



Instructions For Use

REF: PMP803/ PMP804/PMP802

Chromprobe Multiprobe® - System OctoChrome™



FOR PROFESSIONAL USE ONLY

ENGLISH/FRANÇAIS/ITALIANO/DEUTSCH/ESPAÑOL

Further information available at www.cytocell.com

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

The OctoChrome combines the principles of the Chromprobe Multiprobe® System with multiple colour fluorescence labelling to provide a FISH technology to aid cytogenetic analysis, making it quick, simple and cost effective.

The Multiprobe-OctoChrome device is divided into 8 square areas, each containing three different whole chromosome painting probes each directly labelled in a different colour : green (FITC spectrum), red (Texas Red spectrum), and blue (Aqua filter). The probes are reversibly bound to a glass device, a method exclusive to CytoCell, thereby simplifying fluorescence *in situ* hybridisation by removing the need to prepare the probes. Denaturation of probe and target DNA occurs simultaneously under the device once heated.

The Multiprobe-OctoChrome is intended for FISH to metaphase chromosomes from fixed cultured peripheral blood cells.

Material Provided

Each kit contains the following reagents, which are sufficient for either 2 (Cat. No. PMP802), 5 (Cat. No. PMP804) or 10 (Cat. No. PMP803) patient samples:

- 2, 5 or 10 Chromprobe Multiprobe - OctoChrome devices coated with directly labelled painting probes.
Amount of painting probe labelled in red: 2.5 to 5 ng per square.
Amount of painting probe labelled in green: 7.5 to 12.5 ng per square.
Amount of painting probe labelled in blue: 15 to 25 ng per square.
- 4, 7 or 12 Glass slides printed with a special template
- 500 µl Hybridisation Solution A: 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 Chromprobe 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 formaldehyde, 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 potentially carcinogenic substance. 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 Chromprobe Multiprobe System kit should be stored at 2-8°C until the expiry date indicated on the kit label. **Do not freeze.** The counterstain vial must be stored in the dark.

Equipment Necessary but not Supplied

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

Fluorescence Microscope Recommendation

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

Sample Preparation

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

Chromprobe 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 4 µl of the concentrated sample onto another square of your test slide and re-examine by phase contrast microscopy.

Please Note: 50 µl is the minimum volume required for the protocol.

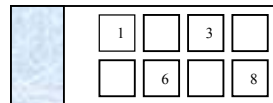
iii. Quality control of samples

Samples should be examined for cytoplasm since this will interfere with the *in situ* protocol. If the chromosomes appear to be enclosed by a granular material when examined under phase contrast microscopy, then this will compromise results. One method for reducing cytoplasm is to spot 4 µl of your sample onto the template slide and watch the fixative as it spreads out. In the normal situation, the fixative will spread to maximum, recede and then evaporate. To clean up any cytoplasm we have found that effective results are achieved if a fresh drop of 3:1

fixative is allowed to fall onto the spot at the point when the spreading fixative has reached its maximum. Allow the drop of fixative to evaporate and re-examine the spot.

iv. Spotting of slide

Pipette 4 µl of cell suspension onto all 8 areas of the template slide in a sequence of alternating squares as shown below. This will prevent the cell spreads from interfering with each other.



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

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

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

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

1. Preparation of OctoChrome device and template slide

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

2. Positioning of template slide over the OctoChrome device

- i. Carefully invert the template slide over the OctoChrome device such that the number 1, which is now upside down, is located over the top right hand area of the OctoChrome device.
To help locate square 1 (Chromosomes 3, 15 & 17), its position on the device has been marked in Orange.
- ii. Make sure that the template slide is carefully aligned with the matching areas on the OctoChrome device. Carefully lower the slide over the OctoChrome 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 OctoChrome device.
- iii. Lift the slide/OctoChrome carefully holding the frosted end of the glass slide and invert so that the slide is underneath the OctoChrome device. Make sure the device does not smear across the template slide as this could cause cross-contamination of the probes.
- iv. Place at 37°C (+/- 1°C) (hotplate or incubator) for 10 minutes.

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

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

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

To use the thermometer properly, place it onto the surface of the hotplate and wait until the different segments stop changing colour. The correct temperature is indicated by a pale green / gold colour. When the segments appear granular and the colours no longer appear uniform and regular, the thermometer should be discarded as it is exhausted. The life span of each thermometer should, however, easily be sufficient for a ten-device OctoChrome 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/OctoChrome 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 5 minutes.

6. Hybridisation

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

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

Do not place a lid on the water bath.

Do not hybridise in an incubator.

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

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

7. Post-hybridisation stringent washes

- i. Preparation of stringent wash solutions
 1. Solution 1: Prepare a coplin/Hellendahl jar containing 0.4 x SSC. Place in a water bath and allow to reach 72°C (+/- 1°C) adjust pH to 7.0.
 2. Solution 2: Prepare a coplin/Hellendahl jar containing 2 x SSC and 0.05% Tween 20. Allow standing at room temperature.**Check the temperature and pH of the solutions in coplin jars and adjust if necessary. The pH should be 7.0 when at the correct temperature.**
- ii. Stringent wash steps
 1. Remove the OctoChrome device carefully from the slide and place the slide in Solution 1 for 2 minutes. (The OctoChrome device cannot be re-used)
 2. Place the slide into Solution 2 for 30 seconds.**Avoid processing more than two OctoChrome slides through the stringency washes at any one time.**

8. Mounting and visualisation of results

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.
4. Certain types of microscope have slide holders which make it difficult to view the extreme ends of the slide. If this occurs then simply turn the slide through 180° which will help with the viewing of the slide.

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

Stability of Finished Slides

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

Procedural Recommendations

1. The use of a calibrated thermometer is strongly recommended for measuring temperatures of solutions, waterbaths, and incubators, as these temperatures are critical for optimum product performance.
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.

Expected Results

1. The acrocentric chromosome painting probes contain short arm material. This is shared between the D & G group chromosomes, so cross-hybridisation in these regions may be observed.
2. The chromosome 16 whole chromosome painting probe may show faint cross-hybridisation to the heterochromatic regions of chromosome Y.
3. The Y chromosome painting probe contains the pseudoautosomal regions common with the X chromosome. Consequently, cross-hybridisation may be observed in these regions.
4. Chromosomes 1, 5 and 19 have centromeric DNA sequences in common. Consequently cross-hybridisations in these regions may be observed between these chromosomes.
5. Chromosome 1 whole chromosome painting probe may show a brighter signal at 1p36.
6. Whole chromosome painting probes do not cover the Heterochromatic blocks in chromosomes 1, 9 and 16.

Customer Support
Please contact the Cytocell Sales and Marketing Department.

Probe Specifications

OctoChrome Square	Chromosome	Fluorophore
1	3	red
	15	blue
	17	green
2	8	red
	12	blue
	21*	green
3	1*	red
	16*	blue
	19*	green
4	2	red
	13*	blue
	20	green
5	9	red
	11	blue
	22*	green
6	4	red
	14*	blue
	18	green
7	5*	red
	10	blue
	7	green
8	X	red
	6	blue
	Y*	green

* See the "Expected Results" paragraph for details.

