



Instructions For Use

REF: PMP030 /031/032

**Chromoprobe
Multiprobe® - System
ALL v2 Panel**



FOR PROFESSIONAL USE ONLY

ENGLISH/FRANÇAIS/ITALIANO/DEUTSCH/ESPAÑOL

Further information available at www.cytocell.com

Fluorescence *In Situ* Hybridisation (FISH) is a technique that allows DNA sequences to be detected on metaphase chromosomes or in interphase nuclei of fixed cultured or uncultured cytogenetic samples. The technique uses DNA probes that hybridise to entire chromosomes or single unique sequences, and serves as a powerful adjunct to classic cytogenetics. Target DNA, after fixation and denaturation is available for annealing to a similarly denatured, fluorescently labelled DNA probe which has a complementary sequence. Following hybridisation, unbound and non-specifically bound DNA probe is removed by a series of rapid formamide-free stringent washes and the DNA counterstained for visualisation. Fluorescence microscopy then allows the visualisation of the hybridised probe on the target material.

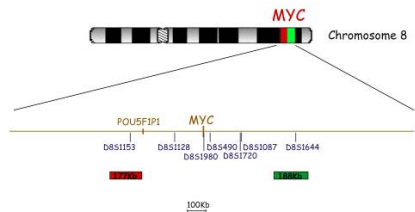
Chromoprobe Multiprobe ALL Panel

Cytocell's The Chromoprobe Multiprobe ALL Panel has been designed to provide as much information about the patient's genotype as possible using FISH probes applied to a single slide in a single hybridisation experiment. It detects rearrangements that occur primarily in B-cell lineage ALL, though some T-lineage markers have been included. In addition, in common with the CLL panel the panel strategy has been developed to give the maximum amount of information from cells at interphase and in some cases is capable of detecting chromosome rearrangements that are undetectable using standard cytogenetics.

FISH Tests on the Chromoprobe Multiprobe ALL Panel

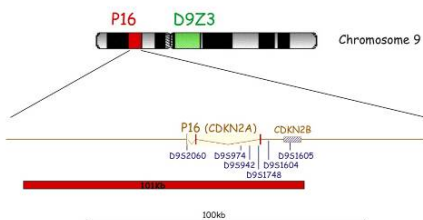
MYC

For the MYC fission product, the probes are spaced widely apart (717 kb) so as to be capable of picking up each of the three translocations. The proximal probe (177 kb) is 332 kb 3' of the gene and is labelled in red, whilst the distal probe (188 kb) is 380 kb 5' of the gene and is labelled in green.



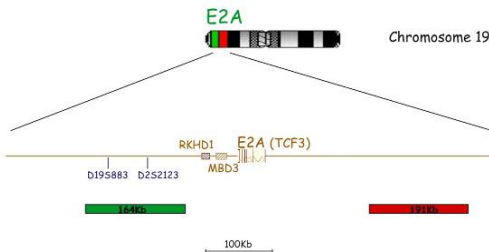
P16

The P16 probe, labelled in red, covers a 101 kb region of 9p21, extending from 59 kb 3' of P16 to the 5' end of P15. The probe mix also contains a control probe for chromosome 9 (D9Z3, the heterochromatic block at 9q12), labelled in green.



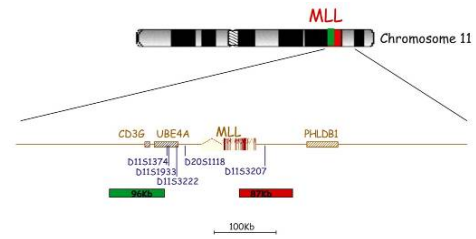
E2A

The E2A probe mix consists of a 3' probe, labelled in green, covering 164 kb 3' of the gene spanning the markers D19S883 and D2S2123 whilst the 5' region probe, labelled in red, (191 kb) is 157 kb from the 5' end of the gene.



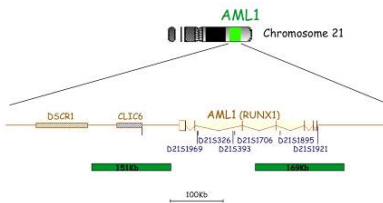
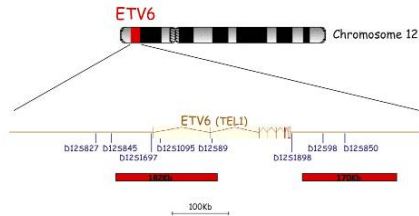
MLL

The MLL probe mix has a green 5' probe and a red 3' probe. The 5' region probe (96 kb) spans the CDG3 gene and 16 kb of the UBE4A gene whilst the 3' region probe (87 kb) spans a region 3' of exon 5.



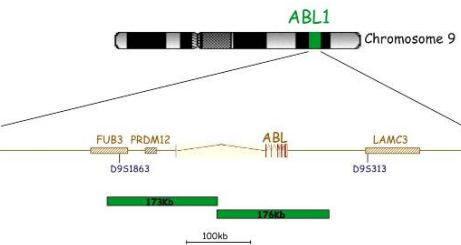
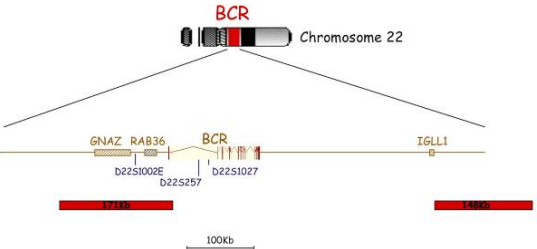
TEL (ETV6)/AML1

The ETV6 probe mix contains a probe 5' of ETV6 covering a region between the marker D12S845 and the 5' end of intron 2, measuring 182 kb and a second probe covering a region 3' of the gene extending 170 kb from the marker D12S1898. Both are labelled in red. For AML1, the probes cover 151 kb 3' of RUNX1, including CLIC6 and a second probe extending from intron 3 of RUNX1 to 51 Kb beyond the 5' end of the gene. In the normal cell, these probes will appear as discrete red and green spots, one for each homologue (resulting in a 2G 2R conformation). This probe set will detect the t(12;21) fusion and may also detect larger deletions of the TEL1 (ETV6) gene.



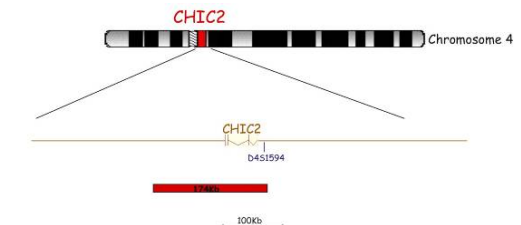
BCR/ABL

The BCR probe mix contains a probe 3' of BCR covering a region extending 171 kb 3', covering the genes GNAZ and RAB36 and a second probe covering a region 262 kb 5' of the gene extending 148 kb. Both are labelled in red and are orientated such that breakpoints in either mBCR or MBCR will result in a fusion signal. For ABL, the probe contig covers 349 kb from the middle of the FUB3 gene to a point 64 kb from the 5' end of ABL.



CHIC2

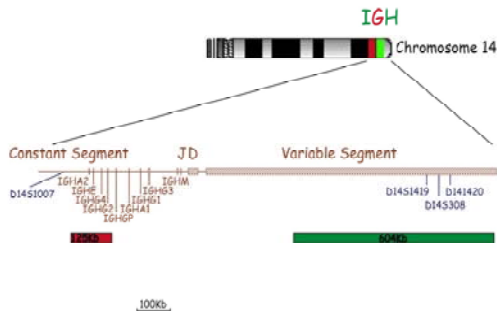
The CHIC2 probe has been provided on the panel as an enumerator for chromosome 4 to assess the levels of hyperdiploidy in ALL patients.



IGH

With all these rearrangements having breakpoints within the IGH gene, we have designed a split probe set for IGH, which can detect any rearrangement, which involves the splitting of the IGH gene in the region between the Constant and Variable segments, thereby identifying the IGH translocation partner chromosome in the less common rearrangements of this gene.

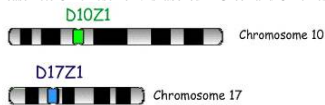
The Constant region of the gene is labelled in red whilst the Variable segment is labelled in green. The normal situation is represented by fusion or close-juxtaposition of the red and green signals (2Y) whilst a rearrangement of the gene is detectable by separate green and red signals (1Y, 1G, 1R).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



Hyperdiploidy

The ALL panel has been designed so that hyperdiploidy can be determined for chromosomes 4, 10 and 17 using CHIC2 (see above) for chromosome 4 along with centromeric probes for chromosomes 10 and 17. In addition, probes for IGH and AML1 will enumerate chromosomes 14 and 21 (squares 8 and 5 respectively), whilst MYC on square 1 will enumerate chromosome 8 which is associated with a poor outcome in adult ALL. Enumeration of chromosomes 4, and 10 using this panel will identify those patients with a relatively better outcome, as these have been associated with the subgroup of patients exhibiting between 55 and 67 chromosomes.

Please note Chromosome 10 is labelled in Green and Chromosome 17 is labelled in blue.



Material Provided

Each kit contains the following reagents, which are sufficient for either 2 (Cat. No. PMP030), 5 (Cat. No. PMP031) or 10 (Cat. No. PMP032) patient samples:

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

Warnings and Precautions

1. For *in vitro* diagnostic use. For professional use only.
2. Wear gloves when handling DNA probes and DAPI counterstain.
3. The hybridisation solution contains Formamide, which is toxic. Handle with care; wear gloves and a lab coat. Upon disposal, flush with a large volume of water.
4. DAPI is a potential carcinogen. Handle with care; wear gloves and a lab coat. Upon disposal, flush with a large volume of water.
5. All hazardous materials should be disposed of according to your institution's guidelines for hazardous waste disposal.

Storage and Handling

The Chromoprobe Multiprobe System kit should be stored at 2-8°C until the expiry date indicated on the kit label. Do not freeze. The counterstain vial must be stored in the dark.

Equipment Necessary but not Supplied

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

Fluorescence Microscope Recommendation

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

Sample Preparation

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

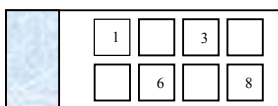
Prepare samples on Cytocell Chromoprobe Multiprobe template slides according to Cytocell protocol below.

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

Chromoprobe Multiprobe Protocol

I. Slide preparation

- i. Clean template slide
- ii. Soak the template slide for 2 minutes in 100% methanol and polish dry with a clean soft tissue.
- iii. Establish correct mitotic index
It is important that the intended sample has a sufficiently high mitotic index to allow detection of chromosome abnormalities. To check the density of the sample, using a micropipette (e.g. a Gilson P10 or P20) pipette 4 µl of the cell suspension onto one of the areas of the spare template slide and allow to air dry. The small volume used means that you usually have to gently touch the slide with the pipette tip to transfer the suspension. Examine by phase contrast microscopy. If the cell density is too high, dilute the suspension with fresh fixative. If the mitotic index is too low, spin down the fixed cell suspension at 160 xg for 10 minutes. Note the volume of supernatant, remove, and re-suspend the cell pellet in a smaller volume of fresh fixative. If cell sample concentration has been altered, spot 4 µl of the concentrated sample onto another square of your test slide and re-examine by phase contrast microscopy.
Please Note: 50 µl is the minimum volume required for the protocol.
- iii. Quality control of samples
Samples should be examined for cytoplasm since this will interfere with the *in situ* protocol. If the chromosomes appear to be enclosed by a granular material when examined under phase contrast microscopy, then this will compromise results. One method for reducing cytoplasm is to spot 4 µl of your sample onto the template slide and watch the fixative as it spreads out. In the normal situation, the fixative will spread to maximum, recede and then evaporate. To clean up any cytoplasm we have found that effective results are achieved if a fresh drop of 3:1 fixative is allowed to fall onto the spot at the point when the spreading fixative has reached its maximum. Allow the drop of fixative to evaporate and re-examine the spot.
- iv. Spotting of slide
Pipette 4 µl of cell suspension onto all 8 areas of the template slide in a sequence of alternating squares as shown below. This will prevent the cell spreads from interfering with each other.



