



Instructions For Use

REF: LPE NOR

Acro-P-Arm (Acrocentric chromosome p arms)



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

The NOR (Nucleolar Organizer Regions) probe is specific for acrocentric chromosome p arms. It is designed for fluorescence *in situ* hybridisation to metaphase chromosomes from fixed cultured peripheral blood cells.

NORs are a chromosomal region around which the nucleoli develop at the end of mitosis¹. The region contains several tandem copies of ribosomal RNA genes (5.8S, 18S, and 28S) clustered on the short arms of the acrocentric chromosomes 13, 14, 15, 21 and 22^{2,3}.

A NOR can translocate to a terminal region of another chromosome. In rare instances this can be pathogenic, particularly when the translocation has led to a deletion at the tip of recipient chromosome⁴.

The NORs show a high degree of variations in size and staining pattern. If the region is not translated conventional silver staining will not stain the NOR. However, FISH is able to overcome this problem and acrocentric chromosomes can be accurately confirmed⁵.

Materials Provided

Probe: 100 µl per vial (10 tests)

Amount of Acro-P probe labelled with red fluorophore: 20-25 ng/test

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

Counterstain: 150 µl per vial (15 tests)

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

Warnings and Precautions

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

Storage and Handling

The Aquarius kit should be stored at -20°C until the expiry date indicated on the kit label. The probe and counterstain vials must be stored in the dark.

Equipment Necessary but not Supplied

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

Fluorescence Microscope Recommendation

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

Sample Preparation

The 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.

Prepare air dried samples on microscope slides according to standard cytogenetic procedures.

FISH Protocol

Slide preparation

1. Spot cell sample onto microscope glass slide. Allow to dry.
2. Wash slide in 2 x SSC for 2 minutes at room temperature (RT).

3. Dehydrate in an ethanol series (70%, 85% and 100%), each for 2 mins at RT. Allow to dry.
- Pre-Denaturation
4. Remove probe from -20°C freezer and allow to warm to RT.
5. Ensure probe solution is uniform by repeated gentle, pipette mixing.
6. Remove 10µl of probe per test, place in a microcentrifuge tube. Return remaining probe to -20°C.
7. Place probe, sample slide to prewarm on a 37°C (+/- 1°C) hotplate for 10 mins.
8. Spot 10µl probe mixture onto the cell sample and carefully apply coverslip. Seal with rubber solution glue and allow to dry completely.

Denaturation

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

Hybridisation

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

Post-Hybridisation Washes

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

Expected results: up to ten signals which vary in size.

Stability of Finished Slides

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

Procedural Recommendations

1. 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.
2. The wash concentrations (stringency), pH and temperature are important, as low stringency can result in non-specific binding of the probe and too high stringency can result in a lack of signal.

Customer Support

Please contact the Cytocell Sales and Marketing Department by telephone or e-mail.

probes@cytocell.com

FRANÇAIS

L'hybridation *in situ* par fluorescence (FISH) est une technique qui permet de détecter des séquences ADN sur les chromosomes en métaphase ou sur les noyaux interphasiques de cellules cytogénétiques fixés cultivés ou non cultivés. La technique utilise des sondes ADN qui s'hybrident aux chromosomes entiers ou à des séquences spécifiques, et sert de test complémentaire à la cytogénétique classique. L'ADN cible, après fixation, est traité par la chaleur et à la formamide pour dénaturer la double hélice, la rendant simple hélice. L'ADN cible est alors disponible pour hybridation avec une sonde ADN complémentaire simple brin, dénaturée de la même manière et marquée avec un fluorochrome. Après hybridation, l'ADN non hybridé et l'ADN non lié spécifiquement sont éliminés par une série de lavages stringents et l'ADN est ensuite contre-coloré. Un microscope à fluorescence permet ensuite la visualisation de la sonde hybridée sur l'ADN cible.

Caractéristiques de la sonde

La sonde NOR (région de l'organisateur nucléolaire) est spécifique des bras courts (p) des chromosomes acrocentriques. Elle est spécialement conçue pour l'hybridation *in situ* par fluorescence (FISH) sur les chromosomes en métaphase des cellules de sang périphérique cultivées et fixées.

