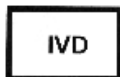




Chromoprobe Multiprobe[®] - System OctoChrome[™]

REF PMP803/ PMP804/PMP802

ENGLISH/FRANÇAIS/ITALIANO/
DEUTSCH/ESPAÑOL/DANSK



ENGLISH

Contents

Introduction	4
Material provided	5
Warning and Precautions	5
Storage and Handling	5
Ancillary Products	5
Materials Necessary but not Supplied	5
Optimal Microscope and Filter Set-up	6
Sample Preparation	7
Chromoprobe Multiprobe Protocol	7
Slide preparation	7
Preparation of OctoChrome device and template slide	9
Positioning of the template over the OctoChrome device	9
Instructions for use of the Cytocell slide surface thermometer	10
Denaturation	10
Hybridisation	10
Post-hybridisation stringent washes	11
Mounting and visualisation of results	11
Counterstaining with PI or DAPI	11
Removal of PI and re-staining with DAPI	12
Stability of Finished Slides	12
Procedural Recommendations	12
Expected Results	12
Probe Specifications	14
References	14
FRANÇAIS	17
ITALIANO	31
DEUTSCH	45
ESPAÑOL	61
DANSK	75

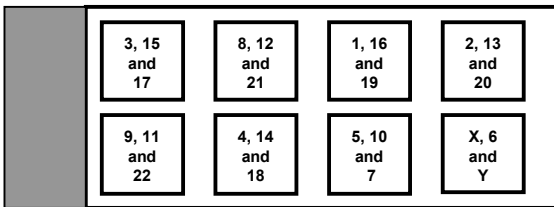
Introduction

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, is treated with heat and formamide to denature the double-stranded DNA, rendering it single-stranded. The target DNA is thus available for annealing to a similarly denatured, single-stranded, fluorescently labelled DNA probe which has a complementary sequence. Following hybridisation, unbound and non-specifically bound DNA probe is removed by a series of 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 Chromoprobe 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 (Coumarin 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 FISH protocol is further simplified with the simultaneous denaturation of both probe and target DNA and, after overnight hybridisation, the use of rapid formamide-free stringency washes. The directly labelled painting probes remove the need for lengthy amplification steps.



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 Chromoprobe 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
- 500µl Hybridisation Solution A: Formamide, Dextran Sulphate, SSC
- 500µl Counterstain Solution: PI (ES: 0.125µg/ml PI (Propidium Iodide)), Antifade
- 500µl Counterstain Solution: DAPI (ES: 0.125µg/ml DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole)), Antifade
- 1 Cytocell Slide Surface Thermometer
- 1 Cytocell Chromoprobe Multiprobe Hybridisation Chamber

Warnings and precautions

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

Storage and Handling

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

Ancillary Products

- 5 x ST Buffer - 100 ml Cat. No. PCA 004
- 20 x SSC Buffer Cat. No. PCA 003
- Cytocell Hotplate Cat. No. PCN 001
- Fluorescent filter sets are available from Cytocell upon request.

Materials Necessary but not Supplied

Equipment

- a) Hotplate with accurate temperature control up to 80°C
- b) 37°C incubator
- c) Variable volume micropipettes range 1µl - 200µl
- d) 37°C water bath (without stirrer)

- e) Microcentrifuge tubes (0.5 ml)
- f) Waterbath 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 50mm)

Solutions

- a) **Carnoy's Fixative**
3:1 methanol : glacial acetic acid
- b) **Ethanol Series**
70%, 85%, 100% (absolute) ethanol
- c) **20 x SSC Stock**
175.3g Sodium chloride, 88.2g Sodium citrate per litre adjust to pH 7.0 with conc. HCl. (4 x SSC: dilute stock 1:5)(2 x SSC: dilute stock 1:10). This solution may be stored for up to 1 year at 4°C
- d) **ST Buffer (1x)**
4 x SSC plus 0.05% (v/v) Tween 20
- e) **0.4 x SSC**
Mix 2ml 20 x SSC with 98mls distilled water.
- f) **2 x SSC, 0.05% Tween 20**
Mix 10ml 20 x SSC with 90mls distilled water, add 50µl Tween 20
- g) **100% Methanol**

Optimal Microscope and Filter Set up

To ensure optimal results with this product it is essential that the microscope used is set up as follows:

General Microscope Set up	
100 Watt Mercury bulb	x 100 ; x 60 Plan-Apochromat Objectives

Fluorophore or counterstain visible

Filter Specifications	Green	Red	Blue with DAPI	Blue with PI	DAPI	PI
DAPI/ FITC/ Texas Red Triple Filter	v	v	v	v	v	v
FITC (narrow bandpass) Single Bandpass Filter	v					
Texas Red Single Bandpass Filter		v				v
Aqua Single Bandpass Filter			v	v		

Sample preparation

The Chromoprobe 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. (See also Solutions, above)

Prepare blood metaphase spreads on CytoCELL Chromoprobe Multiprobe template slides according to CytoCELL protocol below. Baking or otherwise ageing slides is not recommended as it may reduce signal fluorescence.

Chromoprobe Multiprobe Protocol

1. Slide preparation

i. Clean template slide

Soak the template slide for 2 minutes in 100% methanol and polish dry with a clean soft tissue.

ii. Establish correct mitotic index

It is important that the intended sample has a sufficiently high mitotic index to allow detection of chromosome abnormalities. To check the density of the sample, using a micropipette (e.g. a Gilson P10 or P20) pipette 4µl 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 160xg 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 μ l of the concentrated sample onto another square of your test slide and re-examine by phase contrast microscopy.

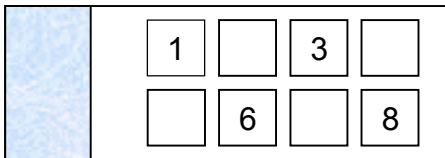
Please Note: 50 μ l is the minimum volume required for the OctoChrome device protocol.

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 μ l 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 μ l 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 μ l 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, spotting further drop(s) of suspension can be added to increase the cell density.

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

2. Preparation of OctoChrome device and template slide

- i. Ensure that the Chromoprobe 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 25µl 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. Whilst 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 2µl 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.

3. 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 (Figure 1).

To help locate square 1 (Chromosomes 3, 15 & 17), its position on the device has been marked in Orange.

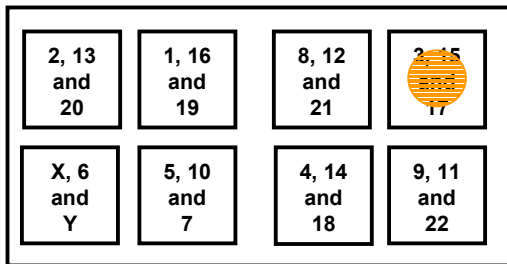


Figure 1. Location of whole chromosome painting probes on OctoChrome device squares.

- 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.

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

Please note: **Do not seal the lid on the hybridisation chamber.**
 Do not place a lid on the water bath.
 Do not hybridise in an incubator.

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

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

7. Post-hybridisation stringent washes

i. Preparation of stringent wash solutions

1. Solution 1: Prepare a coplin/Hellendahl jar containing 0.4 x SSC. Place in a water bath and allow to reach 72°C (+/- 1°C) adjust pH to 7.0.
2. Solution 2: Prepare a coplin/Hellendahl jar containing 2 x SSC and 0.05% Tween 20. Allow 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

The slide can be either counterstained in PI or DAPI. PI will allow simultaneous visualisation of the three fluorophores using the recommended triple filter. Distinguishing the PI from the red fluorophore will not be optimal with the triple filter or the single Texas Red filter. Image analysis capturing of each fluorophore with the specific single filters (see Optimal Microscope set up) is possible, although the PI may interfere with the Texas Red channel.

With DAPI as the counterstain the blue fluorophore may appear lost when using the triple filter (because the DAPI may mask the blue fluorophore), although green and red signals will still be visible. Visual analysis and image capture are possible with the appropriate single filters. The advantage of using DAPI over PI is that the banding is superior and will allow inversion to G banding using an image analysis system.

Alternatively the slide can be stained firstly in PI and later de-stained and re-stained in DAPI. However, please note it is more difficult to remove DAPI counterstain so the initial stain should be PI.

i. Counterstaining with PI or DAPI

1. Apply 20µl of DAPI or PI to each end of the slide and apply a coverslip (24 x 50 mm)
2. Blot the slide with filter paper or tissue.

3. Leave in the dark for 10 minutes before viewing by fluorescence microscopy.
- ii. Removal of PI and re-staining with DAPI
 1. Wash slide for 5 minutes in 1 x ST.
 2. Repeat to give a total of four washes.
 3. Apply 20µl of DAPI to both ends of the slide and apply a large coverslip (24 x 50 mm)
 4. Blot the slide with filter paper.
 5. Leave in the dark for 10 minutes before viewing by fluorescence microscopy.
- iii. Certain types of microscope have slide holders which make it difficult to view the extreme ends of the slide. If this occurs then simply turn the slide through 180° which will help with the viewing of the slide.

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

Stability of finished slides

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

Procedural recommendations

1. Baking or otherwise ageing of slides is not recommended as it may reduce signal fluorescence.
2. Hybridisation conditions may be adversely affected by the use of reagents other than those provided or recommended by Cytocell Technologies Ltd.
3. Failure to follow all procedures for slide preparation, denaturation and hybridisation may give unacceptable or erroneous results.
4. 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.
5. 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.
6. Incomplete denaturation can result in lack of signal and over denaturation can also result in non-specific binding.

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. The interpretation of FISH results should be made in conjunction with proper controls, applying cytogenetic analytical skills and within the context of the patient's medical history and other clinical findings.
6. We recommend that the FISH probes must be used in accordance with the product label.

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.

References

- Collins C., Lin Kuo W., Segreaves R., Fuscoe J. Pinkel P. and Gray J.W. (1991). Construction and characterisation of plasmid libraries enriched in sequences from single human chromosomes. *Genomics* **11**: 997-1006.
- Evans J.W., Chang J.A., Giaccia A.J., Pinkel D. & Brown J.M. (1991). The use of fluorescence *in situ* hybridization combined with premature chromosome condensation for the identification of chromosome damage. *Brit. J. Cancer* **63**: 517 - 521.

- Leedham P., Lawrie M., Randhawa H., Gould C., Viegas-Pequignot E., Armstrong S. & Hulten M. (1996). Improved prenatal diagnosis by FISH Multiprobe and immunocytochemistry using a monoclonal antibody against 5-methylcytosine. *Eur. J. Hum. Genet.* **4**: Suppl 1.35
- Maher E.J., Larin Z., Smith S., Cardy D.L.N. & Southern E.M. (1995). Fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) of twenty four different chromosome specific paints on a single microscope slide. In The Association of Clinical Cytogeneticists Abstract booklet.
- Pinkel D., Landegent J., Collins C., Fuscoe J., Segraves R., Lucas J. & Gray J. (1988). Fluorescence *in situ* hybridization with human chromosome-specific libraries: Detection of trisomy 21 and translocations of chromosome 4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 9138-9142.
- Price C. M. (1993). Fluorescence *in situ* hybridisation (review). *Blood Reviews* **7**: 127-134
- Trask B. J. (1991) Fluorescence *in situ* hybridization: applications in cytogenetics and gene mapping. *Trends in Genetics* **7**: 149-154.

Symbol Legend

REF	Catalogue Number		Consult Instructions For Use (IFU)
CONT	Contents	LOT	Lot Number
	Manufacturer		Use By (Expiry Date)
	Contains sufficient for <n> tests		Temperature Limitation (Storage Temperature; upper and lower limits)
IVD	<i>In Vitro</i> Diagnostic Medical Device		

Patents and Trademarks

Chromoprobe, Cytocell and Chromoprobe Multiprobe are registered trademarks of Cytocell Technologies 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.