Once the first group of drops has air-dried, spot the remaining squares with 4 µl drops in the same manner. After the slide has dried, examination of the slide under phase contrast will reveal whether any squares have been missed. If spots have been missed, or squares have too few cells, simply spot those squares again: it is not necessary to re-spot a new slide.

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

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

2. Preparation of ALL Panel device and template slide

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

3. Positioning of template slide over the device

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

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

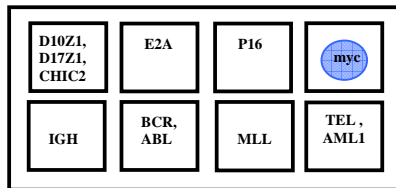


Figure 1. Location of probes on the ALL Panel

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

4. Instructions for use of the Cytocell Slide Surface Thermometer

The temperature of the hotplate should be checked with the Cytocell Slide Surface Thermometer before proceeding to denaturation.

This thermometer is a liquid crystal device and although reversible, it must be treated with care to ensure a reasonable life span. The thermometer must only be used to check the temperature of a hotplate; it must not be used to monitor the hotplate performance over time. To use the thermometer properly, place it onto the surface of the hotplate and wait until the different segments stop changing colour. The correct temperature is indicated by a pale green / gold colour. When the segments appear granular and the colours no longer appear uniform and regular, the thermometer should be discarded as it is exhausted. The life span of each thermometer should, however, easily be sufficient for a ten-device kit.

5. Denaturation

A PCR thermal cycler-heating block is NOT suitable for use in place of solid bed hotplate for this procedure. Transfer the slide/ device to the hotplate taking particular care to hold it level. Ensure the sample slide is in good contact with the hotplate. Denature on the hotplate at 75°C (+/- 1°C) for 2 minutes.

6. Hybridisation

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

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

- Do not place a lid on the water bath.
- Do not hybridise in an incubator.
- Please ensure that the hybridisation chamber is completely dry. (ie. no water or damp tissue inside the chamber).

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

7. Post-hybridisation stringent washes

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

Check the temperature and pH of the solutions in Coplin/Hellendahl jars and adjust if necessary. The pH should be 7.0 when at the correct temperature.
- ii. Stringent wash steps
 1. Remove the device carefully from the slide and place the slide in Solution 1 for 2 minutes. The device cannot be re-used.
 2. Place the slide into Solution 2 for 30 seconds.

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

8. Mounting and visualisation of results

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

1. Baking or otherwise ageing of slides is not recommended as it may reduce signal fluorescence
2. The use of a calibrated thermometer is strongly recommended for measuring temperatures of solutions, water baths, and incubators, as these temperatures are critical for optimum product performance.
3. 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

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

P16 In the normal cell, there should be two red and two green signals (2R, 2G) whilst a deleted cell has either one red signal and two green controls (1R, 2G) if the deletion is hemizygous or no red signals and two green (0R, 2G) if the deletion is homozygous.

E2A. E2A is represented by a break apart (fission) probe. In a normal cell, therefore, there will be two fusion signals (yellow). If E2A is rearranged by translocation, one yellow probe will be split into one red and one green representing the rearranged 19 and the other partner chromosome. The signal pattern will be 1Y, 1R, and 1G.

TEL/AML1. In a t(12;21) patient, there should be two (yellow) fusion signals in addition to the red and green signals of the normal chromosomes 12 and 21 respectively (1R 1G 2Y). Where there are large deletions of ETV6, the signal pattern will be 1R, 2G in the absence of the t(12;21) or 1Y, 1G in the presence of the t(12;21) rearrangement.

BCR/ABL. In the normal cell, these probes will appear as discrete red and green spots, one for each homologous (resulting in a 2G 2R conformation). In a t(9;22) patient, there should be two (yellow) fusion signals in addition to the red and green signals of the normal chromosomes 22 and 9 respectively (1R 1G 2Y).

IGH. IGH is represented by a break apart (fission) probe. In a normal cell, therefore, there will be two fusion signals (yellow). If IGH is rearranged by translocation, one yellow probe will be split into one red and one green representing the rearranged 14 and the other partner chromosome. The signal pattern will be 1Y, 1R, and 1G.

MLL. MLL is also represented by a break apart (fission) probe. In a normal cell, therefore, there will be two fusion signals (yellow). If MLL is rearranged by translocation, one yellow probe will be split into one red and one green representing the rearranged 11 and the other partner chromosome. The signal pattern will be 1Y, 1R, and 1G.

Hybridized ploidy. Signals are visible on a triple filter but for optimal results an Aqua single filter should be used.

Customer Support

Please contact the Cytocell Sales and Marketing Department by telephone or e-mail. probes@cytocell.com

FRANÇAIS

L'hybridation *in situ* par fluorescence (FISH) est une technique qui permet de détecter des séquences ADN sur les chromosomes en métaphase ou sur les noyaux interphasiques 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 la formamide pour dénaturer l'ADN double hélice, le rendant simple hélice. L'ADN cible est alors disponible pour hybridation avec une sonde ADN complémentaire simple brin, dénaturée de la même manière et marquée avec un fluorochrome. Après l'hybridation, l'ADN non hybridé et l'ADN non lié spécifiquement sont éliminés par une série de lavages stringents et l'ADN est ensuite contre-coloré. Un microscope à fluorescence permet la visualisation de la sonde hybridée sur l'ADN cible.

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

Le Chromoprobe Multiprobe ALL Panel

Le Chromoprobe Multiprobe ALL Panel de Cytocell a été conçu pour détecter les remaniements qui apparaissent essentiellement dans les LAL de la lignée lymphocytaire B, bien que certains marqueurs de la lignée T aient été inclus. De plus, en commun avec le panel CLL, la stratégie du panel a été développée afin de fournir une quantité maximale d'informations à partir de cellules interphasiques et dans certains cas, cette stratégie est capable de détecter des remaniements chromosomiques qui ne sont pas détectables par des méthodes standards de cytogénétique.

Tests FISH sur le Chromoprobe Multiprobe ALL Panel

MYC

Pour le produit de fission MYC, les sondes sont très espacées (717 kb) de façon à ce qu'elles soient capables de détecter chacune des trois translocations. La sonde proximale (177 kb), marquée en rouge, se situe à 332 kb en 3' du gène alors que la sonde distale (188 kb), marquée en vert, se situe à 380 kb en 5' du gène.

P16

La sonde P16, marquée en rouge, couvre une région de 101 kb au niveau de la bande 9p21, s'étendant de 59 kb en 3' de P16 jusqu'à l'extrémité 5' de P15. Le mélange de sondes contient également une sonde de contrôle pour le chromosome 9 (D9Z3), le bloc hétérochromatique en 9q12) marquée en vert.

E2A

Le mélange de sondes E2A est composé d'une sonde en 3', marquée en vert, couvrant 164 kb en 3' du gène englobant les marqueurs D19S883 et D2S2123 alors que la sonde de la région en 5', marquée en rouge (191 kb), se situe à 157 kb de l'extrémité 5' du gène.

MLL

Le mélange de sondes MLL possède également une sonde en 5' marquée en vert et une sonde en 3' marquée en rouge. La sonde de la région en 5' (96 kb) englobe le gène CDG3 et 16 kb du gène UBE4A alors que la sonde de la région en 3' (87 kb) englobe une région en 3' de l'exon 5.

BCR/ABL

Le mélange de sondes BCR se compose d'une sonde en 3' de BCR couvrant une région s'étendant sur 171 kb en 3', recouvrant les gènes GNAZ et RAB36 et d'une seconde sonde couvrant une région s'étendant sur 148 kb située à 262 kb en 5' du gène. Les deux sondes sont marquées en rouge et sont orientées de telle façon que les points de cassure dans le mBCR ou le MBCR entraîneront un signal de fusion. Pour ABL, le contig de sondes recouvre 349 kb à partir du milieu du gène F1B3 jusqu'à un point situé à 64 kb de l'extrémité 5' de ABL.

CHIC2

CHIC2 ou domaine hydrophobe riche en cystéine 2 (Cysteine-Rich Hydrophobic Domain 2) est essentiellement réarrangé chez des patients atteints de LAM, fusionnant avec le gène ETV6 situé sur la bande chromosomique 12p13 lors de la translocation t(4;12). Le gène est également situé dans une région fréquemment délétée au cours de la fusion des gènes FIP1L1 et PDGFRA, ce qui est très courant dans le syndrome hyperéosinophile/leucémie éosinophile et est extrêmement sensible à l'imatinib. Dans ce contexte, cependant, il a été inclus sur le panel afin de dénicher le chromosome 4 dans le but d'évaluer les niveaux d'hyperdiploïdie chez les patients atteints de LAM.

IGH

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

Hyperdiploïdie

Le panel ALL a été conçu de façon à ce que l'hyperdiploïdie puisse être déterminée pour les chromosomes 4, 10 et 17 à l'aide de CHIC2 (voir ci-dessus) pour le chromosome 4 et à l'aide de sondes centromériques pour les chromosomes 10 et 17. De plus, les sondes pour IGH et AML1 dénombreront les chromosomes 14 et 21 (cases 8 et 5 respectivement) alors que MYC à la case 1 dénombrera le chromosome 8 pour identifier la trisomie 8 associée à une évolution défavorable dans les LAL de l'adulte. Le dénombrement des chromosomes 4 et 10 à l'aide de ce panel identifiera les patients avec une évolution relativement meilleure, comme ceux-ci ont été associés au sous-groupe de patients présentant entre 55 et 67 chromosomes. Veuillez remarquer que le chromosome 10 est marqué en vert et que le chromosome 17 est marqué en bleu.

Conditionnement

Chaque kit contient les réactifs suivants pour tester 2 (Réf. PMP030), 5 (Réf. PMP031) ou 10 (Réf. Cat. No. PMP032) échantillons.

- 2, 5 ou 10 Dispositifs Chromoprobe Multiprobe – Panel Leucémique coâtés avec des sondes à une seule copie directement marquées.
- 4, 7 ou 12 Lames en verre imprimées
- 500 µl Hybridation Solution B (solution d'hybridation) : Formamide, Sulfate de Dextran, SSC
- 500 µl Contre-colorant : DAPI (ES : 0,125 µg/ml DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole)), Antifade
- 1 Slide Surface Thermometer (Thermomètre de surface pour lames)
- 1 Chromoprobe Multiprobe Hybridation Chamber (Chambre d'hybridation Chromoprobe Multiprobe)

Avertissements et Précautions

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

Conservation et Manipulation

Le kit Chromoprobe Multiprobe System doit être conservé à 2-8 °C jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette du kit. **Ne pas congeler.** Le contre-colorant doit être conservé à l'abri de la lumière.

