



## Instructions For Use

REF: LPU 018



## XIST Probe (Xq13.2) with X Centromere Control

FOR PROFESSIONAL USE ONLY

ENGLISH/FRANÇAIS/ITALIANO/DEUTSCH/ESPAÑOL

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

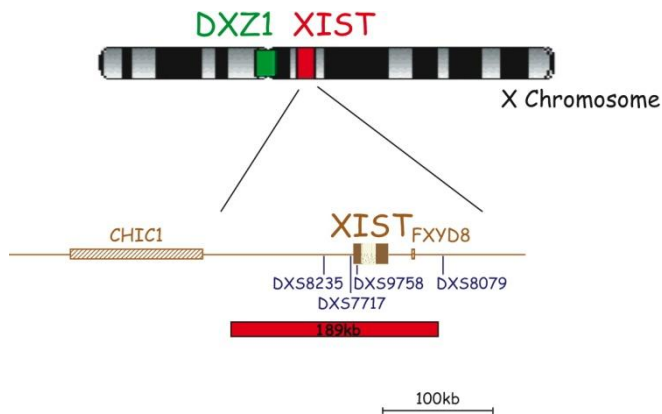
Fluorescence *In Situ* Hybridisation (FISH) is a technique that allows DNA sequences to be detected on metaphase chromosomes or in interphase nuclei of fixed cultured or uncultured cytogenetic samples. The technique uses DNA probes that hybridise to entire chromosomes or single unique sequences, and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

### Probe Specification

XIST (Xq13.2) Red  
Xc: DXZ1 (Xp11.1-q11.1) control probe Green

### Introduction

One X chromosome is inactivated (Xi) in each cell of a female in order to achieve transcriptional balance. An X linked inactivation centre (Xic) is responsible for the initiation of X inactivation. The exact size of the Xic is unclear but it includes the XIST gene (X-inactivation Locus) at Xq13.2. Upregulation of XIST to high levels occurs on the chosen inactive (Xi) chromosome and repression of XIST on the active (Xa) one<sup>1</sup>. Very small ring r(X) chromosomes that do not include XIST have been described with a more severe phenotype in syndromes such as Turner Syndrome<sup>2,3</sup>.



The XIST Region probe labelled in red, is approximately 189 kb, contains markers DXS8235 and DXS7717, and covers the entire XIST gene and flanking DNA. The X centromere: DXZ1 (Xp11.1-q11.1), labelled in green, acts as an X chromosome identification probe. In the normal XY cell, there should be one red and one green signal (1R, 1G) whilst a deletion of XIST results in no red signal and one green control signal (0R, 1G). In the normal XX cell, there should be two red and two green signals (2R, 2G) whilst a deletion of XIST results in one red signal and two green control signals (1R, 2G).

### Materials Provided

Probe: 50µl per vial (5 tests) or 100µl per vial (10 tests)  
Amount of XIST probe : 7.3 ng/test  
Amount of Xc probe: 86.6 ng/test

The probe is provided premixed and ready to use in hybridisation solution (Formamide; Dextran Sulphate; SSC). The probe DNA is directly labelled: XIST Probe with a red fluorophore (specificity to the Texas Red spectrum) and the Xc Control Probe with a green fluorophore (specificity to the FITC spectrum).

Counterstain: 150 µl per vial (15 tests)

The counterstain is DAPI antifade (ES: 0.125 µg/ml DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole)).

### Warnings and Precautions

- For *in vitro* diagnostic use. For professional use only.
- Wear gloves when handling DNA probes and DAPI counterstain.
- Probe mixtures contain formamide which is a teratogen ; do not breathe fumes or allow skin contact. Wear gloves, a lab coat, and handle in a fume hood. Upon disposal, flush with a large volume of water.

- DAPI is a potential carcinogen. Handle with care; wear gloves and a lab coat. Upon disposal, flush with a large volume of water.
- All hazardous materials should be disposed of according to your institution's guidelines for hazardous waste disposal.

### Storage and Handling

The Aquarius kit should be stored at 620°C until the expiry date indicated on the kit label. The probe and counterstain vials must be stored in the dark.

