



Instructions For Use

REF: PMP016 / 017 / 018

Chromprobe Multiprobe® - System
CLL Panel



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.

The Chromprobe Multiprobe CLL Panel

The Chromprobe Multiprobe CLL panel has been developed to allow probes for detecting del (6q), Trisomy 12, del (13q), del (17p), del (11q) and rearrangements of IGH, which lead to the 14+ markers, to be applied simultaneously to a patient sample in a single FISH reaction. The probes have been developed to give clear results in non-dividing cells and thus maximise the information obtained from the technique. The device can be used for initial diagnosis, to confirm findings of routine Cytogenetics and also for monitoring the patient over time. The device also has a probe set for t(11;14) to enable abnormal CLL patients to be distinguished from Mantle Cell Lymphoma patients.

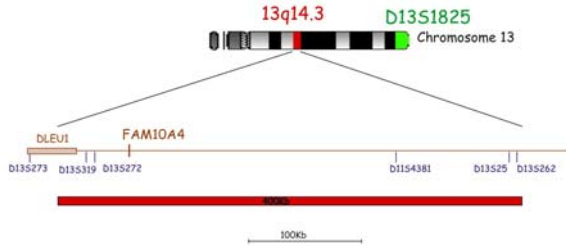
FISH Probes on the Chromprobe Multiprobe CLL Panel

Chromosome 12 Enumeration probe

The chromosome 12 probe on the CLL Panel is a repeat sequence probe, labelled in red, which recognizes the centromeric repeat sequence D12Z1.

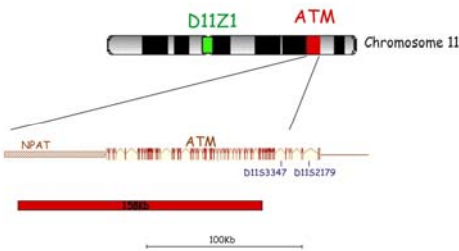
13q14.3

The 13q14.3 deletion probe is approximately 400 kb and covers the region 100 kb centromeric to D13S319 through to the marker D13S25. It is labelled in red. The subtelomeric specific probe at 13pter (clone 163C9) is labelled in green and allows identification of chromosomes 13, acting as a control probe. In the normal cell, therefore, there should be two red and two green signals (2R, 2G) whilst a deletion of the probe target results in one red signal and two green controls (1R, 2G).



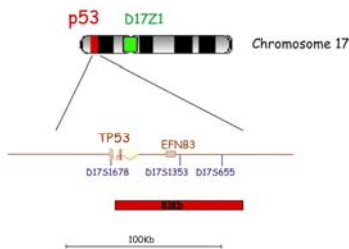
ATM (11q22.3)

The Chromprobe Multiprobe CLL device has the ATM gene probe, measuring 158 kb, labelled in red, which covers the 5' region of NPAT and the 3' region of ATM up to D11S3347. The probe mix also contains a control probe for the 11 centromere (D11Z1). In the normal cell, therefore, there should be two red and two green signals (2R, 2G) whilst a deletion of the probe target results in one red signal and two green controls (1R, 2G).



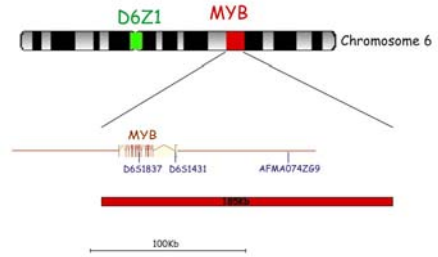
TP53 (17p13.1)

The TP53 probe is 83 kb, labelled in red and covers a region including 15 kb of the 5' end of TP53 and extending 67 kb proximal to the gene, to just beyond the marker D17S655. The probe mix also contains a control probe for the 17 centromere (D17Z1). In the normal cell, therefore, there should be two red and two green signals (2R, 2G) whilst a deletion of the probe target results in one red signal and two green controls (1R, 2G).



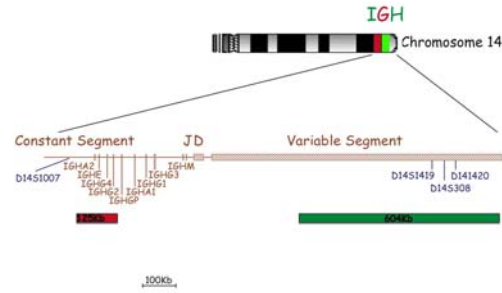
MYB (6q23.3)

The MYB probe is 185 kb, labelled in red and covers the entire MYB gene and 138 kb beyond in the 5' direction. The probe mix also contains a control probe for the 6 centromere (D6Z1). In the normal cell, therefore, there should be two red and two green signals (2R, 2G) whilst a deletion of the probe target results in one red signal and two green controls (1R, 2G).



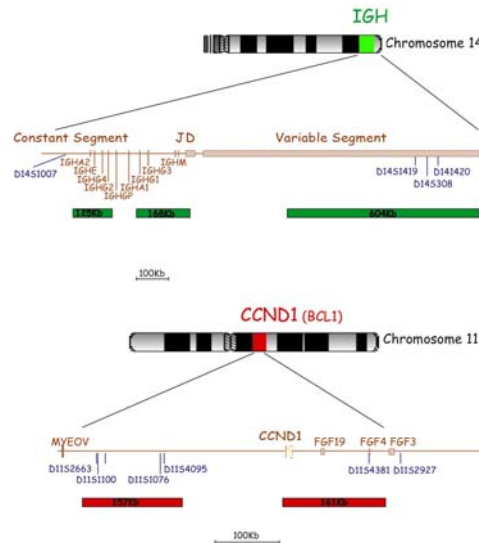
IGH Fission (14q32)

The Constant region of the gene is labelled in red whilst the Variable segment is labelled in green. The normal situation is represented by fusion or close-juxtaposition of the red and green signals (2Y) whilst a rearrangement of the gene is detectable by separate green and red signals (1Y, 1G, 1R) This probe set will detect such rearrangements in interphase cells as well as in dividing cells.



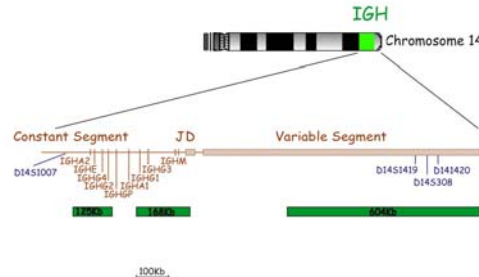
IGH/CCND1 (14q32/11q13.3)

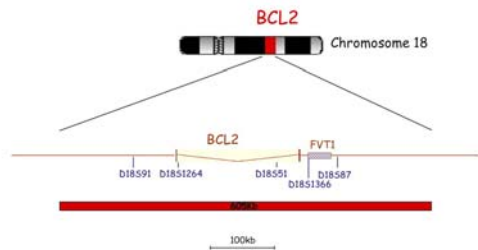
The Constant and Variable segments of the IGH gene are covered by green probe contigs. The CCND1 probe mix contains a probe 3' of CCND1 covering a region between the two markers D11S2663 and D11S4095, measuring 157 kb, (141 kb from CCND1) and a second probe (161 kb) covering CCND1 and the region up to the 3' end of FGF3. Both are labelled in red. In the normal cell, these probes will appear as discrete red and green spots, one for each homologue (resulting in a 2G 2R conformation) In a t(11;14) patient, the constant region probe of the IGH swaps with the CCND1-covering probe and vice versa resulting in two (yellow) fusion signals in addition to the red and green signals of the normal chromosomes 11 and 14 respectively (1R 1G 2Y).



IGH/BCL2 (14q32/18q21.3)

The CLL Panel has a green probe covering the Constant and Variable segments of the IGH gene, and a probe contig, measuring 605 kb, covering the BCL2 and FVT1 genes on chromosome 18 labelled in red. In the normal cell, these probes will appear as discrete red and green spots, one for each homologue (resulting in a 2G 2R conformation) In a t(14;18) patient, the constant region probe of the IGH swaps with the proximal portion of the BCL2 contig and vice versa resulting in two (yellow) fusion signals in addition to the red and green signals of the normal chromosomes 18 and 14 respectively (1R 1G 2Y).





Material Provided

Each kit contains the following reagents, which are sufficient for either 2 (Cat. No. PMP018), 5 (Cat. No. PMP017) or 10 (Cat. No. PMP016) patient samples:

- 2, 5 or 10 Chromoprobe Multiprobe – CLL devices coated with directly labelled probes
- 4, 7 or 12 Glass slides printed with a special template
- 500 µl Hybridisation Solution B: Formamide, Dextran Sulphate, SSC
- 500 µl Counterstain Solution: DAPI (ES: 0.125 µg/ml DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole)), Antifade
- 1 Cytocell Slide Surface Thermometer
- 1 Cytocell Chromoprobe Multiprobe Hybridisation Chamber

Warnings and Precautions

1. For *in vitro* diagnostic use. For professional use only.
2. Wear gloves when handling DNA probes and DAPI counterstain.
3. The hybridisation solution contains Formamide, which is toxic. Handle with care; wear gloves and a lab coat. 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 Chromoprobe Multiprobe System kit should be stored at 2-8°C until the expiry date indicated on the kit label. Do not freeze. The counterstain vial must be stored in the dark.

Equipment Necessary but not Supplied

- a) Hotplate with accurate temperature control up to 80°C
- b) 37°C incubator
- c) Variable volume micropipettes range 1 µl -200 µl
- d) 37°C water bath (without stirrer)
- e) Microcentrifuge tubes (0.5 ml)
- f) Water bath with accurate temperature control at 72°C
- g) Fluorescence microscope (Please see Optimal microscope and filter set up)
- h) Plastic or glass coplin jars
- i) Centrifuge
- j) Forceps
- k) Fluorescence grade microscope lens immersion oil
- l) Fluorescence grade glass coverslips (24 x 50 mm)

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/FTTC/Texas Red is optimal for viewing all three fluorophores simultaneously.

Sample Preparation

The Chromoprobe Multiprobe System is designed for use on cultured peripheral blood or bone marrow cells fixed in Carnoy's fixative, which should be prepared according to the laboratory or institution guidelines.

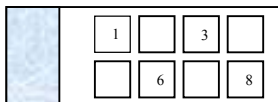
Prepare samples on Cytocell Chromoprobe Multiprobe template slides according to Cytocell protocol below.

Baking or otherwise ageing slides is not recommended as it may reduce signal fluorescence.

Chromoprobe Multiprobe Protocol

1. Slide preparation

- i. Clean template slide
- ii. Soak the template slide for 2 minutes in 100% methanol and polish dry with a clean soft tissue.
- iii. Establish correct mitotic index
It is important that the intended sample has a sufficiently high mitotic index to allow detection of chromosome abnormalities. To check the density of the sample, using a micropipette (e.g. a Gilson P10 or P20) pipette 4 µl of the cell suspension onto one of the areas of the spare template slide and allow to air dry. The small volume used means that you usually have to gently touch the slide with the pipette tip to transfer the suspension. Examine by phase contrast microscopy.
If the cell density is too high, dilute the suspension with fresh fixative.
If the mitotic index is too low, spin down the fixed cell suspension at 160 xg for 10 minutes. Note the volume of supernatant, remove, and re-suspend the cell pellet in a smaller volume of fresh fixative.
If cell sample concentration has been altered, spot 4 µl of the concentrated sample onto another square of your test slide and re-examine by phase contrast microscopy.
- iv. **Please Note: 50 µl is the minimum volume required for the protocol.**
- v. Quality control of samples
Samples should be examined for cytoplasm since this will interfere with the *in situ* protocol. If the chromosomes appear to be enclosed by a granular material when examined under phase contrast microscopy, then this will compromise results. One method for reducing cytoplasm is to spot 4 µl of your sample onto the template slide and watch the fixative as it spreads out. In the normal situation, the fixative will spread to maximum, recede and then evaporate. To clean up any cytoplasm we have found that effective results are achieved if a fresh drop of 3-1 fixative is allowed to fall onto the spot at the point when the spreading fixative has reached its maximum. Allow the drop of fixative to evaporate and re-examine the spot.



