



### Instructions For Use

REF:  
LPT MRK / LPT MRK-S,  
LPT MRKxx / LPT MRKxx-S

### TeloMark



PROFESSIONAL USE ONLY

ENGLISH/FRANÇAIS/ITALIANO/DEUTSCH/ESPAÑOL  
Further information available at [www.cytocell.com](http://www.cytocell.com)

#### Intended Use

Cytocell's TeloMark kit is intended to identify, via Fluorescence *In Situ* Hybridisation (FISH), copy number changes or rearrangements involving the subtelomere regions of human chromosomes in patients with mental retardation or developmental delay. Centromere and locus specific probes are intended for enumeration only. It is intended to be used on cultured peripheral blood lymphocytes. This product is for professional use only and is intended to be an adjunct to Clinical Cytogenetics.

#### Background

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

Subtelomere FISH analysis is a commonly used as an adjunct to routine cytogenetic testing in order to detect small rearrangements involving the telomeric regions of chromosomes. Patients can be referred for telomere analyses for a number of different reasons, including genetic disease, autistic disorders, unexplained mental retardation/developmental delay, recurrent miscarriages and haematological malignancies<sup>1-4</sup>.

Cytocell's TeloMark kit consists of 41 subtelomere specific probes, three centromere and six locus specific probes (50 different probes in total). The subtelomere probes represent all chromosome ends apart from the p-arms of the five acrocentric chromosomes and with no distinction between the X and Y due to clones being located in the pseudoautosomal regions. All of these probes map to unique regions of the chromosomes, within 850kb of the true telomere.

The probes in TeloMark are provided as 15 separate mixes, either provided individually or as a kit containing all 15. All probes are directly labelled in orange, green, yellow (orange and green combined) or blue.

#### Probe Specification

Mix	Probes	Concentrations
Mix 01	1p in Green 1q in Orange Xp/Yp in Orange and Green (Yellow) DXZ1 in Blue	41-62ng/test 18-22ng/test 118-168ng/test 25-37ng/test
Mix 02	2p in Green 2q in Orange Xq/Yq in Orange and Green (Yellow) DXZ1 in Blue	41-62ng/test 18-22ng/test 59-84ng/test 25-37ng/test
Mix 03	3p in Green 3q in Orange 22q in Orange and Green (Yellow) BCR (22q11) in Blue	41-62ng/test 18-22ng/test 59-84ng/test 76-110ng/test
Mix 04	4p in Green 4q in Orange 21q in Orange and Green (Yellow) AML1 (RUNX1) (21q22) in Blue	41-62ng/test 18-22ng/test 59-84ng/test 76-110ng/test
Mix 05	5p in Green 5q in Orange	41-62ng/test 18-22ng/test
Mix 06	6p in Green 6q in Orange 13q in Orange and Green (Yellow) 13q14 in Blue	41-62ng/test 18-22ng/test 59-84ng/test 102-146ng/test

Mix 07	7p in Green 7q in Orange 14q in Orange and Green (Yellow) TCRAD (14q11.2) in Blue	41-62ng/test 18-22ng/test 59-84ng/test 76-110ng/test
Mix 08	8p in Green 8q in Orange 17p in Orange and Green (Yellow) D17Z1 in Blue	41-62ng/test 18-22ng/test 79-111ng/test 25-37ng/test
Mix 09	9p in Green 9q in Orange 17q in Orange and Green (Yellow) D17Z1 in Blue	41-62ng/test 18-22ng/test 59-84ng/test 25-37ng/test
Mix 10	10p in Green 10q in Orange 15q in Orange and Green (Yellow) PML (15q24) in Blue	41-62ng/test 18-22ng/test 118-168ng/test 76-110ng/test
Mix 11	11p in Green 11q in Orange 18p in Orange and Green (Yellow) D18Z1 in Blue	27-41ng/test 12-14ng/test 45-63ng/test 25-37ng/test
Mix 12	12p in Green 12q in Orange 18q in Orange and Green (Yellow) D18Z1 in Blue	82-123ng/test 36-43ng/test 99-139ng/test 25-37ng/test
Mix 13	16p in Green 16q in Orange	41-62ng/test 18-22ng/test
Mix 14	19p in Green 19q in Orange E2A (TCF3) (19p13) in Blue	41-62ng/test 19-23ng/test 36-51ng/test
Mix 15	20p in Green 20q in Orange	21-31ng/test 13-15ng/test

#### Materials Provided

**Probe:** 15µl per vial (5 tests) or 30µl per vial (10 tests)

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

#### Counterstain:

150µl per tube (LPT MRKxx/LPT MRKxx-S), 300µl per tube (LPT MRK-S) or 600µl per tube (LPT MRK)

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

#### Warnings and Precautions

- For *in vitro* diagnostic use. For professional use only.
- Wear gloves when handling DNA probes and DAPI counterstain.
- Probe mixtures contain formamide, which is a teratogen; do not breathe fumes or allow skin contact. Wear gloves, a lab coat, and handle in a fume hood. Upon disposal, flush with a large volume of water.
- DAPI is a potential carcinogen. Handle with care; wear gloves and a lab coat. Upon disposal, flush with a large volume of water.
- All hazardous materials should be disposed of according to your institution's guidelines for hazardous waste disposal.
- Take care not to let coverslips touch on the slide after the addition of the probe as this may cause cross contamination between probes.
- Users of this product must be capable of visually distinguishing between the colours red, blue and green.

#### Storage and Handling

The Aquarius<sup>®</sup> 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

- Hotplate (with a solid plate and accurate temperature control up to 80°C).
- Variable volume micropipettes and tips range 1µl - 200µl.
- Water bath with accurate temperature control at 72°C.
- Microcentrifuge tubes (0.5ml).
- Fluorescence microscope (Please see Fluorescence Microscope Recommendation section).
- Plastic or glass coplin jars.
- Forceps.
- Fluorescence grade microscope lens immersion oil.
- Bench top centrifuge.
- Microscope slides.
- 12mm coverslips.
- Timer.
- 37°C incubator.
- 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 filters DAPI/FITC/Texas Red or DAPI/FITC/TRITC are optimal for viewing all fluorophores and DAPI simultaneously. Alternatively for viewing orange and green fluorophores use dual bandpass filters FITC/Texas Red or FITC/TRITC. The blue fluorophore has specificity to the Aqua and DEAC spectrum (single bandpass Aqua or DEAC filter is required).

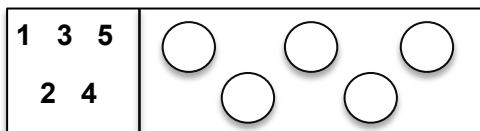
The fluorescence microscope should be checked before use to ensure it is operating correctly. Immersion oil should be suitable for use in fluorescence microscopy and formulated for low autofluorescence. Manufacturers' recommendations should be followed in regards to the life of the lamp and the age of the filters.

#### 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.

#### Slide preparation

- Spot the cell sample onto 3 glass microscope slides with 5 target areas per slide in order to hybridise all 15 TeloMark mixes. Apply 3µl of cell sample per area. Allow to dry.



Example of slide number 1 containing targets 1, 2, 3, 4 and 5. Repeat the same process for slides 2 and 3 with 5 targets per slide.

#### Recommended slide Pretreatment:

1. Immerse the slide in 2xSSC for 2 minutes at 37°C.
2. Place the slide in freshly made pepsin working solution (5mg of pepsin added to 100ml of 0.01M HCl) for 10 minutes at 37°C.
3. Immerse the slide in phosphate buffered saline (PBS) at RT for 5 minutes.
4. Immerse the slide in post fixation solution (0.95% formaldehyde: 1.0ml of 37% formaldehyde, 0.18g of MgCl<sub>2</sub> and 39.0ml of PBS) for 5 minutes at RT.
5. Immerse the slide in PBS at RT for 5 minutes.
6. Immerse the slide in 70% ethanol at RT. Allow the slide to stand in the ethanol wash for 1 minute.
7. Remove the slide from 70% ethanol. Repeat step 6 with 85% ethanol, followed by 100% ethanol.
8. Allow to air dry.

#### FISH Protocol (skip this step if the slide was pretreated according to the protocol above)

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

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

#### Pre-Denaturation

1. Remove the probe from the freezer and allow it to warm to room temperature (RT). Briefly centrifuge tubes before use.
2. Ensure that the probe solution is uniformly mixed with a pipette.
3. Place the probe mixes and the sample slide to prewarm on a 37°C (+/- 1°C) hotplate for 5 minutes.
4. Spot 3µl of probe mixture onto the corresponding target area and carefully apply a 12mm coverslip. Seal with rubber solution glue and allow the glue to dry completely.

#### Denaturation

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

#### Hybridisation

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

#### Post-Hybridisation Washes

7. Remove the coverslip and all traces of glue carefully.
8. Immerse the slide in 0.4xSSC (pH 7.0) at 72°C (+/- 1°C) for 2 minutes without agitation.
9. Drain the slide and immerse it in 2xSSC, 0.05% Tween-20 at RT (pH 7.0) for 30 seconds without agitation.
10. Drain the slide and apply 10µl of DAPI antifade onto either end of each slide.
11. Cover with a 22x50mm coverslip, remove any bubbles and allow the colour to develop in the dark for 10 minutes.
12. 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

Normal cells should show the results listed in the table below. For mixes 1 and 2, the number of normal blue signals will vary between male (1 blue) and female (2 blue) samples.

Any deviations from the results listed below should be classed as abnormal.