### Equipment Necessary but not Supplied

- Hotplate (with a solid plate and accurate temperature control up to 80°C)
- Variable volume micropipettes range 1 µl to 200 µl
- Water bath with accurate temperature control at 72°C
- Microcentrifuge tubes (0.5 ml)
- Fluorescence microscope (Please see Fluorescence Microscope Recommendation section)
- Plastic or glass coplin jars
- Forceps
- Fluorescence grade microscope lens immersion oil
- Bench top centrifuge

### Fluorescence Microscope Recommendation

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

### Sample Preparation

The kit is designed for use on cultured peripheral blood cells fixed in Carnoy's fixative and should be prepared according to the laboratory or institution guidelines. Prepare blood metaphase spreads on microscope slides according to standard cytogenetic procedures.

### FISH Protocol

#### Slide preparation

- Spot cell sample onto cleaned microscope slide.
- Immerse slide in 2 x SSC, pH 7.0 for 2 mins.
- Dehydrate in an ethanol series (70%, 85% and 100%), each for 2 mins.

#### Pre-Denaturation

- Remove probe from -20°C freezer and allow to warm to RT.
- Ensure probe solution is uniform by repeated pipette mixing.
- Remove 10 µl of probe and place on cell sample slide, cover with a 24 x 24mm glass coverslip and seal with rubber solution glue.

#### Denaturation

- Place slide on to a 75°C (+/-1°C) hotplate and denature for 2 minutes.

#### Hybridisation:

- Hybridise slide overnight in a humid, lightproof container at 37°C (+/-1°C).

#### Post-Hybridisation Washes

- Remove coverslip and all traces of glue carefully.
- Wash slide in 0.4 x SSC at 72°C (+/-1°C) (pH 7.0) for 2 mins.
- Drain slide and wash in 2 x SSC, 0.05% Tween-20 at RT (pH 7.0) for 30 seconds.
- Drain the slide and apply 10 µl of DAPI antifade.
- Cover with a coverslip and allow colour to develop in the dark for 10 mins.
- View with fluorescence microscope.

### 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

- Baking or aging of slides is not recommended as it may reduce signal fluorescence.
- The use of a calibrated thermometer is strongly recommended for measuring temperatures of solutions, waterbaths, and incubators, as these temperatures are critical for optimum product performance.
- The wash concentrations (stringency), pH and temperature are important, as low stringency can result in non-specific binding of the probe and too high stringency can result in a lack of signal.

### Customer Support

Please contact the Cytocell Sales and Marketing Department.

### FRANÇAIS

L'hybridation *in situ* par fluorescence (FISH) est une technique qui permet de détecter des séquences ADN sur les chromosomes en métaphase ou sur les noyaux interphasiques déchantillons 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. Le ADN cible, après fixation, est traité par la chaleur et à la formamide pour dénaturer la double hélice, la rendant simple hélice. Le 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, le ADN non hybridé et le ADN non lié spécifiquement sont éliminés par une série de lavages stringents et le ADN est ensuite contre-coloré. Un microscope à fluorescence permet la visualisation de la sonde hybridée sur le ADN cible.

### Caractéristiques de la sonde

XIST (Xq13.2) 6 Fluorochrome rouge  
Xc: DXZ1 (Xp11.1-q11.1) 6 Fluorochrome vert

Un seul des deux chromosomes X de la femelle est inactivé (Xi) afin d'équilibrer le produit des gènes liés au chromosome X. Un centre d'inactivation lié à la Xic (Xic) est responsable de l'initiation de l'inactivation de la X. La taille exacte de Xic n'est pas connue avec précision, cependant on sait qu'elle inclut le gène XIST (X inactive specific transcript) en Xq13.2. Le gène XIST est surexprimé sur le chromosome X inactivé choisi (Xi) et par contre réprimé sur la Xa active (Xa)<sup>1</sup>. Des petits chromosomes X en anneaux de très petites tailles (Xr), n'ayant pas le gène XIST, ont été décrits comme associés à un phénotype plus sévère dans des syndromes tel que le syndrome de Turner<sup>2,3</sup>.

