



Instructions For Use

REF: LPE 0XYc / LPE 0XYq



Chromosome X α -satellite (DXZ1) and Chromosome Y α -satellite (DYZ3) dual labelled and Chromosome X α -satellite (DXZ1) and Chromosome Y satellite III (DYZ1) dual labeled

FOR 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.

Probe Specification

XYc
X centromere Xp11.1-q11.1 (DXZ1) Green
Y centromere Yp11.1-q11.1 (DYZ3) Red

XYq
X centromere Xp11.1-q11.1 (DXZ1) Green
Y heterochromatin Yq12 (DYZ1) Red

Introduction

Chromosome X α -satellite (DXZ1) and Chromosome Y α -satellite (DYZ3)
This enumeration probe set contains chromosome specific alphoid DNA repeat sequences located at the centromeres of chromosome X and chromosome Y.

This probe set will enable the identification and enumeration of X and Y human chromosomes in interphase cells and metaphase chromosomes from fixed cultured peripheral blood cells.

Chromosome X α -satellite (DXZ1) and Chromosome Y satellite III (DYZ1)

This enumeration probe set contains chromosome specific DNA repeat sequences located at the centromere of chromosome X and in the heterochromatic block of chromosome Y.

It will enable the identification and enumeration of X and Y human chromosomes in interphase cells and metaphase chromosomes from fixed cultured peripheral blood and bone marrow samples.

Materials Provided

Probe: 100 μ l per vial (10 tests)
XYc
Amount of X α -satellite probe: 0.6 ng/test
Amount of Y α -satellite probe: 500 ng/test

XYq
Amount of X α -satellite probe: 0.6 ng/test
Amount of Y satellite III probe: 8.3 ng/test

The XY probes are provided premixed and ready to use in hybridisation solution (Formamide; Dextran Sulphate; SSC). The probe DNA is directly labelled: X with a green fluorophore (FITC spectrum) and Y probes with a red fluorophore (Texas Red spectrum).

Counterstain: 150 μ l per vial (15 tests)

The counterstain is DAPI antifade (ES: 0.125 μ g/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 formaldehyde 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 institutions 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 μ l to 200 μ l
- 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 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 is optimal for viewing all three fluorophores simultaneously.

Sample preparation

The XYc kit is designed for use on cultured peripheral blood cells fixed in Carnoy's fixative and should be prepared according to the laboratory or institution guidelines.
The XYq kit is designed for use on cultured peripheral blood and bone marrow cells fixed in Carnoy's fixative and should be prepared according to the laboratory or institution guidelines.
Prepare blood and bone marrow metaphase spreads on microscope slides according to standard cytogenetic procedures.

FISH Protocol

Slide preparation

- Spot cell sample onto cleaned microscope slide
- Wash slide in 2 x SSC for 2 minutes at room temperature (RT: 20-25°C)
- Dehydrate in an ethanol series (70%, 85% and 100%), each for 2 mins

Pre-Denaturation

- Remove probe from -20°C freezer and allow to warm to RT
- Ensure probe solution is uniform by repeated pipette mixing
- Remove 10 μ l of probe per test, place in a microcentrifuge tube
- Place probe, sample slide and 24x24mm glass coverslip to prewarm on a 37°C (+/- 1°C) hotplate for 10 mins
- Spot 10 μ l probe mixture onto the cell sample and carefully apply coverslip. Seal with rubber glue solution 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) for 1 hour.

Post-Hybridisation Washes

- Remove coverslip and all traces of glue carefully
- Wash slide in 0.4 x SSC at 72°C (+/- 1°C) (pH 7.0) 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 μ l of DAPI antifade
- Cover with a coverslip and allow colour to develop in the dark for 10 mins
- View with fluorescence microscope

* If background is observed, slides can be washed through 0.25xSSC at stage 12 instead of 0.4xSSC to increase stringency of washes.

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.

Expected Results

Chromosome X α -satellite (DXZ1) and Chromosome Y α -satellite (DYZ3)

- A diploid female sample should show a green fluorescence signal at the centromere of each X chromosome in 70-90% of cells analysed.
- A diploid male sample should show a green fluorescence signal at the centromere of the X chromosome together with a red fluorescence signal at the centromere of the Y chromosome in 70-90% of cells analysed.
- The probe will not detect constitutional or acquired structural sex chromosome abnormalities.

