifikation

TLX3 Region, zentromerisch 5q35, Rot
TLX3 Region, telomerisch 5q35, Grün

Die TLX3 Sonde besteht aus einer roten Sonde (162kb), die zentromerisch vom TLX3 Gen liegt und einer telomerisch liegenden grünen Sonde (173kb). Die rote Sonde umfasst einen 162kb großen Teils des RANBP17 Gens einschließlich dem D5S653 Marker während die grüne Sonde die NPM1 und FGF18 Gene einschließlich dem Marker RH80894 abdeckt. Mit dieser Sonde kann das Auftreten von Translokationen in dieser Region in T-Zellen ALL untersucht werden.

Kitkomponenten

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

Menge an TLX3 rot: 48-60 ng/Test

Menge an TLX3 grün: 96-120 ng/Test

Die Sonden sind 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. 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 +20°C gelagert werden. Die Röhrchen mit den Sonden und der Gegenfärbung müssen im Dunkeln aufbewahrt werden.

Benötigte, aber nicht mitgelieferte Laborgeräte

1. Heizplatte (mit stabiler Heizplatte und genauer Temperaturregelung bis 80°C)
2. Micropipetten mit variablem Volumen von 1 µl - 200 µl
3. Wasserbad mit genauer Temperaturkontrolle bei 72°C.
4. Mikro-Zentrifugenröhrchen (0,5 ml).
5. Fluoreszenzmikroskop (siehe auch %Empfehlungen zum Fluoreszenzmikroskop%).
6. Coplin-Färbetrog aus Kunststoff oder Glas.
7. Pinzette.
8. Für Fluoreszenzobjektive geeignetes Immersionsöl.
9. Tischzentrifuge.
10. Objektträger für das Mikroskop.
11. 24x24 mm Deckgläser.
12. Timer.
13. 37°C Inkubator.
14. Gummilösung zum Versiegeln der Deckglasränder.

Empfehlungen zum Fluoreszenzmikroskop

Zur bestmöglichen Beobachtung der Probe empfehlen wir die Verwendung einer 100 Watt Quecksilberdampfampe und von Plan Achromat Objektiven mit 63-facher oder 100-facher Vergrößerung. Das 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

Bitte beachten Sie jederzeit, dass die Sonden dem Laborlicht nur für eine möglichst kurze Zeit ausgesetzt sind.

Vorbereitung des Objektträgers

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

Vordenaturierung

5. Nehmen Sie die Sonde aus dem +20°C Gefrierschrank und lassen Sie diese sich auf Zimmertemperatur aufwärmen.
6. Durch wiederholtes, sanftes Mischen in der Pipette sicherstellen, dass die Sondenlösung homogen gemischt ist.
7. Pro Test 10µl Sonde entnehmen und in ein Mikrozentrifugenröhrchen geben. Bewahren Sie die restliche Sonde bei -20°C auf. Sonde.
8. Probenobjektträger zum Vorwärmen 5 Minuten auf eine Heizplatte mit 37°C (+/- 1°C) geben.
9. 10µl Sondenmischung auf die Zellprobe auftropfen und Deckplättchen sorgfältig auflegen. Mit Gummikleber-Lösung versiegeln und vollständig trocken lassen.

Denaturierung

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

Hybridisierung

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

Waschen nach der Hybridisierung

12. Deckgläschen und alle Kleberspuren vorsichtig entfernen.
13. Objektträger 2 Minuten in 0,4 x SSC (pH 7,0) bei 72°C (+/- 1°C) waschen.
14. Objektträger abtropfen lassen und 30 Sekunden in 2 x SSC, 0,05% Tween -20 bei RT, (pH 7,0), waschen.
15. Den Objektträger abtropfen lassen und 10µl des DAPI Antifade zu jeder Probe geben.

