



## Instructions For Use

REF: PMP007/ PMP008/ PMP009

### Chromoprobe Multiprobe® - T System



FOR PROFESSIONAL USE ONLY

ENGLISH/FRANÇAIS/ITALIANO/DEUTSCH/ESPAÑOL

Further information available at [www.cytocell.com](http://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.

Telomere analysis for chromosome rearrangements is very attractive as the majority of translocations involve chromosome ends and therefore an assay that targets telomeres will identify all of these with high sensitivity regardless of size. With the advent of the first generation of telomere clones (mainly cosmids 35-40 kb) and applying the Multiprobe technology, Cytocell was able to launch Chromoprobe Multiprobe®-T, a FISH based assay which allows every telomere to be investigated using only a single microscope slide per patient. A directly labelled product incorporating a second generation set of telomere PAC/BAC clones and some of the original cosmid clones has now succeeded the first generation product. The strategy involves FISH of the telomere specific probes to metaphase chromosomes. Deletions are detected by the absence of signal from the end of the cognate chromosome and trisomies by the presence of three signals. The chromosome location of the signals is immediately apparent from cytogenetic characterisation of the chromosomes and thus both balanced and unbalanced translocations can be instantly detected and accurately described.

The Multiprobe device is divided into 24 square areas, each containing a telomere specific probe for both the p arm and q arm of a chromosome (except the D and G groups). The probes are reversibly bound to a glass device, a method exclusive to Cytocell, thereby simplifying fluorescence *in situ* hybridisation by removing the need to prepare the probes. Denaturation of probe and target DNA occurs simultaneously under the device once heated. The probes are differentially labelled. The p arm probe is labelled in a fluorophore specific for the FITC spectrum and the q arm probe is labelled in a fluorophore specific for the Texas Red spectrum.

The FISH protocol incorporates co-denaturation and overnight hybridisation, followed by non-formamide rapid washes. Chromoprobe Multiprobe-T provides an effective assay for identifying telomere rearrangements, is highly specific and cost effective.

#### Material Provided

Each kit contains the following components which are sufficient for either 2 (Cat. No. PMP009), 5 (Cat. No. PMP008) or 10 (Cat. No. PMP007) patient samples:

- 2, 5 or 10 Glass Multiprobe devices coated with 42 directly labelled subtelomeric probes (minimum of 20 µg of probe per square).
- 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
- 4, 7 or 12 Large coverslips (24 mm x 60 mm)

#### 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 a solid plate and accurate temperature control up to 80°C)
- b) Variable volume micropipettes range 1 µl - 200 µl
- c) Non-stirring water bath with accurate temperature control at 37°C
- d) Water bath with accurate temperature control at 72°C
- e) Microcentrifuge tubes (0.5 ml)
- f) Fluorescence microscope (Please see Optimal microscope and filter set up section)
- g) Plastic or glass coplin jars
- h) Forceps
- i) Fluorescence grade microscope lens immersion oil
- j) Bench top centrifuge

#### Fluorescence Microscope Recommendation

For optimal visualisation of the probe we recommend a 100-watt mercury lamp and plan apochromat objectives x63 or x100. The Triple bandpass filter DAPI/FITC/Texas Red is optimal for viewing all three fluorophores simultaneously.

#### Sample Preparation

The Chromoprobe Multiprobe System is designed for use on cultured peripheral blood cells fixed in Carnoy's fixative, which should be prepared according to the laboratory or institution guidelines. Prepare blood metaphase spreads on Cytocell Chromoprobe Multiprobe template slides according to Cytocell protocol below. Baking or otherwise ageing of 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. Establish correct cell density  
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.  
**Please Note: 50 µl is the minimum volume required for the Multiprobe device protocol.**
- iii. Quality control of samples  
Samples should be examined for cytoplasm since this will interfere with the final FISH results. One method for reducing cytoplasm is to spot 2 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 spread. Allow the second drop of fixative to evaporate and re-examine the spot.

- iv. Spotting of slide  
Pipette 2 µl of cell suspension onto all 24 areas following the method outlined below.

**Please Note:** If samples are of excellent quality, it is important that each spot is allowed to dry before proceeding to the next. If samples exhibit a degree of cytoplasmic contamination, however, then spotting the samples one after the other in the manner described below may help.

The spotting sequence of alternating squares shown below should be adhered to so that the drops of suspension do not interfere with each other as they spread.

1	3	5	7	
10	12	14	16	
17	19	21	X	

Once the first group of drops has air-dried, spot the remaining squares with 2µl 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 and they can be respotted.

If the metaphase cells appear overspread, if there are chromosomes randomly scattered, then allow every spot to dry before proceeding to the next.

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

##### 2. Preparation of Multiprobe device and template slide

- i. Place the Chromoprobe Multiprobe Hybridisation Chamber in a 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 30 µl aliquot per Multiprobe device to 37°C (+/- 1°C) (hotplate or incubator). Also pre-warm Multiprobe device to 37°C (hotplate or incubator) by placing device **label side down**.  
**Do not touch the raised boss surfaces of the Multiprobe device.**
- iii. Wash spotted template slide in 2 x SSC for 2 minutes at room temperature (20°C - 25°C).
- iv. Whilst the Multiprobe device is still at 37°C, dehydrate template slide through an ethanol series (2 minutes each at 70%, 85% and absolute ethanol), air dry and place at 37°C (hotplate or incubator) to warm.
- v. Add 1 µl of pre-warmed hybridisation solution (using a P10 micropipette) to each of the raised bosses of the Multiprobe device while it remains at 37°C.

##### 3. Positioning of template slide over Multiprobe

- i. Carefully invert the template slide so that square 1 is located over the top right hand area of the Multiprobe, marked in yellow (Figure 1).
- ii. Make sure that the template slide is carefully aligned over the matching areas on the Multiprobe device. Carefully lower the slide over the Multiprobe so that the drops of hybridisation fluid make contact with the slide. Apply gentle, even pressure to ensure that the hybridisation fluid is spread to the edges of each of the raised areas on the Multiprobe.

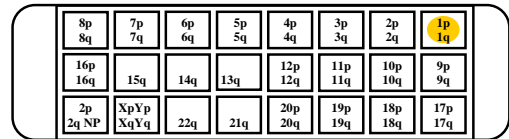


Figure 1. Location of telomeric probes on Multiprobe bosses.

- iii. Lift the slide / Multiprobe carefully and invert so that the slide is under the Multiprobe. 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

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

The liquid crystal thermometer must only be used to check the temperature of a hotplate, it must not be used to monitor the hotplate performance over extended time. 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 lifespan of each thermometer should, however, easily be sufficient for a ten Multiprobe 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 / Multiprobe device to the 75°C 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 / Multiprobe device in the prewarmed Chromoprobe Multiprobe Hybridisation Chamber, 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. (ie. no water or damp tissue inside the chamber).

##### 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 (20°C - 25°C).

**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 Multiprobe device carefully from the template slide and place the slide in Solution 1 for 2 minutes. (The Multiprobe device cannot be re-used).
2. Place the slide into Solution 2 for 30 seconds.

**Avoid processing more than two Multiprobe slides through the stringency washes at any one time.**

##### 8. Mounting and visualisation of results

- i. Drain off excess solution by placing the slide on its edge on a tissue for around 20 seconds.  
**Do not allow to dry.**
- ii. Add one 20µl drop of DAPI-Antifade solution to both ends of the slide and apply a large (24mm x 60mm) coverslip, as provided, slowly to avoid the formation of air bubbles.
- iii. Blot with a piece of filter paper / tissue.
- iv. Leave for 10 minutes in the dark before viewing by fluorescence microscopy.
- v. Certain types of microscope have slide holders which make it difficult to view the extreme ends of the slide. If this occurs then simply turn the slide through 180° which will help with the viewing of the slide.

The probes used on the Multiprobe device are directly labelled with fluorophores which are light sensitive. Results are improved when the probes are exposed to minimal amounts of light during these procedures; however, it is not necessary to work in the dark.

#### Stability of Finished Slides

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

#### Procedural Recommendations

- The use of a calibrated thermometer is strongly recommended for measuring temperatures of solutions, waterbaths, and incubators, as these temperatures are critical for optimum product performance.
- The wash concentrations (stringency), pH and temperature are important, as low stringency can result in non-specific binding of the probe and too high stringency can result in a lack of signal.

#### Expected Results

- For all chromosomes except the acrocentric D & G group chromosomes, a normal sample will show 2 green (p-arm) and 2 red (q-arm) signals on the respective ends of the chromosome. For acrocentric chromosomes, a normal sample will show red signals on the q-arms only.
- \* The 2q PAC (d10i1017) detects the common polymorphism described by Macina *et al* in 1994. Should a 2q deletion be detected studies have stressed the importance of testing the deletion by FISH using a second probe mapping to the region (Fan *et al* 2001) and to test the parents to determine its inheritance (Knight *et al* 2000). To this end, the second 2q BAC, 172113, D2S447 which is more proximal and labelled in red, has been incorporated on square Y of the device. It is supplied with a control probe (2pter) labelled in green. It must be stressed, however, that although further studies have been facilitated by the provision of the second clone on square Y of the device, any apparent 2q deletions must be followed-up with testing of other family members to prevent the misinterpretation of a clinically significant distal 2q deletion as a polymorphism or normal variant.

#### Template slide layout with probe cross-hybridisation and polymorphism details.

Template slide square	Probe	Probe label	Cross-hybridisation and polymorphism of probe clones
1	1p	green	
	1q	red	
2	2p	green	
	2q	red	2q polymorphism*⊗
3	3p	green	
	3q	green	
4	4p	green	
	4q	red	
5	5p	green	
	5q	red	
6	6p	green	
	6q	red	
7	7p	green	
	7q	red	
8	8p	green	8p with 1p and 3q
	8q	red	
9	9p	green	
	9q	red	
10	10p	green	9q with 10p and 16p, 18p, XqYq
	10q	red	
11	11p	green	11p with 17p
	11q	red	11q with 12q (interstitial)
12	12p	green	12p with 6p, 20q
	12q	red	
13	13q	red	
14	14q	red	14q with 16p11.2
15	15q	red	
16	16p	green	
	16q	red	
17	17p	green	
	17q	red	17q with 1p, 5q, 6q and 11p
	18p	red	
18	18q	red	
	19p	green	19p occasionally with 20q
19	19q	red	
	20p	green	
20	20q	red	20q with 6p
	21q	red	
21	21q	red	22q with 2q (interstitial)
22	XpYp**	green	
X	XqYq***	red	
	2p	green	
Y	2q NP	red	non-polymorphic*

\* See the "Expected Results" paragraph for more details.