Mix	Normal Expected Results
Mix 01	2 Green, 2 Orange, 2 Yellow, 1 or 2 Blue (2G, 2O, 2Y, 1/2B)
Mix 02	2 Green, 2 Orange, 2 Yellow, 1 or 2 Blue (2G, 2O, 2Y, 1/2B)
Mix 03	2 Green, 2 Orange, 2 Yellow, 2 Blue (2G, 2O, 2Y, 2B)
Mix 04	2 Green, 2 Orange, 2 Yellow, 2 Blue (2G, 2O, 2Y, 2B)
Mix 05	2 Green, 2 Orange (2G, 2O)
Mix 06	2 Green, 2 Orange, 2 Yellow, 2 Blue (2G, 2O, 2Y, 2B)
Mix 07	2 Green, 2 Orange, 2 Yellow, 2 Blue (2G, 2O, 2Y, 2B)
Mix 08	2 Green, 2 Orange, 2 Yellow, 2 Blue (2G, 2O, 2Y, 2B)
Mix 09	2 Green, 2 Orange, 2 Yellow, 2 Blue (2G, 2O, 2Y, 2B)
Mix 10	2 Green, 2 Orange, 2 Yellow, 2 Blue (2G, 2O, 2Y, 2B)
Mix 11	2 Green, 2 Orange, 2 Yellow, 2 Blue (2G, 2O, 2Y, 2B)
Mix 12	2 Green, 2 Orange, 2 Yellow, 2 Blue (2G, 2O, 2Y, 2B)
Mix 13	2 Green, 2 Orange (2G, 2O)

Mix 14	2 Green, 2 Orange, 2 Blue (2G, 2O, 2B)
Mix 15	2 Green, 2 Orange (2G, 2O)

#### Known Cross Reactivity

Mix	Known Cross Reactivity
Mix 01	None
Mix 02	None
Mix 03	22q with 2q (pericentromeric)
Mix 04	None
Mix 05	None
Mix 06	None
Mix 07	14q with 16 (centromeric)
Mix 08	8p to XpYp telomere region
Mix 09	9q to chromosome 1 (interstitial)
Mix 10	None
Mix 11	11p to 17p
Mix 12	None
Mix 13	None
Mix 14	None
Mix 15	20q to 6p and 4q (interstitial)

#### 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. Failure to adhere to the protocol may alter the performance of the assay and may yield erroneous results.

#### 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

#### Utilisation prévue

Le kit TeloMark de CytoCELL est conçu pour identifier, par hybridation *in situ* en fluorescence (FISH), les modifications ou les réarrangements du nombre de copies impliquant les régions subtélomériques de chromosomes humains chez des patients présentant un retard mental ou un retard de développement. Les sondes centromériques et sondes locus spécifique sont conçues pour l'énumération uniquement. Ce kit est conçu pour être utilisé sur les cultures de lymphocytes du sang périphérique. Ce produit est à usage professionnel uniquement et est un complément de la cytogénétique classique.

#### Contexte

L'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) est une technique qui permet la détection de séquences d'ADN sur des chromosomes métaphasiques ou dans des noyaux interphasiques provenant d'échantillons cytogénétiques. Cette technique utilise des sondes d'ADN qui s'hybrident aux chromosomes entiers ou à des séquences spécifiques uniques, et est un excellent complément de la cytogénétique classique. Les récents développements ont permis à ce que cette technique précieuse puisse maintenant être utilisée comme un outil de diagnostic essentiel dans des analyses chromosomiques prénatales, hématologiques et pathologiques. L'ADN cible, après fixation et dénaturation, est prêt pour l'hybridation à une sonde d'ADN marquée par fluorescence, dénaturée de manière similaire et qui possède une séquence complémentaire. Après l'hybridation, la sonde d'ADN non liée et liée de manière non spécifique est éliminée et l'ADN est contre-coloré pour sa visualisation. La microscopie à fluorescence permet ensuite la visualisation de la sonde hybridée sur le matériau cible.

#### Informations concernant la sonde

L'analyse subtélomérique FISH est couramment utilisée comme complément des tests de cytogénétique de routine afin de détecter les petits réarrangements impliquant les régions télomériques des chromosomes. Les patients peuvent être adressés pour des analyses télomériques pour un certain nombre de raisons différentes, notamment une maladie génétique, des troubles autistiques, un retard mental/un retard de développement inexpliqué, des fausses couches à répétition et les tumeurs malignes hématologiques<sup>1-4</sup>.

Le kit TeloMark de CytoCELL comprend 41 sondes subtélomériques spécifiques, trois sondes centromériques et six sondes locus spécifique (soit un total de 50 sondes différentes). Les sondes subtélomériques représentent tous les extrémités des chromosomes en dehors des bras p des cinq chromosomes acrocentriques et sans distinction entre X et Y en raison de clones situés dans les régions pseudoautosomiques. Toutes ces sondes cartographient des régions uniques des chromosomes, sur 850kb du télomère naturel.

Les sondes de TeloMark se présentent sous forme de 15 mélanges séparés, fournis individuellement ou sous la forme d'un kit contenant les 15 mélanges. Toutes les sondes sont directement marquées en orange, vert, jaune (orange et vert combinés) ou bleu.

#### Spécification des sondes

Mélange	Description du mélange de la sonde	Concentrations
Mélange 01	1p en vert	41-62ng/test
	1q en orange	18-22ng/test
	Xp/Yp en orange et vert (jaune) DXZ1 en bleu	118-168ng/test 25-37ng/test
Mélange 02	2p en vert	41-62ng/test
	2q en orange	18-22ng/test
	Xq/Yq en orange et vert (jaune) DXZ1 en bleu	59-84ng/test 25-37ng/test
Mélange 03	3p en vert	41-62ng/test
	3q en orange	18-22ng/test
	22q en orange et vert (jaune) BCR (22q11) en bleu	59-84ng/test 76-110ng/test
Mélange 04	4p en vert	41-62ng/test
	4q en orange	18-22ng/test
	21q en orange et vert (jaune) AML1 (RUNX1) (21q22) en bleu	59-84ng/test 76-110ng/test
Mélange 05	5p en vert	41-62ng/test
	5q en orange	18-22ng/test

Mélange 06	6p en vert 6q en orange 13q en orange et vert (jaune) 13q14 en bleu	41-62ng/test 18-22ng/test 59-84ng/test 102-146ng/test
Mélange 07	7p en vert 7q en orange 14q en orange et vert (jaune) TCRAD (14q11.2) en bleu	41-62ng/test 18-22ng/test 59-84ng/test 76-110ng/test
Mélange 08	8p en vert 8q en orange 17p en orange et vert (jaune) D17Z1 en bleu	41-62ng/test 18-22ng/test 79-111ng/test 25-37ng/test
Mélange 09	9p en vert 9q en orange 17q en orange et vert (jaune) D17Z1 en bleu	41-62ng/test 18-22ng/test 59-84ng/test 25-37ng/test
Mélange 10	10p en vert 10q en orange 15q en orange et vert (jaune) PML (15q24) en bleu	41-62ng/test 18-22ng/test 118-168ng/test 76-110ng/test
Mélange 11	11p en vert 11q en orange 18p en orange et vert (jaune) D18Z1 en bleu	27-41ng/test 12-14ng/test 45-63ng/test 25-37ng/test
Mélange 12	12p en vert 12q en orange 18q en orange et vert (jaune) D18Z1 en bleu	82-123ng/test 36-43ng/test 99-139ng/test 25-37ng/test
Mélange 13	16p en vert 16q en orange	41-62ng/test 18-22ng/test
Mélange 14	19p en vert 19q en orange E2A (TCF3) (19p13) en bleu	41-62ng/test 19-23ng/test 36-51ng/test
Mélange 15	20p en vert 20q en orange	21-31ng/test 13-15ng/test

#### Composants fournis

**Sonde** : 15µl par flacon (5 tests) ou 30µl par flacon (10 tests)

Les sondes sont prémélangées dans une solution d'hybridation (formamide ; sulfate de dextrane ; SSC) et sont prêtes à l'emploi.

#### Contre-coloration :

150µl par tube (LPT MRKxx/LPT MRKxx-S), 300µl par tube (LPT MRK-S) ou 600µl par tube (LPT MRK)

La contre-coloration est une solution de DAPI/antifade (ES : 0,125 µg/ml de DAPI (4,6-diamidino-2-phénylindole)).

#### Mises en garde et précautions

- Pour une utilisation *in vitro* pour un diagnostic. Pour un usage professionnel uniquement.
- Porter des gants lors de la manipulation des sondes d'ADN et du contre-colorant DAPI.
- Les mélanges de sonde contiennent du formamide, qui est un tératogène ; ne pas respirer ses vapeurs ni le mettre en contact avec la peau. Porter des gants, une blouse de laboratoire et manipuler sous une hotte. Après utilisation, rincer avec un grand volume d'eau.
- DAPI est potentiellement cancérigène. Doit être manipulé avec précaution ; porter des gants et une blouse de laboratoire. Après utilisation, rincer avec un grand volume d'eau.
- Toutes les substances dangereuses doivent être éliminées conformément aux directives en vigueur pour l'élimination des déchets dangereux.
- Prendre soin de ne pas mettre les lamelles en contact avec la lame après l'ajout de la sonde car cela pourrait provoquer une contamination croisée entre les sondes.
- Les utilisateurs de ce produit doivent être capables de différencier visuellement les couleurs rouge, bleu et vert.

#### Stockage et manipulation

Le kit Aquarius® doit être conservé à -20°C jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette du kit. Les flacons des sondes et du contre-colorant doivent être stockés dans l'obscurité.