Les NOR sont les régions chromosomiques autour desquelles les nucléoles se réorganisent à la fin du cycle mitotique¹.

Chaque région contient plusieurs copies en tandem des gènes codant pour les ARN ribosomiques (5.8S, 18S et 28S) localisées sur les bras courts des chromosomes acrocentriques 13, 14, 15, 21 et 22^{2,3}. Une région NOR peut présenter une translocation sur une région terminale d'un autre chromosome. Dans de rares cas, cette translocation peut être pathogène, notamment lorsque la translocation s'accompagne d'une délétion terminale sur le chromosome receveur⁴.

Les régions NOR sont très variables en taille et en pattern de coloration. Si la région n'est pas transloquée, une coloration argentique classique ne marquera pas la zone NOR. Par contre, la technique FISH est capable de contrevenir à ce problème, permettant ainsi de confirmer de façon fiable l'intégrité des chromosomes acrocentriques⁵.

Conditionnement

Sonde : 100 µl par tube (10 tests)

Concentration de sonde marquée avec un fluorochrome rouge : 20-25 ng/test

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

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

Le contre-colorant est le DAPI antifading (ES : 0.125 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 précaution. Porter des gants et une blouse de laboratoire. Après élimination, rincer abondamment avec de l'eau.
5. Toutes matières dangereuses doivent être éliminées selon les réglementations en vigueur dans votre institution pour l'élimination des déchets dangereux.

Conservation et manipulation

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

Équipement nécessaire non fourni

- a) Plaque chauffante (avec bloc et contrôle de la température jusqu'à 80°C)
- b) Micropipettes 1 µl - 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 Microscope et filtres)
- f) Jars en plastique ou en verre
- g) Forceps
- h) Huile à immersion pour microscope à fluorescence
- i) Centrifugeuse de paillasse

Microscope et filtres

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

Préparation des échantillons

Le kit a été développé pour utilisation sur les cellules du sang périphérique ou de moelle osseuse cultivées et fixées avec du fixateur Carnoy et doivent être préparées selon les protocoles en vigueur dans le laboratoire ou institution. Préparer les lames de microscope avec les échantillons séchés à l'air selon les procédures standard de cytogénétique.

Protocole FISH

Préparation de la lame échantillon

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

Pré-dénaturation

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

Dénaturation

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

Hybridation

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

Lavages post-hybridation

- Retirer la lamelle et éliminer toutes traces de rubber cément.
- Laver la lame dans du tampon 0,4 x SSC (pH 7,0) à 72°C (+/- 1°C) pendant 2 minutes.
- Égoutter la lame et laver dans du tampon 2 x SSC, 0,05% Tween-20 (pH 7,0) à température ambiante pendant 30 secondes.
- Égoutter la lame et 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.

Résultat attendu : sur une métaphase normale, jusqu'à dix spots rouges de taille variable.

Stabilité des lames

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

Recommandations

- L'utilisation d'un thermomètre calibré est fortement recommandée pour mesurer les températures des solutions, bains-marie et incubateurs. Ces températures sont essentielles pour une efficacité optimale du produit.
- Les concentrations des lavages (stringence), pH et température sont importants. Une faible stringence peut résulter en une liaison non-spécifique de la sonde et une trop forte stringence peut résulter en une perte de signal.

Support Client

Veuillez contacter Cytocell, Département Ventes/Marketing ou votre agent local.

ITALIANO

L'ibridazione *in situ* in fluorescenza (Fluorescence *In Situ* Hybridisation - FISH) è una tecnica che permette di rilevare sequenze di DNA su cromosomi in metafase o in nuclei in interfase di campioni citogenetici fissati, o in coltura dopo prelievo. La tecnica prevede l'utilizzo di sonde di DNA in grado di ibridare con l'intero cromosoma o con singole sequenze. La FISH costituisce quindi un potente strumento in aggiunta alle tecniche citogenetiche classiche. Il DNA bersaglio, dopo la fissazione, è sottoposto a denaturazione al calore in presenza di formamide. Il DNA bersaglio è così disponibile per l'annealing con una sonda di DNA a singola elica a sequenza complementare, marcata con una sostanza fluorescente. Terminata l'ibridazione, la sonda di DNA non legata o legata in modo non specifico, è rimossa per mezzo di lavaggi stringenti ed il DNA è in seguito colorato con un colorante di contrasto. L'ibridazione della sonda viene infine analizzata con un microscopio a fluorescenza.

