



Instructions For Use

REF: LPE R/G



A range of human alpha and classical satellite probes specific for each chromosome directly labelled in either red or green fluorophore

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.

Introduction

Satellite probes are specific for human chromosomes; they are highly repeated human DNA sequences for the centromere, pericentromeric or heterochromatic block of each of the 24 chromosomes. The probes will enable the identification and enumeration of human chromosomes in interphase cells or metaphase chromosomes from peripheral blood samples. For detailed probe specifications refer to Table 1.

The probes are produced in a concentrated form to allow mixing, if required, of up to 3 probes in the same hybridisation, from Cytocell's range of concentrated Aquarius satellite probes. A final volume of 10 µl of probe solution is required per hybridisation.

This Aquarius kit contains only one of the probes from the range of directly labelled human alpha and classical satellite probes.

Material Provided

Probe: 15 µl per vial (5 tests)
Amount of satellite probe labelled with green fluorophore: minimum of 20 ng/test
Amount of satellite probe labelled with red fluorophore: minimum of 5 ng/test
The directly labelled probe is provided in hybridisation solution (Formamide; Dextran Sulphate; SSC). It is directly labelled with either a green (FITC spectrum) or a red fluorophore (Texas Red spectrum).

Hybridisation solution (Formamide; Dextran Sulphate; SSC) (150 µl per vial)

Counterstain : (150 µl per vial).

The counterstain is DAPI in 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 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 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 to 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 x63 or x100. The Triple bandpass filter DAPI/FITC/Texas Red is optimal for viewing all three probe fluorophores and DAPI simultaneously. For some samples and cells single bandpass filters for FITC, Texas Red or TRITC may be required to optimise signal viewing.

Sample Preparation

The kits are designed for use on cultured peripheral blood cells fixed in Carnoy's fixative and should be prepared according to the laboratory or institution guidelines. Prepare blood metaphase spreads on microscope slides according to standard cytogenetic procedures. Baking of slides is not recommended as it may reduce signal fluorescence.

FISH Protocol

Slide Preparation

- Spot cell sample onto cleaned microscope slide.
- 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.
- Allow to air dry.

Probe Preparation

- Remove probe and hybridisation solution from 620°C freezer and allow to warm to RT.
- Ensure both solutions are uniform by repeated pipette mixing.
- Using fresh pipette tips remove: final volume of 10 µl of probe solution.
- for a **single probe hybridisation**: 3 µl of probe and 7 µl of hybridisation solution per test
- for a **two probe hybridisation**: 3 µl of each probe and 4 µl of hybridisation solution per test
- for a **three probe hybridisation**: 3 µl of each probe and 1 µl of hybridisation solution per test

And place in a single microcentrifuge tube, gently vortex to mix and pulse spin in a microcentrifuge.

Denaturation

- Prewarm both sample slide and probe at 37°C (+/- 1°C) for 5 minutes.
- Place the 10µl of probe on the spotted area of the slide, carefully apply a 24mm x 24mm coverslip. Seal with rubber solution glue and allow to dry completely.
- Denature at 75°C (+/- 1°C) for 2 minutes.

Hybridisation

- Incubate for **1 hour to overnight** at 37°C (+/- 1°C) in a humid, lightproof container.

Post-Hybridisation Washes

- Remove coverslip and all traces of glue carefully.
- Wash slide in **0.25 x SSC** at 72°C (+/- 1°C) for 2 minutes without agitation*.
- Wash slide in 2 x SSC, 0.05% Tween 20 at RT, pH 7.0 for 30 seconds without agitation.

Counterstain

- Apply 10 µl of the DAPI antifade. Apply a coverslip and allow colour to develop in the dark for 10 minutes. View with a fluorescence microscope.

* If final signal is poor, repeat FISH using 0.4 x SSC post-hybridisation wash.

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 for a single probe hybridisation

There will be differences in the relative size of signals observed between chromosomes due to the difference in copy number of repeat sequences between chromosomes. The centromere signals for 4, 16, 19 and 20 are particularly small.

- Using one of the satellite probes for the chromosomes 1-12 and 15-20 (except 1/5/19 probe) a diploid sample should show a fluorescent signal at the centromere of both of the chromosomes of the corresponding chromosome in 70 to 90% of cells analysed.
- Using the probe for chromosomes 1/5/19 a diploid sample should show a fluorescent signal at the centromere of each chromosome for chromosomes 1, 5 and 19 in 70 to 90% of cells analysed.
- Using the probe for chromosomes 13/21 or 14/22 a diploid sample should show a fluorescent signal at the centromere of both of the chromosomes for chromosomes 13 and 21 or 14 and 22 in 70 to 90% of cells analysed.
- The chromosome 1 satellite III probe may show faint cross-hybridisation to the pericentromeric region of chromosome 9. This may be reduced when using a 0.25 x SSC stringent wash, compared to a 0.4 x SSC stringent wash.
- The chromosome 2 α-satellite probe may show faint cross-hybridisation to the centromere of an F group chromosome. This may be reduced when using a 0.25 x SSC stringent wash, compared to a 0.4 x SSC stringent wash.
- The chromosome 4 α-satellite probe may show faint cross-hybridisation to the centromeric region of a C group chromosome. This may be reduced when using a 0.25 x SSC stringent wash, compared to a 0.4 x SSC stringent wash.