#### Équipement nécessaire mais non fourni

- Plaque chauffante (avec une plaque en fonte et un régulateur de température précis allant jusqu'à 80°C).
- Micropipettes à volume variable de 1µl à 200µl et embouts.
- Bain d'eau avec un régulateur de température précis à 72°C.
- Tubes microcentrifugés (0,5ml).
- Microscope à fluorescence (se référer à la partie recommandation concernant le microscope à fluorescence).
- Bocal Coplin en plastique ou en verre
- Forceps.
- Huile d'immersion pour lentille de microscope à fluorescence.
- Centrifugeuse de paillasse.
- Lames de microscope.
- Lamelles de 12mm.
- Minuteur.
- Incubateur à 37°C.
- Colle sous forme de solution de caoutchouc.

#### Recommandation concernant le microscope à fluorescence

Pour une visualisation optimale de la sonde, nous recommandons une lampe à mercure de 100 watts et des objectifs plan-apochromatiques x63 ou x100. Les filtres passe-bande triples DAPI/FITC/Texas Red ou DAPI/FITC/TRITC sont parfaits pour la visualisation de tous les fluorophores et de DAPI de manière simultanée. En variante, pour la visualisation des fluorophores orange et vert, il est possible d'utiliser des filtres passe-bande double FITC/Texas Red ou FITC/TRITC. Le fluorophore bleu a une spécificité pour les spectres Aqua et DEAC (un filtre passe-bande unique Aqua ou DEAC est nécessaire).

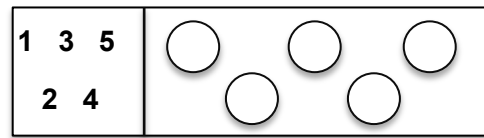
Le microscope à fluorescence doit être vérifié avant utilisation, afin de s'assurer qu'il fonctionne correctement. L'huile d'immersion doit être adaptée à une utilisation en microscopie par fluorescence et formulée pour une auto-fluorescence faible. Il convient de respecter les recommandations du fabricant concernant la durée de vie de la lampe et l'âge des filtres.

#### Préparation des échantillons

Le kit est conçu pour être utilisé sur des cellules de sang périphérique cultivées et fixées avec le fixateur de Carnoy, qui doivent être préparées selon les protocoles en vigueur dans le laboratoire ou l'établissement.

#### Préparation des lames

- Déposer une goutte d'échantillon cellulaire sur 3 lames de microscope en verre avec 5 zones cibles par lame afin d'hybrider les 15 mélanges TeloMark. Déposer 3µl d'échantillon cellulaire par zone. Laisser sécher.



Exemple de la lame N° 1 contenant les cibles 1, 2, 3, 4 et 5. Répéter les mêmes opérations pour les lames 2 et 3 avec 5 cibles par lame.

#### Prétraitement des échantillons recommandé :

- Immerger le échantillon dans du tampon 2xSSC pendant 2 minutes à 37°C.
- Mettre le échantillon dans une solution de pepsine fraîchement préparée (5mg de pepsine ajoutée dans 100ml de 0,01M HCl) pendant 10 minutes à une température de 37°C.
- Immerger le échantillon dans une solution saline tamponnée au phosphate pendant 5 minutes à TA.
- Immerger le échantillon dans la solution post-fixation (0,95% de formaldéhyde : 1,0ml de 37% de formaldéhyde, 0,18g MgCl<sub>2</sub> et 39,0ml de la solution saline tamponnée au phosphate) pendant 5 minutes à TA.
- Immerger le échantillon dans une solution saline tamponnée au phosphate pendant 5 minutes à TA.
- Immerger le échantillon dans de l'éthanol à 70% à TA. Laisser le échantillon dans la solution éthanol pendant une minute.
- Sortir le échantillon de l'éthanol à 70%. Répéter l'étape 6 avec de l'éthanol à 85%, suivi par une procédure avec de l'éthanol à 100%.
- Laisser sécher à l'air libre.

#### Protocole FISH (sauter cette étape si la lame a été prétraitée conformément au protocole décrit ci-dessus)

(Remarque : veuillez vous assurer que la sonde est exposée de manière limitée aux éclairages du laboratoire).

- Immerger la lame dans 2xSSC pendant 2 minutes à température ambiante (TA) sans agitation.
- Déshydrater dans différentes concentrations d'éthanol (70%, 85% et 100%), pendant 2 minutes à température ambiante à chaque fois.
- Laisser sécher.

#### Pré-Dénaturation

- Retirer la sonde du congélateur et la laisser se réchauffer à température ambiante (TA). Centrifuger brièvement les tubes avant ouverture.
- Vérifier que la solution de la sonde est mélangée de manière uniforme avec une pipette.
- Placer les mélanges de sonde et la lame d'échantillon pour un préchauffage à 37°C (+/- 1°C) sur une plaque chauffante pendant 5 minutes.
- Déposer une goutte de 3µl de mélange de sonde sur la zone cible correspondante et déposer avec précaution une lamelle de 12mm. Sceller avec une colle sous forme de solution de caoutchouc et laisser la colle sécher totalement.

#### Dénaturation

- Dénaturer l'échantillon et la sonde simultanément par chauffage des lames sur une plaque chauffante à 75°C (+/- 1°C) pendant 2 minutes.

#### Hybridation

- Placer la lame dans un récipient humide et opaque à 37°C (+/- 1°C) pendant toute une nuit.

#### Lavages post-hybridation

- Retirer avec précaution la lamelle et toute trace de colle.
- Immerger la lame dans 0,4xSSC (pH 7,0) à 72°C (+/- 1°C) pendant 2 minutes sans agitation.
- Égoutter la lame et l'immerger dans 2xSSC, 0,05% de Tween-20 à température ambiante (pH 7,0) pendant 30 secondes sans agitation.
- Égoutter la lame et déposer 10µl de solution DAPI/antifade sur l'une des extrémités de chaque lame.
- Recouvrir avec une lamelle de 22x50mm, éliminer toutes les bulles et laisser la couleur se développer dans le noir pendant 10 minutes.
- Visualiser la lame avec un microscope à fluorescence.

#### Stabilité des lames préparées

Les lames préparées selon le protocole FISH peuvent être analysées pendant 1 mois si elles sont stockées dans le noir et à/au-dessous de la température ambiante.

#### Recommandations de procédure

- La cuisson ou le vieillissement des lames n'est pas recommandé(e) car cela peut réduire la fluorescence du signal.
- Les conditions d'hybridation peuvent être affectées de manière néfaste par l'utilisation de réactifs autres que ceux fournis ou recommandés par CytoCELL Ltd.
- L'utilisation d'un thermomètre calibré est fortement recommandée pour mesurer les températures des solutions, des bains-marie et des incubateurs, car ces températures sont déterminantes pour une performance optimale du produit.
- Les concentrations de lavage, le pH et les températures sont importants car un manque de rigueur peut entraîner une liaison non spécifique de la sonde et une trop grande rigueur peut se traduire par une perte de signal.
- Une dénaturation incomplète peut entraîner une perte de signal et une sur dénaturation peut également se traduire par une liaison non spécifique.

#### Résultats attendus

Les cellules normales devraient donner les résultats indiqués dans le tableau ci-dessous. Pour les mélanges 1 et 2, le nombre de signaux bleus normaux va varier entre les échantillons des sujets masculins (1 signal bleu) et des sujets féminins (2 signaux bleus).

Tout écart par rapport aux résultats présentés ci-dessous doit être considéré comme anormal.

Mélange	Résultats attendus normaux
Mélange 01	2 signaux verts, 2 signaux orange, 2 signaux jaunes, 1 ou 2 signaux bleus (2G, 2O, 2Y, 1/2B)
Mélange 02	2 signaux verts, 2 signaux orange, 2 signaux jaunes, 1 ou 2 signaux bleus (2G, 2O, 2Y, 1/2B)
Mélange 03	2 signaux verts, 2 signaux orange, 2 signaux jaunes, 2 signaux bleus (2G, 2O, 2Y, 2B)
Mélange 04	2 signaux verts, 2 signaux orange, 2 signaux jaunes, 2 signaux bleus (2G, 2O, 2Y, 2B)
Mélange 05	2 signaux verts, 2 signaux orange (2G, 2O)
Mélange 06	2 signaux verts, 2 signaux orange, 2 signaux jaunes, 2 signaux bleus (2G, 2O, 2Y, 2B)
Mélange 07	2 signaux verts, 2 signaux orange, 2 signaux jaunes, 2 signaux bleus (2G, 2O, 2Y, 2B)
Mélange 08	2 signaux verts, 2 signaux orange, 2 signaux jaunes, 2 signaux bleus (2G, 2O, 2Y, 2B)

Mélange 09	2 signaux verts, 2 signaux orange, 2 signaux jaunes, 2 signaux bleus (2G, 2O, 2Y, 2B)
Mélange 10	2 signaux verts, 2 signaux orange, 2 signaux jaunes, 2 signaux bleus (2G, 2O, 2Y, 2B)
Mélange 11	2 signaux verts, 2 signaux orange, 2 signaux jaunes, 2 signaux bleus (2G, 2O, 2Y, 2B)
Mélange 12	2 signaux verts, 2 signaux orange, 2 signaux jaunes, 2 signaux bleus (2G, 2O, 2Y, 2B)
Mélange 13	2 signaux verts, 2 signaux orange (2G, 2O)
Mélange 14	2 signaux verts, 2 signaux orange, 2 signaux bleus (2G, 2O, 2B)
Mélange 15	2 signaux verts, 2 signaux orange (2G, 2O)

#### Réactivité croisée connue

Mélange	Réactivité croisée connue
Mélange 01	Aucune
Mélange 02	Aucune
Mélange 03	22q avec 2q (péricentromérique)
Mélange 04	Aucune
Mélange 05	Aucune
Mélange 06	Aucune
Mélange 07	14q avec 16 (centromérique)
Mélange 08	8p au niveau de la région télomère XpYp
Mélange 09	9q au niveau du chromosome 1 (interstitielle)
Mélange 10	Aucune
Mélange 11	11p au niveau de 17p
Mélange 12	Aucune
Mélange 13	Aucune
Mélange 14	Aucune
Mélange 15	20q au niveau de 6p et 4q (interstitielle)

#### Restrictions

La divulgation et l'interprétation des résultats de FISH doivent être compatibles avec les normes professionnelle en vigueur et doivent prendre en considération d'autres informations cliniques et de diagnostic. Ce kit est conçu comme un complément d'autres tests de diagnostic en laboratoire et une action thérapeutique ne doit pas être mise en œuvre en se basant uniquement sur les résultats de FISH. Le non-respect du protocole peut altérer la performance du test et peut donner lieu à des résultats erronés.