Équipement nécessaire non fourni

- a) Plaque chauffante (avec bloc et contrôle de la température jusqu'à 80 °C)
- b) Incubateur à 37 °C
- c) Micropipettes à volume variable 1 µl – 200 µl
- d) Bain-marie à 37 °C (sans agitation)
- e) Tubes à microcentrifugation (0,5 ml)
- f) Bain-marie avec contrôle de la température à 72 °C
- g) Microscope à fluorescence
- h) Cuves en plastique ou en verre
- i) Centrifugeuse
- j) Forceps
- k) Huile à immersion pour microscope à fluorescence
- l) Lamelles en verre pour fluorescence (24 x 50 mm)

Microscopes et 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 System a été conçu pour utilisation sur des cellules du sang périphérique ou de la moelle osseuse cultivées et fixées avec le fixateur de Carnoy qui doivent être préparées selon les protocoles en vigueur dans le laboratoire ou établissement.

Préparer les échantillons sur les lames en verre Chromoprobe Multiprobe selon le protocole Cytocell ci-dessous. Cuire ou vieillir les lames n'est pas recommandé, ceci pouvant réduire l'intensité du signal fluorescent.

Protocole Chromoprobe Multiprobe

1. Préparation de la lame échantillon

- i. Nettoyage de la lame échantillon
Plonger la lame échantillon dans un bain de méthanol à 100 % pendant 2 minutes et sécher avec un tissu doux et propre.
- ii. Établir un index mitotique correct
Il est important que l'échantillon ait un index mitotique élevé afin de permettre la détection d'anomalies chromosomiques. Pour vérifier la densité cellulaire, utiliser une micropipette (par exemple, Gilson P10 ou P20), pipeter 2 µl de suspension cellulaire et déposer sur une case d'une lame échantillon en trop et laisser sécher. Le dépôt de ce petit volume se fait en touchant légèrement la lame avec l'embout de la pipette pour transférer la suspension. Examiner avec un microscope à contraste de phase.
*Si la densité cellulaire est trop élevée, diluer la suspension avec du fixateur frais (3:1 méthanol : acide acétique glacial).
*Si l'index mitotique est trop faible, centrifuger la suspension à 160 g pendant 10 minutes. Noter le volume de suraigé, éliminer ce suraigé et remettre le culot en suspension dans un plus petit volume de fixateur.
*Si la concentration cellulaire de l'échantillon a été modifiée, déposer 4 µl d'échantillon concentré sur une autre case et vérifier de nouveau par contraste de phase.

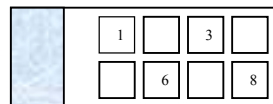
Remarque : un volume minimum de 50 µl est nécessaire pour le protocole.

iii. Contrôle qualité des échantillons

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

iv. Préparation de la lame échantillon

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



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

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

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

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

2. Préparation du dispositif du panel ALL et de la lame échantillon

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

3. Positionnement de la lame échantillon sur le dispositif

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

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

La température de la plaque chauffante doit être vérifiée avec le Cytocell Slide Surface Thermometer avant de procéder à l'étape de dénaturation. Ce thermomètre est un dispositif à cristaux liquides et bien que réversible, il doit être utilisé avec précaution afin de lui assurer une durée de vie raisonnable. Le

thermomètre doit être utilisé uniquement pour vérifier la température de la plaque chauffante avant utilisation. Il ne doit pas être laissé sur la plaque pendant une période prolongée, ceci l'endommagerait.

Pour utiliser le thermomètre correctement, le placer sur la plaque chauffante et attendre que les segments chiffrés arrêtent de changer de couleur. La bonne température est indiquée par une couleur vert pâle/doré. Si les segments apparaissent granuleux ou de couleur non uniforme, le thermomètre doit être jeté car il est usé. La durée de vie de chaque thermomètre doit, cependant, être suffisante pour l'utilisation d'un kit de 10 dispositifs.

5. Dénaturation

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

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

6. Hybridation

Placer l'ensemble lame échantillon/dispositif dans la chambre d'hybridation Chromoprobe Multiprobe. 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.
- Veillez vous assurer que la chambre d'hybridation soit bien sèche (aucune eau ou tissu humide à l'intérieur de la chambre).

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

7. Lavages stringenti di post ibridazione

- Préparation des solutions de lavages stringents
 - Solution 1 : préparer une cuve Coplin/Hellendahl 0,4 x SSC. Placer au bain-marie et laisser équilibrer à 72 °C (+/- 1 °C) et ajuster le pH à 7,0.
 - Solution 2 : préparer une cuve Coplin/Hellendahl 2 x SSC et 0,05 % Tween 20. Laisser équilibrer à température ambiante.

Vérifier la température et le pH des solutions des cuves Coplin/Hellendahl 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 de la lame échantillon. Placer la lame échantillon dans la Solution 1 pendant 2 minutes. (Le dispositif ne peut pas être réutilisé).
 - Placer la lame échantillon dans la Solution 2 pendant 30 secondes.

Éviter de traiter plus de deux lames à la fois lors de l'étape des lavages stringents.

8. Montage et visualisation

- Contre-coloration avec le DAPI
 - Déposer 20 µl de DAPI à chaque extrémité de la lame puis appliquer délicatement une grande lamelle (24 mm x 60 mm).
 - Sécher la lame avec du papier filtre ou un tissu.
 - 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°, ce qui aidera à visualiser la lame.
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 FISHées sont analysables pendant un mois si elles sont conservées dans l'obscurité et à ou en dessous de la température ambiante.

Recommandations

- Cuire ou vieillir les lames n'est pas recommandé, ceci pouvant réduire l'intensité du signal fluorescent.
- 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

MYC La situation normale est représentée par la fusion ou la proche juxtaposition des signaux rouges et verts (2J) alors qu'un remaniement du gène est détecté par des signaux rouges et verts séparés (1J, 1V, 1R). Cet ensemble de sondes détectera de tels remaniements de MYC dans les cellules interphasiques ainsi que dans les cellules en cours de division.

P16 Dans une cellule normale, deux signaux rouges et deux signaux verts (2R, 2V) doivent être observés, alors que dans une cellule déletée, seulement un signal rouge et deux signaux de contrôle verts (1R, 2V) doivent être observés si la déletion est hémizygotique ou aucun signal rouge et deux signaux verts (0R, 2V) si la déletion est homozygote.

E2A. E2A est représenté par une sonde dite « break-apart » (sonde séparée en cas de réarrangement du gène, soit de fusion). Par conséquent, dans une cellule normale, on observera deux signaux de fusion (jaunes). Si E2A est réarrangé suite à une translocation, une sonde jaune se séparera en un signal rouge et un signal vert représentant le chromosome 19 réarrangé et l'autre chromosome partenaire. Le profil des signaux sera 1J, 1R et 1V.

TEL/AML1 Chez un patient présentant une translocation t(12;21), on doit observer deux signaux de fusion (jaune) en plus des signaux rouges et verts des chromosomes normaux 12 et 21 respectivement (1R 1V 2J). Là où il existe de larges délétions de ETV6, le profil des signaux sera 1R, 2V en l'absence de la translocation t(12;21) ou 1J, 1V en présence d'un remaniement t(12;21).

BCR/ABL Dans une cellule normale, ces sondes apparaîtront comme des points rouges et verts individuels, un pour chaque chromosome homologue (résultant en une conformation 2R 2R). Chez un patient présentant une translocation t(9;22), on doit observer deux signaux de fusion (jaune) en plus des signaux rouges et verts des chromosomes normaux 22 et 9 respectivement (1R 1V 2J).

IGH. IGH est représenté par une sonde dite « break-apart » (sonde séparée en cas de réarrangement du gène, soit de fusion). Par conséquent, dans une cellule normale, on observera deux signaux de fusion (jaunes). Si IGH est réarrangé suite à une translocation, une sonde jaune se séparera en un signal rouge et un signal vert représentant le chromosome 14 réarrangé et l'autre chromosome partenaire. Le profil des signaux sera 1J, 1R et 1V.

MLL. MLL est également représenté par une sonde dite « break-apart » (sonde séparée en cas de réarrangement du gène, soit de fusion). Par conséquent, dans une cellule normale, on observera deux signaux de fusion (jaunes). Si MLL est réarrangé suite à une translocation, une sonde jaune se séparera en un signal rouge et un signal vert représentant le chromosome 11 réarrangé et l'autre chromosome partenaire. Le profil des signaux sera 1J, 1R et 1V.

Hyperdiploïdie. Les signaux sont visibles avec un filtre triple bande ; cependant, pour des résultats optimaux, il est recommandé d'utiliser un filtre Aqua.

Support Client

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

ITALIANO

L'ibridazione fluorescente *in situ* (FISH) è una tecnica che consente di individuare sequenze di DNA sui cromosomi metafisici o sui nuclei interfascici ottenuti da campioni citogenetici preparati da cellule coltivate o meno. Questa tecnica utilizza sonde di DNA che riconoscono interi cromosomi o singole sequenze uniche e rappresenta un valido ausilio alle metodiche della citogenetica classica. Dopo la fissazione, il DNA bersaglio viene riscaldato e trattato con formamide per denaturarne i due filamenti e renderlo a singolo filamento. Il DNA bersaglio così ottenuto è ora disponibile per l'appaiamento con una sonda di DNA fluorescente, costituita da un filamento singolo derivato da un analogo processo di denaturazione e composta da una sequenza complementare. Al termine dell'ibridazione, la sonda di DNA non appaiata o appaiata in modo specifico al bersaglio viene rimossa mediante una serie di lavaggi stringenti e il DNA viene controcolorato per una migliore visualizzazione dei segnali di ibridazione. Con il microscopio fluorescente è quindi possibile visualizzare la sonda ibridata al DNA bersaglio.

Il protocollo FISH è ulteriormente semplificato dalla denaturazione contemporanea sia della sonda che del DNA bersaglio e, dopo l'ibridazione "overnight", dall'utilizzo di lavaggi stringenti rapidi privi di formamide. Grazie all'impiego di sonde marcate direttamente, non è più necessario procedere a lunghe fasi di amplificazione.

Kit ALL Panel Chromoprobe Multiprobe

Il kit ALL Panel Chromoprobe Multiprobe di Cytocell è stato sviluppato per individuare i riarrangiamenti che si manifestano prevalentemente nella LLA del tipo a cellule B, sebbene siano stati inclusi anche dei marcatori per il tipo a cellule T. Inoltre, analogamente al pannello messo a punto per la leucemia linfocitica cronica (LLC), anche il kit ALL Panel è finalizzato ad ottenere il maggior numero possibile di informazioni dalle cellule interfasiche e in alcuni casi è in grado di individuare dei riarrangiamenti cromosomici altrimenti non rilevabili con le metodiche citogenetiche convenzionali.

Metodica FISH con ALL Panel Chromoprobe Multiprobe

MYC

Nel caso delle rotture che coinvolgono il gene MYC, le sonde sono notevolmente distanziate (717 kb), in modo tale poter rilevare ciascuna delle tre traslocazioni. La sonda prossimale (177 kb) è posta 332 kb a valle dell'estremità 3' del gene ed è marcata in rosso, mentre la sonda distale (188 kb) è posta 380 kb a monte dell'estremità 5' del gene ed è marcata in verde.

P16

La sonda P16, marcata in rosso, copre una regione di 101 kb nel locus 9q21, estendendosi da 59 kb al 3' di P16 fino all'estremità 5' di P15. Il mix di sonde contiene anche una sonda di controllo per il cromosoma 9 (D9Z3, il blocco eterocromatico al locus 9q12) marcata in verde.

