



Instructions For Use

REF: LPT R/G

A range of Subtelomere Specific Probes directly labelled in either a red or a 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, is treated with heat and Formamide to denature the double-stranded DNA, rendering it single-stranded. The target DNA is thus available for annealing to a similarly denatured, single-stranded, fluorescent-labelled DNA probe, which has a complementary sequence. Following hybridisation, unbound and non-specifically bound DNA probe is removed by a series of stringent washes and the DNA counterstained for visualisation. Fluorescence microscopy then allows the visualisation of the hybridised probe on the target material.

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

This Aquarius kit contains only one of the probes from the range of directly labelled telomere specific probes.

Material Provided

Probe: 15µl per vial (5 tests)
Amount of subtelomere specific probe: minimum of 40 ng/test
The 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) (150µl per vial).

Counterstain: (150µl per vial).

The counterstain is DAPI in antifade (ES: 0.125µg/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 1µl to 200µl
- Water bath with accurate temperature control at 72°C
- Microcentrifuge tubes (0.5 ml)
- Fluorescence microscope 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 both 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 blood 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).
- Dehydrate in an ethanol series (70%, 85% and 100%), each for 2 mins
- Allow to air dry

Probe Preparation

- Remove probe (s) and hybridisation solution from -20°C freezer and allow to warm to RT
- Ensure solutions are uniform by repeated gentle, pipette mixing
- Using fresh pipette tips remove: final volume of 10µl of probe solution
 - for a **single probe hybridisation**: 3µl of probe and 7µl of hybridisation solution per test
 - for a **two probe hybridisation**: 3µl of each probe and 4µl of hybridisation solution per test
 - for a **three probe hybridisation**: 3µl of each probe and 1µl 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 to 37°C (+/- 1°C) for 5 minutes
- Place the 10µl of probe on the spotted area of the slide, carefully apply a 24 x 24mm coverslip. Seal with rubber solution glue and allow to dry completely.

- Denature at 75°C (+/- 1°C) for 2 minutes

Hybridisation

- Incubate 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 0.4 x SSC at 72°C (+/- 1°C) pH 7.0 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 10µl of the DAPI antifade. Apply a coverslip, remove bubbles and allow colour to develop in the dark for 10 minutes. View with a fluorescence microscope

Stability of Finished Slides

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

Procedural Recommendations

- 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

- A normal sample will show a signal of the telomeric region of each of the relevant chromosome homologues, or 2 signals in interphase cells.
- The chromosome location of the signals is immediately apparent from the cytogenetic characterisation of the chromosomes and thus both balanced and unbalanced abnormalities can be instantly detected and accurately described.
- # The 2q PAC (dj10111017) detects the common polymorphism described by Macina *et al* in 1994. Should a 2q deletion be detected studies have stressed the importance of testing the deletion by FISH using a second probe mapping to the region (Fan *et al* 2001) and to test the parents to determine its inheritance (Knight *et al* 2000). To this end, a second 2q BAC, 172113, D2S447 which is more proximal has been added to the Aquarius Telomere Specific probe range.

