



Instructions For Use

REF: LPP xxR/G

Painting Probes



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

Whole chromosome painting probes are specific for each chromosome and are derived from flow-sorted chromosomes. They are libraries of many sequential sequences extending along the whole length of the chromosome.

Probe Specification

The probes are directly labelled with either a red or a green fluorophore. For detailed probe specifications refer to Table 1.

Table 1: Probe Specifications

Chromosome	Catalogue Number*
1	LPP 01R/G
2	LPP 02R/G
3	LPP 03R/G
4	LPP 04R/G
5	LPP 05R/G
6	LPP 06R/G
7	LPP 07R/G
8	LPP 08R/G
9	LPP 09R/G
10	LPP 10R/G
11	LPP 11R/G
12	LPP 12R/G
13	LPP 13R/G
14	LPP 14R/G
15	LPP 15R/G
16	LPP 16R/G
17	LPP 17R/G
18	LPP 18R/G
19	LPP 19R/G
20	LPP 20R/G
21	LPP 21R/G
22	LPP 22R/G
X	LPP 0XR/G
Y	LPP 0YR/G

*R specifies a red label and G specifies a green label

This Aquarius® kit contains only one of the probes from the range of directly labelled whole chromosome painting probes.

Materials Provided

Probe: 50µl per vial (5 tests)

Amount of red whole chromosome painting probe: 18-38ng/test

Amount of green whole chromosome painting probe: 56-94ng/test

The probes are provided in hybridisation solution (Formamide; Dextran Sulphate; SSC) and are ready to use. They are labelled with either a red or a green fluorophore.

Counterstain: 150µl per vial (15 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 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.

Suggestions for mixing probes

1. Mixing one red probe and one green probe: 5µl of red probe and 5µl of green probe per test.
2. Mixing one red, one green and a yellow probe: 3µl of red probe, 3µl of green probe and for the yellow: 2µl of red probe and 2µl of green probe for the same chromosome per test.

These volumes are for use as recommendations only. These volumes may require optimisation.

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

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. The X chromosome painting probe contains the pseudoautosomal regions common with the Y chromosome. Consequently, cross-hybridisation may be observed in these regions.
5. Chromosomes 1, 5 and 19 have centromeric DNA sequences in common. Consequently cross-hybridisations in these regions may be observed between these chromosomes.
6. Chromosome 1 whole chromosome painting probe may show a brighter signal at 1p36.
7. Whole chromosome painting probes do not cover the heterochromatic blocks in chromosomes 1, 9 and 16.
8. The chromosome 21 whole chromosome painting probe may show cross-hybridisation to the subtelomere region of chromosome 1 p-arm.

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 diagnostic 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.

Informations sur les sondes

Les sondes de peinture des chromosomes entiers sont spécifiques pour chaque chromosome et sont dérivées de chromosomes séparés par tri en flux. Elles constituent des bibliothèques de nombreuses séquences séquentielles s'étendant sur toute la longueur des chromosomes.

Caractéristiques de la sonde

Les sondes sont directement marquées à l'aide d'un fluorophore rouge ou vert. Pour les spécifications détaillées des sondes, se reporter au tableau 1.

Tableau 1 : spécifications des sondes

Chromosome	Numéro de catalogue*
1	LPP 01R/G
2	LPP 02R/G
3	LPP 03R/G
4	LPP 04R/G
5	LPP 05R/G
6	LPP 06R/G
7	LPP 07R/G
8	LPP 08R/G
9	LPP 09R/G
10	LPP 10R/G
11	LPP 11R/G
12	LPP 12R/G
13	LPP 13R/G
14	LPP 14R/G
15	LPP 15R/G
16	LPP 16R/G

17	LPP 17R/G
18	LPP 18R/G
19	LPP 19R/G
20	LPP 20R/G
21	LPP 21R/G
22	LPP 22R/G
X	LPP 0XR/G
Y	LPP 0YR/G

*R spécifie un marquage rouge et G spécifie un marquage vert

Cette trousse Aquarius® ne contient que l'une des sondes de la gamme des sondes de peinture de chromosomes entiers directement marquées.