Table 1 : Probe Specifications

Chr	Catalogue Number *	Locus	Chromosome Region	DNA Class	Probe brightness **
					Red/ Green
1 _a	LPE 01G/R	D1Z1	1q12	satellite III	3
2 ^b	LPE 02G/R	D2Z2	2p11.1-q11.1	α-satellite	3
3	LPE 03G/R	D3Z1	3p11.1-q11.1	α-satellite	3
4 ^c	LPE 04G/R	D4Z1	4p11-q11	α-satellite	2
1/5/19	LPE 05G/R	D1Z7 DSZ2 D19Z3	1p11.1-q11 5p11.1-q11.1 19p11-q11	α-satellite	3 2 1
6	LPE 06G/R	D6Z1	6p11.1-q11.1	α-satellite	3
7	LPE 07G/R	D7Z1	7p11.1-q11.1	α-satellite	3
8	LPE 08G/R	D8Z2	8p11.1-q11.1	α-satellite	3
9	LPE 09G/R	D9Z3	9q12	satellite III	3
10	LPE 10G/R	D10Z1	10p11.1-q11.1	α-satellite	3
11	LPE 11G/R	D11Z1	11p11.1-q11.1	α-satellite	3
12	LPE 12G/R	D12Z3	12p11.1-q11.1	α-satellite	3
13/21	LPE 13G/R	D13Z1 D21Z1	13p11.1-q11 21p11.1-q11.1	α-satellite	2-3
14/22	LPE 14G/R	D14Z1 D22Z1	14p11.1-q11.1 22p11.1-q11.1	α-satellite	3
15	LPE 15G/R	D15Z4	15p11.1-q11.1	α-satellite	3
16	LPE 16G/R	D16Z2	16p11.1-q11.1	α-satellite	1-2
17	LPE 17G/R	D17Z1	17p11.1-q11.1	α-satellite	3
18	LPE 18G/R	D18Z1	18p11.1-q11.1	α-satellite	3
20	LPE 20G/R	D20Z1	20p11.1-q11.1	α-satellite	1-2
X	LPE 0XG/R	DXZ1	Xp11.1-q11.1	α-satellite	2
Y	LPE 0YcG/R	DYZ3	Yp11.1-q11.1	α-satellite	2-3
Y	LPE 0YqG/R	DYZ1	Yq12	satellite III	2-3

* G specifies a green label, R specifies a red label.

** Probe brightness: 1. Signal visible with triple filter, but may need individual specific filters for accurate analysis. 2. Signal clearly visible with triple filter. 3. Very bright signal with triple filter.

a, b, c: See the "Expected Results" paragraph for further details.

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.

Introduction

Les sondes satellites sont spécifiques des chromosomes humains. Ce sont des séquences ADN hautement répétées localisées au niveau du centromère, des régions péracentromériques ou hétérochromatiques de chacun des 24 chromosomes. Les sondes permettront d'identifier et de compter les chromosomes humains sur des cellules en interfase ou des chromosomes en métaphase à partir d'échantillons de sang périphérique. Pour les caractéristiques des sondes, voir le tableau 1.

Les sondes sont fournies sous forme concentrée pour permettre le mélange, si nécessaire, de 3 sondes satellites de la gamme Aquarius lors d'une même hybridation. Un volume final de 10 µl de sonde est nécessaire par hybridation.

Le kit Aquarius contient seulement une sonde de la gamme de sondes alpha-satellites et satellites classiques directement marquées.

Conditionnement

Sonde: 15 µl par tube (5 tests)

Concentration de sonde satellite marquée avec un fluorochrome vert : minimum de 20 ng/test

Concentration de sonde satellite marquée avec un fluorochrome rouge : minimum de 5 ng/test

La sonde directement marquée est fournie dans la solution d'hybridation (formamide, sulfate de dextran, SSC). La sonde est directement marquée soit avec un fluorochrome rouge (spectre Texas Red) soit avec un fluorochrome vert (spectre FITC).

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

Contre-colorant: (150 µl par tube).

Le contre-colorant est le DAPI antifading (ES : 0,125 µg/ml DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole))

Avertissements et Précautions

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

Conservation

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.

Équipement nécessaire non fourni

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

Microscopes 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 et du DAPI simultanément. Pour certains échantillons cellulaires, les filtres simple bande FITC ou Texas Red peuvent être nécessaires pour une visualisation optimale du signal.

Préparation des échantillons

Le kit a été développé pour utilisation sur les cellules du sang périphérique cultivées et fixées avec du fixateur de 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. Cuire les lames nœst pas recommandé, ceci pouvant réduire l'intensité du signal.

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.
3. Déshydrater dans une série de bains éthanol (70%, 85% et 100%), 2 minutes dans chaque bain.
4. Laisser sécher.