Probe Specifications

Probe	Catalogue Number	Clone name	Marker	Accession Numbers	Max. physical distance from telomere (kb)	Cross-hybridisations & polymorphisms
1p	LPT01PR/G	CEB108	CEB108/T7		<300	
1q	LPT01QR/G	160H23	1qtel19	D1S3739	80	
2p	LPT02PR/G	DJ892G20	2ptel27	D2S2983	330	
2q	LPT02QR/G	DJ1011017	2qtel47	D2S2986	240	Polymorphism #⊗
2q NP	LPT02QNP R/G	172113	VII- YRM2112	D2S447	240	Non-polymorphic#
3p	LPT03PR/G	DJ1186B18	3ptel25	D3S4559	450	
3q	LPT03QR/G	196F4	3qtel06	D3S1272	450	
4p	LPT04PR/G	36P21	4ptel04	D4S3360	73	
4q	LPT04QR/G	DJ963k6	4qtel11		275-500	
5p	LPT05PR/G	189N21	5ptel48		Unknown	
5q	LPT05QR/G	240G13	5qtel70	D5S2097	245	
6p	LPT06PR/G	621I1	6ptel48		300	
6q	LPT06QR/G	57H24	6qtel54	D6S2522	280	
7p	LPT07PR/G	109a6		G31341	<255	
7q	LPT07QR/G	2000a5		G31340	<8	
8p	LPT08PR/G	DJ580L5	8ptel91	D8S2333	250	8p with 1p & 3q
8q	LPT08QR/G	489D14	8qtel11	D8S1925	170	
9p	LPT09PR/G	43N6	9ptel30		600	
9q	LPT09QR/G	112N13	9qtel33	D9S2168	65	9q with 10p & 16p, 18p, XqYq
10p	LPT10PR/G	306F7	10ptel45	D10S2488	320	
10q	LPT10QR/G	137E24	10qtel24	D10S2490	270	
11p	LPT11PR/G	DJ908H22	11ptel03	D11S2071	125	11p with 17p
11q	LPT11QR/G	DJ770G7	11qtel38	D11S4974	65	11q with 12q (interstitial)
12p	LPT12PR/G	496A11	12ptel27		Unknown	12p with 6p, 20q
12q	LPT12QR/G	221K18	12qtel87	D12S2343	190	
13q	LPT13QR/G	163C9	13qtel56	D13S1825	170	
14q	LPT14QR/G	DJ820M16	14qtel01	D14S1420	200	
15q	LPT15QR/G	154P1	WI-5214	D15S936	300	
16p	LPT16PR/G	12114	16ptel05	D16S3400	160	
16q	LPT16QR/G	240G10	16qtel48		200	
17p	LPT17PR/G	202L17	17ptel80	D17S2199	60	
17q	LPT17QR/G	362K4	17qtel13	D17S2200	90	17q with 1p, 6q
18p	LPT18PR/G	74G18	VII- YRM2102	D18S552	220	
18q	LPT18QR/G	DJ964M9	18qtel11	D18S1390	290	
19p	LPT19PR/G	DJ546C11	19ptel29		250-500	
19q	LPT19QR/G	F21283	19qtel82		Unknown	
20p	LPT20PR/G	DJ106L1L	20pthy33	D20S502	180	
20q	LPT20QR/G	81F12	20qtel14		50	20q with 6p
21q	LPT21QR/G	63H24	21qtel07	D21S1575	175	
22q	LPT22QR/G	99K24	22qtel31	D22S1726	120	22q with 2q (interstitial)
XpYp **	LPTXYPR/G	839D20		DXYS129	160	
XqYq ***	LPTXYQR/G	225F6		GDB451553/ DXF23751E/ DXYS61	182	
		C8.2/1			88	

See the ⊗Expected Results paragraph for more details.

⊗ See Knight S. and Flint J. (2000) *J Med Genet* 37: 401-409 and Fan Y *et al.* (2001) *Genet in Med* 3 (6) : 416-421 for further information on this polymorphism.

** This probe is specific for the p-arms of both X and Y

*** This probe is specific for q-arms of both X and Y

Customer Support

Please contact the Cytocell Sales and Marketing Department

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. Les sondes sont fournies sous forme concentrée pour permettre le mélange, si nécessaire, de 3 sondes subtelomériques de la gamme Aquarius dans la 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 subtelomériques directement marquées.

Conditionnement

Sonde : 15 µl par tube (5 tests)

Concentration de sonde subtelomérique: minimum de 40 ng/test
La sonde est fournie dans la solution d'hybridation (formamide, sulfate de dextran, SSC). La sonde est directement marquée soit avec un fluorochrome rouge (spécifique du spectre Texas Red) soit avec un fluorochrome vert (spécifique du 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-phénylindole))

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 du 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.

Equipement nécessaire non fourni

- Plaque chauffante (avec bloc et contrôle de la température jusqu'à 80°C)
- Micropipettes 1 µl 6 200 µl
- Bain-marie avec contrôle de la température à 72°C
- Tubes à microcentrifugation (0,5 ml)
- Microscopio à fluorescence (Voir la section Microscopes et Filtres)
- Jarres en plastique ou en verre
- Forceps
- Huile à immersion pour microscopio à fluorescence
- Centrifugeuse de paillasse

Microscopes 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 2 fluorochromes et du DAPI simultanément.

Préparation des échantillons

Le kit a été conçu pour l'utilisation sur des cellules du sang périphérique cultivées et fixées avec le fixateur de Carnoy et doivent être préparés selon les protocoles en vigueur dans le laboratoire ou institution. Préparer les étalements métaphasiques sur des lames à microscopio selon les techniques standards de cytogénétique. Cuire les lames n'est pas recommandé, ceci pouvant réduire l'intensité du signal.

