

Instructions For Use

REF: LPH 009-S / LPH 009 / LPH 009-20

P16 Deletion Probe



PROFESSIONAL USE ONLY

ENGLISH/FRANÇAIS/ITALIANO/DEUTSCH/ESPAÑOL

Further information available at www.cytocell.com

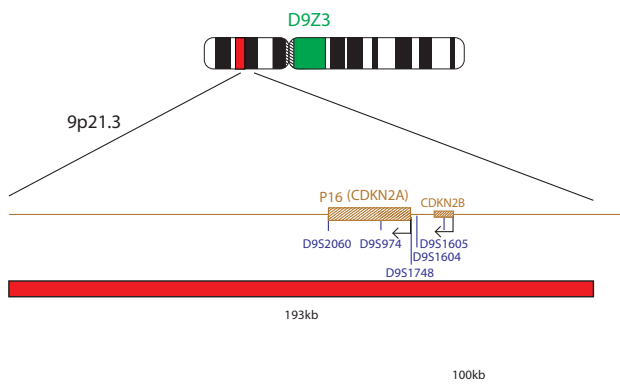
Fluorescence *In Situ* Hybridisation (FISH) is a technique that allows DNA sequences to be detected on metaphase chromosomes or in interphase nuclei from fixed cytogenetic samples. The technique uses DNA probes that hybridise to entire chromosomes or single unique sequences, and serves as a powerful adjunct to classic cytogenetics. Recent developments have meant that this valuable technique can now be applied as an essential diagnostic tool in prenatal, haematological and pathological chromosomal analysis. Target DNA, after fixation and denaturation, is available for annealing to a similarly denatured, fluorescently labelled DNA probe, which has a complementary sequence. Following hybridisation, unbound and non-specifically bound DNA probe is removed and the DNA is counterstained for visualisation. Fluorescence microscopy then allows the visualisation of the hybridised probe on the target material.

Probe Information

Deletions of chromosome 9p21 are implicated in a wide variety of tumours including approximately 10% of paediatric ALL patients¹, though the incidence is higher in T-ALL². The region has been the subject of much study but deletion of the potential tumour suppressor gene P16 (Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A (CDKN2A)) was found to take place in 90% of newly diagnosed cases of paediatric ALL showing cytogenetic deletions of 9p21 by FISH³. This study showed that deletion of P16 only (rather than both P16 (CDKN2A) and P15 (CDKN2B)) was the critical step as one case was found to be deleted for P16 but P15 was present. The deletion is usually homozygous (81% compared to 9% hemizygous) in cases of T-ALL whilst homozygous and hemizygous deletions are roughly equal in B-ALL (23% vs. 20% for homozygous and hemizygous respectively). The gene product inhibits the Cyclin Dependent Kinases CDK4 and CDK6, which are important in controlling cell cycle progression from G1 to S phase⁴. Disruptions of this process are therefore likely to result in the proliferation of mutated cells.

Probe Specification

P16, 9p21.3, Red
D9Z3, 9q12, Green



The P16 probe, labelled in red, covers a 193kb region of 9p21.3, extending from 105kb telomeric of P16 gene to 46kb centromeric of CDKN2B. The probe mix also contains a control probe for chromosome 9 (D9Z3, the heterochromatic block at 9q12) labelled in green.

Materials Provided

Probe: 50µl per vial (5 tests), 100µl per vial (10 tests) or 200µl per vial (20 tests)

Amount of red P16 probe: 52-65ng/test

Amount of green D9Z3 probe: 5-6ng/test

The probes are provided premixed in hybridisation solution (Formamide; Dextran Sulphate; SSC) and are ready to use.

Counterstain: 150µl per vial (15 tests) or 500µl per vial (50 tests)

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

Warnings and Precautions

1. For *in vitro* diagnostic use. For professional use only.
2. Wear gloves when handling DNA probes and DAPI counterstain.
3. Probe mixtures contain formamide, which is a teratogen; do not breathe fumes or allow skin contact. Wear gloves, a lab coat, and handle in a fume hood. Upon disposal, flush with a large volume of water.
4. DAPI is a potential carcinogen. Handle with care; wear gloves and a lab coat. Upon disposal, flush with a large volume of water.
5. All hazardous materials should be disposed of according to your institution's guidelines for hazardous waste disposal.

Storage and Handling

The Aquarius® kit should be stored at -20°C until the expiry date indicated on the kit label. The probe and counterstain vials must be stored in the dark.

Equipment Necessary but not Supplied

1. Hotplate (with a solid plate and accurate temperature control up to 80°C).
2. Variable volume micropipettes and tips range 1µl - 200µl.
3. Water bath with accurate temperature control at 72°C.
4. Microcentrifuge tubes (0.5ml).
5. Fluorescence microscope (Please see Fluorescence Microscope Recommendation section).
6. Plastic or glass coplin jars.
7. Forceps.
8. Fluorescence grade microscope lens immersion oil.
9. Bench top centrifuge.
10. Microscope slides.
11. 24x24mm coverslips.
12. Timer.
13. 37°C incubator.
14. Rubber solution glue.

Fluorescence Microscope Recommendation

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

Sample Preparation

The kit is designed for use on cultured peripheral blood cells or cultured bone marrow cells fixed in Carnoy's fixative, that should be prepared according to the laboratory or institution guidelines. Prepare air dried samples on microscope slides according to standard cytogenetic procedures.