FRANÇAIS

Table des matières

Introduction	18
Conditionnement	19
Avertissements et Précautions	19
Conservation et Manipulation	19
Autres produits disponibles	19
Matériel nécessaire non fourni	20
Microscope et Filtres	20
Préparation des échantillons	21
Protocole Chromoprobe Multiprobe	21
Préparation de la lame échantillon	21
Préparation du dispositif OctoChrome et de la lame échantillon	23
Positionnement de la lame échantillon sur le dispositif OctoChrome	23
Instructions pour l'utilisation du Cytocell Slide Surface Thermometer	24
Dénaturation	24
Hybridation	25
Lavages stringents de post hybridation	25
Montage et visualisation	25
Contre-coloration avec le PI ou le DAPI	26
Élimination du PI et seconde coloration avec le DAPI	26
Stabilité des lames	26
Recommandations	27
Interprétation des résultats	27
Caractéristiques des sondes	28
Bibliographie	28

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 Coumarin). Les sondes sont réversiblement coatées 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.

3, 15 et 17	8, 12 et 21	1, 16 et 19	2, 13 et 20
9, 11 et 22	4, 14 et 18	5, 10 et 7	X, 6 et Y

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 coatés 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, Sulphate de Dextran, SSC
- 500 µl Contre-colorant : PI (ES : 0,125 µg/ml PI/Antifade (iodure de propidium))
- 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

Avvertissements 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.

Autres produits disponibles

- Tampon 5 x ST Réf. PCA 004
- Tampon 20 x SSC Réf. PCA 003
- Plaque chauffante Cytocell Réf. PCN 001
- Ensemble de filtres pour fluorescence disponible sur demande.

Matériel nécessaire non fourni

Équipement

- 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 (Voir la section Microscopes et Filtres)
- 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

Solutions

- a) **Fixateur de Carnoy**
3:1 méthanol : acide acétique glacial
- b) **Série de bains éthanol**
Éthanol à 70%, 85%, 100% (absolu)
- c) **Solution stock 20 x SSC**
175,3 g chlorure de sodium, 88,2 g citrate de sodium par litre ajusté à pH 7,0 avec du HCl concentré. (4 x SSC; diluer la solution stock au 1:5) (2 x SSC; diluer la solution stock au 1:10). Les solutions stock peuvent être conservées à 4°C pendant un an.
- d) **Tampon ST (1X)**
4 x SSC plus 0,05% (v/v) Tween 20
- d) **0,4 x SSC**
Mélanger 2 ml de solution 20 x SSC avec 98 ml d'eau distillée.
- e) **2 x SSC, 0,05% Tween**
Mélanger 10 ml de solution 20 x SSC avec 90 ml d'eau distillée, ajouter 50 µl de Tween 20
- f) **100% Méthanol**

Microscope et Filtres

Afin d'assurer des résultats optimaux lors de l'utilisation de ce produit, il est important que le microscope soit réglé de la manière suivante :

Réglage général du microscope	
Ampoule à mercure 100 Watt	Objectif plan apochromatique.x 60

Fluorochrome et contre-colorant

Caractéristiques des filtres	Vert	Rouge	Bleu avec DAPI	Bleu avec PI	DAPI	PI
Triple filtre DAPI/FITC/Texas Red	v	v	v	v	v	v
Filtre simple bande FITC	v					
Filtre simple bande Texas Red		v				v
Filtre simple bande Aqua			v	v		

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. (Voir la section Solutions ci-dessus).

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. Etablir 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.

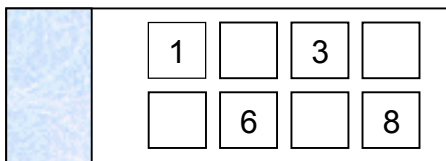
Remarque : un volume minimum de 50 µl est nécessaire pour effectuer un test avec un dispositif OctoChrome.

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 (Figure 1).
- 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.

Pour aider à localiser la case 1 (chromosomes 3, 15 et 17), sa position sur le dispositif a été marquée en orange.

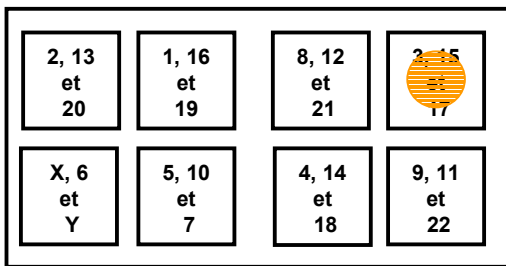


Figure 1. localisation des sondes de peinture chromosomiques sur le dispositif OctoChrome.

- 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.

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.

Eviter de traiter plus de 2 lames OctoChrome à la fois lors de l'étape de lavages stringents.

8. Montage et visualisation

La lame peut être soit contre-colorée avec du PI ou avec du DAPI. Le PI permettra la visualisation simultanée des 3 fluorochromes lorsque le triple filtre recommandé est utilisé. La distinction entre le PI et le fluorochrome rouge ne sera pas optimale avec le triple filtre ou le filtre simple bande Texas Red. La capture d'analyse d'image de chaque fluorochrome avec le filtre simple bande spécifique (voir la section

Microscope et filtres) est possible, bien que le PI puisse interférer avec le canal Texas Red.

Lorsque le DAPI est utilisé comme contre-colorant, le fluorochrome bleu peut apparaître perdu avec le triple filtre (ceci est dû au fait que le DAPI peut « masquer » le fluorophore bleu), alors que les signaux verts et rouges seront toujours visibles. Une analyse à l'œil nu et une capture d'image sont possibles avec les filtres simple bande appropriés. L'avantage d'utiliser le DAPI à la place du PI est que le banding est supérieur et il permettra l'inversion du G banding lorsqu'un système d'analyse d'image est utilisé.

Autrement la lame peut être colorée en premier avec le PI et ensuite décolorée et colorée de nouveau avec le DAPI. Cependant, veuillez noter qu'il est plus difficile d'éliminer le contre-colorant DAPI, par conséquent, la coloration initiale doit être le PI.

i. Contre-coloration avec le PI et le DAPI

1. Appliquer 20 µl de DAPI ou de PI 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.

ii. Elimination du PI et nouvelle coloration avec le DAPI

1. Laver la lame dans du tampon 1 x ST pendant 5 minutes.
2. Répéter ce lavage 4 fois.
3. Appliquer 20µl de DAPI à chaque extrémité de la lame et couvrir avec une grande lamelle (24 x 50 mm)
4. Sécher la lame avec un papier absorbant.
5. Laisser la coloration se développer dans l'obscurité pendant 10 minutes avant visualisation.

iii. 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 le moins possible à la lumière lors des différentes étapes du protocole; cependant, il n'est pas nécessaire de travailler dans l'obscurité.

Stabilité des lames

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

Recommandations

1. Cuire ou vieillir les lames n'est pas recommandé, ceci pouvant réduire l'intensité du signal.
2. Les conditions d'hybridation peuvent être affectées par l'utilisation de réactifs différents de ceux fournis ou recommandés par Cytocell Technologies Ltd.
3. La non-observation des protocoles pour la préparation des lames, dénaturation et hybridation peut engendrer de mauvais résultats.
4. 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.
5. 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.
6. Une dénaturation incomplète peut engendrer une perte de signal et une trop forte dénaturation une liaison non-spécifique.

Interprétation des résultats

1. 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 dans les chromosomes des groupes D et G, par conséquent, des hybridations croisées peuvent être observées dans ces régions.
2. La sonde de peinture chromosomique du chromosome 16 peut présenter une faible hybridation croisée avec les régions hétérochromatiques du chromosome Y.
3. 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.
4. Les chromosomes 1, 5 et 19 possèdent des séquences ADN centromériques communes. Par conséquent, des hybridations croisées peuvent être observées dans ces régions.
5. L'interprétation des résultats de FISH doit être effectuée en complémentarité avec des contrôles appropriés, en appliquant de bonnes pratiques de cytogénétique et en tenant compte du contexte médical du patient et des données cliniques.
6. Nous recommandons que les sondes FISH soient utilisées en accord avec l'étiquetage du produit.

Support Client

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

Caractéristiques des sondes

Case de l'OctoChrome	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 « Interprétation des résultats » pour plus d'information.

Bibliographie

- Collins C., Lin Kuo W., Segraves R., Fuscoe J. Pinkel P. and Gray J.W. (1991). Construction and characterisation of plasmid libraries enriched in sequences from single human chromosomes. *Genomics* **11**: 997-1006.
- Evans J.W., Chang J.A., Giaccia A.J., Pinkel D. & Brown J.M. (1991). The use of fluorescence *in situ* hybridization combined with premature chromosome condensation for the identification of chromosome damage. *Brit. J. Cancer* **63**: 517 - 521.

- Leedham P., Lawrie M., Randhawa H., Gould C., Viegas-Pequignot E., Armstrong S. & Hulten M. (1996). Improved prenatal diagnosis by FISH Multiprobe and immunocytochemistry using a monoclonal antibody against 5-methylcytosine. *Eur. J. Hum. Genet.* 4: Suppl 1.35
- Maher E.J., Larin Z., Smith S., Cardy D.L.N. & Southern E.M. (1995). Fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) of twenty four different chromosome specific paints on a single microscope slide. In The Association of Clinical Cytogeneticists Abstract booklet.
- Pinkel D., Landegent J., Collins C., Fuscoe J., Segraves R., Lucas J. & Gray J. (1988). Fluorescence *in situ* hybridization with human chromosome-specific libraries: Detection of trisomy 21 and translocations of chromosome 4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 9138-9142.
- Price C. M. (1993). Fluorescence *in situ* hybridisation (review). *Blood Reviews* 7: 127-134
- Trask B. J. (1991) Fluorescence *in situ* hybridization: applications in cytogenetics and gene mapping. *Trends in Genetics* 7: 149-154.

Légende des symboles

REF	Numéro de catalogue		Consulter la notice d'utilisation
CONT	Contenu	LOT	Numéro de lot
	Fabriquant		Date de péremption
	Nombre de tests		Limites de température (Températures de conservation; limites supérieure et inférieure)
IVD	Dispositif Médical de diagnostic <i>in vitro</i>		

Brevets et Marques déposées

Chromoprobe, Cytocell et Chromoprobe Multiprobe sont des marques déposées de Cytocell Technologies Ltd.

Le principe du Chromoprobe est couvert par des brevets internationaux WO9314223, EP0623177. Le design du dispositif Multiprobe est un design déposé, No. 2050801 et est aussi couvert par un brevet de design No. 420,745.

Toute cyanine utilisée dans ce produit est fabriquée au nom d'Amersham Pharmacia Biotech Inc. sous une licence exclusive de l'université de Carnegie Mellon et est couverte par un brevet américain No. 5 268 486 et d'autres brevets en attente. Le composé dans ce produit est fabriqué par NEN Life Science Products, Inc. sous les brevets américains No. 5 047 519 et 5 151 507. L'utilisation du produit à des fins commerciales est strictement interdite sans permission écrite de la part d'Amersham Pharmacia Biotech Inc et NEN Life Sciences Products Inc.