Protocole FISH

Préparation de la lame échantillon

- Déposer l'échantillon cellulaire sur une lame à microscopio propre.
 - Laver la lame dans du tampon 2 x SSC, pendant 2 minutes à température ambiante.
 - Déshydrater dans une série de bains d'éthanol (70%, 85% et 100%), 2 minutes dans chaque bain.
 - Laisser sécher.
- Préparation de la sonde
- Retirer la sonde et la solution d'hybridation du congélateur à -20°C et laisser préchauffer à température ambiante.
 - Bien homogénéiser la sonde et la solution d'hybridation en pipetant plusieurs fois.
 - 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

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

Hybridation

- Incuber la lame pendant une nuit à 37°C (+/- 1°C) à l'abri de la lumière et dans une chambre humide.
- Lavages de post-hybridation
- Retirer la lamelle et éliminer toutes traces de ruber cément.
- Laver la lame dans du tampon 0,4 x SSC (pH 7,0) à 72°C (+/- 1°C) pendant 2 minutes sans agitation
- 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

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

Stabilité des lames

Les lames FISHées sont analysables pendant un mois si elles sont conservées dans l'obscurité et à ou en 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.

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

- Un échantillon normal présentera un signal sur la région télomérique étudiée sur chaque chromosome homologue, ou 2 signaux sur des cellules en interfase.
- La caractérisation cytogénétique des chromosomes permet une localisation immédiate des signaux, ainsi les translocations équilibrées et non équilibrées peuvent être détectées instantanément et décrites avec précision.
- Le PAC 2q (d(10)1017) détecte le polymorphisme commun précédemment observé avec le cosmide (2112b2), décrit pour la première fois par Macina *et al* en 1994. S'une délétion 2q est détectée, des études ont montré l'importance de tester la délétion par FISH en utilisant une deuxième sonde localisée dans la région (Fan *et al* 2001) et de tester les parents afin de déterminer son hérité (Knight *et al* 2000). A cette fin, un deuxième BAC 2q, 17213, D2S447 qui est plus proximal et marqué en rouge, a été ajouté à la gamme Aquarius Subtelomere Specific Probe.

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.

Le sonde sono prodotte in forma concentrata per permettere, se necessario, di miscelare fino a 3 sonde subtelomeriche specifiche Aquarius (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 telomeriche specifiche marcate direttamente.

Materiale fornito

Sonda: 15µl per provetta (5 test)
Quantità di sonda subtelomeriche specifica: quantità minima 40 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: 0.125µg/ml DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindolo))

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 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.
- 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 una piastra solida ed 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)
- Contentori di Coplin in plastica o vetro
- Pinzette
- Olivo 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 contemporaneamente i due fluorocromi delle sonde ed il DAPI.

Preparazione del campione

Il kit 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.

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 o un'altra forma di invecchiamento dello stesso in quanto ciò potrebbe ridurre la fluorescenza del segnale.

Protocollo

Preparazione del vetrino

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

Preparazione della sonda

- Rimuovere la(e) sonda(e) e la soluzione di ibridazione dal congelatore a -20°C e lasciarle riscaldare a temperatura ambiente (TA)
 - Accertarsi che le soluzioni siano uniformi pipettando delicatamente e ripetutamente
 - 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

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

Ibridazione

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

Lavaggi post-ibridazione

- Rimuovere accuratamente il vetrino coprioggetti e tutte le tracce di colla
- Lavare il vetrino in SSC 0,4x (pH 7,0) a 72°C (+/- 1°C) per 2 minuti senza agitazione
- Lavare il vetrino in SSC 2x, tween 20 0,05% (pH 7,0) a TA per 30 secondi senza agitazione

Colorante di contrasto

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

Stabilità dei vetrini finiti

I vetrini FISH restano analizzabili per circa 1 mese se conservati al buoi 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 termostato 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 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 per una ibridazione con una singola sonda

- Un campione normale mostrerà un segnale in prossimità della regione telomeric di ognuno dei due cromosomi omologhi o, nel caso di cellule in interfase, due segnali.
- La localizzazione cromosomica dei segnali è dettata in modo immediato dalla morfologia dei cromosomi e tutte le anomalie bilanciate e non bilanciate possono essere quindi rivelate e descritte in modo accurato.
- # La sonda 2q PAC (d(10)1017) è in grado di rivelare il polimorfismo comune descritto da Macina *et al* in 1994. Alcuni studi hanno sottolineato che, nel caso in cui dovesse essere rilevata una delezione 2q, diventa importante analizzare la delezione con la tecnica FISH utilizzando una seconda sonda in grado di mappare la regione (Fan *et al* 2001) e sottoporre ai test i parenti per determinarne l'ereditabilità (Knight *et al* 2000). A tal fine, alla gamma di Aquarius Telomere Specific probe è stata aggiunta una seconda sonda, 2q BAC, 17213, D2S447, più prossimale.