Chromosome X α -satellite (DXZ1) and Chromosome Y satellite III (DYZ1)

- A diploid female sample should show a green fluorescence signal at the centromere of each X chromosome in 70-90% of cells analysed.
- The probe identifies only the proportion of donor and recipient cells in bone marrow samples from recipients of opposite sex bone marrow transplantation. It does not distinguish between malignant and normal cells.
- Constitutional sex chromosome aneuploidy in the patient or donor will complicate signal enumeration and test interpretation when the probe is used for monitoring sex mismatched post-transplant bone marrow patients.

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 déchantillons 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 l'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 la visualisation de la sonde hybridée sur le ADN cible.

Caractéristiques des sondes

XYc

Sonde centromérique Xp11.1-q11.1 (DXZ1) α Fluorochrome vert
Sonde centromérique Yp11.1-q11.1 (DYZ3) α Fluorochrome rouge

XYq

Sonde centromérique Xp11.1-q11.1 (DXZ1) α Fluorochrome vert
Sonde hétérochromatique Yq12 (DYZ1) α Fluorochrome rouge

Introduction

Cocktail de sondes α -satellite du chromosome X (DXZ1) et α -satellite du chromosome Y (DYZ3)

Ce cocktail de sondes centromériques est composé de séquences répétées alphoides spécifiques des chromosomes situés au niveau des centromères des chromosomes X et Y.

Le cocktail permettra d'identifier et de compter les chromosomes humains X et Y sur des cellules en interphase et sur des chromosomes en métaphase à partir de cellules de sang périphérique cultivées et fixées.

Cocktail de sondes α -satellite du chromosome X (DXZ1) et satellite III du chromosome Y (DYZ1)

Ce cocktail de sondes centromériques est constitué de séquences répétées spécifiques des chromosomes situés au niveau du centromère du chromosome X et au niveau de la région hétérochromatique du chromosome Y.

Le cocktail permettra d'identifier et de compter les chromosomes humains X et Y sur des cellules en interphase et sur des chromosomes en métaphase à partir de cellules de moelle osseuse cultivées et fixées.

Conditionnement

Sonde : 100 μ l par tube (10 tests)

XYc

Concentration de sonde α -satellite X : 0,6 ng/test
Concentration de sonde α -satellite Y : 500 ng/test

XYq

Concentration de sonde α -satellite X : 0,6 ng/test
Concentration de sonde satellite III Y : 8,3 ng/test

Les sondes XY sont fournies prêtes à l'emploi dans le tampon d'hybridation (formamide, sulfate de dextran, SSC). La sonde ADN est directement marquée : la sonde du chromosome X avec un fluorochrome vert (spectre FITC) et les sondes du chromosome Y avec un fluorochrome rouge (spectre Texas Red).

Contre-colorant : 150 μ l par tube (15 tests)

Le contre-colorant est le DAPI antifading (ES : 0,125 μ g/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 précautions. 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 de péremption indiquée sur l'étiquette du kit. La sonde et le contre-colorant doivent être conservés à l'abri de la lumière.

Matériel nécessaire non fourni

Equipement

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

Microscopos et Filtrés

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 XYc a été développé pour utilisation sur des cellules du sang périphérique cultivées et fixées avec du fixateur Carnoy et doivent être préparées selon les protocoles en vigueur dans le laboratoire ou institution. Le kit XYq a été développé pour utilisation sur des cellules de 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 étalements métaphasiques sur des lames à microscope selon les techniques standards de cytogénétique.

Protocole FISH

Préparation de la lame échantillon

1. Déposer l'échantillon cellulaire sur une lame propre.
2. Laver la lame dans du tampon 2 x SSC, pH 7.0 pendant 2 minutes à température ambiante (20-25°C).
3. Déshydrater dans une série d'éthanol (70%, 85% et 100%), 2 minutes dans chaque bain.

Préparation de la sonde

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

Dénaturation

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

Hybridation

10. Incuber la lame pendant 1h 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 développer dans l'obscurité pendant 10 minutes.
16. Visualiser avec un microscope à fluorescence.