Once the first group of drops has air-dried, spot the remaining squares with 4 µl drops in the same manner. After the slide has dried, examination of the slide under phase contrast will reveal whether any squares have been missed.

If spots have been missed, or squares have too few cells, simply spot those squares again: it is not necessary to re-spot a new slide.

If upon examination of slide, a square has insufficient cells/metaphases, further drop(s) of suspension can be added to increase the cell density.

Please note: If the metaphase cells appear overspread then clean the template slide thoroughly in methanol and re-spot allowing every spot to dry before proceeding to the next.

2. Preparation of device and template slide

- i. Ensure that the Chromoprobe Multiprobe Hybridisation Chamber is in the 37°C water bath and allow to equilibrate to 37°C (+/- 1°C). (This may take up to an hour if the water bath has been switched on from cold).
- ii. Mix the hybridisation solution by repeated pipetting and pre-warm a 25µl aliquot per device to 37°C. Also pre-warm each device to 37°C by placing the device label side down.
Do not touch the raised boss surfaces of the device.
- iii. Wash template slides containing fixed samples in 2 x SSC for 2 minutes at room temperature (20 - 25°C).
- iv. Whilst the device is still at 37°C, dehydrate template slides containing fixed samples through an ethanol series (2 minutes each in 70%, 85% and absolute ethanol), dry and place at 37°C to warm.
- v. Add 2 µl of pre-warmed hybridisation solution to each of the eight areas on the pre-warmed device using a P10 micropipette while it remains at 37°C.

3. Positioning of template slide over the device.

- i. Carefully invert the template slide over the device such that the number 1, which is now upside down, is located over the top right hand area of the device (Figure 1).

To help locate square 1, its position on the device has been marked with a red label

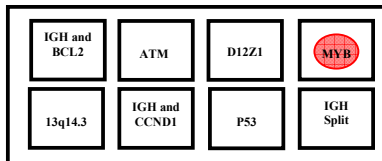


Figure 1. Location of probes on the CLL Panel

- ii. Make sure that the template slide is carefully aligned with the matching areas on the device. Carefully lower the slide over the device so that the drops of hybridisation solution make contact with the slide. Apply gentle, even pressure to ensure that the hybridisation solution is spread to the edges of each of the raised areas on the device.
- iii. Lift the slide, carefully holding the frosted end of the glass slide and invert so that the slide is underneath the device. Make sure the device does not smear across the template slide as this could cause cross-contamination of the probes.
- iv. Place at 37°C (+/- 1°C) (hotplate or incubator) for 10 minutes.

4. Instructions for use of the Cytocell slide surface thermometer.

The temperature of the hotplate should be checked with the Cytocell slide surface thermometer before proceeding to denaturation.

This thermometer is a liquid crystal device and although reversible, it must be treated with care to ensure a reasonable life span. The thermometer must only be used to check the temperature of a hotplate; it must not be used to monitor the hotplate performance over time.

To use the thermometer properly, place it onto the surface of the hotplate and wait until the different segments stop changing colour. The correct temperature is indicated by a pale green / gold colour. When the segments appear granular and the colours no longer appear uniform and regular, the thermometer should be discarded as it is exhausted. The life span of each thermometer should, however, easily be sufficient for a ten-device kit.

5. Denaturation

A PCR thermal cycler-heating block is NOT suitable for use in place of solid bed hotplate for this procedure.

Transfer the slide/device to the hotplate taking particular care to hold it level. (Ensure the sample slide is in good contact with the hotplate). Denature on the hotplate at 75°C (+/- 1°C) for 2 minutes.

6. Hybridisation

Place slide/device in the Chromoprobe Multiprobe Hybridisation Chamber supplied, replace the lid and float the chamber in the 37°C (+/- 1°C) water bath (non-stirring) overnight.

Please note: Do not seal the lid on the hybridisation chamber.

Do not place a lid on the water bath.

Do not hybridise in an incubator.

Please ensure that the hybridisation chamber is completely dry. (i.e. no water or damp tissue inside the chamber).

The humidity inside the chamber is vital for optimal hybridisation. The correct levels will be achieved following those steps.

7. Post-hybridisation stringent washes

- i. Preparation of stringent wash solutions
 1. Solution 1: Prepare a coplin/Hellendahl jar containing 0.4 x SSC. Place in a water bath and allow to reach 72°C (+/- 1°C) adjust pH to 7.0.
 2. Solution 2: Prepare a coplin/Hellendahl jar containing 2 x SSC and 0.05% Tween 20. Allow to stand at room temperature.

Check the temperature and pH of the solutions in coplin jars and adjust if necessary. The pH should be 7.0 when at the correct temperature.
- ii. Stringent wash steps
 1. Remove the device carefully from the slide and place the slide in Solution 1 for 2 minutes. (The device cannot be re-used).
 2. Place the slide into Solution 2 for 30 seconds. Drain off the excess liquid but do not allow to dry. Avoid processing more than two slides through the stringency washes at any one time.

8. Mounting and visualisation of results.

Counterstaining with DAPI

1. Apply 20 µl of DAPI to each end of the slide and apply a coverslip (24 x 50 mm).
2. Blot the slide with filter paper or tissue.
3. Leave in the dark for 10 minutes before viewing by fluorescence microscopy.

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, water baths, 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

Introduction

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

Le protocole FISH est encore simplifié grâce à la dénaturation simultanée de la sonde et de l'ADN cible, puis, après une hybridation sur la nuit, à l'utilisation de lavages stringents rapides sans formamide. Les sondes directement marquées éliminent le besoin d'étapes d'amplification longues.

Le Chromoprobe Multiprobe CLL Panel

Le Chromoprobe Multiprobe CLL Panel a, par conséquent, été développé pour permettre l'application simultanée de sondes détectant la délétion du 6q, la trisomie 12, la délétion du 13q, la délétion du 17p, la délétion du 11q et les réarrangements du gène IGH, conduisant aux marqueurs 14+, sur un échantillon de patient lors d'une réaction FISH unique. Les sondes ont été développées afin de fournir des résultats clairs dans des cellules ne se divisant pas, et par conséquent, pour optimiser au maximum les informations obtenues à partir de cette technique. Le dispositif peut être utilisé pour un diagnostic initial, afin de confirmer les résultats obtenus par cytogénétique de routine et également pour surveiller le patient dans le temps. Le dispositif possède également un set de sondes pour la translocation (t(11;14) afin de permettre de faire la distinction entre les patients atteints de LCC anormaux et les patients atteints de lymphomes à cellules du manteau.

Sondes FISH sur le Chromoprobe Multiprobe CLL Panel

Sonde d'énumération du chromosome 12

La sonde du chromosome 12 sur le panel CLL est une sonde de séquence répétée, marquée en rouge, reconnaissant la séquence répétée centromérique D12Z1.

13q14.3

La sonde de délétion 13q14.3 d'environ 400 kb s'étend sur la région centromérique de 100 kb au marqueur D13S319 au marqueur D13S25. Elle est marquée en rouge. La sonde subtelomérique spécifique 13qter (clone 163C9) est marquée en vert et permet l'identification des chromosomes 13, et sert de sonde de contrôle. Dans une cellule normale, par conséquent, deux signaux rouges et deux signaux verts (2R, 2V) doivent être observés, alors que dans une cellule déletée, seulement un signal rouge et deux signaux verts (1R, 2V) doivent être observés.

ATM (11q22.3)

Le dispositif Chromoprobe Multiprobe CLL possède la sonde du gène ATM, de 158 kb, marquée en rouge, couvrant la région 5' du gène NPAT et la région 3' du gène ATM jusqu'au marqueur D11S3347. Le mélange de sondes contient

également une sonde de contrôle pour le centromère du chromosome 11 (D11Z1). Dans une cellule normale, par conséquent, deux signaux rouges et deux signaux verts (2R, 2V) doivent être observés, alors que dans une cellule déléetée, seulement un signal rouge et deux signaux verts (1R, 2V) doivent être observés.

TP53 (17p13.1)

La sonde TP53, d'une longueur de 83 kb, est marquée en rouge et couvre une région incluant 15 kb de l'extrémité 5' du gène TP53 et s'étendant sur 67 kb de manière proximale par rapport au gène, et jusqu'au-delà du marqueur D17S65 inclus. Le mélange de sondes contient également une sonde de contrôle pour le centromère du chromosome 17 (D17Z1). Dans une cellule normale, par conséquent, deux signaux rouges et deux signaux verts (2R, 2V) doivent être observés, alors que dans une cellule déléetée, un seul signal rouge et deux signaux verts (1R, 2V) doivent être observés.

MYB (6q23.3)

La sonde MYB de 185 kb, marquée en rouge, couvre la totalité du gène MYB et 138 kb au-delà de la direction 5'. Le mélange de sondes contient également une sonde de contrôle pour le centromère du chromosome 6 (D6Z1). Dans une cellule normale, par conséquent, deux signaux rouges et deux signaux verts (2R, 2V) doivent être observés, alors que dans une cellule déléetée, seulement un signal rouge et deux signaux verts (1R, 2V) doivent être observés.

Fisison IGH (14q32)

La région constante du gène est marquée en rouge alors que le segment variable est marqué en vert. La situation normale est représentée par la fusion ou la proche juxtaposition des signaux rouges et verts (2I) alors qu'un réarrangement du gène est détecté par des signaux rouges et verts séparés (1I, 1V, 1R). Ce set de sondes détectera de tels réarrangements dans les cellules en interphase ainsi que dans les cellules en cours de division.

IGH/CCND1 (14q32/11q13.3)

Les segments constants et variables du gène IGH sont couverts par des contigs de sonde verte. Le mélange de sondes CCND1 contient une sonde en 3' de CCND1 couvrant une région comprise entre les deux marqueurs D11S2663 et D11S4095, de 157 kb (141 kb à partir de CCND1) et une deuxième sonde (161kb) couvrant CCND1 et la région jusqu'à l'extrémité 3' de IGH. Les deux sondes sont marquées en rouge. Dans une cellule normale, ces sondes apparaîtront comme des points rouges et verts discrets, un pour chaque chromosome homologue (entraînant une conformation 2V 2R). Chez un patient présentant une translocation t(11;14), la sonde de la région constante du gène IGH s'intervertit avec la sonde couvrant CCND1 et vice versa entraînant deux signaux de fusion (jaune) en plus des signaux rouge et vert des chromosomes 11 et 14 normaux respectivement (1R 1V 2).

IGH/BCL2 (14q32/18q21.3)

Le panel CLL comprend une sonde verte couvrant les segments constants et variables du gène IGH, ainsi qu'un contig de sondes, de 605 kb, couvrant les gènes BCL2 et FVT1 sur le chromosome 18 et marqué en rouge. Dans une cellule normale, ces sondes apparaîtront comme des points rouges et verts discrets, un pour chaque chromosome homologue (entraînant une conformation 2V 2R). Chez un patient présentant une translocation t(14;18), la sonde de la région constante du gène IGH s'intervertit avec la portion proximale du contig BCL2 et vice versa entraînant deux signaux de fusion (jaune) en plus des signaux rouges et verts des chromosomes 18 et 14 normaux respectivement (1R 1V 2).