ITALIANO

Sommario

Introduzione	32
Materiale fornito	33
Avvertenze e misure precauzionali	33
Conservazione e utilizzo	33
Prodotti accessori	33
Materiali necessari non forniti	34
Configurazione ottimale del microscopio e dei filtri	34
Preparazione del campione	35
Protocollo Chromoprobe Multiprobe	35
Preparazione del vetrino	35
Preparazione del dispositivo OctoChrome e del vetrino campione	37
Posizionamento del vetrino sul dispositivo OctoChrome	37
Istruzioni per l'uso del Cytocell slide surface thermometer	38
Denaturazione	38
Ibridazione	38
Lavaggi stringenti post-ibridazione	39
Preparazione del vetrino per la visualizzazione dei risultati	39
Colorazione con PI o DAPI	40
Rimozione di PI e nuova colorazione con DAPI	40
Stabilità dei vetrini finiti	40
Raccomandazioni per l'uso	40
Risultati attesi	41
Specifiche delle sonde	42
Bibliografia	42

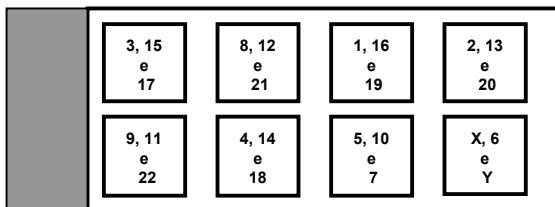
Introduzione

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.

OctoChrome 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 cumarina). 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 Vetrini stampati con un reticolo speciale
- 500 µl Hybridisation Solution A (Soluzione di ibridazione): Formamide, Destrano solfato, SSC
- 500 µl Soluzione del colorante di contrasto : PI (ES: 0,125 µl PI (ioduro di propidio)), Antifade
- 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

1. Per uso diagnostico in vitro. Per uso professionale.
2. Quando si manipolano le sonde ed il colorante di contrasto DAPI è necessario indossare i guanti.
3. 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.
4. Il DAPI ed il PI sono sostanze potenzialmente cancerogene. Maneggiare con cura, indossare i guanti ed un camice da laboratorio. Per lo smaltimento, lavare con grandi quantità di acqua.
5. 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.

Prodotti accessori

- Tampone ST 5x – 100 ml N. cat. PCA 004
- Tampone SSC 20x N. cat. PCA 003
- Cytocell Hotplate N. cat. PCA 001
- Su richiesta sono disponibili set di filtri per fluorescenza Cytocell.

Materiali necessari non forniti

Apparecchiature

- a) Piastra riscaldante con controllo accurato della temperatura fino a 80°C
- b) Incubatore a 37°C
- c) Micropipette a volume variabile compreso tra 1 µl e 200 µl
- d) Bagno termostato a 37°C (senza agitatore)
- e) Provette da microcentrifuga (0,5 ml)
- f) Bagno termostato con controllo accurato della temperatura a 72°C
- g) Microscopio a fluorescenza (Vedere Configurazione ottimale del microscopio e dei filtri)
- h) Contenitori di Coplin in plastica o vetro
- i) Centrifuga da banco
- j) Pinzette
- k) Olio per lenti ad immersione del microscopio a fluorescenza
- l) Vetrini coprioggetto (24 x 50 mm) per fluorescenza

Soluzioni

- a) **Fissativo di Carnoy**
3 : 1 metanolo: acido acetico glaciale
- b) **Diluizioni di etanolo**
etanolo al 70%, 85%, 100% (assoluto)
- c) **Soluzione madre di SSC 20x**
175,3 g cloruro di sodio, 88,2 g citrato di sodio per litro di soluzione; portare il pH a 7,0 con HCl concentrato. (SSC 4x: diluire la soluzione madre 1:5) (SSC 2x: diluire la soluzione madre 1:10). Questa soluzione può essere conservata fino ad un anno a 4°C.
- d) **Tampone ST (1x)**
SSC 4x più Tween 20 0,05% (v/v)
- e) **SSC 0,4x**
Miscelare 2 ml di SSC 20x con 98 ml di acqua distillata.
- f) **SSC 2x, Tween 20 0,05%**
Miscelare 10 ml di SSC 20x con 90 ml di acqua distillata, aggiungere 50 µl di Tween 20.
- g) **Metanolo 100%**

Configurazione ottimale del microscopio e dei filtri

Per assicurare risultati ottimali con questo prodotto è essenziale che il microscopio utilizzato sia impostato come segue:

Configurazione generale del microscopio	
Lampada al mercurio da 100 Watt	Obiettivi Plan-Apochromat 100x e 60x

Fluoroforo o colorante di contrasto visibile

Specifiche del filtro	Verde	Rosso	Blu con DAPI	Blu con PI	DAPI	PI
Filtro triplo DAPI/FITC/Texas Red	v	v	v	v	v	v
Filtro FITC a singola banda	v					
Filtro a singola banda Texas Red		v				v
Filtro a singola banda Aqua			v	v		

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. (Vedere anche la sezione Soluzioni, riportata in precedenza). 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

i. Pulire il vetrino

Immergere il vetrino per 2 minuti in metanolo 100% ed asciugare con un tessuto pulito e soffice.

ii. 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 surnatante, 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 μ l 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.

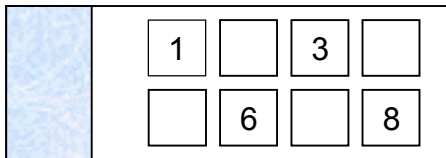
Nota: 50 μ l è il volume minimo richiesto per il protocollo del dispositivo OctoChrome.

iii. 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 4 μ l 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 μ l 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 OctoChrome e del vetrino portaoggetto

- i. 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).
- ii. Miscelare la soluzione di ibridazione pipettando ripetutamente e pre-riscaldare a 37°C un'aliquota da 25 µl per il dispositivo OctoChrome. Pre-riscaldare, inoltre, ogni dispositivo OctoChrome a 37°C ponendo il dispositivo stesso **con l'etichetta rivolta verso il basso**.
Evitare di toccare le superfici sporgenti del dispositivo OctoChrome.
- iii. Lavare i vetrini contenenti i campioni fissati in SSC 2x per 2 minuti a temperatura ambiente (20-25°C).
- iv. Mentre il dispositivo OctoChrome 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.
- v. Aggiungere con una micropipetta, 2 µl di soluzione di ibridazione pre-riscaldata ad ognuna delle otto aree presenti sul dispositivo OctoChrome precedentemente riscaldato, mentre questo è ancora a 37°C.

3. Posizionamento del vetrino sul dispositivo OctoChrome.

- i. Capovolgere con cura il vetrino sul dispositivo OctoChrome in modo che il numero 1 si trovi sull'area in alto a destra dell'OctoChrome (Figura 1).

Per facilitare la localizzazione del quadrato 1 (cromosomi 3, 15 e 17), la sua posizione sul dispositivo è stata marcata in arancione.

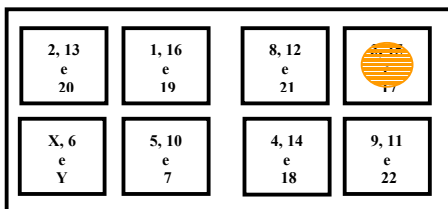


Figura 1. Localizzazione delle sonde painting l'intero cromosoma sui quadrati del dispositivo OctoChrome.

- ii. Accertarsi che il vetrino sia accuratamente allineato con le aree corrispondenti sul dispositivo OctoChrome. Adagiare con cura il vetrino sul dispositivo OctoChrome, applicare una pressione leggera ed uniforme in modo che la soluzione di ibridazione si diffonda fino al margine delle aree sopraelevate del dispositivo OctoChrome.
- iii. Sollevare con cura il dispositivo vetrino/Multiprobe e capovolgerlo 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.

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 smettano 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 OctoChrome.

5. Denaturazione

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

Trasferire il vetrino/OctoChrome 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/OctoChrome 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

- i. Preparazione delle soluzioni utilizzate nel corso dei lavaggi stringenti
 1. 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).
 2. Soluzione 2: Preparare un contenitore di Coplin/Hellendahl contenente SSC 2x e Tween 20 0,05%. Lasciarlo a temperatura ambiente.

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

- ii. Fasi del lavaggio stringente
 1. Allontanare con cura il dispositivo OctoChrome dal vetrino dei campioni ed immergere il vetrino nella Soluzione 1 per 2 minuti. (Il dispositivo OctoChrome non può essere riutilizzato)
 2. Immergere il vetrino nella soluzione 2 per 30 secondi.

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

8. Preparazione del vetrino per la visualizzazione dei risultati

Il vetrino può essere sottoposto a colorazione di contrasto con DAPI o PI. Utilizzando il filtro triplo o il filtro Texas Red non è possibile distinguere in modo ottimale il PI dal fluoroforo rosso. È possibile catturare l'analisi dell'immagine con ogni fluoroforo utilizzando i filtri singoli specifici (vedere il paragrafo Configurazione ottimale del microscopio), anche se il PI può interferire con il canale del Texas Red.

Con il filtro triplo, utilizzando il DAPI come colorante di contrasto, il segnale del fluoroforo blu può sembrare perso (in quanto il DAPI può mascherare il fluoroforo blu), mentre i segnali verde e rosso restano visibili.

Utilizzando i filtri singoli appropriati, sono possibili l'analisi ottica e la cattura dell'immagine. Il vantaggio di utilizzare il DAPI rispetto al PI, consiste nel fatto che il bandeggio risulta superiore e che utilizzando un sistema di analisi dell'immagine, è possibile effettuare l'inversione verso il bandeggio G.

Alternativamente, il vetrino può essere colorato prima con PI e successivamente decolorato e ricolorato in DAPI. Si noti, tuttavia, che è più difficile rimuovere il colorante di contrasto DAPI per cui il primo colorante dovrebbe sempre essere il PI.

i. Colorazione con PI o DAPI

1. Applicare 20 µl di DAPI o PI 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.

ii. Rimozione di PI e nuova colorazione con DAPI

1. Lavare il vetrino in ST 1x per 5 minuti.
2. Ripetere l'operazione effettuando 4 lavaggi.
3. Applicare 20 µl di DAPI ad entrambe le estremità del vetrino e coprire con un coprioggetto (24 x 50 mm)
4. Tamponare il vetrino con carta da filtro.
5. Lasciare al buio per 10 minuti prima di procedere alla visualizzazione per mezzo di un microscopio a fluorescenza.

iii. 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. 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.
2. Le condizioni di ibridazione possono essere influenzate negativamente dall'utilizzo di reagenti diversi da quelli forniti o raccomandati da Cytocell Technologies Ltd.
3. Il mancato rispetto di tutte le procedure relative alla preparazione del vetrino, alla denaturazione ed alla ibridazione, può portare a risultati non accettabili o errati.
4. Si raccomanda fortemente l'utilizzo di un termometro calibrato per misurare la temperatura delle soluzioni, del bagno termostato e degli incubatori in quanto critiche per il funzionamento ottimale del prodotto.

5. 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.
6. La denaturazione incompleta può provocare la perdita del segnale, mentre una denaturazione prolungata può facilitare un legame aspecifico.