Conditionnement

Sonde : 50µl par tube (5 tests)

Quantité de sonde peinture rouge de chromosome entier : 18-38ng/test

Quantité de sonde peinture verte de chromosome entier : 56-94ng/test.

La sonde est fournie prête-à-l'emploi dans le tampon d'hybridation (formamide, sulfate de dextran, SSC). Elles sont marquées à l'aide d'un fluorophore rouge ou vert.

Contre-colorant : 150µl par tube (15 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 or 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 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 ciment 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 ciment.
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 seconde 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.

Suggestions pour le mélange des sondes

1. Mélanger une sonde rouge et une sonde verte : 5 µl de sonde rouge et 5 µl de sonde verte par test.

- Mélanger une sonde rouge, une sonde verte et une sonde jaune : 3 µl de sonde rouge, 3 µl de sonde verte et pour la sonde jaune : 2 µl de sonde rouge et 2 µl de sonde verte pour le même chromosome par test.

Ces volumes à utiliser doivent être considérés comme des recommandations uniquement. Une optimisation des volumes peut être nécessaire.

Stabilité des lames

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

Recommandations

- Cuire ou vieillir les lames n'est pas recommandé, ceci pouvant réduire l'intensité du signal.
- Les conditions d'hybridation peuvent être affectées par l'utilisation de réactifs autres que ceux fournis ou recommandés par Cytocell Ltd.
- L'utilisation d'un thermomètre calibré est fortement recommandé pour mesurer les températures des solutions, bains-marie et incubateurs. Ces températures sont essentielles pour une efficacité optimale du produit.
- Les concentrations des lavages (stringence), pH et température sont importants. Une faible stringence peut résulter en une liaison non-spécifique de la sonde et une trop forte stringence peut résulter en une perte de signal.
- Une dénaturation incomplète peut engendrer une perte de signal et une trop forte dénaturation une hybridation non-spécifique.

Résultats attendus

- Les sondes de peinture des chromosomes acrocentriques comportent du matériel de bras court, partagé entre les chromosomes des groupes D et G, de sorte qu'une hybridation croisée peut être constatée dans ces régions.
- La sonde de peinture de chromosome entier spécifique du chromosome 16 peut présenter une faible hybridation croisée dans les régions hétérochromatiques du chromosome Y.
- La sonde de peinture spécifique du chromosome Y contient les régions pseudoautosomales communes avec le chromosome X. Par conséquent, une hybridation croisée peut être observée dans ces régions.
- La sonde de peinture spécifique du chromosome X contient les régions pseudoautosomales communes avec le chromosome Y. Par conséquent, une hybridation croisée peut être observée dans ces régions.
- Les chromosomes 1, 5 et 19 possèdent en commun des séquences d'ADN centromérique. Par conséquent, des hybridations croisées peuvent être observées entre ces chromosomes.
- La sonde de peinture de chromosome entier spécifique du chromosome 1 peut présenter un signal plus intense en 1p36.
- Les sondes de peinture de chromosome entier ne couvrent pas les blocs hétérochromatiques des chromosomes 1, 9 et 16.
- La sonde de peinture de chromosome entier spécifique du chromosome 21 peut présenter une hybridation croisée dans la région subtelomérique du bras court (p) du chromosome 1.

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 coltura dopo prelievo. La tecnica prevede l'utilizzo di sonde di DNA in grado di ibridare con l'intero cromosoma o con singole sequenze. La FISH costituisce quindi un potente strumento in aggiunta alle tecniche citogenetiche classiche. Recenti sviluppi hanno reso possibile che questa preziosa tecnica può ora essere applicata come strumento diagnostico essenziale nell'analisi cromosomica prenatale, ematologica 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.