E2A

Il mix di sonde E2A è costituito da una sonda specifica per la regione 3', marcata in verde, che copre 164 kb al 3' del gene e comprende anche i marcatori D19S883 e D2S2123, e da una sonda specifica per la regione 5', marcata in rosso (191 kb), ad una distanza di 157 kb dall'estremità 5' del gene.

MLL

Anche il mix di sonde MLL è costituito da una sonda verde specifica per la regione 5' e da una sonda rossa specifica per la regione 3'. La sonda specifica per la regione 5' (96 kb) copre il gene CDG3 e 16 kb del gene UBE4A, mentre la sonda specifica per la regione 3' (87kb) copre la regione 3' dell'esone 5.

TEL/AML1

Il mix di sonde ETV6 è costituito da una sonda specifica per la regione 5' del gene ETV6, che si estende per 182 kb e copre una regione compresa tra il marcatore D12S845 e l'estremità 5' dell'introne 2, e da un'altra sonda specifica per la regione 3' dello stesso gene, che si estende per 170 kb dal marcatore D12S1989. Entrambe le sonde sono marcate in rosso. Il mix di sonde AML è invece costituito da una sonda che copre 151 kb nella regione 3' del gene RUNX1, compreso il CLIC6, e da una seconda sonda che si estende dall'introne 3 del gene RUNX1 per 51 kb oltre l'estremità 5' del gene

stesso. Nella cellula normale, queste sonde hanno l'aspetto di punti discreti di colore rosso e verde (uno per ciascun omologo, con conseguente schema 2R 2R). Questo mix di sonde consente di rilevare la fusione in corrispondenza della traslocazione (t(12;21) ed è probabilmente in grado di rilevare anche delezioni più estese del gene TEL1 (ETV6).

BCR/ABL

Il mix di sonde BCR è costituito da una sonda specifica per la regione 3' del gene BCR, che copre la regione 3' per una lunghezza di 171 kb comprendendo anche i geni GNAZ e RAB36, e da una seconda sonda di 148 kb che copre la regione 5' dello stesso gene per una lunghezza di 262 kb. Entrambe le sonde sono marcate in rosso e sono orientate in modo tale che i punti di rottura sia nell'mBCR che nell'mBCR diano luogo ad un segnale di fusione. Per l'ABL, la sonda copre una distanza contigua di 349 kb dalla porzione mediana del gene F1UB3 fino a 64 kb dall'estremità 5' del gene ABL.

CHIC2

Il dominio idrofobico 2 ricco di cisteina (CHIC2) è riarrangiato soprattutto nei pazienti con LMA, nei quali si fonde con il gene ETV6 sul cromosoma 12p13 nella traslocazione t(4;12). Il gene è inoltre localizzato in una regione comunemente deleta durante la fusione di FIP1L1 e PDGFRA, di frequentissimo riscontro nella sindrome iperproliferativa/leucemia eosinofila, ed è estremamente sensibile all'imatinib. In questo contesto, tuttavia, è stato incluso nel pannello per determinare il numero di copie del cromosoma 4 allo scopo di valutare i livelli di iperdiploidia nei pazienti con LLA.

IGH

Il segmento costante del gene è marcato in rosso, mentre il segmento variabile è marcato in verde. La condizione normale è rappresentata dalla fusione o dalla giustapposizione dei segnali rosso e verde (2V), mentre il riarrangiamento genico è evidenziabile attraverso altri segnali verde e rosso (1V, 1G, 1R). Questo mix di sonde consente di rilevare i riarrangiamenti di questo tipo anche nelle cellule interfasiche, oltre che nelle cellule in divisione.

Iperdiploidia

Il kit ALL Panel è stato progettato per determinare l'iperdiploidia dei cromosomi 4, 10 e 17, con utilizzo di CHIC2 (vedere sopra) per il cromosoma 4 e di sonde centromeriche per i cromosomi 10 e 17. Inoltre, le sonde per i geni IGH e AML1 sono in grado di effettuare la determinazione del numero di copie dei cromosomi 14 e 21 (rispettivamente celle 8 e 5), mentre la sonda per il gene MYC nella cella 1 consente la determinazione del numero di copie del cromosoma 8 per l'individuazione della trisomia 8, che si associa ad una prognosi infastida della LLA nei pazienti adulti. La determinazione del numero di copie dei cromosomi 4 e 10 con questo kit consentirà di individuare quei pazienti che, appartenendo al sottogruppo con numero di cromosomi compreso tra 55 e 67, presentano una prognosi relativamente migliore. Attenzione: il Cromosoma 10 è marcato in verde ed il Cromosoma 17 è marcato in blu.

Materiale fornito

Ogni singolo kit contiene i seguenti materiali, sufficienti per 2 (Cod. PMP030), 5 (Cod. PMP031) o 10 (Cod. PMP032) campioni:

- 2, 5 o 10 Supporti Chromoprobe Multiprobe per la diagnosi della LLA rivestiti con sonde a singola copia marcate direttamente
- 4, 7 o 12 Vetrini stampati con griglia di riferimento
- 500 µl Soluzione per ibridazione B: formamide, destrano solfato, sodio citrato (SSC)
- 500 µl Soluzione contro-colorante: DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindolo) (es: 0,125 µg/ml di DAPI), Antifade
- 1 Termometro a contatto Cytocell
- 1 Camera di ibridazione Chromoprobe Multiprobe Cytocell

Avvertenze e precauzioni

- 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 manipolazione

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

Attrezzatura richiesta non fornita nel kit

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

Configurazione ottimale del microscopio e dei filtri

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

Preparazione dei campioni

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

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

Protocollo Chromoprobe Multiprobe

1. Preparazione dei vetrini

- Pulire il vetrino con la griglia di riferimento
Immergere il vetrino con la griglia di riferimento per 2 minuti in metanolo al 100% e asciugare perfettamente con un panno asciutto e pulito.

- Determinare l'indice mitotico corretto.
È importante che il campione abbia un indice mitotico sufficientemente elevato per consentire di rilevare eventuali anomalie cromosomiche. Per verificare la densità del campione, utilizzare una micropipetta (es. una Gilson P10 o P20), pipettare 4 µl di sospensione cellulare su un altro vetrino di riferimento tra quelli forniti nel kit e lasciare asciugare all'aria. Data l'esiguità del volume utilizzato, per trasferire la sospensione è sufficiente toccare appena il vetrino con il puntale della pipetta. Esaminare il campione al microscopio a contrasto di fase.

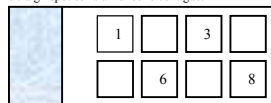
- Se la densità cellulare è troppo elevata, diluire la sospensione con fissativo fresco.
Se l'indice mitotico è troppo basso, centrifugare a 160 g per 10 minuti la sospensione cellulare precedentemente preparata. Osservare il volume del surnatante, asportare e risospesare il pellet cellulare in un volume inferiore di fissativo fresco.
Se la concentrazione cellulare del campione è stata modificata, trasferire esattamente 4 µl di campione concentrato in un'altra cella del vetrino e riesaminare il campione al microscopio a contrasto di fase.

N.B.: 50 µl è il volume minimo richiesto per il protocollo.

- Controllo qualità dei campioni
I campioni devono essere controllati per escludere l'eventuale presenza di citoplasma, in quanto quest'ultimo può interferire con il protocollo di ibridazione *in situ*. Se all'osservazione al microscopio a fase di contrasto i cromosomi appaiono circondati da materiale granulare, i risultati del test saranno compromessi. Uno dei possibili metodi per ridurre la presenza di citoplasma è trasferire esattamente 4 µl di campione sul vetrino e osservare la propagazione del fissativo. In condizioni normali, il fissativo si distribuisce sulla superficie del vetrino fin dove possibile, quindi si ritira ed evapora. Per ripulire efficacemente il campione da eventuali tracce di citoplasma, si consiglia di lasciare cadere una goccia fresca di fissativo 3:1 sullo spot cellulare nel punto esatto che corrisponde al limite massimo di distribuzione del fissativo. Lasciar evaporare la goccia di fissativo e riesaminare lo spot cellulare.

iv. Spotting sul vetrino

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



Una volta che la prima serie di gocce si è asciugata all'aria, trasferire esattamente 4 µl di gocce nelle celle restanti con la stessa modalità. Dopo che il vetrino si è asciugato, osservandolo al microscopio a contrasto di fase sarà possibile verificare se tutte le celle sono state debitamente riempite. Se così non fosse, o se qualche cella contenesse un numero troppo esiguo di cellule, è sufficiente ripetere lo spotting in quelle celle: non è necessario eseguire nuovamente lo spotting su un altro vetrino.

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

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

2. Preparazione del supporto ALL Panel e del vetrino con griglia di riferimento

- Assicurarsi che la camera di ibridazione Chromoprobe si trovi nel bagnomaria a 37° C. Termostatare a 37° C (+/- 1° C) (questa operazione può richiedere anche un'ora se il bagnomaria è stato acceso a freddo).
- Miscelare la soluzione di ibridazione con pipettaggi ripetuti e preriscaldare a 37° C un'aliquota da 25 µl per ciascun supporto. Preriscaldare a 37° C ciascun supporto posizionandolo con il lato dell'etichetta verso il basso. Non toccare le parti in rilievo del supporto.
- Lavare i vetrini contenenti i campioni fissati in SSC 2x per 2 minuti a temperatura ambiente (20-25° C).
- Mentre il supporto è ancora alla temperatura di 37° C, deidratare i vetrini contenenti i campioni fissati in una serie di etanolo (per 2 minuti ciascuno in etanolo al 70%, 85% e 100%), lasciar asciugare e riscaldare a 37° C.
- Utilizzando una micropipetta P10 e sempre alla temperatura di 37° C, aggiungere 2 µl della soluzione di ibridazione preriscaldata in ciascuno degli 8 compartimenti del supporto preriscaldato.

3. Posizionamento del vetrino sul supporto

- Capovolgere delicatamente il vetrino sopra il supporto in modo tale che il numero 1, che si trova ora in posizione rovesciata, venga a trovarsi in corrispondenza della parte superiore destra del supporto (Fig. 1).
- Assicurarsi che il vetrino sia correttamente allineato con i riscontri sul supporto. Abbassare delicatamente il vetrino sul supporto, in modo tale che le gocce della soluzione di ibridazione vengano a contatto del vetrino. Premere delicatamente e in modo uniforme, in modo tale da assicurare che la soluzione di ibridazione si distribuisca negli angoli di ciascuna delle parti in rilievo del supporto.
- Solvere delicatamente il vetrino impugnandolo all'estremità smerigliata e rovesciarlo in modo tale che venga a trovarsi sotto il supporto. Assicurarsi che il supporto non interferisca con il vetrino causando una possibile contaminazione crociata delle sonde.
- Incubare a 37 °C (+/- 1°C) (su piastra caldo o in incubatore) per 10 minuti.

4. Istruzioni per l'uso del termometro a contatto Cytocell

Prima di procedere alla denaturazione è necessario controllare la temperatura della piastra riscaldante utilizzando il termometro di superficie Cytocell. Questo termometro è un dispositivo a cristalli liquidi e, benché rovesciabile, deve essere maneggiato con cura per garantire una ragionevole durata utile. Il termometro deve essere utilizzato esclusivamente per verificare la temperatura della piastra riscaldante in un dato momento; non deve essere utilizzato per controllare il funzionamento della piastra riscaldante nel tempo.