Specifiche della sonda

NOR (Organizzatore delle Regioni Nucleolari), sonda specifica per il braccio p dei cromosomi acrocentrici. La sonda è stata progettata per effettuare ibridazione in situ di cromosomi in metafase da colture fissate di cellule del sangue periferico.

NORs è una regione cromosomica attorno alla quale i nucleoli si sviluppano alla fine della mitosi¹. Nella regione si trovano parecchie copie in tandem di geni codificanti RNA ribosomiale (5.8S, 18S e 28S), raggruppati sui bracci corti dei cromosomi acrocentrici 13, 14, 15, 21 e 22^{2,3}.

Possono verificarsi traslocazioni della regione NOR con la regione terminale di un altro cromosoma. In rari casi questo evento può risultare patogenico, in particolare quando la traslocazione porta ad una delezione dell'estremità relativa al cromosoma ricevente⁴.

NOR mostrano un elevato grado di variabilità in termini di dimensione e di colorazione. Se la regione non è tradotta, la colorazione in argento convenzionalmente utilizzata non marca la regione NOR. Tuttavia, la FISH è in grado di ovviare a questo problema e i cromosomi acrocentrici possono essere accuratamente confermati⁵.

Materiali forniti

Sonda: 100µl per provetta (10 test)

Quantità di probe marcata con fluorocromo rosso: 20-25 ng/test

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

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

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

Avvertenze e misure precauzionali

- Per uso diagnostico *in vitro*. Per uso professionale.
- Quando si manipolano le sonde ed il colorante di contrasto DAPI è necessario indossare i guanti.
- Le miscele di sonda contengono formamide, una sostanza teratogena. Non respirare i fumi ed evitare il contatto con la pelle. Indossare guanti, camicia da laboratorio e maneggiare in una cappa aspirante. Per lo smaltimento, lavare con grandi quantità di acqua.
- Il DAPI è un potenziale cancerogeno. Maneggiare con cura, indossare guanti ed un camicia da laboratorio. Per lo smaltimento, lavare con grandi quantità di acqua.
- Eseguire lo smaltimento dei materiali pericolosi nel rispetto delle normative interne dell'istituzione relative allo smaltimento dei residui tossici.

Conservazione e utilizzo

Conservare il kit Aquarius a 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

- Piastra riscaldante (con - un controllo accurato della temperatura fino a 80°C).
- Micropipette a volume variabile compreso tra 1µl e 200µl.
- Bagno termostato con controllo accurato della temperatura a 72°C.
- Provette da microcentrifuga (0,5 ml)
- Microscopio a fluorescenza (riferirsi alla sezione Configurazione ottimale del microscopio e dei filtri)
- Contenitori di Coplin in plastica o vetro.
- Pinzette.
- Olio per lenti ad immersione del microscopio a fluorescenza.
- 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 i fluorofori contemporaneamente.

Il kit è stato progettato per l'utilizzo con cellule del sangue periferico coltivate o cellule di midollo osseo coltivate, fissate nel fissativo di Carnoy e preparate secondo le linee guida del laboratorio o dell'istituzione. Stendere i campioni da analizzare su vetrini da microscopia secondo le procedure citogenetiche standard.

Protocollo

Preparazione del vetrino

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

Pre-denaturazione

- Rimuovere la sonda dal congelatore a -20°C e lasciarla riscaldare a TA
- Accertarsi che la soluzione della sonda sia uniforme pipettando ripetutamente con delicatezza

- Pipettare 10µl di sonda per test ed inserirli in una provetta da microcentrifuga. Riporre la sonda non utilizzata a -20°C.
- Pre-riscaldare la sonda, il vetrino ed il coprioggetto su una piastra riscaldante a 37°C (+/- 1°C) per 10 minuti

- Caricare 10µl di miscela della sonda sul campione cellulare e coprire delicatamente con il coprioggetto. Sigillare con soluzione collante gommosa e far asciugare completamente

Denaturazione

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

Ibridazione

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

Lavaggi post-ibridazione

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

Risultati attesi: Fino 10 segnali che variano in dimensioni.