* Si du bruit de fond est observé, les lames peuvent être soumises à un lavage à 0,25 x SSC à l'étape 12 à la place de 0,4 x SSC afin d'augmenter la stringence des lavages.

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

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.

Interprétation des résultats

Cocktail de sondes α -satellite du chromosome X et α -satellite du chromosome Y.

1. Un échantillon diploïde féminin présentera un signal vert au niveau du centromère des 2 chromosomes X homologues dans 70-90% des cellules analysées.
2. Un échantillon diploïde masculin présentera un signal vert au niveau du centromère du chromosome X et un signal rouge au niveau du centromère du chromosome Y dans 70-90% des cellules analysées.
3. Les sondes ne détecteront pas les anomalies de structure des chromosomes sexuels constitutionnelles ou acquises.

Cocktail de sondes α -satellite du chromosome X et satellite III du chromosome Y.

1. Un échantillon diploïde féminin présentera un signal vert au niveau du centromère de chaque chromosome X homologue dans 70-90% des cellules analysées.
2. Le cocktail identifie seulement le ratio de cellules du donneur et de cellules du receveur dans les échantillons de moelle osseuse de receveurs ayant une greffe de moelle osseuse à partir d'un donneur de sexe opposé. Le cocktail ne permet pas de faire la distinction entre les cellules normales et les cellules malignes.
3. Les aneuploïdies constitutionnelles des chromosomes sexuels chez le patient ou le donneur compliqueront le comptage des signaux et l'interprétation des résultats lorsque la sonde est utilisée afin de contrôler les patients ayant reçu une greffe de moelle osseuse d'un donneur de sexe opposé.
4. L'interprétation des résultats de FISH doit être effectuée en complémentarité avec des contrôles appropriés, en appliquant de bonnes pratiques de cytogénétique et en tenant compte du contexte médical du patient et des données cliniques.
5. Nous recommandons que les sondes soient utilisées en accord avec l'étiquetage du produit.

Support Client

Veuillez 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 delle sonde

XYc

X centromero Xp11.1-q11.1 (DXZ1) Verde

Y centromero Yp11.1-q11.1 (DYZ3) Rossa

XYq

X centromero Xp11.1-q11.1 (DXZ1) Verde

Y eterocromatina Yq12 (DYZ1) Rossa

Introduzione

Chromosome X α -satellite (DXZ1) e Chromosome Y α -satellite (DYZ3)

Questo set di sonde contiene sequenze ripetute di DNA aploide, cromosoma-specifiche, localizzate nella regione centromerica del cromosoma X e del cromosoma Y.

Queste permettono l'identificazione e la numerazione dei cromosomi umani X e Y da cellule in interfase e in cromosomi in metafase di cellule di sangue periferico in coltura, fissate.

Chromosome X α -satellite (DXZ1) e Chromosome Y satellite III (DYZ1)

Questo set di sonde contiene sequenze ripetute di DNA, cromosoma specifiche, localizzate nella regione centromerica del cromosoma X e nel blocco eterocromatico del cromosoma Y.

Tali sonde permettono l'identificazione e la numerazione dei cromosomi umani X e Y in cellule in interfase e in cromosomi in metafase da cellule di sangue periferico e di midollo osseo in coltura, fissate.

Materiali forniti

Sonda: 100µl per provetta (10 test)

XYc

Quantità di X α -satellite probe: 0,6 ng/test

Quantità di Y α -satellite probe: 500 ng/test

XYq

Quantità di X α -satellite probe: 0,6 ng/test

Quantità di Y satellite III probe: 8,3 ng/test

Le sonde specifiche per i cromosomi X e Y sono fornite, pre-miscelate e pronte per l'uso, nella soluzione di ibridazione (Formamide; Destrano solfato; SSC). Il DNA della sonda è direttamente marcato: le sonde specifiche per il cromosoma X sono marcate con un fluorocromo verde (spettro FITC) mentre le sonde specifiche per il cromosoma Y sono marcate con un fluorocromo rosso (spettro Texas Red).