Contigage

Chaque kit contient les réactifs suivants pour tester 2 (Réf. PMP018), 5 (Réf. PMP017) ou 10 (Réf. PMP016) échantillons.

- 2, 5 ou 10 Dispositifs Chromoprobe Multiprobe – CLL cotés avec des sondes directement marquées.
- 4, 7 ou 12 Lames en verre imprimées
- 500 µl Hybridisation Solution B (solution d'hybridation) : Formamide, Sulphate de Dextran, SSC
- 500 µl Contre-colorant : DAPI (ES : 0.125 µg/ml DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole)), Antifade
- 1 Slide Surface Thermometer
- 1 Chromoprobe Multiprobe Hybridisation Chamber

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 solution d'hybridation contient de la formamide qui est toxique. Manipuler avec précautions. Porter des gants et une blouse de laboratoire. 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 et Manipulation

Le kit Chromoprobe Multiprobe System doit être conservé à 2-8 °C jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette du kit. Ne pas congeler. Le contre-colorant doit être conservé 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) Incubateur à 37 °C
- c) Micropipettes à volume variable 1 µl – 200 µl
- d) Bain-marie à 37 °C (sans agitation)
- e) Tubes à microcentrifugation (0,5 ml)
- f) Bain-marie avec contrôle de la température à 72 °C
- g) Microscope à fluorescence
- h) Cuves en plastique ou en verre
- i) Centrifugeuse
- j) Forceps
- k) Huile à immersion pour microscope à fluorescence
- l) Lamelles en verre pour fluorescence (24 x 50 mm)

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 simultanément.

Préparation des échantillons

Le kit Chromoprobe Multiprobe System a été conçu pour utilisation sur des cellules du sang périphérique ou de la moelle osseuse cultivées et fixées avec le fixateur de Carnoy qui doivent être préparées selon les protocoles en vigueur dans le laboratoire ou établissement. Préparer les échantillons sur les lames en verre Chromoprobe Multiprobe selon le protocole Cytocell ci-dessous. Cuire ou vieillir les lames n'est pas recommandé, ceci pouvant réduire l'intensité du signal fluorescent.

Protocole Chromoprobe Multiprobe

1. Préparation de la lame échantillon

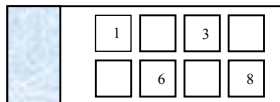
i. Nettoyage de la lame échantillon
Plonger la lame échantillon dans un bain de méthanol à 100 % pendant 2 minutes et sécher avec un tissu doux et propre.

- ii. Établir un index mitotique correct
Il est important que l'échantillon ait un index mitotique élevé afin de permettre la détection d'anomalies chromosomiques. Pour vérifier la densité cellulaire, utiliser une micropipette (par exemple, Gilson P10 ou P20), pipeter 2 µl de suspension cellulaire et déposer sur une case d'une lame échantillon en trop et laisser sécher. Le dépôt de ce petit volume se fait en touchant légèrement la lame avec l'embout de la pipette pour transférer la suspension. Examiner avec un microscope à contraste de phase.
Si la densité cellulaire est trop élevée, diluer la suspension avec du fixateur frais (3:1 méthanol : acide acétique glacial).
Si l'index mitotique est trop faible, centrifuger la suspension à 160 g pendant 10 minutes. Noter le volume de surnageant, éliminer ce surnageant et remettre le culot en suspension dans un plus petit volume de fixateur.
Si la concentration cellulaire de l'échantillon a été modifiée, déposer 4 µl d'échantillon concentré sur une autre case et vérifier de nouveau par contraste de phase.

Remarque : un volume minimum de 50 µl est nécessaire pour le protocole.

- iii. Contrôle qualité des échantillons
Les échantillons doivent être examinés afin de s'assurer de l'absence de cytoplasme, le cytoplasme pouvant interférer avec le protocole *in situ*. Si les chromosomes apparaissent enfermés par du matériel granuleux lors de leur visualisation sous un microscope à contraste de phase, ceci compromettra alors les résultats. Une méthode pour réduire le cytoplasme consiste à déposer 4 µl d'échantillon sur la lame échantillon et observer la façon dont le fixateur s'étale. En situation normale, le fixateur s'étale au maximum, se rétracte puis s'évapore. Pour éliminer le cytoplasme, déposer 2 µl de suspension cellulaire sur une case. Lorsque le fixateur s'est étalé au maximum, déposer une goutte de fixateur frais sur la goutte échantillon. Laisser la goutte évaporer et examiner de nouveau le dépôt.

- iv. Préparation de la lame échantillon
Déposer 4 µl de suspension cellulaire sur chacune des 8 cases de la lame échantillon en suivant la séquence en quinconce décrite ci-dessous. Ceci empêchera que les étallements cellulaires n'interfèrent les uns avec les autres.



Lorsque le premier groupe de gouttes a séché, déposer de la même façon 4 µl de suspension cellulaire dans les cases restantes. Lorsque la lame est sèche, examiner la lame une dernière fois en contraste de phase afin de s'assurer qu'aucune case n'a été oubliée.

Si une case a été oubliée ou si des cases n'ont pas assez de cellules, un nouveau dépôt peut être effectué sur ces cases : il n'est pas nécessaire de refaire de dépôt des échantillons sur une nouvelle lame.

Si après examen de la lame, une case ne présente pas suffisamment de cellules/métaphases, il est possible de redéposer d'autres gouttes de suspension cellulaire afin d'augmenter la densité cellulaire.

Remarque : Si les cellules métaphasiques apparaissent sur-étalées, nettoyer soigneusement la lame échantillon à l'aide de méthanol puis refaire le dépôt en laissant sécher chaque dépôt avant de passer au suivant.

2. Préparation du dispositif et de la lame échantillon

- i S'assurer que la Chromoprobe Multiprobe Hybridisation Chamber est dans un bain-marie à 37 °C et s'équilibre à 37 °C (+/- 1 °C). (Ceci peut prendre environ 1 heure si le bain-marie est froid).
- ii Homogénéiser la solution d'hybridation en pipetant plusieurs fois. Préchauffer un aliquote de 25 µl de solution d'hybridation par dispositif à 37 °C (+/- 1 °C). Préchauffer également chaque dispositif à 37 °C en veillant à ce que le côté étiqueté soit placé au-dessous.
- iii Ne pas toucher la surface des cases du dispositif.
Laver les lames échantillon contenant les échantillons fixés dans du tampon 2 x SSC à température ambiante (20 °C – 25 °C) pendant 2 minutes.
- iv Alors que le dispositif est toujours à 37 °C, déshydrater les lames échantillon contenant les échantillons fixés dans une série de bains éthanol (2 minutes dans chaque bain, 70 %, 85 % et éthanol absolu). Laisser sécher puis préchauffer en plaçant à 37 °C.
- v Déposer 2 µl de solution d'hybridation préchauffée (pipette P10) sur chacune des 8 cases du dispositif préchauffé. Laisser le dispositif sur la plaque chauffante à 37 °C durant cette opération.

3. Positionnement de la lame échantillon sur le dispositif.

- i Retourner délicatement la lame échantillon sur le dispositif afin que la case numérotée 1, qui est à présent à l'envers, soit en ligne avec la case en haut à droite du dispositif (Figure 1).
- ii Veillez à ce que la lame échantillon soit alignée avec précision sur les cases complémentaires du dispositif. Appliquer la lame échantillon sur le dispositif afin que les gouttes de solution d'hybridation entrent en contact avec la lame échantillon. Appuyer légèrement afin de bien étaler la solution d'hybridation sur chaque case du dispositif.
- iii Retourner délicatement l'ensemble lame échantillon/dispositif Multiprobe avec précaution, en tenant l'extrémité bleue de la lame en verre, de façon à ce que la lame échantillon soit en dessous du dispositif. S'assurer que le dispositif ne glisse pas, ceci pourrait entraîner des contaminations croisées entre les sondes.
- iv Placer l'ensemble lame échantillon/dispositif Multiprobe à 37 °C (+/- 1 °C) (plaque chauffante ou incubateur) pendant 10 minutes.

4. Instructions pour l'utilisation du Cytocell Slide Surface Thermometer

La température de la plaque chauffante doit être vérifiée avec le Cytocell Slide Surface Thermometer avant de procéder à l'étape de dénaturation.

Ce thermomètre est un dispositif à cristaux liquides et bien que réversible, il doit être utilisé avec précaution afin de lui assurer une durée de vie raisonnable. Le thermomètre doit être utilisé uniquement pour vérifier la température de la plaque chauffante avant utilisation. Il ne doit pas être laissé sur la plaque pour une longue période, ceci l'endommagerait.
Pour utiliser le thermomètre correctement, le placer sur la plaque chauffante et attendre que les segments chiffrés arrêtent de changer de couleur. La bonne température est indiquée par un couleur vert pale/or. Si les segments apparaissent granuleux ou de couleur non uniforme, le thermomètre doit être jeté car il est usé. La durée de vie de chaque thermomètre doit, cependant, être suffisante pour l'utilisation d'un kit de 10 dispositifs.

5. Dénaturation

Un bloc chauffant de thermocycleur PCR ne peut pas être utilisé pour remplacer une plaque chauffante lors de cette étape.

Transférer l'ensemble lame échantillon/dispositif sur la plaque chauffante en faisant attention de la maintenir horizontalement. (S'assurer que la lame échantillon soit bien en contact avec la plaque chauffante). Dénaturer sur la plaque chauffante à 75 °C (+/- 1 °C) pendant 2 minutes.

6. Hybridation

Placer l'ensemble lame échantillon/dispositif dans la chambre d'hybridation Chromoprobe Multiprobe. Remettez le couvercle sur la chambre d'hybridation et laissez flotter dans le bain-marie (sans agitation) à 37 °C (+/- 1 °C) pendant une nuit.

Remarques :
Ne pas sceller le couvercle de la chambre d'hybridation.
Ne pas fermer le couvercle du bain-marie.
Ne pas hybrider dans un incubateur.
Veillez vous assurer que la chambre d'hybridation soit bien sèche. (c.-à-d. aucune eau ou tissu humide à l'intérieur de la chambre).

L'humidité à l'intérieur de la chambre est vitale pour une hybridation optimale. Les niveaux appropriés seront atteints en suivant ces étapes.

7. Lavages stringents de post hybridation

- i. Préparation des solutions de lavages stringents
 1. Solution 1 : préparer une cuve Coplin/Hellendahl 0,4 x SSC. Placer au bain-marie et laisser équilibrer à 72 °C (+/- 1 °C) et ajuster le pH à 7,0.
 2. Solution 2 : préparer une cuve Coplin/Hellendahl 2 x SSC et 0,05 % Tween 20. Laisser équilibrer à température ambiante.Vérifier la température et le pH des solutions des cuves Coplin et ajuster si nécessaire. Le pH doit être de 7,0 lorsque les solutions sont à la bonne température.
- ii. Lavages stringents
 1. Retirer doucement le dispositif de la lame échantillon. Placer la lame échantillon dans la Solution 1 pendant 2 minutes. (Le dispositif ne peut pas être réutilisé).
 2. Placer la lame échantillon dans la Solution 2 pendant 30 secondes. Éliminer l'excès de solution mais ne pas laisser sécher.Éviter de traiter plus de deux lames à la fois lors de l'étape des lavages stringents.