FISH Protocol

(Note: Please ensure that exposure of the probe to laboratory lights is limited at all times).

Slide preparation

1. Spot the cell sample onto a glass microscope slide. Allow to dry.
2. Immerse the slide in 2xSSC for 2 minutes at room temperature (RT) without agitation.
3. Dehydrate in an ethanol series (70%, 85% and 100%), each for 2 minutes at RT.
4. Allow to dry.

Pre-Denaturation

5. Remove the probe from the freezer and allow it to warm to RT.
6. Ensure that the probe solution is uniformly mixed with a pipette.
7. Remove 10µl of probe per test, and transfer it to a microcentrifuge tube. Quickly return the remaining probe to -20°C.
8. Place the probe and the sample slide to prewarm on a 37°C (+/- 1°C) hotplate for 5 minutes.
9. Spot 10µl of probe mixture onto the cell sample and carefully apply a coverslip. Seal with rubber solution glue and allow the glue to dry completely.

Denaturation

10. Denature the sample and probe simultaneously by heating the slide on a hotplate at 75°C (+/- 1°C) for 2 minutes.

Hybridisation

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

Post-Hybridisation Washes

12. Remove the coverslip and all traces of glue carefully.
13. Immerse the slide in 0.4xSSC (pH 7.0) at 72°C (+/- 1°C) for 2 minutes without agitation.
14. Drain the slide and immerse it in 2xSSC, 0.05% Tween-20 at RT (pH 7.0) for 30 seconds without agitation.
15. Drain the slide and apply 10µl of DAPI antifade onto each sample.
16. Cover with a coverslip, remove any bubbles and allow the colour to develop in the dark for 10 minutes.
17. View with a fluorescence microscope.

Stability of Finished Slides

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

Procedural Recommendations

1. Baking or 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 Ltd.
3. 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.
4. The wash concentrations, pH and temperatures 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.
5. Incomplete denaturation can result in lack of signal and over denaturation can also result in non-specific binding.

Expected Results

In a normal cell there should be two red and two green signals (2R, 2G). A cell with a hemizygous deletion of the P16 should have one red and two green signals (1R, 2G) whilst a cell with a homozygous deletion should have no red and two green signals (0R, 2G).

Limitations

Reporting and interpretation of FISH results should be consistent with professional standards of practice and should take into consideration other clinical and diagnostic information. This kit is intended as an adjunct to other diagnostic laboratory tests and therapeutic action should not be initiated on the basis of the FISH result alone.

Additional Information

For additional product information please contact the Cytocell Technical Support Department.

T: +44 (0)1223 294048
E: techsupport@cytocell.com
W: www.cytocell.com

FRANÇAIS

L'hybridation *in situ* par fluorescence (FISH) est une technique qui permet de détecter des séquences ADN sur les chromosomes en métaphase ou sur les noyaux interphasiques 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. De récents développements ont démontré que cette technique informative peut maintenant être utilisée comme un outil diagnostique essentiel lors de l'analyse des chromosomes en prénatal, hématologie et pathologie. L'ADN cible, après fixation, est traité par la chaleur et à la formamide pour dénaturer la double hélice, la 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 ensuite la visualisation de la sonde hybridée sur l'ADN cible.

Caractéristiques de la sonde

Sonde de la région P16 9p21.3 en rouge
Sonde de la région D9Z3 9q12 en vert

La sonde P16, marquée en rouge, couvre une région de 193kb de 9p21.3, s'étendant d'une région télomérique de 105kb du gène P16 à une région centromérique de 46kb de CDKN2B. Le mélange de sondes contient également une sonde de contrôle du chromosome 9 (D9Z3, le bloc hétérochromatique à 9q12) marquée en vert.

Conditionnement

Sonde : 50µl par tube (5 tests), 100µl par tube (10 tests) ou 200µl par tube (20 tests)
Concentration de sonde P16, rouge: 52-65ng/test
Concentration de sonde D9Z3, vert: 5-6ng/test
La sonde est fournie prête-à-l'emploi dans le tampon d'hybridation (formamide, sulphate de dextran, SSC).
Contre-colorant: 150µl par tube (15 tests) ou 500µl par tube (50 tests)
Le contre-colorant est le DAPI antifading (ES: 0.125µg/ml DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole)).

Avertissements et précautions

1. Pour utilisation en diagnostic *in vitro*. Pour usage professionnel uniquement.
2. Porter des gants lors de la manipulation des sondes ADN et du contre-colorant DAPI.
3. La sonde contient de la formamide qui est un tératogène. Ne pas respirer les vapeurs. Ne pas mettre en contact avec la peau. Porter des gants, une blouse de laboratoire et manipuler sous une hotte. Après élimination, rincer abondamment avec de l'eau.
4. Le DAPI est un carcinogène potentiel. Manipuler avec précaution. Porter des gants et une blouse de laboratoire. Après élimination, rincer abondamment avec de l'eau.
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 Aquarius® doit être conservé à -20°C jusqu'à la date d'expiration indiquée sur le kit. La sonde et le contre-colorant doivent être conservés à l'abri de la lumière.