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

Die Sonden werden als Konzentrat hergestellt um so, falls erforderlich, bis zu drei Sonden aus CytoCells Aquarius-Produktlinie konzentrierter Subtelomersonden in der gleichen Hybridisierung mischen zu können. Pro Hybridisierung beträgt das Endvolumen 10 µl.

Dieser Aquarius-Kit enthält nur eine Sonde aus der Produktreihe der direkt markierten telomerspezifischen Sonden.

Kitkomponenten

Sonde: 15 µl pro Röhrchen (5 Tests)
Menge an subtelomerspezifischer Sonde: mindesten 40 ng/Test
Die Sonde liegt in Hybridisierungslösung vor (Formamid, Dextransulfat, SSC) und ist entweder mit einem grünen (FITC-Spektrum) oder einem roten Fluorophor (Texas-Red-Spektrum) 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.
- Sonnenschutzcreme 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 potentielles Teratogen. 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

Der Aquarius-Kit sollte bis zum Ablaufdatum, das auf dem Kiteikett 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)
- Variable Mikropipetten im Bereich 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 Quecksilberdampfampe und von Plan Achromat Objektiven 63-facher oder 100-facher Vergrößerung. Ein Dreifach-Bandpassfilter DAPI/FITC/Texas Red ist für die simultane Beobachtung von Sondenfluoreszenz und DAPI-Gegenfärbung optimal geeignet.

Probenvorbereitung

Der 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. Erhitzten oder Altern der Objektträger wird nicht empfohlen, da dies zu einer Verminderung der Signalfluoreszenz führen kann.

FISH-Protokoll

Vorbereitung des Objektträgers

1. Zellprobe auf gereinigten Objektträger auftragen
2. Objektträger für 2 Minuten in 2 x SSC bei Raumtemperatur (RT).
3. Entwässern in Alkoholreihe (70%, 85% und 100%), jeweils für 2 Min.
4. An der Luft trocknen lassen

Vorbereiten der Sonde

1. Sonde(n) und Hybridisierungslösung aus dem -20°C-Gefrierschrank nehmen und auf RT erwärmen lassen.
 2. Durch wiederholtes Mischen in der Pipette sicherstellen, dass die Lösungen homogen gemischt sind
 3. Mit frischen Pipettenspitzen entnehmen: Endvolumen der Sondenlösung 10 µl
 - 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

4. Sowohl Objektträger mit Probe und Sonde bei 37°C (+/- 1°C) für 5 Minuten vorwärmen
5. 10 µl Sondenlösung auf Zellauftragsstelle auf Objektträger geben und vorsichtig mit einem 24 x 24mm Deckglaschen abdecken. Mit Gummikleber-Lösung versiegeln und vollständig trocknen lassen.

6. Bei 75°C (+/- 1°C) für 2 Minuten denaturieren

Hybridisierung

7. **Übernacht** bei 37°C (+/- 1°C) in einer feuchten, lichtdichten Kammer inkubieren

Waschen nach der Hybridisierung

8. Deckgläschen und alle Kleberspuren vorsichtig entfernen
9. Objektträger 2 Minuten in 0,4 x SSC bei 72°C (+/- 1°C), pH 7,0, ohne schütteln waschen
10. Objektträger 30 Sekunden in 2 x SSC, 0,05% Tween 20 bei RT, pH 7,0, ohne schütteln waschen

Gegenfärben

11. 10 µl DAPI Antifade hinzugeben. Mit Deckgläschen abdecken und zur Farbentwicklung 10 Minuten im Dunkeln lagern. Unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachten

Stabilität der fertigen Objektträger

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

Empfehlungen zur Durchführung

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

Erwartete Ergebnisse für eine Einzelsondenhybridisierung

1. Eine normale Probe wird im Telomerbereich jedes der entsprechenden homologen Chromosome ein Signal zeigen, bzw. zwei Signale in Interphase-Zellen.
2. Die Lage der Signale auf dem Chromosom ist sofort anhand der zytogenetischen Charakterisierung des Chromosoms ersichtlich, d.h. sowohl balancierte als auch unbalancierte Translokationen können schnell entdeckt und genau beschrieben werden.
3. # 2q PAC (dj1011017) weist den weit verbreiteten Polymorphismus, der von Macina *et al* 1994 beschrieben wurde, nach. Beim Auftreten einer 2q-Deletion haben Untersuchungen die Bedeutung des Tests dieser Deletion in der FISH mit einer zweiten Sonde, die diesen Bereich abdeckt (Fan *et al* 2001), unterstrichen; auch sollte der genetische Hintergrund der Eltern getestet werden (Knight *et al* 2000). Deshalb wurde die Aquarius Produktlinie telomerspezifischer Sonden um eine zweite 2q BAC-Sonde, 172113, D2S447, die mit einer weiter proximal liegenden Sequenz hybridisiert, erweitert.