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

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

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

#### Customer Support

Please contact the CytoCell Sales and Marketing Department by telephone or e-mail. probes@cytozell.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.

L'analyse des réarrangements subtelomériques est une analyse très attrayante du fait du grand nombre de translocations impliquant les extrémités des chromosomes. Un test ciblant les extrémités subtelomériques permettra donc d'identifier ces réarrangements avec une grande sensibilité quelle que soit leur taille. Avec l'avènement d'un premier set de sondes subtelomériques (principalement des cosmides 35-40 kb) et l'utilisation de la technologie Multiprobe, CytoCell a lancé le Chromoprobe Multiprobe®-T, un test basé sur la technique FISH qui permet l'investigation de chaque subtelomère en utilisant une seule lame par patient. Une seconde version du produit incorporant des sondes directement marquées et un nouveau set de sondes subtelomériques (PAC/BAC et quelques clones originaux) a remplacé le produit de première génération. Les délétions sont détectées par l'absence de signal à l'extrémité du chromosome analysé et les trisomies par la présence de 3 signaux de même couleur. La caractérisation cytogénétique des chromosomes permet une localisation immédiate des signaux, ainsi les translocations équilibrées et non équilibrées peuvent être détectées instantanément et décrites avec précision.

Le dispositif Multiprobe est divisé en 24 cases, chaque case est coâtée avec les sondes subtelomériques spécifiques pour le bras court et le bras long d'un chromosome (sauf pour les groupes D et G). Les sondes sont réversiblement coâtées sur le dispositif en verre, une méthode exclusive à CytoCell, simplifiant ainsi l'hybridation *in situ* en éliminant le besoin de préparer la sonde. La dénaturation de la sonde et de l'ADN cible se fait simultanément sous le dispositif à feu chauffé. Les sondes sont marquées différemment : les bras courts en vert (spectre FITC) et les bras longs en rouge (spectre Texas Red). Le protocole de FISH inclut une co-dénaturation et une hybridation pendant une nuit suivie par des lavages sans utilisation de formamide.

#### Conditionnement

Chaque kit contient les composants suivants pour tester 2 (Réf. PMP009), 5 (Réf. PMP008) ou 10 (Réf. PMP007) échantillons.

- 2, 5 ou 10 Dispositifs Multiprobe en verre coâtés avec 42 sondes subtelomériques directement marquées (20 ng minimum de sonde par case).
- 4, 7 ou 12 Lames en verre imprimées (24 cases)
- 500µl Hybridation Solution B (solution d'hybridation) : Formamide, Sulfate de Dextran, SSC
- 500µl Contre-colorant : DAPI (ES : 0,125 µg/ml DAPI / Antifade (4,6-diamidino-2-phenylindole))
- 1 Slide Surface Thermometer
- 1 Chromoprobe Multiprobe Hybridation Chamber
- 4, 7 ou 12 Grandes lamelles (24 mm x 60 mm)

#### Avertissements et Précautions

- Pour utilisation en diagnostic *in vitro*. Pour usage professionnel uniquement.
- Porter des gants lors de la manipulation des sondes ADN et du contre-colorant DAPI.
- La 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.
- Le DAPI est un carcinogène potentiel. Manipuler avec précautions. Porter des gants et une blouse de laboratoire. Après élimination, rincer abondamment avec de l'eau.

- Toutes matières dangereuses doivent être éliminées selon les réglementations en vigueur dans votre institution pour l'élimination des déchets dangereux.

#### Conservation et Manipulation

Le kit 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

- Plaque chauffante (avec bloc et contrôle de la température jusqu'à 80°C)
- Micropipettes 1 µl – 200 µl
- Bain-marie sans agitation avec contrôle de la température à 37°C
- Bain-marie avec contrôle de la température à 72°C
- Tubes à microcentrifugation (0,5 ml)
- Microscope à fluorescence
- Jarres en plastique ou en verre
- Forceps
- Huile à immersion pour microscope à fluorescence
- Centrifugeuse de paillasse

#### Microscopie et Filtres

Pour une visualisation optimale de la sonde, nous recommandons l'utilisation d'une lampe à mercure de 100 watts et d'objectifs plan apochromatiques x63 ou x100. Le filtre triple bande DAPI/FITC/Texas Red est optimal pour la visualisation des 2 fluorochromes simultanément.

#### Préparation des échantillons

Le kit Chromoprobe Multiprobe a été conçu pour utilisation sur des cellules du sang périphérique cultivées et fixées avec le fixateur de Carnoy et doivent être préparées selon les protocoles en vigueur dans le laboratoire ou institution. (Voir la section Solutions ci-dessus). Préparer les étalements métaphasiques sur les lames en verre Chromoprobe Multiprobe selon le protocole CytoCell ci-dessus. 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

- Nettoyage de la lame échantillon  
Plonger la lame échantillon dans un bain méthanol 100% pendant 2 minutes et sécher avec un tissu doux.
- Établir une densité cellulaire correcte  
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 160g pendant 10 minutes. Noter le volume de surnageant, éliminer ce surnageant et resuspendre le culot dans un plus faible 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 effectuer un test avec le Multiprobe.**
- Contrôle qualité des échantillons  
Les échantillons doivent être examinés afin de s'assurer de l'absence de cytoplasme, le cytoplasme pouvant interférer avec les résultats du FISH. Une méthode pour réduire le cytoplasme consiste à déposer 2 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 2ème goutte évaporer et examiner de nouveau le dépôt.
- Préparation de la lame échantillon  
Déposer 2 µl de suspension cellulaire sur chacune des 24 cases de la lame en suivant la méthode décrite ci-dessus.

**Remarque : Si les échantillons sont d'excellente qualité, il est important que chaque dépôt sèche avant de déposer le suivant. Si les échantillons sont contaminés par du cytoplasme, dans ce cas cependant, déposer les échantillons dans les cases l'un après l'autre comme décrit ci-dessus peut être bénéfique.**

Il est important de suivre la méthode de dépôt de l'échantillon en quinconce (ci-dessous) afin que les gouttes de suspension cellulaire n'interfèrent pas entre elles lors de leur étalement.

1	3	5	7
10	12	14	16
17	19	21	X

Lorsque le premier groupe de gouttes a séché, déposer de la même façon 2 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, un dépôt peut être ré-éffectué.

Si les cellules métaphasiques apparaissent sur-étalées ou s'il y a des chromosomes éparpillés, laisser sécher le dépôt avant de passer au suivant.

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.

##### 2. Préparation du dispositif Multiprobe et de la lame échantillon

- Mettre le Chromoprobe Multiprobe Hybridation Chamber dans un bain-marie à 37°C et laisser équilibrer à 37°C (+/- 1°C) (Il faut environ 1 heure lorsque le bain-marie est froid).
- Homogénéiser la solution d'hybridation en pipetant plusieurs fois. Préchauffer un aliquote de 30 µl de solution d'hybridation par dispositif Multiprobe à 37°C (+/- 1°C) (plaque chauffante ou incubateur). Préchauffer également le dispositif Multiprobe à 37°C (plaque chauffante ou incubateur) en veillant à ce que le côté étiqueté soit placé au-dessous.  
**Ne pas toucher la surface des cases du dispositif Multiprobe.**
- Laver la lame échantillon dans du tampon 2 x SSC à température ambiante (20°C – 25°C) pendant 2 minutes.
- Alors que le dispositif Multiprobe est toujours à 37°C, déshydrater la lame échantillon dans une série de bains éthanol (2 minutes dans chaque bain, 70%, 85% et éthanol absolu). Laisser sécher et préchauffer en plaçant à 37°C (plaque chauffante ou incubateur).
- Déposer 1 µl de solution d'hybridation préchauffée (pipette P10) sur chaque case du dispositif Multiprobe. Laisser le dispositif Multiprobe sur la plaque chauffante à 37°C durant cette opération.

##### 3. Positionnement de la lame échantillon sur le dispositif Multiprobe

- Retourner délicatement la lame échantillon sur le dispositif Multiprobe afin que la case marquée 1 soit en ligne avec la case marquée en jaune en haut à droite du dispositif Multiprobe (Figure 1).
- Veillez à ce que la lame échantillon soit alignée avec précautions sur les cases complémentaires du dispositif Multiprobe. Appliquer la lame échantillon sur le dispositif Multiprobe 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 Multiprobe.
- Retourner délicatement l'ensemble lame échantillon/dispositif Multiprobe de façon à ce que la lame échantillon soit en dessous du dispositif Multiprobe. S'assurer que le dispositif ne glisse pas, ceci pourrait entraîner des contaminations croisées entre les sondes.
- Placer l'ensemble lame échantillon/dispositif Multiprobe à 37°C (+/- 1°C) (plaque chauffante ou incubateur) pendant 10 minutes.

##### 4. Utilisation du CytoCell Slide Surface Thermometer

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

Le thermomètre à cristaux liquides 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. Placer le thermomètre sur la plaque chauffante et attendre que les segments chiffrés arrêtent de changer de couleur. La bonne température est indiquée par une couleur vert pâle/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 être suffisante pour l'utilisation d'un kit Multiprobe de 10 tests.

## 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 Multiprobe sur une plaque chauffante à 75°C 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 Multiprobe dans la chambre d'hybridation préchauffée au bain-marie. Remettre le couvercle sur la chambre d'hybridation et la laisser 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.  
Veuillez vous assurer que la chambre d'hybridation soit bien sèche. (aucune eau ou tissu humide à l'intérieur de la chambre).

## 7. Lavages stringents de post-hybridation

- Préparation des solutions de lavages stringents
  - Solution 1 : préparer une jarre 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.
  - Solution 2 : préparer une jarre Coplin/Hellendahl 2 x SSC et 0,05% Tween 20. Laisser équilibrer à température ambiante (20°C - 25°C).

Vérifier la température et le pH des solutions des jarres Coplin et ajuster si nécessaire. Le pH doit être de 7,0 lorsque les solutions sont à la bonne température.

- Lavages stringents
  - Retirer doucement le dispositif Multiprobe de la lame échantillon. Placer la lame échantillon dans la Solution 1 pendant 2 minutes. (Le dispositif Multiprobe ne peut pas être ré-utilisé).
  - Placer la lame échantillon dans la Solution 2 pendant 30 secondes.