Informazioni sulle sonde

Le sonde painting per cromosomi interi sono specifiche per ciascun cromosoma e derivano da cromosomi ottenuti per flow sorting. Sono librerie di numerose sequenze sequenziali che si estendono per tutta la lunghezza del cromosoma.

Specifiche della sonda

Le sonde vengono marcate direttamente con un fluoroforo rosso o verde. Per i particolari sulle specifiche delle sonde fare riferimento alla Tabella 1.

Tabella 1: Specifiche delle sonde

Cromosoma	Numero di catalogo*
1	LPP 01R/G
2	LPP 02R/G
3	LPP 03R/G
4	LPP 04R/G
5	LPP 05R/G
6	LPP 06R/G
7	LPP 07R/G
8	LPP 08R/G
9	LPP 09R/G
10	LPP 10R/G
11	LPP 11R/G
12	LPP 12R/G
13	LPP 13R/G
14	LPP 14R/G
15	LPP 15R/G
16	LPP 16R/G
17	LPP 17R/G
18	LPP 18R/G
19	LPP 19R/G
20	LPP 20R/G
21	LPP 21R/G
22	LPP 22R/G
X	LPP 0XR/G
Y	LPP 0YR/G

* La lettera "R" indica la marcatura in rosso, la "G" la marcatura in verde

Questo kit Aquarius® contiene soltanto una delle sonde painting per cromosomi interi marcate direttamente, comprese nella serie.

Materiali forniti

Sonda: 50µl per provetta (5 test)

Quantità della sonda painting per cromosoma intero marcata in rosso: 18-38ng/test

Quantità della sonda painting per cromosoma intero marcata in verde: 56-94ng/test

La sonda è fornita già miscelata e pronta per l'uso nella soluzione di ibridazione (Formamide; Destrano solfato; SSC). Sono marcate con un fluoroforo rosso o verde.

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

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

Avvertenze e misure precauzionali

- Per uso diagnostico *in vitro*. Per uso professionale.
- Quando si manipolano le sonde ed il colorante di contrasto DAPI è necessario indossare i guanti.
- Le miscele di sonda contengono formamide, una sostanza 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.
- Il DAPI è un potenziale cancerogeno. Maneggiare con cura, indossare guanti ed un camice da laboratorio. Per lo smaltimento, lavare con grandi quantità di acqua.
- Eseguire lo smaltimento dei materiali pericolosi nel rispetto delle normative interne dell'istituzione relative allo smaltimento dei 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

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

Configurazione ottimale del microscopio e dei filtri

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

Preparazione del campione

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

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

Pre-denaturazione

- Rimuovere la sonda dal congelatore a -20°C e lasciarla riscaldare a TA.
- Accertarsi che la soluzione della sonda sia uniforme pipettando ripetutamente con delicatezza.
- Pipettare 10µl di sonda per test ed inserirli in una provetta da microcentrifuga. Riporre la sonda non utilizzata a -20°C.
- Pre-riscaldare la sonda, il vetrino ed il coprioggetto su una piastra riscaldante a 37°C (+/- 1°C) per 5 minuti.
- 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

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

Ibridazione

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

Lavaggi post-ibridazione

- Rimuovere accuratamente il vetrino coprioggetto e tutte le tracce di colla.
- Lavare il vetrino in 0,4xSSC (pH 7,0) a 72°C (+/- 1°C) per 2 minuti, senza agitazione.
- Scolare il vetrino e lavare in 2xSSC, Tween-20 0,05% (pH 7,0) a TA per 30 secondi senza agitazione.
- Scolare i vetrini e applicare 10µl di DAPI antifade su ciascun campione.
- Coprire con un vetrino coprioggetto, rimuovere eventuali bolle e attendere 10 minuti lasciando il vetrino al buio.
- Analizzare con il microscopio a fluorescenza.

Suggerimenti per la miscelazione delle sonde

- Miscelazione di una sonda rossa e una sonda verde: 5 µl di sonda rossa e 5 µl di sonda verde per test.
- Miscelazione di una sonda rossa, una verde e una gialla: 3 µl di sonda rossa, 3 µl di sonda verde e, per la sonda gialla, 2 µl di sonda rossa e 2 µl di sonda verde per lo stesso cromosoma, per test.