Préparation de la sonde

1. Retirer la sonde et la solution d'hybridation du congélateur à -20°C et laisser préchauffer à température ambiante.
2. Bien homogénéiser la sonde et la solution d'hybridation en pipetant plusieurs fois.
3. En utilisant un nouveau cône, prélever : (un volume final de 10 µl de sonde est nécessaire)
 - pour l'hybridation d'une seule sonde : 3 µl de sonde et 7 µl de solution d'hybridation par test
 - pour l'hybridation de deux sondes : 3 µl de chaque sonde et 4 µl de solution d'hybridation par test
 - pour l'hybridation de trois sondes : 3 µl de chaque sonde et 1 µl de solution d'hybridation par test

Placer dans un tube à microcentrifugation, vortexer doucement puis centrifuger pendant 2-3 secondes.

Dénaturation

4. Préchauffer la lame échantillon et la sonde à 37°C (+/- 1°C) pendant 5 minutes.
5. Déposer 10 µl de sonde sur l'échantillon et couvrir avec une lamelle 24 mm x 24 mm. Sceller avec du ruber ciment et laisser sécher.
6. Dénaturer à 75°C (+/- 1°C) pendant 2 minutes.

Hybridation

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

Lavages post-hybridation

8. Retirer la lamelle et éliminer toutes traces de ruber ciment.
9. Laver la lame dans du tampon 0,25 x SSC (pH 7,0) à 72°C (+/- 1°C) pendant 2 minutes sans agitation*
10. Laver la lame dans du tampon 2 x SSC, 0,05% Tween-20 (pH 7,0) à température ambiante pendant 30 secondes sans agitation.

Contre-colorant

11. Déposer 10 µl de DAPI antifading. Couvrir avec une lamelle et laisser la coloration se développer dans l'obscurité pendant 10 minutes. Visualiser avec un microscope à fluorescence.

* Si le signal final est faible, refaire le FISH en utilisant un lavage post-hybridation à 0,4 x SSC.

Stabilité des lames

Les lames FISH sont analysables pendant un mois si elles sont conservées à l'obscurité et à l'abri de la température 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.

Interprétation des résultats pour l'hybridation d'une seule sonde

On peut observer des différences dans la taille relative des signaux entre les chromosomes. Ceci est dû à la différence du nombre de copies des séquences répétées entre les chromosomes. Les signaux pour les centromères 4, 16, 19 et 20 en particulier sont petits.

1. Pour les sondes satellites des chromosomes 1 à 12 et 15 à 20 (excepté la sonde 1/5/19), un échantillon diploïde présentera un signal fluorescent au niveau du centromère des 2 chromosomes homologues étudiés dans 70-90% des cellules analysées.
2. Pour la sonde 1/5/19, un échantillon diploïde présentera un signal fluorescent au niveau du centromère de chaque chromosome pour les chromosomes 1, 5 et 19 dans 70-90% des cellules analysées.
3. Pour les sondes 13/21 et 14/22, un échantillon diploïde présentera un signal fluorescent au niveau du centromère des 2 chromosomes pour les chromosomes 13 et 21 ou 14 et 22 dans 70-90% des cellules analysées.
4. La sonde satellite III du chromosome 1 peut avoir une faible hybridation croisée avec la région péracentromérique du chromosome 9. Ceci peut être réduit lorsqu'un lavage stringent à 0,25 x SSC est utilisé en comparaison avec un lavage à 0,4 x SSC.

5. La sonde alpha-satellite du chromosome 2 peut avoir une faible hybridation croisée avec le centromère des chromosomes du groupe F. Ceci peut être réduit lorsqu'un lavage stringent à 0,25 x SSC est utilisé en comparaison avec un lavage à 0,4 x SSC.
6. La sonde alpha-satellite du chromosome 4 peut avoir une faible hybridation croisée avec la région centromérique des chromosomes du groupe C. Ceci peut être réduit lorsqu'un lavage stringent à 0,25 x SSC est utilisé en comparaison avec un lavage à 0,4 x SSC.

Tableau 1 : Caractéristiques des sondes

- ** G : fluorochrome vert, R : fluorochrome rouge
- * Intensité du signal des sondes : 1. Signal visible avec un triple filtre, mais les filtres spécifiques peuvent être nécessaires pour une analyse précise. 2. Signal clairement visible avec un triple filtre. 3. Signal très lumineux avec un triple filtre.

a, b, c Voir le paragraphe "Interprétation des Résultats" pour de plus amples informations.

Support Client

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

ITALIANO

L'ibridazione *in situ* in fluorescenza (Fluorescence *In Situ* Hybridisation - FISH) è una tecnica che permette di rilevare sequenze di DNA su cromosomi in metafase o in nuclei in interfase di campioni citogenetici fissati, in coltura o non coltivati. La tecnica prevede l'utilizzo di sonde di DNA in grado di ibridare con l'intero cromosoma o con singole sequenze, e costituisce una 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 colorato con un colorante di contrasto. L'ibridazione della sonda viene infine analizzata con un microscopio a fluorescenza

Introduzione

Le sonde satellite sono specifiche per i cromosomi umani; sono costituite da sequenze di DNA altamente ripetute, complementari alle sequenze del centromero e del blocco pericentromerico o eterocromatico di ognuno dei 24 cromosomi. Le sonde permettono l'identificazione e la numerazione di cromosomi umani in cellule in interfase o in cromosomi in metafase di campioni di sangue periferico. Per ulteriori dettagli relativi alle specifiche delle sonde riferirsi alla tabella 1.