FRANÇAIS

Introduction

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

L'OctoChrome combine les principes du Chromoprobe Multiprobe® System et le marquage fluorescent en multicolore afin de fournir une technique FISH aidant à l'analyse cytogénétique, la rendant rapide, simple et d'un bon rapport qualité/prix.

Le dispositif Multiprobe-OctoChrome est divisé en 8 cases, chacune contenant 3 sondes de peinture chromosomiques différentes, chacune de ces sondes étant marquée avec une couleur différente : vert (spectre FITC), rouge (spectre Texas Red) et bleu (filtre Aqua). Les sondes sont réversiblement coâtées sur le dispositif en verre, une méthode exclusive à Cytocell, simplifiant ainsi l'hybridation *in situ* en éliminant le besoin de préparer la sonde. La dénaturation de la sonde et de l'ADN cible se fait simultanément sous le dispositif une fois chauffé.

Le protocole FISH est d'autant plus simplifié que la dénaturation de la sonde et de l'ADN cible est simultanée suivie d'une hybridation sur la nuit et l'utilisation de lavages stringents sans formamide. Les sondes de peinture directement marquées éliminent le besoin de longues étapes d'amplification. Le Multiprobe-OctoChrome a été conçu pour le FISH de chromosomes en métaphase à partir de cellules de sang périphérique cultivées.

Conditionnement

Chaque kit contient les composants suivants pour tester 2 (Réf. PMP802), 5 (Réf. PMP804) ou 10 (Réf. PMP803) échantillons.

- 2, 5 ou 10 Dispositifs OctoChrome coâtés avec des sondes de peinture directement marquées. Concentration des sondes de peinture marquées en rouge : 2,5 à 5 ng par case. Concentration des sondes de peinture marquées en vert : 7,5 à 12,5 ng par case. Concentration des sondes de peinture marquées en bleu : 15 à 25 ng par case.
- 4, 7 ou 12 Lames en verre imprimées (8 cases)
- 500 µl Hybridisation Solution A (solution d'hybridation) : Formamide, Sulfate de Dextran, SSC
- 500 µl Contre-colorant : DAPI (ES : 0,125 µg/ml DAPI/Antifade (4,6-diamidino-2-phenylindole))
- 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 avec contrôle de la température à 37°C
- e) Bain-marie avec contrôle de la température à 72°C
- f) Tubes à microcentrifugation (0,5 ml)
- g) Microscope à fluorescence
- h) Jars en plastique ou en verre
- i) Forceps
- j) Huile à immersion pour microscope à fluorescence
- k) Centrifugeuse de paillasse
- l) Grandes lamelles en verre (24 x 50 mm) pour fluorescence

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

Protocole Chromoprobe Multiprobe

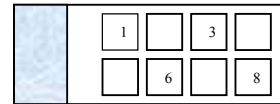
1. Préparation de la lame échantillon

- i. Nettoyage de la lame échantillon
Plonger la lame échantillon dans un bain méthanol 100% pendant 2 minutes et sécher avec un tissu doux.
- 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 4 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.
Si l'index mitotique est trop faible, centrifuger la suspension à 160g pendant 10 minutes. Noter le volume de surnageant, éliminer ce surnageant et resuspendre le culot dans un plus faible volume de fixateur.
Si la concentration cellulaire de l'échantillon a été modifiée, déposer 4 µl d'échantillon concentré sur une autre case et vérifier de nouveau par contraste de phase.

Remarque : un volume minimum de 50 µl est nécessaire pour effectuer un test avec un dispositif OctoChrome.

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

iv. Préparation de la lame échantillon
Déposer 4 µl de suspension cellulaire sur chacune des 8 cases de la lame en suivant la méthode en quinconce décrite ci-dessous. Ceci évitera aux étalements de se toucher.



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

Remarque : Si les cellules métaphasiques apparaissent surétalées, nettoyer la lame échantillon dans du méthanol et redéposer en laissant chaque dépôt sécher avant de procéder au suivant.

2. Préparation du dispositif OctoChrome et de la lame échantillon

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

3. Positionnement de la lame échantillon sur le dispositif OctoChrome

- i. Retourner délicatement la lame échantillon sur le dispositif OctoChrome afin que la case marquée 1 soit en ligne avec la case en haut à droite du dispositif Multiprobe.
- ii. Veillez à ce que la lame échantillon soit alignée avec précaution sur les cases complémentaires du dispositif OctoChrome. Appliquer la lame échantillon sur le dispositif OctoChrome 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 de l'OctoChrome.
- iii. Retourner délicatement l'ensemble lame échantillon/dispositif OctoChrome de façon à ce que la lame échantillon soit en dessous du dispositif OctoChrome. 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. Utilisation du Cytocell Slide Surface Thermometer

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

Ce thermomètre est un dispositif à cristaux liquides et bien que réversible, il doit être manipulé avec précautions pour assurer une durée de vie correcte. Le thermomètre doit être utilisé uniquement pour vérifier la température de la plaque chauffante avant utilisation. Il ne doit pas être laissé sur la plaque pour une longue période.

Placer le thermomètre sur la plaque chauffante et attendre que les segments chiffrés arrêtent de changer de couleur. La bonne température est indiquée par une couleur vert/pale/or. Si les segments apparaissent granuleux ou de couleur non uniforme, le thermomètre doit être jeté car il est usé. La durée de vie de chaque thermomètre doit être suffisante pour l'utilisation d'un kit OctoChrome de 10 tests.

5. Dénaturation

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

Transférer l'ensemble lame échantillon/dispositif OctoChrome sur une plaque chauffante à 75°C en faisant attention de la maintenir horizontalement. S'assurer que la lame échantillon soit bien en contact avec la plaque chauffante. Dénaturer sur la plaque chauffante à 75°C (+/- 1°C) pendant 5 minutes.

6. Hybridation

Placer l'ensemble lame échantillon/dispositif OctoChrome dans la chambre d'hybridation préchauffée au bain-marie. Remettre le couvercle sur la chambre d'hybridation et la laisser flotter dans le bain-marie (sans agitation) à 37°C (+/- 1°C) pendant une nuit.

Remarques : Ne pas sceller le couvercle de la chambre d'hybridation

Ne pas fermer le couvercle du bain-marie.

Ne pas hybrider dans un incubateur.

Veillez vous assurer que la chambre d'hybridation soit bien sèche. (aucune eau ou tissu humide à l'intérieur de la chambre).