Per un utilizzo corretto del termometro, collocarlo sulla superficie della piastra riscaldante e attendere fino a che i vari segmenti abbiano cessato di cambiare colore. La temperatura corretta è indicata da un colore verde/dorato pallido. Quando i segmenti hanno un aspetto granulare e i colori non appaiono più regolari ed uniformi, il termometro deve essere scartato perché esaurito. La durata utile di ciascun termometro dovrebbe tuttavia essere sufficiente per coprire l'utilizzo di un kit da 10 test.

5. Denaturazione

Per questa procedura, NON utilizzare termociclatori per PCR al posto delle piastre riscaldanti a letto fisso. Trasferire il gruppo supporto/vetrino sulla piastra riscaldante avendo cura di mantenerlo perfettamente orizzontale (assicurarsi che il vetrino con il campione sia opportunamente a contatto della piastra riscaldante). Eseguire la denaturazione sulla piastra riscaldante a 75° C (+/- 1° C) per 2 minuti.

6. Ibridazione

Porre il supporto con il vetrino nella camera di ibridazione Chromoprobe fornita nel kit, togliere il coperchio e lasciare la camera a bagnomaria (senza agitazione) a 37° C (+/- 1° C) per un'intera notte.

N.B.: Non sigillare il coperchio sulla camera di ibridazione.

Non coprire con un coperchio il bagnomaria.

Non eseguire l'ibridazione in un incubatore.

Assicurarsi che la camera di ibridazione sia completamente asciutta (ossia che non siano presenti acqua o tessuti umidi all'interno della camera).

L'umidità all'interno della camera è essenziale per un esito ottimale dell'ibridazione. Attenendosi alla procedura descritta si otterrà un tenore di umidità ideale.

7. Lavaggio stringente post-ibridazione

- Preparazione delle soluzioni di lavaggio stringente
 - Soluzione 1: Preparare una vaschetta Coplin/Hellendahl contenente SSC 0,4x. Porla in un bagnomaria e attendere che raggiunga una temperatura di 72° C (+/- 1° C), regolando il pH a 7,0.
 - Soluzione 2: Preparare una vaschetta Coplin/Hellendahl contenente SSC 2x e Tween 20 allo 0,05%. Lasciare riposare a temperatura ambiente.Controllare la temperatura e il pH delle soluzioni nelle vaschette di Coplin/Hellendahl e regolarli secondo necessità. Alla giusta temperatura di esercizio, il valore di pH dovrebbe essere 7,0.
- Fasi di lavaggio stringente
 - Togliere accuratamente il vetrino dal supporto e immergerlo nella Soluzione 1 per 2 minuti (il supporto non può essere riutilizzato).
 - Immergere il vetrino nella Soluzione 2 per 30 secondi.**Non sottoporre a lavaggio stringente più di due vetrini contemporaneamente.**

8. Montaggio dei vetrini e lettura dei risultati

- Contro-colorazione con DAPI
 - Applicare 20 µl di DAPI a ciascuna estremità del vetrino e coprire con un vetrino coprioggetto (24 x 50 mm).
 - Assicurare il vetrino con una velina o una carta da filtro.
 - Lasciare al buio per 10 minuti prima di esaminare il vetrino al microscopio a fluorescenza.
- Alcuni tipi di microscopio sono dotati di portavetrini, il che ostacola la visualizzazione delle estremità del vetrino da esaminare. In questo caso, è sufficiente ruotare il vetrino di 180° per facilitarne la visualizzazione completa.

Le sonde utilizzate sul supporto Multiprobe sono marcate direttamente con dei fluorofori, che sono fotosensibili. I risultati migliori si ottengono limitando al minimo la quantità di luce a cui sono esposte le sonde durante queste procedure; tuttavia, non è necessario eseguire l'operazione al buio.

Stabilità dei vetrini montati

Al termine della FISH, i vetrini rimangono analizzabili per un periodo massimo di 1 mese se conservati al buio a temperatura ambiente o a temperature inferiori.

Raccomandazioni d'uso

- Si sconsiglia di porre i vetrini in stufa o di sottoporli ad altro trattamento di invecchiamento, in quanto così facendo si rischia di ridurre la fluorescenza del segnale.
- Per la misurazione delle temperature delle soluzioni, dei bagnomaria e degli incubatori si raccomanda fortemente di utilizzare un termometro accuratamente tarato, in quanto queste temperature sono fondamentali per un rendimento ottimale del prodotto.
- La concentrazione, il pH e la temperatura delle soluzioni di lavaggio stringente sono fondamentali, in quanto una stringenza troppo bassa può determinare un'appaiamento aspecifico della sonda, mentre una stringenza troppo alta può tradursi in una mancanza di segnale.

Risultati attesi

MYC. La condizione normale è rappresentata dalla fusione o dalla giustapposizione dei segnali rossi e verdi (2Y), mentre il riarrangiamento genico è evidenziabile attraverso segnali verdi e rossi separati (1Y 1G 1R). Questo mix di sonde consente di rilevare i riarrangiamenti del gene MYC anche nelle cellule interfasiche, oltre che nelle cellule in divisione.

P16. Nella cellula normale dovrebbero essere presenti due segnali rossi e due segnali verdi (2R 2G), mentre una cellula deleta presenta un solo segnale rosso e due segnali verdi (1R 2G) se la delezione è emizigote, oppure nessun segnale rosso e due segnali verdi (0R, 2G) se la delezione è omozigote.

E2A. E2A è rappresentato da una sonda break apart (fissione). In una cellula normale ci saranno quindi due segnali di fusione (gialli). Se E2A è riarrangiato a seguito di traslocazione, una sonda che dà luogo ad un segnale giallo sarà suddivisa in due parti, una darà un segnale rosso ed una un segnale verde, che rappresentano il cromosoma 19 riarrangiato ed il cromosoma partner nella traslocazione. Il pattern di segnali sarà: 1G, 1R, ed 1V.

TEL/AML1. Nei pazienti con traslocazione (t(12;21)), saranno presenti due segnali di fusione (gialli), oltre rispettivamente al segnale rosso e al segnale verde dei cromosomi 12 e 21 (1R 1G 2Y). Laddove siano presenti ampie delezioni del gene ETV6, lo schema dei segnali sarà 1R 2G se non vi è traslocazione (t(12;21)), oppure 1Y 1G se vi è traslocazione (t(12;21)).

BCR/ABL. Nella cellula normale, queste sonde hanno l'aspetto di punti discreti di colore rosso e verde (uno per ciascun omologo, con conseguente schema 2G 2R). Nei pazienti con traslocazione (t(9;22)), saranno presenti due segnali di fusione (gialli), oltre rispettivamente al segnale rosso e al segnale verde dei cromosomi 22 e 9 (1R 1G 2Y).

IGH. IGH è rappresentato da una sonda break apart (fissione). In una cellula normale ci saranno quindi due segnali di fusione (gialli). Se IGH è riarrangiato a seguito di traslocazione, una sonda che dà luogo ad un segnale giallo sarà suddivisa in due parti, una darà un segnale rosso ed una un segnale verde, che rappresentano il cromosoma 14 riarrangiato ed il cromosoma partner nella traslocazione. Il pattern di segnali sarà: 1G, 1R, ed 1V.

MLL. MLL è rappresentato da una sonda break apart (fissione). In una cellula normale ci saranno quindi due segnali di fusione (gialli). Se MLL è riarrangiato a seguito di traslocazione, una sonda che dà luogo ad un segnale giallo sarà suddivisa in due parti, una darà un segnale rosso ed una un segnale verde, che rappresentano il cromosoma 11 riarrangiato ed il cromosoma partner nella traslocazione. Il pattern di segnali sarà: 1G, 1R, ed 1V.

Iperplodia. I segnali sono visibili con un filtro triplo ma per risultati ottimali si consiglia di utilizzare un filtro Aqua singolo.

Assistenza clienti

Contattare l'Ufficio Commerciale e Vendita della Cytocell

DEUTSCH

Einleitung

Die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) ist eine Technik, mit der DNA-Sequenzen auf Metaphase-Chromosomen oder Interphasen-Kernen bei fixierten Kulturen oder nicht in Kultur gezüchteten zytogenetischen Proben nachgewiesen werden können. Die Technik verwendet DNA-Sonden, die an gesamte Chromosomen oder an einzelne, einmalige Sequenzen hybridisieren und dient als leistungsstarke Ergänzung zur klassischen Zytogenetik. Die Ziel-DNA wird zum Denaturieren der doppelsträngigen DNA nach dem Fixieren mit Hitze und Formamid behandelt, wodurch sie einzelsträngig wird. So kann sich die Ziel-DNA an eine ebenso denaturierte, einzelsträngige fluoreszenzmarkierte DNA-Sonde mit komplementärer Sequenz anlagern. Nach der Hybridisierung werden nichtgebundene und nicht spezifisch gebundene DNA-Sonden durch eine Reihe von Waschküchungen unter stringenten Bedingungen entfernt und die DNA zum Sichtbarmachen gegengefärbt. Unter dem Fluoreszenzmikroskop wird die hybridisierte Sonde am Zielmaterial erkennbar.

Das FISH-Protokoll wird durch das gleichzeitige Denaturieren von Sonde und Ziel-DNA und durch die Verwendung von raschen, formamidfreien stringenten Waschküchungen nach Hybridisierung über Nacht weiter vereinfacht. Die direkt etikettierten Sonden machen langwierige Vergrößerungsschritte überflüssig.

Prinzip der Multiprobe ALL

Die Multiprobe ALL wurde entwickelt, um unter Benutzung von FISH-Sonden, die bei einem einzigen Hybridisierungsexperiment auf einem Objektträger aufgebracht werden, möglichst viele Informationen über den Genotyp des Patienten zu erhalten.

Dazu werden auf einem Trägersystem 8 oder 24 verschiedene DNA-Sonden jeweils auf separaten Stempeln in Lösung gebracht.

Das fixierte Probenmaterial wird auf einem Matrizenobjektträger mit 8 oder 24 nummerierten Feldern aufgebracht, nicht getropft. Danach auf den Sonden-Träger aufgelegt. Denaturierung von Material und Sonde geschieht dabei in einem Schritt.

Die Multiprobe ALL von Cytocell wurde zur Entdeckung von Umlagerungen entwickelt, die vorwiegend bei ALL-B-Zellen auftreten, es wurden aber auch einige T-Zellenmarker mit einbezogen. Die Strategie, die die Multiprobe-ALL mit der Multiprobe-CLL gemeinsam hat, wurde entwickelt, um die maximale Menge von Informationen in Interphasezellen zu erhalten, und in manchen Fällen kann sie auch Chromosomenumlagerungen entdecken, die bei Benutzung der Standard-Zytogenetik unentdeckt bleiben.

FISH-Tests mit der Multiprobe ALL

MYC

Für das MYC-Spaltprodukt hybridisieren die Sonden mit großen Zwischenräumen (717Kb), so dass sie jede der drei Translokationen erfassen können. Die proximale Sonde (177Kb) ist 332Kb 3' des Gens und rot markiert, die distale Sonde (188Kb) ist 380Kb 5' des Gens und grün markiert.

P16

Die rot markierte P16-Sonde deckt einen Bereich von 101Kb von 9p21 ab, der sich von 59Kb 3' von P16 bis zum 5'-Ende von P15 erstreckt. Die Sondenmischung enthält auch eine grün markierte Kontrollsonde für Chromosom 9 (D9Z3, den heterochromatischen Block auf 9q12) ist grün markiert.