8. Montage et visualisation

- i. Contre-coloration avec le DAPI
a) Déposer 20 µl de DAPI à chaque extrémité de la lame puis appliquer délicatement une grande lamelle (24 mm x 60 mm).
- b) Sécher la lame avec du papier filtre ou un tissu.
- c) Laisser la coloration développer dans l'obscurité pendant 10 minutes avant visualisation.

Stabilité des lames

Les lames FISHEES sont analysables pendant un mois si elles sont conservées dans l'obscurité et à une 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.

Support Client

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

ITALIANO

Introduzione

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 la riassociazione con una sonda di DNA, denaturata allo stesso modo, a singola elica, marcata con una sostanza fluorescente e contenente una sequenza complementare. 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. Il protocollo FISH è ulteriormente semplificato dalla denaturazione simultanea delle sonde e del DNA bersaglio e, dopo l'ibridazione notturna, dall'utilizzo di lavaggi rapidi stringenti, in assenza di formamide. Le sonde marcate direttamente eliminano la necessità di passaggi di amplificazione prolungata.

Chromoprobe Multiprobe CLL Panel

La Chromoprobe Multiprobe CLL panel è stata progettata per la rilevazione di: del (6q), trisomia 12, del (13q), del (17p), del (11q) e riarrangiamenti del gene IGH (dando origine ai marcatori 14+); essa, inoltre, permette di applicare le sonde simultaneamente ad un campione, in una unica reazione FISH. Le sonde sono state sviluppate per fornire risultati chiari in cellule non in divisione, massimizzando l'informazione ottenuta dalla tecnica. Il sistema può essere utilizzato per una diagnosi iniziale, per confermare conclusioni ottenute con le tecniche citogenetiche di routine e per monitorare il paziente nel tempo. Esso, inoltre, ha una sonda per la translocazione (11; 14) che permette di distinguere i pazienti con LLC anomala dai pazienti con linfoma a cellule del mantello.

Sonde FISH sulla Chromoprobe Multiprobe CLL Panel

Sonda per l'enumerazione del cromosoma 12

La sonda per il cromosoma 12 sul pannello LLC è una sonda a sequenza ripetuta, marcata in rosso, che riconosce la sequenza centromerica ripetuta D1Z1.

13q14.3

La 13q14.3 deletion probe ha una dimensione approssimativa di 400 Kb ed è complementare a una regione di 100 Kb che va dal centromero al marcatore D13S319, attraverso il marcatore D13S25. La sonda è marcata in rosso. La sonda sabetomeric specific 13qter (clone 163C9), con funzione di sonda di controllo, è marcata in verde e permette l'identificazione dei cromosomi 13. La cellula normale è identificata da due segnali rossi e due segnali verdi (2R, 2V) mentre la cellula con delezioni presenta un unico segnale rosso e due segnali di controllo verdi (1R, 2V).

ATM (11q22.3)

Il dispositivo della Chromoprobe Multiprobe CLL ha la sonda per il gene ATM, lunga 158kb, marcata in rosso; questa copre la regione 5' del NPAT e la regione 3' dell'ATM, fino a D11S3347. Il mix della sonda contiene anche una sonda di controllo che si lega al centromero 11 (D11Z1). La cellula normale è identificata da due segnali rossi e due segnali verdi (2R, 2V) mentre la cellula con delezioni presenta un unico segnale rosso e due segnali di controllo verdi (1R, 2V).

TP53 (17p13.1)

La sonda TP53, lunga 83kb e marcata in rosso, copre una regione che comprende 15 kb dell'estremità 5' del gene TP53 e si estende per 67 kb prossimali del gene, proprio al di fuori del marcatore D17S655. Il mix della sonda contiene anche una sonda di controllo che si lega al centromero 17 (D17Z1). La cellula normale è identificata da due segnali rossi e due segnali verdi (2R, 2V) mentre la cellula con delezioni presenta un unico segnale rosso e due segnali di controllo verdi (1R, 2V).

MYB (6q23.3)

La sonda MYB, lunga 185kb, è marcata in rosso e copre tutto il gene MYB e 138kb, in direzione 5'. Il mix della sonda contiene anche una sonda di controllo che si lega al centromero 6 (D6Z1). La cellula normale è identificata da due segnali rossi e due segnali verdi (2R, 2V) mentre la cellula con delezioni presenta un unico segnale rosso e due segnali di controllo verdi (1R, 2V).

Fissione IGH (14q32)

La regione costante del gene è marcata in rosso mentre il segmento variabile è marcato in verde. La situazione normale è rappresentata dalla fusione o dalla stretta giustapposizione dei segnali verde e rosso (2G) mentre un riarrangiamento del gene è rilevabile dai due segnali verde e rosso (1G, 1V, 1R). Questo set di sonde rileva i riarrangiamenti in cellule in interfase e in cellule in divisione.

IGH/CCND1 (14q32/11q13.3)

Il segmento costante e il segmento variabile del gene IGH sono coperti dai *contigs* della sonda verde. Il mix CCND1 contiene una sonda con la regione 3' di CCND1 (lunga 157Kb), che copre una regione compresa tra i due marcatori D11S2663 e D11S4095 (141Kb da CCND1), e una seconda sonda (161 Kb), che copre CCND1 e la regione che si trova fino all'estremità 3' del gene GGF3. Entrambe sono marcate in rosso. Nella cellula normale, le sonde appaiono come due spot discreti rosso e verde, uno per ogni cromosoma omologo (conformazione 2V 2R). In un paziente t (11;14), la sonda per la regione costante del gene IGH si inverte con la sonda per il CCND1, e viceversa, dando origine a due segnali di fusione (gialli) oltre ai segnali rosso e verde dei cromosomi normali 11 e 14 rispettivamente (1R 1V 2G).

IGH/BCL2 (14q32/18q21.3)

Il pannello LLC contiene una sonda verde che copre il segmento costante e quello variabile del gene IGH e una sonda *contig* (di 605Kb) che copre i geni BCL2 e FVT1 sul cromosoma 18, marcata in rosso. Nelle cellule normali, le sonde appaiono come due spot discreti rosso e verde, uno per ogni cromosoma omologo (conformazione 2V 2R). In un paziente t (14;18), la sonda per la regione costante del gene IGH si inverte con la porzione prossimale del contig BCL2, e viceversa, dando origine a due segnali di fusione (gialli) oltre ai segnali rosso e verde dei cromosomi normali 18 e 14 rispettivamente (1R 1V 2G).

Materiale fornito

Ogni kit contiene i reagenti elencati di seguito, sufficienti per 2 (N. cat. PMP018), 5 (N. cat. PMP017) o 10 (N. cat. PMP016) campioni paziente:

- 2, 5 o 10 Dispositivo Chromoprobe Multiprobe - CLL rivestito con sonde marcate direttamente.
- 4, 7 o 12 Vetrini stampati con un reticolo speciale
- 500µl Soluzione di ibridazione B: Formamide, Destano solfato, SSC
- 500µl Colorante di contrasto: DAPI (ES: 0.125µg/ml DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindole)). Antifade
- 1 Cytocell Slide Surface Thermometer
- 1 Cytocell Chromoprobe Multiprobe Hybridisation Chamber

Avvertenze e precauzioni

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. La soluzione di ibridazione contiene formamide, una sostanza tossica. Maneggiare con cura, indossare guanti ed un camice da laboratorio. Per lo smaltimento, lavare con grandi quantità di acqua.
4. Il DAPI è altamente cancerogeno. Maneggiare con cura, indossare guanti ed un camice 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 manipolazione

Il kit ALL Panel Chromoprobe Multiprobe deve essere conservato ad una temperatura di 2-8° C fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta del kit. Non congelare. La fiala con la soluzione contro-colorante deve essere conservata al buio.

Attrezzatura richiesta non fornito nel kit

- a) Piastra riscaldante termostata fino a 80° C
- b) Incubatore a 37° C
- c) Micropipette a volume variabile da 1 µl a 200 µl
- d) Bagnomaria a 37° C (senza agitatore)
- e) Provette per microcentrifuga (0,5 ml)
- f) Bagnomaria termostata a 72° C
- g) Microscopio a fluorescenza (vedere alla sezione "Allestimento del microscopio e del filtro")
- h) Vaschette Coplin in vetro o plastica
- i) Centrifuga
- j) Forbici
- k) Olio da immersione per lenti di microscopio a fluorescenza
- l) Vetrini coprioggetto per microscopio a fluorescenza (24 x 50 mm)

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 a passa-banda DAPI/FITC/Texas Red è ottimale per visualizzare entrambi i fluorocromi contemporaneamente.

Preparazione dei campioni

Il kit ALL Panel Chromoprobe Multiprobe è progettato per l'utilizzo su campioni di cellule coltivate di midollo osseo o di sangue periferico, fissati con fissativo di Carnoy, da prepararsi in conformità alle linee guida dei rispettivi laboratori o istituti di appartenenza.

Preparare i campioni sui vetrini Chromoprobe Multiprobe Cytocell con griglia di riferimento, conformemente al protocollo Cytocell sotto riportato. Si consiglia di porre i vetrini in stufa o di sottoporli ad altro trattamento di invecchiamento, in quanto così facendo si rischia di ridurre la fluorescenza dei segnali.

Protocollo Chromoprobe Multiprobe

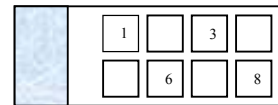
1. Preparazione dei vetrini

- i. Pulire il vetrino con la griglia di riferimento
Immergere il vetrino con la griglia di riferimento per 2 minuti in metanolo al 100% e asciugare perfettamente con un panno asciutto e pulito.
- ii. Determinare l'indice mitotico corretto.
È importante che il campione abbia un indice mitotico sufficientemente elevato per consentire di rilevare eventuali anomalie cromosomiche. Per verificare la densità del campione, utilizzare una micropipetta (es. una Gilson P10 o P20), pipettare 4 µl di sospensione cellulare su un altro vetrino di riferimento tra quelli forniti nel kit e lasciare asciugare all'aria. Data l'esiguità del volume utilizzato, per trasferire la sospensione è sufficiente toccare appena il vetrino con il puntale della pipetta. Esaminare il campione al microscopio a contrasto di fase.
• Se la densità cellulare è troppo elevata, diluire la sospensione con fissativo fresco.
• Se l'indice mitotico è troppo basso, centrifugare a 160 g per 10 minuti la sospensione cellulare precedentemente preparata. Osservare il volume del surmatante, asportare e risospesione il pellet cellulare in un volume inferiore di fissativo fresco.
• Se la concentrazione cellulare del campione è stata modificata, trasferire esattamente 4 µl di campione concentrato in un'altra cella del vetrino e riesaminare il campione al microscopio a contrasto di fase.
N.B.: 50 µl è il volume minimo richiesto per il protocollo.
- iii. Controllo qualità dei campioni
I campioni devono essere controllati per escludere l'eventuale presenza di citoplasma, in quanto quest'ultimo può interferire con il protocollo di ibridazione *in situ*. Se all'osservazione al microscopio a fase di contrasto i cromosomi appaiono circondati da materiale granulare, i risultati del test saranno compromessi. Uno dei possibili metodi per ridurre la presenza di citoplasma è trasferire esattamente 4 µl di campione sul vetrino e osservare la propagazione del fissativo. In condizioni normali, il fissativo si

distribuisce sulla superficie del vetrino fin dove possibile, quindi si ritira ed evapora. Per ripulire efficacemente il campione da eventuali tracce di citoplasma, si consiglia di lasciare cadere una goccia fresca di fissativo 3:1 sullo spot cellulare nel punto esatto che corrisponde al limite massimo di distribuzione del fissativo. Lasciar evaporare la goccia di fissativo e riesaminare lo spot cellulare.

iv. Spotting sul vetrino

Trasferire esattamente 4 µl di sospensione cellulare in tutte le 8 celle delimitate dalla griglia di riferimento del vetrino alternando le celle come mostrato sotto. Il riempimento alterno delle celle impedisce che al momento della distribuzione si creino interferenze tra gli spot cellulari di celle contigue.