Équipement nécessaire non fourni

1. Plaque chauffante (avec bloc et contrôle de la température jusqu'à 80°C).
2. Micropipettes 1µl - 200µl.
3. Bain-marie avec contrôle de la température à 72°C.
4. Tubes à microcentrifugation (0.5ml).
5. Microscope à fluorescence (Voir la section Microscope et filtres).
6. Jars en plastique ou en verre.
7. Forceps.
8. Huile à immersion pour microscope à fluorescence.
9. Centrifugeuse de paillasse.
10. Lames de microscope.
11. Lamelles 24x24mm.
12. Chronomètre.
13. Incubateur à 37°C.
14. Colle Rubber cement.

Microscope et filtres

Pour une visualisation optimale de la sonde, nous recommandons l'utilisation d'une lampe à mercure de 100-watts et d'objectifs plan apochromatiques x63 ou x100. Le filtre triple bande DAPI/FITC/Texas Red est optimal pour la visualisation des 3 fluorochromes simultanément.

Préparation des échantillons

Le kit a été développé pour utilisation sur les cellules du sang périphérique ou de moelle osseuse cultivées et fixées avec du fixateur Carnoy et doivent être préparées selon les protocoles en vigueur dans le laboratoire ou institution. Préparer les lames de microscope avec les échantillons séchés à l'air selon les procédures standard de cytogénétique.

Protocole FISH

(Remarque : Veuillez toujours vous assurer de limiter l'exposition de la sonde à l'éclairage du laboratoire)

Préparation de la lame échantillon

1. Déposer l'échantillon cellulaire sur une lame propre. Laisser sécher.
2. Plonger la lame dans du 2xSSC pendant 2 minutes à température ambiante sans agitation.
3. Déshydrater dans une série de bains éthanol (70%, 85% et 100%), 2 minutes dans chaque bain à température ambiante.
4. Laisser sécher.

Pré-dénaturation

5. Retirer la sonde du congélateur à -20°C et la laisser préchauffer à température ambiante.
6. Bien homogénéiser la sonde en pipetant plusieurs fois.
7. Prélever 10µl de sonde par test et placer dans un tube à microcentrifugation. Remettre le tube avec le restant de sonde à -20°C.
8. Mettre la sonde et la lame échantillon à préchauffer sur une plaque chauffante à 37°C (+1°C) pendant 5 minutes.
9. Déposer 10µl de sonde sur l'échantillon et couvrir avec une lamelle. Sceller avec du rubber cément et laisser sécher.

Dénaturation

10. Dénaturer simultanément la sonde et l'échantillon en plaçant la lame sur une plaque chauffante à 75°C (+/- 1°C) pendant 2 minutes.

Hybridation

11. Incuber la lame pendant une nuit à 37°C (+1°C) à l'abri de la lumière et dans une chambre humide.

Lavages post-hybridation

12. Retirer la lamelle et éliminer toutes traces de rubber cément.
13. Laver la lame dans du tampon 0.4xSSC (pH 7.0) à 72°C (+/- 1°C) pendant 2 minutes.
14. Egoutter la lame et laver dans du tampon 2xSSC, 0.05% Tween-20 (pH 7.0) à température ambiante pendant 30 secondes sans agitation.
15. Sécher la lame et appliquer 10µl de DAPI antifading sur chaque échantillon.
16. Recouvrir d'une lamelle, enlever les bulles et laisser la coloration apparaître à l'abri de la lumière pendant 10 minutes.
17. Visualiser avec un microscope à fluorescence.

Stabilité des lames

Les lames FISH sont analysables pendant un mois si elles sont conservées à l'obscurité et/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 autres que ceux fournis ou recommandés par Cytocell Ltd.
3. 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.
4. 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.
5. Une dénaturation incomplète peut engendrer une perte de signal et une trop forte dénaturation une hybridation non-spécifique.

Résultats attendus

Une cellule normale doit présenter deux signaux rouges et deux signaux verts (2R, 2V). Une cellule comportant une délétion hémizygote de P16 doit présenter un signal rouge et deux signaux verts (1R, 2V) alors que deux signaux verts, sans aucun signal rouge, (0R, 2V) doivent être observés pour une cellule comportant une délétion homozygote.

Limitations

La diffusion et l'interprétation du test FISH doivent être effectués conformément aux normes professionnelles mises en pratique et tout en prenant en considération les autres informations cliniques et diagnostiques disponibles. Ce kit est développé comme un test complémentaire à la cytogénétique classique, pour cette raison des actions thérapeutiques ne doivent pas être lancées sur la seule base des résultats du test FISH.

Informations supplémentaires

Pour plus d'informations sur le produit, veuillez contacter l'Assistance technique Cytocell.
T: +44 (0)1223 294048
E: techsupport@cytocell.com
W: www.cytocell.com

ITALIANO

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

Specifiche della sonda

Regione P16, 9p21.3 rosso
Regione D9Z3, 9q12 verde

La sonda P16, marcata in rosso, copre una regione di 193kb del 9p21.3, con una lunghezza da 105kb telomerici del gene P16 fino a 46kb centromerici di CDKN2B. Il mix della sonda contiene anche una sonda di controllo per il cromosoma 9 (D9Z3, il blocco eterocromatico al 9q12) marcata in verde.