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

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

Assistenza clienti

Contattare l'Ufficio Commerciale e Vendita della Cytocell.

DEUTSCH

Die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) ist eine Technik, mit der DNA-Sequenzen auf Metaphase-Chromosomen oder Interphase-Kernen bei fixierten Kulturen oder nicht in Kultur gezeichneten 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.

Sonde spezifikation

Die NOR (Nucleolar Organizer Regions) Sonde ist spezifisch für die P-Arme akrozentrischer Chromosomen. Sie wurde für die Fluoreszenz-*in situ* Hybridisierung (FISH) von Metaphase-Chromosomen fixierter peripherer Blutzellen aus Kultur entwickelt.

NORs sind chromosomale Regionen, um die sich am Ende der Mitose die Nukleoli entwickeln¹. Diese Region enthält mehrere Tandemwiederholungen ribosomaler RNA Gene (5.8S, 18S und 28S), die gebündelt auf dem kurzen Arm der akrozentrischen Chromosomen 13, 14, 15, 21 und 22^{2,3} vorkommen.

Eine NOR kann auf eine terminale Region anderer Chromosomen translozieren. In seltenen Fällen kann dieses Ereignis pathologisch sein, insbesondere dann, wenn die Translokation zu einer Deletion im Endbereich des Empfänger-Chromosoms führt⁴.

NORs zeigen ein hohes Maß an Variationen in Größe und Färbemuster. Wenn die Region nicht translatiert wird, dann ist die NOR durch konventionelle Silberfärbung nicht anfärbbar. Dieses Problem kann durch FISH gelöst und akrozentrische Chromosomen damit verlässlich nachgewiesen werden.⁵

Kitkomponenten

Sonde: 100µl pro Röhrchen (10 Tests)

Menge Sonde der mit rotem Fluorophor markierten: 20-25 ng/Test

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

Gegenfärbung: 150µl pro Röhrchen (15 Tests)

Die Gegenfärbung besteht aus DAPI antifade (ES: 0,125µg/ml DAPI (4,6-Diamidino-2-Phenylindol)).

Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen

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

Lagerung und Behandlung

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

Benötigte, aber nicht mitgelieferte Laborgeräte

- 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.
- Für Fluoreszenzobjektive geeignetes Immersionsöl.
- 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 Fluorophore optimal geeignet.

Probenvorbereitung

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

FISH-Protokoll

Vorbereitung des Objektträgers

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

Vordenaturierung

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

Denaturierung

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

Hybridisierung

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

Waschen nach der Hybridisierung

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

Erwartetes Ergebnis: Bis zu 10 Signale, die in Ihrer Stärke variieren.

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.

Kundendienst

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

ESPAÑOL

La hibridación *in situ* fluorescente (FISH) es una técnica que permite detectar secuencias de ADN en cromosomas metafásicos o núcleos interfásicos en muestras citogenéticas cultivadas o no cultivadas y fijadas. En la técnica se utiliza una sonda de ADN que hibridiza los cromosomas completos o las secuencias únicas simples y es un componente útil para la citogenética clásica. Después de la fijación, el ADN diana se trata con calor y formamida para desnaturar el ADN bicatenario haciendo que resulte monocatenario. El ADN diana queda entonces disponible para hibridarlo con una sonda de ADN igualmente desnaturado, monocatenario marcado con fluorescencia que tiene una secuencia complementaria. Después de la hibridación la sonda de ADN no específicamente hibridada y no hibridada se elimina tras varios lavados y se aplica un contraste al ADN para su visualización. El uso de un microscopio de fluorescencia permite la visualización de la sonda hibridada en el material utilizado.

