



Instructions For Use

REF: PMP025/026/027

**Chromoprobe
Multiprobe®- System
AML/MDS Panel**



FOR PROFESSIONAL USE ONLY

ENGLISH/FRANÇAIS/ITALIANO/DEUTSCH/ESPAÑOL

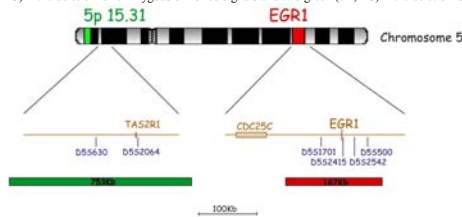
Further information available at www.cytocell.com

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.

FISH Tests on the Chromoprobe Multiprobe AML/MDS Panel

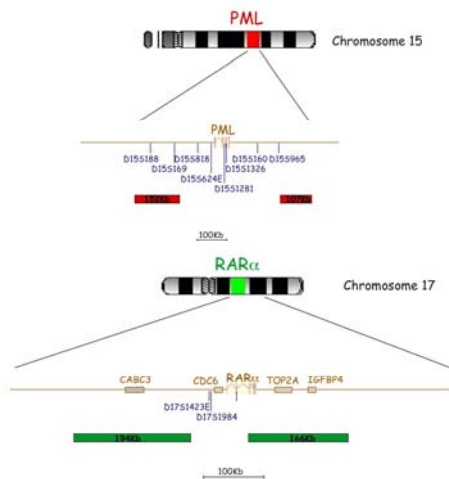
del(5q)

The EGR1 probe, labelled in red, covers a 167 kb region of 5q31.1, extending from 91.9 kb 3' of EGR1 to 68.4 kb 5' of the gene. The probe mix also contains a control probe for chromosome 5 at 5p15.31 flanking the marker DSS630. In the normal cell, there should be two red and two green signals (2R, 2G). Deleted cells have 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.



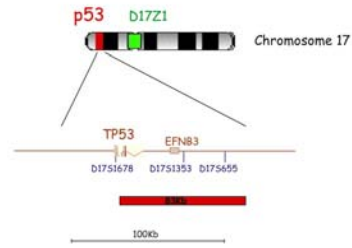
PML/RAR α

The PML probe mix contains a probe 107 kb proximal to PML, measuring 152 kb, and a second probe 169 kb distal to PML, measuring 107 kb. Both are labelled in red. For RAR α , the probes cover a 194 kb region proximal to RAR α , including CAB3 and a second probe including 13Kb of the distal end of RAR α and extending 153 kb beyond the end of the gene. Both are labelled in green. 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(15;17) fusion. In a t(15;17) patient, there should be two (yellow) fusion signals in addition to the green and red signals of the normal chromosomes 15 and 17 respectively (1R 1G 2Y).



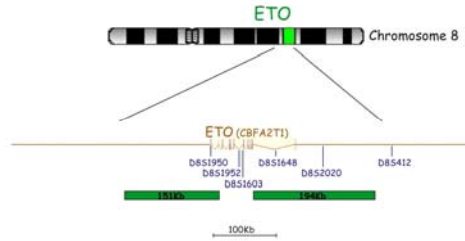
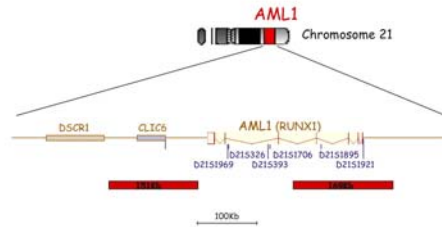
Tp53

The TP53 probe is 83 kb, labelled in red, and covers a region including 15 kb of the 5' end of TP53 extending 67 kb proximal to the gene, to just beyond the marker D175655. The probe mix also contains a control probe for the 17 centromere (D17Z1). 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.



AML1/ETO

The AML1 probe mix contains a probe 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. Both are labelled in red. For ETO, the probes cover a region 151 kb 5' of ETO, including the marker D8S1950 and a second probe extending from intron 7 of ETO to 127 kb beyond the 3' 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(8;21) fusion. In a t(8;21) patient, there should be two (yellow) fusion signals in addition to the green and red signals of the normal chromosomes 8 and 21 respectively (1R 1G 2Y).

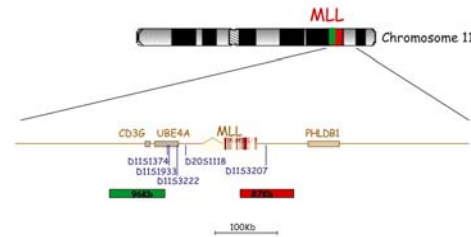


TRISOMY 8

The AML/MDS panel has been designed so that trisomy 8 can be determined using ETO (see above) on square 4.

MLL

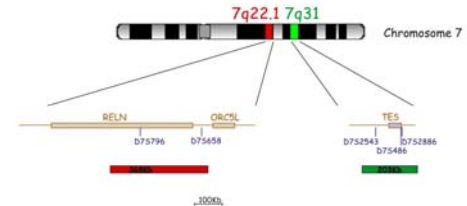
The MLL probe mix also has a green 5' probe and a red 3' probe. The 5' region probe spans the CD3G gene and 16 kb of the UBE4A gene whilst the 3' region probe spans a region 5' of exon 5. The normal situation is represented by fusion or close-juxtaposition of the red and green signals (2Y) whilst a rearrangement of the gene is detectable by separate green and red signals (1Y, 1G, 1R). This probe set will detect rearrangements of MLL in interphase cells as well as in dividing cells.



-7/del(7q)

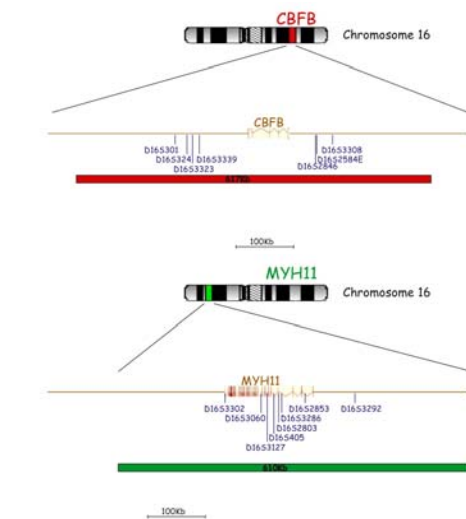
The proximal 7q probe, labelled in red, covers a 368 kb region of 7q22.1, including 235kb of the 5' end of RELN to beyond the marker D7S658. The distal 7q probe, labelled in green, covers a 203 kb region of 7q31 encompassing TES. In the normal cell, there should be two red and two green signals (2R, 2G). Deleted cells may show one of the following signal patterns:-

- 1 - one red signal and two green (1R, 2G) if the deletion encompasses the proximal CDR only and is hemizygous or
- 2 - no red signals and two green (0R, 2G) if the deletion encompasses the proximal CDR only and the deletion is homozygous or
- 3 - one green signal and two red (1G, 2R) if the deletion encompasses the distal CDR only and is hemizygous or
- 4 - no green signals and two red (0G, 2R) if the deletion encompasses the distal CDR only and the deletion is homozygous or
- 5 - one red signal and one green (1R, 1G) for monosomy 7 or hemizygous deletion of both CDRs on 7q.