Risultati attesi

1. La sonda painting specifica per l'intero cromosoma 1 può indurre una debole cross ibridazione con le regioni centromeriche dei cromosomi 5 e 19.
2. La sonda painting specifica per l'intero cromosoma 5 può indurre una debole ibridazione con le regioni centromeriche dei cromosomi 1 e 19.
3. La sonda painting specifica per l'intero cromosoma 13 può indurre una debole cross ibridazione con i bracci p dei cromosomi acrocentrici.
4. La sonda painting specifica per l'intero cromosoma 14 può indurre una debole cross ibridazione con i bracci p dei cromosomi acrocentrici.
5. La sonda painting specifica per l'intero cromosoma 19 può indurre una debole cross ibridazione con le regioni centromeriche dei cromosomi 1 e 5.
6. La sonda painting specifica per l'intero cromosoma 21 può indurre una debole cross ibridazione con i bracci p dei cromosomi acrocentrici.
7. La sonda painting specifica per l'intero cromosoma 22 può indurre una debole cross ibridazione con i bracci p dei cromosomi acrocentrici.
8. La sonda painting specifica per l'intero cromosoma Y può indurre un cross ibridazione con il cromosoma X, in prossimità delle regioni pericentromeriche, dell'estremità del braccio p e delle regioni interstiziali del braccio q.
9. L'interpretazione dei risultati FISH deve essere effettuata parallelamente ai controlli adeguati, applicando le conoscenze analitiche derivanti dalla citogenetica e nell'ambito del contesto della storia medica del paziente e delle altre conclusioni cliniche.
10. Si raccomanda di utilizzare le sonde FISH in accordo con quanto riportato sull'etichetta del prodotto.

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	blu
	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”.

Bibliografia

- Collins C., Lin Kuo W., Segaves R., Fuscoe J. Pinkel P. and Gray J.W. (1991). Construction and characterisation of plasmid libraries enriched in sequences from single human chromosomes. *Genomics* **11**: 997-1006.
- Evans J.W., Chang J.A., Giaccia A.J., Pinkel D. & Brown J.M. (1991). The use of fluorescence *in situ* hybridization combined with premature chromosome condensation for the identification of chromosome damage. *Brit. J. Cancer* **63**: 517 - 521.

- Leedham P., Lawrie M., Randhawa H., Gould C., Viegas-Pequignot E., Armstrong S. & Hulten M. (1996). Improved prenatal diagnosis by FISH Multiprobe and immunocytochemistry using a monoclonal antibody against 5-methylcytosine. *Eur. J. Hum. Genet.* **4**: Suppl 1.35
- Maher E.J., Larin Z., Smith S., Cardy D.L.N. & Southern E.M. (1995). Fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) of twenty four different chromosome specific paints on a single microscope slide. In The Association of Clinical Cytogeneticists Abstract booklet.
- Pinkel D., Landegent J., Collins C., Fuscoe J., Seagraves R., Lucas J. & Gray J. (1988). Fluorescence *in situ* hybridization with human chromosome-specific libraries: Detection of trisomy 21 and translocations of chromosome 4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 9138-9142.
- Price C. M. (1993). Fluorescence *in situ* hybridisation (review). *Blood Reviews* **7**: 127-134
- Trask B. J. (1991) Fluorescence *in situ* hybridization: applications in cytogenetics and gene mapping. *Trends in Genetics* **7**: 149-154.

Legenda dei simboli

REF	Numero di catalogo		Consultare le istruzioni per l'uso (Instructions For Use - IFU)
CONT	Sommario	LOT	Numero di lotto
	Produttore		Utilizzare entro (data di scadenza)
	Contiene una quantità sufficiente per <n> test		Intervallo di temperatura consigliato (temperatura di conservazione, limite superiore ed inferiore)
WD	Dispositivo per la diagnostica medica <i>in Vitro</i>		

Brevetti e marchi commerciali

Chromoprobe, Cytocell e Chromoprobe Multiprobe sono marchi commerciali registrati di Cytocell Technologies Ltd.

Il principio Chromoprobe è coperto dal brevetto internazionale WO9314223, EP0623177. Il design Multiprobe è registrato ed è coperto dal brevetto N.420,745.

Tutte le cianine utilizzate in questo prodotto sono prodotte per conto di Amersham Pharmacia Biotech Inc con licenza esclusiva da parte della Carnegie Mellon University e sono coperte da brevetto US Numero 5 268 486 e da altri prossimi brevetti. Il composto in questo prodotto è fabbricato da NEN Life Science Products, Inc. sotto i brevetti US Numero 5 047 519 e 5 151 507. L'utilizzo del prodotto per scopi commerciali è strettamente proibito in assenza di un permesso scritto da parte di Amersham Pharmacia Biotech Inc. e NEN Life Science Products, Inc.

DEUTSCH

Inhalt

Einleitung	46
Kitkomponenten	47
Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen	47
Lagerung und Behandlung	47
Hilfsprodukte	47
Benötigte, aber nicht mitgelieferte Materialien	48
Optimale Einstellung für Mikroskop und Filter	48
Probenvorbereitung	49
Chromoprobe Multiprobe Protokoll	49
Vorbereitung des Objektträgers	49
Vorbereitung des OctoChrome-Systems und des Matrizen-Objektträgers	51
Positionierung der Matrize über dem OctoChrome-System	51
Anweisungen zur Verwendung des Cytocell Objektträgeroberflächen Thermometers	52
Denaturierung	53
Hybridisierung	53
Stringentes Waschen nach der Hybridisierung	53
Eindecken und Ablesen der Ergebnisse	54
Gegenfärbung mit PI oder DAPI	54
Entfernen von PI und nochmalige Färbung mit DAPI	54
Stabilität der fertigen Objektträger	55
Empfehlungen zur Durchführung	55
Erwartete Ergebnisse	55
Sondenspezifikationen	57
Literatur	57

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 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 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 Chromoprobe Multiprobe® Systems mit der Mehrfarbenmarkierung 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 (Cumarin-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, stringente Waschschritten weiter vereinfacht. Die direkt markierten Painting-Sonden machen lange Amplifizierungsschritte unnötig.

3, 15 und 17	8, 12 und 21	1, 16 und 19	2, 13 und 20
9, 11 und 22	4, 14 und 18	5, 10 und 7	X, 6 und Y

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 Chromoprobe 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: PI (ES: 0,125 µl PI (Propidium-Iodid)), Antifade
- 500 µl Gegenfärbungslösung: DAPI (ES: 0.125 µl DAPI (4,6-Diamidino-2-Phenylindol)), Antifade
- 1 Cytocell Slide Surface Thermometer
- 1 Cytocell Chromoprobe 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 und PI sind potentielle Karzinogene. 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 Chromoprobe 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.

Hilfsprodukte

- 5 x ST-Puffer - 100 ml Katalognr. PCA 004
- 20 x SSC-Puffer Katalognr. PCA 003
- Cytocell Heizplatte Katalognr. PCA 001
- Fluoreszenzfiltersets sind von Cytocell auf Anfrage erhältlich.

Benötigte, aber nicht mitgelieferte Materialien

Labogeräte

- 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 (siehe auch „Optimale Einstellung von Mikroskop und Filter“)
- h) Coplin-Färbetrog aus Kunststoff oder Glas
- i) Zentrifuge
- j) Pinzette
- k) Für Fluoreszenzobjektive geeignetes Immersionsöl
- l) Für Fluoreszenzobjektive geeignete Glasdeckplättchen (24 x 50mm)

Lösungen

- a) **Carnoy's Fixativ**
3:1 Methanol: Eisessig
- b) **Alkoholreihe**
70%, 85%, 100% (absolutes) Ethanol
- c) **20 x SSC-Stocklösung**
175,3 g Natriumchlorid, 88,2 g Natriumcitrat pro Liter, mit konz. HCl auf pH 7,0 bringen. (4 x SSC: Stocklösung 1:5 verdünnen)(2 x SSC: Stocklösung 1:10 verdünnen). Die Lösung kann bei 4°C bis zu einem Jahr gelagert werden.
- d) **ST-Puffer (1x)**
4 x SSC plus 0,05% (v/v) Tween 20
- e) **0,4 x SSC**
2 ml 20 x SSC mit 98 ml Aqua dest. mischen.
- f) **2 x SSC, 0,05% Tween 20**
10ml 20 x SSC mit 90 ml Aqua dest. mischen, 50 µl Tween 20 zugeben
- g) **Methanol 100%**

Optimale Einstellung für Mikroskop und Filter

Zur Gewährleistung von optimalen Ergebnissen mit diesem Produkt ist es ausschlaggebend, dass das verwendete Mikroskop folgendermaßen aufgebaut wird:

Allgemeine Mikroskopanordnung	
100 Watt Quecksilberdampfampe	100x; 60x Plan-Achromat Objektive

Sichtbares Fluorophor oder Gegenfärbung

Filter-spezifikationen	Grün	Rot	Blau mit DAPI	Blau mit API	DAPI	PI
DAPI/FITC/ Texasrot Dreifach-Filter	v	v	v	v	v	v
FITC (enger Bandpass) Einfach- Bandpassfilter	v					
Texasrot Einfach- Bandpassfilter		v				v
Aqua Einfach- Bandpassfilter			v	v		

Probenvorbereitung

Das Chromoprobe 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. (Siehe auch oben, Lösungen)

Bereiten Sie Metaphasen-Spreitungspräparate auf Cytocell Chromoprobe 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.

Chromoprobe 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, dass 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 auftropfen 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 Zellprobe geändert hat, 4 µl des Probenkonzentrats auf ein anderes Feld Ihres Testobjektträgers auftropfen und unter dem Phasenkontrastmikroskop untersuchen.

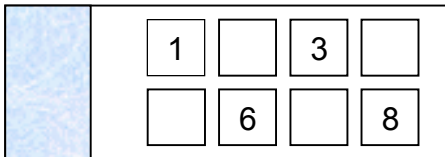
Bitte beachten Sie: 50 µl ist die Mindestmenge, die für das OctoChrome-System-Protokoll erforderlich ist.

iii. Qualitätskontrolle der Proben

Die Proben sollten auf Zytoplasma 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 Zytoplasmas 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 Zytoplasma effektiv 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 auftropfen. 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 trocknen lassen, bevor zum nächsten übergegangen wird.

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

- i. Sicherstellen, dass sich die Chromoprobe 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
Die erhöhten Felder des OctoChrome-Systems nicht berühren.
- iii. Die Matrizenobjektträger, die die fixierten Proben enthalten, für 2 Minuten in 2 x SSC bei Zimmertemperatur (20-25°C) waschen.
- 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), trocknen 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 (Abbildung 1).

Um das Auffinden des Feldes 1 (Chromosomen 3, 15 und 17) zu vereinfachen, ist seine Lage auf dem System orange markiert.

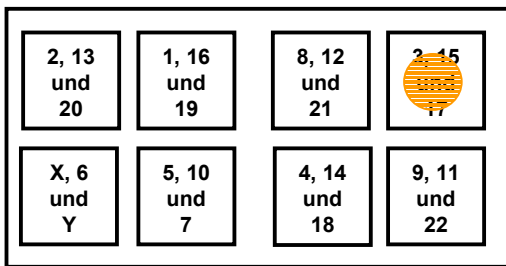


Abbildung 1. Lage der Painting-Sonden für gesamte Chromosomen auf den Feldern des OctoChrome-Systems.

- 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 aufliegen 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.
- 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 blassgrüne/goldene Farbe angezeigt. Wenn die Segmente

körnig aussehen und die Farben nicht mehr gleichmäßig und ordentlich erscheinen, sollte das Thermometer weggeworfen werden, weil es verbraucht ist. Die Lebensspanne jedes Thermometers sollte jedoch leicht für ein Kit mit zehn 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

- i. Vorbereitung der stringenten Waschlösungen
 1. Lösung 1: Einen Coplin/Hellendahl-Trog 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.
 2. Lösung 2: Einen Coplin/Hellendahl-Trog 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.

- ii. Stringente Waschschritte
 1. 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).
 2. 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

Der Objektträger kann entweder in PI oder DAPI gegengefärbt werden. Unter Verwendung des empfohlenen Dreifach-Filters gestattet PI die gleichzeitige Beobachtung der drei Fluorophore. Die Unterscheidung von PI vom roten Fluorophor ist mit dem Dreifach-Filter oder dem Texasrot Einfach-Filter nicht optimal. Die Erfassung mittels Bildanalyse eines jeden Fluorophors mit den spezifischen einzelnen Filtern (siehe Optimale Mikroskopeinstellung) ist möglich, obwohl das PI mit dem Texasrot-Kanal interferieren könnte.

