



Instructions For Use

REF: LPU 023



Rubinstein-Taybi

FOR PROFESSIONAL USE ONLY

ENGLISH/FRANÇAIS/ITALIANO/DEUTSCH/ESPAÑOL

Further information available at www.cytocell.com

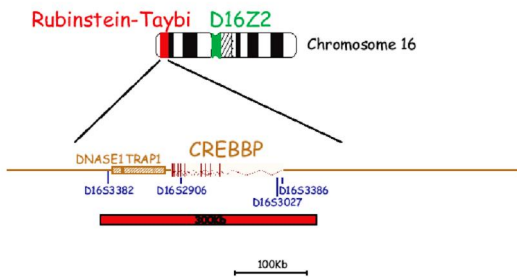
Fluorescence *In Situ* Hybridisation (FISH) is a technique that allows DNA sequences to be detected on metaphase chromosomes or in interphase nuclei of fixed cultured or uncultured cytogenetic samples. The technique uses DNA probes that hybridise to entire chromosomes or single unique sequences, and 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.

Probe Specification

CREBBP (16p13.3) Red
16 cen (D16Z2) Green

Introduction

Rubinstein-Taybi syndrome described in 1963 is a well-defined condition characterized by short stature, mental retardation, facial abnormalities, and broad thumbs and first toes¹. This condition is an autosomal-dominant disease with a frequency of one individual in 100,000 newborns. Chromosome band 16p13.3 contains the Rubinstein-Taybi syndrome locus, which includes a gene encoding a binding protein for cyclic adenosine monophosphate response element binding protein (CBP) (CREBBP). This gene spans approximately 150 kb with 31 exons² and dosage anomalies are the common cause of the disease³. Disruptions of CREBBP, either by gross chromosomal rearrangement or point mutation, are responsible for the phenotype of Rubinstein-Taybi syndrome. Microdeletions including the CREBBP gene account for about 10-15% of RTS cases¹.



EnsEMBL 54

The CREBBP region probe labelled in red, is approximately 300 kb and covers the entire CREBBP gene and flanking DNA. The accompanying D16Z2 centromere specific probe in green, acts as a control probe. In the normal cell there should be two red and two green signals (2R, 2G), whilst a deletion of a probe target results in one red signal and two green control signals (1R, 2G).

Materials Provided

Probe: 50µl per vial (5 tests) or 100 µl per vial (10 tests)

Amount of CREBBP probe : 40-50 ng/test

Amount of 16 cen probe: 120-150 ng/test

The probe is provided premixed and ready to use in hybridisation solution (Formamide; Dextran Sulphate; SSC). The probe DNA is directly labelled: CREBBP Probe with a red fluorophore (specificity to the Texas Red spectrum) and the 16 cen Specific 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 probe 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 ageing 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 décanthilons 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

CREBBP (16p13.3) δ Fluorochrome rouge
16 cen (D16Z2) δ Fluorochrome vert

L'échantillon de la région CREBBP marqué en rouge mesure environ 300 kb et recouvre la totalité du gène CREBBP et de l'ADN flanquant. L'échantillon spécifique de centromère D16Z2 associé marqué en vert joue un rôle d'échantillon de contrôle. Une cellule normale doit comporter 2 signaux rouges et deux signaux verts (2R, 2V), alors que la délétion d'un échantillon cible entraîne une signal rouge et deux signaux verts (1R, 2V).

Conditionnement

Sonde : 50µl par tube (5 tests) ou 100 µl par tube (10 tests)

Concentration de sonde CREBBP: 40-50 ng/test

Concentration de sonde 16 cen: 120-150 ng/test

La sonde est fournie prête-à-l'emploi dans le tampon d'hybridation (formamide, sulfate de dextran, SSC). La sonde ADN est directement marquée : CREBBP avec un fluorochrome rouge (spectre Texas Red) et 16 cen 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)
- Jarses 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 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 institution.