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

7. Lavages stringents de post-hybridation

- i. Préparation des solutions de lavages stringents
 1. Solution 1 : préparer une jarre Coplin/Hellendahl 0,4 x SSC. Placer au bain-marie et laisser équilibrer à 72°C (+/- 1°C) et ajuster le pH à 7,0.
 2. Solution 2 : préparer une jarre Coplin/Hellendahl 2 x SSC et 0,05% Tween 20. Laisser équilibrer à température ambiante (20°C – 25°C).**Vérifier la température et le pH des solutions des jarres Coplin et ajuster si nécessaire. Le pH doit être de 7,0 lorsque les solutions sont à la bonne température.**

- ii. Lavages stringents
 1. Retirer doucement le dispositif Multiprobe de la lame échantillon. Placer la lame échantillon dans la Solution 1 pendant 2 minutes. (Le dispositif Multiprobe ne peut pas être ré-utilisé.)
 2. Placer la lame échantillon dans la Solution 2 pendant 30 secondes.**Éviter de traiter plus de 2 lames OctoChrome à la fois lors de l'étape de lavages stringents.**

8. Montage et visualisation

1. Appliquer 20 µl de DAPI à chaque extrémité de la lame puis couvrir avec une lamelle (24 x 50 mm).
2. Sécher la lame avec un papier absorbant.
3. Laisser la coloration se développer dans l'obscurité pendant 10 minutes avant visualisation.
4. Certains microscopes possèdent des portoirs à lames qui rendent la visualisation des extrémités de la lame difficile. Si cela se produit, simplement retourner la lame de 180°. Ceci devrait aider à la visualisation de la lame.

Les sondes utilisées sur le dispositif OctoChrome sont directement marquées avec des fluorochromes qui sont photosensibles. Les résultats sont meilleurs lorsque les sondes sont exposées 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 FISH sont analysables pendant un mois si elles sont conservées à l'obscurité et/ou au-dessous de la température ambiante.

Recommandations

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

Interpretation des résultats

- Les sondes de peinture des chromosomes acrocentriques contiennent de l'ADN se trouvant au niveau des bras courts de ceux-ci. Cette caractéristique est retrouvée chez les chromosomes des groupes D et G, par conséquent, des hybridations croisées peuvent être observées dans ces régions.
- La sonde de peinture chromosomique du chromosome 16 peut présenter une faible hybridation croisée avec les régions hétérochromatiques du chromosome Y.
- La sonde de peinture chromosomique du chromosome Y contient des régions pseudoautosomales communes au chromosome X. Par conséquent, des hybridations croisées peuvent être observées dans ces régions.
- Les chromosomes 1, 5 et 19 possèdent des séquences ADN centromériques communes. Par conséquent, des hybridations croisées peuvent être observées entre ces régions.
- Il est possible que la sonde de peinture chromosomique pour le chromosome 1 présente un signal de plus vive intensité au niveau de la bande 1p36.
- Les sondes de peinture chromosomique ne couvrent pas les blocs hétérochromatiques des chromosomes 1, 9 et 16.

Support Client

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

Caractéristiques des sondes

Case de l'OctoChromosome	Chromosome	Fluorochrome
1	3	rouge
	15	bleu
	17	vert
2	8	rouge
	12	bleu
	21*	vert
3	1*	rouge
	16*	bleu
	19*	vert
4	2	rouge
	13*	bleu
	20	vert
5	9	rouge
	11	bleu
	22*	vert
6	4	rouge
	14*	bleu
	18	vert
7	5*	rouge
	10	bleu
	7	vert
8	X	rouge
	6	bleu
	Y*	vert

* Voir le paragraphe « Interpretation des résultats » pour plus d'information.

ITALIANO

Introduzione

L'ibridazione *in situ* in fluorescenza (Fluorescence *In Situ* Hybridisation - FISH) è una tecnica che permette di rilevare sequenze di DNA su cromosomi in metafase o in nuclei in interfase di campioni citogenetici fissati, o in coltura dopo prelievo. La tecnica prevede l'utilizzo di sonde di DNA in grado di ibridare con l'intero cromosoma o con singole sequenze. La FISH costituisce quindi una potente strumento in aggiunta alle tecniche citogenetiche classiche. Il DNA bersaglio, dopo la fissazione, è sottoposto a denaturazione al calore in presenza di formamide. Il DNA bersaglio è così disponibile per l'annealing con una sonda di DNA a singola elica a sequenza complementare, marcata con una sostanza fluorescente. Terminata l'ibridazione, la sonda di DNA non legata o legata in modo non specifico, è rimossa per mezzo di lavaggi stringenti ed il DNA è in seguito colorato con un colorante di contrasto. L'ibridazione della sonda viene infine analizzata con un microscopio a fluorescenza.

OctoChromosome combina i principi del Chromoprobe Multiprobe® System con la marcatura in fluorescenza a colori multipli per fornire una tecnologia FISH in grado di facilitare l'analisi citogenetica, rendendola veloce, semplice ed a costi ragionevoli.

Il dispositivo Multiprobe-Octochrome è diviso in 8 aree quadrate, ognuna contenente tre differenti sonde in grado di colorare l'intero cromosoma; ogni sonda è marcata direttamente con un diverso colore: verde (spettro FITC), rosso (spettro Texas Red), e blu (filtro Aqua). Le sonde sono legate reversibilmente ad un dispositivo di vetro, un metodo esclusivo Cytocell, il che semplifica l'ibridazione *in situ* in fluorescenza rendendo non necessaria la preparazione delle sonde stesse. La denaturazione della sonda e del DNA bersaglio avviene simultaneamente riscaldando il dispositivo una sola volta.

Il protocollo FISH prevede la co-denaturazione e l'ibridazione per tutta la notte, seguita da lavaggi rapidi in assenza di formamide. Le sonde painting marcate direttamente eliminano la necessità di passaggi di amplificazione prolungata.

Il Multiprobe Octochrome è stato progettato per la tecnologia FISH su cromosomi in metafase, derivanti da colture di cellule del sangue periferico fissate.

Materiale fornito

Ogni kit contiene i reagenti elencati di seguito, sufficienti per 2 (N. cat. PMP802), 5 (N. cat. PMP804) o 10 (N. cat. N. PMP803) campioni:

- 2, 5 o 10 Dispositivi Chromoprobe Multiprobe - Octochrome rivestiti con sonde painting marcate direttamente.
Quantità di sonda painting marcata in rosso: da 2,5 a 5 ng per quadrato.
Quantità di sonda painting marcata in verde: da 7,5 a 12,5 ng per quadrato.
Quantità di sonda painting marcata in blu: da 15 a 25 ng per quadrato.
- 4, 7 o 12 Vetri stampati con un reticolo speciale
- 500 µl Hybridisation Solution A (Soluzione di ibridazione): Formamide, Destrano solfato, SSC
- 500 µl Soluzione del colorante di contrasto: DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindole), Antifade
- 1 Cytocell Slide Surface Thermometer
- 1 Cytocell Chromoprobe Multiprobe Hybridisation Chamber

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 i guanti ed un camice da laboratorio. Per lo smaltimento, lavare con grandi quantità di acqua.
- Il DAPI è una sostanza potenzialmente cancerogena. Maneggiare con cura, indossare i 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 rifiuti 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 riscaldante con controllo accurato della temperatura fino a 80°C
- Incubatore a 37°C
- Micropipette a volume variabile compreso tra 1 µl e 200 µl
- Bagno termostato a 37°C (senza agitatore)
- Provette da microcentrifuga (0,5 ml)
- Bagno termostato con controllo accurato della temperatura a 72°C
- Microscopio a fluorescenza
- Contenitori di Coplin in plastica o vetro
- Centrifuga da banco
- Pinzette
- Olio per lenti ad immersione del microscopio a fluorescenza
- Vetri coprioggetto (24 x 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, fissate nel fissativo di Carnoy, preparate secondo le linee guida del laboratorio o dell'istituzione. Preparare sospensioni dense di cellule ematiche in metafase sui vetrini campione Cytocell Chromoprobe Multiprobe seguendo il protocollo riportato di seguito. Evitare l'essiccamento del vetrino ad alte temperature o una qualunque altra forma di invecchiamento dello stesso in quanto ciò potrebbe ridurre la fluorescenza del segnale.