Éviter de traiter plus de 2 lames Multiprobe à la fois lors de l'étape de lavages stringents.

## 8. Montage et visualisation

- Éliminer l'excès de solution en mettant la lame sur le côté sur un papier absorbant.  
**Ne pas laisser sécher.**
- Déposer 20 µl de DAPI-Antifade aux 2 extrémités de la lame et appliquer délicatement une grande lamelle (24 mm x 60 mm) pour empêcher la formation de bulles d'air.
- Sécher avec un papier absorbant.
- Laisser la coloration développer dans l'obscurité pendant 10 minutes avant visualisation.
- Certains microscopes ont des portoirs à lames ce qui peut rendre difficile la visualisation des extrémités de la lame. Si c'est le cas, retourner simplement la lame de 180°.

Les sondes utilisées sur le dispositif Multiprobe sont directement marquées avec des fluorochromes qui sont photosensibles. Les résultats sont meilleurs lorsque les sondes sont exposées le moins possible à la lumière lors des différentes étapes du protocole; cependant, il n'est pas nécessaire de travailler dans l'obscurité.

## Stabilité des lames

Les lames FISHees sont analysables pendant un mois si elles sont conservées dans l'obscurité et à ou en dessous de la température ambiante.

## Recommandations

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

## Interprétation des résultats

- Pour tous les chromosomes exceptés les acrocentriques des groupes D et G, 2 signaux verts (bras courts) et 2 signaux rouges (bras longs) seront observés sur les extrémités respectives du chromosome pour un échantillon normal. Pour les chromosomes acrocentriques, 2 signaux rouges seulement seront observés sur les
- \* Le PAC 2q (d11011017) détecte le polymorphisme commun précédemment observé avec le cosmid (2112b2), décrit pour la première fois par Macina *et al* en 1994. Si une délétion 2q est détectée, cependant, des études ont montré l'importance de tester la délétion par FISH en utilisant une deuxième sonde localisée dans la région (Fan *et al* 2001) et de tester les parents afin de déterminer son hérédité (Knight *et al* 2000). A cette fin, un deuxième BAC 2q, 172113, D2S447 qui est plus proximal et marqué en rouge, a été incorporé sur la case Y du dispositif Multiprobe. Comme pour les autres cases, une sonde de contrôle (Pter) marquée en vert a été ajoutée sur la case Y. Il doit être noté, cependant, que bien que d'autres études ont été facilitées par l'apport du deuxième clone sur la case Y du dispositif, toute délétion apparente du 2q doit être suivie par l'analyse d'autres membres de la famille afin d'empêcher une mauvaise interprétation d'une délétion 2q distale cliniquement significative comme étant un polymorphisme ou un variant normal.

## Support Client

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

## Hybridations croisées et polymorphismes associés aux sondes subclonées

Case de la lame échantillon	Sonde	Couleur de la sonde	Hybridations croisées et polymorphismes connus
1	1p	vert	
	1q	rouge	
2	2p	vert	
	2q	rouge	polymorphisme 2q *⊗
3	3p	vert	
	3q	rouge	
	4p	vert	
	4q	rouge	
4	5p	vert	
	5q	rouge	
6	6p	vert	
	6q	rouge	
7	7p	vert	
	7q	rouge	
8	8p	vert	8p avec 1p et 3q
	8q	rouge	
9	9p	vert	
	9q	rouge	9q avec 10p et 16p, 18p, Xq,Yq
10	10p	vert	
	10q	rouge	
11	11p	vert	11p avec 17p
	11q	rouge	11q avec 12q (interstitiel)
12	12p	vert	12p avec 6p, 20q
	12q	rouge	
13	13q	rouge	
14	14q	rouge	14q avec 16p11.2
15	15q	rouge	
16	16p	vert	
	16q	rouge	
17	17p	vert	
	17q	rouge	17q avec 1p, 5q, 6q et 11p
	18p	vert	
18	18q	rouge	
	19p	vert	19p occasionnellement avec 20q
	19q	rouge	
	20p	vert	
20	20q	rouge	20q avec 6p
	21q	rouge	
21	22q	rouge	22q avec 2q (interstitiel)
22	XpYp**	vert	
X	XqYq***	rouge	
	2p	vert	
	2q NP	rouge	non-polymorphe *

\* Voir le paragraphe "Interprétations des résultats" pour plus d'informations

⊗ Voir Knight S. and Flint J. (2000) *J Med Genet* 37: 401-409 et Fan Y *et al.* (2001) *Genet in Med* 3 (6) : 416-421 pour de plus amples informations sur ce polymorphisme

\*\* Cette sonde est spécifique pour les bras courts des chromosomes X et Y

\*\*\* Cette sonde est spécifique pour les bras longs des chromosomes X et Y.

## 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 l'annealing con una sonda di DNA a singola elica, a sequenza complementare, marcata con una sostanza fluorescente. Terminata l'ibridazione, la sonda di DNA non legata o legata in modo non specifico è rimossa per mezzo di lavaggi stringenti ed il DNA è colorato con un colorante di contrasto. L'ibridazione della sonda viene infine analizzata con un microscopio a fluorescenza.

L'analisi telomerica per la rivelazione dei riarrangiamenti cromosomici è molto interessante in quanto la maggior parte delle traslocazioni coinvolge le estremità dei cromosomi. Un saggio mirato ai telomeri sarà in grado di identificarne la maggior parte con elevata sensibilità, indipendentemente dalla dimensione del riarrangiamento stesso. Con la comparsa della prima generazione di cloni telomerici (costituiti principalmente da cosmid di 35-40 kb) e con l'applicazione della tecnologia Multiprobe, Cytocell è stata in grado di lanciare Chromoprobe Multiprobe-®-T, un saggio basato sulla FISH in grado di analizzare ogni telomero utilizzando unicamente un vetrino da microscopio per paziente. La prima generazione di prodotti è stata soppiantata da un kit caratterizzato da cloni marcati direttamente (PAC/BAC ed alcuni cosmid). La strategia prevede l'utilizzo della tecnica FISH, con sonde specifiche per i telomeri, applicata a cromosomi in metafase. Eventuali delezioni sono rivelate dall'assenza di segnale all'estremità del cromosoma associato mentre le trisomie sono evidenziate dalla presenza di tre segnali. La localizzazione cromosomica dei segnali è dettata in modo immediato dalla morfologia dei cromosomi e, tutte le traslocazioni bilanciate e sbilanciate possono essere quindi rivelate e descritte in modo accurato.

Il dispositivo Multiprobe è diviso in 24 aree quadrate, ognuna contenente una sonda specifica per entrambi i bracci p e q del telomero di un cromosoma (eccetto per i gruppi D e G). Le sonde sono legate reversibilmente ad un dispositivo di vetro, un metodo esclusivo Cytocell, il che semplifica l'ibridazione *in situ* in fluorescenza rendendo evitando la preparazione delle sonde. La denaturazione della sonda e del DNA bersaglio avviene simultaneamente riscaldando il dispositivo una sola volta. Le sonde sono marcate in modo diverso. La sonda relativa al braccio p è marcata in un fluorocromo specifico per lo spettro FITC mentre quella relativa al braccio q è marcata in un fluorocromo specifico per lo spettro Texas Red. Il protocollo FISH incorpora la co-denaturazione e l'ibridazione per tutta la notte, seguita da lavaggi rapidi in assenza di formamide.

Chromoprobe Multiprobe-T fornisce un saggio efficiente per l'identificazione dei riarrangiamenti dei telomeri, è altamente specifico e con un costo conveniente.

## Materiale fornito

Ogni kit contiene i componenti elencati di seguito, sufficienti per 2 (N. cat. PMP009), 5 (N. cat. PMP008) o 10 (N. cat. N. PMP007) campioni:

- 2, 5 o 10 Dispositivi di vetro Multiprobe rivestiti con 42 sonde subtelomeriche marcate direttamente (minimo 20 ng di sonda per quadrato).
- 4, 7 o 12 Vetrini stampati con un reticolo speciale
- 500 µl Soluzione di ibridazione B: Formamide, Destrano solfato, SSC
- 500 µl Soluzione del colorante di contrasto: DAPI (ES : 0.125µl DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindole), Antifade
- 1 Cytocell Slide Surface Thermometer
- 1 Cytocell Chromoprobe Multiprobe Hybridation Chamber
- 4, 7 o 12 Vetrini coprioggetto larghi (24 mm x 60 mm)

## Avvertenze e misure precauzionali

- Per uso diagnostico *in vitro*. Per uso professionale.
- Quando si manipolano le sonde ed il colorante di contrasto DAPI è necessario indossare i guanti.
- 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.
- Il DAPI è altamente cancerogeno. Maneggiare con cura, indossare guanti ed un camice da laboratorio. Per lo smaltimento, lavare con grandi quantità di acqua.
- Eseguire lo smaltimento dei materiali pericolosi nel rispetto delle normative interne dell'istituzione relative allo smaltimento dei residui tossici.

## Conservazione e utilizzo

Conservare il kit Chromoprobe Multiprobe System a temperature comprese tra 2 e 8°C fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta. **Non congelare.** Il flaconcino del colorante di contrasto deve essere conservato al buio.

## Apparecchiature necessari non forniti

- Piastri riscaldante (con una piastra solida ed un controllo accurato della temperatura fino ad 80°C)
- Micropipette a volume variabile compreso tra 1 µl e 200 µl
- Bagno termostato privo di meccanismo di agitazione con controllo accurato della temperatura a 37°C
- Bagno termostato con controllo accurato della temperatura a 72°C
- Provette da microcentrifuga (0,5 ml)
- Microscopio a fluorescenza
- Contenitori di Coplin in plastica o vetro
- Piastrette
- Olio per lenti ad immersione del microscopio a fluorescenza
- Centrifuga da banco

## Configurazione ottimale del microscopio e dei filtri

Per una visualizzazione ottimale della sonda si raccomanda di utilizzare una lampada a mercurio da 100 watt ed obiettivi plan apochromat 63x e 100x. Il filtro triplo a passa-banda DAPI/FITC/Texas Red è ottimale per visualizzare entrambi i fluorocromi contemporaneamente.