Mit DAPI als Gegenfärbung kann es bei Verwendung des Dreifachfilters so aussehen, als ob das blaue Fluorophor verschwunden wäre, (weil das DAPI das blaue Fluorophor verdecken kann), obwohl die grünen und roten Signale noch sichtbar sind. Eine visuelle Analyse und eine Bilderfassung sind mit den geeigneten Einzelfiltern möglich. Der Vorteil der Verwendung von DAPI gegenüber PI ist, dass die Bänderung besser ist und bei Verwendung eines Bildanalyseystems eine Inversion zur G Bänderung gestattet.

Als Alternative kann der Objektträger zuerst mit PI gefärbt und später entfärbt und mit DAPI noch einmal gefärbt werden. Beachten Sie jedoch bitte, dass die Entfernung der DAPI-Gegenfärbung schwieriger ist, daher sollte die anfängliche Färbung PI sein.

- i. Gegenfärbung mit PI oder DAPI
 1. 20 µl DAPI oder PI auf jedes Ende des Objektträgers auftragen und ein Deckgläschen (24 x 50 mm²) auflegen.
 2. Den Objektträger mit Filterpapier oder einem Tuch abtupfen.
 3. Vor dem Betrachten mit dem Fluoreszenzmikroskop für 10 Minuten im Dunkeln lassen.
- ii. Entfernung von PI und nochmalige Färbung mit DAPI
 1. Objektträger 5 Minuten lang in 1 x ST waschen.
 2. Wiederholen und insgesamt vier Wäschen durchführen.
 3. 20 µl DAPI auf jedes Ende des Objektträgers auftragen und ein großes Deckgläschen (24 x 50 mm²) auflegen.
 4. Den Objektträger mit Filterpapier abtupfen.

5. Vor dem Betrachten mit dem Fluoreszenzmikroskop für 10 Minuten im Dunkeln lassen.
- iii. 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 Lichtmengen ausgesetzt werden. Es ist jedoch nicht notwendig, im Dunkeln zu arbeiten.

Stabilität der fertigen Objektträger

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

Empfehlungen zur Durchführung

1. Erhitzen oder Altern der Objektträger wird nicht empfohlen da dies zu einer Verminderung der Signalfluoreszenz führen kann.
2. Durch die Verwendung anderer als der von Cytocell Technologies Ltd. gelieferten oder empfohlenen Reagenzien können die Hybridisierungsbedingungen negativ beeinflusst werden.
3. Wenn beim Präparieren der Objektträger, der Denaturierung und der Hybridisierung nicht alle angegebenen Schritte genau befolgt werden, können inkonsistente oder fehlerhafte Ergebnisse resultieren.
4. 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.
5. 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.
6. Eine unvollständige Denaturierung kann zu Signalverlust, eine zu starke Denaturierung dagegen auch zu nicht-spezifischer Bindung führen.

Erwartete Ergebnisse

1. Die Chromosom 1 Painting-Sonde für gesamte Chromosomen kann mit der Zentromerregionen der Chromosomen 5 und 19 eine schwache Kreuzhybridisierung zeigen.
2. Die Chromosom 5 Painting-Sonde für gesamte Chromosomen kann mit der Zentromerregionen der Chromosomen 1 und 19 eine schwache Kreuzhybridisierung zeigen.

3. Die Chromosom 13 Painting-Sonde für gesamte Chromosomen kann mit den p-Armen der akrozentrischen Chromosomen eine Kreuzhybridisierung zeigen.
4. Die Chromosom 14 Painting-Sonde für gesamte Chromosomen kann mit den p-Armen der akrozentrischen Chromosomen eine Kreuzhybridisierung zeigen.
5. Die Chromosom 19 Painting-Sonde für gesamte Chromosomen kann mit den Zentromerregionen der Chromosomen 1 und 5 eine Kreuzhybridisierung zeigen.
6. Die Chromosom 21 Painting-Sonde für gesamte Chromosomen kann mit den p-Armen der akrozentrischen Chromosomen eine Kreuzhybridisierung zeigen.
7. Die Chromosom 22 Painting-Sonde für gesamte Chromosomen kann mit den p-Armen der akrozentrischen Chromosomen eine Kreuzhybridisierung zeigen.
8. Die Chromosom Y Painting-Sonde für gesamte Chromosomen kann mit der Perizentromer-Region und dem Ende des p-Arms von Chromosom X und den interstitiellen Regionen des q-Arms von Chromosom X eine Kreuzhybridisierung aufweisen.
9. Die Interpretation der FISH-Ergebnisse sollte unter Anwendung anerkannter zytogenetischer Analysemethoden in Verbindung mit entsprechenden Kontrollen, erfolgen. Auch sollten die Anamnese des Patienten und andere klinische Befunde miteinbezogen werden.
10. Wir empfehlen, die FISH-Sonden entsprechend dem Produktetikett zu verwenden.

Kundendienst

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

Sondenspezifikationen

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“.






Literatur

- Collins C., Lin Kuo W., Segraves R., Fuscoe J. Pinkel P. and Gray J.W. (1991). Construction and characterisation of plasmid libraries enriched in sequences from single human chromosomes. *Genomics* **11**: 997-1006.
- Evans J.W., Chang J.A., Giaccia A.J., Pinkel D. & Brown J.M. (1991). The use of fluorescence *in situ* hybridization combined with premature chromosome condensation for the identification of chromosome damage. *Brit. J. Cancer* **63**: 517 - 521.
- Leedham P., Lawrie M., Randhawa H., Gould C., Viegas-Pequignot E., Armstrong S. & Hulten M. (1996). Improved prenatal diagnosis by FISH Multiprobe and

immunocytochemistry using a monoclonal antibody against 5-methylcytosine. *Eur. J. Hum. Genet.* **4**: Suppl 1.35

- Maher E.J., Larin Z., Smith S., Cardy D.L.N. & Southern E.M. (1995). Fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) of twenty four different chromosome specific paints on a single microscope slide. In The Association of Clinical Cytogeneticists Abstract booklet.
- Pinkel D., Landegent J., Collins C., Fuscoe J., Segraves R., Lucas J. & Gray J. (1988). Fluorescence *in situ* hybridization with human chromosome-specific libraries: Detection of trisomy 21 and translocations of chromosome 4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 9138-9142.
- Price C. M. (1993). Fluorescence *in situ* hybridisation (review). *Blood Reviews* **7**: 127-134
- Trask B. J. (1991) Fluorescence *in situ* hybridization: applications in cytogenetics and gene mapping. *Trends in Genetics* **7**: 149-154.

Erklärung der Symbole

REF	Katalog- Nummer		Beachten Sie die Packungsbeilage (IFU=Instruction for Use)
CONT	Inhalt	LOT	Lot-Nummer
	Hersteller		Verwenden bis (Verfallsdatum)
	Ausreichend für <n> Bestimmungen		Temperaturgrenzen (Lagertemperatur, Ober- und Untergrenze)
IVD	Medizinisches Gerät zur <i>in vitro</i> Diagnostik		

Patente und Handelsmarken

Chromoprobe, Cytocell und Chromoprobe Multiprobe sind eingetragene Handelsmarken von Cytocell Technologies Ltd.

Das Chromoprobe-Prinzip ist durch die internationalen Patente WO9314223 und EP0623177 abgedeckt. Das Design der Multiprobe ist ein eingetragenes Design und auch durch das Designpatent Nr. 420.745 geschützt.

In diesem Produkt verwendete Cyanin-Farbstoffe sind für Amersham Pharmacia Biotech Inc. unter einer Exklusivlizenz der Carnegie Mellon Universität hergestellt und durch US Patent Nummer 5 268 486 und andere angemeldete Patente geschützt. Die Komponente in diesem Produkt wird durch NEN Life Science Products unter den US Patenten 5 047 519 und 5 151 507 hergestellt. Die Verwendung des Produkts für kommerzielle Zwecke ist ohne schriftliche Erlaubnis von Amersham Pharmacia Biotech Inc. und NEN Life Science Products, Inc. strikt verboten.

ESPAÑOL

Contenido

Introducción	62
Material proporcionado	63
Avisos y precauciones	63
Almacenamiento y manejo	63
Productos suplementarios	63
Materiales necesarios pero no proporcionados	64
Configuración óptima del microscopio y los filtros	64
Preparación de la muestra	65
Protocolo de Chromoprobe Multiprobe	65
Preparación del portaobjetos	65
Preparación del dispositivo OctoChrome y el portaobjetos plantilla	67
Colocación del portaobjetos plantilla sobre el dispositivo OctoChrome	67
Instrucciones de uso del Cytocell Slide Surface Thermometer	68
Desnaturalización	68
Hibridación	69
Baños posthibridación	69
Montaje y visualización de los resultados	69
Contraste con PI o DAPI	70
Eliminación de PI y recoloración con DAPI	70
Estabilidad de los portaobjetos terminados	70
Recomendaciones de procedimiento	70
Resultados esperados	71
Especificaciones de la sonda	72
Bibliografía	72

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 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.

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 Coumarin). 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 desnaturalización de la sonda y del ADN diana se produce simultáneamente en el dispositivo una vez calentado.

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

3, 15 y 17	8, 12 y 21	1, 16 y 19	2, 13 y 20
9, 11 y 22	4, 14 y 18	5, 10 y 7	X, 6 y Y

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 Hybridisation Solution A (Solución de hibridación) : Formamida, dextran sulfato, SSC
- 500µl Solución de contraste: PI (ES: 0,125 µl (PI (ioduro de propidio)), Antifade
- 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

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

Almacenamiento y manejo

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

Productos suplementarios

- 5 x ST Buffer - 100 ml Cat. No. PCA 004
- 20 x SSC Buffer Cat. No. PCA 003
- Cytocell Hotplate Cat. No. PCN 001
- Conjuntos de filtros de fluorescencia proporcionados por Cytocell mediante petición

Materiales necesarios pero no proporcionados

Equipo

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

Soluciones

- a) **Fijador de Carnoy**
3:1 metanol: ácido acético glacial
- b) **Series de etanol**
etanol 70%, 85%, 100% (puro)
- c) **20 x SSC Stock**
175,3 g de cloruro sódico, 88,2 g de citrato de sodio por litro ajustado a pH 7.0 con conc. HCl. (4 x SSC; acción diluida 1:5)(2 x SSC; acción diluida 1:10). Esta solución puede almacenarse durante 1 año a 4°C
- d) **ST Buffer (1x)**
4 x SSC más 0,05% (v/v) Tween 20
- e) **0,4 x SSC**
Mezclar 2 ml 20 x SSC con 98 mls de agua destilada
- f) **2 x SSC, 0,05% Tween 20**
Mezclar 10 ml 20 x SSC con 90 mls de agua destilada y agregar 50µl Tween 20
- g) **Metanol 100%**

Configuración óptima del microscopio y los filtros

Para asegurarse de obtener los resultados óptimos con este producto, es esencial que el microscopio utilizado esté montado de la siguiente manera:

Configuración general del microscopio	
Bombilla de mercurio de 100 vatios	Objetivos x 100 x 60 Plan-Apochromat

Fluoróforo o contraste visible

Especificaciones para el filtro	Verde	Rojo	Azul con DAPI	Azul con PI	DAPI	PI
DAPI/FITC/Texas Red Filtro triple	v	v	v	v	v	v
FITC (banda estrecha) Filtro banda simple	v					
Filtro banda simple Texas Red		v				v
Filtro banda simple Aqua			v	v		

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. (Ver también Soluciones, anteriormente). 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

i. Limpiar el portaobjetos

Empape el portaobjetos durante 2 minutos en metanol 100% y seque con un papel limpio.

ii. Establecer el índice miótico 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, centrifugue la suspensión celular fijada a 160g durante 10 minutos. Observe el volumen de sobrenadante, elimínelo y vuelva a suspender el pellet en un volumen menor de fijador.