CBFB/MYH11

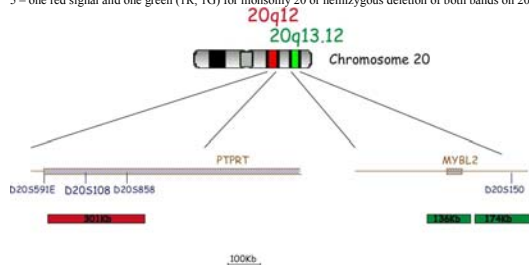
The CBFB probe, labelled in red, covers a 617 kb region of 16q22, extending from 298 kb 5' of CBFB to 246 kb beyond the 3' terminus of the gene. For MYH11, the probe covers 610 kb region of 16p13. In the normal cell, these probes will appear as discrete red and green spots, one for each homologue (resulting in a 2G 2R conformation). This probe set will detect the inv(16) fusion and the variants. In a inv(16) patient, there should be two (yellow) fusion signals in addition to the green and red signals of the normal chromosome 16 (1R 1G 2Y).



Del(20q) (MYBL2)

The proximal 20q probe, labelled in red, covers a 301 kb region of 20q12, extending from 12.4kb inside PTPRT. For the MYBL2 gene in band 20q13.12 the probe contig covers 321kb from 60kb 5' of MYBL2 to 211kb 3' of the gene. In the normal cell, there should be two red and two green signals (2R, 2G). Deleted cells may show one of the following signal patterns:-

- 1 - one red signal and two green (1R, 2G) if the deletion is interstitial encompassing band q12 but not q13.12 and is hemizygous or
- 2 - no red signals and two green (0R, 2G) if the deletion is interstitial encompassing band q12 but not q13.12 and is homozygous or
- 3 - one green signal and two red (1G, 2R) if the deletion encompasses band q13.12 but not q12 and is hemizygous or
- 4 - no green signals and two red (0G, 2R) if the deletion encompasses band q13.12 but not q12 and is homozygous or
- 5 - one red signal and one green (1R, 1G) for monosomy 20 or hemizygous deletion of both bands on 20q.



Material Provided

Each kit contains the following reagents, which are sufficient for either 2 (Cat. No. PMP025), 5 (Cat. No. PMP026) or 10 (Cat. No. PMP027) 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 1µl - 200µl
- 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
- 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/FITC/Texas Red is optimal for viewing all three fluorophores simultaneously.

Sample Preparation

The Chromoprobe Multiprobe System is designed for use on cultured peripheral blood or bone marrow cells fixed in Carnoy's fixative, which should be prepared according to the laboratory or institution guidelines. Prepare samples on Cytocell Chromoprobe Multiprobe template slides according to Cytocell protocol below. Baking or otherwise ageing slides is not recommended as it may reduce signal fluorescence.

Chromoprobe Multiprobe Protocol

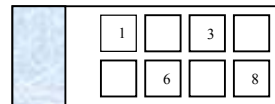
1. Slide preparation

- i. Clean template slide
Soak the template slide for 2 minutes in 100% methanol and polish dry with a clean soft tissue.
- ii. 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 4µl 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 slides

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 4µl 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 AML/MDS 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 on a 37°C hotplate.
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, dehydrated 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 green coloured label.

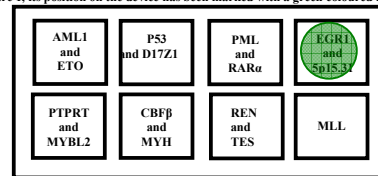


Figure 1. Location of probes on the AML/MDS Panel

- 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 75°C hotplate should be checked with the Cytocell Slide Surface Thermometer before proceeding to denaturation.

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

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

5. Denaturation

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

6. Hybridisation

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

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

Do not place a lid on the water bath.

Do not hybridise in an incubator.

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

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

7. Post-hybridisation stringent washes

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

Check the temperature and pH of the solutions in Coplin/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. Drain off the excess liquid but do not allow to dry.
Avoid processing more than two slides through the stringency washes at any one time.

8. Mounting and visualisation of results.

- 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.

Stability of Finished Slides

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

Procedural Recommendations

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

Customer Support

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

Introduction

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

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

Tests FISH sur le Chromoprobe Multiprobe AML/MDS Panel**del(5q)**

La sonde EGR1, marquée en rouge, couvre une région de 167 kb de 5q31.1, s'étendant de 91,9 kb en 3' de EGR1 jusqu'à 68,4 kb en 5' du gène. Le mélange de sondes contient également une sonde de contrôle pour le chromosome 5 en 5p15.31.3, encadrant le marqueur D5S630. Dans une cellule normale, deux signaux rouges et deux signaux verts (2R, 2V) doivent être observés. Dans une cellule déletée, un seul signal rouge et deux signaux verts de contrôle (1R, 2V) doivent être observés si la déletion est hémizyote ; aucun signal rouge et deux signaux verts (0R, 2V) doivent être observés si la déletion est homozygote.

PML/RARα

Le mélange de sondes PML contient une sonde, d'une longueur de 152 kb, située à 107 kb de manière proximale par rapport à PML, ainsi qu'une deuxième sonde, d'une longueur de 107 kb, située à 169 kb de manière distale par rapport à PML. Les deux sondes sont marquées en rouge. Pour RARα, les sondes couvrent une région de 194 kb située de manière proximale par rapport à RARα, y compris le gène CAB3C, ainsi qu'une deuxième sonde comprenant 13 kb de l'extrémité distale de RARα et s'étendant sur 153 kb au-delà de l'extrémité du gène. Les deux sondes sont marquées en vert. Dans une cellule normale, ces sondes apparaîtront sous la forme de points rouges et verts individuels, un pour chaque chromosome homologe (conduisant à une conformation 2V 2R). Cet ensemble de sondes détectera la fusion t(15;17). Chez un patient présentant une translocation t(15;17), deux signaux de fusion (jaunes) en plus des signaux rouges et verts des chromosomes 15 et 17 normaux respectivement (1R 1V 2J) doivent être observés.

TP53

La sonde TP53, d'une longueur de 83 kb, est marquée en rouge et couvre une région incluant 15 kb de l'extrémité 5' du gène TP53 et s'étendant sur 67 kb de manière proximale par rapport au gène, et jusqu'au marqueur D17S655 inclus. Le mélange de sondes contient également une sonde de contrôle pour le centromère du chromosome 17 (D17Z1). Dans une cellule normale, deux signaux rouges et deux signaux verts (2R, 2V) doivent être observés, alors que dans une cellule déletée, un seul signal rouge et deux signaux verts de contrôle (1R, 2V) doivent être observés si la déletion est hémizyote ou aucun signal rouge et deux signaux verts (0R, 2V) si la déletion est homozygote.

AML1/ETO

Le mélange de sondes AML1 contient une sonde de 151 kb en 3' de RUNX1, y compris le gène CLIC6 ainsi qu'une deuxième sonde s'étendant de l'intron 3 de RUNX1 jusqu'à 51 kb au-delà de l'extrémité 5' du gène. Les deux sondes sont marquées en rouge. Pour ETO, les sondes couvrent une région de 151 kb en 5' de ETO, y compris le marqueur D8S1950 ainsi qu'une deuxième sonde s'étendant de l'intron 7 de ETO jusqu'à 127 kb au-delà de l'extrémité 3' du gène. Dans une cellule normale, ces sondes apparaîtront sous la forme de points rouges et verts individuels, un pour chaque chromosome homologe (conduisant à une conformation 2V 2R). Cet ensemble de sondes détectera la fusion t(8;21). Chez un patient présentant une translocation t(8;21), deux signaux de fusion (jaunes) en plus des signaux rouges et verts des chromosomes 8 et 21 normaux respectivement (1R 1V 2J) doivent être observés.

TRISOMIE 8

Le Chromoprobe Multiprobe AMS/MDS Panel a été conçu de façon à ce qu'une trisomie 8 puisse être mise en évidence à l'aide de la sonde ETO (voir ci-dessus) à la case 4.

MLL

Le mélange de sondes MLL possède une sonde en 5' verte et une sonde en 3' rouge. La sonde de la région en 5' englobe le gène CDG3 et 16 kb du gène UBE4A alors que la sonde de la région en 3' englobe une région en 5' de l'exon 5. La situation normale est représentée par la fusion ou la proche juxtaposition des signaux rouges et verts (2J) alors qu'un réarrangement de gène est détecté par des signaux rouges et verts séparés (1J, 1V, 1R). Cet ensemble de sondes détectera les réarrangements de MLL dans les cellules interphasiques ainsi que dans les cellules en division.