Especificaciones de la sonda

La sonda NOR (Nucleolar Organizer Regions) es específica para los brazos p de cromosomas acrocentricos. Esta diseñada para FISH (Fluorescent in situ Hybridisation) en células en metafase a partir de muestras de sangre fijadas.

NORs son regiones cromosómicas alrededor de las cuales el nucleolo se desarrolla al final de la mitosis¹. Esta región contiene numerosas copias en tandem de genes de RNA ribosómico (5.8S, 18S y 28S) agrupados en los brazos cortos de los cromosomas acrocentricos 13, 14, 15, 21 y 22^{2,3}.

Una región NOR puede trasladarse a una región terminal de otro cromosoma. En raros casos esta traslocación puede ser patogénica, sin embargo esta traslocación puede conllevar pérdida de la parte terminal del cromosoma receptor.⁴ Las regiones NOR presentan alto número de variaciones en tamaño y patrón de tinción. Si la región no se transcribe, la tinción tradicional con plata no teñirá estas regiones. Con la sonda FISH que se presenta, se podrá solucionar este problema y podrán detectarse con precisión.⁵

Material proporcionado

Sonda: 100µl por vial (10 reacciones)

Cantidad de sonda marcada con fluorocromo rojo: 20-25 ng/reacción

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

Contraste: 150µl por vial (15 reacciones)

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

Avisos y precauciones

1. Para diagnóstico *in vitro*. Sólo para uso profesional.
2. Utilizar guantes al manipular las sondas de ADN y la contratinción DAPI. La solución de hibridación contiene formamida, que es teratogénica; no respire los vapores y evite el contacto con la piel. Manipular con cuidado; utilizar guantes y bata de laboratorio. Al eliminarla, rociar con gran cantidad de agua.
3. El DAPI y PI puede producir cáncer. Manipular con cuidado; utilizar guantes y bata de laboratorio. Al eliminarla, rociar con gran cantidad de agua.
4. Las sustancias peligrosas deben eliminarse de acuerdo con las instrucciones de su institución en relación con la eliminación de sustancias peligrosas.

Almacenamiento y manejo

El kit Aquarius debe almacenarse a -20°C hasta la fecha de caducidad que se indica en la etiqueta del kit. Los viales de contraste y de sonda deben almacenarse en un lugar oscuro.

Equipo necesarios pero no proporcionados

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

Recomendaciones para el microscopio de fluorescencia

Para una visualización óptima de la sonda, se recomienda utilizar una lámpara de mercurio de 100 vatios y objetivos x63 o x100 Plan-Apochromat. El filtro de triple banda DAPI/FTTC/Texas Red es óptimo para ver simultáneamente los fluorocromos.

Preparación de la muestra

El kit está diseñado para su uso en células sanguíneas periféricas cultivadas y fijadas o en células de médula ósea cultivadas y fijadas en fijador de Carnoy, y deben prepararse de acuerdo con las instrucciones del laboratorio o la institución.

Prepare extensiones celulares sobre portaobjetos para microscopio de acuerdo con los procedimientos generales utilizados en citogenética.

Protocolo FISH

Preparación del portaobjetos

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

Antes de la desnaturalización

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

Desnaturalización

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

Hibridación

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

Baños posthibridación

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

Resultados esperados: Hasta 10 señales de diverso tamaño.

Estabilidad de los portaobjetos terminados

Los portaobjetos de FISH permanecen analizables durante 1 mes si se han almacenado en la oscuridad y por debajo de la temperatura ambiente.

Recomendaciones de procedimiento

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

Ayuda al cliente

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

References

1. McClintock B 1934 Z Zellforsch 21:294-326
2. Henderson AS et al Proc natl Ac Sci USA 1972; 69:3394-8
3. Hsu TC et al. 1975 Chromosoma 53:25-36
4. R. J. M. Gardner, Grant R. Sutherland -Chromosome abnormalities and genetic counseling 2004 ó p240
5. Babu V et al 2005 Ind J Hum Genet 11(1): 44-46

Patents and Trademarks

Aquarius and Cytocell are registered trademarks of Cytocell Ltd.



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