## Preparazione del campione

Il Chromoprobe Multiprobe System è stato progettato per l'utilizzo con cellule del sangue periferico coltivate, fissate nel fissativo di Carnoy, preparato secondo le linee guida del laboratorio o dell'istituzione. Preparare sospensioni dense di cellule ematiche in metafase sui vetrini campione Cytocell Chromoprobe Multiprobe seguendo il protocollo riportato di seguito. Evitare l'essiccamento del vetrino ad alte temperature o una qualunque altra forma di invecchiamento dello stesso in quanto ciò potrebbe ridurre la fluorescenza del segnale.

## Protocolle Chromoprobe Multiprobe

## 1. Preparazione del vetrino

- Pulire il vetrino.
- Immergere il vetrino per 2 minuti in metanolo 100% ed asciugare con un tessuto pulito e soffice.
- Stabilire la corretta densità delle cellule.  
Per permettere la rivelazione di anomalie cromosomiche è importante che il campione da analizzare abbia un indice mitotico sufficientemente alto. Per verificare la densità del campione, utilizzando una micropipetta (ad es. una Gilson P10 o P20), caricare 4 µl della sospensione cellulare in una delle aree del vetrino libero e lasciarlo asciugare all'aria. A causa del ridotto volume utilizzato, è necessario che il puntale della pipetta tocchi delicatamente il vetrino per trasferire la sospensione. Esaminare con un microscopio a contrasto di fase.  
Se la densità delle cellule è troppo alta, diluire la sospensione con fissativo fresco.  
Se l'indice mitotico è troppo basso, centrifugare la sospensione di cellule fissate a 160 g per 10 minuti. Misurare il volume del supernatante, rimuoverlo e risospesione il pellet di cellule in un volume inferiore di fissativo fresco.  
Se la concentrazione delle cellule del campione è stata alterata, caricare 4µl del campione concentrato in un altro quadrato del vetrino utilizzato per il test e determinare nuovamente la concentrazione con il microscopio a contrasto di fase.  
**Nota: 50 µl è il volume minimo richiesto per il protocollo del dispositivo Multiprobe.**
- Controllo qualità dei campioni  
Esaminare il citoplasma dei campioni in quanto questo potrebbe interferire con i risultati finali FISH. Un metodo per ridurre i problemi legati alla presenza di citoplasma consiste nel caricare 2 µl di campione sul vetrino e guardare attentamente come si diffonde il fissativo. In una situazione normale, il fissativo si diffonde al massimo, si dirada e poi evapora. Per eliminare ogni traccia di citoplasma è stato rilevato che il risultato migliore si ottiene quando una goccia di fissativo fresco diluito 3:1 viene fatta cadere nel punto in cui il fissativo raggiunge il punto di diffusione massimo. Far evaporare la seconda goccia di fissativo ed esaminare nuovamente il vetrino.
- Caricamento del vetrino  
Caricare 2µl di sospensione cellulare in tutte le 24 aree seguendo il metodo esposto di seguito.

**Nota: Se i campioni sono di qualità eccellente, è importante far asciugare le gocce di sospensione prima di procedere. Se i campioni sono parzialmente contaminati da citoplasma, tuttavia, può essere di aiuto posizionare i campioni uno dopo l'altro come indicato di seguito.**

Attendersi alla sequenza alternata di caricamento dei quadrati illustrata di seguito in modo che le gocce di sospensione non interferiscano tra di loro diffondendosi.

1	3	5	7
10	12	14	16
17	19	21	X

Una volta che il primo gruppo di gocce si sono asciugate all'aria, riempire analogamente i quadrati vuoticon gocce da 2 microlitri. Quando il vetrino si è asciugato, l'esame dello stesso al microscopio a contrasto di fase rivelerà eventuali quadrati lasciati vuoti che possono essere nuovamente caricati.

Se le cellule in metafase appaiono diffuse o ci sono cromosomi sparsi a caso, aspettare che tutte le gocce si siano asciugate prima di procedere con il prossimo caricamento.

Se l'esame del vetrino rivela che un quadrato contiene una quantità di cellule/metafasi insufficiente, è possibile aggiungere ulteriori gocce di sospensione per aumentare la densità delle cellule.

## 2. Preparazione del dispositivo Multiprobe e del vetrino campione

- Inserire la Chromoprobe Multiprobe Hybridisation Chamber nel bagno termostato a 37°C e lasciare che raggiunga la temperatura fissata. (Se il bagno termostato è stato acceso da poco potrebbe essere necessaria fino ad un'ora).
- Miscelare la soluzione di ibridazione pipettando ripetutamente e pre-riscaldare a 37°C (+/- 1°C) un'aliquota da 30µl per il dispositivo Multiprobe (su piastra calda o in incubatore). Pre-riscaldare, inoltre, il dispositivo Multiprobe a 37°C (su piastra calda o in incubatore) ponendo lo stesso con l'etichetta rivolta verso il basso.  
**Non toccare le superfici sopraelevate del dispositivo Multiprobe.**
- Lavare il vetrino caricato in SSC 2x per 2 minuti a temperatura ambiente (20°C - 25°C).
- Mentre il dispositivo Multiprobe è ancora a 37°C, disidratare il vetrino con i campioni immergendolo in una scala di alcool etilico crescente (70%, 85%, etanolo assoluto; 2 minuti per diluizione), lasciarlo asciugare all'aria e quindi porlo a 37°C (su piastra calda o in incubatore).
- Aggiungere 1µl di soluzione di ibridazione pre-riscaldata (utilizzando una micropipetta P10) ad ognuna delle aree sporgenti o bossi presenti sul Multiprobe precedentemente riscaldato, mentre questo è ancora a 37°C.

## 3. Posizionamento del vetrino sul Multiprobe

- Capovolgere con cura il vetrino con i campioni in modo che il numero 1 si trovi sull'area in alto a destra del Multiprobe, marcata in giallo (Figura 1).
- Accertarsi che il vetrino sia accuratamente allineato con le aree corrispondenti sul dispositivo Multiprobe. Abbassare con cura il vetrino sul Multiprobe 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 di ognuna delle aree del Multiprobe.
- Sollevarlo con cura il dispositivo vetrino/Multiprobe e capovolgere in modo che il vetrino stesso si trovi al di sotto del Multiprobe. Accertarsi che il dispositivo non strisci lungo il vetrino in quanto questo potrebbe essere causa di contaminazione delle sonde.
- 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

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

Il termometro a cristalli liquidi deve essere utilizzato solo per verificare la temperatura della piastra riscaldante; non deve essere usato per monitorare il funzionamento della piastra per tempi prolungati.

Posizionare il dispositivo sulla superficie della piastra riscaldante 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 un kit Multiprobe di 10 saggi.

## 5. Denaturazione

**Per questa procedura non è possibile utilizzare un Termociclore per PCR al posto della piastra riscaldante.**

Trasferire il dispositivo formato dal vetrino/Multiprobe alla piastra riscaldante a 75°C facendo particolare attenzione a non inclinarlo (assicurarsi che il vetrino sia bene in contatto con la piastra). Denaturare sulla piastra a 75°C (+/- 1°C) per **2 minuti**.

## 6. Ibridazione

Porre il dispositivo vetrino/Multiprobe nella Chromoprobe Multiprobe Hybridisation Chamber pre-riscaldata, rimettere a posto il coperchio e far fluttuare la camera nel bagno termostato 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).

## 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 bagno termostato 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 (20°C - 25°C).

**Se 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.**

- Fasi del lavaggio stringente
  - Allontanare con cura il dispositivo Multiprobe dal vetrino dei campioni ed immergere il vetrino nella Soluzione 1 per 2 minuti. (Il dispositivo Multiprobe non può essere riutilizzato).
  - Immergere il vetrino nella soluzione 2 per 30 secondi.

**Evitare di effettuare i lavaggi stringenti a più di due vetrini Multiprobe alla volta.**

## 8. Preparazione del vetrino per la visualizzazione dei risultati

- Eliminare la soluzione in eccesso ponendo a contatto l'estremità del vetrino con un tessuto per circa 20 secondi.  
**Evitare che il vetrino si asciughi.**
- Aggiungere una goccia da 20 µl di soluzione DAPI-Antifade ad entrambe le estremità del vetrino e coprire lentamente con un vetrino coprioggetti largo (24 mm x 60 mm), fornito, evitando la formazione di bolle d'aria.
- Asciugare il liquido in eccesso con un pezzo di carta da filtro/tessuto.
- Lasciare al buio per 10 minuti prima di procedere alla visualizzazione con il microscopio a fluorescenza.
- 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 al buio a temperatura ambiente o inferiore.

## Raccomandazioni per l'uso

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

## Risultati attesi

- Per tutti i cromosomi (eccetto che per quelli dei gruppi acrocentrici D & G), un campione normale presenterà due segnali verdi (braccia p) e due segnali rossi (bracci q) alle rispettive estremità del cromosoma. Nel caso di cromosomi acrocentrici, un campione normale mostrerà solo segnali rossi in prossimità dei bracci q.
- La sonda 2q PAC (dj101017) è in grado di rivelare il polimorfismo comune descritto da Macina *et al* nel 1994. Alcuni studi hanno sottolineato che, nel caso in cui dovesse essere rilevata una delezione 2q, diventa importante analizzare la delezione con la tecnica FISH utilizzando una seconda sonda in grado di mappare la regione (Fan *et al* 2001) e sottoporre al test i parenti per determinarne l'ereditabilità (Knight *et al* 2000). A tal fine, sul quadrato Y del dispositivo è stata incorporata una seconda sonda, la 2q BAC, 172113, D25447, più prossimale e marcata in rosso. Questa è fornita insieme ad una sonda di controllo (2pter) marcata in verde.

È bene sottolineare, tuttavia, che sebbene ulteriori studi siano stati agevolati dalla presenza del secondo clone sul quadrato Y del dispositivo, ogni delezione apparente 2q deve essere seguita dall'analisi di altri membri della famiglia al fine di prevenire interpretazioni errate di una delezione 2q distale clinicamente significativa, che può essere considerata come un polimorfismo o una normale variante.