-7/del(7q)

La sonde 7q proximale, marquée en rouge, couvre une région de 368 kb de 7q22.1, y compris 235 kb de l'extrémité 5' de RELN jusqu'au marqueur D7S658 inclus. La sonde 7q distale, marquée en vert, couvre une région de 203 kb de 7q31, englobant TES. Dans une cellule normale, deux signaux rouges et deux signaux verts (2R, 2V) doivent être observés. Il est possible que les cellules déletées présentent un des profils suivants :

- 1 – un signal rouge et deux signaux verts (1R, 2V) si la déletion englobe le CDR proximal uniquement, et il s'agit d'une déletion hémizyote ou
- 2 – aucun signal rouge et deux signaux verts (0R, 2V) si la déletion englobe le CDR proximal uniquement, et il s'agit d'une déletion homozygote ou
- 3 – un signal vert et deux signaux rouges (1V, 2R) si la déletion englobe le CDR distal uniquement, et il s'agit d'une déletion hémizyote ou
- 4 – aucun signal vert et deux signaux rouges (0V, 2R) si la déletion englobe le CDR distal uniquement, et il s'agit d'une déletion homozygote ou
- 5 – un signal rouge et un signal vert (1R, 1V) pour une monosomie 7 ou bien la déletion est hémizyote pour les deux CDR sur le 7q.

CBFβ/MYH11

La sonde CBFβ, marquée en rouge, couvre une région de 617 kb de 16q22, s'étendant de 298 kb en 5' de CBFβ jusqu'à 246 kb au-delà de l'extrémité 3' du gène. Pour MYH11, la sonde couvre une région de 610 kb de 16p13. Dans une cellule normale, ces sondes apparaîtront sous la forme de points rouges et verts individuels, un pour chaque chromosome homologe (conduisant à une conformation 2V 2R). Cet ensemble de sondes détectera l'inversion inv(16) ainsi que les variants. Chez un patient présentant une inversion inv(16), deux signaux de fusion (jaunes) en plus des signaux rouges et verts du chromosome 16 normal (1R 1V 2J) doivent être observés.

del(20q) (MYBL2)

La sonde 20q proximale, marquée en rouge, couvre une région de 301 kb au niveau de la bande 20q12, s'étendant sur 12,4 kb à l'intérieur du gène PTPRT. Pour le gène MYBL2 au niveau de la bande 20q13.12, le contig de la sonde couvre 321 kb en partant de 60 kb en 5' de MYBL2 jusqu'à 211 kb en 3' du gène. Dans une cellule normale, deux signaux rouges et deux signaux verts (2R, 2V) doivent être observés. Il est possible que les cellules déletées présentent un des profils suivants :

- 1 – un signal rouge et deux signaux verts (1R, 2V) si la déletion est interstitielle englobant la bande q12 mais n'englobant pas la bande q13.12, et il s'agit d'une déletion hémizyote ou
- 2 – aucun signal rouge et deux signaux verts (0R, 2V) si la déletion est interstitielle englobant la bande q12 mais n'englobant pas la bande q13.12, et il s'agit d'une déletion homozygote ou
- 3 – un signal vert et deux signaux rouges (1V, 2R) si la déletion englobe la bande q13.12 mais n'englobe pas la bande q12, et il s'agit d'une déletion hémizyote ou
- 4 – aucun signal vert et deux signaux rouges (0V, 2R) si la déletion englobe la bande q13.12 mais n'englobe pas la bande q12, et il s'agit d'une déletion homozygote ou
- 5 – un signal rouge et un signal vert (1R, 1V) pour une monosomie 20 ou bien la déletion est hémizyote pour les deux bandes sur le 20q.

Conditionnement

Chaque kit contient les réactifs suivants pour tester 2 (Réf. PMP025), 5 (Réf. PMP026) ou 10 (Réf. PMP027) échantillons.

- 2, 5 ou 10 Dispositifs Chromoprobe Multiprobe – Panel leucémique cotés avec des sondes à une seule copie directement marquées.
- 4, 7 ou 12 Lames en verre imprimées
- 500 µl Hybridisation 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
- 1 Chromoprobe Multiprobe Hybridisation Chamber

Avertissements et Précautions

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

Conservation et Manipulation

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

Équipement nécessaire non fourni

- a) Plaque chauffante (avec bloc et contrôle de la température jusqu'à 80 °C)
- b) Incubateur à 37 °C

- c) Micropipettes 1 µl – 200 µl
- d) Bain-marie (sans agitation) à 37 °C
- 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 une utilisation sur des cellules du sang périphérique ou de la moelle osseuse cultivées et fixées avec le fixateur de Carnoy et 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**I. 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 surajout, éliminer ce surajout et remettre le culot en suspension dans un plus petit volume de fixateur.

• Si la concentration cellulaire de l'échantillon a été modifiée, déposer 4 µl d'échantillon concentré sur une autre case et vérifier de nouveau par contraste de phase.

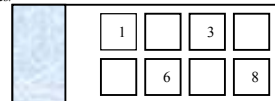
Remarque : un volume minimum de 50 µl est nécessaire pour le protocole.

iii. Contrôle qualité des échantillons

Les échantillons doivent être examinés afin de s'assurer de l'absence de cytoplasme, le cytoplasme pouvant interférer avec le protocole *in situ*. Si les chromosomes apparaissent enfermés par du matériel granuleux lors de leur visualisation sous un microscope à contraste de phase, ceci compromettra alors les résultats. Une méthode pour réduire le cytoplasme consiste à déposer 4 µl d'échantillon sur la lame échantillon et observer la façon dont le fixateur s'étale. En situation normale, le fixateur s'étale au maximum, se rétracte puis s'évapore. Une méthode pour réduire le cytoplasme consiste à déposer une goutte de fixateur 3:1 frais sur le dépôt d'échantillon là où le fixateur s'est étalé au maximum. 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.

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

2. Préparation du dispositif et de la lame échantillon

- i. S'assurer que 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 (+/- 1 °C). Préchauffer également chaque dispositif à 37 °C en veillant à ce que le côté étiqueté soit placé au-dessous.
- iii. Ne pas toucher la surface des cases du dispositif.
- 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.

3. Positionnement de la lame échantillon sur le dispositif.

- i. Retourner délicatement la lame échantillon sur le dispositif afin que la case numérotée 1, qui est à présent à l'envers, soit en ligne avec la case en haut à droite du dispositif (Figure 1).
- ii. Veillez à ce que la lame échantillon soit alignée avec précision sur les cases complémentaires du dispositif. Appliquez 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 afin de placer avec précision, 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.

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

Pour utiliser le thermometer 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 pale/or. Si les segments apparaissent granuleux ou de couleur non uniforme, le thermometer doit être jeté car il est usé. La durée de vie de chaque thermometer 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. (c.-à-d. aucune eau ou tissu humide à l'intérieur de la chambre).

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

7. Lavages stringents de post hybridation

- 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 et ajuster si nécessaire. Le pH doit être de 7,0 lorsque les solutions sont à la bonne température.

ii. 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. Éliminer l'excès de solution mais ne pas laisser sécher.

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

8. Montage et visualisation

- 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 photostables. 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 un dessous de la température ambiante.