Materiali forniti

Sonda: 50µl per provetta (5 test), 100µl per provetta (10 test) o 200µl per provetta (20 test)
Quantità di P16 rosso probe: 52-65ng/test
Quantità di D9Z3 verde probe: 5-6ng/test
La sonda è fornita già miscelata e pronta per l'uso nella soluzione di ibridazione (Formamide; Destrano solfato; SSC).
Colorante di contrasto: 150µl per provetta (15 test) o 500µl per provetta (50 test)
Il colorante di contrasto è il DAPI antifade (ES: 0,125µg/ml DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindole)).

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. Le miscele di sonda contengono formamide, una sostanza teratogena. Non respirare i fumi ed evitare il contatto con la pelle. Indossare guanti, camicia da laboratorio e maneggiare in una cappa aspirante. Per lo smaltimento, lavare con grandi quantità di acqua.
4. Il DAPI è un potenziale cancerogeno. Maneggiare con cura, indossare guanti ed un camicia 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 residui tossici.

Conservazione e utilizzo

Conservare il kit Aquarius® a -20°C fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta. I flaconcini della sonda e del colorante di contrasto devono essere conservati al buio.

Apparecchiature necessari non forniti

1. Piastra riscaldante (con - un controllo accurato della temperatura fino ad 80°C).
2. Micropipette a volume variabile compreso tra 1µl - 200µl.
3. Bagno termostatico con controllo accurato della temperatura a 72°C.
4. Provette da microcentrifuga (0,5 ml).
5. Microscopio a fluorescenza (riferirsi alla sezione Configurazione ottimale del microscopio e dei filtri).
6. Contenitori di Coplin in plastica o vetro.
7. Pinzette.
8. Olio per lenti ad immersione del microscopio a fluorescenza.
9. Centrifuga da banco.
10. Vetrini da microscopia.
11. 24x24 mm vetrini coprioggetto.
12. Timer.
13. Incubatore a 37°C.
14. Colla per vetrini.

Configurazioni ottimali del microscopio e dei filtri

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

Preparazione del campione

Il kit è stato progettato per l'utilizzo con cellule del sangue periferico coltivate o cellule di midollo osseo coltivate, fissate nel fissativo di Carnoy e preparate secondo le linee guida del laboratorio o dell'istituzione. Stendere i campioni da analizzare su vetrini da microscopia secondo le procedure citogenetiche standard.

Protocollo

(Nota: Limitare l'esposizione della sonda alle luci del laboratorio durante l'intera procedura)

Preparazione del vetrino

1. Caricare il campione cellulare su un vetrino da microscopia. Lasciare asciugare il vetrino.
2. Immergere i vetrini in 2xSSC per 2 minuti a temperatura ambiente (TA) senza agitazione.
3. Disidratare in una serie di diluizioni di etanolo (70%, 85% e 100%), ognuna per 2 minuti a TA.
4. Lasciare asciugare il vetrino.

Pre-denaturazione

5. Rimuovere la sonda dal congelatore a -20°C e lasciarla riscaldare a TA.
6. Accertarsi che la soluzione della sonda sia uniforme pipettando ripetutamente con delicatezza.
7. Pipettare 10µl di sonda per test ed inserirli in una provetta da microcentrifuga. Riporre la sonda non utilizzata a -20°C.
8. Pre-riscaldare la sonda, il vetrino ed il coprioggetto su una piastra riscaldante a 37°C (+/- 1°C) per 5 minuti.
9. Caricare 10µl di miscela della sonda sul campione cellulare e coprire delicatamente con il coprioggetto. Sigillare con soluzione collante gommosa e far asciugare completamente.

Denaturazione

10. Denaturare simultaneamente il campione e la sonda riscaldando il vetrino su una piastra riscaldante a 75°C (+/- 1°C) per 2 minuti.

Ibridazione

11. Disporre il vetrino in una camera umida, non permeabile alla luce, a 37°C (+/- 1°C) per tutta la notte.

Lavaggi post-ibridazione

12. Rimuovere accuratamente il vetrino coprioggetto e tutte le tracce di colla.
13. Lavare il vetrino in 0.4xSSC (pH 7.0) a 72°C (+/- 1°C) per 2 minuti, senza agitazione.
14. Scolare il vetrino e lavare in 2xSSC, Tween-20 0,05% (pH 7.0) a TA per 30 secondi senza agitazione.
15. Scolare i vetrini e applicare 10µl di DAPI antifade su ciascun campione.
16. Coprire con un vetrino coprioggetto, rimuovere eventuali bolle e attendere 10 minuti lasciando il vetrino al buio.
17. Analizzare con il microscopio a fluorescenza.

Stabilità del vetrino finito

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

Raccomandazioni per l'uso

1. L'eccessivo riscaldamento o l'invecchiamento dei vetrini non è raccomandato in quanto potrebbe ridurre la fluorescenza del segnale.
2. Le condizioni di ibridazione potrebbero essere influenzate negativamente dall'impiego di reagenti differenti rispetto a quelli forniti o raccomandati da CytoCell Ltd.
3. L'utilizzo di un termometro calibrato è fortemente raccomandato per la misurazione delle temperature delle soluzioni, dei bagni termostati e degli incubatori in quanto queste temperature sono di fondamentale importanza per la performance ottimale del prodotto.
4. Le concentrazioni del lavaggio (stringenza), il pH e la temperatura sono di fondamentale importanza in quanto condizioni di stringenza blande possono favorire un legame non specifico della sonda e condizioni di stringenza troppo elevate possono condurre alla perdita del segnale.
5. La denaturazione incompleta può tradursi in una perdita del segnale mentre una denaturazione eccessiva può anche tradursi in un legame non specifico.