**Assistenza clienti**  
Contattare l'Ufficio Commerciale e Vendita della Cytocell.

## Disposizione del vetrino dei campioni con dettagli delle cross ibridazioni e dei polimorfismi

Quadrato del vetrino	Sonda	Etichetta della sonda	Cross ibridazione e polimorfismo dei cloni delle sonde
1	1p	rosso	
2	1q	rosso	
	2p	verde	
3	2q	rosso	polimorfismo 2q *◎
	3p	verde	
4	3q	rosso	
	4p	verde	
5	4q	rosso	
	5p	verde	
6	5q	rosso	
	6p	verde	
7	6q	rosso	
	7p	verde	
8	7q	rosso	8p con 1p e 3q
	8p	verde	
9	8q	rosso	9q con 10p e 16p, 18p, XqYq
	9p	verde	
10	10p	verde	
	10q	rosso	
11	11p	verde	11p con 17p
	11q	rosso	11q con 12q (interstiziale)
12	12p	verde	12p con 6p, 20q
	12q	rosso	
13	13q	rosso	14q con 16p11.2
	14	rosso	
14	14q	rosso	
	15	rosso	
15	15q	rosso	
	16	verde	
16	16q	rosso	
	17	verde	
17	17p	verde	17q con 1p, 5q, 6q and 11p
	17q	rosso	
18	18p	rosso	19p occasionalmente with 20q
	18q	rosso	
18	19p	verde	
	19q	rosso	
19	20p	verde	20q con 6p
	20q	rosso	
20	21q	rosso	22q con 2q (interstiziale)
	21	rosso	
21	22q	rosso	
	22	verde	
22	XpYp**	verde	
	XqYq***	rosso	
X	2p	verde	
	2q NP	rosso	non-polimorfico *

\* Per maggiori dettagli consultare il paragrafo "Risultati previsti".

◎ Vedere Knight S. e Flint J. (2000) *J Med Genet* 37: 401-409 e Fan Y *et al.* (2001) *Genet in Med* 3 (6) : 416- 421 per ulteriori informazioni su questo polimorfismo.

\*\* Questa sonda è specifica per il braccio p dei cromosomi X e Y

\*\*\* Questa sonda è specifica per il braccio q dei cromosomi X e Y

## DEUTSCH

### Einleitung

Die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) ist eine Technik, mit der DNA-Sequenzen auf Metaphase-Chromosomen oder Interphase-Kernen bei fixierten Kulturen oder nicht in Kultur gezüchteten zytogenetischen Proben nachgewiesen werden können. Die Technik verwendet DNA-Sonden, die an gesamte Chromosomen oder an einzelne, einmalige Sequenzen hybridisieren und dient als leistungsstarke Ergänzung zur klassischen Zytogenetik. Die Ziel-DNA wird zum Denaturieren der doppelsträngigen DNA nach dem Fixieren mit Hitze und Formamid behandelt, wodurch sie einzelsträngig wird. Die Ziel-DNA kann somit mit einer gleichermaßen behandelten denaturierten, einzelsträngigen und fluoreszenzmarkierten DNA-Sonde, die komplementäre Sequenzen aufweist, hybridisieren. Nach der Hybridisierung werden nichtgebundene und nicht spezifisch gebundene DNA-Sonden durch eine Reihe von Waschvorgängen unter stringenter Bedingungen entfernt und die DNA zum Sichtbarmachen gefärbt. Unter dem Fluoreszenzmikroskop wird dann die hybridisierte Sonde am Zielmaterial erkennbar.

Die Untersuchung von Telomeren auf Chromosomenrearrangements ist sehr attraktiv, da die Mehrheit der Translokationen der Chromosomenenden betrifft. Somit identifiziert ein Test, der Telomere zum Ziel hat alle diese mit hoher Sensitivität ungeachtet ihrer Größe. Mit dem Aufkommen der ersten Generation von Telomerkonen (hauptsächlich Kosmiden mit 35-40 Kb) und mit der Anwendung der Multiprobe-Technologie war es Cytocell möglich, Chromoprobe Multiprobe-T auf den Markt zu bringen, ein auf FISH basierender Assay, bei dem jedes Telomer unter Verwendung eines einzelnen Mikroskop-Objektivträgers pro Patient untersucht werden kann. Das Produkt der ersten Generation wurde nun durch ein direkt markiertes Produkt ersetzt, das ein Set von PAC/BAC-Telomerkonen der zweiten Generation und einige der ursprünglichen Kosmidklone enthält. Bei dieser Strategie werden telomerspezifische Sonden mit Metaphase-Chromosomen hybridisiert (FISH). Deletionen werden aufgrund des Fehlens des Signals am kognaten Chromosomenende erkannt, Trisomien durch das Auftreten von drei Signalen. Die Lage der Signale auf dem Chromosom ist sofort anhand der zytogenetischen Charakterisierung der Chromosomen ersichtlich, d.h. sowohl balancierte als auch unbalancierte Translokationen können schnell entdeckt und genau beschrieben werden.

Das Multiprobe-System ist in 24 quadratische Felder aufgeteilt, von denen jedes eine telomerspezifische Sonde sowohl für den p-Arm wie auch für den q-Arm eines Chromosoms (außer der D- und G-Gruppe) enthält. Die Sonden sind reversibel an den Glasuntergrund gebunden, eine Methode, die ausschließlich von Cytocell angewandt wird, wodurch die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung vereinfacht wird, da die Notwendigkeit der Vorbereitung der Sonden entfällt. Die Denaturierung von Sonde und Ziel-DNA erfolgt bei diesem System gleichzeitig, sobald es erwärmt wird. Die Sonden sind verschieden markiert. Die Sonde für den p-Arm ist mit einem für das FITC-Spektrum spezifischen Fluorophor markiert und die Sonde für den q-Arm mit einem für das Texasrot-Spektrum spezifischen Fluorophor. Das FISH-Protokoll beinhaltet eine Kodierung und eine Übernacht-Hybridisierung gefolgt von formamidfreien kurzen Waschschritten.

Das Chromoprobe Multiprobe-T-System ist ein effizienter Assay für die Identifizierung von Telomerearrangements, es ist hoch spezifisch und kostengünstig.

### Kitkomponenten

Jeder Kit enthält folgende Komponenten, die entweder für 2 (Katalog-Nr. PMP009), 5 (Katalog-Nr. PMP008), oder 10 (Katalog-Nr. PMP007) Patientenproben ausreichen:

- 2, 5 oder 10 Multiprobe-Glassysteme, beschichtet mit 42 direkt markierten Subtelomersonden (mindestens 20 ng Sonde pro Feld).
- 4, 7 oder 12 Glasobjektträger, die mit einer speziellen Matrize bedruckt sind.
- 500 µl Hybridisation Solution B (Hybridisierungslösung): Formamid, Dextranulfat, SSC
- 500 µl Gegenfärbungslösung: DAPI (ES: 0.125 µl DAPI (4,6-Diamidino-2-Phenylindol)), Antifade
- 1 Cytocell Slide Surface Thermometer
- 1 Cytocell Chromoprobe Multiprobe Hybridisation Chamber
- 4, 7 oder 12 Große Deckgläserchen (24 x 60 mm<sup>2</sup>)

### Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen

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

### Lagerung und Behandlung

Der Chromoprobe Multiprobe System-Kit sollte bis zum Ablaufdatum, das auf dem Kitetikett angegeben ist, bei 2-8°C gelagert werden. **Nicht einfrieren.** Das Rohrchen mit der Gegenfärbungslösung muss im Dunkeln aufbewahrt werden.

### Benötigte, aber nicht mitgelieferte Laborgeräte

- Heizplatte (mit stabiler Heizplatte und genauer Temperaturregelung bis 80°C)
- Mikropipetten mit variablem Volumen von 1 µl – 200 µl
- Wasserbad ohne Rührer mit genauer Temperaturkontrolle bei 37°C.
- Wasserbad mit genauer Temperaturkontrolle bei 72°C
- Mikro-Zentrifugenröhrchen (0,5 ml)

- f) Fluoreszenzmikroskop (s. auch Abschnitt „Optimale Einstellung von Mikroskop und Filter“)
- g) Coplin-Färbetrog aus Kunststoff oder Glas
- h) Pinzette
- i) Fluoreszenzobjektiv-geeignetes Immersionsöl
- j) Tischzentrifuge

**Empfehlungen zum Fluoreszenzmikroskop**

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

**Probenvorbereitung**

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

**Chromprobe Multiprobe Protokoll**

**1. Präparieren des Objektträgers**

- i. Den Matrizenobjektträger reinigen.  
Den Matrizenobjektträger 2 Minuten lang in 100% Methanol legen und dann mit einem sauberen, weichen Tuch trocken polieren.
- ii. Die korrekte Zelldichte einstellen.  
Es ist wichtig, das die interessierende Probe einen genügend hohen Mitoseindex hat, um die Detektion von Chromosomenabnormalitäten zu ermöglichen. Zur Überprüfung der Dichte der Probe mit einer Mikropipette (z.B. einer Gilson P10 oder P20) 4 µl der Zellsuspension auf eines der Felder des Ersatz-Matrizenobjektträgers aufzutropfen und an der Luft trocknen lassen. Das kleine Volumen der verwendeten Menge bedeutet, dass man für gewöhnlich den Objektträger zur Übertragung der Suspension sachte mit der Pipettenspitze berühren muss. Unter dem Phasenkontrastmikroskop untersuchen.

Wenn die Zelldichte zu hoch ist, die Suspension mit frischem Fixativ verdünnen.

Wenn der Mitoseindex zu niedrig ist, die fixierte Zellsuspension für 10 Minuten bei 160 xg herunterzentrifugieren. Das Volumen des Überstandes bestimmen, diesen dekantieren und das Zellpellet noch einmal in einem kleineren Volumen frischen Fixativs resuspendieren.

Wenn sich die Konzentration der Zellprobe geändert hat, 4 µl des Probenkonzentrats auf ein anderes Feld des Testobjektträgers aufzutropfen und unter dem Phasenkontrastmikroskop untersuchen.

**Bitte beachten: 50 µl ist die Mindestmenge, die für das Multiprobe-System-Protokoll erforderlich ist.**

**iii. Qualitätskontrolle der Proben**

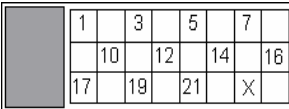
Die Proben sollten auf Zytosol untersucht werden, da dieses mit den FISH-Resultaten interferiert. Eine Methode zur Reduzierung des Zytosols ist, 2 µl der Probe auf den Matrizenobjektträger aufzutropfen und das Fixativ bei seiner Ausbreitung zu beobachten. Im Normalfall wird sich das Fixativ maximal ausbreiten, rezedieren und dann verdampfen. Unserer Erfahrung nach lassen sich zum Entfernen von Zytosol effektive Resultate erzielen, wenn man einen frischen Tropfen 3:1 Fixativ zu dem Zeitpunkt auftröpfelt, wenn das sich ausbreitende Fixativ seine maximale Ausbreitung erreicht hat. Den zweiten Tropfen Fixativ verdampfen lassen und dann die Auftropfstelle noch einmal untersuchen.