La sonde de la région XIST, marquée en rouge, fait approximativement 189 kb, contient les marqueurs DXS8235 et DXS7717, et couvre entièrement le gène XIST et ses régions adjacentes. La sonde du centromère de l'X, DXZ1 (Xp11.1-q11.1), marquée en vert, sert de contrôle pour identifier le chromosome X. Dans une cellule XY normale, on doit voir 1 spot rouge et 1 spot vert (1R, 1G). Dans une cellule XY déléetée, on observe aucun signal rouge et 1 spot vert contrôlé (0R, 1G). Dans une cellule XX normale, on observe 2 spots rouges et 2 spots verts contrôlés (2R, 2G). Dans une cellule XX déléetée, on observe 1 spot rouge et 2 spots verts contrôlés (1R, 2G).

### Conditionnement

Sonde : 50 µl par tube (5 tests) ou 100 µl par tube (10 tests)  
Concentration de sonde XIST : 7.3 ng/test  
Concentration de sonde de contrôle Xc : 86.6 ng/test

La sonde est fournie prête-à-emploi dans le tampon d'hybridation (formamide, sulfate de dextran, SSC). La sonde ADN est directement marquée : XIST avec un fluorochrome rouge (spectre Texas Red) et Xc avec un fluorochrome vert spectre FITC.

Contre-colorant : 150 µl par tube (15 tests)

Le contre-colorant est le DAPI antifading (ES : 0,125µg/ml DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole))

### Avertissements et précautions

- Pour utilisation en diagnostic *in vitro*. Pour usage professionnel uniquement.
- Porter des gants lors de la manipulation des sondes ADN et du contre-colorant DAPI.
- La sonde contient de la formamide qui est un tératogène. Ne pas respirer les vapeurs. Ne pas mettre en contact avec la peau. Porter des gants, une blouse de laboratoire et manipuler sous une hotte. Après élimination, rincer abondamment avec de l'eau.
- Le DAPI est un carcinogène potentiel. Manipuler avec précaution. Porter des gants et une blouse de laboratoire. Après élimination, rincer abondamment avec de l'eau.
- Toutes matières dangereuses doivent être éliminées selon les réglementations en vigueur dans votre institution pour l'élimination des déchets dangereux.

## Conservation et manipulation

Le kit Aquarius doit être conservé à -20°C jusqu'à la date d'expiration indiquée sur le kit. La sonde et le contre-colorant doivent être conservés à l'abri de la lumière.

## Matériel nécessaire non fourni

### Équipement

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

### Microscope 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 3 fluorochromes simultanément.

### Préparation des échantillons

Le kit a été développé pour l'utilisation sur des cellules du sang périphérique cultivées et fixées avec du fixateur Carnoy et doivent être préparés selon les protocoles en vigueur dans le laboratoire ou l'institution.

Préparer les éléments métaphasiques sur des lames à microscope selon les techniques standards de cytogénétique.

### Protocole FISH

Préparation de la lame échantillon

- Déposer l'échantillon cellulaire sur une lame propre.
  - Plonger la lame dans du 2 x SSC, pH 7.0 pendant 2 minutes.
  - Déshydrater dans une série de bains éthanol (70%, 85% et 100%), 2 minutes dans chaque bain.
- Pré-Dénaturation
- Retirer la sonde du congélateur à -20°C et la laisser préchauffer à température ambiante.
  - Bien homogénéiser la sonde en pipétant plusieurs fois.
  - Prelever 10 µl de sonde et la déposer sur la lame échantillon, et couvrir avec une lamelle en verre 24 x 24mm. Sceller avec du rubber cément et laisser sécher.

### Dénaturation

- Placer la lame sur une plaque chauffante à 75°C (+/- 1°C) et dénaturer pendant 2 minutes.