Protocollo Chromoprobe Multiprobe

1. Preparazione del vetrino

- Pulire il vetrino
Immergere il vetrino per 2 minuti in metanolo 100% ed asciugare con un tessuto pulito e soffice.
- Stabilire l'indice mitotico corretto
Per permettere la rivelazione di anomalie cromosomiche è importante che il campione da analizzare abbia un indice mitotico sufficientemente alto. Per verificare la densità del campione, utilizzando una micropipetta (ad es. una Gilson P10 o P20), caricare 4 µl della sospensione cellulare in una delle aree del vetrino libero e lasciarlo asciugare all'aria. A causa del ridotto volume utilizzato, è necessario che il puntale della pipetta tocchi delicatamente il vetrino per trasferire la sospensione. Esaminare con un microscopio a contrasto di fase.

Se la densità delle cellule è troppo alta, diluire la sospensione con fissativo fresco.

Se l'indice mitotico è troppo basso, centrifugare la sospensione di cellule fissate a 160 g per 10 minuti. Misurare il volume del surmatante, rimuoverlo e risospendere il pellet di cellule in un volume inferiore di fissativo fresco.

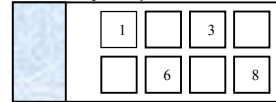
Se la concentrazione delle cellule del campione è stata alterata, caricare 4 µl del campione concentrato in un altro quadrato del vetrino utilizzato per il test e determinare nuovamente la concentrazione con il microscopio a contrasto di fase.

Nota: 50 µl è il volume minimo richiesto per il protocollo del dispositivo OctoChromosome.

- 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 su un vetrino e guardare attentamente come si diffonde il fissativo. In una situazione normale, il fissativo si diffonde e poi evapora. Per eliminare ogni traccia di citoplasma è possibile aggiungere una goccia di fissativo fresco sopra la goccia di campione appena deposto. Far evaporare ed esaminare nuovamente il vetrino.

iv. 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 le aree restanti. Quando il vetrino si è asciugato, l'esame dello stesso al microscopio a contrasto di fase rivelerà eventuali quadrati lasciati vuoti.

Se l'esame del vetrino rivela che un'area 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 portaoggetto in metanolo e caricare nuovamente facendo asciugare ogni goccia prima di procedere al caricamento successivo.

2. Preparazione del dispositivo OctoChromosome e del vetrino portaoggetto

- Porre la Chromoprobe Multiprobe Hybridisation Chamber nel bagno termostato a 37°C e attendere che raggiunga la temperatura. (Se il bagno termostato 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 OctoChromosome. Pre-riscaldare, inoltre, ogni dispositivo OctoChromosome a 37°C ponendo il dispositivo stesso con l'etichetta rivolta verso il basso.
Evitare di toccare le superfici sporgenti del dispositivo OctoChromosome.
- Lavare i vetrini contenenti i campioni fissati in SSC 2x per 2 minuti a temperatura ambiente (20-25°C).
- Mentre il dispositivo OctoChromosome 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, seccare e porre a 37°C.
- Aggiungere con una micropipetta, 2 µl di soluzione di ibridazione pre-riscaldata ad ognuna delle otto aree presenti sul dispositivo OctoChromosome precedentemente riscaldato, mentre questo è ancora a 37°C.

3. Posizionamento del vetrino sul dispositivo OctoChromosome.

- Capovolgere con cura il vetrino sul dispositivo OctoChromosome in modo che il numero 1 si trovi sull'area in alto a destra dell'OctoChromosome.
- Accertarsi che il vetrino sia accuratamente allineato con le aree corrispondenti sul dispositivo OctoChromosome. Adagiare con cura il vetrino sul dispositivo OctoChromosome, applicare una pressione leggera ed uniforme in modo che la soluzione di ibridazione si diffonda fino al margine delle aree sopraelevate del dispositivo OctoChromosome.
- Sollevare con cura il dispositivo vetrino/Multiprobe e capovolgere in modo che il vetrino stesso si trovi al di sotto del Multiprobe. Accertarsi che il dispositivo non strisci lungo il vetrino in quanto questo potrebbe essere causa di cross-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 dispositivo a cristalli liquidi e, sebbene reversibile, deve essere trattato con cura per assicurarne una ragionevole durata. Il termometro a cristalli liquidi deve essere utilizzato solo per verificare la temperatura di una piastra calda; non deve essere usato per monitorare il funzionamento della piastra per tempi prolungati.

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 dovrebbe essere sufficiente per una decina di kit OctoChromosome.

5. Denaturazione

Per questa procedura non è possibile utilizzare un termociclatore per PCR al posto di una piastra riscaldante.

Trasferire il vetrino/OctoChromosome sulla piastra riscaldante avendo cura di tenerlo in posizione orizzontale. (Verificare che il vetrino con i campioni sia bene a contatto con la piastra riscaldante) Denaturare sulla piastra riscaldante a 75°C (+/- 1°C) per 5 minuti.

6. Ibridazione

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

Nota: Non sigillare il coperchio sulla camera di ibridazione.

Non coprire il bagno termostato con un coperchio.

Non ibridare in un incubatore.

Accertarsi che la camera di ibridazione sia completamente asciutta.

L'umidità all'interno della camera è un fattore fondamentale per una ibridazione ottimale. I livelli corretti saranno raggiunti seguendo i passaggi descritti nella nota di cui sopra.

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. Immergerlo in un bagno termostato in modo che raggiunga 72°C (+/- 1°C).
 - 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.**
- Fasi del lavaggio stringente
 - Allontanare con cura il dispositivo OctoChromosome dal vetrino dei campioni ed immergere il vetrino nella Soluzione 1 per 2 minuti. (Il dispositivo OctoChromosome non può essere riutilizzato)
 - Immergere il vetrino nella soluzione 2 per 30 secondi.**Evitare di effettuare i lavaggi stringenti a più di due vetrini OctoChromosome alla volta.**

8. Preparazione del vetrino per la visualizzazione dei risultati

1. Applicare 20 µl di DAPI ad ogni estremità del vetrino ed apporre un coprioggetto (24 x 50 mm).
2. Tamponare il vetrino con carta da filtro o tessuto.
3. Lasciare al buio per 10 minuti prima di procedere alla visualizzazione per mezzo di un microscopio a fluorescenza.
4. 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°.