Colorante di contrasto : 150µl per provetta (15 test)

Il colorante di contrasto è il DAPI antifade (ES: 0,125µg/ml DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindole)).

Avvertenze e misure precauzionali

1. Per uso diagnostico in vitro. Per uso professionale.
2. Quando si manipolano le sonde ed il colorante di contrasto DAPI è necessario indossare i guanti.

3. Le miscele di sonda contengono formamide, una sostanza teratogena. Non respirare i fumi ed evitare il contatto con la pelle. Indossare guanti e 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. Mangiare 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 una piastra solida ed 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 contemporaneamente tutti e tre i fluorocromi.

Preparazione del campione

Il kit XYc è stato progettato per l'utilizzo con cellule del sangue periferico coltivate, fissate nel fissativo di Carnoy e preparate secondo le linee guida del laboratorio o dell'istituzione.

Il kit XYp è stato progettato per l'utilizzo con cellule del sangue periferico o del midollo osseo coltivate, fissate nel fissativo di Carnoy e preparate secondo le linee guida del laboratorio o dell'istituzione.

Preparare sospensioni dense di cellule ematiche o di midollo osseo in metafase sui vetrini campione seguendo le procedure standard di citogenetica.

Protocollo FISH

Preparazione del vetrino

1. Caricare il campione cellulare su un vetrino da microscopia pulito
2. Lavare il vetrino in SSC 2x per 2 minuti temperatura ambiente (TA: 20-25°C)
3. Disidratare in una serie di diluizioni di etanolo (70%, 85% e 100%), immergendo il vetrino in ogni soluzione per 2 minuti

Pre-denaturazione

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
6. Rimuovere 10µl di sonda per test ed inserirli in una provetta da microcentrifuga
7. Appoggiare la sonda, il vetrino campione ed il coprioggetto da 24x24mm su una piastra riscaldante a 37°C (+/- 1°C) per 10 minuti
8. Caricare 10µl di miscela della sonda sul campione cellulare e coprire con il coprioggetto. Sigillare con soluzione collante gommosa e far asciugare completamente

Denaturazione

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

Ibridazione

10. Incubare il vetrino in una camera umida, non permeabile alla luce, a 37°C (+/- 1°C) per un tempo compreso tra 1 ora.

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. Sgocciolare il vetrino e lavare in SSC 2x. Tween -20 0,05% (pH 7,0) a TA per 30 secondi
14. Sgocciolare il vetrino e caricare 10µl di DAPI antifade
15. Coprire con un vetrino coprioggetto e lasciar sviluppare il colore al buio per 10 minuti.
16. Analizzare con un microscopio a fluorescenza

* In caso di background, al punto 12 il vetrino può essere lavato con SSC 0,25 x al posto di SSC 0,4x per aumentare la stringenza dei lavaggi.

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 termostato e degli incubatori in quanto critiche per il funzionamento ottimale del prodotto.
2. Le concentrazioni del lavaggio (stringenza), il pH e la temperatura sono importanti in quanto condizioni basse di stringenza possono favorire un legame non specifico della sonda e condizioni di stringenza troppo alte possono portare alla perdita del segnale.

Risultati attesi

Chromosome X α -satellite (DXZ1) e Chromosome Y α -satellite (DYZ3)

1. Nel 70-90% di cellule analizzate, un campione diploide femminile sarà caratterizzato da un segnale fluorescente verde in prossimità del centromero di ognuno dei due cromosomi X.
2. Nel 70-90% di cellule analizzate, un campione diploide maschile sarà caratterizzato da un segnale fluorescente verde in prossimità del centromero del cromosoma X ed un segnale fluorescente rosso in prossimità del centromero del cromosoma Y.
3. Le sonde non sono in grado di rivelare anomalie cromosomiche strutturali costituzionali o acquisite.