#### Informations complémentaires

Pour plus d'informations concernant le produit, veuillez contacter le service assistance technique de Cytocell.  
Tél : +44 (0)1223 294048  
E-mail : techsupport@cytocell.com  
Site internet : www.cytocell.com

#### ITALIANO

#### Uso previsto

Il kit TeloMark di Cytocell è concepito per identificare mediante ibridazione *in situ* fluorescente (Fluorescence *In Situ* Hybridisation - FISH) modifiche del numero di copie o riarrangiamenti che coinvolgono le regioni subtelomeriche dei cromosomi umani in pazienti affetti da ritardo mentale o ritardo dello sviluppo. Le sonde specifiche per centromero e loco sono destinate alla mera elencazione. Si intende utilizzare il kit su linfociti di sangue periferico coltivati. Questo prodotto deve essere utilizzato solo a scopo professionale ed è concepito come ausilio per le tecniche di citogenetica clinica.

#### Contesto

L'ibridazione *in situ* fluorescente (FISH) è una tecnica che consente di rilevare sequenze di DNA su cromosomi in metafase o in nuclei in interfase da campioni citogenetici fissati. La tecnica prevede l'uso di sonde di DNA in grado di ibridarsi con cromosomi interi o con singole sequenze univoche e costituisce un potente ausilio per la citogenetica classica. Grazie ai recenti sviluppi, questa preziosa tecnica può ora essere applicata come fondamentale strumento diagnostico nell'analisi cromosomica prenatale, ematologica e patologica. Il DNA bersaglio, dopo fissaggio e denaturazione, è disponibile per l'annealing con una sonda di DNA analogamente denaturata e marcata con una sostanza fluorescente, che presenta una sequenza complementare. Dopo l'ibridazione, la sonda di DNA non legata e legata in modo aspecifico viene rimossa e il DNA viene colorato con un colorante di contrasto per la visualizzazione. La sonda ibridata sul materiale bersaglio viene infine visualizzata mediante un microscopio a fluorescenza.

#### Informazioni sulla sonda

L'analisi FISH subtelomeriche è utilizzata comunemente come uno strumento aggiuntivo per i test citogenetici ordinari al fine di rilevare piccoli riarrangiamenti che coinvolgono le regioni telomeriche dei cromosomi. Ai pazienti può essere consigliata un'analisi telomeriche per numerose ragioni differenti, incluse malattie genetiche, disturbi autistici, inspiegato ritardo mentale/ritardo nello sviluppo, aborti ricorrenti e malattie ematologiche maligne<sup>1-4</sup>.

Il kit TeloMark di Cytocell è costituito da 41 sonde specifiche per subtelomeri, tre sonde specifiche per centromeri e sei per loci (50 sonde differenti in totale). Le sonde subtelomeriche rappresentano tutte le terminazioni cromosomiche ad eccezione dei bracci p dei cinque cromosomi acrocentrici e senza distinzione tra X e Y, poiché i cloni si trovano nelle regioni pseudoautosomiche. Tutte queste sonde mappano regioni uniche dei cromosomi, fino a un massimo di 850kb del telomero effettivo.

Le sonde in TeloMark sono fornite come 15 miscele separate, ciascuna fornita singolarmente o come kit contenente tutte e 15 le sonde. Tutte le sonde sono marcate direttamente in arancione, verde, giallo (arancione e verde combinati) o blu.

#### Specifiche delle sonde

Miscela	Descrizione della miscela della sonda	Concentrazioni
Miscela 01	1p in verde 1q in arancione Xp/Yp in arancione e verde (giallo) DXZ1 in blu	41-62ng/test 18-22ng/test 118-168ng/test 25-37ng/test
Miscela 02	2p in verde 2q in arancione Xq/Yq in arancione e verde (giallo) DXZ1 in blu	41-62ng/test 18-22ng/test 59-84ng/test 25-37ng/test
Miscela 03	3p in verde 3q in arancione 22q in arancione e verde (giallo) BCR (22q11) in blu	41-62ng/test 18-22ng/test 59-84ng/test 76-110ng/test

Miscela 04	4p in verde 4q in arancione 21q in arancione e verde (giallo) AML1 (RUNX1) (21q22) in blu	41-62ng/test 18-22ng/test 59-84ng/test 76-110ng/test
Miscela 05	5p in verde 5q in arancione	41-62ng/test 18-22ng/test
Miscela 06	6p in verde 6q in arancione 13q in arancione e verde (Giallo) 13q14 in blu	41-62ng/test 18-22ng/test 59-84ng/test 102-146ng/test
Miscela 07	7p in verde 7q in arancione 14q in arancione e verde (giallo) TCRAD (14q11.2) in blu	41-62ng/test 18-22ng/test 59-84ng/test 76-110ng/test
Miscela 08	8p in verde 8q in arancione 17p in arancione e verde (giallo) D17Z1 in blu	41-62ng/test 18-22ng/test 79-111ng/test 25-37ng/test
Miscela 09	9p in verde 9q in arancione 17q in arancione e verde (giallo) D17Z1 in blu	41-62ng/test 18-22ng/test 59-84ng/test 25-37ng/test
Miscela 10	10p in verde 10q in arancione 15q in arancione e verde (giallo) PML (15q24) in blu	41-62ng/test 18-22ng/test 118-168ng/test 76-110ng/test
Miscela 11	11p in verde 11q in arancione 18p in arancione e verde (Giallo) D18Z1 in blu	27-41ng/test 12-14ng/test 45-63ng/test 25-37ng/test
Miscela 12	12p in verde 12q in arancione 18q in arancione e verde (giallo) D18Z1 in blu	82-123ng/test 36-43ng/test 99-139ng/test 25-37ng/test
Miscela 13	16p in verde 16q in arancione	41-62ng/test 18-22ng/test
Miscela 14	19p in verde 19q in arancione E2A (TCF3) (19p13) in blu	41-62ng/test 19-23ng/test 36-51ng/test
Miscela 15	20p in verde 20q in arancione	21-31ng/test 13-15ng/test

#### Materiali forniti

**Sonda:** 15µl per flaconcino (5 test) oppure 30µl per flaconcino (10 test)

Le sonde vengono consegnate premiscelate in soluzione di ibridazione (formamide, destran solfato, SSC) e sono pronte all'uso.

#### Colorante di contrasto:

150µl per provetta (LPT MRKxx/LPT MRKxx-S), 300µl per provetta (LPT MRK-S) oppure 600µl per provetta (LPT MRK)

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

#### Avvertenze e misure precauzionali

- Per uso diagnostico *in vitro*. Esclusivamente per uso professionale.
- Quando si manipolano le sonde di DNA e il colorante di contrasto DAPI, è necessario indossare i guanti.
- Le miscele delle sonde 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 e un camicia da laboratorio. Per lo smaltimento, lavare con grandi quantità di acqua.
- Eseguire lo smaltimento dei materiali pericolosi nel rispetto delle linee guida della propria struttura in materia di smaltimento dei rifiuti pericolosi.
- I vetrini coprioggetto non devono andare a contatto con il vetrino dopo aver aggiunto la sonda, il contatto potrebbe provocare contaminazione incrociata tra le sonde.
- Coloro che utilizzano questo prodotto devono essere in grado di distinguere visivamente i colori rosso, blu e verde.

#### 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 necessarie ma non fornite

- Piastra riscaldante (con una piastra robusta e un controllo accurato della temperatura fino a 80°C)
- Micropipette e puntali a volume variabile compreso tra 1µl e 200µl
- Bagno termostato con controllo accurato della temperatura a 72°C
- Provette°C da microcentrifuga (0,5ml)
- Microscopio a fluorescenza (fare riferimento alla sezione Configurazione ottimale del microscopio a fluorescenza)
- Vaschette di Coplin in plastica o vetro
- Pinzette
- Olio per lenti ad immersione del microscopio a fluorescenza
- Centrifuga da banco
- Vetrini da microscopio
- Vetrini coprioggetto da 12mm
- Timer
- Incubatore a 37°C
- Sigillante per vetrini a base gommosa

#### Configurazione ottimale del microscopio a fluorescenza

Per una visualizzazione ottimale della sonda, si raccomanda di utilizzare una lampada a mercurio da 100 watt e obiettivi plan apochromat 63x o 100x. I tripli filtri passa banda DAPI/FITC/Texas Red o DAPI/FITC/TRITC sono ottimali per visualizzare tutti i fluorofori e il DAPI contemporaneamente. In alternativa, per visualizzare i fluorofori arancioni e verdi, utilizzare i doppi filtri passa banda FITC/Texas Red o FITC/TRITC. Il fluoroforo blu è specifico per lo spettro di Aqua e DEAC (è necessario il singolo filtro passa banda Aqua o DEAC).