### Hybridation

- Incuber la lame pendant une nuit à 37°C (+/1°C) à l'abri de la lumière et dans une chambre humide ou chambre d'hybridation.
- Lavages post-hybridation
- Retirer la lamelle et éliminer toutes traces de rubber cément
  - Laver la lame dans du tampon 0,4 x SSC (pH 7.0) à 72°C (+/- 1°C) pendant 2 minutes.
  - Egoutter la lame et laver dans du tampon 2 x SSC, 0,05% Tween-20 (pH 7.0) à température ambiante pendant 30 secondes.
  - Egoutter la lame et déposer 10 µl de DAPI antifading.
  - Couvrir avec une lamelle et laisser la coloration se développer dans l'obscurité pendant 10 minutes.
  - Visualiser avec un microscope à fluorescence.

### Stabilité des lames

Les lames FISH sont analysables pendant un mois si elles sont conservées à l'obscurité et à/ou au-dessous de la température ambiante.

### Recommandations

- Cuire ou vieillir les lames n'est pas recommandé, ceci pouvant réduire l'intensité du signal.
- 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 Cytocell, Département Ventes/Marketing ou votre agent local.

## ITALIANO

L'ibridazione *in situ* in fluorescenza (Fluorescence *In Situ* Hybridisation - FISH) è una tecnica che permette di rilevare sequenze di DNA su cromosomi in metafase o in nuclei in interfase di campioni citogenetici fissati, in coltura 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 un 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.

### Specifiche della sonda

XIST (Xq13.2) rosso  
Xc: DXZ1 (Xp11.1-q11.1) verde

Un cromosoma X è inattivato (Xi) in ogni cellula di una femmina per ottenere un bilanciamento trascrizionale. Un centro di inattivazione legato al cromosoma X (Xic) è responsabile dell'avvio dell'inattivazione del cromosoma X. La dimensione esatta dello Xic non è nota ma si sa che comprende il gene XIST (locus di inattivazione del cromosoma X) a Xq13.2. La sovraespressione di XIST a livelli elevati si verifica sul cromosoma X inattivato (Xi) e la repressione di XIST sul cromosoma X attivo (Xa)<sup>1</sup>. La presenza di cromosomi molto piccoli ad anello, r(X), che non comprendono XIST è stata associata ad un fenotipo più grave in sindromi quali la sindrome di Turner<sup>2,3</sup>.

La sonda complementare alla regione XIST, marcata in rosso, è di circa 189 kb, contiene i marcatori DXS8235 e DXS7717c ibridizza con l'intero gene XIST e con il DNA fiancheggiante. La sonda centromerica specifica per il cromosoma X: DXZ1 (Xp11.1-q11.1), marcata in verde, ha la funzione identificare il cromosoma X. Nella cellula normale XY, si osserva un segnale rosso e un segnale verde (1R, 1G) mentre una delezione a carico del gene XIST si traduce nell'assenza del segnale rosso e in un segnale di controllo verde (0R, 1G). La cellula normale XX è identificata da due segnali rossi e due segnali verdi (2R, 2G) mentre la cellula con una delezione a carico del gene XIST presenta un unico segnale rosso e due segnali di controllo verdi (1R, 2G).

### Materiale fornito

Sonda : 50µl per provetta (5 test) o 100µl per provetta (10 test)

Quantità di sonda di XIST : 7.3 ng/test

Quantità di sonda Xc: 86.6 ng/test

La sonda è fornita già miscelata e pronta per l'uso nella soluzione di ibridazione (Formamide; Destrano solfato; SSC). Il DNA della sonda è marcato direttamente. Sonda XIST marcata con un fluorocromo rosso (spettro Texas Red) e Xc marcata con un fluorocromo verde (spettro FITC).

Colorante di contrasto : 150µl per provetta (15 test)

Il colorante di contrasto è il DAPI antifade (ES: 0,125µg/ml DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindolo))

### 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.
- Le miscele di sonda contengono formamide, una sostanza cancerogena. Non respirare i fumi ed evitare il contatto con la pelle. Indossare guanti, camicia da laboratorio e maneggiare in una cappa aspirante. Per lo smaltimento, lavare con grandi quantità di acqua.
- Il DAPI è altamente cancerogeno. Maneggiare con cura, indossare i guanti ed un camicia 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 Aquarius a 620°C fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta. I flaconcini della sonda e del colorante di contrasto devono essere conservati al buio.