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

Stabilità dei vetrini finiti

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

Raccomandazioni per l'uso

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

Risultati attesi

1. Le sonde ibridanti con i cromosomi acrocentrici contengono materiale del braccio corto. Questo è condiviso tra cromosomi dei gruppi D e G per cui è possibile osservare, una cross-ibridazione.
2. La sonda ibridante con l'intero cromosoma 16 può indurre una debole cross-ibridazione con le regioni eterocromatiche del cromosoma Y.
3. La sonda ibridante con il cromosoma Y contiene le regioni pseudoautosomiali comuni con il cromosoma X. Di conseguenza, in queste regioni si può osservare una cross-ibridazione.
4. I cromosomi 1, 5 e 19 hanno sequenze di DNA centromerico in comune. Di conseguenza, in queste regioni si può osservare una cross-ibridazione tra questi cromosomi.
5. La sonda painting del cromosoma 1 può mostrare un segnale più brillante nella regione 1p36.
6. Le sonde painting non riconoscono le regioni Eterocromatiche dei cromosomi 1,9 e 16.

Assistenza clienti

Contattare l'Ufficio commercializzazione e vendita Cytocell.

Specifiche delle sonde

Quadrato OctoChrome	Cromosoma	Fluoroforo
1	3	rosso
	15	blu
	17	verde
2	8	rosso
	12	verde
	21*	verde
3	1*	rosso
	16*	blu
	19*	verde
4	2	rosso
	13*	blu
	20	verde
5	9	rosso
	11	blu
	22*	verde
6	4	rosso
	14*	blu
	18	verde
7	5*	rosso
	10	blu
	7	verde
8	X	rosso
	6	blu
	Y*	verde

* Per maggiori dettagli consultare il paragrafo "Risultati attesi".

DEUTSCH

Einleitung

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

Das OctoChrome-System kombiniert die Technologien des Chromprobe Multiprobe® Systems mit der Mehrfarbmarkierung mit Fluoreszenzfarbstoffen um eine FISH-Technologie anzubieten, die die zytogenetische Analyse schnell, einfach und kostengünstig macht.

Die Multiprobe-OctoChrome-System ist in 8 quadratische Felder aufgeteilt, von denen jedes drei verschiedene Painting-Sonden für gesamte Chromosomen enthält. Jede dieser Sonden ist mit einer anderen Farbe direkt markiert: grün (FITC-Spektrum), rot (Texasrot-Spektrum) und blau (Aqua-Filter). Die Sonden sind reversibel an die Glasoberfläche gebunden, eine Methode, die exklusiv von Cytocell angewandt wird, wodurch die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung vereinfacht wird, da die Vorbereitung der Sonden entfällt. Die Denaturierung von Sonde und Ziel-DNA erfolgt bei diesem System gleichzeitig, sobald dieses erwärmt wird.

Das FISH-Protokoll wird durch die gleichzeitige Denaturierung von Sonde als auch Ziel-DNA und, nach einer Übernacht-Hybridisierung, durch formamidfreie, kurze, stringenten Waschschritten weiter vereinfacht. Die direkt markierten Painting-Sonden machen lange Amplifizierungsschritte unnötig.

Multiprobe-Octochrome ist für die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung an Metaphasen-Chromosomen aus fixierten, kultivierten peripheren Blutzellen geeignet.

Kitkomponenten

Jeder Kit enthält folgende Reagenzien, die für entweder 2 (Katalognr. PMP802), 5 (Katalognr. PMP804), oder 10 (Katalognr. PMP803) Patientenproben ausreichen:

- 2, 5 oder 10 Chromprobe Multiprobe-OctoChrome-Systeme, die mit direkt markierten Painting-Sonden beschichtet sind.
Menge der rot markierten Painting-Sonde: 2,5 bis 5 ng pro Feld.
Menge der grün markierten Painting-Sonde: 7,5 bis 12,5 ng pro Feld.
Menge der blau markierten Painting-Sonde: 15 bis 25 ng pro Feld.
- 4, 7 oder 12 Glasobjektträger, die mit einer speziellen Matrize bedruckt sind.
- 500 µl Hybridisation Solution A (Hybridisierungslösung): Formamid, Dextransulfat, SSC
- 500 µl Gegenfärbungslösung: DAPI (ES: 0,125 µl DAPI (4,6-Diamidino-2-Phenylindol)), Antifade
- 1 Cytocell Slide Surface Thermometer
- 1 Cytocell Chromprobe Multiprobe - Hybridisation Chamber

Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen

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

Lagerung und Behandlung

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

Benötigte, aber nicht mitgelieferte Laborgeräte

- a) Heizplatte mit genauer Temperaturregelung bis 80°C
- b) 37°C-Inkubator
- c) Mikropipetten mit variablem Volumen von 1 µl - 200 µl
- d) 37°C Wasserbad (ohne Rührgerät)

- e) Mikro-Zentrifugenröhrchen (0,5 ml)
- f) Wasserbad mit genauer Temperaturkontrolle bei 72°C
- g) Fluoreszenzmikroskop
- h) Coplin-Färbetrog aus Kunststoff oder Glas
- i) Zentrifuge
- j) Pinzette
- k) Für Fluoreszenzobjektive geeignetes Immersionsöl
- l) Für Fluoreszenzobjektive geeignete 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/Texasrot ist für die simultane Beobachtung aller drei Fluorophore optimal geeignet.