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 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 una contraincubación al ADN para su visualización. El uso de un microscopio de fluorescencia permite la visualización de la sonda hibridada en el material utilizado.

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 subteloméricas específicas concentradas Aquarius de Cytocell. Cada hibridación requiere un volumen final de 10 µl de solución sonda.

El kit Aquarius contiene sólo una de las sondas de la gama de sondas teloméricas específicas directamente marcadas.

Material Proporciónado

Sonda: 15µl por vial (5 reacciones)

Cantidad de sonda específica subtelomérica: mínimo de 40 ng/reacción

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

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 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.
4. La DAPI puede producir cáncer. Manipule 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 o de plástico
- g) Pírazas
- h) Microscopio de fluorescencia con objetivo de inmersión en aceite
- i) Centrifuga

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.

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 (TA).
3. Deshidrate en una serie de etanol (70%, 85% y 100%), 2 minutos en cada uno
4. Secar al aire

Preparación de la sonda

1. Saque la sonda del congelador a -20°C y deje que se caliente a TA
2. Asegúrese de que la solución de la sonda es uniforme mezclando varias veces con la pipeta
3. Con una punta de pipeta nueva extraiga: un volumen final de 10 µl de solución de sonda
- para una **hibridación de sonda sencilla**: 3 1 de solución de sonda y 7 1 de solución de hibridación por prueba
- para una **hibridación de sonda doble**: 3 1 de solución de sonda y 4 1 de solución de hibridación por prueba
- para una **hibridación de sonda triple**: 3 1 de solución de sonda y 1 1 de solución de hibridación por prueba

Y colóquelo en un único tubo de microcentrifuga, girar suavemente para mezclar y efectuar pulsos de giro en la microcentrifuga.

Desnaturalización

4. Precaliente el portaobjetos de la muestra y la sonda a 37°C (+/- 1°C) durante 5 minutos
5. 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
6. Desnaturalice a 75°C (+/- 1°C) durante 2 minutos

Hibridación

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

Baños posthibridación

8. Quite el cubreobjetos y los restos de goma cuidadosamente
9. Lave el portaobjetos en **0,25 x SSC a 72°C (+/- 1°C) pH 7,0** durante dos minutos sin agitar*
10. Lave el portaobjetos en 2 x SSC, 0,05% Tween 20 a TA, pH 7,0 durante 30 segundos sin agitar

Contraincubación

11. 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

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 stringencia 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 una hibridación de sonda sencilla

1. Una muestra normal mostrará una señal de la región telomérica de cada uno de los homólogos cromosómicos relevantes, o dos señales en las células en interfase.
2. La localización cromosómica de las señales es inmediatamente aparente con la caracterización citogenética de los cromosomas y de ese modo se pueden detectar instantáneamente y describirse con exactitud las anomalías equilibradas y no equilibradas.
3. # El 2q PAC (dj1011017) detecta el polimorfismo común descrito por Macina y col. en 1994. Si se detecta una detección 2q, los estudios han subrayado la importancia de probar la detección con FISH utilizando una segunda sonda para esta región (Fan y col. 2001) y de estudiar a los padres para determinar la herencia (Knight y col. 2000). Para ello, un segundo 2q BAC, 172113, D2S447, que es más proximal, se ha añadido a la gama de sondas teloméricas específicas de Aquarius.

Ayuda al cliente

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

Referencia/Bibliografía/Bibliografía/Literatur

Review: Knight and Flint. J Med Genet 2000; 37:401-409

Knight SJL, Lucas S, Regan R, Brenan M, Nicod A, Lawrie NM, Cardy DLN, Nguyen H, Hudson TJ and Flint J (2000). An optimized set of human telomere clones for studying telomere integrity and architecture. Am. J. Hum. Genet. 67 : 320-332

Yao-Shan Fan, Yang Zhang; Marsha Speevak; Sandra Farrell; Jack Jung; and Victoria Siu. (2001) Detection of Submicroscopic aberrations in patients with unexplained mental retardation by fluorescence *in situ* hybridisation using multiple subtelomeric probes. Genetics in Medicine 3 (6) 416-421

Macina, RA; Negorev, DG; Spais, LA; Hu, Xi; Reithman, HC. (1994) Sequence organisation of the human chromosome 2q telomere. Human Molecular Genetics 3 1847-1853

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

004/2010-06-28

DS#080/CE