Chromosome X α -satellite (DXZ1) e Chromosome Y satellite III (DYZ1)

1. Nel 70-90% di cellule analizzate, un campione diploide femminile sarà caratterizzato da un segnale fluorescente verde in prossimità del centromero di ognuno dei due cromosomi X.
2. Nei casi di trapianto di midollo osseo in cui donatore e ricevente siano di sesso opposto, la sonda identifica solo la proporzione fra cellule del donatore e cellule del ricevente in campioni di midollo osseo del ricevente. Questa non è in grado di distinguere tra cellule tumorali e cellule normali.
3. Quando la sonda è utilizzata per monitoraggio post-trapianto di pazienti sottoposti a trapianto di midollo osseo, in cui donatore e ricevente sono di sesso opposto, una eventuale aneuploidia costituzionale a carico dei cromosomi sessuali del paziente o del donatore complicherà l'interpretazione del segnale e, di conseguenza, del test.

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

Sondenspezifikation

XYc

X Zentromer Xp11.1-q11.1 (DXZ1) Grün

Y Zentromer Yp11.1-q11.1 (DYZ3) Rot

XYq

X Zentromer Xp11.1-q11.1 (DXZ1) Grün

Y heterochromatin Yq12 (DYZ1) Rot

Einleitung

Chromosom X α -Satellit (DXZ1) und Chromosom Y α -Satellit (DYZ3)

Dieses Zählsondenset enthält chromosomenspezifische aliphoide repetitive DNA-Sequenzen, die an den Zentromeren des X- und des Y-Chromosoms sitzen.

Dieses Sondenset ermöglicht die Identifizierung und Zählung von menschlichen X- und Y-Chromosomen in Interphasen-Zellen und Metaphasen-Chromosomen aus fixierten, kultivierten peripheren Blutzellen.

Chromosom X α -Satellit (DXZ1) und Chromosom Y Satellit III (DYZ1)

Dieses Zählsondenset enthält chromosomenspezifische repetitive DNA-Sequenzen, die am Zentromer des X-Chromosoms und im heterochromatischen Block des Y-Chromosoms liegen.

Es ermöglicht die Identifizierung und Zählung von menschlichen X- und Y-Chromosomen in Interphasen-Zellen und Metaphasen-Chromosomen aus fixierten, kultivierten peripheren Blut- und Knochenmarkproben.

Kitkomponenten

Sonde: 100 µl pro Röhrchen (10 Tests)

XYc

Menge an X α-Satelliten-Sonde: 0,6 ng/Test

Menge an Y α-Satelliten-Sonde: 500 ng/Test

XYq

Menge an X α-Satelliten-Sonde: 0,6 ng/Test

Menge an Y Satellit III - Sonde: 8,3 ng/test

Die XY Sonden werden vorgemischt und gebrauchsfertig in Hybridisierungslösung geliefert (Formamid, Dextranulfat, SSC). Die Sonden-DNA ist direkt markiert: X ó Sonden mit einem grünen Fluorophor (FITC-Spektrum) und Y ó Sonden mit einem roten Fluorophor (Texasrot-Spektrum).

Gegenfärbung : 150 µl 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. Sonnenschutzmittel 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 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 1µl -200µl
- 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 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 XYc - Kit ist für die Verwendung von kultivierten peripheren Blutzellen, die mit Carnoy's Fixativ fixiert wurden, ausgelegt. Die Zellen sollten nach den Richtlinien des Labors oder der Einrichtung präpariert werden. Das XYq - Kit ist für die Verwendung von kultivierten peripheren Blut- und Knochenmarkzellen, die mit Carnoy's Fixativ fixiert wurden, ausgelegt. Die Zellen sollten nach den Richtlinien des Labors oder der Einrichtung präpariert werden. Präparieren Sie mit zytogenetischen Standardmethoden Blut- und Knochenmarks- Metaphasen-Spreitungspräparate.

FISH-Protokoll

Vorbereitung des Objektträgers

1. Zellprobe auf gereinigten Objektträger auftropfen
 2. Objektträger für 2 Minuten in 2 x SSC bei Zimmertemperatur waschen (RT: 20-25°C)
 3. Entwässern in Alkoholreihe (70%, 85% und 100%), jeweils für 2 Min.
Vordenturierung
 4. Nehmen Sie die Sonde aus dem 620°C Gefrierschrank und lassen Sie diese sich auf Zimmertemperatur aufwärmen.
 5. Durch wiederholtes Mischen in der Pipette sicherstellen, dass die Sondenlösung homogen gemischt ist.
 6. Pro Test 10µl Sonde entnehmen und in ein Mikrozentrifugenröhrchen geben.
 7. Sonde, Probenobjektträger und 24x24 mm² Glasdeckgläschen zum Vorwärmen 10 Minuten auf eine Heizplatte mit 37°C (+/- 1°C) legen.
 8. 10µl Sondenmischung auf die Zellprobe auftropfen und Deckgläschen 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 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 bei 72°C (+/- 1°C), pH 7,0, 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