### Materiali necessari non forniti

#### Apparecchiature

- Piastra riscaldante (con controllo accurato della temperatura fino ad 80°C)
- Micropipette a volume variabile compreso tra 1µl e 200µl
- Bagno termostatico con controllo accurato della temperatura a 72°C
- Provette da microcentrifuga (0,5 ml)
- Microscopio a fluorescenza (riferirsi alla sezione Configurazione ottimale del microscopio e dei filtri)
- Contenitori di Coplin in plastica o vetro
- Pinzette
- Olivo per lenti ad immersione del microscopio a fluorescenza
- Centrifuga da banco

### Configurazione ottimale del microscopio e dei filtri

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

## Preparazione del campione

Il kit è stato progettato per l'utilizzo con cellule del sangue periferico coltivate, fissate nel fissativo di Carnoy e preparate secondo le linee guida del laboratorio o dell'istituzione.

Preparare sospensioni dense di cellule ematiche in metafase sui vetrini campione seguendo le procedure standard di citogenetica.

## Protocollo

### Preparazione del vetrino

- Caricare il campione cellulare su un vetrino da microscopia pulito
- Immergere il vetrino in SSC 2x, pH 7.0 per 2 minuti
- Disidratare in una serie di diluizioni di etanolo (70%, 85% e 100%), ognuna per 2 minuti

### Pre-denaturazione

- Rimuovere la sonda dal congelatore a -20°C e lasciarla riscaldare a TA
- Accertarsi che la soluzione della sonda sia uniforme pipettando ripetutamente
- Rimuovere 10µl di sonda e caricarli sul vetrino con il campione cellulare, coprire con un coprioggetti da 24 x 24 mm e sigillare con soluzione collante gommosa

### Denaturazione

- Porre il vetrino su una piastra riscaldante a 75°C (+/- 1°C) e denaturare per 2 minuti.
- Ibridazione
- Incubare il vetrino per tutta la notte** in una camera umida, non permeabile alla luce, a 37°C (+/- 1°C)

### Lavaggi post-ibridazione

- Rimuovere accuratamente il vetrino coprioggettato e tutte le tracce di colla
- Lavare il vetrino in SSC 0.4x (pH 7.0) a 72°C (+/- 1°C) per 2 minuti
- Scolare il vetrino e lavare in SSC 2x, Tween-20 0.05% (pH 7.0) a TA per 30 secondi
- Colorare il vetrino e applicare 10µl di DAPI antifade
- Coprire con un vetrino coprioggettato e far sviluppare il colore al buio per 10 minuti
- Analizzare con il microscopio a fluorescenza

### 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

- 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.
- Si raccomanda fortemente l'utilizzo di un termometro calibrato per misurare la temperatura delle soluzioni, dei bagni termostatici 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 di stringenza blande possono favorire un legame non specifico della sonda e condizioni di stringenza troppo alte possono portare alla perdita del segnale.

### Assistenza clienti

Contattare l'Ufficio Commerciale e Vendita della Cytocell.

## DEUTSCH

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

### Sondenspezifikation

XIST (Xq13.2) Rot  
Xc: DXZ1 (Xp11.1-q11.1) Grün

In jeder Zelle eines weiblichen Individuums wird ein X-Chromosom inaktiviert (Xi), um transkriptionelles Gleichgewicht zu erreichen. Ein X-linked Inactivation Centre (Xic) ist verantwortlich für die Initiation der X-Inaktivierung. Die genaue Größe des Xic ist unklar, aber es umfasst das XIST-Gen (X-Inactivation Locus) auf Xq13.2. Auf dem ausgewählten inaktiven (Xi) Chromosom erfolgt eine Aktivierung des XIST auf hohem Niveau, auf dem aktiven (Xa) erfolgt eine Repression des XIST<sup>1</sup>. Sehr kleine r(X)-Chromosomen, die kein XIST enthalten, wurden bei Syndromen wie dem Turner-Syndrom mit einem schwereren Phänotyp beschrieben<sup>2,3</sup>.