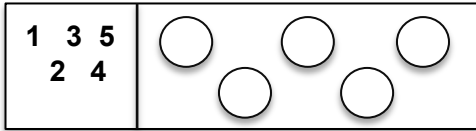
Prima dell'uso il microscopio a fluorescenza deve essere controllato per garantire che funzioni correttamente. L'olio di immersione deve essere adatto per l'uso con i microscopi a fluorescenza e progettato con una bassa autofluorescenza. Seguire le raccomandazioni del produttore sulla durata della lampadina e dei filtri.

#### Preparazione del campione

Il kit è concepito per essere utilizzato su cellule del sangue periferico coltivate fissate nel fissativo di Carnoy che deve essere preparato secondo le linee guida del laboratorio o della struttura.

#### Preparazione del vetrino

- Caricare il campione cellulare su 3 vetrini da microscopio con 5 aree bersaglio per vetrino, al fine di ibridare tutte e 15 le miscele TeloMark. Applicare 3µl di campione cellulare per area. Lasciare asciugare.



Esempio di vetrino numero 1, contenente i bersagli 1, 2, 3, 4 e 5. Ripetere lo stesso procedimento per i vetrini 2 e 3 con 5 bersagli per vetrino.

#### Pretrattamento raccomandato per i vetrini:

- Immergere il vetrino in SSC2X per 2 minuti a 37°C.
- Collocare il vetrino in una soluzione di lavoro di pepsina appena preparata (5mg di pepsina aggiunti a 100ml di HCl 0,01M) per 10 minuti a 37°C.
- Immergere il vetrino in tampone fosfato salino (PBS) a TA per 5 minuti.
- Immergere il vetrino in una soluzione post-fissazione (formaldeide allo 0,95%: 1,0 ml di formaldeide al 37%, 0,18g di MgCl<sub>2</sub> e 39,0ml di PBS) per 5 minuti a TA.
- Immergere il vetrino in PBS a TA per 5 minuti.
- Immergere il vetrino in una soluzione di etanolo al 70% a TA. Lasciare il vetrino nel lavaggio in etanolo per 1 minuto.
- Rimuovere il vetrino dalla soluzione di etanolo al 70%. Ripetere il passaggio 6 con etanolo all'85% e poi con etanolo al 100%.
- Lasciare asciugare all'aria.

#### Protocollo FISH (se il vetrino è stato sottoposto a pretrattamento come descritto nel protocollo riportato sopra, saltare questo passaggio)

- (Nota: limitare l'esposizione della sonda alle luci del laboratorio durante l'intera procedura)
- Immergere i vetrini in 2xSSC per 2 minuti a temperatura ambiente (TA), senza agitazione.
  - Disidratare in una serie di diluizioni di etanolo (70%, 85% e 100%), ognuna per 2 minuti a TA.
  - Lasciare asciugare.

#### Pre-denaturazione

- Rimuovere la sonda dal congelatore e lasciarla riscaldare a temperatura ambiente (TA). Centrifugare brevemente i tubi prima dell'uso.
- Assicurarsi che la soluzione della sonda sia uniformemente miscelata utilizzando una pipetta.
- Pre-riscaldare le miscele della sonda e il vetrino con il campione su una piastra riscaldante a 37°C (+/- 1°C) per 5 minuti.
- Caricare 3µl di miscela della sonda sull'area bersaglio corrispondente e applicare con cautela un vetrino coprioggetto da 12mm. Sigillare con soluzione a base gommosa e lasciare asciugare completamente il sigillante.

#### Denaturazione

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

#### Ibridazione

- Disporre il vetrino in un contenitore umido, 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 sigillante.
- Immergere il vetrino in 0,4xSSC (pH 7,0) a 72°C (+/- 1°C) per 2 minuti, senza agitazione.
- Far sgocciolare il vetrino e immergerlo in 2xSSC, Tween-20 allo 0,05% (pH 7,0) a TA per 30 secondi, senza agitazione.
- Far sgocciolare il vetrino e applicare 10µl di DAPI/Antifade su ciascuna estremità di ciascun vetrino.
- Coprire con un vetrino coprioggetto da 22x50mm, rimuovere eventuali bolle e lasciare che si sviluppi il colore lasciando il vetrino al buio per 10 minuti.
- Analizzare con il microscopio a fluorescenza.

#### Stabilità dei vetrini finiti

I vetrini sottoposti a FISH restano analizzabili per un tempo massimo di 1 mese, se conservati al buio e a temperatura ambiente o inferiore.

#### Raccomandazioni per l'uso

- L'eccessivo riscaldamento o l'invecchiamento dei vetrini non è raccomandato in quanto potrebbe ridurre la fluorescenza del segnale.
- Le condizioni di ibridazione potrebbero essere influenzate negativamente dall'impiego di reagenti differenti rispetto a quelli forniti o raccomandati da Cytocell Ltd.
- L'uso di un termometro calibrato è fortemente consigliato per misurare le temperature delle soluzioni, dei bagni termostatici e degli incubatori, in quanto queste temperature sono di fondamentale importanza affinché il prodotto fornisca le prestazioni ottimali.
- Le concentrazioni del lavaggio, il pH e le temperature sono importanti in quanto una bassa stringenza può favorire un legame non specifico della sonda e una stringenza troppo elevata può condurre alla perdita del segnale.
- La denaturazione incompleta può tradursi in una perdita del segnale, mentre una denaturazione eccessiva può anche tradursi in un legame non specifico.

#### Risultati attesi

Le cellule normali dovrebbero mostrare i risultati elencati nella seguente tabella. Per le miscele 1 e 2, il numero di segnali blu normali varierà tra campioni maschili (1 blu) e femminili (2 blu).

Qualsiasi scostamento rispetto ai risultati elencati di seguito deve essere classificato come anormale.

Miscela	Risultati normali attesi
Miscela 01	2 verdi, 2 arancioni, 2 gialli, 1 o 2 blu (2V, 2A, 2G, 1/2B)
Miscela 02	2 verdi, 2 arancioni, 2 gialli, 1 o 2 blu (2V, 2A, 2G, 1/2B)
Miscela 03	2 verdi, 2 arancioni, 2 gialli, 2 blu (2V, 2A, 2G, 2B)
Miscela 04	2 verdi, 2 arancioni, 2 gialli, 2 blu (2V, 2A, 2G, 2B)
Miscela 05	2 verdi, 2 arancioni (2V, 2A)
Miscela 06	2 verdi, 2 arancioni, 2 gialli, 2 blu (2V, 2A, 2G, 2B)
Miscela 07	2 verdi, 2 arancioni, 2 gialli, 2 blu (2V, 2A, 2G, 2B)
Miscela 08	2 verdi, 2 arancioni, 2 gialli, 2 blu (2V, 2A, 2G, 2B)
Miscela 09	2 verdi, 2 arancioni, 2 gialli, 2 blu (2V, 2A, 2G, 2B)
Miscela 10	2 verdi, 2 arancioni, 2 gialli, 2 blu (2V, 2A, 2G, 2B)
Miscela 11	2 verdi, 2 arancioni, 2 gialli, 2 blu (2V, 2A, 2G, 2B)

Miscela 12	2 verdi, 2 arancioni, 2 gialli, 2 blu (2V, 2A, 2G, 2B)
Miscela 13	2 verdi, 2 arancioni (2V, 2A)
Miscela 14	2 verdi, 2 arancioni, 2 blu (2V, 2A, 2B)
Miscela 15	2 verdi, 2 arancioni (2V, 2A)

#### Reattività crociata nota

Miscela	Reattività crociata nota
Miscela 01	Assente
Miscela 02	Assente
Miscela 03	22q con 2q (pericentromerica)
Miscela 04	Assente
Miscela 05	Assente
Miscela 06	Assente
Miscela 07	14q con 16 (centromerica)
Miscela 08	Regione telomerica da 8p a XpYp
Miscela 09	Da 9q a cromosoma 1 (interstiziale)
Miscela 10	Assente
Miscela 11	Da 11p a 17p
Miscela 12	Assente
Miscela 13	Assente
Miscela 14	Assente
Miscela 15	Da 20q a 6p e 4q (interstiziale)

#### Limitazioni

La refertazione e l'interpretazione dei risultati della FISH devono essere coerenti con gli standard professionali della pratica medica e devono tenere in considerazione altre informazioni cliniche e diagnostiche. Il presente kit è concepito come strumento aggiuntivo per altri test diagnostici di laboratorio e non deve essere intrapresa alcuna azione terapeutica esclusivamente sulla base del risultato della FISH. La mancata adesione al protocollo può alterare le prestazioni del saggio e condurre a risultati errati.

#### Informazioni aggiuntive

Per informazioni aggiuntive sul prodotto, contattare il Dipartimento di Assistenza tecnica Cytocell.  
Tel: +44 (0)1223 294048  
E-mail: techsupport@cytocell.com  
Indirizzo web: www.cytocell.com

#### DEUTSCH

#### Bestimmungsgemäße Verwendung

Das TeloMark-Kit von Cytocell dient dazu, mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) Kopienzahlveränderungen oder Umlagerungen (Rearrangements) in den subtelomeren Regionen von menschlichen Chromosomen bei Patienten mit geistiger Behinderung oder Entwicklungsverzögerung zu identifizieren. Centromere und Locus-spezifische Sonden sind lediglich zum Auszählen vorgesehen. Das Kit ist für die Anwendung mit kultivierten peripheren Blutlymphozyten bestimmt. Dieses Produkt ist nur zur Verwendung durch Fachkräfte vorgesehen und dient als Ergänzung zur klinischen Zytogenetik.