Una volta che la prima serie di gocce si è asciugata all'aria, trasferire esattamente 4 µl di gocce nelle celle restanti con la stessa modalità. Dopo che il vetrino si è asciugato, osservandolo al microscopio a contrasto di fase sarà possibile verificare se tutte le celle sono state debitamente riempite.

Se così non fosse, o se qualche cella contenesse un numero troppo esiguo di cellule, è sufficiente ripetere lo spotting in quelle celle non riempite.

Se all'osservazione del vetrino una cella risulta contenere un numero insufficiente di cellule/metafasi, per aumentare la densità cellulare è possibile aggiungere una o più gocce di sospensione.

N.B.: Se le aree di distribuzione delle cellule metafasiche appaiono in qualche caso sovrapposte, occorre pulire accuratamente il vetrino ed eseguire nuovamente lo spotting, facendo in modo da lasciar asciugare bene ciascuno spot prima di procedere con il successivo.

2. Preparazione del dispositivo e del vetrino dei campioni

- i. Accertarsi che la Chromoprobe Multiprobe Hybridisation Chamber sia nel bagnomaria a 37° C e lasciare che si equilibri a 37° C (+/- 1° C). (Se il bagnomaria è stato acceso da poco potrebbe essere necessaria anche un'ora).
- ii. Miscelare la soluzione di ibridazione pipettando ripetutamente e pre-riscaldare a 37° C un'aliquota da 25 µl per il dispositivo. Pre-riscaldare, inoltre, ogni dispositivo a 37° C ponendo il dispositivo stesso con l'etichetta rivolta verso il basso.
Non toccare le superfici sopraelevate del dispositivo.
- iii. Lavare i vetrini contenenti i campioni fissati in SSC 2x per 2 minuti a temperatura ambiente (20-25° C).
- iv. Mentre il dispositivo è ancora a 37° C, disidratare i vetrini contenenti i campioni fissati immergendoli nelle diverse diluizioni di etanolo (70%, 85%, etanolo assoluto), 2 minuti per diluizione. Successivamente asciugare e riscaldare a 37° C.
- v. Aggiungere, con una micropipetta P10, 2 µl di soluzione di ibridazione pre-riscaldata ad ognuna delle otto aree presenti sul dispositivo precedentemente riscaldato, mentre questo è ancora a 37° C.

3. Posizionamento del vetrino dei campioni sul dispositivo.

- i. Capovolgere con cura il vetrino sul dispositivo in modo che il numero 1, che si trova ora a testa in giù, si trovi sull'area in alto a destra (Figura 1).
Per facilitare la localizzazione del primo quadrato la sua posizione sul dispositivo è stata marcata in rosso.
- ii. Accertarsi che il vetrino sia accuratamente allineato con le aree corrispondenti sul dispositivo. Abbassare con cura il vetrino sul dispositivo in modo che le gocce di soluzione di ibridazione siano in contatto con il vetrino. Applicare una pressione leggera ed uniforme in modo che la soluzione di ibridazione si diffonda fino al margine delle aree sopraelevate del dispositivo.
- iii. Sollevare con cura il vetrino tenendolo per l'estremità traslucida e capovolgere in modo che il vetrino stesso si trovi al di sotto del dispositivo. Accertarsi che il dispositivo non strisci lungo il vetrino in quanto questo potrebbe essere causa di contaminazione delle sonde.
- iv. Incubare a 37° C (+/- 1° C) (su piastra calda o in incubatore) per 10 minuti.

4. Istruzioni per l'uso del Cytocell slide surface thermometer.

Prima di procedere alla denaturazione, verificare la temperatura della piastra calda con il Cytocell slide surface thermometer.

Si tratta di un termometro a cristalli liquidi e, sebbene reversibile, deve essere trattato con cura per assicurarne una ragionevole durata. Il termometro deve essere usato solo per verificare la temperatura di una piastra calda; non deve essere usato per monitorare il funzionamento della piastra nel tempo. Per utilizzare il termometro in modo appropriato, posizionarlo sulla superficie della piastra calda ed aspettare fino a quando i diversi segmenti smettono di cambiare colore. La temperatura corretta è indicata da un tenue colore verde/oro. Quando i segmenti appaiono granulari ed i colori non sono più uniformi e regolari, il termometro deve essere eliminato perché esaurito. La durata di ogni termometro, tuttavia, dovrebbe essere sufficiente per una decina di kit.

5. Denaturazione

Per questa procedura NON è possibile utilizzare un thermal cycler-heating block della PCR al posto di una piastra calda.

Trasferire vetrino/dispositivo sulla piastra calda avendo cura di tenerlo in posizione orizzontale. (Verificare che il vetrino con i campioni sia bene a contatto con la piastra calda) Denaturare sulla piastra calda a 75° C (+/- 1° C) per **2 minuti**.

6. Ibridazione

Porre il vetrino/dispositivo nella Chromoprobe Multiprobe Hybridisation Chamber fornita, rimettere a posto il coperchio e far fluttare la camera nel bagnomaria a 37° C (+/- 1° C) (senza agitazione) per tutta la notte.

Nota: Non sigillare il coperchio sulla camera di ibridazione.

Non coprire il bagno termostato con un coperchio.

Non ibridare in un incubatore.
Accertarsi che la camera di ibridazione sia completamente asciutta. (cioè non siano presenti acqua o tessuti umidi all'interno della camera).

L'umidità all'interno della camera è un fattore fondamentale per una ibridazione ottimale. I livelli corretti saranno raggiunti seguendo i passaggi riportati di seguito.

7. Lavaggi stringenti post-ibridazione

Preparazione delle soluzioni utilizzate nel corso dei lavaggi stringenti
Soluzione 1: Preparare un contenitore di Coplin/Hellendahl contenente SSC 0,4x Inserirlo in un bagnomaria in modo che raggiunga 72° C (+/- 1° C) - aggiustare il pH a 7,0.

Soluzione 2: Preparare un contenitore di Coplin/Hellendahl contenente SSC 2x e Tween 20 0,05%. Lasciarlo a temperatura ambiente.

È necessario, verificare la temperatura ed il pH delle soluzioni all'interno dei contenitori di Coplin. Alla corretta temperatura, il pH deve essere pari a 7,0.

ii. Fasi del lavaggio stringente

1. Allontanare con cura il dispositivo dal vetrino dei campioni ed immergere il vetrino nella Soluzione 1 per 2 minuti. (Il dispositivo non può essere riutilizzato)
2. Immergere il vetrino nella soluzione 2 per 30 secondi. Rimuovere il liquido in eccesso impedendo, però, che si asciughi completamente.
Evitare di effettuare i lavaggi stringenti a più di due vetrini alla volta.

8. Preparazione del vetrino per la visualizzazione dei risultati.

- i. Colorazione con DAPI
a) Applicare 20 µl di DAPI ad ogni estremità del vetrino ed apporre un coprioggetto (24 x 50 mm).
b) Blottare il vetrino con carta da filtro o tessuto.
c) Lasciare al buio per 10 minuti prima di procedere alla visualizzazione per mezzo di un microscopio a fluorescenza.
- ii. Alcuni microscopi hanno un supporto per vetrini che rende difficile visualizzare le estremità del vetrino stesso. In questo caso si consiglia di ruotare semplicemente il vetrino di 180° per avere una visualizzazione facilitata.
Le sonde utilizzate sul dispositivo Multiprobe sono marcate direttamente con fluorocromi altamente sensibili alla luce. Risultati migliori si ottengono esponendo le sonde alla quantità minima di luce nel corso delle procedure; tuttavia non è necessario lavorare al buio.

Stabilità dei vetrini finiti

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

Raccomandazioni per l'uso

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

Assistenza clienti

Contattare l'Ufficio Commerciale e Vendita della Cytocell

DEUTSCH

Einleitung

Die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) ist eine Technik, mit der DNA-Sequenzen auf Chromosomen oder in Interphasen-Kernen nachgewiesen werden. Die Technik verwendet DNA-Sonden, die an gesamte Chromosomen oder an einzelne, spezifische Sequenzen hybridisiert und dient als leistungsstarke Ergänzung zur klassischen Zytogenetik. Die Ziel-DNA wird zum Denaturieren der doppelsträngigen DNA mit Hitze und Formamid behandelt, wodurch sie einzelsträngig wird.

So kann sich eine ebenso denaturierte, einzelsträngige und fluoreszenzmarkierte DNA-Sonde mit komplementärer Sequenz an die Ziel-DNA anlagern.

Nach der Hybridisierung werden nichtgebundene DNA-Sonden durch eine Reihe von Waschvorgängen unter stringenter Bedingungen entfernt. Unter dem Fluoreszenzmikroskop wird das Ergebnis mit entsprechenden Fluoreszenzfiltern ausgewertet.

Die Multiprobe CLL

Die Multiprobe CLL wurde entwickelt, um Sonden zum Entdecken von Deletionen (6q), Trisomie 12, Deletionen 13q, 17p, 11q und IGH - Umstellungen zu bekommen, die zu den 14+ - Markern führen. Eine Patientenprobe kann mit einer einzigen Hybridisierung untersucht werden. Die Sonden wurden entwickelt, um klare Ergebnisse bei sich nicht teilenden Zellen zu erzielen und damit die durch diese Technik erhaltenen Informationen zu maximieren. Die Multiprobe CLL kann für die Anfangsdiagnose, zum Bestätigen der Befunde bei einer Routine-Zytogenetik, wie auch zur Überwachung des Patienten über einen Zeitraum verwendet werden. Die Multiprobe CLL hat zusätzlich ein Sonden-Set für t(11, 14), mit dem abnormale CLL-Patienten von Patienten mit Mantelzell-Lymphom unterschieden werden können.

FISH-Sonden auf der Multiprobe CLL

Chromosom 12 - Zentromersonde

Die Chromosom 12-Sonde auf der CLL-Platte ist eine rot markierte Sonde und erkennt die zentromere repetitive Sequenz D12Z1.

13q14.3

Die 13q14.3 - Deletions-Sonde ist etwa 400 Kb groß und deckt die 100 Kb Region am Zentromer zu D13S319 hin durch den Marker D13S25 ab. Sie ist rot markiert. Die subtelomerespezifische Sonde auf 13qter (Klon 163C9) ist grün markiert. Sie ermöglicht die Identifizierung von Chromosom 13 und fungiert als eine Kontrollsonde. Bei einer normalen Zelle sollte es daher zwei rote und zwei grüne Signale geben (2R, 2G), während eine Zelle mit Deletionen nur ein rotes Signal und zwei grüne Signale hat (1R, 2G).

ATM (11q22.3)

Auf der Multiprobe CLL hat die Sonde für das ATM-Gen eine Größe von 158 Kb, (rot markiert), und deckt die 5'-Region von NPAT und die 3'-Region von ATM bis hin zu D11S3347 ab. Die Sondenmischung enthält auch eine Kontrollsonde für Chromosom 11 (D11Z1). Bei einer normalen Zelle sollte es daher zwei rote und zwei grüne Signale geben (2R, 2G), während eine Zelle mit Deletionen nur ein rotes Signal und zwei grüne Signale hat (1R, 2G).