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

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

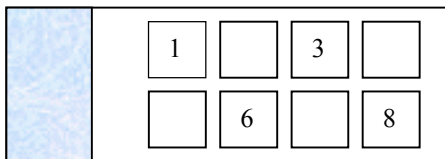
iii. Control de calidad de las muestras

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 4 µl 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 cuadrados.

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

Si durante el examen del portaobjetos, un cuadrado no tiene suficientes células/metafases 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 repetido y precaliente una porción alícuota de 25µl por dispositivo OctoChrome a 37°C. Precaliente 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 OctoChrome (Figura 1).

Para ayudar a localizar el cuadrado 1 (cromosomas 3, 15 y 17), su posición en el dispositivo se ha marcado en naranja.

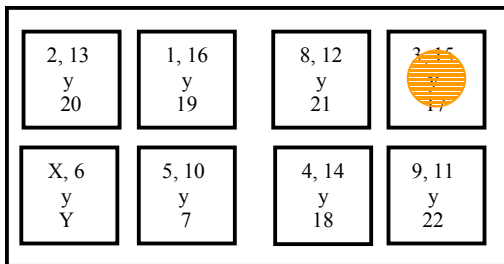


Figura 1. Ubicación de todas las sondas de pintado cromosómico en los cuadros del dispositivo OctoChrome.

Nota: Para ayudar a localizar el cromosoma 1, en el dispositivo se ha marcado esta posición en azul.

- 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.

4. Instrucciones de uso del Cytocell Slide Surface Thermometer

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

Este termómetro es un dispositivo de cristal líquido y aunque es reutilizable debe tratarse con cuidado para garantizar una vida útil razonable. El termómetro sólo debe utilizarse para comprobar la temperatura de una placa caliente, no debe usarse para controlar el rendimiento de la placa caliente en el tiempo.

Para utilizar el termómetro correctamente, colóquelo en la superficie de la placa caliente y espere hasta que los distintos segmentos cambien de color. La temperatura correcta se indica con color verde pálido/dorado. Cuando los segmentos aparecen granulados y los colores no aparecen uniformes y regulares deberá cambiar el termómetro, puesto que ya no funciona correctamente. La duración de vida de cada termómetro debería ser, sin embargo, suficiente para un kit de diez dispositivos 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

El portaobjetos puede contrastarse en PI o DAPI. PI permitirá la visualización simultánea de los tres fluorocromos utilizando el filtro triple recomendado. La distinción del PI del fluorocromo rojo no será óptima con el filtro triple o el filtro sencillo Texas Red . La captura de imágenes de cada fluorocromo con los filtros sencillos específicos (ver Configuración óptima del microscopio) es posible, aunque PI puede interferir con el canal Texas Red.

Con DAPI como contraste, el fluoróforo azul puede no visualizarse correctamente cuando se utilice el filtro triple (DAPI puede enmascarar el fluorocromo azul) aunque las señales verdes y rojas seguirán siendo visibles. El análisis visual y la captura de imágenes son posibles con los filtros sencillos adecuados. La ventaja de utilizar DAPI sobre PI es la obtención de un bandeado DAPI que permite la inversión a bandas G utilizando un sistema de análisis por imagen.

De forma alternativa, el portaobjetos puede contrañirse primero en PI y después desteñirse y volver a contrañirse con DAPI. Sin embargo, debe observarse que es difícil eliminar el DAPI, de modo que el tinte inicial deberá ser PI.

- i. Contraste con PI o DAPI
 1. Aplique 20µl de DAPI o de PI 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.

- ii. Eliminación de PI y tinción con DAPI
 1. Lave el portaobjetos durante 5 minutos en 1 x ST.
 2. Repita hasta dar un total de cuatro lavados.
 3. Aplique 20µl de DAPI a ambos extremos del portaobjetos y aplique un portaobjetos grande (24 x 50 mm).
 4. Seque el portaobjetos con un papel de filtro.
 5. Déjelo durante 10 minutos en la oscuridad antes de verlo con el microscopio de fluorescencia.

- iii. 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. No es recomendable calentar o envejecer los portaobjetos ya que puede reducir la señal de fluorescencia.

2. Las condiciones de hibridación se pueden ver afectadas de forma adversa por el uso de reactivos que no sean los proporcionados o recomendados por Cytocell Technologies Ltd.
3. El hecho de no seguir todos los procedimientos para la preparación del portaobjetos, la desnaturalización y la hibridación podría ofrecer resultados erróneos o inaceptables.
4. 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.
5. 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.
6. Una desnaturalización incompleta puede resultar en la falta de señal y demasiada desnaturalización, en una hibridación no específica.

Resultados esperados

1. La sonda de pintado del cromosoma 1 puede mostrar una ligera hibridación cruzada con las regiones centroméricas de los cromosomas 5 y 19.
2. La sonda de pintado del cromosoma 5 puede mostrar una ligera hibridación cruzada con las regiones centroméricas de los cromosomas 1 y 19.
3. La sonda de pintado del cromosoma 13 puede mostrar una hibridación cruzada con los brazos p de los cromosomas acrocéntricos.
4. La sonda de pintado del cromosoma 14 puede mostrar una hibridación cruzada con los brazos p de los cromosomas acrocéntricos.
5. La sonda de pintado del cromosoma 19 puede mostrar una ligera hibridación cruzada con las regiones centroméricas de los cromosomas 1 y 5.
6. La sonda de pintado del cromosoma 21 puede mostrar una hibridación cruzada con los brazos p de los cromosomas acrocéntricos.
7. La sonda de pintado del cromosoma 22 puede mostrar una hibridación cruzada con los brazos p de los cromosomas acrocéntricos.
8. La sonda de pintado del cromosoma Y puede mostrar una hibridación cruzada con las regiones pericentroméricas, el extremo del brazo p del cromosoma X y las regiones intersticiales del brazo q del cromosoma X.
9. La interpretación de los resultados de FISH debe realizarse en conjunto con controles adecuados, aplicando técnicas analíticas citogenéticas y dentro del contexto del historial del paciente y otros resultados clínicos.
10. Se recomienda que las sondas FISH se empleen teniendo en cuenta la etiqueta del producto.

Ayuda al cliente

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

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.

Bibliografía

- Collins C., Lin Kuo W., Segreaves R., Fuscoe J., Pinkel P., and Gray J.W. (1991). Construction and characterisation of plasmid libraries enriched in sequences from single human chromosomes. *Genomics* **11**: 997-1006.
- Evans J.W., Chang J.A., Giaccia A.J., Pinkel D. & Brown J.M. (1991). The use of fluorescence *in situ* hybridization combined with premature chromosome condensation for the identification of chromosome damage. *Brit. J. Cancer* **63**: 517 - 521.
- Leedham P., Lawrie M., Randhawa H., Gould C., Viegas-Pequignot E., Armstrong S. & Hulten M. (1996). Improved prenatal diagnosis by FISH Multiprobe and immunocytochemistry using a monoclonal antibody against 5-methylcytosine. *Eur. J. Hum. Genet.* **4**: Suppl 1.35.

- Maher E.J., Larin Z., Smith S., Cardy D.L.N. & Southern E.M. (1995). Fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) of twenty four different chromosome specific paints on a single microscope slide. In The Association of Clinical Cytogeneticists Abstract booklet.
- Pinkel D., Landegent J., Collins C., Fuscoe J., Segraves R., Lucas J. & Gray J. (1988). Fluorescence *in situ* hybridization with human chromosome-specific libraries: Detection of trisomy 21 and translocations of chromosome 4. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **85**: 9138-9142.
- Price C. M. (1993). Fluorescence *in situ* hybridisation (review). Blood Reviews **7**: 127-134
- Trask B. J. (1991) Fluorescence *in situ* hybridization: applications in cytogenetics and gene mapping. Trends in Genetics **7**: 149-154.

Leyenda

	Número de catálogo		Consultar instrucciones de uso
	Contenido		Número de lote
	Fabricante		Utilización hasta (Fecha de caducidad)
	Contenido suficiente para ensayos <n>		Límite de temperatura (Temperatura de almacenamiento; límites superior e inferior)
	Dispositivo de diagnóstico médico <i>In Vitro</i>		

Patentes y marcas registradas

Chromoprobe, Cytocell y Chromoprobe Multiprobe son marcas registradas de Cytocell Technologies Ltd.

El principio de Chromoprobe está protegido por las patentes internacionales WO9314223, EP0623177. El diseño de Multiprobe está registrado con el número 2050801 y también está protegido por la patente de diseño Núm. 420.745.

Cualquier tinte de cianina utilizado en este Producto está fabricado en nombre de Amersham Pharmacia Biotech Inc. con licencia exclusiva de Carnegie Mellon University y está protegido por la patente de EE.UU. número 5 268 486 y otras patentes pendientes. La Composición de este Producto está fabricada por NEN Life Science Products, Inc. Bajo las patentes de EE.UU. números 5 047 519 y 5 151 507. Queda estrictamente prohibida la utilización del Producto con fines comerciales sin el consentimiento escrito de Amersham Pharmacia Biotech Inc. y NEN Life Science Products, Inc.

DANSK

Indhold

Introduktion	76
Materialer vedlagt	76
Advarsler og forholdsregler	77
Opbevaring og håndtering	77
Supplerende produkter	77
Nødvendige materialer, ikke vedlagt	77
Optimal mikroskop og filter opsætning	78
Prøve forberedelse	79
Chromoprobe Multiprobe Protokol	79
Præparat forberedelse	79
Forberedelse af OctoChrome enhed og template præparat	80
Positionering af template præparat over OctoChrome enheden	81
Instruktioner for brug af Cytocell Slide Surface Thermometer	82
Denaturering	82
Hybridisering	82
Post hybridisering stringente vaske	82
Indfatning og visualisering af resultater	83
Modfarvning med PI eller DAPI	84
Fjernelse af PI og re-farvning med DAPI	84
Stabilitet af færdige præparater	84
Procedure anbefalinger	84
Forventede resultater	84
Probe specifikationer	85
Referencer	86

Introduktion

Fluorescens *In Situ* Hybridisering (FISH) er en teknik, som tillader DNA sekvenser at blive detekteret på metafase kromosomer eller i interfase kerner af fikserede dyrkede eller udyrkede cytogenetiske prøver. Teknikken anvender DNA prober, som hybridiserer til hele kromosomer eller enkelte unikke sekvenser, og virker som et stærkt supplement til klassisk cytogenetik. Efter fiksering behandles target DNA med varme og formamid for at denaturere det dobbeltstrengede DNA og gøre det enkeltstrengt. Target DNA'et kan derefter anneales til en ligeledes denatureret, enkeltstrengt, fluorescens mærket DNA probe, som har en komplementær sekvens. Efter hybridisering fjernes ubundet og nonspecifikt bundet DNA probe ved en serie af stringente vaske, og DNA'et farves for visualisering. Fluorescens mikroskopi giver så mulighed for visualisering af den hybridiserede probe på target materialet.

OctoChrome kombinerer principperne fra Chromoprobe Multiprobe® System med multibel farve fluorescens mærkning, og giver en hjælpsom FISH teknologi, som gør cytogenetisk analyse hurtig, simpel og kosteffektiv.