#### Hintergrund

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. Diese Technik, bei der die verwendeten DNA-Sonden an vollständige Chromosomen oder einzelne, eindeutige Sequenzen hybridieren, dient als leistungsstarke Ergänzung zur klassischen Zytogenetik. Dank der jüngsten Entwicklungen kann diese nützliche Technik nun auch als ein wesentliches diagnostisches Werkzeug für pränatale, hämatologische und pathologische Chromosomenanalysen eingesetzt werden. Die Ziel-DNA lagert sich dabei nach Fixieren und Denaturieren an eine ebenso denaturierte, fluoreszenzmarkierte DNA-Sonde mit komplementärer Sequenz an. Nach der Hybridisierung wird die ungebundene und nicht spezifisch gebundene DNA-Sonde entfernt und die DNA wird zum Sichtbarmachen gegengefärbt. Unter dem Fluoreszenzmikroskop lässt sich dann die hybridisierte Sonde am Zielmaterial erkennen.

#### Informationen über die Sonde

Die Subtelomer-FISH-Analyse wird in der Regel als Ergänzung zu zytogenetischen Routinetests eingesetzt, um kleine Rearrangements der Telomer-Regionen von Chromosomen nachzuweisen. Bei Patienten können Telomer-Analysen aus unterschiedlichsten Gründen indiziert sein. Dazu zählen genetische Erkrankungen, autistische Störungen, ungeklärte geistige Behinderung/Entwicklungsverzögerung, gehäufte Fehlgeburten sowie hämatologische Malignome<sup>1-4</sup>.

Das TeloMark-Kit von Cytocell enthält 41 Subtelomer-spezifische Sonden, drei Centromer- und sechs Locus-spezifische Sonden (insgesamt 50 verschiedene Sonden). Die Subtelomer-Sonden sind für alle Chromosomenenden außer den p-Armen der fünf akrozentrischen Chromosomen spezifisch, und aufgrund der in den pseudoautosomalen Regionen lokalisierten Klone gibt es keine Unterscheidung zwischen X und Y. Alle diese Sonden machen spezifische Regionen der Chromosomen innerhalb einer Länge von 850kb des echten Telomers sichtbar.

Die Sonden im TeloMark-Kit werden als 15 separate Mischungen ausgeliefert, die entweder einzeln oder als Kit, das alle 15 umfasst, erhältlich sind. Alle Sonden sind direkt markierte orangefarbene, grüne, gelbe (orange und grün kombiniert) oder blau fluoreszierende Sonden.

#### Sondenspezififikation

Mischung	Beschreibung der Sondenmischungen	Sondenkonzentrationen
Mischung 01	1p in Grün 1q in Orange Xp/Yp in Orange und Grün (Gelb) DXZ1 in Blau	41-62ng/test 18-22ng/test 118-168ng/test 25-37ng/test
Mischung 02	2p in Grün 2q in Orange Xq/Yq in Orange und Grün (Gelb) DXZ1 in Blau	41-62ng/test 18-22ng/test 59-84ng/test 25-37ng/test
Mischung 03	3p in Grün 3q in Orange 22q in Orange und Grün (Gelb) BCR (22q11) in Blau	41-62ng/test 18-22ng/test 59-84ng/test 76-110ng/test
Mischung 04	4p in Grün 4q in Orange 21q in Orange und Grün (Gelb) AML1 (RUNX1) (21q22) in Blau	41-62ng/test 18-22ng/test 59-84ng/test 76-110ng/test
Mischung 05	5p in Grün 5q in Orange	41-62ng/test 18-22ng/test

Mischung 06	6p in Grün 6q in Orange 13q in Orange und Grün (Gelb) 13q14 in Blau	41-62ng/test 18-22ng/test 59-84ng/test 102-146ng/test
Mischung 07	7p in Grün 7q in Orange 14q in Orange und Grün (Gelb) TCRAD (14q11.2) in Blau:	41-62ng/test 18-22ng/test 59-84ng/test 76-110ng/test
Mischung 08	8p in Grün 8q in Orange 17p in Orange und Grün (Gelb) D17Z1 in Blau	41-62ng/test 18-22ng/test 79-111ng/test 25-37ng/test
Mischung 09	9p in Grün 9q in Orange 17q in Orange und Grün (Gelb) D17Z1 in Blau	41-62ng/test 18-22ng/test 59-84ng/test 25-37ng/test
Mischung 10	10p in Grün 10q in Orange 15q in Orange und Grün (Gelb) PML (15q24) in Blau	41-62ng/test 18-22ng/test 118-168ng/test 76-110ng/test
Mischung 11	11p in Grün 11q in Orange 18p in Orange und Grün (Gelb) D18Z1 in Blau	27-41ng/test 12-14ng/test 45-63ng/test 25-37ng/test
Mischung 12	12p in Grün 12q in Orange 18q in Orange und Grün (Gelb) D18Z1 in Blau	82-123ng/test 36-43ng/test 99-139ng/test 25-37ng/test
Mischung 13	16p in Grün 16q in Orange	41-62ng/test 18-22ng/test
Mischung 14	19p in Grün 19q in Orange E2A (TCF3) (19p13) in Blau	41-62ng/test 19-23ng/test 36-51ng/test
Mischung 15	20p in Grün 20q in Orange	21-31ng/test 13-15ng/test

#### Bestandteile des Kits

**Sonde:** 15µl pro Röhrchen (5 Tests) oder 30µl pro Röhrchen (10 Tests)

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

#### Farbstoff für die Gegenfärbung:

150µl pro Röhrchen (LPT MRKxx/LPT MRKxx-S), 300µl pro Röhrchen (LPT MRK-S) oder 600µl pro Röhrchen (LPT MRK)

Der Farbstoff für die Gegenfärbung ist DAPI Antifade (ES: 0,125 µg/ml DAPI (4,6-Diamidino-2-Phenylindol)).

#### Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen

- Zur Verwendung in der *in vitro*-Diagnostik. Nur zur Verwendung durch Fachkräfte bestimmt.
- Beim Umgang mit DNA-Sonden und dem DAPI-Farbstoff für die Gegenfärbung Handschuhe tragen.
- Sondenmischungen enthalten Formamid, das teratogen ist. Keine Dämpfe einatmen und Hautkontakt vermeiden. Handschuhe und Labormantel tragen und unter einer Abzugshaube arbeiten. Bei der Entsorgung mit viel Wasser nachspülen.
- DAPI ist ein potenzielles Karzinogen. Vorsichtig damit umgehen, Handschuhe und Labormantel tragen. Bei der Entsorgung mit viel Wasser nachspülen.
- Alle Gefahrstoffe sollten gemäß den Leitlinien Ihrer Einrichtung zur Entsorgung von Sondermüll entsorgt werden.
- Darauf achten, dass die Deckgläser nach Hinzufügen der Sonde nicht den Objektträger berühren, da dies zu einer Kreuzkontamination zwischen den Sonden führen kann.
- Die Anwender dieses Produkts müssen in der Lage sein, optisch zwischen den Farben rot, blau und grün zu unterscheiden.

#### Lagerung und Handhabung

Das Aquarius<sup>®</sup>-Kit wird bis zum Ablauf des auf dem Etikett angegebenen Haltbarkeitsdatums bei -20°C gelagert. Die Durchstechflaschen mit den Sonden und dem Farbstoff müssen lichtgeschützt aufbewahrt werden.

#### Benötigte aber nicht mitgelieferte Laborgeräte

- Heizplatte (mit stabiler Platte und genauer Temperaturregelung bis 80°C)
- Mikropipetten mit unterschiedlichen Volumen von 1µl - 200µl
- Wasserbad mit genauer Temperaturregelung bei 72°C
- Mikrozentrifugenröhrchen (0,5ml)
- Fluoreszenzmikroskop (siehe auch „Empfehlungen zum Fluoreszenzmikroskop“)
- Coplin-Färbeträger aus Kunststoff oder Glas
- Pinzette
- Für Fluoreszenzobjektive geeignetes Immersionsöl
- Tischzentrifuge
- Objektträger für das Mikroskop
- 12-mm-Deckgläser
- Zeituhr
- 37°C-Inkubator
- Gummilösung zum Versiegeln der Deckglasränder

#### Empfehlungen zum Fluoreszenzmikroskop

Zur bestmöglichen Beobachtung der Sonde empfehlen wir eine 100-Watt-Quecksilberdampfampe und Plan Achromat Objektive mit 63-facher oder 100-facher Vergrößerung. Die Dreifach-Bandpassfilter DAPI/FITC/Texasrot oder DAPI/FITC/TRITC sind für die simultane Beobachtung aller Fluorophore sowie der Gegenfärbung optimal geeignet. Alternativ dazu können zur Beobachtung des orangefarbenen und des grünen Fluorophors die Zweifach-Bandpassfilter FITC/Texasrot oder FITC/TRITC verwendet werden. Das blaue Fluorophor hat eine Spezifität gegenüber dem Aqua- oder DEAC-Spektrum (ein Aqua- oder DEAC-Einfach-Bandpassfilter ist erforderlich).