Risultati attesi

In una cellula normale ci dovrebbero essere due segnali rossi e due verdi (2R, 2G). Una cellula con una delezione emizigotica del P16 dovrebbe avere un segnale rosso e due verdi (1R, 2G) mentre una cellula con una delezione omozigotica dovrebbe avere zero segnali rossi e due verdi (0R, 2G).

Limitazioni

La refertazione e l'interpretazione dei risultati della FISH devono essere coerenti con gli standard professionali della pratica medica e dovrebbe prendere in considerazione altre informazioni cliniche e diagnostiche. Questo kit è concepito in aggiunta alla tecnica citogenetica classica e azione terapeutica non deve essere messa in atto esclusivamente sulla base del risultato di FISH.

Informazioni aggiuntive

Per informazioni aggiuntive sul prodotto contattare il Dipartimento di Assistenza Tecnica CytoCell.
T: +44 (0)1223 294048
E: techsupport@cytoCell.com
W: www.cytoCell.com

DEUTSCH

Die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) ist eine Technik, mit der DNA-Sequenzen auf Metaphase-Chromosomen oder Interphase-Kernen in fixierten zytogenetischen Proben nachgewiesen werden können. Dabei werden DNA-Sonden verwendet, die an ganze Chromosomen oder einzelne, einmalige Sequenzen hybridisieren. Kürzliche Entwicklungen haben gezeigt, dass diese nützliche Technik nun auch als essentielles diagnostisches Werkzeug für pränatale, hämatologische und pathologische Chromosomenanalysen eingesetzt werden kann. Nachdem die zu untersuchende DNA fixiert und denaturiert wurde, kann die Fluoreszenz markierte, einzelsträngige Sonde daran binden. Nach der Hybridisierung werden nicht gebundene sowie unspezifisch gebundene DNA-Sonden durch eine Reihe von Waschvorgängen entfernt und die DNA zur Visualisierung gegengefärbt. Unter dem Fluoreszenzmikroskop wird dann die hybridisierte Sonde am Zielmaterial erkennbar.

Sondenspezifikation

P16 9p21.3 Region, rot
D9Z3 9q12 Region, grün

Die P16-Sonde, rot markiert, deckt eine 193kb-Region von 9p21.3 ab, die sich telomerisch von 105kb des P16-Gens bis 46kb zentromerisch von CDKN2B erstreckt. Die Sondenmischung enthält außerdem eine Kontrollsonde für Chromosom 9 (D9Z3, den heterochromatischen Block bei 9q12), grün markiert.

Kitkomponenten

Sonde: 50µl pro Röhrchen (5 tests), 100µl pro Röhrchen (10 tests) oder 200µl pro Röhrchen (20 tests)

Menge an P16 rot: 52-65ng/Test

Menge an D9Z3 grün: 5-6ng/Test

Die Sonden werden vorgemischt und gebrauchsfertig in Hybridisierungslösung geliefert (Formamid, Dextransulfat, SSC).

Gegenfärbung: 150µl pro Röhrchen (15 Tests) oder 500µl pro Röhrchen (50 Tests)

Die Gegenfärbung besteht aus DAPI antifade (ES: 0.125µg/ml DAPI (4,6-Diamidino-2-Phenylindol)).

Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen

1. Zur Verwendung in der *in vitro* Diagnostik. Durchführung ausschließlich durch qualifiziertes Laborpersonal.
2. Beim Umgang mit DNA-Sonden und der DAPI-Gegenfärbung Handschuhe tragen.
3. Sondenmischungen enthalten Formamid, das teratogen ist. Keine Dämpfe einatmen und nicht mit der Haut in Berührung bringen. Handschuhe und Labormantel tragen und unter einer Abzugshaube arbeiten. Bei der Entsorgung mit viel Wasser nachspülen.
4. DAPI ist ein potentielles Karzinogen. Vorsichtig damit umgehen, Handschuhe und Labormantel tragen. Bei der Entsorgung mit viel Wasser nachspülen.
5. Alle Gefahrstoffe sollten gemäß den Ihren hausinternen Richtlinien zur Gefahrstoffentsorgung entsorgt werden.

Lagerung und Behandlung

Das Aquarius®-Kit sollte bis zum Ablaufdatum, das auf dem Kit-Etikett angegeben ist, bei 20°C gelagert werden. Die Röhrchen mit den Sonden und der Gegenfärbung müssen im Dunkeln aufbewahrt werden.