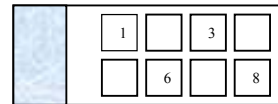
Probenvorbereitung

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

Chromprobe Multiprobe Protokoll

1. Vorbereitung des Objektträgers

- i. Den Matrizenobjektträger reinigen.
Den Matrizenobjektträger 2 Minuten lang in 100% Methanol einlegen und dann mit einem sauberen, weichen Tuch trocken polieren.
- ii. Den korrekten Mitoseindex herstellen.
Es ist wichtig, das die beabsichtigte Probe einen genügend hohen Mitoseindex hat, um die Detektion von Chromosomenabnormalitäten zu ermöglichen. Zur Überprüfung der Dichte der Probe mit einer Mikropipette (z.B. einer Gilson P10 oder P20) 4 µl der Zellsuspension auf eines der Felder des Ersatz-Matrizenobjektträgers aufzutropfen und an der Luft trocknen lassen. Die Kleinheit des verwendeten Volumens bedeutet, dass man für gewöhnlich den Objektträger zur Übertragung der Suspension nur sachte mit der Pipettenspitze zu berühren braucht. Unter dem Phasenkontrastmikroskop untersuchen.
-Wenn die Zelldichte zu hoch ist, die Suspension mit frischem Fixativ verdünnen.
-Wenn der Mitoseindex zu niedrig ist, die fixierte Zellsuspension für 10 Minuten bei 160xg herunterzentrifugieren. Das Volumen des Überstandes messen, dekantieren und das Pellet in einem kleineren Volumen frischen Fixativs resuspendieren.
-Wenn sich die Konzentration der Zelleprobe geändert hat, 4 µl des Probenkonzentrats auf ein anderes Feld Ihres Testobjektträgers aufzutropfen und unter dem Phasenkontrastmikroskop untersuchen.
- iii. Qualitätskontrolle der Proben.
Die Proben sollten auf Zytosplasma untersucht werden, da dieses das *in situ*-Protokoll beeinträchtigen würde. Falls die Chromosomen bei der Untersuchung unter dem Phasenkontrastmikroskop von einem granulären Material umschlossen erscheinen, wird dies die Ergebnisse beeinträchtigen. Eine Methode zur Reduzierung des Zytosplasma ist, 4 µl Ihrer Probe auf den Matrizenobjektträger aufzutropfen und das Fixativ bei seiner Ausbreitung zu beobachten. Normalerweise wird sich das Fixativ auf ein Maximum ausbreiten, sich zurückziehen und dann verdampfen. Zum Bereinigen von Wir haben festgestellt, dass Zytosplasma effektive entfernt werden kann, wenn man einen frischen Tropfen 3:1 Fixativ zu dem Zeitpunkt auftröpfelt, wenn das sich ausbreitende Fixativ seine maximale Ausbreitung erreicht hat. Den Tropfen Fixativ verdampfen lassen und dann die Stelle noch einmal untersuchen.
- iv. Betropfen des Objektträgers
In einer Abfolge von alternierenden Feldern, wie unten dargestellt, 4 µl der Zellsuspension auf alle 8 Felder des Matrizenobjektträgers aufzutropfen. Dadurch wird verhindert, dass sich Zellausbreitungen überlagern.



Sobald die erste Gruppe von Tropfen an der Luft getrocknet ist, die übrigen Felder mit jeweils 4 µl auf die gleiche Weise betropfen. Sobald der Objektträger trocken ist, zeigt die Untersuchung unter dem Phasenkontrastmikroskop, ob Felder ausgelassen worden sind.

Wenn Felder ausgelassen wurden oder zu wenige Zellen haben, diese Felder einfach noch einmal betropfen: es ist nicht notwendig einen neuen Objektträger neu zu betropfen.

Wenn bei der Untersuchung des Objektträgers ein Feld 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 gespreitet erscheinen, den Matrizenobjektträger sorgfältig in Methanol reinigen und neu betropfen. Dabei jeden Tropfen trocken lassen, bevor zum nächsten übergegangen wird.

2. Vorbereitung der OctoChrome-Systeme und des Matrizen-Objektträgers

- i. Sicherstellen, dass sich die Chromprobe Multiprobe Hybridisierungskammer in einem Wasserbad mit 37°C befindet und sie auf 37°C (+/- 1°C) erwärmen lassen. (Wenn das Wasserbad kalt angeschaltet wurde, kann dies bis zu einer Stunde dauern).
- ii. Die Hybridisierungslösung wiederholt in der Pipette mischen und ein 25 µl Aliquot pro OctoChrome-System auf 37°C vorwärmen. Ebenso jedes OctoChrome-System auf 37°C vorwärmen, wobei das System **mit dem Etikett nach unten** aufgelegt wird.
- iii. Die erhöhten Felder des OctoChrome-Systems nicht berühren.
- iv. Solange das OctoChrome-System noch auf 37°C ist, die Matrizenobjektträger, die die fixierten Proben enthalten, in einer Alkoholreihe entwässern (je 2 Minuten in 70%, 85% und absolutem Ethanol), trocken und zum Aufwärmen auf 37°C legen.
- v. 2 µl vorgewärmte Hybridisierungslösung mit einer P10 Mikropipette auf jedes der acht Felder des vorgewärmten OctoChrome-Systems zugeben, solange dieses noch 37°C hat.

3. Positionierung des Matrizenobjektträgers über dem OctoChrome-System

- i. Den Matrizenobjektträger vorsichtig über das OctoChrome-System drehen, so dass die Nummer 1, die jetzt auf dem Kopf steht, sich über dem oberen rechten Bereich der OctoChrome-Systems befindet.
- ii. Vergewissern Sie sich, dass der Matrizenobjektträger sorgfältig auf die entsprechenden Felder des OctoChrome-Systems ausgerichtet ist. Den Objektträger vorsichtig über das OctoChrome-System absenken, so dass die Tropfen der Hybridisierungslösung den Objektträger berühren. Sacht auflegen und gleichmäßig andrücken, so dass sich die Hybridisierungslösung bis zu den Rändern jedes der erhöhten Bereiche auf dem OctoChrome-System ausbreitet.
- iii. Objektträger mit Matrizenobjektträger/OctoChrome-System **vorsichtig** anheben, wobei man ihm am matten Ende hält, und so umdrehen, dass der Objektträger unter dem OctoChrome-System zu liegen kommt. Achten Sie darauf, dass das OctoChrome-System nicht über den Matrizenobjektträger verschmiert, da dies eine Kreuzkontaminierung der Sonden verursachen könnte.
- iv. 10 Minuten bei 37°C (+/- 1°C) inkubieren (Heizplatte oder Inkubator).

4. Anweisungen zur Verwendung des Cytocell Objektträgeroberflächen-Thermometers.

Bevor die Denaturierung durchgeführt wird, sollte die Temperatur der Heizplatte mit dem Cytocell Objektträgerflächen-Thermometer geprüft werden.

Dieses Thermometer ist ein Flüssigkristallgerät das, wenn auch reversibel, mit Sorgfalt behandelt werden muss, um eine lange Lebensdauer sicherzustellen. Das Thermometer darf nur zur kurzfristigen Temperaturmessung einer Heizplatte verwendet werden; es darf nicht zur Überwachung der Heizplattenleistung über einen längeren Zeitraum gebraucht werden.

So wird das Thermometer richtig verwendet: auf die Heizplatte legen und warten, bis die verschiedenen Segmente aufhören, die Farbe zu wechseln. Die korrekte Temperatur wird durch eine blaue/grüne/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 OctoChrome-Systemen ausreichen.

5. Denaturierung

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

Matrizenobjektträger/OctoChrome-System auf die Heizplatte übertragen, wobei besonders darauf zu achten ist, ihn waagrecht zu halten. (Sicherstellen, dass der Probenobjektträger guten Kontakt zur Heizplatte hat). Bei 75°C (+/- 1°C) **5 Minuten lang** auf der Heizplatte denaturieren.

6. Hybridisierung

Matrizenobjektträger/OctoChrome-System in die mitgelieferte Chromoprobe Multiprobe-Hybridisierungskammer legen, den Deckel wieder auflegen und die Kammer über Nacht in das 37°C (+/- 1°C) warme (ohne Rühren) Wasserbad stellen.