TP53 (17p13.1)

Die TP53-Sonde ist 83 Kb groß, rot markiert, sie deckt eine Region von 15 Kb des Endes 5' von TP53 ab und erstreckt sich 67 Kb proximal zum Gen bis gerade über den Marker D17S655 hinaus. Die Sondenmischung enthält auch eine Kontrollsonde für das 17. Zentromer (D17Z1). Bei einer normalen Zelle sollte es daher zwei rote und zwei grüne Signale geben (2R, 2G), während eine Zelle mit Lösungen nur ein rotes Signal und zwei grüne Signale hat (1R, 2G).

MYB (6q23.3)

Die MYB-Sonde ist 185 Kb groß, rot markiert und deckt das ganze MYB-Gen und 138 Kb darüber hinaus in Richtung 5' ab. Die Sondenmischung enthält auch eine Kontrollsonde für Chromosom 6 (D6Z1). Bei einer normalen Zelle sollte es daher zwei rote und zwei grüne Signale geben (2R, 2G), während eine Zelle mit Deletionen nur ein rotes Signal und zwei grüne Signale hat (1R, 2G).

IGH Spaltung (14q32)

Die konstante Region des Gens ist rot markiert, das variable Segment dagegen ist grün markiert. Die normale Situation stellt eine Verschmelzung oder enge Juxtaposition des roten und des grünen Signals dar (2Y), eine Umlagerung des Gens ist dagegen an getrennten grünen und roten Signalen erkennbar (1Y, 1G, 1R). Dieses Sondenset kann solche Umlagerung sowohl bei Interphasen-Zellen, als auch bei sich teilenden Zellen feststellen.

IGH/CCND1 (14q32/11q13.3)

Das konstante und das variable Segment des IGH-Gens werden von grünen Sondenkontingenten abgedeckt. Die CCND1-Sondenmischung enthält eine Sonde 3' von CCND1, die eine Region zwischen den beiden Markern D11S2663 und D11S495 abdeckt und 157 Kb groß ist (141 Kb von CCND1 aus) und eine zweite Sonde (161 Kb), welche CCND1 und die Region bis zum 3'-Ende von FGF3 abdeckt. Beide sind rot markiert. Bei der normalen Zelle erscheinen diese Sonden als diskrete rote und grüne Flecken, je einer für jedes Homolog (was eine 2G 2R Anordnung ergibt). Bei einem t(11;14)-Patienten ist tauscht die Sonde der konstanten Region des IGH Platz mit der Sonde, welche CCND1 abdeckt, und umgekehrt, wodurch zwei gelbe Verschmelzungssignale zusätzlich zu den roten und grünen Signalen der normalen Chromosome 11 und 14 auftreten (1R 1G 2Y).

IGH/BCL2 (14q32/18q21.3)

Die Multiprobe-CLL deckt mit einer grün markierten Sonde das konstante und das variable Segment des IGH-Gens ab, und ein 605 Kb großes, rot markiertes Sondenkontingent, die Gene BCL2 und FVT1 auf Chromosom 18. Bei einer normalen Zelle erscheinen diese Sonden als diskrete rote und grüne Flecken, für jedes Homolog (was eine 2G 2R Anordnung ergibt). Bei einem t(14;18)-Patienten tauscht die Sonde der konstanten Region des IGH Platz mit der Sonde, die den proximalen Teil des BCL2-Kontingents abdeckt, und umgekehrt. Dadurch entstehen zwei gelbe Verschmelzungssignale zusätzlich zu den roten und grünen Signalen der normalen Chromosome 18 und 14 (1R 1G 2Y).

Kitkomponenten

Jedes Kit enthält folgende Komponenten, die für entweder 2 (Katalognr. PMP018), 5 (Katalognr. PMP017), oder 10 (Katalognr. PMP016) Patientenproben ausreichen:

- 2, 5 oder 10 Chromosomen Multiprobe - CLL Sonden-Träger, mit direkt markierten Sonden.
- 4, 7 oder 12 Glasobjektträger, mit je 8 Feldern
- 500µl Hybridisierungslösung B: Formamid, Dextranulfat, SSC
- 500µl Gegenfärbungslösung: DAPI (ES: 0.125µg/ml DAPI (4,6-Diamidino-2-Phenylindol)), Antifade
- 1 Cytocell Objektträger - Thermometer
- 1 Cytocell Multiprobe - Hybridisierungskammer

Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen

1. Nur für die Verwendung in der *in vitro* Diagnostik. Nur für die professionelle Verwendung.
2. Beim Umgang mit DNA-Sonden und der DAPI-Gegenfärbung Handschuhe tragen.
3. Die Hybridisierungslösung enthält Formamid, das toxisch ist. Vorsichtig damit umgehen, Handschuhe und einen Labormantel tragen. Bei der Entsorgung mit viel Wasser nachspülen.
4. DAPI ist ein potentiell Karzinogen. Vorsichtig damit umgehen, Handschuhe und Labormantel tragen. Bei der Entsorgung mit viel Wasser nachspülen.
5. Alle Gefahrstoffe sollten gemäß den Richtlinien zur Gefahrfarbstoffentorgung Ihrer Einrichtung entsorgt werden.

Lagerung und Behandlung

Der Multiprobe Kit sollte bis zum Ablaufdatum, das auf dem Kitekett angegeben ist, bei 2-8°C gelagert werden. Nicht einfrieren. Die Röhren mit DAPI-Antifade müssen im Dunkeln aufbewahrt werden.

Benötigte, aber nicht mitgelieferte Laborgeräte

- a) Heizplatte mit genauer Temperaturregelung bis 80°C
- b) 37°C Inkubator
- c) Mikropipetten mit variablem Volumen von 1µl -200µl
- d) 37°C warmes Wasserbad (ohne Mischer)
- e) Mikro-Zentrifugenröhrchen (0,5 ml)
- f) Wasserbad mit genauer Temperaturkontrolle bei 72°C
- g) Fluoreszenzmikroskop
- h) Coplin-Färbetrog aus Kunststoff oder Glas
- i) Zentrifuge
- j) Pinzette
- k) Für Fluoreszenzobjektive geeignetes Immersionsöl
- l) Fluoreszenztaugliche Glasdeckplättchen (24 x 50mm)

Empfehlungen zum Fluoreszenzmikroskop

Zur bestmöglichen Beobachtung der Probe empfehlen wir die Verwendung einer 100 Watt Quecksilberdampfampe und von Plan Achromat Objektiven mit 63-facher oder 100-facher Vergrößerung. Das Dreifach-Bandpassfilter DAPI/FITC/Texasrot ist für die simultane Beobachtung aller drei Fluorophore optimal geeignet.

Probenvorbereitung

Das Multiprobe System ist für die Verwendung von kultivierten peripheren Blut- oder Knochenmarkzellen, die mit Carnoy's Fixativ fixiert wurden, ausgelegt. Die Zellen sollten nach den Richtlinien des Labors oder der Einrichtung vorbereitet werden. Bereiten Sie Präparate auf den Cytocell Multiprobe Matrizen-Objektträgern nach dem untenstehenden Cytocell Protokoll vor. Erhitzen oder Altern der Objektträger wird nicht empfohlen da dies zu einer Verminderung der Signalfluoreszenz führen kann.

Multiprobe Protokoll

1. Vorbereitung des Objektträgers

- i. Den Matrizen-Objektträger reinigen.
Den Matrizen-Objektträger 2 Minuten lang in 100% Methanol einlegen und dann mit einem sauberen, weichen Tuch trocken polieren.

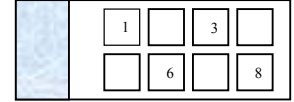
- ii. Den korrekten Mitoseindex herstellen.
Es ist wichtig, dass die Probe einen genügend hohen Mitoseindex hat, um Chromosomenabnormitäten zu erkennen. Zur Überprüfung der Zelldichte 4µl der Zellsuspension auf eines der Felder eines Matrizenobjektträgers aufzutropfen und an der Luft trocknen lassen. Unter dem Phasenkontrastmikroskop beurteilen.
Wenn die Zelldichte zu hoch ist, die Suspension mit frischem Fixativ verdünnen.
Wenn der Mitoseindex zu niedrig ist, die fixierte Zellsuspension für 10 Minuten auf 160xg herunterbringen. Die Menge des an der Oberfläche schwimmenden Materials feststellen, dieses entfernen und den Zeltropfen noch einmal in eine kleinere Menge frisches Fixativ geben.
Wenn sich die Zelldichte der Probe geändert hat, 4µl des auf ein anderes Quadrat Ihres Testobjektträgers aufzutropfen und unter dem Phasenkontrastmikroskop beurteilen.
Bitte beachten Sie: 50µl ist die Mindestmenge, die für das Protokoll erforderlich ist.

iii. Qualitätskontrolle der Proben

Die Proben sollten auf Zytoplasma untersucht werden, was die Endresultate des *In situ* - Protokolls beeinträchtigen wird. Wenn die Chromosomen bei der Untersuchung unter dem Phasenkontrast-Mikroskop von körnigem Material umschlossen erscheinen, wird das die Ergebnisse beeinträchtigen. Eine Methode zur Reduzierung des Zytoplasmas ist, 4µl Ihrer Probe auf den Matrizen-Objektträger aufzutropfen und das Fixativ bei seiner Ausbreitung zu beobachten. In der normalen Situation wird sich das Fixativ auf das Maximum ausbreiten, rezedieren und dann verdampfen. Zum Entfernen von Zytoplasmaresten haben wir gefunden, dass effektive Resultate erzielt werden, wenn man einen frischen Tropfen 3:1 Fixativ zu dem Zeitpunkt auf den Punkt tropft, wo das sich ausbreitende Fixativ seine maximale Ausbreitung erreicht hat. Den Tropfen Fixativ verdampfen lassen und dann die Stelle noch einmal untersuchen.

iv. Betropfen des Objektträgers

Tragen Sie mit der Pipette 4µl Zellsuspension auf alle 8 Bereiche des Matrizen-Objektträgers in einer Abfolge von abwechselnden Quadraten auf, wie unten abgebildet. Dadurch wird verhindert, dass die Zellenaufträge ineinander laufen.



Sobald die erste Gruppe von Tropfen an der Luft getrocknet hat, die übrigen Quadrate auf die gleiche Weise mit 4µl betropfen. Sobald der Objektträger trocken ist, zeigt die Untersuchung unter dem Phasenkontrastmikroskop, ob Quadrate ausgelassen worden sind. Wenn Punkte ausgelassen wurden, oder Quadrate zu wenig Zellen aufweisen, betropfen Sie diese Quadrate einfach noch einmal: es ist nicht notwendig, noch einmal einen neuen Objektträger zu betropfen.
Bitte beachten Sie: Wenn die Metaphasen-Zellen zu stark aufgetragen erscheinen, reinigen Sie den Matrizen-Objektträger gründlich mit Methanol und tropfen Sie noch einmal auf, wobei Sie jeden Punkt trocken lassen, bevor Sie zum nächsten übergehen.