E2A

Die E2A Sondenmischung besteht aus einer grün markierten 3'-Sonde, die 164Kb 3' des Gens abdeckt und die Marker D19S883 und D2S2123 umspannt, während die rot markierte Sonde (191Kb) der Region 5' 157Kb vom Ende der Region 5' des Gens liegt.

MLL

Die MLL-Sondenmischung hat ebenfalls eine grüne 5'-Sonde und eine rote 3'-Sonde. Die Sonde für Region 5' (96Kb) umspannt das Gen CDG3 und 16Kb des Gens UBE4A, die Sonde für die Region 3' (87Kb) umspannt dagegen eine Region 3' von Exon 5.

TEL/AML1

Die ETV6 – Sondenmischung enthält eine Sonde 5' von ETV6, die eine Region zwischen dem Marker D12S845 und dem 5' – Ende von Intron 2 abdeckt, und 182Kb misst, und eine zweite Sonde, die eine Region 3' des Gens abdeckt und sich 170Kb vom Marker D12S898 aus erstreckt. Beide sind rot markiert. Bei AML1 decken die Sonden 151Kb 3' von RUNX1 ab, wobei sie CLIC6 einschließen, und eine zweite Sonde, die sich von Intron 3 von RUNX1 bis 51Kb über das Ende 5' des Gens erstreckt. Bei einer normalen Zelle erscheinen diese Sonden als einzelnes rotes bzw. grünes Signal, eines für jedes Homolog (was eine Anordnung 2G 2R ergibt). Dieses Sondenset detektiert die Fusion t(12;21) und auch größere Deletionen des Gens TEL1 (ETV6).

BCR/ABL

Die BCR-Sondenmischung enthält eine Sonde 3' von BCR, welche eine Region abdeckt, die sich 171Kb 3' erstreckt und die Gene GANZ und RAB36 abdeckt, sowie eine zweite Sonde, welche eine Region von 262Kb 5' des Gens mit einer Ausdehnung von 148Kb abdeckt. Beide sind rot markiert und so ausgerichtet, dass Bruchpunkte entweder in mBCR, oder in MbCR ein Fusionsignal ergeben. Bei ABL decken die Sonden 349Kb von der Mitte des Gens FUB3 bis zu einem Punkt 64Kb vom Ende 5' des ABL Gens ab.

CHIC2

Die CHIC2 oder zysteinerische hydrophobische Domäne 2 ist vorwiegend bei Patienten mit AML umgelagert, wobei sie bei der Translokation t(4;12) mit dem Gen ETV6 auf Chromosom 12p13 fusioniert. Das Gen liegt auch in einer Region, die bei der Verschmelzung von FIP1L1 und PDGFRA üblicher Weise deletiert wird, was sehr häufig beim Hyperesoinophilie-Syndrom bzw. bei der eosinophilen Leukämie auftritt. Es reagiert äußerst empfindlich auf Imatinib. In diesem Kontext dient es jedoch auf der Multiprobe-ALL zur Nummerierung für Chromosom 4, um den Grad an Hyperdiploidität bei ALL-Patienten beurteilen zu können.

IGH

Die konstante Region des Gens ist rot markiert, das variable Segment dagegen ist grün markiert. Die normale Situation wird durch die Verschmelzung oder enge Außenanlagerung des roten und des grünen Signals (2Y) angezeigt, während eine Umlagerung des Gens durch getrennte grüne und rote Signale (1Y, 1G, 1R) entdeckt werden kann. Dieses Sondenset entdeckt solche Umlagerungen sowohl bei Interphasen-Zellen, als auch bei sich teilenden Zellen.

Hyperdiploidität

Die Multiprobe ALL wurde so ausgelegt, dass Hyperdiploidität bei den Chromosomen 4, 10 und 17 durch Benutzung von CHIC2 (siehe oben) für Chromosom 4 zusammen mit Zentromersonden für die Chromosomen 10 und 17 bestimmt werden kann. Zusätzlich zählen Sonden für IGH und AML1 die Chromosomen 14 und 21 (Quadrate 8 und 5), während MYC auf Quadrat 1 Chromosom 8 zählt, um Trisomie 8 festzustellen, die bei ALL von Erwachsenen mit einem schlechten Ausgang verbunden ist. Die Zahl der Chromosomen 4 und 10 identifiziert die Patienten mit einem relativ besseren Ausgang, da diese mit der Untergruppe von Patienten in Verbindung gebracht wurde, die zwischen 55 und 67 Chromosomen aufweisen.

Kitkomponenten

Jedes Kit enthält folgende Komponenten, die für entweder 2 (Katalognr. PMP030), 5 (Katalognr. PMP031), oder 10 (Katalognr. PMP032) Patientenproben ausreichen:

- 2, 5 oder 10 Chromoprobe Multiprobe – Sondenträger, mit direkt markierten single copy Sonden beschichtet.
- 4, 7 oder 12 Glasobjektträger, die mit einer speziellen Matritze bedruckt sind,
- 500µl Hybridisierungslösung B: Formamid, Dextransulfat, SSC
- 500µl Antifadedlösung: DAPI (ES: 0.125µg/ml DAPI (4,6-Diamidino-2-Phenylindol))
- Cytocell Objektträgerflächen - Thermometer
- Cytocell Multiprobe – Hybridisierungskammer

Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen

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

Lagerung und Behandlung

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

Benötigte, aber nicht mitgelieferte Materialien

Laborgeräte

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

Empfehlungen zum Fluoreszenzmikroskop

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

Probenvorbereitung

Das Multiprobe System ist für die Verwendung von kultivierten peripheren Blut- oder Knochenmarkzellen, die mit Carnoy's Fixativ fixiert wurden, ausgelegt. Die Zellen sollten nach den Richtlinien des Labors oder der Einrichtung präpariert werden.

Bereiten Sie Präparate auf den Cytocell Multiprobe Matrizen-Objektträgern nach dem untenstehenden Cytocell Protokoll vor. Erhitzen oder Altern der Objektträger wird nicht empfohlen da dies zu einer Verminderung der Signalfrequenz führen kann.

Multiprobe Protokoll

1. Vorbereitung des Objektträgers

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

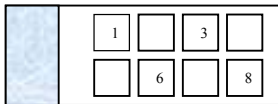
ii. Den korrekten Mitoseindex herstellen.
Es ist wichtig, dass die Probe einen genügend hohen Mitoseindex hat, um Chromosomenabnormitäten zu erkennen. Zur Überprüfung der Zelllichte 4µl der Zellsuspension auf eines der Felder eines Matrizenobjektträgers aufzutropfen und an der Luft trocknen lassen. Unter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

Wenn die Zelllichte zu hoch ist, die Suspension mit frischem Fixativ verdünnen.
Wenn der Mitoseindex zu niedrig ist, die fixierte Zellsuspension für 10 Minuten auf 160g herunterbringen. Die Menge des an der Oberfläche schwimmenden Materials feststellen, dieses entfernen und den Zelltropfen noch einmal in eine kleinere Menge frisches Fixativ geben.
Wenn sich die Zelllichte der Probe geändert hat, 4µl des auf ein anderes Quadrat Ihres Testobjektträgers aufzutropfen und unter dem Phasenkontrastmikroskop beurteilen.

Wenn sich die Zelllichte der Probe geändert hat, 4µl des auf ein anderes Quadrat Ihres Testobjektträgers aufzutropfen und unter dem Phasenkontrastmikroskop beurteilen.

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

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



Sobald die erste Gruppe von Tropfen an der Luft getrocknet hat, die übrigen Quadrate auf die gleiche Weise mit 4µl betropfen. Sobald der Objektträger trocken ist, zeigt die Untersuchung unter dem Phasenkontrastmikroskop, ob Quadrate ausgelassen worden sind. Wenn Punkte ausgelassen wurden, oder Quadrate zu wenig Zellen aufweisen, betropfen Sie diese Quadrate einfach noch einmal: es ist nicht notwendig, noch einmal einen neuen Objektträger zu betropfen.

Wenn Punkte ausgelassen wurden, oder Quadrate zu wenig Zellen aufweisen, betropfen Sie diese Quadrate einfach noch einmal: es ist nicht notwendig, noch einmal einen neuen Objektträger zu betropfen.

Wenn Punkte ausgelassen wurden, oder Quadrate zu wenig Zellen aufweisen, betropfen Sie diese Quadrate einfach noch einmal: es ist nicht notwendig, noch einmal einen neuen Objektträger zu betropfen.

Wenn Punkte ausgelassen wurden, oder Quadrate zu wenig Zellen aufweisen, betropfen Sie diese Quadrate einfach noch einmal: es ist nicht notwendig, noch einmal einen neuen Objektträger zu betropfen.

2. Vorbereitung der ALL-Platte und des Objektträgers

i. Die Multiprobe Hybridisierungskammer in ein Wasserbad mit 37°C legen auf 37°C (+/- 1°C) aufwärmen. (Wenn das Wasserbad kalt angeschaltet wurde, kann das bis zu einer Stunde dauern).

ii. Die Hybridisierungslösung mit der Pipette resuspendieren und einen Aliquot von 25µl pro Sondenträger auf 37°C vorwärmen. Den Sondenträger ebenso auf 37°C vorwärmen, wobei die **Etikettenseite nach unten gerichtet** ist.

iii. Die erhöhten Oberflächen dabei nicht berühren.
Objektträger für 2 Minuten in 2 x SSC bei Zimmertemperatur (20-25°C) waschen.

iv. Solange der Sondenträger noch auf 37°C ist, den Matrizenobjektträger mit den fixierten Proben in einer Alkoholreihe dehydrieren (je 2 Minuten in 70%, 85% und absolutem Ethanol), lufttrocknen und zum Aufwärmen auf 37°C legen.

v. 2µl vorgewärmte Hybridisierungslösung mit einer P10 Mikropipette auf jeden der acht Bereiche des vorgewärmten Sondenträgers geben, solange dieser noch 37°C hat.

3. Positionierung des Matrizen-Objektträgers über dem Sondenträger.
i. Den Matrizen-Objektträger umdrehen und vorsichtig auf den Sondenträger legen, so dass die Nummer 1, die jetzt nach unten zeigt, auf dem oberen rechten Bereich der Vorrichtung zu liegen kommt (Abbildung 1).

ii. Vergewissern Sie sich, dass der Matrizen-Objektträger sorgfältig auf die entsprechenden Felder der Vorrichtung ausgerichtet ist. Den Objektträger vorsichtig über der Vorrichtung absetzen, so dass die Tropfen der Hybridisierungsflüssigkeit den Objektträger berühren. **Sacht** aufliegen und gleichmäßig andrücken, so dass sich die Hybridisierungsflüssigkeit bis zu den Rändern jedes der erhöhten Bereiche auf der Vorrichtung ausbreitet.

iii. Den Objektträger anheben, wobei Sie das matte Ende des Glasobjektträgers **vorsichtig** halten, und ihn umdrehen, so dass der Objektträger unter der Vorrichtung ist. Achten Sie darauf, dass die Vorrichtung nicht über den Matrizen-Objektträger schmiert, da das eine Kreuzkontamination der Sonden verursachen könnte.

iv. 10 Minuten bei 37 °C (+/- 1°C) inkubieren (Heizplatte oder Inkubator).

4. Anweisungen zur Verwendung des Cytocell Objektträgerflächen-Thermometers
Vor der Denaturierung sollte die Temperatur der Heizplatte mit dem Cytocell Objektträgerflächen-Thermometer geprüft werden.