Questi sono solo volumi consigliati per l'uso, può essere necessario correggerli per ottimizzarli.

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

1. Le sonde painting per cromosomi acrocentrici contengono materiale del braccio corto. Tale materiale è condiviso dai cromosomi dei gruppi D e G, per cui in queste regioni si può osservare un'ibridizzazione crociata.
2. La sonda painting per cromosoma intero per il cromosoma 16 può mostrare una lieve ibridizzazione crociata con le regioni eterocromatiche del cromosoma Y.
3. La sonda painting per il cromosoma Y contiene le regioni pseudoautosomiali in comune con il cromosoma X, perciò in queste regioni si può osservare un'ibridizzazione crociata.
4. La sonda painting per il cromosoma X contiene le regioni pseudoautosomiali in comune con il cromosoma Y, perciò in queste regioni si può osservare un'ibridizzazione crociata.
5. I cromosomi 1, 5 e 19 hanno sequenze in comune del DNA centromerico, perciò in queste regioni si possono osservare ibridizzazioni crociate tra questi cromosomi.
6. La sonda painting per cromosoma intero per il cromosoma 1 può mostrare un segnale più luminoso in 1p36.
7. Le sonde painting per cromosoma intero non coprono i blocchi eterocromatici nei cromosomi 1, 9 e 16.
8. La sonda painting per cromosoma intero per il cromosoma 21 può mostrare ibridizzazione crociata con la regione subtelomerica del braccio p del cromosoma 1.

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@cytozell.com
W: www.cytozell.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.

Sondeninformation

Sonden zur Einfärbung eines ganzen Chromosoms (Whole Chromosome Painting-Sonden) sind für jedes Chromosom spezifisch und leiten sich von mithilfe der Flusszytometrie sortierten Chromosomen ab. Bibliotheken vieler sequenzieller Sequenzen, die sich über die gesamte Länge des Chromosoms erstrecken, sind verfügbar

Sondenspezifikation

Die Sonden sind direkt mit einem roten oder einem grünen Fluorophor markiert. In Tabelle 1 sind detaillierte Sondenspezifikationen gezeigt.

Tabelle 1: Sondenspezifikationen

Chromosom	Katalognummer*
1	LPP 01R/G
2	LPP 02R/G
3	LPP 03R/G
4	LPP 04R/G
5	LPP 05R/G
6	LPP 06R/G
7	LPP 07R/G
8	LPP 08R/G
9	LPP 09R/G
10	LPP 10R/G
11	LPP 11R/G
12	LPP 12R/G
13	LPP 13R/G
14	LPP 14R/G
15	LPP 15R/G
16	LPP 16R/G
17	LPP 17R/G
18	LPP 18R/G
19	LPP 19R/G
20	LPP 20R/G
21	LPP 21R/G
22	LPP 22R/G
X	LPP 0XR/G
Y	LPP 0YR/G

*R steht für die rote Markierung und G für die grüne Markierung

Dieses Aquarius® Kit enthält nur eine der Sonden aus der Palette der direkt markierten Whole Chromosome Painting-Sonden.

Kitkomponenten

Sonde: 50µl pro Röhrchen (5 tests)
Menge an roter Whole Chromosome Painting-Sonde: 18-38ng/Test
Menge an grüner Whole Chromosome Painting-Sonde: 56-94ng/Test

Die Sonden wird vorgemischt und gebrauchsfertig in Hybridisierungslösung geliefert (Formamid, Dextransulfat, SSC). Sie sind mit einem roten oder einem grünen Fluorophor markiert.