Le sonde sono prodotte in forma concentrata per permettere, se necessario, di miscelare fino a 3 sonde satellite Aquarius 6 (CytoCell) nel corso della stessa ibridazione. Per ogni ibridazione è necessario un volume finale pari a 10 µl di soluzione della sonda.

Il kit Aquarius contiene solo una delle sonde appartenenti alla gamma di sonde umane satellite, alfa e classiche, direttamente marcate.

Materiale fornito

Sonda: 15µl per provetta (5 test)

Quantità di sonda satellite marcata con fluorocromo verde: quantità minima 20 ng/test

Quantità di sonda satellite marcata con fluorocromo rosso: quantità minima 5 ng/test

La sonda è fornita nella soluzione di ibridazione (Formamide; Destrano solfato; SSC) ed è marcata direttamente con un fluorocromo verde (spettro FITC) o un fluorocromo rosso (spettro Texas Red)

Soluzione di ibridazione (Formamide; Destrano solfato; SSC) (150µl per provetta)

Colorante di contrasto : (150µl per provetta).

Il colorante di contrasto è il DAPI in antifade (ES: 0,1250µ g/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 cancerogena. 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 un 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 delle sonde ed il DAPI. Per alcuni campioni e cellule, per ottimizzare la visualizzazione del segnale, può essere necessario utilizzare filtri singoli specifici per il FITC, il Texas Red o TRITC.

Preparazione del campione

Il kit sono stati progettati 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. Preparare sospensioni dense di cellule ematiche in metafase sui vetrini campione seguendo le procedure standard di citogenetica. Evitare l'essiccamento del vetrino ad alte temperature in quanto ciò potrebbe ridurre la fluorescenza del segnale.

Protocollo

Preparazione del vetrino

1. Caricare il campione cellulare su un vetrino da microscopia pulito
2. Lavare il vetrino in SSC 2x per 2 minuti a temperatura ambiente (TA).
3. Disidratare in una serie di diluizioni di etanolo (70%, 80% e 95%), ognuna per 2 minuti
4. Lasciare asciugare il vetrino all'aria.

Preparazione della sonda

5. Rimuovere la sonda e la soluzione di ibridazione dal congelatore a -20°C e lasciarla riscaldare a temperatura ambiente (TA)
6. Accertarsi che entrambe le soluzioni siano uniformi pipettando ripetutamente
7. Utilizzando puntali monouso prelevare: un volume finale pari a 10µl di soluzione della sonda
 - per una **ibridazione con una singola sonda:** 3µl di sonda e 7µl di soluzione di ibridazione per test
 - per una **ibridazione con due sonde:** 3µl di ciascuna sonda e 4µl di soluzione di ibridazione per test
 - per una **ibridazione con tre sonde:** 3µl di ciascuna sonda e 1µl di soluzione di ibridazione per test

Inserire i 10µl di soluzione della sonda in una provetta da microcentrifuga, miscelare agitando delicatamente su un vortex e centrifugare brevemente in una microcentrifuga

Denaturazione

8. Pre-riscaldare sia il vetrino dei campioni che la sonda a 37°C (+/- 1°C) per 5 minuti
9. Caricare i 10µl di sonda sul vetrino e coprire con cura con un coprioggetto da 24mm x 24mm. Sigillare con soluzione collante gommosa e far asciugare completamente.
10. Denaturare a 75°C (+/- 1°C) per 2 minuti.

Ibridazione

11. Incubare da **1 ora a tutta la notte** a 37°C (+/- 1°C) in una camera umida, non permeabile alla luce
12. Lavaggi post-ibridazione
13. Rimuovere accuratamente il vetrino coprioggetto e tutte le tracce di colla
14. Lavare il vetrino in **SSC 0,25x** (pH 7,0) a 72°C (+/- 1°C) per 2 minuti senza agitazione*
14. Lavare il vetrino in SSC 2x, Tween 20 0,05% (pH 7,0) a TA per 30 secondi senza agitazione

Colorante di contrasto

15. Applicare 10µl di DAPI antifade. Coprire con un vetrino coprioggetto e lasciar sviluppare il colore al buio per 10 minuti. Analizzare con un microscopio a fluorescenza

* In caso di segnale debole ripetere la FISH utilizzando SSC 0,4x per i lavaggi post-ibridazione.

Stabilità dei vetrini finiti

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

Raccomandazioni per l'uso

1. Evitare l'essiccamento del vetrino ad alte temperature o un'altra forma di
2. 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.
3. 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.

Resultati attesi per una ibridazione con una singola sonda

Le differenze nell'intensità relativa dei segnali osservati tra i diversi cromosomi rispecchia la differenza nel numero di copie delle sequenze ripetute che esiste tra i cromosomi stessi. I segnali del centromero per i cromosomi 4, 16, 19 e 20 sono particolarmente deboli.