Dieses Flüssigkristall Thermometer muss, auch wenn es reversibel ist, sorgfältig behandelt werden, um eine verminderte Lebensspanne zu gewährleisten. Es darf nur zur Temperaturmessung auf einer Heizplatte verwendet werden. Es dient nicht zur Überwachung der Heizplattenleistung über einen längeren Zeitraum.

Das Thermometer auf die Heizplatte legen und warten, bis die verschiedenen Segmente aufhören, die Farbe zu wechseln. Die korrekte Temperatur wird durch eine blaugrüne/goldene Farbe angezeigt. Wenn die Segmente körnig aussehen und die Farben nicht mehr gleichmäßig und ordentlich erscheinen, sollte das Thermometer weggeworfen werden, weil es erschöpft ist. Die Lebensspanne jedes Thermometers sollte jedoch leicht für ein Kit mit zehn Vorrichtungen ausreichen.

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

Den Objektträger mit der Vorrichtung auf die Heizplatte legen und dabei besonders darauf achten, sie waagrecht zu halten. (Achten Sie darauf, dass der Probenobjektträger guten Kontakt zur Heizplatte hat). Bei 75°C (+/- 1°C) **2 Minuten lang** auf der Heizplatte denaturieren.

6. Hybridisierung
Den Objektträger mit der Vorrichtung in die vorgewärmte Hybridisierungskammer legen, den Deckel wieder aufliegen und die Kammer über Nacht in das 37°C (+/- 1°C) warme (nicht durchmischende) Wasserbad legen.

Bitte beachten Sie: Den Deckel der Hybridisierungskammer nicht versiegeln. Keinen Deckel auf das Wasserbad geben. Nicht in einem Inkubator hybridisieren.

Stellen Sie bitte sicher, dass die Hybridisierungskammer vollkommen trocken ist. (d.h., dass sich kein Wasser oder feuchtes Gewebe in der Kammer befindet).

Die Feuchtigkeit in der Kammer im Wasserbad ist für eine optimale Hybridisierung völlig ausreichend.

7. Stringentes Waschen nach der Hybridisierung

i. Vorbereitung der stringenten Waschlösungen
1. Lösung 1: Einen Coplin / Helledahl-Trog mit 0,4 x SSC vorbereiten. In ein Wasserbad geben und auf 72°C (+/- 1°C) erwärmen lassen, den pH-Wert auf 7,0 bringen.

2. Lösung 2: Einen Coplin / Helledahl-Trog mit 2 x SSC und 0,05% Tween 20 vorbereiten. Bei Zimmertemperatur stehen lassen.

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

ii. Stringente Waschschritte
1. Die Vorrichtung vorsichtig vom Objektträger abnehmen und den Objektträger für 2 Minuten in Lösung 1 (0,4xSSC) einlegen. (Der Sondenträger kann nicht wieder verwendet werden).

2. Den Objektträger für 30 Sekunden in Lösung 2 (2xSSC/0,05%Tween) einlegen.
Nicht mehr als zwei Multiprobe-Objektträger waschen.

8. Gegenfärbung und Auswertung der Ergebnisse
i. Gegenfärben mit DAPI
1. Auf jedes Ende des Objektträgers 20µl DAPI auftragen und ein Deckplättchen (24 x 50mm) aufliegen.

2. Den Objektträger mit Filterpapier oder einem Tuch abtupfen.
3. Vor dem Betrachten unter dem Fluoreszenzmikroskop 10 Minuten im Dunkeln lassen.

ii. Manche Mikroskoptypen haben Halter für den Objektträger, die ein Betrachten der äußeren Enden des Objektträgers erschweren. Sollte das passieren, den Objektträger einfach um 180° drehen.

Die auf der Multiprobe-Vorrichtung verwendeten Sonden sind mit lichtempfindlichen Fluorophoren direkt markiert. Die Resultate werden verbessert, wenn die Sonden bei diesen Prozeduren nur minimal dem Licht 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. Erhitzen oder Altern der Objektträger wird nicht empfohlen da dies zu einer Verminderung der Signalfrequenz führen kann.

2. 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.

3. Die Konzentrationen der Waschlösungen (Stringenz), pH und Temperatur sind wichtig, da niedrig stringente Bedingungen zu nicht-spezifischer Bindung der Sonden führen kann und zu hohe Stringenz zum Verlust des Signals.

Erwartete Ergebnisse
MYC Die normale Situation wird daher durch die Versmelzung oder enge Außenanlagerung des roten und des grünen Signals (2Y) angezeigt, während eine Umlagerung des Gens durch getrennte grüne und rote Signale (1Y, 1G, 1R) entdeckt werden kann. Dieses Sondenset entdeckt solche Umlagerungen sowohl bei Interphasen-Zellen, als auch bei sich teilenden Zellen.

P16 Bei der normalen Zelle sollte es zwei rote und zwei grüne Signale geben (2R, 2G), während eine Deletion entweder ein rotes und zwei grüne Signale (1R, 2G) zeigt, wenn die Deletion hemizygotisch ist, oder kein rotes aber zwei grüne Signale (0R, 2G), wenn die Deletion homozygotisch ist.

E2A, E2A wird durch eine Break-apart-Sonde repräsentiert. In einer normalen Zelle werden aus diesem Grund zwei Fusionsignale (gelb) auftreten. Wenn es in E2A zu einem translokationsbedingten Rearrangement kommt, wird eine gelbe Sonde in einen roten und einen grünen Anteil aufgespalten, die das Chromosom 19 mit dem Rearrangement und das andere Partnerchromosom repräsentieren. Das Signalmuster lautet 1Y (gelb), 1R (rot) und 1G (grün).

TEL/AML1 Bei Patienten mit t(12;21) sollte es zusätzlich zu den roten und grünen Signalen der normalen Chromosomen 12 und 21 zwei gelbe Fusionsignale geben (1R, 1G, 2Y). Bei größeren Deletionen von ET6 wird das Signalmuster ohne t(12;21) 1R, 2G sein. Bei einer Umlagerung t(12;21) dagegen 1Y, 1G.

BCR/ABL Bei der normalen Zelle erscheinen diese Sonden für jedes Homolog als einzelnes rotes bzw. grünes Signal, (2G 2R). Bei einem Patienten mit t(9;22) sollte es zusätzlich zu einem roten und grünen Signalen für die normalen Chromosomen 22 und 9 zwei gelbe Fusionsignale geben (1R, 1G, 2Y).

IGH, IGH wird durch eine Break-apart-Sonde repräsentiert. In einer normalen Zelle werden aus diesem Grund zwei Fusionsignale (gelb) auftreten. Wenn es in IGH zu einem translokationsbedingten Rearrangement kommt, wird eine gelbe Sonde in einen roten und einen grünen Anteil aufgespalten, die das Chromosom 14 mit dem Rearrangement und das andere Partnerchromosom repräsentieren. Das Signalmuster lautet 1Y (gelb), 1R (rot) und 1G (grün).

MLL, auch MLL wird durch eine Break-apart-Sonde repräsentiert. In einer normalen Zelle werden aus diesem Grund zwei Fusionsignale (gelb) auftreten. Wenn es in MLL zu einem translokationsbedingten Rearrangement kommt, wird eine gelbe Sonde in einen roten und einen grünen Anteil aufgespalten, die das Chromosom 11 mit dem Rearrangement und das andere Partnerchromosom repräsentieren. Das Signalmuster lautet 1Y (gelb), 1R (rot) und 1G (grün).

Hyperdiploidie. Die Signale sind mit einem Dreifachfilter sichtbar, für optimale Ergebnisse sollte jedoch ein Aqua Einfachfilter eingesetzt werden.

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

ESPAÑOL

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

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

Panel ALL de Chromoprobe Multiprobe
El panel ALL de Chromoprobe Multiprobe ha sido diseñado para detectar reordenamientos que ocurren principalmente en la ALL de linaje de células B, aunque se han incluido también algunos marcadores de linaje T. Además, al igual que el panel CLL, se ha desarrollado una estrategia de panel para proporcionar la máxima cantidad de información de las células en interfase y, en algunos casos, es posible detectar reordenamientos cromosómicos que son indetectables utilizando las técnicas de citogenética estándar.

Pruebas para FISH del panel ALL de Chromoprobe Multiprobe
MYC
Para la producción de fisión de MYC, las sondas se espacian bastante (717 kb) para poder detectar cada una de las tres translocaciones. La sonda proximal (177 kb) es 332 kb 3' del gen y se marca en color rojo, mientras que la sonda distal (188 kb) es 380 kb 5' del gen y se marca en verde.

P16
La sonda P16, etiquetada en rojo, cubre una región de 101 kb de 9p21, que se extiende desde 59 kb 3' de P16 al extremo 5' de P15. La sonda mixta también contiene una sonda de control para el cromosoma 9 (D9Z3, el bloque heterocromático de 9q12) marca en verde.

E2A
La sonda mixta de E2A consta de una sonda 3', marcada en verde, que cubre 164 kb 3' del gen, entre los marcadores D19S883 y D2S2123, mientras que la sonda de la región 5', marcada en rojo, (191 kb) está a 157 kb del extremo 5' del gen.

MLL
La sonda mixta de MLL también tiene una sonda verde en 5' y una roja en 3'. La sonda de la región 5' (96 kb) abarca el gen CDG3 y 16 kb del gen UBE4A, mientras que la sonda de la región 3' (87 kb) abarca una región 3' del exón 5.

TEL/AML1
La sonda mixta ET6 también contiene una sonda 5' de ET6 que cubre la región entre el marcador D12S845 y el extremo 5' del intrón 2, que mide 182 kb, y una segunda sonda que cubre la región 3' del gen que se extiende 170 kb a partir del marcador D12S1898. Ambas están marcadas en rojo. Para el AML1, las sondas cubren 151 kb 3' de RUNX1, incluidos CLIC6 y una segunda sonda que se extiende del intrón 3 de RUNX1 a 51 kb más allá del extremo 5' del gen. En la célula normal, estas sondas aparecerán en forma de marcas rojas y verdes discretas, una para cada homólogo (que produce una conformación 2G 2R). Este conjunto de sondas detectará la fusión t(12;21) y también podría detectar delecciones mayores del gen TEL1 (ET6).

BCR/ABL
La sonda mixta de BCR/ABL también contiene una sonda roja en 5' y una verde en 3'. La sonda de la región 5' (96 kb) abarca el gen CDG3 y 16 kb del gen UBE4A, mientras que la sonda de la región 3' (87 kb) abarca una región 3' del exón 5.

La sonda mixta BCR contiene una sonda 3' de BCR que cubre una región que se extiende 171 kb 3', y que abarca los genes GNAZ y RAB36, y una segunda sonda que cubre una región de 266 kb 5' del gen que se extiende 148 kb. Ambos están marcados en rojo, y están orientados de tal forma que los puntos de corte de mBCR ó MBRC producirán una señal de fusión. Para el ABL, la sonda contig cubre 349 kb desde la mitad del gen FUB3 hasta un punto de 64 kb del extremo 5' de ABL.

CHIC2

El CHIC2, o dominio 2 hidrofóbico rico en cisteína, se reordena principalmente en pacientes con AML, fusionándose con el gen ETV6 del cromosoma 12p13 en la translocación (4;12). El gen también está situado en una región habitualmente borrada durante la fusión de FIP1L1 y PDGFRA, que es muy común en el síndrome hiperesoinfílico / leucemia eosinofílica, que es muy sensible a imatinib. Sin embargo, en este contexto se ha incluido en el panel como enumerador del cromosoma 4 para evaluar los niveles de hiperdiploidia en los pacientes de ALL.