2. Vorbereitung der Sonden-Träger und des Objektträgers

- i. Die Multiprobe Hybridisierungskammer in ein Wasserbad mit 37°C legen und lassen auf 37°C (+/- 1°C) erwärmen lassen. (Wenn das Wasserbad kalt angeschaltet wurde, kann das bis zu einer Stunde dauern).
- ii. Die Hybridisierungslösung mit der Pipette resuspendieren und einen Aliquot von 25µl pro Sonden-Träger auf 37°C vorwärmen. Jeden Sonden-Träger ebenso auf 37°C vorwärmen, wobei die Etikettenseite der Träger nach unten gerichtet ist.
- iii. Die erhöhten Flächen der Träger nicht berühren.
- iv. Objektträger für 2 Minuten in 2 x SSC bei Raumtemperatur (20-25°C) waschen.
- v. Während die der Sonden-Träger noch 37°C warm ist, die Objektträger mit den fixierten Proben in einer Ethanol-Reihe dehydrieren (2 Minuten jeweils in 70%, 85% und purem Ethanol), trocknen und bei 37°C aufwärmen.
- vi. 2µl vorgewärmte Hybridisierungslösung mit einer P10 Mikropipette auf jeden der acht Bereiche des vorgewärmten Sonden-Trägers geben, solange diese noch 37°C hat.

3. Positionierung des Objektträgers über dem Sonden-Träger

- i. Den Objektträger umdrehen und vorsichtig auf den Sonden-Träger legen, so Feld 1, das jetzt nach unten zeigt, auf dem oberen rechten markierten Bereich des Sonden-Trägers zu liegen kommt (Abbildung 1).
- ii. Vergewissern Sie sich, dass der Objektträger sorgfältig auf die entsprechenden Felder ausgerichtet ist. Den Objektträger vorsichtig über den Sonden-Träger absetzen, so dass die Tropfen der Hybridisierungslösung die Objektträger berühren. Sicht auflegen und gleichmäßig leicht andrücken, so dass sich die Hybridisierungslösung bis zu den Rändern jedes der erhöhten Bereiche des Sonden-Trägers ausbreitet.
- iii. Die ganze Einheit vorsichtig umdrehen. Achten Sie darauf, dass der Sonden-Träger nicht über den Objektträger schmiert, da das Kreuzkontaminieren der Sonden mit Nachbarfeldern verursachen könnte.
- iv. 10 Minuten bei 37°C (+/- 1°C) inkubieren (Heizplatte oder Inkubator).

4. Anweisungen zur Verwendung des Cytocell Objektträgerflächen-Thermometers

Vor der Denaturierung sollte die Temperatur der Heizplatte mit dem Cytocell Objektträgerflächen-Thermometer geprüft werden.

Dieses Thermometer ist ein wiederverwendbares Flüssigkristall- Thermometer und sollte, sorgfältig behandelt werden, damit eine vernünftige Lebensdauer gewährleistet ist. Das Thermometer darf nur zur Temperaturmessung einer Heizplatte verwendet werden. Es darf nicht zur Überwachung der Heizplattenleistung über einen längeren Zeitraum gebraucht werden. Das Thermometer auf die Heizplatte legen und warten, kein Farbwechsel mehr erfolgt. Die korrekte Temperatur wird durch eine blassgrüne/gelbe Farbe angezeigt. Wenn die Segmente körnig aussehen und die Farben nicht mehr gleichmäßig und ordentlich erscheinen, sollte das Thermometer weggenommen werden, weil es verbraucht ist. Die Lebensspanne jedes Thermometers sollte jedoch leicht für ein Kit mit zehn Sonden-Trägern ausreichen.

5. Denaturierung

Für diese Prozedur ist die Verwendung eines PCR Heizblocks statt einer -Heizplatte NICHT geeignet.

Die Einheit (Objektträger nach unten) waagrecht auf die Heizplatte legen. (Achten Sie darauf, dass der Probenobjektträger guten Kontakt zur Heizplatte hat). Bei 75°C (+/- 1°C) **2 Minuten lang** auf der Heizplatte denaturieren.

6. Hybridisierung

Die Einheit in die vorgewärmte Multiprobe-Hybridisierungskammer legen, den Deckel wieder auflegen und die Kammer über Nacht in das 37°C (+/- 1°C) warme (nicht durchlaufende) Wasserbad stellen.

Bitte beachten Sie:
Den Deckel der Hybridisierungskammer nicht versiegeln.
Keinen Deckel auf das Wasserbad geben.
Nicht in einem Inkubator hybridisieren.
Stellen Sie bitte sicher, dass die Hybridisierungskammer vollkommen trocken ist, (d.h., dass sich kein Wasser oder feuchtes Gewebe in der Kammer befindet).

Die Feuchtigkeit in der Kammer ist für eine optimale Hybridisierung wesentlich (Stringenz der Hybridisierungslösung).

7. Stringente Waschschrifte

i. Vorbereitung der Waschlösungen

1. Lösung 1: Einen Coplin / Hellendahl-Trog mit 0,4 x SSC vorbereiten. In ein Wasserbad geben und auf 72°C (+/- 1°C) erwärmen lassen, den pH-Wert auf 7,0 bringen.
2. Lösung 2: Einen Coplin/Hellendahl-Trog mit 2 x SSC und 0,05% Tween 20 vorbereiten. Bei Raumtemperatur stehen lassen.

Temperatur und pH-Wert der Lösungen überprüfen und nötigenfalls korrigieren. Bei der korrekten Temperatur sollte der pH-Wert 7,0 betragen.

ii. Stringente Waschschrifte

1. Den Sonden-Träger vorsichtig vom Objektträger abnehmen und den Objektträger für 2 Minuten in Lösung 1 stellen. (Der Sonden-Träger kann nicht wieder verwendet werden).
2. Den Objektträger für 30 Sekunden in Lösung 2 stellen. Überschüssige Flüssigkeit abtupfen, aber nicht trocknen lassen.
Nicht mehr als jeweils zwei Multiprobe-Objektträger gleichzeitig den stringenten Waschschriften unterziehen.

8. Auswertung

i. Gegenfärben mit DAPI

1. Auf jedes Ende des Objektträgers 20µl DAPI auftragen und ein Deckglas (24 x 50mm) auflegen.
2. Den Objektträger mit Filterpapier oder einem Tuch abtupfen.
3. Vor dem Betrachten mit dem Fluoreszenzmikroskop für 10 Minuten im Dunkeln lassen.

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.

Kundendienst

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

ESPAÑOL

Introducción

La hibridación *in situ* fluorescente (FISH) es una técnica que permite detectar secuencias de ADN en cromosomas en metafase o núcleos en interfase 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 intensos y se aplica una contraindicación al ADN para su visualización. El uso de un microscopio de fluorescencia permite la visualización de la sonda hibridada en el material utilizado.

El protocolo de FISH se simplifica aún más con la desnaturalización simultánea del ADN diana y la sonda y, después de la hibridación durante toda la noche, con los lavados intensos rápidos sin formamida. Las sondas marcadas directamente eliminan la necesidad de seguir largos pasos de amplificación.

Panel Chromoprobe Multiprobe CLL

En consecuencia, se ha desarrollado el panel Chromoprobe Multiprobe CLL para que las sondas detecten la del (6q), la trisomía 12, las del (13q), del (17p) y del (11q) y el reordenamiento de IGH, que permite aplicar simultáneamente los marcadores 14+ en la muestra del paciente en una única reacción de FISH. Las sondas se han desarrollado para obtener resultados claros en las células que no están en división y, de ese modo, aumentar al máximo la información obtenida con la técnica. El slide puede usarse para el diagnóstico inicial, para confirmar los resultados citogenéticos habituales y también para vigilar al paciente en el tiempo. El slide tiene además un grupo de sondas para la t (11; 14) que permite distinguir a los pacientes anormales con CLL de los que tienen un linfoma de células del manto.

Sondas para FISH del panel Chromoprobe Multiprobe CLL

Definición de la sonda del cromosoma 12

La sonda del cromosoma 12 del panel CLL es una sonda de secuencia repetitiva, marcada en rojo, que reconoce la secuencia centromérica repetitiva D12Z1.

13q14.3

La sonda de detección 13q14.3 mide aproximadamente 400 Kb y cubre la región centromérica de 100 Kb hacia D13S319 a través del marcador D13S25. Está marcada en rojo. La sonda subtelomérica específica 13qter (clon 163C9) está marcada en verde y permite la identificación del cromosoma 13, actuando como sonda de control. Por tanto, en la célula normal debería haber dos señales rojas y dos señales verdes (2R, 2G), mientras que una célula con detección tiene sólo una señal roja y dos controles verdes (1R, 2G).

ATM (11q22.3)

El slide Chromoprobe Multiprobe CLL contiene la sonda del gen ATM, que mide 158 kb, marcada en rojo, que cubre la región 5' del NPAT y la región 3' del ATM hasta D11S347. La mezcla de sondas también contiene una sonda de control para el centrómero 11 (D11Z1). Por tanto, en la célula normal debería haber dos señales rojas y dos señales verdes (2R, 2G), mientras que una célula con detección tiene sólo una señal roja y dos controles verdes (1R, 2G).

TP53 (17p13.1)

La sonda TP53 mide 83 kb, está marcada en rojo y cubre una región 5' de 15 kb del extremo TP53 y se extiende por 67 kb proximales al gen, hasta pasar el marcador D17S655. La mezcla de sondas también contiene una sonda de control para el centrómero 17 (D17Z1). Por lo tanto, en la célula normal debería haber dos señales rojas y dos señales verdes (2R, 2G), mientras que una célula con detección tiene sólo una señal roja y dos controles verdes (1R, 2G).

MYB (6q23.3)

La sonda MYB mide 185 kb, está marcada en rojo y cubre todo el gen MYB y 138 kb más allá en dirección 5'. La mezcla de sondas también contiene una sonda de control para el centrómero 6 (D6Z1). Por tanto, en la célula normal debería haber dos señales rojas y dos señales verdes (2R, 2G), mientras que una célula con detección tiene sólo una señal roja y dos controles verdes (1R, 2G).

Fisión de IGH (14q32)

La región constante del gen está marcada en rojo y el segmento variable está marcado en verde. La situación normal está representada por la fusión o yuxtaposición próxima de las señales roja y verde (2Y), mientras que el reordenamiento del gen es detectable por la separación de dichas señales (1Y, 1G, 1R). Esta sonda detectará tales reordenamientos de las células en interfase y también en las células que están en división.

IGH/CCND1 (14q32/11q13.3)

Los segmentos constante y variable del gen IGH están cubiertos por contigs (contigs) verdes de la sonda. La mezcla de sondas CCND1 contiene una sonda 3' de CCND1 que cubre la región entre los dos marcadores D11S2663 y D11S4095, mide 157 Kb, (141 Kb desde CCND1) y una segunda sonda (161 Kb) que cubre CCND1 y la región hasta el extremo 3' de FGF3. Ambas están marcadas en rojo. En la célula normal estas sondas aparecen como manchas discretas rojas y verdes, una para cada homólogo (con una conformación 2G 2R). En un paciente con la t (11;14) la sonda de la región constante de IGH se superpone a la sonda que cubre el gen CCND1 y viceversa, lo que da lugar a dos señales de fusión (amarillas) además de las señales roja y verde de los cromosomas normales 11 y 14 respectivamente (1R 1G 2Y).

IGH/BCL2 (14q32/18q21.3)

El panel CLL contiene una sonda verde que cubre los segmentos constante y variable del gen IGH, y una sonda contig que mide 605 Kb, que cubre los genes BCL2 y FV1T1 en el cromosoma 18 marcado en rojo. En la célula normal estas sondas aparecen como manchas discretas rojas y verdes, una para cada homólogo (con una conformación 2G 2R). En un paciente con la t (14;18) la sonda de la región constante de IGH se superpone a la porción proximal del contig BCL2 y viceversa, lo que da lugar a dos señales de fusión (amarillas) además de las señales roja y verde de los cromosomas normales 18 y 14 respectivamente (1R 1G 2Y).