- Utilizzando una delle sonde satellite per i cromosomi dall'1 al 12 e dal 15 al 20 (eccetto la sonda 1/5/19) il 70-90% delle cellule analizzate di un campione diploide dovrebbe mostrare un segnale di fluorescenza a livello del centromero di entrambi i cromosomi, per ogni cromosoma corrispondente alla sonda utilizzata.
- Utilizzando la sonda per i cromosomi 1/5/19, il 70-90% delle cellule analizzate di un campione diploide dovrebbe mostrare un segnale di fluorescenza al livello del centromero di ognuno dei due cromosomi 1,5 e 19.
- Utilizzando la sonda per i cromosomi 13/21 o 14/22, il 70-90% delle cellule analizzate di un campione diploide dovrebbe mostrare un segnale di fluorescenza al livello del centromero di entrambi i cromosomi 13 e 21 o 14 e 22.
- La sonda satellite III specifica per il cromosoma 1 può mostrare una debole cross ibridazione con la regione pericentromerica del cromosoma 9. Tale reazione può essere ridotta effettuando un lavaggio più stringente (con SSC 0,25x al posto di SSC 0,4x).
- La sonda alfa satellite specifica per il cromosoma 2 può mostrare una debole cross ibridazione con il centromero di un cromosoma del gruppo F. Tale reazione può essere ridotta con un lavaggio più stringente (con SSC 0,25x al posto di SSC 0,4x).
- La sonda alfa satellite specifica per il cromosoma 4 può mostrare una debole cross ibridazione con la regione centromerica di un cromosoma del gruppo C. Tale reazione può essere ridotta con un lavaggio a diversa stringenza (con SSC 0,25x al posto di SSC 0,4x).

Assistenza clienti

Contattare l'Ufficio Commerciale e Vendita della Cytocell.

Tabella 1: Specifiche delle sonde

* G indica una marcatura verde, R indica una marcatura rossa.

** Luminosità della sonda: 1. Segnale visibile con filtro triplo, ma, per un'analisi accurata, potrebbero essere necessari filtri individuali specifici 2. Segnale chiaramente visibile con filtro triplo. 3. Segnale molto brillante con filtro triplo.

a, b, c: Per maggiori dettagli consultare il paragrafo "Resultati attesi".

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

Einführung

Satellitensonden sind spezifisch für menschliche Chromosomen. Sie sind hochrepetitive wiederholte menschliche DNA-Sequenzen für den zentromeren, perizentromeren, oder heterochromatischen Block jedes der 24 Chromosomen. Die Sonden ermöglichen die Identifizierung und Zählung von menschlichen Chromosomen in Interphasen-Zellen, oder Metaphasen-Chromosomen aus peripheren Blutproben. Für detaillierte Sondenspezifikationen siehe Tabelle 1.

Die Sonden werden als Konzentrat hergestellt um so, falls erforderlich, bis zu drei Sonden aus Cytocells Aquarius-Produktlinie konzentrierter Satellitensonden in der gleichen Hybridisierung mischen zu können. Pro Hybridisierung ist ein Endvolumen von 10µl erforderlich.

Dieses Aquarius-Kit enthält nur eine der Sonden aus der Produktreihe der direkt markierten humanen Alpha- und klassischen Satellitensonden.

Kitkomponenten

Sonde : 15µl pro Röhrchen (5 Tests)

Menge der mit grünem Fluorophor markierten Satellitensonde: mindestens 20 ng/Test

Menge der mit rotem Fluorophor markierten Satellitensonde: mindestens 5 ng/Test

Die direkt markierte Sonda wird in Hybridisierungslösung geliefert (Formamid, Dextransulfat, SSC). Sie ist entweder mit einem grünen (FITC) o Spektrum, oder einem roten (Texasrot-Spektrum) direkt markiert.

Hybridisierungslösung (Formamid, Dextransulfat, SSC) (150 µl pro Röhrchen).

Gegenfärbung : (150 µl pro Röhrchen).

Bei der Gegenfärbung handelt es sich um gegen Ausbleichen geschütztes (antifade) DAPI (ES: 0,125 µg/ml DAPI (4,6-Diamidino-2-Phenylindol)).

Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen

- Nur für die Verwendung in der *in vitro* Diagnostik. Nur für die professionelle Verwendung.
- Beim Umgang mit DNA-Sonden und der DAPI-Gegenfärbung Handschuhe tragen.
- Sonneneinstrahlung enthalten Formamid, das teratogen ist. Keine Dämpfe einatmen oder mit der Haut in Berührung bringen. Handschuhe und Labormantel tragen und unter einer Abzugshaube arbeiten. Bei der Entsorgung mit viel Wasser nachspülen.
- DAPI ist ein potentiell teratogenes. Vorsichtig damit umgehen, Handschuhe und Labormantel tragen. Bei der Entsorgung mit viel Wasser nachspülen.
- Alle Gefahrstoffe sollten gemäß den Richtlinien zur Gefahrstoffentsorgung Ihrer Einrichtung entsorgt werden.