Recommandations

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

Support Client

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

ITALIANO

Introduzione

L'ibridazione *in situ* a fluorescenza (Fluorescence *In Situ* Hybridization - FISH) è una tecnica che permette di rilevare sequenze di DNA su cromosomi in metafase o in nuclei in interfase di campioni citogenetici fissati, in coltura o non coltivati. La tecnica prevede l'utilizzo di sonde di DNA in grado di ibridare con l'intero cromosoma o con singole sequenze, e costituisce una potente strumento in aggiunta alle tecniche citogenetiche classiche. Il DNA bersaglio, dopo la fissazione, è sottoposto a denaturazione al calore in presenza di formamide. Il DNA bersaglio è così disponibile per la riassociazione con una sonda di DNA, denaturata allo stesso modo, a singola elica, marcata con una sostanza fluorescente e contenente una sequenza complementare. Terminata l'ibridazione, la sonda di DNA non legata o legata in modo non specifico è rimossa per mezzo di lavaggi stringenti ed il DNA è colorato con un colorante di contrasto. L'ibridazione della sonda viene infine analizzata con un microscopio a fluorescenza. Il protocollo FISH è ulteriormente semplificato dalla denaturazione simultanea delle sonde e del DNA bersaglio e, dopo l'ibridazione notturna, dall'utilizzo di lavaggi rapidi stringenti, in assenza di formamide. Le sonde marcate direttamente eliminano la necessità di passaggi di amplificazione prolungata.

Test FISH sul pannello Chromoprobe Multiprobe AML/MDS

del(5q)

La sonda EGR1, con l'etichetta rossa, copre una regione 5q31.1 di 167kb estendendosi da 91.9kb 3' di EGR1 a 68.4kb 5' del gene. La sonda tipo probe mix contiene anche una sonda di controllo per il cromosoma 5 a 5p15.31.3 che fiancheggia il marker D5S630. Nella cellula normale, ci devono essere due segnali rossi e due verdi (2R, 2V). Le cellule delete hanno controlli con un segnale rosso e due verdi (1R, 2V) se la delezione è emizigotica o nessun segnale rosso e due verdi (0R, 2V) se la delezione è omizigotica.

PML/RARα

La probe mix PML contiene una sonda 107kb prossimale a PML, che misura 152kb e una seconda sonda 169kb distale a PML che misura 107kb. Entrambe hanno l'etichetta rossa. Per RARα, le sonde coprono una regione 194kb prossimale a RARα che comprende CAB3 e una seconda sonda che 13kb comprende dell'estremità distale di RARα e che si estende di 153kb al di là del gene. Entrambe hanno l'etichetta verde. Nella cellula normale, queste sonde appariranno come macchie rosse e verdi distinte una per ciascun omologo (risultante in una conformazione 2V 2R). Questo set di sonde rileverà la fusione t(15;17). In un paziente t(15;17), ci devono essere due segnali di fusione (gialli) oltre ai segnali verdi e rossi rispettivamente dei cromosomi normali 15 e 17 (1R 1G 2V).

TP53

La sonda TP53 è 83kb, etichettata in rosso, e copre una regione che include 15kb dell'estremità 5' di TP53 che si estende di 67kb in modo prossimale al gene, fino ad appena oltre il marker D17S655. La sonda tipo probe mix contiene anche una sonda di controllo per il cromosoma 17 (D17Z1). Nella cellula normale, ci dovrebbero essere due segnali rossi e due verdi (2R, 2V) mentre una cellula deleta ha sia un segnale rosso che due controlli verdi (1R, 2V) se la delezione è emizigotica, e nessun segnale rosso e due verdi (0R, 2V) se la delezione è omizigotica.

AML1/ETO

La probe mix AML1 contiene una sonda 151kb 3' di RUNX1 che comprende CLIC6 e una seconda sonda che si estende dall'introne 3' di RUNX1 a 51kb oltre l'estremità 5' del gene. Entrambe hanno l'etichetta rossa. Per ETO, la sonda copre una regione 151kb 7 di ETO e comprende il marker D8S1950 e una seconda sonda che si estende dall'introne 7 di ETO a 127kb oltre l'estremità 3' del gene. Nella cellula normale, queste sonde appariranno come macchie rosse e verdi distinte una per ciascun omologo (risultante in una conformazione 2V 2R). Questo set di sonde rileverà la fusione t(8;21). In un paziente t(8;21), ci devono essere due segnali di fusione (gialli) oltre ai segnali verdi e rossi rispettivamente dei cromosomi normali 8 e 21 (1R 1V 2G).

TRISOMIA 8

Il pannello AML/MDS è stato progettato in modo che la trisomia 8 possa essere determinata usando ETO (vedi sopra) sul quadrato 4.

MLL

La probe mix MLL ha anche una sonda verde 5' e una sonda rossa 3'. La regione 5' della sonda copre il gene CDG3 e 16kb del gene UBE4A mentre la sonda della regione 3' copre la regione 5' dell'esone 5. La situazione normale è rappresentata da fusione o vicina-giustapposizione dei segnali rossi e verdi (2G) mentre un riarrangiamento del gene è rilevabile attraverso segnali verdi e rossi separati (1G, 1V, 1R). Questo set di sonde rileverà i riarrangiamenti di MLL in cellule di interfase nonché in cellule che si dividono.

-7/del(7q)

La sonda 7q prossimale, con etichetta rossa, copre una regione 368kb di 7q22.1, che comprende 235kb dell'estremità 5' di RELN fino a oltre il marker D7S658. La sonda distale 7q, con etichetta verde, copre una regione 203kb di 7q31 che comprende TES. Nella cellula normale, ci devono essere due segnali rossi e due segnali verdi (2R, 2V). Le cellule delete possono mostrare uno dei seguenti schemi di segnali:-
1 - un segnale rosso e due verdi (1R, 2V) se la delezione comprende solo CDR prossimale ed è emizigotica, oppure
2 - nessun segnale rosso e due verdi (0R, 2V) se la delezione comprende solo CDR prossimale ed è omizigotica, oppure
3 - un segnale verde e due rossi (1G, 2R) se la delezione comprende solo CDR distale ed è emizigotica, oppure
4 - nessun segnale verde e due rossi (0V, 2R) se la delezione comprende solo CDR prossimale ed è omizigotica, oppure
5 - un segnale rosso e uno verde (1R, 1V) per monosomia 7 o delezione emizigotica di entrambe le CDR su 7q.

CBFB/MYH11

La sonda CBFB, con l'etichetta rossa, copre una regione 617kb di 16q22 estendendosi da 298kb 5' di CBFB a 246kb al di là del termine 3' del gene. Per MYH11, la sonda copre la regione 610kb di 16p13. Nella cellula normale, queste sonde appariranno come macchie rosse e verdi distinte una per ciascun omologo (risultante in una conformazione 2V 2R). Questo set di sonde rileverà la fusione inv(16) e le varianti. In un paziente inv(16), ci devono essere due segnali di fusione (gialli) oltre ai segnali verdi e rossi del cromosoma normale 16 (1R 1V 2G).

Del(20q) (MYBL2)

La sonda prossimale 20q, con etichetta rossa, copre una regione 301kb di 20q12, che si estende da 12.4kb all'interno di PTPRT. Per il gene MYBL2 nella banda 20q13.12 la sonda contig copre 321kb da 60kb 5' di MYBL2 a 211kb 3' del gene. Nella cellula normale, ci devono essere due segnali rossi e due segnali verdi (2R, 2V). Le cellule delete possono mostrare uno dei seguenti schemi di segnali:-
1 - un segnale rosso e due verdi (1R, 2V) se la delezione è interstiziale e comprende la banda q12 ma non q13.12 ed è emizigotica, oppure
2 - nessun segnale rosso e due verdi (0R, 2V) se la delezione è interstiziale e comprende la banda q12 ma non q13.12 ed è omizigotica, oppure
3 - un segnale verde e due rossi (1G, 2R) se la delezione comprende la banda q13.12 ma non q12 ed è emizigotica, oppure
4 - nessun segnale verde e due rossi (0G, 2R) se la delezione comprende la banda q13.12 ma non q12 ed è omizigotica, oppure

5 - un segnale rosso e uno verde (1R, 1V) per monosomia 20 o delezione emizigotica di entrambe le bande su 20q.