* Für die Betrachtung des Hintergrunds können die Objektträger zur Erhöhung der Stringenz der Waschschriffe statt mit 0,4xSSC mit 0,25xSSC auf Stufe 12 gewaschen werden.

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. Erhitzen oder Altern der Objektträger wird nicht empfohlen da dies zu einer Verminderung der Signalfloreszenz führen kann.
2. Durch die Verwendung anderer als der von Cytocel Ltd. gelieferten oder empfohlenen Reagenzien können die Hybridisierungsbedingungen negativ beeinflusst werden.
3. Wenn bei der Präparation der Objektträger, Denaturierung und Hybridisierung nicht alle angegebenen Schritte genau befolgt werden, können inkonsistente oder fehlerhafte Ergebnisse resultieren.
4. 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.
5. 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.
6. Eine unvollständige Denaturierung kann zu Signalverlust, eine zu starke Denaturierung dagegen auch zu nicht-spezifischer Bindung führen.

Erwartete Ergebnisse

Chromosom X α-Satellit (DXZ1) und Chromosom Y α-Satellit (DYZ3)

1. Eine diploide weibliche Probe sollte am Zentromer jedes X-Chromosoms bei 70-90% der analysierten Zellen ein grünes Fluoreszenzsignal zeigen.
2. Eine diploide männliche Probe sollte bei 70-90% der analysierten Zellen am Zentromer des X-Chromosoms ein grünes Fluoreszenzsignal und am Zentromer des Y-Chromosoms ein rotes Fluoreszenzsignal zeigen.
3. Die Sonde detektiert keine konstitutionelle oder erworbene strukturelle Aberration der Geschlechtschromosomen.

Chromosom X α-Satellit (DXZ1) und Chromosom Y Satellit III (DYZ1)

1. Eine diploide weibliche Probe sollte am Zentromer jedes X-Chromosoms bei 70-90% der analysierten Zellen ein grünes Fluoreszenzsignal zeigen.
2. Die Sonde identifiziert nur das Verhältnis von Spender- und Empfängerzellen bei Knochenmarkproben von Empfängern einer Koehenmarkstransplantation vom entgegengesetzten Geschlecht. Sie unterscheidet nicht zwischen malignen und normalen Zellen.
3. Konstitutionelle Aneuploidie von Geschlechtschromosomen beim Patienten oder beim Spender verkomplizieren die Signalzählung und die Interpretation des Tests, wenn die Sonde zur Überwachung von im Geschlecht falsch zugeordneten Knochenmarkspatienten nach einer Transplantation verwendet wird.

Kundendienst

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

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 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

XYc

Centrómero X Xp11.1-q11.1 (DXZ1) Verde

Centrómero Y Yp11.1-q11.1 (DYZ3) Rojo

XYq

Centrómero X Xp11.1-q11.1 (DXZ1) Verde

Heterocromatina Y Yq12 (DYZ1) Rojo

Introducción

Satélite α del cromosoma X (DXZ1) y satélite α del cromosoma Y (DYZ3)

Este juego de sondas de enumeración contiene las secuencias repetidas de ADN alfa específicas del cromosoma, situadas en los centrómeros de los cromosomas X e Y.

Esto permitirá identificar y enumerar los cromosomas X e Y humanos en células interfásicas y cromosomas metafásicos procedentes de células de sangre periférica cultivadas y fijadas.

Satélite α del cromosoma X (DXZ1) y satélite III del cromosoma Y (DYZ1)

Este juego de sondas de enumeración contiene las secuencias repetidas de ADN específicas del cromosoma, situadas en el centrómeros del cromosoma X y en el bloque heterocromático del cromosoma Y.