Lagerung und Behandlung

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

Benötigte, aber nicht mitgelieferte Laborgeräte

- Heizplatte (mit stabiler Heizplatte und genauer Temperaturregelung bis 80°C)
- Mikropipetten mit variablem Volumen von 1 µl 6 200 µl
- Wasserbad mit genauer Temperaturkontrolle bei 72°C
- Mikro-Zentrifugenröhrchen (0,5 ml)
- Fluoreszenzmikroskop (siehe auch Empfehlungen zum Fluoreszenzmikroskop)
- Coplin-Färbetrog aus Kunststoff oder Glas
- Pinzette
- Fluoreszenzobjektiv-geeignetes Immersionsöl
- Tischzentrifuge

Empfehlungen zum Fluoreszenzmikroskop

Zur bestmöglichen Beobachtung der Probe empfehlen wir die Verwendung einer 100 Watt Quecksilberdampflampe und von Plan Achromat Objektiven 63-facher oder 100-facher Vergrößerung. Ein Dreifach-Bandpassfilter DAPI/FITC/Texasrot ist für die simultane Beobachtung von Sondenfluoreszenz und DAPI-Gegenfärbung optimal geeignet. Bei manchen Proben und Zellen können für die optimale Signalbeobachtung Einfach-Bandpassfilter für FITC, Texasrot, oder TRITC sein.

Probenvorbereitung

Das 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. Präparieren Sie mit zytogenetischen Standardmethoden Metaphasen-Spreitungspräparate. Erhitzen der Objektträger wird nicht empfohlen da dies zu einer Verminderung der Signalfluoreszenz führen kann.

FISH-Protokoll

Vorbereitung des Objektträgers

- Zellprobe auf den gereinigten Objektträger auftropfen
- Objektträger für 2 Minuten in 2 x SSC bei Raumtemperatur (RT) waschen.
- Entwässern in Alkoholreihe (70%, 85% und 100%), jeweils für 2 Min.
- An der Luft trocknen lassen
- Vorbereiten der Sonda
 - Nehmen Sie die Sonda und die Hybridisierungslösung aus dem 620°C Gefrierschrank und lassen Sie diese sich auf Zimmertemperatur aufwärmen.
 - Durch wiederholtes Mischen in der Pipette sicherstellen, dass beide Lösungen homogen gemischt sind
 - Mit frischen Pipettenspitzen entnehmen: Endmenge von 10 µl Sondenlösung
 - für eine **Einzelsondenhybridisierung**: 3 µl Sonden- und 7 µl Hybridisierungslösung pro Test
 - für eine **Zwei-Sondenhybridisierung**: jeweils 3 µl Sonden- und 4 µl Hybridisierungslösung pro Test
 - für eine **Drei-Sondenhybridisierung**: jeweils 3 µl Sonden- und 1 µl Hybridisierungslösung pro Test
 - Entnehmen und in ein einziges Mikrozentrifugenröhrchen geben, vorsichtig durchmischen (Vortex) und kurz zentrifugieren
- Denaturierung
 - Objektträger mit Probe und auch die Sonda bei 37°C (+/- 1°C) für 5 Minuten vorwärmen.
 - 10 µl Sondenlösung auf die Zellaufragsstelle auf dem Objektträger geben und vorsichtig mit einem 24 x 24mm Deckgläschen abdecken. Mit Gummikleber-Lösung versiegeln und vollständig trocknen lassen.
- Bei 75°C (+/- 1°C) 2 Minuten lang denaturieren
- Hybridisierung
 - 1 Stunde lang, oder über Nacht** bei 37°C (+/- 1°C) in einer feuchten, lichtdichten Kammer inkubieren. Waschen nach der Hybridisierung
 - Deckgläschen und alle Kleberspuren vorsichtig entfernen

- Objektträger 2 Minuten in 0,25 x SSC bei 72°C (+/- 1°C), pH 7,0, ohne schütteln waschen*
- Objektträger 30 Sekunden in 2 x SSC, 0,05% Tween 20 bei RT, pH 7,0, ohne schütteln waschen. Gegenfärben
- 10µl DAPI Antifade hinzugeben. Mit Deckgläschen abdecken und zur Farbentwicklung 10 Minuten im Dunkeln lagern. Unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachten
 - Wenn das resultierende Signal schwach ist, FISH wiederholen, nach der Hybridisierung mit 0,4 x SSC waschen.

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

- Es wird dringend empfohlen, zur Temperaturmessung von Lösungen, Wasserbädern und Inkubatoren ein geeichtes Thermometer zu verwenden, da diese Temperaturen für die optimale Leistung des Produkts ausschlaggebend sind.
- Die Konzentrationen der Waschlösungen (Stringenz), pH und Temperatur sind wichtig, da niedrig stringente Bedingungen zu nicht-spezifischer Bindung der Sonde führen kann und zu hohe Stringenz zum Verlust des Signals.

Erwartete Ergebnisse für eine Einzelsondenhybridisierung

Aufgrund des Unterschieds in der Kopienanzahl der repetitiven Sequenzen wird es zwischen Chromosomen Unterschiede bei der relativen Stärke der beobachteten Signale geben. Die Zentromer-Signale für 4, 16, 19 und 20 sind besonders klein.