Material proporcionado

Cada kit contiene los siguientes reactivos, los suficientes para 2 (Nº de cat. PMP018), 5 (Nº de cat. PMP017) o 10 (Nº de cat. PMP016) muestras:

- 2, 5 ó 10 Slides Chromoprobe Multiprobe - CLL recubiertos con sondas marcadas directamente.
- 4, 7 ó 12 Porta de cristal con plantilla especial
- 500µl Solución de hibridación B: Formamida, sulfato de dextrano, SSC
- 500µl Solución de contraste: DAPI (ES : 0.125µg/ml DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol)), Antifade
- 1 Termómetro de superficie de Cytocell
- 1 Cámara de Hibridación de Chromoprobe Multiprobe de Cytocell

Advertencias 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. Manipular con cuidado; utilizar guantes y bata de laboratorio. Al eliminarla, rociar con gran cantidad de agua.
4. La DAPI y PI puede producir cáncer. Manipular con cuidado; utilizar guantes y bata de laboratorio. Al eliminarla, rociar con gran cantidad de agua.
5. Las sustancias peligrosas deben eliminarse de acuerdo con las instrucciones de su institución en relación con la eliminación de sustancias peligrosas.

Almacenamiento y manejo

El kit Chromoprobe Multiprobe System debe almacenarse a 2-8 °C hasta la fecha de caducidad que se indica en la etiqueta del kit. **No congelar.** El vial de contraindicación debe almacenarse en un lugar oscuro.

Equipo necesarios pero no proporcionados

- a) Placa caliente con control preciso de temperatura hasta 80°C
- b) Incubadora a 37°C
- c) Micropipetas de volumen variable (rango 1µl -200µl)
- d) 37°Baño de agua a 37° (sin agitador)
- e) Tubos de microcentrifugado (0,5 ml)
- f) Baño de agua con control preciso de temperatura a 72°C
- g) Microscopio de fluorescencia
- h) Recipientes de cristal o de plástico
- i) Centrifugador
- j) Pinzas
- k) Microscopio de fluorescencia con objetivo de inmersión en aceite
- l) Cubre de cristal para fluorescencia (24 x 50 mm)

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 ambos fluorocromos.

Preparación de la muestra

El Chromoprobe Multiprobe System está diseñado para su uso en células sanguíneas periféricas o de médula ósea cultivadas y fijadas en Carnoy que debe prepararse de acuerdo con las instrucciones del laboratorio o la institución. Preparar las muestras en los porta de Cytocell Chromoprobe Multiprobe según el protocolo de Cytocell que se expone más adelante. No es recomendable calentar o envejecer los porta ya que puede reducir la señal de fluorescencia.

Protocolo de Chromoprobe Multiprobe

1. Preparación del porta

- i. Limpiar el porta
- Empape el porta durante 2 minutos en metanol 100% y seque con un papel limpio.

ii. Establecer el índice mitótico correcto

Es importante que la muestra prevista tenga un índice mitótico suficientemente alto para permitir la detección de las anomalías cromosómicas. Para comprobar la densidad de la muestra utilizando una micropipeta (p. ej. una Gilson P10 o P20) ponga 4µl de la suspensión celular en una de las áreas del porta plantiALL y deje secar al aire. El volumen pequeño utilizado significa que normalmente tiene que tocar suavemente el porta con la punta de la pipeta para transferir la suspensión. Examine con el microscopio de contraste de fases.

•Si la densidad celular es muy elevada, diluya la suspensión con fijador.
•Si el índice mitótico es muy bajo, centrifuge la suspensión celular fijada a 160g durante 10 minutos. Observe el volumen de sobrenadante, elimínelo y vuelva a suspender el pellet en un volumen menor de fijador.
•Si la concentración de la muestra ha sido alterada, extienda 4µl de la muestra en otro cuadrado del porta y vuelva a examinar en el microscopio de contraste de fases.

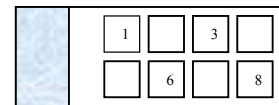
Nota: 50µl es el volumen mínimo necesario para el protocolo.

iii. Control de calidad de las muestras

Debe examinar la presencia de citoplasma en las muestras, puesto que interferirá con el protocolo *in situ*. Si los cromosomas aparecen encerrados por un material granulado cuando los examina en el microscopio de contraste de fases, comprometerá los resultados. Un método para reducir el citoplasma es sembrar 4 µl de la muestra en el porta y mirar cómo se extiende el fijador. En una situación normal, el fijador se extiende al máximo, retrocede y por último se evapora. Para limpiar restos de citoplasma se alcanzan resultados efectivos si se deja caer una gota de fijador 3:1 en la muestra, justo en el punto en que el fijador ha alcanzado su extensión máxima. Deje que la gota de fijador se evapore y vuelva a examinar la muestra.

iv. Sembrado del porta

Añada 4 µl de la suspensión celular en las 8 áreas del porta en una secuencia de cuadrados alternos, tal como se muestra a continuación. Esto evitará que las extensiones celulares interfieran entre sí.



Una vez seco el primer grupo de gotas siembre los espacios restantes con gotas de 4µl de la misma manera. Después de haber secado el porta, el examen del mismo en contraste de fases revelará si falta alguno de los cuadrados.

Si falta alguno de los cuadrados o estos tienen muy pocas células, siémbrelas de nuevo: no es necesario volver a extender un nuevo porta.

Si durante el examen del porta un cuadrado no tiene suficientes células / metafases, se pueden añadir más gotas de suspensión para aumentar la densidad celular.

Nota: Si las células en metafase aparecen demasiado extendidas, limpie el porta con metanol y vuelva a sembrar dejando que cada extensión se seque antes de pasar a la siguiente

2. Preparación del slide y del porta

- i. Asegúrese de que la Chromoprobe Multiprobe Hybridisation Chamber está en un baño de agua a 37°C estable (+/- 1°C). (Esto puede durar una hora si el baño de agua se calentó a partir de agua fría).
- ii. Mezcle la solución de hibridación mediante pipeteo precaliente y precaliente una porción alícuota de 25µl por slide a 37°C. Precaliente también cada slide a 37°C colocando la etiqueta del slide **abajo**.
- iii. **No toque las superficies salientes del slide.**
- iv. Lave los porta que contienen las muestras fijadas en 2 x SSC durante 2 minutos a temperatura ambiente (20-25°C).
- v. Mientras el slide continúa a 37°C, deshidrate los porta que contienen las muestras fijadas mediante una serie de etanol (2 minutos cada una a 70%, 85% y etanol puro), seque y caliente a 37°C.
- vi. Añada 2µl de la solución de hibridación precalentada utilizando una micropipeta P10, a cada una de las ocho áreas del slide precalentado mientras se mantiene la temperatura de 37°C.

3. Colocación del porta sobre el slide

- i. Invierta con cuidado el porta sobre el slide de manera que el número 1, que ahora está al revés, quede situado sobre la parte superior derecha del slide (Figura 1).
- ii. Asegúrese de que el porta está cuidadosamente alineado con las áreas correspondientes del slide. Baje con cuidado el porta del slide de modo que las gotas de la solución de hibridación estén en contacto con el porta. Presione suave y uniformemente para asegurarse de que la solución de hibridación se extiende hacia los bordes de cada una de las áreas elevadas en el slide.
- iii. Levante el porta, sujetando cuidadosamente la parte esmerilada del porta de cristal e inviértalo de modo que el porta se sitúe debajo del slide. Asegúrese de que el slide no roza con el porta ya que esto podría causar la contaminación cruzada de las sondas.
Colóquelo a 37°C (+/- 1°C) (placa caliente o incubador) durante 10 minutos.
- iv.

4. Instrucciones de uso del Termómetro de superficie de Cytocell

La temperatura de la placa caliente debe comprobarse con el Cytocell Slide Surface Thermometer antes de proceder a la desnaturalización.

Este termómetro es un slide de cristal líquido y aunque es reutilizable debe tratarse con cuidado para garantizar una vida útil razonable. El termómetro sólo debe utilizarse para controlar la temperatura de una placa caliente; no debe usarse para controlar el rendimiento de la placa caliente en el tiempo.

Para utilizar el termómetro correctamente, colóquelo en la superficie de la placa caliente y espere hasta que los distintos segmentos cambien de color. La temperatura correcta se indica con color verde pálido/dorado. Cuando los segmentos aparecen granulados y los colores no aparecen uniformes y regulares deberá cambiar el termómetro, puesto que ya no funciona correctamente. La duración de vida de cada termómetro debería ser, sin embargo, suficiente para un kit de diez slides.

5. Desnaturalización

Un bloque de termociclador de PCR NO es adecuado para utilizar en este procedimiento en lugar de una placa caliente de base sólida.

Transfiera el porta/slide a la placa caliente poniendo especial cuidado para mantenerlo nivelado. (Compruebe que el porta de la muestra hace contacto con la placa caliente). Desnaturalice en la placa caliente a 75°C (+/- 1°C) **durante 2 minutos.**

6. Hibridación

Coloque el porta/slide en la cámara de hibridación Chromoprobe Multiprobe suministrada, ponga la tapa e introduzca la cámara en el baño de agua a 37°C (+/- 1°C) (sin agitación) durante la noche.

Nota: No selle la tapa de la cámara de hibridación.

No tape el baño de agua.

No hidrate en una incubadora.

Asegúrese de que la cámara de hibridación está completamente seca (es decir, sin agua ni papel húmedo dentro de la cámara).

La humedad interior de la cámara es imprescindible para una hibridación óptima. Los niveles correctos se alcanzarán siguiendo estos pasos.

7. Baños posthibridación intensos

- i. Preparación de las soluciones de lavado intenso
 1. Solución 1: Prepare un recipiente de Hellingdahl que contenga 0,4 x SSC. Colóquelo en un baño de agua y deje que alcance los 72°C (+/- 1°C)-ajuste el pH a 7,0.
 2. Solución 2: Prepare un recipiente de Hellingdahl que contenga 2 x SSC y un 0,05% Tween 20. Déjelo a temperatura ambiente.
Compruebe la temperatura y el pH de las soluciones en su recipiente y ajústelos si fuese necesario. El pH debe ser 7,0 cuando alcance la temperatura correcta.
- ii. Pasos para el lavado profundo
 1. Quite el slide cuidadosamente del porta e introduzca el porta en la solución 1 durante 2 minutos. (El slide no puede volver a utilizarse).
 2. Coloque el porta en la solución 2 durante 30 segundos. Escurre el exceso de líquido pero no lo deje secar.

Evite lavar profundamente más de dos porta al mismo tiempo.

8. Montaje y visualización de los resultados.

- i. Contraste con DAPI
 1. Coloque 20µl de DAPI a cada extremo del porta y coloque un cubre (24 x 50 mm).
 2. Seque el porta con un pañuelo o papel de filtro.
 3. Déjelo durante 10 minutos en la oscuridad antes de verlo con el microscopio de fluorescencia.

Estabilidad de los porta terminados

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

Recomendaciones de protocolo

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. La intensidad de los lavados, el pH y la temperatura son importantes puesto que un lavado poco intenso puede dar lugar a 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.

Patents and Trademarks

Chromoprobe, Cytocell and Chromoprobe Multiprobe are registered trademarks of Cytocell Ltd.

The Chromoprobe principle is covered by international patents WO9314223 and EP0623177. The design of the Multiprobe is a registered design and is also covered by a Design Patent No. 420,745.

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@cytoce.com
W: www.cytoce.com

004/2008-03-20

PI025/CE