**iv. Betropfen des Objektträgers**

2 µl der Zellsuspension nach der unten skizzierten Methode auf alle 24 Felder pipettieren.

**Bitte beachten Sie:** Wenn die Proben von hervorragender Qualität sind, ist es wichtig, jeden Tropfen trocken zu lassen, bevor man mit dem nächsten fortfährt. Zeigen die Proben jedoch einen Grad an Kontamination mit Zytosol, dann kann das Auftropfen der Proben nacheinander in der unten beschriebenen Weise hilfreich sein.

Die Abfolge beim Betropfen von alternierenden Quadraten, die unten gezeigt ist, sollte eingehalten werden, damit die einzelnen Lösungstropfen bei ihrer Ausbreitung nicht miteinander interferieren.



Sobald die erste Gruppe von Tropfen an der Luft getrocknet ist, die übrigen Felder mit Tropfen von je 2 µl auf die gleiche Weise betropfen. Sobald der Objektträger trocken ist, zeigt die Untersuchung unter dem Phasenkontrastmikroskop, ob Felder ausgelassen worden sind. Diese können dann noch einmal betropft werden.

Wenn die Metaphasen-Zellen zu stark gespreizt erscheinen, wenn wahllos verstreute Chromosomen vorkommen, jeden Tropfen trocknen lassen, bevor zum nächsten Feld übergegangen wird.

Wenn bei der Untersuchung des Objektträgers ein Feld zu wenig Zellen/Metaphasen aufweist, können zur Erhöhung der Zelldichte weitere Tropfen der Suspension zugegeben werden.

**2. Vorbereitung des Multiprobe-Systems und des Matrizen Objektträgers**

- i. Die Chromprobe Multiprobe Hybridisation Chamber in ein Wasserbad mit 37°C stellen und diese sich auf 37°C (+/- 1°C) erwärmen lassen. (Wenn das kalte Wasserbad angeschaltet wurde, kann dies bis zu einer Stunde dauern)
- ii. Die Hybridisierungslösung durch wiederholtes pipettieren mischen und ein 30 µl-Aliquot zur Multiprobe-System auf 37°C (+/- 1°C) vorwärmen (Heizplatte oder Inkubator). Ebenso ein Multiprobe-System auf 37°C vorwärmen (Heizplatte oder Inkubator), wobei das System mit dem Etikett nach unten aufgelegt wird. **Die erhöhten Glasfelder des Multiprobe-Systems nicht berühren.**
- iii. Den betropften Matrizenobjektträger 2 Minuten in 2x SSC bei Zimmertemperatur (20°C – 25°C) waschen.
- iv. Solange das Multiprobe-System bei 37°C vorwärmt, den Matrizenobjektträger in einer Alkoholreihe entwässern (je 2 Minuten in 70%, 85% und absolutem Ethanol), lufttrocknen und zum Aufwärmen auf 37°C auf eine Heizplatte oder in einen Inkubator legen.
- v. 1 µl vorgewärmte Hybridisierungslösung (mit einer P10 Mikropipette) auf jedes der erhöhten Glasfelder des Multiprobe-Systems pipettieren, solange dieses noch 37°C aufweist.

**3. Positionierung des Matrizen-Objektträgers auf dem Multiprobe-System**

- i. Den Matrizenobjektträger vorsichtig umdrehen, so dass sich Quadrat 1 über dem oberen rechten Bereich des Multiprobe-Systems, der gelb markiert ist, befindet (Abbildung 1).
- ii. Vergewissern Sie sich, dass der Matrizenobjektträger sorgfältig über den entsprechenden Felder des Multiprobe-Systems ausgerichtet ist. Den Objektträger vorsichtig über der Multiprobe absenken, so dass die Tropfen der Hybridisierungslösung den Objektträger berühren. Sacht aufliegen und gleichmäßig andrücken, so dass sich die Hybridisierungslösung bis zu den Rändern jedes der erhöhten Felder auf dem Multiprobe-System ausbreitet.
- iii. Objektträger/Multiprobe-System vorsichtig anheben und umdrehen, so dass der Matrizenobjektträger unter dem Multiprobe-System zu liegen kommt. Achten Sie darauf, dass das Multiprobe-System nicht über den Matrizenobjektträger verschmiert, da dies eine Kreuzkontamination der Sonden verursachen könnte.
- iv. 10 Minuten bei 37°C (+/- 1°C) inkubieren (Heizplatte oder Inkubator).

**4. Anleitung zur Verwendung des Cytocell Slide Surface Thermometers**

**Bitte beachten:** Bevor mit Denaturierung fortgefahren wird, sollte die Temperatur der Heizplatte mit dem Cytocell Objektträgeroberflächen-Thermometer geprüft werden.

Das Flüssigkristall-Thermometer darf nur zur Temperaturkontrolle einer Heizplatte verwendet werden, es darf nicht zur Überwachung der Heizplattentemperatur über einen längeren Zeitraum benutzt werden.

Das Thermometer auf die Heizplatte legen und warten, bis die verschiedenen Segmente die Farbe nicht mehr wechseln. Die korrekte Temperatur wird durch eine blassgrüne/goldene Farbe angezeigt. Wenn die Segmente körnig aussehen und die Farben nicht mehr gleichmäßig und ordentlich erscheinen, sollte das Thermometer weggeworfen werden, weil es verbraucht ist. Die Lebensdauer jedes Thermometers sollte jedoch für ein Kit mit zehn Multiprobe-Systemen mehr als ausreichend sein.

**5. Denaturierung**

Für diesen Arbeitsschritt ist die Verwendung eines PCR Thermoocycler-Heizblocks statt einer Festbett-Heizplatte NICHT geeignet.

Objektträger/Multiprobe-System auf die 75°C heiße Heizplatte legen, wobei besonders darauf zu achten ist, beide waagrecht zu halten, (sicherstellen, dass der Probenobjektträger guten Kontakt zur Heizplatte hat). Bei 75°C (+/- 1°C) 2 Minuten lang auf der Heizplatte denaturieren.

**6. Hybridisierung**

Objektträger/Multiprobe-System in die vorgewärmte Chromprobe Multiprobe-Hybridisierungskammer legen, den Deckel wieder aufliegen und die Kammer über Nacht in das 37°C (+/- 1°C) warme Wasserbad (ohne Rührer) stellen.

**Bitte beachten:**

Den Deckel der Hybridisierungskammer nicht versiegeln.

Das Wasserbad nicht mit einem Deckel abdecken.

Nicht in einem Inkubator hybridisieren.

Bitte sicherstellen, dass die Hybridisierungskammer vollkommen trocken ist, (d.h., dass sich kein Wasser oder feuchtes Gewebe in der Kammer befindet).

**7. Stringentes Waschen nach der Hybridisierung**

- i. Vorbereitung der stringenten Waschlösungen
  - 1. Lösung 1: einen Coplin-/Hendelahl-Trog mit 0,4x SSC vorbereiten. In ein Wasserbad stellen und auf 72°C (+/- 1°C) erwärmen lassen, den pH-Wert auf 7,0 einstellen.
  - 2. Lösung 2: einen Coplin-/Hendelahl-Trog mit 2x SSC und 0,05% Tween 20 vorbereiten. Bei Zimmertemperatur (20°C – 25°C) stehen lassen.

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

**ii. Stringente Waschroutine**

- 1. Das Multiprobe-System vorsichtig vom Matrizenobjektträger abnehmen und den Objektträger 2 Minuten in Lösung 1 legen. (Das Multiprobe-System kann nicht wiederverwendet werden).
  - 2. Den Objektträger 30 Sekunden in Lösung 2 legen.
- Nicht mehr als jeweils zwei Multiprobe-Objektträger gleichzeitig stringent waschen.**

**8. Eindecken und Ablesen der Ergebnisse**

- i. Überschüssige Lösung ablaufen lassen, indem man den Objektträger etwa 20 Sekunden lang mit der Kante auf ein Tuch stellt.
- ii. Nicht entrocknen lassen.
- iii. Einen Tropfen mit 20 µl DAPI-Antifade-Lösung auf beide Enden des Objektträgers aufzutropfen und ein großes Deckglaschen (24 x 60 mm<sup>2</sup>), wie mitgeliefert, langsam, um die Bildung von Luftblasen zu vermeiden, aufliegen.
- iv. Mit einem Stück Filterpapier oder Tuch abtupfen.
- v. Vor dem Betrachten mit dem Fluoreszenzmikroskop für 10 Minuten im Dunkeln stehen lassen.
- vi. Manche Mikroskoptypen haben nur an den q-Armen rote Signale. Sollte dies der Fall sein, den Objektträger einfach um 180° drehen; dies erleichtert das Betrachten des Objektträgers.

Die im Multiprobe-System verwendeten Sonden sind direkt mit Fluorophoren markiert, die lichtempfindlich sind. Die Resultate werden verbessert, wenn die Sonden bei diesen Arbeitsschritten nur minimalen Lichtmengen ausgesetzt werden. Es ist jedoch nicht notwendig, im Dunkeln zu arbeiten.

**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 und zu hohe Stringenz zum Verlust des Signals führen kann.

**Erwartete Ergebnisse**

- 1. Bei allen Chromosomen außer den akrozentrischen Chromosomen der D- und G-Gruppe weist eine normale Probe 2 grüne (p-Arm) und 2 rote (q-Arm) Signale an den jeweiligen Chromosomenenden auf. Bei akrozentrischen Chromosomen wir eine normale Probe nur an den q-Armen rote Signale zeigen.
- 2. Die 2q PAC (dj1011017)-Sonde weist den verbreiteten Polymorphismus nach, der von Macina *et al* 1994 beschrieben wurde. Sollte eine 2q-Deletion festgestellt werden, haben Studien die Wichtigkeit einer Untersuchung der Deletion mit FISH unterstrichen, bei der eine zweite Sonde, die diesen Bereich abdeckt (Fan *et al* 2001), verwendet wird; auch sollte der genetische Hintergrund der Eltern (Knight *et al* 2000) untersucht werden. Hierzu wurde auf dem Y-Feld des Multiprobe-Systems eine zweite 2q BAC-Sonde, 172113, D2S447, die weiter proximal bindet und rot markiert ist, eingeführt. Diese wird mit einer grün markierten Kontrollsonde (2pter) geliefert. Es muss jedoch betont werden, dass, obwohl weitere Studien durch die Bereitstellung des zweiten Klangs auf Feld Y des Multiprobe-Systems erleichtert worden sind, jede offensichtliche 2q-Deletion weiter verfolgt werden muss, indem die anderen Familienmitglieder getestet werden, um die Fehlinterpretation einer klinisch signifikanten distalen 2q-Deletion als Polymorphismus oder normale Variante zu ausschließen.