- Bei Verwendung einer der Satellitensonden für die Chromosome 1-12 und 15-20 (ausgenommen bei der 1/5/19 Sonda) sollte eine diploide Probe bei 70-90% der analysierten Zellen ein Fluoreszenzsignal am Zentromer des entsprechenden Chromosoms an beiden Chromosomen zeigen.
- Wird die Sonda für die Chromosomen 1/5/19 verwendet, sollte eine diploide Probe bei 70-90% der analysierten Zellen am Zentromer jedes Chromosoms bei den Chromosomen 1,5 und 19 ein Fluoreszenzsignal zeigen.
- Wird die Sonda für die Chromosomen 13/21, oder 14/22 verwendet, sollte eine diploide Probe bei 70-90% der analysierten Zellen am Zentromer beider Chromosomen für die Chromosome 13 und 21, oder 14 und 22 ein Fluoreszenzsignal zeigen.
- Die Chromosom 1 Satelliten-III-Sonde kann mit der Perizentromer-Region von Chromosom 9 eine schwache Kreuzhybridisierung aufweisen. Das kann durch einen Waschschritt mit 0,25 x SSC unter stringenten Bedingungen statt durch Waschen mit 0,4 x SSC unter stringenten Bedingungen reduziert werden.
- Die Chromosom 2 α-Satellitensonde kann mit dem Zentromer eines F-Gruppen-Chromosoms eine schwache Kreuzhybridisierung zeigen. Das kann durch einen Waschschritt mit 0,25 x SSC unter stringenten Bedingungen statt durch Waschen mit 0,4 x SSC unter stringenten Bedingungen reduziert werden.
- Die Chromosom 4 α-Satellitensonde kann mit der Zentromerregion eines C-Gruppen-Chromosoms eine schwache Kreuzhybridisierung zeigen. Das kann durch einen Waschschritt mit 0,25 x SSC unter stringenten Bedingungen statt durch Waschen mit 0,4 x SSC unter stringenten Bedingungen reduziert werden.
- Die Sonden werden keine anlagebedingten oder erworbene strukturelle Chromosomenaberrationen entdecken.
- Die Interpretation der FISH-Ergebnisse sollte unter Anwendung anerkannter zytogenetischer Analysemethoden in Verbindung mit entsprechenden Kontrollen, erfolgen. Auch sollten die Anamnese des Patienten und andere klinische Befunde miteinbezogen werden.

Kundendienst

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

Tabelle 1: Sondenspezifikationen

* G bedeutet eine grüne Markierung, R bedeutet eine rote Markierung.

** Sondenhelligkeit: 1. Signal mit Dreifach-Filter sichtbar, es können aber individuelle spezifische Filter für die genaue Analyse benötigt werden. 2. Signal mit Dreifach-Filter klar sichtbar. 3. Sehr helles Signal mit Dreifach-Filter.

a, b, c: Für weitere Einzelheiten s. Abschnitt "Erwartete Ergebnisse".

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.

Introducción

Las sondas satélite son secuencias de ADN humano altamente repetidas complementarias de los bloques centromérico, pericentromérico o heterocromático específicos para cada uno de los 24 cromosomas. Estas sondas permiten identificar y enumerar los cromosomas humanos en células de muestras de sangre periférica en interfase o metafase. Las especificaciones detalladas de cada sonda se incluyen en la tabla 1.

Las sondas se producen en forma concentrada para permitir la mezcla, si es preciso, de hasta tres sondas en la misma hibridación, a partir de la gama de sondas satélite concentradas Aquarius de Cytocell. Cada hibridación requiere un volumen final de 10 µl de solución sonda.

Cada kit Aquarius contiene sólo una de las sondas de la gama de sondas centroméricas marcadas directamente.

Material Proporcionado

Sonda: 15µl por vial (5 reacciones)

Cantidad de sonda satélite marcada con fluorocromo verde: mínimo de 20 ng/reacción

Cantidad de sonda satélite marcada con fluorocromo rojo: mínimo de 5 ng/reacción

La sonda se proporciona mezclada previamente y lista para utilizar en la solución de hibridación (Formamida; dextrán sulfato; SSC). Está directamente marcada en fluorocromo verde (FITC), con fluorocromo rojo (Texas Red).

Solución de hibridación (formamida, dextrano sulfato, SSC) (150 µl por vial).

Contraste : (150µl por vial).

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 el contraste DAPI.
- La solución de hibridación contiene formamida, que es una sustancia tóxica. No inhale gases ni permita el contacto con la piel. Lleve guantes, bata de laboratorio y realice la manipulación con campana extractora. Al eliminarla, rociar con gran cantidad de agua.
- La DAPI puede producir cáncer. Manipule con cuidado; utilice 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 (0,5 ml)
- Microscopio de fluorescencia (Lea la sección Recomendaciones para el microscopio de fluorescencia)
- Recipientes de cristal o de plástico
- Pinzas
- Microscopio de fluorescencia con objetivo de inmersión en aceite
- Centrífuga

Recomendación 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. En algunas muestras y células puede ser necesario utilizar filtros de banda sencilla para FITC, rojo Texas o TRITC y Agua, para optimizar la visión de la señal.