Benötigte, aber nicht mitgelieferte Laborgeräte

1. Heizplatte (mit stabiler Heizplatte und genauer Temperaturregelung bis 80°C).
2. Mikropipetten mit variablem Volumen von 1µl - 200µl.
3. Wasserbad mit genauer Temperaturkontrolle bei 72°C.
4. Mikro-Zentrifugenröhrchen (0,5ml).
5. Fluoreszenzmikroskop (siehe auch "Empfehlungen zum Fluoreszenzmikroskop").
6. Coplin-Färbetrog aus Kunststoff oder Glas.
7. Pinzette.
8. Für Fluoreszenzobjektive geeignetes Immersionsöl.
9. Tischzentrifuge.
10. Objektträger für das Mikroskop.
11. 24x24mm Deckgläser.
12. Timer.
13. 37°C Inkubator.
14. Gummilösung zum Versiegeln der Deckglasränder.

Empfehlungen zum Fluoreszenzmikroskop

Für die optimale Visualisierung der Probe empfehlen wir die Verwendung plan-apochromatischer Objektive mit 63-facher oder 100-facher Vergrößerung sowie einer 100-Watt Quecksilberlampe. Das Dreifach-Bandpassfilter DAPI/FITC/Texasrot ist für die simultane Beobachtung aller drei Fluorophore optimal geeignet.

Probenvorbereitung

Der Kit ist für Verwendung an kultivierten, peripheren Blutzellen und Knochenmarkszellen, die in Carnoy's Fixativ fixiert sind, ausgelegt. Die Vorbereitung erfolgt entsprechend der Laborrichtlinien.

Fertigen Sie die luftgetrockneten Proben auf Objektträgern entsprechend der zytogenetischen Standardvorschriften an.

FISH-Protokoll

(Hinweis: Bitte versuchen Sie nach Möglichkeit, die Sonde vor Licht zu schützen.)

Vorbereitung des Objektträgers

1. Zellprobe auf Objektträger auftropfen und trocknen lassen.
2. Den Objektträger in 2xSSC für 2 Minuten bei RT eintauchen (schütteln nicht notwendig).
3. Dehydratation mittels Alkoholreihe (70%, 85% und 100%), jeweils für 2 Minuten bei RT.
4. Trocknen lassen.

Prä-denaturierung

5. Nehmen Sie die Sonde aus dem Gefrierschrank und lassen Sie diese sich auf Zimmertemperatur aufwärmen.
6. Mischen der Sondenlösung durch mehrmaliges Aufpipettieren.
7. Pro Test 10µl Sonde entnehmen und in ein Mikrozentrifugenröhrchen geben. Bewahren Sie die restliche Sonde bei -20°C auf.
8. Sonde und Probenobjektträger 5 Minuten auf einer Heizplatte bei 37°C (+/- 1°C) vorwärmen.

- 10µl Sondenmischung auf die Zellprobe auftropfen und Deckglas sorgfältig auflegen. Mit Gummikleber-Lösung versiegeln und vollständig trocknen lassen.

Denaturierung

- Denaturieren sie Probe und Sonde gleichzeitig durch 2 minütiges Erwärmen des Objektträgers auf einer Heizplatte bei 75°C (+/- 1°C).

Hybridisierung

- Den Objektträger über Nacht bei 37°C (+/- 1°C) in eine feuchte, lichtdichte Kammer geben.

Waschen nach der Hybridisierung

- Deckgläschen und alle Kleberspuren vorsichtig entfernen.
- Objektträger 2 Minuten in 0,4 x SSC (pH 7,0) bei 72°C (+/- 1°C) waschen.
- Objektträger abtropfen lassen und 30 Sekunden in 2 x SSC, 0,05% Tween-20 bei RT, (pH 7,0), waschen.
- Den Objektträger abtropfen lassen und 10µl des DAPI Antifade zu jeder Probe geben.
- Mit einem Deckglas abdecken, die Luftblasen entfernen and 10 Minuten unter Lichtschutz entwickeln lassen.
- Unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachten.

Stabilität der fertigen Objektträger

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

Empfehlungen zur Durchführung

- Es wird empfohlen, die Auswertung prompt durchzuführen, da das Fluoreszenzsignal mit der Zeit abnimmt. Wärme kann ebenfalls zur Abnahme der Fluoreszenz führen.
- Durch die Verwendung von anderen Reagenzien, als den von Cytozell Ltd. empfohlenen, können die Hybridisierungsbedingungen negativ beeinflusst werden.
- Es wird dringend empfohlen, zur Temperaturmessung von Lösungen, Wasserbädern und Inkubatoren ein geeichtes Thermometer zu verwenden, da diese Temperaturen für die optimale Leistung des Produkts ausschlaggebend sind.
- Die Konzentrationen der Waschlösungen (Stringenz), pH und Temperatur sind wichtig, da niedrig stringente Bedingungen zu nicht-spezifischer Bindung der Sonde führen kann und zu hohe Stringenz zum Verlust des Signals.
- Unvollständige Denaturierung kann zu einem Verlust des Signals führen und übermäßige Denaturierung kann zu nicht-spezifischer Bindung der Sonde führen.

Zu erwartende Ergebnisse

In einer normalen Zelle sollten zwei rote und zwei grüne Signale vorhanden sein (2R, 2G). Eine Zelle mit einer hemizygoten Deletion von P16 sollte ein rotes und zwei grüne Signale (1R, 2G) aufweisen, während eine Zelle mit einer homozygoten Deletion kein rotes und zwei grüne Signale aufweisen sollte (0R, 2G).