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

Protocole FISH

Préparation de la lame échantillon

1. Déposer l'échantillon cellulaire sur une lame propre.

2. Plonger la lame dans du 2 x SSC, pH 7.0 pendant 2 minutes.

3. Déshydrater dans une série de bains éthanol (70%, 85% et 100%), 2 minutes dans chaque bain.

Pré-Dénaturation

5. Retirer la sonde du congélateur à -20°C et la laisser préchauffer à température ambiante.

6. Bien homogénéiser la sonde en pipetant plusieurs fois.

7. Prélever 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

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

Hybridation

9. 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

10. Retirer la lamelle et éliminer toutes traces de rubber cément

11. Laver la lame dans du tampon 0,4 x SSC (pH 7.0) à 72°C (+/- 1°C) pendant 2 minutes.

12. Egoutter la lame et laver dans du tampon 2 x SSC, 0,05% Tween-20 (pH 7.0) à température ambiante pendant 30 secondes.

13. Egoutter la lame et déposer 10 µl de DAPI antifading.

14. Couvrir avec une lamelle et laisser la coloration se développer dans l'obscurité pendant 10 minutes.

15. 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

1. Cuir ou vieillir les lames n'est pas recommandé, ceci pouvant réduire l'intensité du signal.

2. 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.

3. 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

CREBBP (16p13.3) rosso
16 cen (D16Z2) verde

La sonda della regione CREBBP etichettata in rosso è di circa 300 kb e copre l'intero gene CREBBP e il DNA contiguo. La sonda centromero D16Z2 specifica in verde, agisce come sonda di controllo. Nella cellula normale ci sono due segnali rossi e due segnali verdi (2R, 2G), mentre una delezione di un bersaglio della sonda dà origine a un 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 CREBBP (16p13.3): 40-50 ng/test

Quantità di sonda 16 cen (D16Z2): 120-150 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 CREBBP marcata con un fluorocromo rosso (spettro Texas Red) e 16 cen 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-fenilindole))

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.

Materiale 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 termostato 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
- Olio per lenti ad immersione del microscopio a fluorescenza
- Centrifuga da banco

Configurazione ottimale del microscopio e dei filtri

Per una visualizzazione ottimale della sonda si raccomanda di utilizzare una lampada a mercurio da 100 watt ed obiettivi plan apochromat 63x e 100x. Il filtro triplo 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 coprioggetto 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
- Scolare il vetrino e applicare 10µl di DAPI antifade
- Coprire con un vetrino coprioggetto 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, einmalige Sequenzen hybridisieren und dient als leistungsstarke Ergänzung zur klassischen Zytogenetik. Die Ziel-DNA wird zum Denaturieren der doppelsträngigen DNA nach dem Fixieren mit Hitze und Formamid behandelt, wodurch sie einzelsträngig wird. So kann sich die Ziel-DNA an eine ebenso denaturierte, einzelsträngige fluoreszenzmarkierte DNA-Sonde mit komplementärer Sequenz anlagern. Nach der Hybridisierung werden nichtgebundene und nicht spezifisch gebundene DNA-Sonden durch eine Reihe von Waschgängen unter stringenten Bedingungen entfernt und die DNA zum Sichtbarmachen gegengefärbt. Unter dem Fluoreszenzmikroskop wird dann die hybridisierte Sonde am Zielmaterial erkennbar.

Sondenspezifikation

CREBBP (16p13.3) Rot

16 cen (D16Z2) Grün

Die rot markierte Sonde für die CREBBP -Region umfasst ca. 300 kb und deckt das gesamte CREBBP -Gen und die flankierende DNA ab. Die begleitende, D16Z2-Centromer-spezifische Sonde ist grün und fungiert als Kontrollsonde. In einer normalen Zelle sollten zwei rote und zwei grüne Signale (2R, 2G) sichtbar sein, während eine Deletion eines Sondenziels zu einem roten Signal und zwei grünen Kontrollsignalen (1R, 2G) führt.