- Mit einem Deckglas abdecken, die Luftblasen entfernen und die Farbe 10 Min im Dunkeln entwickeln lassen.
- 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

- Wärmebehandlung oder Reifung der Proben ist nicht empfehlenswert, da dies zu einer verminderten Signalfluoreszenz führen kann.
- 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 hoher 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

In der normalen Zelle werden aufgrund der Nähe der nebeneinanderliegenden Sonden die beiden Homologe entweder in Form von zwei miteinander fusionierten gelben Signalen (2Y) sichtbar oder als zwei rot/grüne Signale (2RG). Im Falle einer monoallelen Translokation ist ein fusioniertes gelbes Signal (1Y) oder ein rot/grünes Signal zu sehen und ein distinktes voneinander getrenntes rotes (1R) und grünes (1G) Signal. Im Falle einer biallelen Translokation treten keine fusionierten Signale auf und man beobachtet zwei rote (2R) und zwei grüne (2G) Signale.

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 hibridiza los cromosomas completos o las secuencias únicas simples y es un complemento útil para la citogenética clásica. Recientes estudios indican que esta es una técnica que puede aplicarse como herramienta esencial de diagnóstico prenatal, hematológico y patológico. Después de la fijación, el ADN diana se trata con calor y formamida para desnaturizar el ADN bicatenario haciendo que resulte monocatenario. El ADN diana queda entonces disponible para hibridarlo con una sonda de ADN igualmente desnaturizado, 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

Región centromérica a TLX3, 5q35 en rojo
Región telomérica a TLX3, 5q35 en verde

La sonda TLX3 consta de dos sondas, una roja (162 kb) centromérica al gen TLX3 y una sonda verde (173 kb) telomérica a dicho gen. La señal roja abarca una zona de 162 kb del gen RANBP17 e incluye al marcador D5S653 y la sonda verde abarca a los genes NPM1 y FGF18 e incluye al marcador RH80894. Esta sonda está diseñada para el análisis de la incidencia de traslocaciones en esta región en linfocitos-T en ALL (Leucemia Linfoblástica Aguda).

Material proporcionado

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

Sonda de la región de TLX3 rojo: 48-60 ng/reacción

Sonda de la región de TLX3 verde: 96-120 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

- Para diagnóstico *in vitro*. Sólo para uso profesional.
- Utilizar guantes al manipular las sondas de ADN y la contraindicación 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.
- La EI DAPI y PI puede producir cáncer. Manipular con cuidado; utilizar guantes y bata de laboratorio. Al eliminarla, rociar con gran cantidad de agua.
- 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

- 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 de fluorescencia)
- 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.

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

(Nota: Por favor asegúrese que la exposición de la sonda a las luces del laboratorio sea lo mas limitada posible)

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
- Asegúrese de que la solución de la sonda es uniforme mezclando varias veces con la pipeta
- Extraiga 10µl de la sonda por prueba, poner en un tubo de microcentrifuga. Vuelva a almacenar el resto de la sonda a -20°C
- .0
- Precaliente 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 placa caliente 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

Baños posthibridación

- 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
- Escorra el portaobjetos y añada 10ul 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.
- Una desnaturalización incompleta puede provocar falta de señal y una desnaturalización excesiva también puede originar una fijación no específica.

Resultados esperados

En una célula normal, debido a la cercanía de ambas sondas, se observarán dos de señales de fusión (2Y) o dos señales rojo/verde yuxtapuestas (2RG).

En el caso de una traslocación monoalélica, se observarán una señal de fusión amarilla (1Y) o rojo/verde (1RG), una señal independiente verde (1G) y una señal independiente roja (1R). En el caso de una traslocación bialélica, no se observarán señales de fusión y se verán dos señales independientes verdes (2G) y dos señales independientes rojas (2R)

Ayuda al cliente

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

Referencias/Bibliographie/Literatur/Bibliografía

- Bernard OA *et al* (2001) *Leukaemia* 15: 1495-1504
- Van Zutven *et al* (2004) *Haematologica* 89: 671-678
- Cavé H *et al* (2004) *Blood* 103: 442-450
- Mauvioux *et al* (2002) *Leukemia* 16:2417-2422

Patents and Trademarks

Aquarius and Cytocell are registered trademarks of Cytocell Ltd.



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