Gegenfärbung: 150µl pro Röhrchen (15 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 Labpersonal.
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 planapochromatischer 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 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. Dehydration 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.
8. Bewahren Sie die restliche Sonde bei -20°C auf.
9. Sonde und Probenobjektträger 5 Minuten auf einer Heizplatte bei 37°C (+/- 1°C) vorwärmen.
10. 10µl Sondenmischung auf die Zellprobe auftropfen und Deckglas sorgfältig auflegen. Mit Gummikleber-Lösung versiegeln und vollständig trocknen lassen.

Denaturierung

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

Hybridisierung

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

Waschen nach der Hybridisierung

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

Vorschläge zum Mischen von Sonden

1. Mischen einer roten Sonde und einer grünen Sonde: 5 µl rote Sonde und 5 µl grüne Sonde pro Test.
2. Mischen einer roten, einer grünen und einer gelben Sonde: 3 µl rote Sonde, 3 µl grüne Sonde und für die gelbe: 2 µl rote Sonde und 2 µl grüne Sonde für dasselbe Chromosom pro Test.

Diese Volumina dienen nur als Richtwerte. Möglicherweise müssen diese Volumina optimiert werden.

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. Es wird empfohlen, die Auswertung prompt durchzuführen, da das Fluoreszenzsignal mit der Zeit abnimmt. Wärme kann ebenfalls zur Abnahme der Fluoreszenz führen.
2. Durch die Verwendung von anderen Reagenzien, als den von Cytocell Ltd. empfohlenen, können die Hybridisierungsbedingungen negativ beeinflusst werden.
3. 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 hoher 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

- Die akrozentrischen Chromosome-Painting-Sonden enthalten Kurzzarmaterial. Dies wird von Chromosomen der D & G-Gruppe gemeinsam genutzt, so dass in diesen Regionen Kreuzhybridisierung beobachtet werden kann.
- Die Whole Chromosome Painting-Sonde für Chromosom 16 kann schwache Kreuzhybridisierung mit den heterochromatischen Regionen von Chromosom Y zeigen.
- Die Painting-Sonde für Chromosom Y enthält die pseudoautosomalen Regionen, die mit dem X-Chromosom identisch sind. Daher kann in diesen Regionen Kreuzhybridisierung beobachtet werden.
- Die Painting-Sonde für Chromosom X enthält die pseudoautosomalen Regionen, die mit dem Y-Chromosom identisch sind. Daher kann in diesen Regionen Kreuzhybridisierung beobachtet werden.
- Chromosomen 1, 5 und 15 haben gemeinsame zentromere DNA-Sequenzen. Daher können zwischen diesen Chromosomen Kreuzhybridisierungen in diesen Regionen beobachtet werden.
- Die Whole Chromosome Painting-Sonde für Chromosom 1 kann bei 1p36 ein helleres Signal zeigen.
- Whole Chromosome Painting-Sonden decken die heterochromatischen Blöcke der Chromosomen 1, 9 und 16 nicht ab.
- Die Whole Chromosome Painting-Sonde für Chromosom 21 kann Kreuzhybridisierung mit der subtileren Region des p-Arms von Chromosom 1 zeigen.

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 Cytocell.
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 desnaturizar el ADN bicatenario haciendo que resulte monocatenario. El ADN diana queda entonces disponible para hibridarlo con una sonda de ADN igualmente desnaturizado, monocatenario marcado con fluorescencia que tiene una secuencia complementaria. Después de la hibridación la sonda de ADN no específicamente hibridada y no hibridada se elimina 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.

Información sobre las sondas

Las sondas para el pintado de cromosomas enteros son específicas de cada cromosoma y derivan de cromosomas sometidos a citometría de flujo. Son adenotecas de muchas secuencias secuenciales que se encuentran por todo el cromosoma.

Especificaciones de la sonda

Las sondas están marcadas directamente con un fluorocromo rojo o verde. Para las especificaciones detalladas de las sondas consulte la Tabla 1.