Materiale fornito

Ogni singolo kit contiene i seguenti materiali, sufficienti per 2 (Cod. PMP025), 5 (Cod. PMP026) o 10 (Cod. PMP027) campioni:

- 2, 5 o 10 Supporti Chromoprobe Multiprobe per la diagnosi della leucemia 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 misure precauzionali

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

Conservazione e utilizzo

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

Apparecchiature necessari non forniti

- Piastra calda con controllo accurato della temperatura fino a 80°C.
- Incubatore a 37°C.
- Micropipette a volume variabile compreso tra 1 µl e 200 µl.
- 37°Bagnomaria (senza agitatore).
- Provette da microcentrifuga (0,5 ml).
- Bagnomaria con controllo accurato della temperatura a 72°C.
- Microscopio a fluorescenza
- Contenitori di Coplin in plastica o vetro.
- Centrifuga.
- Pinzette.
- Olio per lenti ad immersione del microscopio a fluorescenza.
- Vetrini coprioggetto (24x 50 mm) per fluorescenza.

Configurazione ottimale del microscopio e dei filtri

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

Preparazione del campione

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

Protocollo Chromoprobe Multiprobe

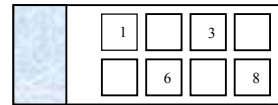
I. Preparazione dei vetrini

- 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 supernatante, asportare e risospesione il pellet cellulare in un volume inferiore di fissativo fresco.
Se la concentrazione cellulare del campione è stata modificata, trasferire esattamente 4 µl di campione concentrato in un'altra cella del vetrino e riesaminare il campione al microscopio a contrasto di fase.
N.B.: 50 µl è il volume minimo richiesto per il protocollo.

- Controllo qualità dei campioni
Esaminare il citoplasma dei campioni in quanto questo potrebbe interferire con il protocollo di ibridazione *in situ*. Se, esaminati al microscopio a contrasto di fase, i cromosomi appaiono racchiusi in un materiale granulare i risultati saranno compromessi. Un metodo per ridurre i problemi legati alla presenza di citoplasma consiste nel caricare 4µl di campione sul vetrino e guardare attentamente come si diffonde il fissativo. In una situazione normale, il fissativo si diffonde al massimo, si dirada e poi evapora. Per eliminare ogni residuo di citoplasma abbiano notato che buoni risultati si raggiungono lasciando cadere una goccia di fissativo fresco 3:1 sullo spot nel momento in cui il fissativo ha raggiunto il massimo punto di espansione. Far evaporare la goccia di fissativo ed esaminare nuovamente il vetrino.

- Caricamento del vetrino
Caricare 4 µl di sospensione cellulare in tutte le 8 aree del vetrino dei campioni, in una sequenza di quadrati alternati, come mostrato di seguito. In questo modo si evita che le cellule diffuse interferiscano tra loro.



Una volta che il primo gruppo di gocce si sono asciugate all'aria riempire analogamente i quadrati restanti con gocce da 4 µl. Quando il vetrino si è asciugato, l'esame dello stesso al microscopio a contrasto di fase rivelerà eventuali quadrati lasciati vuoti.

Nel caso in cui siano stati omessi dei quadrati, o ci siano alcuni quadrati con una quantità insufficiente di cellule, è sufficiente riempire semplicemente tali quadrati di nuovo. Non è necessario caricare un nuovo vetrino.

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

Nota: Se le cellule in metafase appaiono diffuse, pulire accuratamente il vetrino dei campioni in metanolo e caricare nuovamente facendo asciugare ogni goccia prima di procedere al caricamento successivo.

2. Preparazione del dispositivo e del vetrino dei campioni

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

3. Posizionamento del vetrino dei campioni sul dispositivo.

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

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

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

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

5. Denaturazione

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

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

6. Ibridazione

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

Nota: Non sigillare il coperchio sulla camera di ibridazione.

Non coprire il bagno termostato con un coperchio.

Non ibridare in un incubatore.

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

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

7. Lavaggi stringenti post-ibridazione

Preparazione delle soluzioni utilizzate nel corso dei lavaggi stringenti

Soluzione 1: Preparare un contenitore di Coplin/Hellendahl contenente SSC 0,4x Inserirlo in un bagnomaria in soluzione che raggiunga 72°C (+/- 1°C) - aggiustare il pH a 7,0.

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

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

ii. Fasi del lavaggio stringente

- Allontanare con cura il dispositivo dal vetrino dei campioni ed immergere il vetrino nella Soluzione 1 per 2 minuti. (Il dispositivo non può essere riutilizzato)
- Immergere il vetrino nella soluzione 2 per 30 secondi. Rimuovere il liquido in eccesso impedendo, però, che si asciughi completamente.

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

8. Preparazione del vetrino per la visualizzazione dei risultati.

i. Colorazione con DAPI

- Applicare 20 µl di DAPI ad ogni estremità del vetrino ed apporre un coprioggetto (24 x 50 mm).
- Blottare il vetrino con carta di filtro o tessuto.
- Lasciare al buio per 10 minuti prima di procedere alla visualizzazione per mezzo di un microscopio a fluorescenza.

ii. Alcuni microscopi hanno un supporto per vetrini che rende difficile visualizzare le estremità del vetrino stesso. In questo caso si consiglia di ruotare semplicemente il vetrino di 180° per avere una visualizzazione facilitata.

Le sonde utilizzate sul dispositivo Multiprobe sono marcate direttamente con fluorocromi altamente sensibili alla luce. Risultati migliori si ottengono esponendo le sonde alla quantità minima di luce nel corso delle procedure; tuttavia non è necessario lavorare al buio.

Stabilità dei vetrini finiti

I vetrini FISH restano analizzabili per circa 1 mese se conservati al buio a temperatura ambiente o inferiori.

Raccomandazioni per l'uso

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

Assistenza clienti

Contattare l'ufficio commercializzazione e vendita Cytocell.

DEUTSCH

Einführung

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

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

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

FISH-Test auf der Chromosom Multiprobe AML/MDS

del(5q)

Die ERG1-Sonde, rot markiert, deckt 167 kb des Bereichs von 5q31.1 ab und reicht von 91,1kb 3' des ERG1 bis 68,4kb 5' des Gens. Die Sondenmischung enthält ebenso eine Kontrollsonde für das Chromosom 5 bei 5p15.31.3 neben dem Marker D5S630. Bei einer normalen Zelle sollten zwei rote und zwei grüne Signale zu sehen sein. (2R, 2G). Deletion ist charakterisiert durch ein rotes Signal und zwei grüne (1R, 2G) sollte der Verlust hemizygot sein, oder kein rotes Signal und zwei grüne (0R, 2G), wenn die Deletion homozygot ist.

PML/RARα

Die PML-Sondenmischung enthält eine Sonde, die 107kb groß ist, proximal zu PML und 152kb misst, sowie eine zweite Sonde, die 169kb groß ist, distal zu PML und 107kb misst. Beide sind rot markiert. Bei RARα decken die Sonden eine Fläche von 194kb proximal zu RARα ab, einschließlich CABC3 und einer zweiten Sonde einschließlich 13kb des distalen Endes von RARα und geht 153kb über das Ende des Gens hinaus. Beide sind grün markiert. In einer normalen Zelle erscheinen diese Sonden als diskrete rote und grüne Flecke, je einer für jedes Homolog (was eine 2G 2R Anordnung ergibt). Diese Sonde zeigt die t(15;17) Fusion auf. Bei einem t(15;17) Patienten, sollten zwei gelbe Fusionsignale zusätzlich zu den grünen und den roten Signalen der normalen Chromosome 15 und 17 (1R 1G 2Y) zu sehen sein.