Einschränkungen

Protokollierung und Interpretation der FISH Tests sollte nach professionellen Standards für die Praxis und unter Berücksichtigung anderer klinischer und diagnostischer Informationen. Der Test ist als Ergänzung zur klassischen Zytogenetik zu verstehen. Daher sollten therapeutische Maßnahmen nicht allein auf Grundlage der FISH-Ergebnisse veranlasst.

Weitere Informationen:

Weitere Produktinformationen erhalten Sie vom Technischen Kundendienst von Cytozell.
T: +44 (0)1223 294048
E: techsupport@cytozell.com
W: www.cytozell.com

ESPAÑOL

La hibridación *in situ* fluorescente (FISH) es una técnica que permite detectar secuencias de ADN en cromosomas metafásicos o núcleos interfásicos en muestras citogenéticas 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. Recientes estudios indican que esta es una técnica que puede aplicarse como herramienta esencial de diagnóstico prenatal, hematológico y patológico. Después de la fijación, el ADN diana se trata con calor 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 y se aplica un contraste al ADN para su visualización. El uso de un microscopio de fluorescencia permite la visualización de la sonda hibridada en el material utilizado.

Especificaciones de la sonda

Región P16 9p21.3 en rojo
Región D9Z3 9q12 en verde

La sonda P16, marcada en rojo, cubre una región de 193kb de 9p21.3, extendiéndose 105kb telomérica del gen P16 hasta 46kb centromérica de CDKN2B. La combinación de sondas también contiene una sonda de control para el cromosoma 9 (D9Z3, el bloque heterocromático en 9q12) marcada en verde.

Material proporcionado

Sonda: 50µl por vial (5 reacciones), 100µl por vial (10 reacciones) o 200µl por vial (20 reacciones)

Sonda de la región de P16 rojo: 52-65ng/reacción

Sonda de la región de D9Z3 verde: 5-6ng/reacción

La sonda se proporciona mezclada previamente y lista para utilizar en la solución de hibridación (Formamida; sulfato de dextrano; SSC).

Contraste: 150µl por vial (15 reacciones) o 500µl por vial (50 reacciones)
DAPI Antifade (ES: 0.125µg/ml DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol)).

Avisos y precauciones

- Para diagnóstico *in vitro*. Sólo para uso profesional.
- Utilizar guantes al manipular las sondas de ADN y la contraindicación DAPI.
- La sonda contiene formamida, que es teratógena; no respire los vapores y evite el contacto con la piel. Utilizar guantes, bata de laboratorio y manipular utilizando la campana de humos. Para eliminarla, aclarar con abundante agua.
- La contraindicación DAPI puede producir cáncer. Manipular con cuidado; utilizar guantes y bata de laboratorio. Para eliminarla, aclarar con abundante agua.
- Las sustancias peligrosas deben eliminarse de acuerdo con las instrucciones de su institución en relación con la eliminación de sustancias peligrosas

Almacenamiento y manejo

El kit Aquarius® debe almacenarse a -20°C hasta la fecha de caducidad que se indica en la etiqueta del kit. Los viales de contraste y de sonda deben almacenarse en un lugar oscuro.

Equipo necesarios pero no proporcionados

- Placa caliente (con una placa sólida y un control de temperatura preciso hasta 80°C).
- Micropipetas de volumen variable (rango 1µl - 200µl).
- Baño de agua con control preciso de temperatura a 72°C.
- Tubos de microcentrifugado (0.5ml).
- Microscopio de fluorescencia (lea la sección Recomendaciones para el microscopio de fluorescencia).

- Recipientes de cristal y de plástico.
- Pinzas.
- Microscopio de fluorescencia con objetivo de inmersión en aceite.
- Centrífuga de banco.
- Portaobjetos para microscopio.
- Cubreobjetos de 24x24mm.
- Cronómetro.
- Incubador 37°C.
- Pegamento.

Recomendaciones para el microscopio de fluorescencia

El kit está diseñado para su uso en células sanguíneas periféricas cultivadas y fijadas o en células de médula ósea cultivadas y fijadas en fijador de Carnoy, y deben prepararse de acuerdo con las instrucciones del laboratorio o la institución.

Prepare extensiones celulares sobre portaobjetos para microscopio de acuerdo con los procedimientos generales utilizados en citogenética.

Preparación de la muestra

El kit está diseñado para su uso en células sanguíneas periféricas cultivadas y fijadas o en células de médula ósea cultivadas y fijadas en fijador de Carnoy, y deben prepararse de acuerdo con las instrucciones del laboratorio o la institución.

Prepare extensiones celulares sobre portaobjetos para microscopio de acuerdo con los procedimientos generales utilizados en citogenética.

Protocolo FISH

(Observación: asegúrese de limitar la exposición de la sonda a las luces del laboratorio en todo momento)

Preparación del portaobjetos

- Extender la muestra en un portaobjetos. Dejarlo secar.
- Sumerja el portaobjetos en 2xSSC durante 2 minutos a temperatura ambiente sin agitación.
- Deshidrate en una serie de etanol (70%, 85% y 100%), 2 minutos en cada una a TA.
- Dejarlo secar.