Die XIST-Region-Sonde, rot markiert, ist ca. 189 kb lang, enthält die Marker DXS8235 und DXS7717, und deckt das gesamte XIST-Gen und flankierende DNA ab. Die Sonda X-Zentromer: DXZ1 (Xp11.1-q11.1), grün markiert, dient als X-Chromosomen-Identifizierungssonde. In einer normalen XY-Zelle sollte es ein rotes und ein grünes Signal geben (1R, 1G), während eine Deletion von XIST zur Abwesenheit des roten Signals und einem grünen Kontrollsignal führt (0R, 1G). In einer normalen XX-Zelle sollte es zwei rote und zwei grüne (2R, 2G) Signale geben, während die Deletion eines Sonden-Targets zu einem roten Signal und zwei grünen Kontrollsignalen führt (1R, 2G).

### Kitkomponenten

Sonde: 50µl pro Röhrchen (5 tests) oder 100µl pro Röhrchen (10 tests)

Menge an XIST ó Bereichssonde: 7.3 ng/Test

Menge an Xc - Sonde: 86.6 ng/Test

Die Sonde wird vorgemischt und gebrauchsfertig in Hybridisierungslösung geliefert (Formamid, Dextransulfat, SSC). Die Sonden-DNA ist direkt markiert: die XIST- Sonde mit einem roten Fluorophor (spezifisch für das Texasrot-Spektrum) und die Xc - Sonde mit einem grünen Fluorophor (spezifisch für das FITC-Spektrum).

Gegenfärbung : 150 µl pro Röhrchen (15 Tests)

Die Gegenfärbung besteht aus DAPI antifade (ES: 0,125 µg/ml DAPI (4,6-Diamidino-2-Phenylindol)).

### Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen

- Zur Verwendung in der *in vitro* Diagnostik. Nur für die professionelle Verwendung.
- Beim Umgang mit DNA-Sonden und der DAPI-Gegenfärbung Handschuhe tragen.
- Sonneneinstrahlung enthalten Formamid, das teratogen ist. Keine Dämpfe einatmen und nicht mit der Haut in Berührung bringen. Handschuhe und Labormantel tragen und unter einer Abzugshaube arbeiten. 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 Ihrer Einrichtung zur Gefahrstoffentsorgung entsorgt werden.

### Lagerung und Behandlung

Das Aquarius-Kit sollte bis zum Ablaufdatum, das auf dem Kiteikett angegeben ist, bei 620°C gelagert werden. Die Röhrchen mit den Sonden und der Gegenfärbung müssen im Dunkeln aufbewahrt werden.

### Benötigte, aber nicht mitgelieferte Materialien

#### Laborgeräte

- Heizplatte (mit stabiler Heizplatte und genauer Temperaturregelung bis 80°C)
- Mikropipetten mit variablem Volumen von 1 µl bis 200 µl
- Wasserbad mit genauer Temperaturregelung bei 72°C.
- Mikro-Zentrifugenröhrchen (0,5 ml)
- Fluoreszenzmikroskop (siehe auch Empfehlungen zum Fluoreszenzmikroskop)
- Coplin-Färbetrog aus Kunststoff oder Glas
- Pinzette
- Für Fluoreszenzobjektive geeignetes Immersionsöl
- Tischzentrifuge

### Empfehlungen zum Fluoreszenzmikroskop

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

### Probenvorbereitung

Das Kit ist für Verwendung an kultivierten, peripheren Blutzellen, die in Carnoy's Fixativ fixiert sind, ausgelegt und sollte nach den Richtlinien des Labors oder der Einrichtung vorbereitet werden. Präparieren Sie mit zytogenetischen Standardmethoden Metaphasen-Spreitungspräparate.

### FISH-Protokoll

Vorbereitung des Objektträgers:

- Zellprobe auf gereinigten Objektträger aufbringen
- Objektträger 2 Minuten in 2 x SSC (pH 7.0) einlegen.
- Entwässern in Alkoholreihe (70%, 85% und 100%), jeweils für 2 Min.