Multiprobe-Octochrome enheden er delt i 8 kvadrat-arealer, hver indeholdende tre forskellige hel-kromosom farve prober, hver direkte mærket i en forskellig farve: grøn (FITC spektrum), rød (Texas Red spektrum), og blå (kumarin filter). Proberne er reversibelt bundet til en glas enhed, en metode hvorpå CytoCELL har eksklusivitet, som simplificerer fluorescens *in situ* hybridisering ved at fjerne behovet for probe forberedelse. Denaturering af probe og target DNA sker simultant under enheden ved opvarmning.

FISH protokollen er yderligere simplificeret ved den samtidige denaturering af både probe og target DNA og, efter hybridisering natten over, brug af hurtige, stringente formamid-frie vaske. De direkte mærkede farve prober overflødiggør lange amplifikationstrin.

3, 15 og 17	8, 12 og 21	1, 16 og 19	2, 13 og 20
9, 11 og 22	4, 14 og 18	5, 10 og 7	X, 6 og Y

Multiprobe-Octochrome er beregnet til FISH på metafase kromosomer fra fikserede dyrkede perifere blod celler.

Materialer vedlagt

Hvert kit indeholder følgende komponenter, som er nok til enten 2 (kat. nr. PMP802), 5 (kat. nr. PMP804) eller 10 (kat. nr. PMP803) patient prøver:

- 2, 5 or 10 Chromoprobe Multiprobe - OctoChrome enheder belagt med direkte mærket farve prober.
Mængde farve probe mærket i rød: 2.5 til 5 ng pr kvadrat.
Mængde farve probe mærket i grøn: 7.5 til 12.5 ng pr kvadrat.
Mængde farve probe mærket i blå: 15 til 25 ng pr kvadrat.
- 4, 7 eller 12 Glas præparater trykt med en speciel template
- 500µl Hybridiserings Opløsning A : Formamid, Dextran Sulfat, SSC
- 500µl Modfarve Opløsning : DAPI (ES : 0.125µl DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole)), Anti-svinde
- 500µl Modfarve Opløsning: PI (ES: 0.125µg/ml PI (Propidium Iodide)), Anti-svinde
- 1 Cytocell Slide Surface Thermometer
- 1 Cytocell Chromoprobe Multiprobe Hybridisation Chamber

Advarsler og forholdsregler

1. Til *in vitro* diagnostisk brug. Kun til professionelt brug.
2. Vær iført handsker ved håndtering af DNA prober og DAPI modfarve.
3. Hybridiserings opløsningen indeholder formamid, som er toksisk. Håndtør med forsigtighed; vær iført handsker og laboratorie kittel. Ved bortskaffelse: skyl med stor mængde vand.
4. DAPI og PI er potentielle carcinogener. Håndtør med forsigtighed; vær iført handsker og laboratorie kittel. Ved bortskaffelse: skyl med stor mængde vand.
5. Alle farlige materialer bør bortskaffes ifølge Jeres institutions guidelines for farligt affald.

Opbevaring og håndtering

Chromoprobe Multiprobe System kittet bør opbevares ved 2-8°C indtil udløbsdatoen, angivet på kit mærkaten. **Må ikke fryses.** Modfarve røret skal opbevares i mørke.

Supplerende produkter

- 5 x ST Buffer - 100 ml Kat. nr. PCA 004
- 20 x SSC Buffer Kat. nr. PCA 003
- Cytocell Hotplate Kat. nr. PCN 001
- Fluorescent filter sets er tilgængelige fra Cytocell på efterspørgsel.

Nødvendige materialer, ikke vedlagt

Udstyr

- a) Varmeplade med præcis temperatur kontrol op til 80°C
- b) 37°C inkubator
- c) Pipetter, variabelt indstillelige i området 1µl - 200µl
- d) Vandbad med præcis temperatur kontrol ved 37°C, uden omrøring
- e) Mikrocentrifuge rør (0.5 ml)
- f) Vandbad med præcis temperatur kontrol ved 72°C

- g) Fluorescens mikroskop (venligst se sektionen Optimal mikroskop og filter opsætning)
- h) Plastic eller glas kar
- i) Bordcentrifuge
- j) Pincet
- k) Fluorescens mikroskop linse immersionsolie
- l) Fluorescens-kvalitet dækglas (24 x 50mm)

Opløsninger

- a) **Carnoy's Fixativ**
3:1 methanol : iseddike
- b) **Ethanol serie**
70%, 85%, 100% (absolut) ethanol
- c) **20 x SSC Stock**
175.3g natriumklorid, 88.2g natriumcitrat pr liter, juster til pH 7.0 med conc. HCl. (4 x SSC; fortynd stock 1:5)(2 x SSC; fortynd stock 1:10). Stock opløsningen kan opbevares op til 1 år ved 4°C
- d) **ST Buffer (1x)**
4 x SSC plus 0.05% (v/v) Tween 20
- e) **0.4 x SSC**
Mix 2ml 20 x SSC med 98ml destilleret vand.
- f) **2 x SSC, 0.05% Tween**
Mix 10ml 20 x SSC med 90ml destilleret vand, tilsæt 50µl Tween 20
- g) **100% methanol**

Optimal mikroskop og filter opsætning

For at sikre optimale resultater med dette produkt er det essentielt, at det anvendte mikroskop er opsat som følgende:

Generel mikroskop opsætning	
100 Watt kviksølvpære	x 100; x 60 plan-apokromat objektiver

Fluorophor eller modfarve synlig

Filter Specifikation	Grøn	Rød	Blå med DAPI	Blå med PI	DAPI	PI
DAPI/FITC/Texas Red Triple Filter	v	v	v	v	v	v
FITC (tæt bandpass) Single Bandpass Filter	v					
Texas Red Single Bandpass Filter		v				v
Aqua Single Bandpass Filter			v	v		

Prøve forberedelse

Chromoprobe Multiprobe System er designet til brug på dyrkede perifere blod celler fikseret i Carnoy's fixativ, som bør forberedes ifølge laboratoriets eller institutionens guidelines. (Se også Opløsninger, ovenover)

Forbered blod metafase spredninger på Cytocell Chromoprobe Multiprobe template præparater ifølge nedenstående Cytocell protokol. Bagning e.l. aldring af præparater anbefales ikke, da det kan reducere signal fluorescensen.

Chromoprobe Multiprobe protokol

1. Præparat forberedelse

i. Rengør template præparat

Gennemblød template præparatet i 2 minutter i 100% methanol og tør med en ren, blød serviet.

ii. Etabler korrekt celle tæthed

Det er vigtigt, at den påtænkte prøve har et tilstrækkeligt højt mitotisk index for at kunne detektere kromosom abnormaliteter. Til at checke prøvens tæthed, vha en mikropipette (f.eks Gilson P10 eller P20), pipetteres 4µl af celle suspensionen på et af områderne af det ekstra template præparat og lufttørres. Det lille volumen betyder, at man normalt forsigtigt må røre præparatet med pipette spidsen for at overføre suspensionen. Eksaminer med fase kontrast mikroskopi.

Hvis celle tætheden er for høj fortyndes suspensionen med frisk fixativ.

Hvis det mitotiske index er for lavt centrifugeres den fikserede celle suspension ved 160xg i 10 minutter. Noter volumen af supernatanten, fjern, og re-suspender celle pellet i et mindre volumen af frisk fixativ.

Hvis celleprøve koncentrationen er ændret, spottes 4µl af den koncentrerede prøve på en anden kvadrat af dit test præparat og re-eksamineres ved fase kontrast mikroskopi.

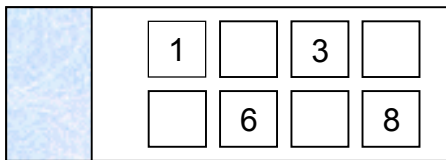
Bemærk: 50µl er minimum volumen krævet til OctoChrome enhed protokollen.

iii. Kvalitetskontrol af prøver

Prøver bør undersøges for cytoplasma, da dette vil interferere med det endelige FISH resultat. Hvis kromosomerne ser ud til at være omgivet af et granulært materiale (set i fase kontrast mikroskop), vil dette give dårlige resultater. En metode til at reducere cytoplasma er at spotte 4µl af sin prøve på template præparatet og se på fixativet, når det spreder sig. I den normale situation vil fixativet spredes til maximum, vige, og så evaporere. Til at rense for cytoplasma har vi fundet, at effektive resultater nås, hvis en frisk dråbe af 3:1 fixativ tillades at falde på spotten på det tidspunkt, hvor det spredende fixativ når sin maximum spredning. Tillad den anden dråbe af fixativ at evaporere og re-eksaminer spotten.

iv. Spotting af præparat

Pipetter 4µl af celle suspensionen på alle 8 arealer af template præparatet i en rækkefølge som vist nedenstående. Dette vil forhindre celle spredningerne fra at interferere med hinanden.



Når den første gruppe af dråber er lufttørret, spottes de øvrige kvadrater med 4 µl dråber på samme måde. Efter at præparatet er tørret, vil eksaminering under fase kontrast vise, om nogle kvadrater er blevet glemt.

Hvis der under præparat eksamineringen ses et kvadrat med for få celler /metafaser, kan flere suspensions dråber tilføjes for at øge celle tætheden.

Bemærk: Hvis metafase cellerne virker overspredte, rengøres template præparatet grundigt i methanol og re-spottes (hver spot skal være tør før fortsættelse til den næste).

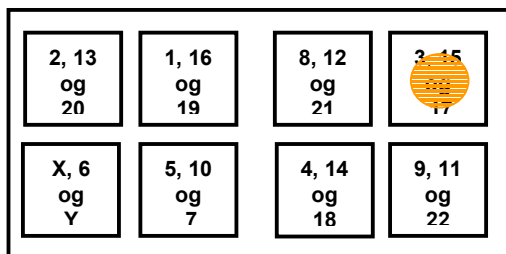
2. Forberedelse af OctoChrome enhed og template præparat

- Læg Chromoprobe Multiprobe Hybridiseringskammer i et 37°C vandbad og lad det ekvilibrere ved 37°C (+/- 1°C). (Dette kan tage op til en time, hvis vandbadet tændes fra kold).

- ii. Mix hybridiserings opløsningen ved gentagen pipettering og forvarm 25µl pr OctoChrome enhed til 37°C (+/- 1°C). Forvarm også hver OctoChrome enhed til 37°C ved at placere enhedens **mærkat-side nederst**.
Rør ikke de løftede overflader på OctoChrome enheden
- iii. Vask template præparater indeholdende fikserede prøver i 2 x SSC i 2 minutter ved stue temperatur (20°C – 25°C).
- iv. Mens **OctoChrome** enheden stadig er ved 37°C, dehydreres template præparatet gennem en ethanol serie (2 minutter hver ved 70%, 85% og absolut ethanol), lufttørres og placeres ved 37°C (varmeplade eller inkubator) til opvarmning.
- v. Tilsæt 2µl forvarmet hybridiserings opløsning til hver af de 8 arealer på den forvarmede OctoChrome enhed vha en P10 mikropipette, mens den forbliver ved 37°C.

3. Positionering af template præparat over OctoChrome enheden.

- i. Læg forsigtigt template præparatet over OctoChrome enheden, sådan at nummer 1, som nu vender bunden i vejret, er placeret over øverste højre areal af OctoChrome enheden (Figur 1).
Som hjælp til at lokalisere kvadrat 1 (kromosom 3, 15 & 17) er dets position på enheden farvet orange.



Figur 1. Placering af hel-kromosom farve prober på OctoChrome enhed kvadrater.