Antes de la desnaturalización

- Saque la sonda del congelador a -20°C y deje que se caliente a TA.
- Asegúrese de que la solución de la sonda es uniforme mezclando varias veces con la pipeta.
- Extraiga 10µl de la sonda por prueba, poner en un tubo de microcentrifuga. Vuelva a almacenar el resto de la sonda a -20°C.
- Precaliente el portaobjetos y la muestra en una placa caliente a 37°C (+/- 1°C) durante 5 minutos.
- Ponga 10µl de sonda sobre el portaobjetos y aplique cuidadosamente el cubreobjetos. Selle con solución de goma y deje secar completamente.

Desnaturalización

- Desnaturalice la muestra y la sonda simultáneamente calentando el porta en la placa caliente a 75°C (+/- 1°C) durante 2 minutos.

Hibridación

- Ponga el porta en un contenedor húmedo a prueba de luz a 37°C (+/- 1°C) toda la noche.

Lavados post-hibridación

- Quite el cubreobjetos y los restos de goma cuidadosamente.
- Lave el portaobjetos en 0.4xSSC (pH 7.0) a 72°C (+/- 1°C) durante 2 minutos.
- Seque el portaobjetos y lávelo en 2 x SSC, 0.05% Tween-20 (pH 7.0) a TA durante 30 segundos sin agitación.
- Escurre el portaobjetos y añada 10µl de DAPI antifade sobre cada muestra.
- Aplique un cubreobjetos, elimine burbujas y deje reposar en oscuridad durante 10 minutos.
- Obsérvelo con el microscopio de fluorescencia.

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

- No se recomienda calentar ni envejecer los portaobjetos ya que se podría reducir la fluorescencia de la señal.
- Las condiciones de hibridación pueden verse afectadas negativamente con el uso de reactivos distintos de los suministrados o recomendados por Cytozell Ltd.
- Se recomienda encarecidamente el uso de un termómetro calibrado para medir las temperaturas de soluciones, baños de agua e incubadores ya que estas temperaturas son cruciales para el rendimiento óptimo del producto.
- Las concentraciones del lavado (stringencia), el pH y la temperatura son importantes ya que una stringencia baja puede provocar una fijación no específica de la sonda y demasiada stringencia puede derivar en una falta de señal.
- Una desnaturalización incompleta puede provocar falta de señal y una desnaturalización excesiva también puede originar una fijación no específica.

Resultados esperados

En una célula normal deben existir dos señales rojas y dos verdes (2R, 2V). Una célula con una deleción hemiciigótica del P16 debe tener una señal roja y dos señales verdes (1R, 2V) mientras que una célula con deleción homocigótica no tendrá ninguna señal roja y presentará dos señales verdes (0R, 2V).

Limitaciones

La comunicación y la interpretación de FISH debe ser conforme a los estándares de prácticas profesionales, y debe tener en consideración otra información clínica y de diagnóstico. Esta prueba está diseñada como un complemento de la citogenética clásica y no deben tomarse medidas terapéuticas basándose únicamente en el resultado de FISH.

Información adicional

Si desea obtener información adicional sobre el producto, póngase en contacto con el Departamento de soporte técnico de Cytozell.






T: +44 (0)1223 294048

E: techsupport@cytozell.com

W: www.cytozell.com

Referencias/Bibliographie/Bibliographia/Literatur/Bibliografía

- Heerema *et al.*, Blood 1999; 94:1537-1544
- Secker-Walker *et al.*, Br J Haematol 1997;96(3):601-10
- Okuda *et al.*, Blood 1995;85(9):2321-30
- Fry *et al.*, Mol Cancer Ther. 2004 Nov;3(11):1427-38.

REF	EN: Catalogue number DE: Bestellnummer FR: Référence du catalogue IT: Riferimento di Catalogo ES: Número de catálogo
IVD	EN: <i>In vitro</i> diagnostic device DE: <i>In-vitro</i> -Diagnostikum FR: Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i> IT: Dispositivo medico-diagnostico <i>in vitro</i> ES: Producto sanitario para diagnóstico <i>in vitro</i>
LOT	EN: Batch code DE: Loscode FR: Code du lot IT: Codice di lotto ES: Código
	EN: Consult instructions for use DE: Gebrauchsanweisung beachten FR: Consulter la notice d'utilisation IT: Consultare le istruzioni per l'uso ES: Consúltense las instrucciones de uso
	EN: Manufacturer DE: Hersteller FR: Fabricant IT: Fabricante ES: Fabricante
	EN: Use by DE: Verwendbar bis FR: Utiliser jusqu'au IT: Utilizzare entro ES: Fecha de caducidad
	EN: Temperature limitation DE: Temperaturbegrenzung FR: Limites de température IT: Limiti di temperatura ES: Limitación de temperatura
	EN: Sufficient for <n> tests DE: Ausreichend für FR: Suffisant pour IT: Sufficiente per ES: Válido para
CONT	EN: Contents DE: Inhalt FR: Contenu IT: Contenuto ES: Contenido

Patents and Trademarks

Aquarius and Cytocell are registered trademarks of Cytocell Ltd.
This product contains technology licensed from Life Technologies Corporation and is available for human diagnostics or life science research use only.



Cytocell Ltd.
3-4 Technopark
Newmarket Road
Cambridge, CB5 8PB, UK.
T: +44(0)1223 294048
F: +44(0)1223 294986
E: probes@cytocell.com
W: www.cytocell.com