Tabla 1: Especificaciones de las sondas

Cromosoma	Código de Catálogo *
1	LPP 01R/G
2	LPP 02R/G
3	LPP 03R/G
4	LPP 04R/G
5	LPP 05R/G
6	LPP 06R/G
7	LPP 07R/G
8	LPP 08R/G
9	LPP 09R/G
10	LPP 10R/G
11	LPP 11R/G
12	LPP 12R/G
13	LPP 13R/G
14	LPP 14R/G
15	LPP 15R/G
16	LPP 16R/G
17	LPP 17R/G
18	LPP 18R/G
19	LPP 19R/G
20	LPP 20R/G
21	LPP 21R/G
22	LPP 22R/G
X	LPP 0XR/G
Y	LPP 0YR/G

*R indica un marcador rojo y G un marcador verde

Este kit Aquarius® contiene solo una de las sondas de toda la gama de sondas de pintado de cromosomas enteros marcadas directamente.

Material proporcionado

Sonda: 50µl por vial (5 reacciones)
Cantidad de sonda roja de pintado de cromosomas enteros: 18-38ng/reacción
Cantidad de sonda verde de pintado de cromosomas enteros: 56-94ng/reacción
Las sondas se presentan en solución de hibridación (formamida; sulfato de dextrano; SSC) y listas para usar. Están marcadas directamente con un fluorocromo rojo o verde.

Contraste: 150µl por vial (15 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 contratención 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 contratención 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

Para una visualización óptima de la sonda, se recomienda utilizar una lámpara de mercurio de 100 vatios y objetivos x63 o x100 Plan-Apochromat. El filtro de triple banda DAPI/FITC/Texas Red es óptimo para ver simultáneamente los tres fluorocromos.

Preparación de la muestra

El kit está diseñado para su uso en células sanguíneas periféricas 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.

Indicaciones para mezclar las sondas

- Mezcla de una sonda roja y una sonda verde: 5 µl de sonda roja y 5 µl de sonda verde por reacción..
- Mezcla de una sonda roja y una verde y una amarilla: 3 µl de sonda roja, 3 µl de sonda verde, y para la amarilla: 2 µl de sonda roja y 2 µl de sonda verde para el mismo cromosoma por reacción..

Estos volúmenes son meramente indicativos. Puede ser necesario optimizarlos.

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 Cytocell 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 (estrिंगencia), el pH y la temperatura son importantes ya que una estrिंगencia baja puede provocar una fijación no específica de la sonda y demasiada estrिंगencia 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

- Las sondas de pintado de cromosomas acrocéntricos contienen material de los brazos cortos. Este es común a los cromosomas de los grupos D y G, de forma que puede observarse una hibridación cruzada entre estas regiones.
- La sonda de pintado de cromosomas enteros del cromosoma 16 puede mostrar una leve hibridación cruzada con las regiones heterocromáticas del cromosoma Y.









3. La sonda de pintado del cromosoma Y contiene las regiones pseudoautosómicas que comparte con el cromosoma X. Por tanto, puede observarse hibridación cruzada en estas regiones.
4. La sonda de pintado del cromosoma X contiene las regiones pseudoautosómicas que comparte con el cromosoma Y. Por tanto, puede observarse hibridación cruzada en estas regiones.
5. Los cromosomas 1, 5 y 19 contienen secuencias comunes de ADN centromérico. Por ello, pueden observarse hibridaciones cruzadas entre estos cromosomas en estas regiones.
6. La sonda de pintado de cromosomas enteros del cromosoma 1 puede mostrar una señal más fuerte en 1p36.
7. Las sondas de pintado de cromosomas enteros no cubren los bloques heterocromáticos de los cromosomas 1, 9 y 16.
8. La sonda de pintado de cromosomas enteros del cromosoma 21 puede mostrar hibridación cruzada en la región subtelomérica del brazo p del cromosoma 1.

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

REF	EN: Catalogue number DE: Bestellnummer FR: Référence du catalogue IT: Riferimento di Catalogo ES: Número de catálogo
	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>
	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: Fabbricante 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
	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@cytozell.com
 W: www.cytozell.com