Bitte beachten: Den Deckel der Hybridisierungskammer nicht versiegeln. Keinen Deckel auf das Wasserbad legen. 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 im Innern der Kammer ist für eine optimale Hybridisierung von entscheidender Bedeutung. Die korrekten Werte werden durch Befolgen dieser Schritte sichergestellt.

7. Stringentes Waschen nach der Hybridisierung

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

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

- Stringente Waschschritte
 - Das OctoChrome-System vorsichtig vom Objektträger abnehmen und den Objektträger für 2 Minuten in Lösung 1 einlegen. (Das OctoChrome-System kann nicht wieder verwendet werden).
 - Den Objektträger für 30 Sekunden in Lösung 2 einlegen.

Nicht mehr als jeweils zwei OctoChrome-Objektträger gleichzeitig den stringenten Wäschen unterziehen.

8. Eindecken und Ablesen der Ergebnisse

- 20 µl DAPI auf jedes Ende des Objektträgers auftragen und ein Deckglaschen (24 x 50 mm²) auflegen.
- Den Objektträger mit Filterpapier oder einem Tuch abtupfen.
- Vor dem Betrachten mit dem Fluoreszenzmikroskop für 10 Minuten im Dunkeln lassen.
- Manche Mikroskoptypen haben Objektträgerhalter, die ein Betrachten der äußeren Enden des Objektträgers erschweren. Sollte dies der Fall sein, den Objektträger einfach um 180° drehen, das hilft beim Betrachten des Objektträgers.

Die im Multiprobe-System verwendeten Sonden sind mit lichtempfindlichen Fluorophoren direkt markiert. Die Resultate werden verbessert, wenn die Sonden bei diesen Prozeduren nur minimalen Lichtemissionen 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.

Erwartete Ergebnisse

- Die akrozentrischen Painting-Sonden für ganze Chromosomen enthalten Material des kurzen Arms. Dieses ist den Chromosomen der D- und G-Gruppe gemeinsam, so dass in diesen Regionen Kreuzhybridisierung beobachtet werden kann.
- Die Chromosom 16 Painting-Sonde für gesamte Chromosomen kann eine schwache Kreuzhybridisierung mit den heterochromatischen Regionen des Y-Chromosoms zeigen.
- Die Y-Chromosom Painting-Sonde enthält pseudoautosomale Regionen, die sie mit dem X-Chromosom gemeinsam hat. Dementsprechend kann in diesen Regionen Kreuzhybridisierung beobachtet werden.
- Die Chromosomen 1, 5 und 19 haben DNA-Sequenzen am Zentromer gemeinsam. Dementsprechend können in diesen Regionen Kreuzhybridisierungen zwischen diesen Chromosomen beobachtet werden.
- Die Painting-Sonde für das gesamte Chromosom 1 kann bei 1p36 ein helleres Signal zeigen.
- Die Painting-Sonden für gesamte Chromosomen bedecken nicht die Heterochromatinblöcke in den Chromosomen 1, 9 und 16.

Kundendienst

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

Sondenspezifkationen

OctoChrome Feld	Chromosom	Fluorophor
1	3	rot
	15	blau
	17	grün
2	8	rot
	12	blau
	21*	grün
3	1*	rot
	16*	blau
	19*	grün
4	2	rot
	13*	blau
	20	grün
5	9	rot
	11	blau
	22*	grün
6	4	rot
	14*	blau
	18	grün
7	5*	rot
	10	blau
	7	grün
8	X	rot
	6	blau
	Y*	grün

- Für Einzelheiten siehe Abschnitt „Erwartete Ergebnisse“.

ESPAÑOL

Introducción

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

El OctoChrome combina los principios del Chromoprobe Multiprobe® System con varios colores de marcado fluorescente para proporcionar una técnica de FISH que facilita el análisis citogenético haciéndolo más rápido, sencillo y rentable.

El Multiprobe-OctoChrome está dividido en 8 áreas cuadradas cada una de las cuales contiene tres sondas de pintado de cromosoma marcadas directamente en colores distintos: verde (espectro FITC), rojo (espectro Texas Red) y azul (filtro Aqua). Las sondas se enlazan de forma reversible a un dispositivo de cristal, un método exclusivo de Cytocell, y de ese modo se simplifica la hibridación *in situ* fluorescente evitando la necesidad de preparar las sondas. La desnaturización de la sonda y del ADN diapa se produce simultáneamente en el dispositivo una vez calentado.

El protocolo de FISH se simplifica aún más con la desnaturización simultánea del ADN diapa y la sonday con los lavados rápidos sin formamida. Las sondas de pintado, marcadas directamente eliminan la necesidad de seguir largos pasos de amplificación.

El Multiprobe-OctoChrome está pensado para FISH en cromosomas metafásicos a partir de células sanguíneas periféricas cultivadas y fijadas.

Material proporcionado

Cada kit contiene los siguientes reactivos que son los suficientes para 2 (Cat. Núm. PMP802), 5 (Cat. Núm. PMP804) o 10 (Cat. Núm. PMP803) muestras:

- 2, 5 o 10 Chromoprobe Multiprobe - OctoChrome recubiertos con sondas de pintado cromosómico marcadas directamente
 - Cantidad de sondas de pintado marcadas directamente en rojo: 2,5 a 5 ng por cuadrado
 - Cantidad de sondas de pintado marcadas en verde: 7,5 a 12,5 ng por cuadrado
 - Cantidad de sondas de pintado marcadas en azul: 15 a 25 ng por cuadrado
- 4, 7 ó 12 Portaobjetos de cristal con plantilla especial
- 500µl Hibridación Solution A (Solución de hibridación) : Formamida, dextran sulfato, SSC
- 500µl Solución de contraste: DAPI (ES : 0,125µl DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol)), Antifade
- 1 Cytocell Slide Surface Thermometer
- 1 Cytocell Chromoprobe Multiprobe Hybridisation Chamber

Avisos y precauciones

- Para diagnóstico *in vitro*. Sólo para uso profesional.
- Utilizar guantes al manipular las sondas de ADN y el contraste DAPI.
- 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.
- DAPI es una sustancia potencialmente cancerígena. Manipular con cuidado; utilizar guantes y bata de laboratorio. Al eliminarla, rociar con gran cantidad de agua.
- Las sustancias peligrosas deben eliminarse de acuerdo con las instrucciones de su institución en relación con la eliminación de sustancias peligrosas.

Almacenamiento y manejo

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

Equipo necesarios pero no proporcionados

- Placa caliente con control preciso de temperatura hasta 80°C
- Incubador a 37°C
- Micropipetas de volumen variable (rango 1µl - 200µl)
- Baño de agua a 37°C (sin agitador)
- Tubos de microcentrifugado (0,5 ml)
- Baño de agua con control preciso de temperatura a 72°C
- Microscopio de fluorescencia
- Recipientes de cristal y de plástico
- Centrífuga
- Pinzas
- Microscopio de fluorescencia con objetivo de inmersión en aceite
- Cubreobjetos 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

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

Protocolo de Chromoprobe Multiprobe

1. Preparación del portaobjetos

- Limpiar el portaobjetos
- Empape el portaobjetos 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 dirección de las anomalías cromosómicas. Para comprobar la densidad de la muestra utilizando una micropipeta (p. ej. una Gilson P10 o P20) ponga 4µl de la suspensión celular en una de las áreas del portaobjetos plantilla y deje secar al aire. El volumen pequeño utilizado significa que normalmente tiene que tocar suavemente el portaobjetos con la punta de la pipeta para transferir la suspensión. Examine con el microscopio de contraste de fases.