TP53

Die TP53 Sonde ist 83kb groß, rot markiert, und deckt eine Region von einschließlich 15kb 5' des TP53 ab, und deckt 67kb proximal zum Gen ab, das direkt nach dem Marker D17S655 sitzt. Die Sondenmischung enthält ebenso eine Kontrollsonde für Chromosom 17 (D17Z1). Bei einer normalen Zelle sollten zwei rote und zwei grüne Signale (2R, 2G) zu sehen sein, während bei Deletion entweder ein rotes und zwei grüne Signale (1R, 2G) im Falle einer hemizygoten Deletion oder kein rotes und zwei grüne Signale (0R, 2G) im Falle einer homozygoten Deletion zu sehen sind.

AML1/ETO

Die AML1 Sondenmischung enthält eine Sonde 3' von RUNX1, die 151 kb groß ist, einschließlich einer CLIC6 und einer zweiten Sonde, welche die Regionen von Intron 3' von RUNX1 bis 51 kb über das 5' Ende des Gens hinaus abdeckt. Beide sind rot markiert. Bei ETO decken die Sonden die Region 5' von ETO, mit einer Größe von 151 kb ab, einschließlich des Markers DSS1950, sowie eine zweite Sonde, die von Intron 7 von ETO bis 127 kb über das 3' Ende des Gens hinausgeht. In einer normalen Zelle erscheinen diese Sonden als diskrete rote und grüne Flecke, je einer für jedes Homolog (was eine 2G 2R Anordnung ergibt). Diese Sonde zeigt die t(8;21) Fusion auf. Bei einem t(8;21) Patienten, sollten zwei gelbe Fusionsignale zusätzlich zu den grünen und den roten Signalen der normalen Chromosome 8 und 21 (1R 1G 2Y) zu sehen sein.

TRISOMIE 8

Die AML/MDS-Sonde wurde entwickelt, um Trisomie 8 unter Anwendung von ETO (siehe oben) auf Quadrat 4 festzustellen.

MLL

Die MLL-Sondenmischung hat eine grüne 5' Sonde und eine rote 3' Sonde. Die 5' Sonde der Region umfasst das CDG3 Gen und 16kb des UBE4A Gens, während die 3' Sonde der Region eine Region 5' von Exon 5 umfasst. Die normale Situation wird durch Fusionsignale oder nahe gegenüberliegende rote und grüne Signale dargestellt (2Y), während eine Mutation des Gens anhand separater grüner und roter Signale zu erkennen ist (1Y, 1G, 1R). Diese Testsonde kann Umlagerungen von MLL in Interphasezellen nachweisen, sowie in teilenden Zellen.

-7/del(7q)

Die proximale 7q Sonde, rot markiert, deckt einen Bereich von 368kb von 7q22.1 ab, dies umfasst 235kb des 5' Endes von RELN bis über den Marker D7S658 hinaus. Die distale 7q Sonde, grün markiert, umfasst einen Bereich von 203kb von 7q31 und umschließt TES. In einer normalen Zelle sollten zwei rote und zwei grüne Signale (2R, 2G) zu sehen sein. Zelldeletion ist anhand der folgenden Signalmuster zu erkennen:-

- 1 - ein rotes und zwei grüne Signale (1R, 2G), sollte die Deletion nur die proximale CDR betreffen und hemizygot sein oder
- 2 - kein rotes Signal und zwei grüne Signale (0R, 2G) sollte die Deletion nur die proximale CDR betreffen und homozygot sein oder
- 3 - ein grünes Signal und zwei rote (1G, 2R) sollte die Deletion die distale CDR betreffen und hemizygot sein oder
- 4 - kein grünes Signal und zwei rote (0G, 2R) sollte die Deletion die distale CDR betreffen und homozygot sein oder
- 5 - ein rotes Signal und ein grünes Signal (1R, 1G) für Monsomie 7 oder hemizygot Deletion beider CDRs von 7q.

CBFB/MYH11

Die CBFB Sonde, rot markiert, umfasst eine Region von 617kb von 16q22, sie erstreckt sich von 298kb 5' von CBFB bis zu 246kb hinaus über den 3' Terminus des Gens. Für MYH11 deckt die Sonde eine 610kb große Region von 16p13 ab. Bei einer normalen Zelle, erscheinen diese Sonden als deutlich erkennbare rote und grüne Flecke, je Homolog einer (was eine 2G 2R Anordnung ergibt). Diese Sondenmischung zeigt die inv(16) Fusion und ihre Varianten auf. Bei einem inv(16) Patienten, sollten zwei gelbe Fusionsignale zusätzlich zu den grünen und den roten Signalen des normalen Chromosoms 16 (1R 1G 2Y) zu sehen sein.

Del(20q) (MYBL2)

Die proximale 20q Sonde, rot markiert, deckt eine Region von 301kb von 20q12 ab, und erstreckt sich von 12.4kb innerhalb von PTPRT. Für das MYBL2-Gen in Band 20q13.12 deckt die Sonde 321kb von 60kb 5' von MYBL2 bis zu 211kb 3' des Gens ab. In einer normalen Zelle sollten zwei rote und zwei grüne Signale (2R, 2G) zu sehen sein. Zelldeletion ist anhand der folgenden Signalmuster zu erkennen:-

- 1 - ein rotes und zwei grüne Signale (1R, 2G), wenn die Deletion interstitiell das q12-Band umfasst, aber nicht das q13.12-Band und hemizygot ist oder
- 2 - kein rotes Signal und zwei grüne Signale (0R, 2G) wenn die Deletion interstitiell das q12-Band umfasst, aber nicht das q13.12-Band und homozygot ist oder
- 3 - ein grünes Signal und zwei rote (1G, 2R) wenn die Deletion das q13.12-Band umfasst, aber nicht das q12-Band und hemizygot ist oder
- 4 - kein grünes Signal und zwei rote (0G, 2R) wenn die Deletion das q13.12-Band umfasst, aber nicht das q12-q13 und homozygot ist oder
- 5 - ein rotes Signal und ein grünes Signal (1R, 1G) für Monsomie 20 oder hemizygot Deletion beider Banden auf 20q.

Kitkomponenten

Jedes Kit enthält folgende Komponenten, die für entweder 2 (Katalognr. PMP025), 5 (Katalognr. PMP026), oder 10 (Katalognr. PMP027) Patientenproben ausreichen.

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

Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen

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

Lagerung und Behandlung

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

Benötigte, aber nicht mitgelieferte 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 Quecksilberdampflampe und von Plan Achromat Objektiven mit 63-facher oder 100-facher Vergrößerung. Das Dreifach-Bandpassfilter DAPI/FITC/Texasort 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 mitgelieferten Cytocell- Multiprobe Objektträgern nach dem untenstehenden Cytocell Protokoll vor. Erhitzen oder Altern der Objektträger wird nicht empfohlen da dies zu einer Verminderung der Signalfluoreszenz führen kann.