IGH

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

Hiperdiploidia

El panel ALL ha sido diseñado para poder determinar hiperdiploidia en los cromosomas 4, 10 y 17 utilizando CHIC2 (véase más arriba) para el cromosoma 4 junto con sondas centroméricas para los cromosomas 10 y 17. Además, las sondas de IGH y AML1 enumerarán los cromosomas 14 y 21 (cuadrados 8 y 5, respectivamente), mientras que el MYC en el cuadrado 1 enumerará al cromosoma 8 para identificar la trisomía 8, que está asociada con mal pronóstico en los pacientes adultos de ALL. La enumeración de los cromosomas 4 y 10 utilizando este panel permitirá identificar a aquellos pacientes con resultados relativamente mejores, ya que se han asociado con el subgrupo de pacientes que presentan entre 55 y 67 cromosomas.

Materiales proporcionados

Cada kit contiene los siguientes reactivos que son los suficientes para 2 (Cat. Núm. PMP030), 5 (Cat. Núm. PMP031) o 10 (Cat. Núm. PMP032) muestras de paciente:

- 2, 5 ó 10 Dispositivos Chromoprobe Multiprobe - Dispositivos del panel de leucemia recubiertos con copias únicas de las sondas marcadas directamente.
- 4, 5 ó 12 Porta de cristal con plantiALL especial
- 500µl Solución de hibridación B: Formamida, sulfato de dextrano, SSC
- 500(1 Solución de contraste: DAPI (ES : 0.125µg/ml DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol)), Antifade
- 1 Cytocell Slide Surface Thermometer
- 1 Cytocell Chromoprobe Multiprobe Hybridisation Chamber

Advertencias y precauciones

1. Para diagnóstico *in vitro*. Sólo para uso profesional.
2. Utilizar guantes al manipular las sondas de ADN y el contraste DAPI.
3. La solución de hibridación contiene formamida, que es una sustancia tóxica. Manipular con cuidado; utilizar guantes y bata de laboratorio. Al eliminarla, rociar con gran cantidad de agua.
4. La DAPI y PI puede producir cáncer. Manipular con cuidado; utilizar guantes y bata de laboratorio. Al eliminarla, rociar con gran cantidad de agua.
5. Las sustancias peligrosas deben eliminarse de acuerdo con las instrucciones de su institución en relación con la eliminación de sustancias peligrosas.

Almacenamiento y manejo

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

Equipo necesario pero no proporcionados

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

Recomendación para el microscopio de fluorescencia

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

Preparación de la muestra

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

Protocolo de Chromoprobe Multiprobe

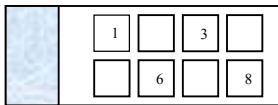
1. Preparación del porta

- i. Limpiar el porta
 - Empape el porta durante 2 minutos en metanol 100% y seque con un papel limpio.
- ii. Establecer el índice mitótico correcto
 - Es importante que la muestra prevista tenga un índice mitótico suficientemente alto para permitir la detección de las anomalías cromosómicas. Para comprobar la densidad de la muestra utilizando una micropipeta (p. ej. una Gilson P10 o P20) ponga 4µl de la suspensión celular en una de las áreas del porta plantiALL y deje secar al aire. El volumen pequeño utilizado significa que normalmente tiene que tocar suavemente el porta con la punta de la pipeta para transferir la suspensión. Examine con el microscopio de contraste de fases.
 - Si la densidad celular es muy elevada, diluya la suspensión con fijador.
 - Si el índice mitótico es muy bajo, centrifugue la suspensión celular fijada a 160g durante 10 minutos. Observe el volumen de sobrenadante, elimínelo y vuelva a suspender el pellet en un volumen menor de fijador.
 - Si la concentración de la muestra ha sido alterada, extienda 4µl de la muestra en otro cuadrado del porta y vuelva a examinar en el microscopio de contraste de fases.

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

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

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



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

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

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

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

2. Preparación del dispositivo y del porta del panel ALL

- i. Asegúrese de que la cámara de hibridación Chromoprobe Multiprobe está en un baño de agua a 37°C estable (+/- 1°C). (Esto puede durar una hora si el baño de agua se calentó a partir de agua fría).
- ii. Mezcle la solución de hibridación mediante pipeteo repetido y precaliente una porción alícuota de 25(1 por dispositivo a 37°C. Precaliente también cada dispositivo a 37°C colocando la etiqueta del dispositivo hacia abajo. No toque las superficies salientes del dispositivo.
- iii. Lave los porta que contienen las muestras fijadas en 2 x SSC durante 2 minutos a temperatura ambiente (20-25°C).

- iv. Mientras el dispositivo continúa a 37°C, deshidrate los porta que contienen las muestras fijadas mediante una serie de etanol (2 minutos cada una a 70%, 85% y etanol puro), seque y caliente a 37°C.
- v. Añada 2(1 de la solución de hibridación precalentada utilizando una micropipeta P10, a cada una de las ocho áreas del dispositivo precalentado mientras se mantiene la temperatura de 37°C.

3. Colocación del porta sobre el dispositivo

- i. Invierta con cuidado el porta sobre el dispositivo de manera que el número 1, que ahora está al revés, quede situado sobre la parte superior derecha del dispositivo (Figura 1).
- ii. Asegúrese de que el porta está cuidadosamente alineado con las áreas correspondientes del dispositivo. Baje con cuidado el porta del dispositivo de modo que las gotas de la solución de hibridación estén en contacto con el porta. Presione suave y uniformemente para asegurarse de que la solución de hibridación se extienda hacia los bordes de cada una de las áreas elevadas en el dispositivo.
- iii. Levante el porta, sujetándolo cuidadosamente el borde esmerilado del porta de cristal e inviértalo de modo que el porta se sitúe debajo del dispositivo. Asegúrese de que el dispositivo no roza con el porta 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

La temperatura de la placa caliente debe comprobarse con el 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.

5. Desnaturalización

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

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

6. Hibridación

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

Nota: No selle la tapa de la cámara de hibridación. No tape el baño de agua. No hibride en un incubadora. Asegúrese de que la cámara de hibridación está completamente seca (p. ej. sin agua ni papel húmedo dentro de la cámara).

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

7. Baños posthibridación profundos

- i. Preparación de las soluciones de lavado profundo
 1. Solución 1: Prepare un recipiente Coplin/Hellendahl 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 Coplin/Hellendahl que contenga 2 x SSC y un 0,05% Tween 20. Déjelo a temperatura ambiente.

Compruebe la temperatura y el pH de las soluciones en su recipiente Coplin/Hellendahl y ajústelos si fuese necesario. El pH debe ser 7,0 cuando alcance la temperatura correcta.
- ii. Pasos para el lavado profundo
 1. Quite el dispositivo cuidadosamente del porta e introduzca el porta en la solución 1 durante 2 minutos. (El dispositivo no puede volver a utilizarse).
 2. Coloque el porta en la solución 2 durante 30 segundos.

Evite lavar profundamente más de dos porta al mismo tiempo.

8. Montaje y visualización de los resultados.

- i. Contraste con DAPI
 1. Aplique 20µl de DAPI a cada extremo del porta y aplique un cubre (24 x 50 mm).
 2. Seque el porta con un pañuelo o papel de filtro.
 3. Déjelo durante 10 minutos en la oscuridad antes de verlo con el microscopio de fluorescencia.
- ii. Algunos tipos de microscopio tienen pinzas para sujetar el porta que pueden dificultar la visión de los extremos del porta. Si esto ocurre, simplemente gire el porta 180°, lo que le permitirá visualizar los extremos del porta.
 - 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 porta terminados

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

Recomendaciones de procedimiento

1. No es recomendable calentar o envejecer los porta ya que puede reducir la señal de fluorescencia.
2. 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.
3. Las concentraciones de lavado (profundidad), el pH y la temperatura son importantes puesto que una baja profundidad de lavado puede resultar en una fijación no específica de la sonda, mientras que demasiada puede dar como resultado la falta de señal.

Resultados esperados

MYC: Por tanto, la situación normal está representada por la fusión o yuxtaposición próxima de las señales roja y verde (2Y), mientras que el reordenamiento del gen es detectable por la separación de las señales roja y verde (1Y, 1G, 1R). Este conjunto de sondas detectará reordenamientos de MYC en las células de la interfase así como en las células en división.

PI6: En la célula normal, debería haber dos señales rojas y dos verdes (2R, 2G), mientras que en la célula con delección hay una señal roja y dos controles verdes (1R, 2G) si la delección es hemizigótica, o ninguna señal roja y dos verdes (0R, 2G) si la delección es homocigótica.

E2A: E2A consiste en una sonda breakpoint o de rotura (fisión). En una célula normal, observaremos dos sondas de fusión (amarillas). Si E2A ha sufrido un reordenamiento por traslocación, una de las señales amarillas desaparecerá y en su lugar habrá una señal roja y una verde representando el reordenamiento en el cromosoma 19 y en el otro cromosoma implicado en el reordenamiento. El patrón de señal será entonces 1Y (1 amarilla), 1R (1 roja) y 1G (1 verde).

TEL/AML1 En un paciente de t(12;21), debería haber dos señales de fusión (amarillas) además de la roja y la verde de los cromosomas normales 12 y 21, respectivamente (1R 1G 2Y). Donde existen grandes delecciones de ETV6, el patrón de señal será 1R, 2G en ausencia de la reordenación (12;21) o 1Y, 1G en presencia de t(12;21).

BCR/ABL: En la célula normal, estas sondas aparecerán en forma de marcas rojas y verdes discretas, una para cada homólogo (que producen una conformación 2G 2R). En un paciente de t(9;22:00), debería haber dos señales de fusión (amarillas) además de la roja y la verde de los cromosomas normales 22 y 9, respectivamente (1R 1G 2Y).

IGH: IGH consiste en una sonda breakpoint o de rotura (fisión). En una célula normal, observaremos dos sondas de fusión (amarillas). Si IGH ha sufrido un reordenamiento por traslocación, una de las señales amarillas desaparecerá y en su lugar habrá una señal roja y una verde, representando el cromosoma 14 y el otro cromosoma implicado en el reordenamiento. El patrón de señal será entonces 1Y (1 amarillo), 1R (1 rojo) y 1G (1 verde)

MLL: MLL consiste en una sonda breakpoint o de rotura (fisión). En una célula normal, observaremos dos sondas de fusión (amarillas). Si MLL ha sufrido un reordenamiento por traslocación, una señal amarilla desaparecerá y en su lugar habrá una señal roja y una verde, representando el cromosoma 11 y el otro cromosoma implicado en el reordenamiento. El patrón de señales será 1Y (1 amarilla), 1R (1 roja) y 1G (1 verde)

Hiperdiploidia: Las señales son visibles bajo filtro triple, sin embargo para resultados óptimos deberá utilizarse un filtro Aqua.

Ayuda al cliente

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

Patents and Trademarks

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

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

Any cyanine dyes used in this Product are manufactured on behalf of Amersham Pharmacia Biotech Inc. under an exclusive license from Carnegie Mellon University and are covered by US Patent Number 5 268 486 and other patents pending. The Compound in this Product is manufactured by NEN Life Science Products, Inc. under US Patent Numbers 5 047 519 and 5 151 507. Use of the Product for commercial purposes is strictly forbidden without written permission from Amersham Pharmacia Biotech Inc. and NEN Life Science Products, Inc.



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

002/2008-03-20

PI029/CE