Kitkomponenten

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

Menge an CREBBP (16p13.3) ó 40-50 ng/Test

Menge an 16 cen (D16Z2) - Sonde : 120-150 ng/Test

Die Sonde wird vorgemischt und gebrauchsfertig in Hybridisierungslösung geliefert (Formamid, Dextransulfat, SSC). Die Sonden-DNA ist direkt markiert: die CREBE - Sonde mit einem roten Fluorophor (spezifisch für das Texasrot-Spektrum) und die 16 cen - 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.
- Sonnenschutzbrillen 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 Kitektik 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 ó 200 µl
- Wasserbad mit genauer Temperaturkontrolle 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 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 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 auftragen
- Objektträger 2 Minuten in 2 x SSC (pH 7.0) einlegen.
- Entwässern in Alkoholfreihe (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 Glasdeckgläschen 24 x 24 mm 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 Kammer bei 37°C (+/- 1°C) **über Nacht hybridisieren**.

Waschen nach der Hybridisierung

- Deckgläschen 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 Deckgläschen abdecken und zur Farbwirkung 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 desnaturizar el ADN bicatenario haciendo que resulte monocatenario. El ADN diana 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.

Especificaciones de la sonda

CREBBP (16p13.3) marcaje rojo
16 cen (D16Z2) marcaje verde

La sonda de la región de CREBBP, etiquetada en rojo, abarca 300 Kb aproximadamente y cubre por completo el gen CREBBP y el ADN adyacente. La sonda específica suplementaria del centrómero D16Z2 actúa como una sonda de control. En una célula normal debe haber dos indicaciones rojas y dos verdes (2R, 2G), sin embargo, la eliminación de la región de aplicación de la sonda deriva en una indicación roja y dos indicaciones de control verdes (1R, 2G).

Material proporcionado

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

Cantidad de CREBBP (16p13.3): 40-50 ng/reacción

Cantidad de sonda 16 cen: 120-150ng/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: CREBBP con fluorocromo rojo (específica para espectro Texas Red) y 16 cen con fluorocromo verde (específica para el espectro FITC).

Contraste: 150µl por vial (15 reacciones)

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

Avisos y precauciones

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

Almacenamiento y manejo

El kit 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

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

1. Manche la concentración celular de la muestra en un portaobjetos limpio del microscopio
2. **Envejezca el portaobjetos durante la noche** dentro de un estuche de portaobjetos a temperatura ambiente (TA)
3. Sumerja el portaobjetos en 2 x SSC, pH 7,0 durante 2 minutos
4. Deshidrate en una serie de etanol (70%, 85% y 100%), 2 minutos en cada uno

Antes de la desnaturización

5. Saque la sonda del congelador a -20°C y deje que se caliente a TA
6. Asegúrese de que la solución de la sonda es uniforme mezclando varias veces con la pipeta
7. 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

Desnaturización

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

Hibridación

9. **Híbride el portaobjetos durante la noche** en un contenedor húmedo y hermético a 37°C (+/- 1°C).

Baños posthibridación

10. Quite el cubreobjetos y los restos de goma cuidadosamente
11. Lave el portaobjetos en 0,4 x SSC (pH 7,0) a 72°C (+/- 1°C) durante 2 minutos
12. Seque el portaobjetos y lávelo en 2 x SSC, 0,05% Tween-20 (pH 7,0) a TA durante 30 segundos
13. Seque el portaobjetos y aplique 10µl del DAPI Antifade
14. Cubra con el cubreobjetos y deje la preparación en la oscuridad durante 10 minutos para estabilizar el DAPI
15. 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

1. No es recomendable calentar o envejecer los portaobjetos ya que puede reducir la señal de fluorescencia.
2. Se recomienda encarecidamente el uso de un termómetro calibrado para medir la temperatura de las soluciones, baños de agua e incubadores ya que estas temperaturas son cruciales para el rendimiento óptimo del producto.
3. Las concentraciones de lavado, 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.

Ayuda al cliente

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

Reference/Bibliographie/Literatur/Bibliografía

- (1) Rubinstein JH and Taybi H (1963) Am J Dis Child 105:588-608
- (2) Petrij F et al (2000) J Med Genet 37(3):168-76
- (3) Stef M et al (2007) 15:843-847
- (4) Bartsch O et al (1999):748-756

Patents and Trademarks

Aquarius and Cytocell are registered trademarks of Cytocell Ltd.



Cytocell 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