- ii. Sørg for at template præparatet er omhyggeligt rettet ind over de matchende områder på OctoChrome enheden. Sænk omhyggeligt præparatet over OctoChrome enheden, så hybridiseringsvæske-dråberne får kontakt med præparatet. Pres ensartet og forsigtigt for at sikre at, væske spredes til hjørnerne på hver af de forhøjede områder på OctoChrome enheden.
- iii. Løft præparatet/OctoChrome forsigtigt og vend, så præparatet er nedenunder OctoChrome enheden. Sørg for, at enheden ikke tværer ud over template præparatet, da dette kan medføre kryds-kontaminering af proberne.

4. Instruktioner for brug af Cytocell Slide Surface Thermometer

Bemærk: Temperaturen af varmepladen bør checkes med Cytocell Slide Surface Thermometer før fortsættelse til denaturering.

Dette termometer er en flydende krystal enhed, og selvom det er reversibelt, skal det behandles forsigtigt for at sikre en fornuftig levetid. Termometeret må kun bruges til at checke temperaturen af en varmeplade, det må ikke bruges til at monitorere varmepladens præstation over tid.

For at anvende termometeret korrekt placeres det på overfladen af varmepladen – vent indtil de forskellige segmenter holder op med at ændre farve. Den korrekte temperatur indikeres ved en svag grøn/guld farve. Når segmenterne virker granuløse, og farverne ikke længere virker uniforme og regulære, bør termometret kassereres, da det er opbrugt. Dog bør varigheden af hvert termometer let være nok til ti OctoChrome kit.

5. Denaturering

En PCR maskines varmeblok er ikke brugbar istedet for en fast varmeplade til denne procedure.

Overfør præparat/OctoChrome enheden til varmepladen og vær specielt opmærksom på at holde den plan (sørg for at prøve præparatet er i god kontakt med varmepladen). Denaturer på varmepladen ved 75°C (+/- 1°C) i **5 minutter**.

6. Hybridisering

Placer præparat/OctoChrome enhed i det forvarmede Chromoprobe Multiprobe hybridiseringskammer, sæt låget på og lad kammeret flyde i 37°C (+/- 1°C) vandbadet (uden omrøring) natten over.

Bemærk:

- Førsegl ikke låget på hybridiserings kammeret.**
- Læg ikke låg på vandbadet.**
- Hybridiser ikke i en inkubator.**
- Sørg for at hybridiserings kammeret er fuldstændigt tørt.**
- (ingen vand eller fugtig materiale inde i kammeret).**

Fugtigheden inde i kammeret er vital for optimal hybridisering. De korrekte niveauer vil opnås ved at følge disse trin.

7. Post hybridisering stringente vaske

- i. Forberedelse af stringente vaske opløsninger

1. Opløsning 1: Forbered et glas/Hellendahl kar indeholdende 0.4 x SSC. Placer i et vandbad og lad det nå 72°C (+/- 1°C), juster pH til 7.0.
2. Opløsning 2 : Forbered et glas/Hellendahl kar indeholdende 2 x SSC og 0.05% Tween 20. Lad det stå ved stue temperatur (20°C – 25°C).

Check temperaturen og pH af opløsningerne i karrene og juster, hvis nødvendigt. pH skal være 7.0 ved den korrekte temperatur.

- ii. Stringente vaske trin
 1. Fjern OctoChrome enheden forsigtigt fra template præparatet og placer præparatet i Opløsning 1 i 2 minutter. (OctoChrome enheden kan ikke genbruges).
 2. Placer præparatet i Opløsning 2 i 30 sekunder.

Undgå at håndtere mere end to OctoChrome præparater ad gangen gennem de stringente vaske.

8. Indfatning og visualisering af resultater

Præparatet kan enten modfarves i PI eller DAPI. PI tillader samtidig visualisering af de 3 fluorophorer ved brug af det anbefalede triple filter. At skelne PI fra den røde fluorophor er ikke optimalt med triple filteret eller single Texas Red filteret. Billedanalyse fastholdelse af hver fluorophor med de specifikke enkelt-filtre (se optimal mikroskop set up) er muligt, selvom PI kan interferere med Texas Red kanalen.

Med DAPI som modfarve kan den blå fluorophor se tabt ud ved brug af triple filteret (fordi DAPI kan dække den blå fluorophor), selvom grønt og rødt signal stadig er synligt. Visuel analyse og billed fastholdelse er muligt med de passende enkelt-filtre. Fordelen ved at bruge DAPI fremfor PI er at denne banding er overlegen og vil tillade inversion til G banding ved brug af et billed analyse system.

Alternativt kan præparatet først farves i PI og senere affarves og re-farves i DAPI. Bemærk at det er sværere at fjerne DAPI modfarve, så den første farve bør være PI.

- i. Modfarvning med PI eller DAPI
 1. Tilsæt 20µl DAPI eller PI til hver ende af præparatet og læg dækglas over (24 x 50 mm)
 2. Blot med et stykke filter papir / serviet.
 3. Lad stå i mørke i 10 minutter før det betragtes i fluorescens mikroskop.
- ii. Fjernelse af PI og re-farvning med DAPI
 1. Vask præparat i 5 min. i 1 x ST.
 2. Gentag 3 gange (4 vaske i alt).

3. Tilsæt 20µl DAPI til hver ende af præparatet og læg dækglass over (24 x 50 mm)
 4. Blot med et stykke filter papir / serviet.
 5. Lad stå i mørke i 10 minutter før det betragtes i fluorescens mikroskop.
- iii. Visse typer mikroskoper har præparat holdere, som gør det svært at se de yderste ender af præparatet. Hvis dette sker, vendes præparatet blot 180°, hvilket vil hjælpe med at se præparatet.

De anvendte prober på Multiprobe enheden er direkte mærket med fluorophorer, som er lys sensitive. Resultater forbedres, hvis proberne er minimalt udsat for lys under disse procedurer; det er dog ikke nødvendigt at arbejde i mørke.

Stabilitet af færdige præparater

FISH præparater forbliver analyserbare i op til 1 måned, hvis de opbevares i mørke ved max stue temperatur.

Procedure anbefalinger

1. Bagning eller anden aldring af præparater anbefales ikke, da det kan reducere signal fluorescens.
2. Hybridiserings betingelser kan påvirkes skadeligt ved at bruge andre reagenser end de vedlagte eller de af Cytocell Technologies Ltd foreslåede.
3. Fiasko i at følge alle procedurer for præparat forberedelse, denaturering og hybridisering kan give uacceptable eller fejlhaftige resultater.
4. Brug af et kalibreret termometer til at måle temperaturer af opløsninger, vandbade og inkubatorer anbefales stærkt, da disse temperaturer er kritiske for optimal produkt præstation.
5. Vaske koncentrationerne (stringent), pH og temperaturer er vigtige, da lav stringens kan resultere i non-specifik binding af proben, og for høj stringens kan resultere i manglende signal.
6. Ukomplet denaturering kan resultere i manglende signal, og over- denaturering kan også resultere i non-specifik binding.

Forventede resultater

1. De akrocentriske kromosom farve-prober indeholder kort-arm materiale. Dette er delt mellem D & G gruppe kromosomerne, så der er mulighed for kryds-hybridisering i disse regioner.
2. Kromosom 16 hel-kromosom farve proben kan vise svag kryds-hybridisering til de heterokromatiske regioner på kromosom Y.
3. Y kromosom farve proben indeholder de pseudoautosomale regioner fælles med X kromosomet. Derfor kan kryds-hybridisering ses i disse regioner.
4. Kromosom 1, 5 og 19 har fælles centromeriske DNA sekvenser. Derfor kan kryds-hybridisering ses i disse regioner, mellem disse kromosomer.

5. Fortolkningen af FISH resultater bør gøres i forbindelse med behørig kontrol, ved at anvende cytogenetiske analytiske færdigheder og i sammenhæng med patientens medicinske journal og andre kliniske fund.
6. Vi anbefaler, at FISH proberne anvendes i overensstemmelse med produkt etiketten.

Kunde Support

Venligst kontakt Cytocells Salgs & Marketing Afdeling.

Probe Specifikationer










OctoChrome kvadrat	Kromosom	Fluorophor
1	3	rød
	15	blå
	17	grøn
2	8	rød
	12	blå
	21*	grøn
3	1*	rød
	16	blå
	19*	grøn
4	2	rød
	13*	blå
	20	grøn
5	9	rød
	11	blå
	22*	grøn
6	4	rød
	14*	blå
	18	grøn
7	5*	rød
	10	blå
	7	grøn
8	X	rød
	6	blå
	Y*	grøn

* Se "Forventede resultater" afsnittet for flere detaljer.

Referencer

- Collins C., Lin Kuo W., Segraves R., Fuscoe J. Pinkel P. and Gray J.W. (1991). Construction and characterisation of plasmid libraries enriched in sequences from single human chromosomes. *Genomics* **11**: 997-1006.
- Evans J.W., Chang J.A., Giaccia A.J., Pinkel D. & Brown J.M. (1991). The use of fluorescence *in situ* hybridization combined with premature chromosome condensation for the identification of chromosome damage. *Brit. J. Cancer* **63**: 517 - 521.
- Leedham P., Lawrie M., Randhawa H., Gould C., Viegas-Pequignot E., Armstrong S. & Hulten M. (1996). Improved prenatal diagnosis by FISH Multiprobe and immunocytochemistry using a monoclonal antibody against 5-methylcytosine. *Eur. J. Hum. Genet.* **4**: Suppl 1.35
- Maher E.J., Larin Z., Smith S., Cardy D.L.N. & Southern E.M. (1995). Fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) of twenty four different chromosome specific paints on a single microscope slide. In *The Association of Clinical Cytogeneticists Abstract booklet*.
- Pinkel D., Landegent J., Collins C., Fuscoe J., Segraves R., Lucas J. & Gray J. (1988). Fluorescence *in situ* hybridization with human chromosome-specific libraries: Detection of trisomy 21 and translocations of chromosome 4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 9138-9142.
- Price C. M. (1993). Fluorescence *in situ* hybridisation (review). *Blood Reviews* **7**: 127-134
- Trask B. J. (1991) Fluorescence *in situ* hybridization: applications in cytogenetics and gene mapping. *Trends in Genetics* **7**: 149-154.

Symboler

	Katalog nummer		Konsulter instruktions manualen
	Indhold		Lot Nummer
	Producent		Udløbsdato
	Indeholder nok til <n> test		Temperatur limitering (opbevaringstemp.; øvre og nedre grænser)
	<i>In Vitro</i> Diagnostisk Medicinsk enhed		

Patenter og varemærker

Chromoprobe, Cytocell og Chromoprobe Multiprobe er registrerede varemærker for Cytocell Technologies Ltd.

Chromoprobe princippet er dækket af internationale patenter WO9314223, EP0623177. Designet af Multiproben er et registreret design, nummer 2050801 og er også dækket af Design Patent nummer 420,745.

Enhver cyanin farve anvendt i dette produkt er produceret på vegne af Amersham Pharmacia Biotech Inc. under en eksklusiv licens fra Carnegie Mellon University og er dækket af US Patent nummer 5 268 486 og andre patent anmeldelser. Den kemiske forbindelse i dette produkt er produceret af NEN Life Science Products, Inc. under US Patent numre 5 047 519 og 5 151 507. Brug af dette produkt til kommercielle formål er strengt forbudt uden skriftlig tilladelse fra Amersham Pharmacia Biotech Inc. og NEN Life Science Products, Inc.



Cytocell Technologies Ltd.

6-7 Technopark

Newmarket Road

Cambridge, CB5 8PB, UK.

T: +44(0)1223 467064

F: +44(0)1223 360732

E: probes@cytozell.com

W: www.cytozell.com