#### Vordenaturierung

- Nehmen Sie die Sonde aus dem 620°C Gefrierschrank und auf Zimmertemperatur aufwärmen lassen.
- Durch wiederholtes Mischen in der Pipette sicherstellen, dass die Sondenlösung homogen gemischt ist.
- 10 µl der Sonde entnehmen und auf den Objektträger mit der Zellprobe geben, mit einem Glasdeckglaschen 24 x 24 mm<sup>2</sup> abdecken und mit Gummikleberlösung versiegeln.

#### Denaturierung

- Objektträger auf eine Heizplatte mit 75°C (+/- 1°C) legen und 2 Minuten lang denaturieren.

#### Hybridisierung

- Den Objektträger in einer lichtdichten feuchten Kammer bei 37°C (+/- 1°C) über Nacht hybridisieren. Waschen nach der Hybridisierung

- Deckgläser und alle Kleberspuren vorsichtig entfernen.
- Objektträger 2 Minuten in 0,4x SSC (pH 7,0) bei 72°C (+/- 1°C) waschen.
- Objektträger abtropfen lassen und 30 Sekunden in 2x SSC, 0,05% Tween-20 (pH 7,0) bei RT waschen.
- Objektträger abtropfen lassen und 10 µl DAPI Antifade auftragen.
- Mit Deckgläsern abdecken und zur Farbentwicklung 10 Minuten im Dunkeln lagern.
- Unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachten

#### 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

- Erhitzen oder anderweitiges Altern der Objektträger wird nicht empfohlen da dies zu einer Verminderung der Signalfuoreszenz führen kann.
- 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

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 diana se trata con calor y formamida para desnaturalizar el ADN bicatenario haciendo que resulte monocatenario. El ADN diana queda entonces disponible para hibridarlo con una sonda de ADN igualmente desnaturalizado, monocatenario marcado con fluorescencia que tiene una secuencia complementaria. Después de la hibridación la sonda de ADN no específicamente hibridada y no hibridada se elimina tras varios lavados 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.

#### Especificaciones de la sonda

XIST (Xq13.2) marcaje rojo

Xc: DXZ1 (Xp11.1-q11.1) marcaje verde

Un seul des deux chromosomes X de la femelle est inactivé (Xi) afin d'équilibrer le produit des gènes liés au chromosome X. Un centre d'inactivation lié à l'oX (Xic) est responsable de l'initiation de l'inactivation de l'oX. La taille exacte de Xic n'est pas connue avec précision, cependant on sait qu'elle inclut le gène XIST (X inactive specific transcript) en Xq13.2. Le gène XIST est surexprimé sur le chromosome X inactivé choisi (Xi) et par contre réprimé sur l'oX activé (Xa). Des petits chromosomes X en anneaux de très petites tailles (Xr), n'incluant pas le gène XIST, ont été décrits comme associés à un phénotype plus sévère dans des syndromes tel que le syndrome de Turner<sup>2</sup>.

La sonda de la région XIST, marquée en rouge, fait approximativement 189 kb, contient les marqueurs DXS8235 et DXS7717, et couvre entièrement le gène XIST et ses régions adjacentes. La sonde du centromère de l'X, DXZ1 (Xp11.1-q11.1), marquée en vert, sert de contrôle pour identifier le chromosome X. Dans une cellule XY normale, on doit voir 1 spot rouge et 1 spot vert (1R, 1G). Dans une cellule XY délétée, on observe aucun signal rouge et 1 spot vert contrôlé (0R, 1G). Dans une cellule XX normale, on observe 2 spots rouges et 2 spots verts contrôlés (2R, 2G). Dans une cellule XX délétée, on observe 1 spot rouge et 2 spots verts contrôlés (1R, 2G).

#### Material proporcionado

Sonda: 50µl por vial (5 reacciones) o 100µl por vial (10 reacciones)

Cantidad de XIST Region probe: 7.3 ng/reacción

Cantidad de sonda Xc: 86.6 ng/reacción

La sonda se proporciona mezclada previamente y lista para utilizar en la solución de hibridación (Formamida; dextran sulfato; SSC). La sonda de ADN está directamente etiquetada: XIST con fluorocromo rojo (específica para espectro Texas Red) y Xc con fluorocromo verde (específica para el espectro FITC).