**Kundendienst**

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

**Details zu Kreuzhybridisierung und zum Polymorphismus der Sonden**

Feld des Matrizen-Objektträgers	Sonde	Sonden-Farbe	Kreuzhybridisierung und Polymorphismus der Sondenklone
1	1p	grün	
2	1q	rot	
	2p	grün	
	2q	rot	2q Polymorphismus *⊙
3	3p	grün	
	3q	rot	
4	4p	grün	
	4q	rot	
5	5p	grün	
	5q	rot	
6	6p	grün	
	6q	rot	
7	7p	grün	
	7q	rot	
8	8p	grün	8p mit 1p und 3q
	8q	rot	
9	9p	grün	
	9q	rot	9q mit 10p und 16p, 18p, XqYq
10	10p	grün	
	10q	rot	
11	11p	grün	
	11q	rot	11p mit 17p
12	12p	grün	11q mit 12q (interstitiell)
	12q	rot	12p mit 6p, 20q
13	13q	rot	
14	14q	rot	14q mit 16p11.2
15	15q	rot	
16	16p	grün	
	16q	rot	
17	17p	grün	17q mit 1p, 5q, 6q und 11p
	17q	rot	
18	18p	grün	
	18q	rot	
19	19p	grün	19p gelegentlich mit 20q
	19q	rot	
20	20p	grün	
	20q	rot	20q mit 6p
	21q	rot	
21	22q	rot	22q mit 2q (interstitiell)
22	XpYp**	grün	
X	XqYq***	rot	
	2p	grün	
Y	2q NP	rot	nicht polymorph *

\* Für weitere Einzelheiten s. Abschnitt "Erwartete Ergebnisse".

⊙ Siehe Knight S. and Flint J. (2000) *J Med Genet* 37: 401-409 and Fan Y *et al.* (2001) *Genet in Med* 3 (6) : 416-421 für weitere Informationen zu diesem Polymorphismus.

\*\* Diese Sonde ist spezifisch für die p-Arme von X und Y

\*\*\* Diese Sonde ist spezifisch für die q-Arme von X und Y

**ESPAÑOL**

**Introducción**

La hibridación *in situ* fluorescente (FISH) es una técnica que permite detectar secuencias de ADN en cromosomas metafásicos o núcleos interfásicos en muestras citogenéticas cultivadas o no cultivadas y fijadas. En la técnica se utiliza una sonda de ADN que hibrida los cromosomas completos o las secuencias cromosómicas simples y es un complemento útil para la citogenética clásica. Después de la fijación, el ADN diana se trata con calor y formamida para desnaturizar el ADN

bicatenario haciendo que resulte monocatenario. El ADN diana queda entonces disponible para hibridarlo con una sonda de ADN igualmente desnaturalizado, monocatenario marcado con fluorescencia que tiene una secuencia complementaria. Después de la hibridación la sonda de ADN no específicamente hibridada y no hibridada se elimina tras varios lavados y se aplica un contraste al ADN para su visualización. El uso de un microscopio de fluorescencia permite la visualización de la sonda hibridada en el material utilizado.

El análisis telomérico de reorganizaciones cromosómicas resulta muy llamativo puesto que la mayoría de las reorganizaciones implican los extremos de los cromosomas y, por lo tanto, un ensayo referido a los telómeros identificará la mayoría de reorganizaciones independientemente de su tamaño. Con la llegada de la primera generación de clones teloméricos (principalmente cósmidos de 35-40 kb) y la aplicación de la tecnología Multiprobe, Cytocell fue capaz de lanzar Chromoprobe Multiprobe®-T, un ensayo basado en FISH que permite estudiar cada telómero utilizando un único portaobjetos por paciente. Una segunda edición de este producto con sondas marcadas directamente y que incorpora un conjunto de segunda generación de clones de telómeros PAC/BAC y algunos de los clones cósmidos originales ha sustituido ahora la primera generación. La estrategia incluye la FISH de las sondas específicas de telómeros en cromosomas metafásicos. Las deleciones se detectan por la ausencia de marcado en los extremos de los cromosomas cognados y trisomías por la presencia de tres marcas. La ubicación cromosómica de las marcas es inmediata a partir de la caracterización citogenética de los cromosomas y, de este modo, las reorganizaciones equilibradas y desequilibradas pueden detectarse al instante y describirse de forma precisa.

El dispositivo Multiprobe está dividido en 24 áreas cuadradas, cada una con una sonda específica para telómero para los brazos p y q de un cromosoma (excepto los grupos D y G). Las sondas se hibridan de forma reversible a un dispositivo de cristal, un método exclusivo de Cytocell, y de ese modo se simplifica la hibridación *in situ* fluorescente evitando la necesidad de preparar las sondas. La desnaturalización de la sonda y del ADN diana se produce simultáneamente en el dispositivo una vez calentado. Las sondas están marcadas de forma diferenciada. La sonda del brazo p está marcada con un fluoróforo específico para espectro FITC y la del brazo q, en espectro Texas Red.

El protocolo de FISH incorpora la codensaturación y la hibridación durante la noche seguidas de lavados rápidos sin formamida.

Chromoprobe Multiprobe-T ofrece un ensayo eficaz para identificar las reorganizaciones teloméricas, muy específico y económico.

#### Material proporcionado

Cada kit contiene los siguientes componentes, los suficientes para 2 (Cat. N.º. PMP009), 5 (Cat. N.º. PMP008) o 10 (Cat. N.º. PMP007) muestras:

- 2, 5 ó 10 Dispositivos de cristal de Multiprobe cubiertos con 42 sondas subteloméricas marcadas directamente (mínimo de 20 ng de sonda por cuadrado).
- 4, 7 ó 12 Portaobjetos de cristal con plantilla especial
- 500µl Hybridisation Solution B (Solución de hibridación): Formamida, dextran sulfato, SSC
- 500µl Solución de contraste: DAPI (ES: 0,125µl DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindolil), Antifade
- 1 Cytocell Slide Surface Thermometer
- 1 Cytocell Chromoprobe Multiprobe Hybridisation Chamber
- 4, 7 ó 12 Cubreobjetos grandes (24 mm x 60 mm)

#### Avisos y precauciones

1. Para diagnóstico *in vitro*. Sólo para uso profesional.
2. Utilizar guantes al manipular las sondas de ADN y el contraste DAPI.
3. La solución de hibridación contiene formamida, que es una sustancia tóxica. 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 contraste debe almacenarse en un lugar oscuro.

#### Equipo necesarios pero no proporcionados

- a) Placa caliente (con una placa sólida y un control de temperatura preciso hasta 80°C)
- b) Micropipetas de volumen variable (rango 1µl - 200µl)
- c) Baño de agua con control preciso de temperatura a 37°C (sin agitador)
- d) Baño de agua con control preciso de temperatura a 72°C
- e) Tubos de microcentrifugado (0,5 ml)
- f) Microscopio de fluorescencia
- g) Recipientes de cristal y de plástico
- h) Pinzas
- i) Microscopio de fluorescencia con objetivo de inmersión en aceite
- j) Centrifuga de banco

#### 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 cultivadas y fijadas en Camoy que debe prepararse de acuerdo con las instrucciones del laboratorio o la institución. Preparar las extensiones de sangre cultivada en los portaobjetos de Cytocell Chromoprobe Multiprobe según el protocolo de Cytocell que se expone más adelante. No es recomendable calentar o envejecer los portaobjetos ya que puede reducir la señal de fluorescencia.

#### Protocolo Chromoprobe Multiprobe

##### 1. Preparación del portaobjetos

- i. Limpiar el portaobjetos
  - Empapar el portaobjetos durante 2 minutos en metanol 100% y secar con un papel limpio.
- ii. Establecer la densidad celular correcta
 

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 portaobjetos plantilla y deje secar al aire. El volumen pequeño utilizado significa que normalmente tiene que tocar suavemente el portaobjetos 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, centrifúguese 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 portaobjetos y vuelva a examinar en el microscopio de contraste de fases.

**Nota: 50µl es el volumen mínimo necesario para el protocolo del dispositivo Multiprobe.**
- iii. Control de calidad de las muestras
 

Debe examinarse la presencia de citoplasma puesto que interferirá con el protocolo de FISH. Si los cromosomas aparecen encerrados por un material granulado cuando los examina en el microscopio de contraste de fases, esto indicará presencia de citoplasma, pudiendo comprometer los resultados. Un método para reducir el citoplasma es sembrar 4µl de la muestra en el portaobjetos plantilla 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 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 portaobjetos
 

Añada 2µl de suspensión celular a las 24 áreas siguiendo el método explicado a continuación.

**Nota:** Si las muestras son de calidad excelente, es importante que cada gota se deje secar antes de seguir con el siguiente paso. Si las muestras presentan un grado de contaminación citoplásmica, entonces extienda las muestras una tras otra de la manera que se describe más adelante.

La secuencia de cuadrados alternos sembrados que se muestra a continuación debe pegarse de manera que las gotas de suspensión no interfieran unas con otras al expandirse.

1	3	5	7
10	12	14	16
17	19	21	X

Una vez seco el primer grupo de gotas siembre los espacios restantes con gotas de 2µl de la misma manera. Después de haber secado el portaobjetos, el examen del mismo en contraste de fases revelará si falta alguno de los cuadrados.

Si las células metafásicas se muestran esparcidas, y hay cromosomas dispersos aleatoriamente, entonces deje que las gotas se sequen antes de continuar.