Preparación de la muestra

El kit está diseñado para su uso con células sanguíneas periféricas cultivadas y fijadas en Carnoy que debe prepararse de acuerdo con las instrucciones del laboratorio o de la institución. Preparar las extensiones de sangre cultivada en los portaobjetos del microscopio según los procedimientos citogenéticos estándar. No se recomienda calentar los portaobjetos ya que esto podría reducir la señal de fluorescencia.

Protocolo FISH

Preparación del portaobjetos

1. Extienda la suspensión celular de la muestra en un portaobjetos limpio del microscopio
2. Lavar el porta en 2 x SSC durante 2 minutos a temperatura ambiente.
3. Deshidrate en una serie de etanol (70%, 85% y 100%), 2 minutos en cada uno
4. Secar al aire

Preparación de la sonda

5. Saque la sonda del congelador a -20°C y deje que se caliente a TA
 6. Asegúrese de que la solución de la sonda es uniforme mezclando varias veces con la pipeta
 7. Con una punta de pipeta nueva extraiga: un volumen final de 10 µl de solución de sonda
 - para una **hibridación con una sonda** : 3 µl de solución de sonda y 7 µl de solución de hibridación por reacción
 - para una **hibridación con dos sondas** : 3 µl de solución de sonda y 4 µl de solución de hibridación por reacción
 - para una **hibridación con tres sondas** : 3 µl de solución de sonda y 1 µl de solución de hibridación por reacción
- Y colóquelo en un único tubo de microcentrífuga, girar suavemente para mezclar y efectuar pulsos de giro en la microcentrífuga.

Desnaturalización

8. Precaliente el portaobjetos de la muestra y la sonda a 37°C (+/- 1°C) durante 5 minutos
9. Ponga 10µl de sonda sobre el portaobjetos y aplique cuidadosamente el cubreobjetos de 24mm x 24mm. Selle con solución de goma y deje secar completamente

10. Desnaturalice a 75°C (+/- 1°C) durante 2 minutos

Hibridación

11. **Hibride el portaobjetos durante la noche** en un contenedor húmedo y hermético a 37°C (+/- 1°C)

Baños posthibridación

12. Quite el cubreobjetos y los restos de goma cuidadosamente
13. Lave el portaobjetos en **0.25 x SSC** a 72°C (+/- 1°C) pH 7.0 durante dos minutos sin agitar*
14. Lave el portaobjetos en 2 x SSC, 0.05% Tween 20 a TA, pH 7.0 durante 30 segundos sin agitar

Contraintención

15. Aplique 10µl del DAPI Antifade. Cubra con el cubreobjetos y deje la preparación en la oscuridad durante 10 minutos. Obsérvelo con el microscopio de fluorescencia

* **Si la señal final es mala, repita la FISH usando un lavado posthibridación de 0.4 x SSC.**

Estabilidad de los portaobjetos terminados

Los portaobjetos objeto de FISH permanecen analizables durante 1 mes si se han almacenado en la oscuridad o 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 una baja estrictencia 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 para la hibridación de sonda sencilla

Habrà diferencias en el tamaño relativo de las señales observadas entre los cromosomas debido a la diferencia en el número de copias de secuencias repetidas entre cromosomas. Las señales de los centrómeros de 4, 16, 19 y 20 son particularmente pequeñas.

1. Con una de las sondas satélite para los cromosomas 1-12 y 15-20 (salvo la sonda 1/5/19) una muestra diploide debe mostrar una señal fluorescente en el centrómero de cada uno de los cromosomas correspondientes en el 70% - 90% de las células analizadas.
2. Con la sonda de cromosomas 1/5/19 una muestra diploide debe mostrar una señal fluorescente en el centrómero de cada cromosoma para los cromosomas 1, 5 y 19 en en 70% - 90% de las células analizadas.
3. Con la sonda de los cromosomas 13/21 ó 14/22 una muestra diploide debe mostrar una señal fluorescente en el centrómero de cada cromosoma para los cromosomas 13 y 21 ó 14 y 22 en en 70% - 90% de las células analizadas
4. La sonda satélite III del cromosoma 1 puede mostrar una hibridación cruzada tenue en la región pericentromérica del cromosoma 9. Esto puede reducirse si se utiliza un lavado de estrictencia con 0.4 x SSC.
5. La sonda satélite del cromosoma 2 puede mostrar una hibridación cruzada tenue en el centrómero de un cromosoma del grupo F. Esto puede reducirse si se utiliza un lavado concienzudo con 0.25 x SSC, comparado con un lavado concienzudo con 0.4 x SSC.
6. La sonda á-satélite del cromosoma 4 puede mostrar una hibridación cruzada tenue en la región centromérica de un cromosoma del grupo C. Esto puede reducirse si se utiliza un lavado concienzudo con 0.25 x SSC, comparado con un lavado concienzudo con 0.4 x SSC.

Ayuda al cliente

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

Tabla 1 : Especificaciones de las sondas

- * G indica etiqueta verde, R indica etiqueta roja.
 ** Brillo de la sonda : 1. Señal visible con filtro triple, pero puede necesitar filtros específicos individuales para un análisis exacto. 2. Señal claramente visible con filtro triple. 3. Señal muy brillante con filtro triple.

a, b, c: Ver detalles en el párrafo "Resultados esperados".

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