Estas sondas permitirán identificar y enumerar los cromosomas X e Y humanos en células interfásicas y cromosomas metafásicos procedentes de células de sangre periférica y muestras de médula ósea cultivadas y fijadas.

Material proporcionado

Sonda: 100µl por vial (10 reacciones)

XYc

Sonda del satélite α X: 0,6 ng/reacción

Sonda del satélite α Y: 500 ng/reacción

XYq

Sonda del satélite α X: 0,6 ng/reacción

Sonda del satélite III Y: 8,3 ng/reacción

Las sondas XY se proporcionan mezcladas previamente y listas para utilizar en la solución de hibridación (Formamida; sulfato de dextrano; SSC). La sonda de ADN está directamente marcada: sondas X con un fluoróforo verde (espectro FITC) y sondas Y con un fluoróforo rojo (espectro Texas Red).

Contraste: 150µl por vial (15 reacciones)

El contraste es 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 el contraste DAPI.
3. La solución de hibridación contiene formamida, que es teratogénica; no inhale gases ni permita el contacto con la piel. Manipular con cuidado; utilizar guantes y bata de laboratorio. Al eliminarla, rociar con gran cantidad de agua.
4. La DAPI y PI puede producir cáncer. Manipular con cuidado; utilizar guantes y bata de laboratorio. Al eliminarla, rociar con gran cantidad de agua.
5. Las sustancias peligrosas deben eliminarse de acuerdo con las instrucciones de su institución en relación con la eliminación de sustancias peligrosas.

Almacenamiento y manejo

El kit 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-Apochromat. El filtro de triple banda DAPI/FITC/Texas Red es óptimo para ver simultáneamente los tres fluorocromos.

Preparación de la muestra

El kit XYc está diseñado para su uso en células sanguíneas periféricas cultivadas en fijador de Carnoy que debe prepararse de acuerdo con las instrucciones del laboratorio o la institución.

El kit XYq está diseñado para su uso en células sanguíneas periféricas y células de médula ósea cultivadas y fijadas en Carnoy que debe prepararse de acuerdo con las instrucciones del laboratorio o la institución. Preparar las extensiones de sangre y médula ósea metafásica en los portaobjetos del microscopio según los procedimientos citogenéticos estándar.

Protocolo FISH

Preparación del portaobjetos

1. Extender la suspensión celular en un portaobjetos limpio
2. Lave el porta en 2 x SSC durante 2 minutos a temperatura ambiente (TA): 20-25°C
3. Deshidrate en una serie de etanol (70%, 85% y 100%), 2 minutos en cada uno
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 determinación, poner en un tubo de microcentrifuga
7. Pre caliente 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
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) entre 1 hora.

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

* Si se observa un fondo, los portas deben lavarse bien con 0,25 x SSC en el paso 12 y no con 0,4 x SSC para aumentar el rigor de los lavados.

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. 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.

Resultados esperados

Satélite α del cromosoma X (DXZ1) y satélite α del cromosoma Y (DYZ3)

1. Una muestra diploide femenina debe mostrar una señal de fluorescencia verde en el centrómero de cada cromosoma X en el 70-90% las células analizadas.
2. Una muestra diploide masculina debe mostrar una señal de fluorescencia verde en el centrómero del cromosoma X junto a una señal de fluorescencia roja en el centrómero del cromosoma Y en el 70-90% de las células analizadas.
3. Las sondas no detectarían anomalías cromosómicas estructurales constitucionales o adquiridas en los cromosomas sexuales.

Satélite α del cromosoma X (DXZ1) y satélite III del cromosoma Y (DYZ1)

1. Una muestra diploide femenina debe mostrar una señal de fluorescencia verde en el centrómero de cada cromosoma X en el 70-90% las células analizadas.

2. La sonda identifica sólo la proporción de células de donante y receptor en la s muestras de médula ósea de los receptores de un trasplante del sexo opuesto. No distingue entre células malignas y células normales.
3. La aneuploidía constitucional de los cromosomas sexuales en el paciente o en el donante complicará la enumeración de la señal y la interpretación de la prueba cuando la sonda se use para monitorizar después del trasplante a los pacientes sin emparejamiento sexual.

Ayuda al cliente

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

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

003/2010-06-28

DS#084/CE