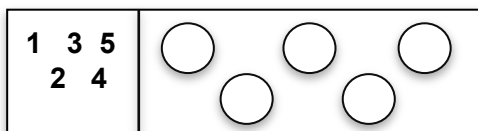
Das Fluoreszenzmikroskop muss vor dem Gebrauch auf seine korrekte Funktion überprüft werden. Das Immersionsöl muss für die Verwendung in der Fluoreszenzmikroskopie geeignet und für geringe Autofluoreszenz formuliert sein. Den Herstellerempfehlungen zur Lebensdauer der Lampe und zum Alter der Filter ist Folge zu leisten.

#### Probenvorbereitung

Das Kit ist für die Verwendung an kultivierten peripheren Blutzellen, die in Carnoy's Fixativ fixiert sind, das nach den Richtlinien des Labors oder Instituts herzustellen ist, ausgelegt.

#### Vorbereitung des Objektträgers

- Zellprobe auf 3 Mikroskop-Objektträger mit 5 Zielbereichen pro Objektträger tüpfeln, um alle 15 TeloMark-Mischungen zu hybridisieren. 3µl Zellprobe pro Bereich auftragen. Trocknen lassen.



Beispiel für Objektträger-Nr. 1, der die Ziele 1, 2, 3, 4 und 5 enthält. Dasselbe Verfahren für die Objektträger 2 und 3 mit 5 Zielen pro Objektträger wiederholen.

#### Empfohlene Vorbehandlung des Objektträgers:

- Tauchen Sie den Objektträger für 2 Minuten bei 37°C in 2xSSC.
- Legen Sie den Objektträger dann 10 Minuten lang bei 37°C in frisch vorbereitete Pepsin-Arbeitslösung (5mg Pepsin werden in 100ml 0,01M HCl gegeben).
- Tauchen Sie den Objektträger bei Raumtemperatur für 5 Minuten in phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS).
- Tauchen Sie den Objektträger für 5 Minuten bei Raumtemperatur in Nachfixierungslösung (0,95% Formaldehyd: 1,0ml 37% Formaldehyd, 0,18g MgCl<sub>2</sub> und 39,0ml PBS).
- Tauchen Sie den Objektträger bei Raumtemperatur für 5 Minuten in PBS.
- Tauchen Sie den Objektträger bei Raumtemperatur in 70%iges Ethanol. Lassen Sie den Objektträger 1 Minute lang in der Ethanol-Waschlösung stehen.
- Nehmen Sie den Objektträger aus dem 70%igen Ethanol. Wiederholen Sie Schritt 6 mit 85%igem Ethanol und dann mit 100%igem Ethanol.
- An der Luft trocknen lassen.

#### FISH-Protokoll (überspringen Sie diesen Schritt, wenn der Objektträger gemäß dem obigen Protokoll vorbehandelt wurde)

(Hinweis: Bitte stellen Sie sicher, dass die Sonde nur in begrenztem Umfang der Strahlung von Laborlampen ausgesetzt ist.)

- Den Objektträger bei Raumtemperatur 2 Minuten ohne Schütteln in 2xSSC tauchen.
- In Alkoholreihe (70%, 85% und 100%) entwässern, jeweils 2 Minuten bei Raumtemperatur.
- Trocknen lassen.

#### Vordenaturierung

- Die Sonde aus dem Gefrierschrank nehmen und auf Raumtemperatur aufwärmen lassen. Röhrchen kurz zentrifugieren vor dem Einsatz.
- Durch Mischen mit Pipette sicherstellen, dass die Sondenlösung homogen gemischt ist.
- Sondenmischungen und Probenobjektträger zum Vorwärmen 5 Minuten lang auf eine 37°C (+/- 1°C) warme Heizplatte stellen.
- 3µl Sondenmischung auf den entsprechenden Zielbereich tüpfeln und ein 12-mm-Deckglas sorgfältig auflegen. Mit Gummikleber-Lösung versiegeln und vollständig trocken lassen.

#### Denaturierung

- Probe und Sonde gleichzeitig durch 2 Minuten langes Erwärmen des Objektträgers auf einer 75°C (+/- 1°C) warmen Heizplatte denaturieren.

#### Hybridisierung

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

#### Waschen nach der Hybridisierung

- Deckglas und alle Kleberspuren vorsichtig entfernen.
- Objektträger 2 Minuten lang ohne Schütteln bei 72°C (+/- 1°C) in 0,4xSSC (pH 7,0) tauchen.
- Objektträger abtropfen lassen und 30 Sekunden ohne Schütteln bei Raumtemperatur in 2xSSC, 0,05% Tween-20 (pH 7,0) tauchen.
- Objektträger abtropfen lassen und 10µl DAPI Antifade auf jeweils ein Ende der Objektträger geben.
- Mit einem Deckglas (22 x 50mm) abdecken, die Luftblasen entfernen und die Farbe 10 Minuten lang im Dunkeln 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 aufbewahrt werden.

#### Empfehlungen zur Durchführung

- Wärmebehandlung oder Reifung der Proben ist nicht empfehlenswert, da dies zu einer verminderten Signalfluoreszenz führen kann.
- Durch die Verwendung von Reagenzien, die nicht von Cytocell Ltd. empfohlen sind oder geliefert werden, 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 Konzentration der Waschlösungen, pH und Temperatur sind wichtig, da Bedingungen mit niedriger Stringenz zu unspezifischer 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 unspezifischer Bindung der Sonde führen.

#### Zu erwartende Ergebnisse

Bei unauffälligen Zellen sollten die in der nachfolgenden Tabelle aufgelisteten Ergebnisse zu beobachten sein. Bei den Mischungen 1 und 2 variiert die Anzahl von normalen blauen Signalen zwischen männlichen (1 blaues) und weiblichen (2 blaue) Proben. Jegliche Abweichungen von den unten aufgeführten Ergebnissen sind als auffällig einzustufen.

Mischung	Normale zu erwartende Ergebnisse
Mischung 01	2 grün, 2 orange, 2 gelb, 1 oder 2 blau (2G, 2O, 2Y, 1/2B)
Mischung 02	2 grün, 2 orange, 2 gelb, 1 oder 2 blau (2G, 2O, 2Y, 1/2B)
Mischung 03	2 grün, 2 orange, 2 gelb, 2 blau (2G, 2O, 2Y, 2B)
Mischung 04	2 grün, 2 orange, 2 gelb, 2 blau (2G, 2O, 2Y, 2B)
Mischung 05	2 grün, 2 orange (2G, 2O)
Mischung 06	2 grün, 2 orange, 2 gelb, 2 blau (2G, 2O, 2Y, 2B)
Mischung 07	2 grün, 2 orange, 2 gelb, 2 blau (2G, 2O, 2Y, 2B)
Mischung 08	2 grün, 2 orange, 2 gelb, 2 blau (2G, 2O, 2Y, 2B)
Mischung 09	2 grün, 2 orange, 2 gelb, 2 blau (2G, 2O, 2Y, 2B)
Mischung 10	2 grün, 2 orange, 2 gelb, 2 blau (2G, 2O, 2Y, 2B)
Mischung 11	2 grün, 2 orange, 2 gelb, 2 blau (2G, 2O, 2Y, 2B)
Mischung 12	2 grün, 2 orange, 2 gelb, 2 blau (2G, 2O, 2Y, 2B)
Mischung 13	2 grün, 2 orange (2G, 2O)
Mischung 14	2 grün, 2 orange, 2 blau (2G, 2O, 2B)
Mischung 15	2 grün, 2 orange (2G, 2O)

## Bekannte Kreuzreaktivität

Mischung	Bekannte Kreuzreaktivität
Mischung 01	Keine
Mischung 02	Keine
Mischung 03	22q mit 2q (perizentromerisch)
Mischung 04	Keine
Mischung 05	Keine
Mischung 06	Keine
Mischung 07	14q mit 16 (zentromerisch)
Mischung 08	8p bis XpYp Telomer-Region
Mischung 09	9q bis Chromosom 1 (interstitiell)
Mischung 10	Keine
Mischung 11	11p bis 17p
Mischung 12	Keine
Mischung 13	Keine
Mischung 14	Keine
Mischung 15	20q bis 6p und 4q (interstitiell)

## Einschränkungen

Protokollierung und Interpretation der FISH-Tests müssen den fachlichen Standards für die Praxis entsprechen und unter Berücksichtigung anderer klinischer und diagnostischer Informationen erfolgen. Dieses Kit ist als Ergänzung zu anderen diagnostischen Laboruntersuchungen zu verstehen. Daher sollten therapeutische Maßnahmen nicht allein auf Grundlage der FISH-Ergebnisse veranlasst werden. Die Nichteinhaltung des Protokolls kann die Leistung des Tests beeinträchtigen und zu fehlerhaften Ergebnissen führen.

## 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

## Uso previsto

El kit TeloMark de Cytocell está diseñado para identificar, mediante hibridación fluorescente *in situ* (FISH), los cambios en el número de copias o las reordenaciones que afectan a las regiones subteloméricas de los cromosomas humanos en pacientes con retraso mental u retraso en el desarrollo. Las sondas centroméricas y específicas de locus únicamente se emplean para la enumeración. Está diseñado para utilizarse en linfocitos de sangre periférica cultivados. Este producto es únicamente para uso profesional como test complementario a la citogenética clínica.