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

##### 2. Preparación del dispositivo Multiprobe y del portaobjetos

- i. Coloque Chromoprobe Multiprobe Hybridisation Chamber en un baño de agua a 37°C (+/- 1°C) estable. (Esto puede durar una hora si el baño de agua se calentó a partir de agua fría).
- ii. Mezcle la solución de hibridación mediante un pipeteo repetido y caliente previamente una porción alícuota de 30 µl por dispositivo Multiprobe a 37°C (+/- 1°C) (placa caliente o incubador). También caliente previamente el dispositivo Multiprobe a 37°C (placa caliente o incubador) colocándolo con la etiqueta del dispositivo hacia abajo.
- iii. **No tocar las superficies salientes del dispositivo Multiprobe.** Lave los portaobjetos plantilla que contienen las muestras fijadas en 2 x SSC durante 2 minutos a temperatura ambiente (20-25°C).
- iv. Mientras el dispositivo Multiprobe continúa a 37°C, deshidrate los portaobjetos plantilla 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 (placa caliente o incubador).
- v. Añada 1µl de la solución de hibridación precalentada utilizando una micropipeta P10, a cada una de las veinticuatro áreas del dispositivo Multiprobe mientras se mantiene a 37°C.

##### 3. Colocación del portaobjetos plantilla sobre el dispositivo Multiprobe

- i. Invierta con cuidado el portaobjetos de plantilla sobre el dispositivo Multiprobe de manera que el número 1, que ahora está al revés quede situado sobre la parte superior derecha del dispositivo Multiprobe (Figura 1).
- ii. Asegúrese de que el portaobjetos plantilla está cuidadosamente alineado con las áreas correspondientes del dispositivo Multiprobe. Baje con cuidado el portaobjetos del dispositivo Multiprobe de modo que las gotas de la solución de hibridación estén en contacto con el portaobjetos. 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 dispositivo Multiprobe.
- iii. Levante el portaobjetos/dispositivo Multiprobe sujetando cuidadosamente el borde esmerilado del portaobjetos de cristal e inviértalo de modo que el portaobjetos se sitúe debajo del dispositivo Multiprobe. Asegúrese de que el dispositivo no roza con el portaobjetos plantilla ya que esto podría causar la contaminación cruzada de las sondas.
- iv. Colóquelo a 37°C (+/- 1°C) (placa caliente o incubador) durante 10 minutos.

##### 4. Instrucciones de uso del Cytocell Slide Surface Thermometer

**Nota:** La temperatura de la placa caliente debe compararse con Cytocell Slide Surface Thermometer antes de proceder a la desnaturalización.

Este termómetro es un dispositivo de cristal líquido y aunque es reutilizable debe tratarse con cuidado para garantizar una vida útil razonable. El termómetro sólo debe utilizarse para comprobar 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 dispositivos Multiprobe.

##### 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 portaobjetos/dispositivo Multiprobe a la placa caliente con mucho cuidado para mantenerlo a nivel (asegúrese de que el portaobjetos de la muestra tiene contacto total con la placa caliente). Desnaturalice en la placa caliente a 75°C (+/- 1°C) durante **2 minutos**.

##### 6. Hibridación

Coloque el portaobjetos/dispositivo Multiprobe en la Chromoprobe Multiprobe Hybridisation Chamber precalentada, vuelva a poner la tapa e introduzca la cámara en el baño de agua a 37°C (+/- 1°C) (sin agitación) durante toda la noche.

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

- No tape el baño de agua.
- No hidrate en un incubador.
- Asegúrese de que la cámara de hibridación está completamente seca (es decir, sin agua ni papel húmedo en su interior).

##### 7. Baños posthibridación

- i. Preparación de las soluciones de lavado
  1. Solución 1: Prepare un recipiente/jarro de Hellen Dahl 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/jarro de Hellen Dahl que contenga 2 x SSC y 0,05% Tween 20. Déjelo a temperatura ambiente (20°C -25°C).

**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
  1. Quite el dispositivo Multiprobe cuidadosamente del portaobjetos e introduzca el portaobjetos en la solución 1 durante 2 minutos. (El dispositivo Multiprobe no puede volver a utilizarse).
  2. Coloque el portaobjetos en la solución 2 durante 30 segundos.

**Evite lavar más de dos portaobjetos Multiprobe al mismo tiempo.**

##### 8. Montaje y visualización de los resultados

- i. Quite el exceso de solución colocando el portaobjetos de lado sobre un papel durante unos 20 segundos. **No deje que se seque.**
- ii. Agregue una gota de 20µl de solución DAPI Antifade en los dos extremos del portaobjetos y aplique un cubreobjetos grande (24mm x 60mm), suministrado, lentamente para evitar la formación de burbujas de aire.
- iii. Seque con un papel/papel de filtro.
- iv. Déjelo durante 10 minutos en la oscuridad antes de verlo con el microscopio de fluorescencia.
- v. Algunos tipos de microscopio tienen pinzas para sujetar el portaobjetos que dificultan la visión de los extremos del portaobjetos. Si esto ocurre, simplemente gire el portaobjetos 180°, lo que le permitirá visualizar los extremos del portaobjetos.

**Las sondas utilizadas en el dispositivo Multiprobe están directamente marcadas con fluorocromos que son sensibles a la luz. Los resultados son mejores cuando las sondas se exponen a cantidades mínimas de luz durante el manipulado; sin embargo, no es necesario trabajar en la oscuridad.**

##### Estabilidad de los portaobjetos terminados

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

##### Recomendaciones de procedimiento

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

##### Resultados esperados

1. Para todos los cromosomas excepto para el grupo D & G acrocéntrico, en una muestra normal aparecerán 2 marcas verdes (brazo p) y 2 rojas (brazo q) en sus extremos respectivos. Para los cromosomas acrocéntricos, en una muestra normal aparecerán marcas rojas sólo en los brazos q.
2. \* El 2q PAC (dj101017) detecta el polimorfismo común descrito por Macina *et al* en 1994. Sin embargo, aunque se detecte la deleción de 2q, los estudios dan especial importancia a comprobar la deleción con FISH utilizando una segunda sonda para esta regional (Fan *et al* 2001) y para examinar a los padres para determinar su herencia (Knight *et al* 2000). A este efecto, el segundo 2q BAC, 172113, D2S447 que está más próximo y marcado en rojo, se ha incorporado al cuadro Y del dispositivo. Se suministra con la sonda de control (2pter) en verde. No obstante debe recalarse que, aunque este segundo clon en el cuadro Y del dispositivo ha permitido estudios posteriores, cualquier deleción aparente de 2q debe estudiarse con ensayos a otros miembros de la familia para evitar un fallo en la interpretación de la significancia clínica de una deleción distal de 2q.

**Ayuda al cliente**

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

**Diseño de los portaobjetos y detalles de polimorfismo e hibridaciones cruzadas.**

Cuadrado de portaobjetos plantilla	Sonda	Marca de sonda	Hibridación cruzada y polimorfismo de clones de sonda
1	1p	verde	
2	1q	roja	
	2q	verde	polimorfismo 2q *⊗
3	3p	roja	
	3q	verde	
4	4p	roja	
	4q	verde	
5	5p	roja	
	5q	verde	
6	6p	roja	
	6q	verde	
7	7p	roja	
	7q	verde	
8	8p	roja	8p con 1p y 3q
	8q	verde	
9	9p	roja	
	9q	verde	9q con 10p y 16p, 18p, XqYq
10	10p	roja	
	10q	verde	
11	11p	roja	11p con 17p
	11q	verde	11q con 12q (intersticial)
12	12p	roja	12p con 6p, 20q
	12q	verde	
13	13q	roja	
	14q	verde	14q con 16p11.2
14	14q	roja	
	15q	verde	
15	15q	roja	
	16p	verde	
16	16q	roja	
	17p	verde	
17	17q	roja	17q con 1p, 5q, 6q y 11p
	18p	verde	
18	18q	roja	
	19p	verde	19p ocasionalmente con 20q
19	19q	roja	
	20p	verde	
20	20q	roja	20q con 6p
	21q	verde	
21	22q	roja	22q con 2q (intersticial)
	XpYp**	verde	
X	XqYq***	roja	
	2p	verde	
Y	2q NP	roja	non-polymorphic*

\* Consultar el apartado "Resultados esperados" para obtener más detalles.

⊗ Consultar Knight S. and Flint J. (2000) *J Med Genet* 37: 401-409 y Fan Y *et al.* (2001) *Genet in Med* 3 (6) : 416-421 para obtener más información sobre este polimorfismo.

\*\* Esta sonda es específica para los brazos p de X e Y

\*\*\* Esta sonda es específica para los brazos q de X e Y

**References/Bibliographie/Bibliographia/Literatur**

1. Knight SJL and Flint J (2000). Perfect endings : a review of subtelomeric probes and their use in clinical diagnosis. *J. Med. Genet.* 37 : 401-409
2. Knight SJL, Lucas S, Regan R, Brennan M, Nicod A, Lawrie NM, Cardy DLN, Nguyen H, Hudson TJ and Flint J (2000). An optimized set of human telomere clones for studying telomere integrity and architecture. *Am. J. Hum. Genet.* 67 : 320-332
3. Knight-Jones E, Knight S, Heussler H, Regan R, Flint J and Martin K (2000). Neurodevelopmental profile of a new dysmorphic syndrome associated with submicroscopic partial deletion of 1p36.3. *Dev Med. & Child Neurology.* 42 : 201-206
4. Yao-Shan Fan; Yang Zhang; Marsha Speevak; Sandra Farrell; Jack Jung; and Victoria Siu. (2001) Detection of Submicroscopic aberrations in patients with unexplained mental retardation by fluorescence *in situ* hybridisation using multiple subtelomeric probes. *Genetics in Medicine* 3 (6) 416-421
5. Macina, RA; Negorev, DG; Spais, LA; Hu, XI; Reithman, HC. (1994) Sequence organisation of the human chromosome 2q telomere. *Human Molecular Genetics* 3 1847-1853

**Patents and Trademarks**

Chromoprobe, Cytocell and Chromoprobe Multiprobe are registered trademarks of Cytocell Ltd. The Chromoprobe principle is covered by international patents WO9314223, EP0623177. The design of the Multiprobe is a registered design, number 2050801 and is also covered by Design Patent No.436,668. Any cyanine dyes used in this Product are manufactured on behalf of Amersham Pharmacia Biotech Inc. under an exclusive license from Carnegie Mellon University and are covered by US Patent Number 5 268 486 and other patents pending. The Compound in this Product is manufactured by NEN Life Science Products, Inc. under US Patent Numbers 5 047 519 and 5 151 507. Use of the Product for commercial purposes is strictly forbidden without written permission from Amersham Pharmacia Biotech Inc. and NEN Life Science Products, Inc.



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

004/2008-03-20

PI016/CE