*Si la densidad celular es muy elevada, diluya la suspensión con fijador.
*Si el índice mitótico es muy bajo, centrifuge la suspensión celular fijada a 160g durante 10 minutos. Observe el volumen de sobrenadante, elimínelo y vuelva a suspender el pellet en un volumen menor de fijador.

*Si la concentración de la muestra ha sido alterada, extienda 4µl de la muestra en otro cuadrado del portaobjetos y vuelva a examinar el microscopio de contraste de fases.

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

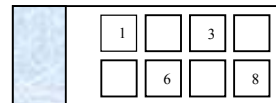
iii. Control de calidad de las muestras

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

En una situación normal, el fijador se extiende al máximo, retrocede y por último se evapora. Para limpiar restos de citoplasma, se alcanzan resultados efectivos si se deja caer una gota de fijador en la muestra, justo en el punto en que el fijador ha alcanzado su extensión máxima. Deje que la gota de fijador se evapore y vuelva a examinar la muestra.

iv. Sembrado del portaobjetos

Añada 4µl de la suspensión celular en las 8 áreas del portaobjetos plantilla en una secuencia de cuadros alternos tal como se muestra a continuación. Esto evitará que las extensiones celulares interfieran entre si.



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 portaobjetos, el examen del mismo en contraste de fases revelará si falta alguno de los cuadros.

Si faltan alguno de los cuadros o estos tienen muy pocas células, siembres los de nuevo: no es necesario volver a extender un nuevo portaobjetos.

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

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

2. Preparación del dispositivo OctoChrome y el portaobjetos plantilla

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

3. Colocación del portaobjetos plantilla sobre el dispositivo OctoChrome

- Invierta con cuidado el portaobjetos de plantilla sobre el dispositivo OctoChrome de manera que el número 1, que ahora está al revés quede situado sobre la parte superior derecha del dispositivo.

- ii. Asegúrese de que el portaobjetos plantilla está cuidadosamente alineado con las áreas correspondientes del dispositivo OctoChrome. Baje con cuidado el portaobjetos del dispositivo OctoChrome de modo que las gotas de la solución de hibridación estén en contacto con el portaobjetos. Presione suave y uniformemente para asegurarse de que la solución de hibridación se extiende hacia los bordes de cada una de las áreas elevadas en el dispositivo OctoChrome.
- iii. Levante el portaobjetos/OctoChrome sujetando **cuidadosamente** el borde esmerilado del portaobjetos de cristal e inviértalo de modo que el portaobjetos se sitúe debajo del dispositivo OctoChrome. Asegúrese de que el dispositivo no roza con el portaobjetos plantilla ya que esto podría causar la contaminación cruzada de las sondas.
- iv. Colóquelo a 37°C (+/- 1°C) (placa caliente o incubador) durante 10 minutos.

4. Instrucciones de uso del Cytozell Slide Surface Thermometer

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

Este termómetro es un dispositivo de cristal líquido y aunque es reutilizable debe tratarse con cuidado para garantizar una vida útil razonable. El termómetro sólo debe utilizarse para comprobar la temperatura de una placa caliente, no debe usarse para controlar el rendimiento de la placa caliente en el tiempo. Para utilizar el termómetro correctamente, colóquelo en la superficie de la placa caliente y espere hasta que los distintos segmentos cambien de color. La temperatura correcta se indica con color verde pálido/dorado. Cuando los segmentos aparecen granulados y los colores no aparecen uniformes y regulares deberá cambiar el termómetro, puesto que ya no funciona correctamente. La duración de vida de cada termómetro debería ser, sin embargo, suficiente para un kit de diez dispositivos OctoChrome.

5. Desnaturalización

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

Transfiera el portaobjetos/dispositivo OctoChrome a la placa caliente con mucho cuidado para mantenerlo a nivel (asegúrese de que el portaobjetos de la muestra tiene contacto total con la placa caliente). Desnaturalice en la placa caliente a 75°C (+/- 1°C) durante **5 minutos**.

6. Hibridación

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

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

No tape el baño de agua.

No hibride en un incubador.

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

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

7. Baños posthibridación

- i. Preparación de las soluciones de lavado
 1. Solución 1: Prepare un recipiente/jarro 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/jarro de Hellendahl que contenga 2 x SSC y 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
 1. Quite el dispositivo OctoChrome cuidadosamente del portaobjetos e introduzca el portaobjetos en la solución 1 durante 2 minutos. (El dispositivo OctoChrome no puede volver a utilizarse).
 2. Coloque el portaobjetos en la solución 2 durante 30 segundos.

Evite lavar más de dos portaobjetos OctoChrome al mismo tiempo.

8. Montaje y visualización de los resultados

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

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

Estabilidad de los portaobjetos terminados

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

Recomendaciones de procedimiento

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

Resultados esperados

1. Las sondas de tinción de cromosomas acrocéntricos contienen material del brazo corto. Se comparte entre los cromosomas de los grupos D y G, por lo que puede observarse la hibridación cruzada en esas regiones.
2. La sonda de tinción del cromosoma 16 puede mostrar una ligera hibridación cruzada con las regiones centroméricas del cromosoma Y.
3. La sonda de tinción del cromosoma Y contiene las regiones pseudoautosómicas comunes con el cromosoma X. En consecuencia, se puede observar hibridación cruzada en estas regiones.
4. Los cromosomas 1, 5 y 19 tienen secuencias comunes de ADN centromérico. En consecuencia, se puede observar la hibridación cruzada en estas regiones entre estos cromosomas.
5. La sonda de pintado (painting) del cromosoma 1 muestra señal más intensa en 1p36.
6. Las sondas de pintado de cromosomas (painting) no incluyen la región Heterocromática de los cromosomas 1, 9 y 16.

Ayuda al cliente

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

Especificaciones de la sonda

Cuadrado de OctoChrome	Cromosoma	Fluorocromo
1	3	Rojo
	15	Azul
	17	Verde
2	8	Rojo
	12	azul
	21*	verde
3	1*	rojo
	16*	azul
	19*	verde
4	2	rojo
	13*	azul
	20	verde
5	9	rojo
	11	azul
	22*	verde
6	4	rojo
	14*	azul
	18	verde
7	5*	rojo
	10	azul
	7	verde
8	X	rojo
	6	azul
	Y*	verde

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

Patents and Trademarks

Chromoprobe, Cytozell and Chromoprobe Multiprobe are registered trademarks of Cytozell 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.



Cytozell Ltd.

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

005/2008-03-20 PI008/CE