Chromosom Multiprobe Protokoll

I. Vorbereitung des Objektträgers

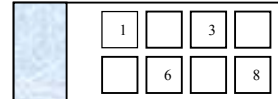
- Den Matrizen-Objektträger reinigen. Den Matrizen-Objektträger 2 Minuten lang in 100% Methanol einlegen und dann mit einem sauberen, weichen Tuch trocken polieren.
- Den korrekten Mitoseindex herstellen. Es ist wichtig, dass die Probe einen genügend hohen Mitoseindex hat, um Chromosomenabnormitäten zu erkennen. Zur Überprüfung der Zelldichte 4µl der Zellsuspension auf eines der Felder eines Matrizenobjektträgers aufzutropfen und an der Luft trocknen lassen. Unter dem Phasenkontrastmikroskop beurteilen. Wenn die Zelldichte zu hoch ist, die Suspension mit frischem Fixativ verdünnen. Wenn der Mitoseindex zu niedrig ist, die fixierte Zellsuspension für 10 Minuten auf 160xg herunterbringen. Die Menge des an der Oberfläche schwimmenden Materials feststellen, dieses entfernen und den Zelltropfen noch einmal in eine kleinere Menge frisches Fixativ geben. Wenn sich die Zelldichte der Probe geändert hat, 4µl des auf ein anderes Quadrat Ihres Testobjektträgers aufzutropfen und unter dem Phasenkontrastmikroskop beurteilen.
Bitte beachten Sie: 50µl ist die Mindestmenge, die für das Protokoll erforderlich ist.

iii. Qualitätskontrolle der Proben

Die Proben sollten auf Zytosolmasse untersucht werden, da dieses die Endresultate des *In situ* - Protokolls beeinträchtigen wird. Wenn die Chromosomen bei der Untersuchung unter dem Phasenkontrast-Mikroskop von körnigem Material umschlossen erscheinen, wird das die Ergebnisse beeinträchtigen (s.o.). Eine Methode zur Reduzierung des Zytosolmasse 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. Zur Entfernung des Zytosolmasse haben wir gefunden, dass man durch Aufbringen eines frischen Tropfens von 3:1 Fixativ auf den Punkt in dem Moment, wenn das sich ausbreitende Fixativ seine größte Ausdehnung erreicht hat, effektive Ergebnisse erzielen kann. Den Tropfen Fixativ verdampfen lassen und dann die Stelle noch einmal untersuchen. Verwenden Sie stets frisch angesetztes Fixativ. Frisch bedeutet unmittelbar vorher ansetzen. Tropfen Sie u.U. in der Nähe des Waschbeckens oder in einer feuchten Kammer auf. Richtwerte für gutes Gelingen einer Zytosolmasse-freien Spreitung: 24 °C und ca 45% relative Feuchte.

iv. Betreten des Objektträgers

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



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, im Phasenkontrast kontrollieren.

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

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

Bitte beachten Sie: Wenn die Metaphasen-Zellen zu stark aufgetragen erscheinen, reinigen Sie den Objektträger gründlich mit Methanol und tropfen Sie noch einmal auf, wobei Sie jeden Punkt trocken lassen, bevor Sie zum nächsten übergehen.

2. Vorbereitung der Sonden-Träger und des Objektträgers

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

3. Positionierung des Objektträgers über dem Sonden-Träger

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

4. Anweisungen zur Verwendung des Cytocell Objektträgerflächen-Thermometers

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

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

5. Denaturierung

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

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

6. Hybridisierung

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

Bitte beachten Sie: Den Deckel der Hybridisierungskammer nicht versiegeln.

Keinen Deckel auf das Wasserbad geben.

Nicht in einem Inkubator hybridisieren.

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

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

7. Stringente Waschschritte

- Vorbereitung der Waschlösungen
 - 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.
 - 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 überprüfen und nötigenfalls korrigieren. Bei der korrekten Temperatur sollte der pH-Wert 7,0 betragen.
- Stringente Waschschritte
 - Den Sonden-Träger vorsichtig vom Objektträger abnehmen und den Objektträger für 2 Minuten in Lösung 1 stellen. (Der Sonden-Träger kann nicht wieder verwendet werden).
 - Den Objektträger für 30 Sekunden in Lösung 2 stellen. Überschüssige Flüssigkeit abtupfen, aber nicht trocknen lassen.

Nicht mehr als jeweils zwei Multiprobe-Objektträger gleichzeitig den stringenten Waschschritten unterziehen.

8. Auswertung

- Gegenfärben mit DAPI
 - Auf jedes Ende des Objektträgers 20µl DAPI auftragen und ein Deckglas (24 x 50mm) aufliegen.
 - Den Objektträger mit Filterpapier oder einem Tuch abtupfen.
 - Vor dem Betrachten mit dem Fluoreszenzmikroskop für 10 Minuten im Dunkeln lassen.
- Manche Mikroskope haben Halter für den Objektträger, die ein Betrachten der äußeren Enden des Objektträgers erschweren. Sollte das passieren, den Objektträger einfach um 180° drehen, das hilft beim Betrachten des Objektträgers.

Die auf dem Multiprobe-Träger verwendeten Sonden sind mit lichtempfindlichen Fluorophoren direkt markiert. Die Resultate können verbessert werden, wenn die Sonden bei diesen Prozeduren nur minimalen Lichtmengen ausgesetzt werden. Es ist jedoch nicht notwendig, im Dunkeln zu arbeiten.

Stabilität der fertigen Objektträger

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

Empfehlungen zur Durchführung

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

Kundendienst

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

ESPAÑOL

Introducción

La hibridación *in situ* fluorescente (FISH) es una técnica que permite detectar secuencias de ADN en cromosomas en metafase o núcleos en interfase en muestras citogenéticas cultivadas o no cultivadas y fijadas. En la técnica se utiliza una sonda de ADN que hibrida los cromosomas completos o las secuencias únicas simples y es un complemento útil para la citogenética clásica. Después de la fijación, el ADN diana se trata con calor y formamida para desnaturizar el ADN bicatenario haciendo que resulte monocatenario. El ADN diana queda entonces disponible para hibridarlo con una sonda de ADN igualmente desnaturizada, monocatenario marcado con fluorescencia que tiene una secuencia complementaria. Después de la hibridación la sonda de ADN no específicamente hibridada y no hibridada se elimina tras varios lavados intensos y se aplica una contraincubación al ADN para su visualización. El uso de un microscopio de fluorescencia permite la visualización de la sonda hibridada en el material utilizado. El protocolo de FISH se simplifica aún más con la desnaturización simultánea del ADN diana y la sonda y, después de la hibridación durante toda la noche, con los lavados intensos rápidos sin formamida. Las sondas marcadas directamente eliminan la necesidad de seguir largos pasos de amplificación.

Pruebas FISH en el panel Chromoprobe Multiprobe AML/MDS

del(5q)

La sonda de EGR1, marcada en rojo, cubre una región de 167 kb de 5q31.1, que se extiende desde 91.9 kb del extremo 3' de la EGR1 hasta 68.4 kb del extremo 5' del gen. La mezcla de sondas también contiene una sonda de control para el cromosoma 5 en 5p15.31.3 que flanquea el marcador D5S630. En la célula normal, debería haber dos señales rojas y dos señales verdes (2R, 2G). Las células delecionadas tienen una señal roja o dos controles verdes (1R, 2G), si se trata de una deleción hemigótica, o ninguna señal roja y dos señales verdes (0R, 2G), si la deleción es homigótica.

PML/RARα

La mezcla de sondas de PML contiene una sonda de 107 kb próxima al PML que mide 152 kb y una segunda sonda de 169 kb separada del PML que mide 107 kb. Ambas se marcan de color rojo. Para el RARα, la sonda cubre una región de 194 kb próxima al RARα, que incluye CAB3, y una segunda sonda, que incluye 13 kb del extremo distal del RARα y se extiende 153 kb más allá del extremo del gen. Ambas se marcan de color verde. En la célula normal, estas sondas aparecerán como puntos diferenciados de color rojo y verde, uno por cada homólogo (que resulta en una conformación 2G

2R). Este conjunto de sondas detectará la fusión t(15;17). En un paciente con t(15;17), debería haber dos señales de fusión (amarillas) además de la señal verde y la señal roja de los cromosomas 15 y 17 normales, respectivamente (1R 1G 2Y).

TP53

La sonda de TP53 es de 83 kb, marcada de color rojo, y abarca una región que incluye 15 kb del extremo 5' de TP53, que se extiende 67 kb próxima al gen hasta más allá del marcador D17S655. La mezcla de sondas también contiene una sonda de control para el centromero 17 (D17Z1). En la célula normal, debería haber dos señales rojas y dos señales verdes (2R, 2G), mientras que una célula delecionada tiene una señal roja y dos controles verdes (1R, 2G), si se trata de una deleción hemigótica, o ninguna señal roja y dos señales verdes (0R, 2G), si la deleción es homigótica.