Contraste: 150µl por vial (15 reacciones)

DAPI Antifade (ES: 0,125 µg/ml DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol))

#### 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. No inhale gases ni permita el contacto con la piel. Lleve guantes, bata de laboratorio y realice la manipulación con campana extractora. Al eliminarla, rociar con gran cantidad de agua.
- La DAPI puede producir cáncer. Manipule con cuidado; utilice 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 Aquarius debe almacenarse a -20°C hasta la fecha de caducidad que se indica en la etiqueta del kit. Los viales de contraste y de sonda deben almacenarse en un lugar oscuro.

#### Equipo necesarios pero no proporcionados

- Placa caliente (con una placa sólida y un control de temperatura preciso hasta 80°C)
- Micropipetas de volumen variable rango (1µl -200µl)
- Baño de agua con control preciso de temperatura a 72°C
- Tubos de microcentrifugado (0,5 ml)
- Microscopio de fluorescencia (Lea la sección Recomendaciones para el microscopio de fluorescencia)
- Recipientes de cristal o de plástico
- Pinzas
- Microscopio de fluorescencia con objetivo de inmersión en aceite
- Centrifuga

#### 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 los tres fluorocromos.

#### Preparación de la muestra

El kit está diseñado para su uso con células sanguíneas periféricas cultivadas y fijadas en Carnoy que debe prepararse de acuerdo con las instrucciones del laboratorio o de la institución.

Preparar las extensiones de sangre cultivada en los portaobjetos del microscopio según los procedimientos citogenéticos estándar.

#### Protocolo FISH

Preparación del portaobjetos

- Manche la concentración celular de la muestra en un portaobjetos limpio del microscopio
- Sumerja el portaobjetos en 2 x SSC, pH 7,0 durante 2 minutos
- Deshidrate en una serie de etanol (70%, 85% y 100%), 2 minutos en cada uno

Antes de la desnaturalización

- Saque la sonda del congelador a -20°C y deje que se caliente a TA
- Asegúrese de que la solución de la sonda es uniforme mezclando varias veces con la pipeta
- Saque 10µl de la sonda y colóquelo en el portaobjetos, cubra con un cubreobjetos de cristal de 24 x 24 mm y selle con solución de goma

Desnaturalización

- Coloque el portaobjetos en una placa caliente a 75°C (+/- 1°C) y desnaturalice durante 2 minutos

Hibridación

- Hibride el portaobjetos durante la noche en un contenedor húmedo y hermético a 37°C (+/- 1°C). Baños posthibridación
- Quite el cubreobjetos y los restos de goma cuidadosamente
- Lave el portaobjetos en 0,4 x SSC (pH 7,0) a 72°C (+/- 1°C) durante 2 minutos
- Seque el portaobjetos y lávelo en 2 x SSC, 0,05% Tween-20 (pH 7,0) a TA durante 30 segundos
- Seque el portaobjetos y aplique 10µl del DAPI Antifade
- Cubra con el cubreobjetos y deje la preparación en la oscuridad durante 10 minutos para estabilizar el DAPI
- Obsérvelo con el microscopio de fluorescencia

#### Estabilidad de los portaobjetos terminados

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

#### Recomendaciones de procedimiento

- No es recomendable calentar o envejecer los portaobjetos ya que puede reducir la señal de fluorescencia.
- 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.
- Las concentraciones de lavado, el pH y la temperatura son importantes puesto que una baja stringencia en el lavado puede resultar en 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.

#### Referencia bibliográfica/ Literatur/Bibliografía

- Boumil R.M. and Lee J.T., et al (2001) *Hum Mol Genet* 10 (20): 2225-2232

- Le Caignec C., et al (2003) *Prenat Diagn* 23 (2): 143-145
- Bouayed Abdelmoula N., (2004) *Ann Genet* 47 (3): 305-313

#### Patents and Trademarks

Aquarius and Cytocell are registered trademarks of Cytocell Ltd.



002/2010-06-23

**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

DS#018/CE