AML1/ETO

La mezcla de sondas de AML1 contiene una sonda de 151 kb del extremo 3' en RUNX1, que incluye CLIC6, y una segunda sonda que se extiende desde el intrón 3 del RUNX1 hasta 51 kb más allá del extremo 5' del gen. Ambas se marcan de color rojo. Para el ETO, las sondas abarcan una región de 151 kb del extremo 5' del ETO, que incluye el marcador D8S1950, y una segunda sonda que se extiende desde el intrón 7 del ETO hasta 127 kb más allá del extremo 3' del gen. En la célula normal, estas sondas aparecerán como puntos diferenciados de color rojo y verde, uno por cada homólogo (que resulta en una conformación 2G 2R). Este conjunto de sondas detectará la fusión t(8;21). En un paciente con t(8;21), debería haber dos señales de fusión (amarillas) además de la señal verde y la señal roja de los cromosomas 8 y 21 normales, respectivamente (1R 1G 2Y).

TRISOMÍA 8

El panel AML/MDS ha sido diseñado para determinar la trisomía 8 mediante ETO (véase lo especificado anteriormente) en el cuadro 4.

MLL

La mezcla de sondas de MLL también tiene una sonda del extremo 5' verde y una sonda del extremo 3' roja. La sonda de la región 5' abarca el gen CDG3 y 16 kb del gen UBE4A, mientras que la sonda de la región 3' abarca una región 5' del exón 5. La situación normal se representa mediante fusión o yuxtaposición cercana de la señal roja y la señal verde (2Y), a la vez que se detecta un reordenamiento del gen mediante una señal verde y una señal roja por separado (1Y, 1G, 1R). Este conjunto de sondas detectará reordenamientos de MLL en células de interfase, como así también en células que se dividen.

-7/del(7q)

La sonda proximal de 7q, marcada de color rojo, cubre una región de 368 kb de 7q22.1, incluyendo 235 kb del extremo 5' del RELN hasta más allá del marcador D7S658. La sonda distal de 7q, marcada de color verde, cubre una región de 203 kb de 7q31 que incluye TES. En la célula normal, debería haber dos señales rojas y dos señales verdes (2R, 2G). Las células delecionadas pueden presentar uno de los siguientes patrones de señales:

- 1 – una señal roja y dos señales verdes (1R, 2G), en caso de que la deleción incluya solamente la CDR proximal y de que sea hemigótica o
- 2 – ninguna señal roja y dos señales verdes (0R, 2G), en caso de que la deleción incluya solamente la CDR proximal y de que sea homigótica o
- 3 – una señal verde y dos señales rojas (1G, 2R), en caso de que la deleción incluya solamente la CDR distal y de que sea hemigótica o
- 4 – ninguna señal verde y dos señales verdes (0G, 2R), en caso de que la deleción incluya solamente la CDR proximal y de que sea homigótica o
- 5 – una señal roja y una señal verde (1R, 1G), en caso de monosomía 7 o deleción hemigótica de ambas CDR en 7q.

CBFB/MYH11

La sonda de CBFB, marcada de color rojo, cubre una región de 617 kb de 16q22, que se extiende desde 298 kb del extremo 5' del CBFB hasta 246 kb más allá del extremo 3' del gen. Para MYH11, la sonda cubre una región de 610 kb de 16p13. En la célula normal, estas sondas aparecerán como puntos diferenciados de color rojo y verde, uno por cada homólogo (que resulta en una conformación 2G 2R). Esta sonda detectará la fusión inv(16) y las variantes. En un paciente con inv(16), debería haber dos señales de fusión (amarillas) además de la señal verde y la señal roja del cromosoma 16 normal (1R 1G 2Y).

Del(20q) (MYBL2)

La sonda proximal de 20q, marcada de color rojo, cubre una región de 301 kb de 20q12, que se extiende desde 12.4 kb dentro de PTPRK1. Para el gen MYBL2 en la banda 20q13.12, la sonda contigua cubre 321 kb desde 60 kb del extremo 5' de MYBL2 hasta 211 kb del extremo 3' del gen. En la célula normal, debería haber dos señales rojas y dos señales verdes (2R, 2G). Las células delecionadas pueden presentar uno de los siguientes patrones de señales:

- 1 – una señal roja y dos señales verdes (1R, 2G), en caso de que la deleción sea intersticial e incluya la banda q12, pero no la q13.12, y de que sea hemigótica o
- 2 – ninguna señal roja y dos señales verdes (0R, 2G), en caso de que la deleción sea intersticial e incluya la banda q12, pero no la q13.12, y de que sea homigótica o
- 3 – una señal verde y dos señales rojas (1G, 2R), en caso de que la deleción incluya la banda q13.12, pero no la q12, y de que sea hemigótica o
- 4 – ninguna señal verde y dos señales rojas (0G, 2R), en caso de que la deleción incluya la banda q13.12, pero no la q12, y de que sea homigótica o
- 5 – una señal roja y una señal verde (1R, 1G), en caso de monosomía 20 o deleción hemigótica de ambas bandas en 20q.

Material proporcionado

Cada kit contiene los siguientes reactivos, los suficientes para 2 (Nº de cat. PMP025), 5 (Nº de cat. PMP026) o 10 (Nº de cat. PMP027) muestras:

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

Advertencias y precauciones

1. Para diagnóstico *in vitro*. Solo 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 proporcionado

- 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) Baño de agua a 37° (sin agitador)
- e) Tubos de microcentrífuga (0,5 ml)
- f) Baño de agua con control preciso de temperatura a 72°C
- g) Microscopio de fluorescencia
- h) Recipientes de cristal o de plástico
- i) Centrífuga
- 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 centro. 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

I. 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.

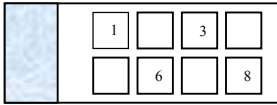
Si la densidad celular es muy elevada, diluya la suspensión con fijador.

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, siembrelas de nuevo: no es necesario volver a extender un nuevo porta.

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

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

2. Preparación del slide y del porta

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

3. Colocación del porta sobre el slide

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

4. Instrucciones de uso del Termómetro de superficie de Cytocell

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

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

5. Desnaturalización

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

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

6. Hibridación

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

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

No tape el baño de agua.

No hibride en una incubadora.

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

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

7. Baños posthibridación intensos

- i. Preparación de las soluciones de lavado intenso
 1. Solución 1: Prepare un recipiente de 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 de 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 y ajústelos si fuese necesario. El pH debe ser 7,0 cuando alcance la temperatura correcta.
- ii. Pasos para el lavado profundo
 1. Quite el slide cuidadosamente del porta e introduzca el porta en la solución 1 durante 2 minutos. (El slide no puede volver a utilizarse).
 2. Coloque el porta en la solución 2 durante 30 segundos. Escorra el exceso de líquido pero no lo deje secar.**Evite lavar profundamente más de dos porta al mismo tiempo.**

8. Montaje y visualización de los resultados.

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

1. Se recomienda encarecidamente el uso de un termómetro calibrado para medir la temperatura de las soluciones, baños de agua e incubadores ya que estas temperaturas son cruciales para el rendimiento óptimo del producto.

2. La intensidad de los lavados, el pH y la temperatura son importantes puesto que un lavado poco intenso puede dar lugar a una fijación no específica de la sonda, mientras que demasiada puede dar como resultado la falta de señal.

Ayuda al cliente

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

Patents and Trademarks

Chromoprobe, Cytocell and Chromoprobe Multiprobe are registered trademarks of Cytocell Ltd. The Chromoprobe principle is covered by international patents WO9314223, 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

004/2008-03-20

PI027/CE