## Información general

La hibridación fluorescente *in situ* (FISH) es una técnica que permite detectar secuencias de ADN en los cromosomas en metafase o en los núcleos en interfase de muestras citogenéticas fijadas. Emplea sondas de ADN que se hibridan a cromosomas completos o a secuencias únicas y es una potente técnica complementaria a la citogenética clásica. Las innovaciones recientes han conseguido que esta técnica de gran utilidad pueda aplicarse ahora como herramienta diagnóstica esencial en el análisis cromosómico prenatal, hematológico y patológico. El ADN diana, una vez fijado y desnaturalizado, está listo para hibridarse a una sonda de ADN también desnaturalizada y marcada con fluorescencia, que tiene una secuencia complementaria. Tras la hibridación, se elimina el ADN de la sonda que no se ha unido o que se ha unido de forma no específica y se realiza una tinción de contraste para visualizarlo. A continuación, y gracias a la microscopía fluorescente, se puede visualizar la sonda hibridada al material diana.

## Información sobre la sonda

El análisis subtelomérico por FISH se emplea habitualmente como complemento a las pruebas citogenéticas de rutina para detectar pequeñas reordenaciones que afectan a las regiones teloméricas de los cromosomas. Existen diversas razones para solicitar análisis teloméricos en los pacientes, por ejemplo, enfermedades genéticas, trastornos autistas, retraso mental o en el desarrollo idiopático, aborto espontáneo recurrente y neoplasias hematológicas<sup>1-4</sup>.

El kit TeloMark de Cytocell está formado por 41 sondas subteloméricas específicas, 3 centroméricas y 6 sondas específicas de locus (50 sondas diferentes en total). Las sondas subteloméricas representan todos los extremos de los cromosomas, además de los brazos p de los cinco cromosomas acrocéntricos sin distinción entre X e Y, ya que los clones están situados en las regiones pseudoautosómicas. Todas estas sondas mapean regiones únicas de los cromosomas, situadas a 850kb del telómero real.

Las sondas de TeloMark se presentan en 15 mezclas distintas, bien de forma individual o como un kit que contiene las 15. Todas las sondas están marcadas directamente en naranja, verde, amarillo (combinación de naranja y verde) o azul.

## Especificación de las sondas

Mezcla	Descripción de la mezcla de sondas	Concentraciones
Mezcla 01	1p en verde	41-62ng/ test
	1q en naranja	18-22ng/ test
	Xp/Yp en naranja y verde (amarillo)	118-168ng/ test
	DXZ1 en azul	25-37ng/ test
Mezcla 02	2p en verde	41-62ng/ test
	2q en naranja	18-22ng/ test
	Xq/Yq en naranja y verde (amarillo)	59-84ng/ test
	DXZ1 en azul:	25-37ng/ test
Mezcla 03	3p en verde	41-62ng/ test
	3q en naranja	18-22ng/ test
	22q en naranja y verde (amarillo)	59-84ng/ test
	BCR (22q11) en azul	76-110ng/ test
Mezcla 04	4p en verde	41-62ng/ test
	4q en naranja	18-22ng/ test
	21q en naranja y verde (amarillo)	59-84ng/ test
	AML1 (RUNX1) (21q22) en azul	76-110ng/ test
Mezcla 05	5p en verde	41-62ng/ test
	5q en naranja	18-22ng/ test
Mezcla 06	6p en verde	41-62ng/ test
	6q en naranja	18-22ng/ test
	13q en naranja y verde (amarillo)	59-84ng/ test
	13q14 en azul	102-146ng/ test
Mezcla 07	7p en verde	41-62ng/ test
	7q en naranja	18-22ng/ test
	14q en naranja y verde (amarillo)	59-84ng/ test
	TCRAD (14q11.2) en azul	76-110ng/ test

Mezcla 08	8p en verde	41-62ng/ test
	8q en naranja	18-22ng/ test
	17p en naranja y verde (amarillo)	79-111ng/ test
	D17Z1 en azul	25-37ng/ test
Mezcla 09	9p en verde	41-62ng/ test
	9q en naranja	18-22ng/ test
	17q en naranja y verde (amarillo)	59-84ng/ test
	D17Z1 en azul	25-37ng/ test
Mezcla 10	10p en verde	41-62ng/ test
	10q en naranja:	18-22ng/ test
	15q en naranja y verde (amarillo)	118-168ng/ test
	PML (15q24) en azul	76-110ng/ test
Mezcla 11	11p en verde	27-41ng/ test
	11q en naranja	12-14ng/ test
	18p en naranja y verde (amarillo)	45-63ng/ test
	D18Z1 en azul	25-37ng/ test
Mezcla 12	12p en verde	82-123ng/ test
	12q en naranja	36-43ng/ test
	18q en naranja y verde (amarillo)	99-139ng/ test
	D18Z1 en azul	25-37ng/ test
Mezcla 13	16p en verde	41-62ng/ test
	16q en naranja	18-22ng/ test
Mezcla 14	19p en verde	41-62ng/ test
	19q en naranja	19-23ng/ test
	E2A (TCF3) (19p13) en azul	36-51ng/ test
Mezcla 15	20p en verde	21-31ng/ test
	20q en naranja	13-15ng/ test

## Materiales suministrados

**Sonda:** 15µl por vial (5 tests) o 30µl por vial (10 tests)

Las sondas se presentan premezcladas en solución de hibridación (formamida; sulfato de dextrano; SSC), listas para usar.

## Tinción de contraste:

150µl por tubo (LPT MRKxx/LPT MRKxx-S), 300µl por tubo (LPT MRK-S) o 600µl por tubo (LPT MRK)

La tinción de contraste es DAPI antifade (ES: 0,125 µg/ml DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol)).

## Advertencias y precauciones

1. Para diagnóstico *in vitro*. Sólo para uso profesional.
2. Llevar guantes al manipular las sondas de ADN y la tinción de contraste DAPI.
3. Las mezclas de sondas contienen formamida, que es teratógena; no respirar los vapores ni dejar que entre en contacto con la piel. Llevar guantes, bata y manipular bajo una campana extractora. Al desechar, lavar con un gran volumen de agua.
4. DAPI es un potencial carcinógeno. Se debe manipular con cuidado y utilizar guantes y bata. Al desechar, lavar con un gran volumen de agua.
5. Todos los materiales peligrosos se deben desechar según las directrices de su institución para la eliminación de residuos peligrosos.
6. Tener cuidado de que los cubreobjetos no toquen el portaobjetos después de añadir la sonda, ya que se puede producir contaminación cruzada entre las sondas.
7. Las personas que utilicen este producto deben ser capaces de diferenciar visualmente los colores rojo, azul y verde.

## Almacenamiento y manipulación

El kit Aquarius® se debe almacenar a -20°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del kit. Los viales de las sondas y de la tinción de contraste se deben almacenar protegidos de la luz.

## Equipo necesario, pero no incluido

1. Placa calefactora (con una placa sólida y control preciso de la temperatura hasta 80°C).
2. Micropipetas de distintos volúmenes y puntas de entre 1µl y 200µl.
3. Baño maría con control preciso de la temperatura a 72°C.
4. Tubos de microcentrífuga (0,5ml).
5. Microscopio de fluorescencia (consultar la sección de Recomendaciones sobre el microscopio de fluorescencia).
6. Cubetas de coplin de plástico o vidrio.
7. Fórceps.
8. Aceite de inmersión para lentes de microscopio de grado fluorescencia.
9. Microcentrífuga.
10. Portaobjetos.
11. Cubreobjetos de 12mm.
12. Cronómetro.
13. Incubadora a 37°C.
14. Adhesivo de solución de caucho.

## Recomendaciones sobre el microscopio de fluorescencia

Para una visualización óptima de la sonda, se recomienda emplear una lámpara de mercurio de 100 vatios y objetivos planos apocromáticos de 63 o 100 aumentos. Los filtros de paso de banda triple DAPI/FITC/Rojo Texas o DAPI/FITC/TRITC son óptimos para visualizar todos los fluoróforos y el DAPI de forma simultánea. Otra posibilidad para visualizar los fluoróforos naranja y verde es usar filtros de paso de banda doble FITC/Rojo Texas o FITC/TRITC. El fluoróforo azul presenta especificidad por el espectro Aqua y DEAC (es necesario un filtro de paso monobanda Aqua o DEAC).

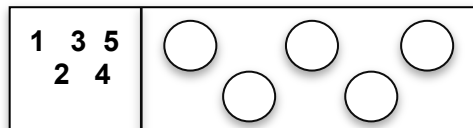
Se debe comprobar el microscopio de fluorescencia antes de su uso para confirmar que funciona correctamente. El aceite de inmersión debe ser adecuado para la microscopía de fluorescencia y presentar baja autofluorescencia. Se deben seguir las recomendaciones del fabricante relativas a la vida de la lámpara y la antigüedad de los filtros.

## Preparación de las muestras

El kit está diseñado para utilizarse en células de sangre periférica cultivadas y fijadas en solución fijadora de Carnoy que se debe preparar conforme a las directrices del laboratorio o institución.

## Preparación de los portaobjetos

1. Colocar la muestra de células en 3 portaobjetos de vidrio con 5 zonas diana por porta para hibridar las 15 mezclas TeloMark. Añadir 3µl de muestra de células por área. Dejar secar.



Ejemplo del portaobjetos n° 1 con las dianas 1, 2, 3, 4 y 5. Repetir el mismo proceso para los portaobjetos 2 y 3 con 5 dianas por portaobjetos.

## Pretratamiento del portaobjetos recomendado:

1. Sumergir el portaobjetos en 2xSSC durante 2 minutos a 37°C.

- Coloque el portaobjetos en solución de trabajo de pepsina recién preparada (5mg de pepsina añadidos a 100ml de HCl a 0,01M) durante 10 minutos a 37°C.
- Sumerja el portaobjetos en solución salina con tampón fosfato (PBS) a TA durante 5 minutos.
- Sumerja el portaobjetos en solución de fijación (formaldehído a 0,95%: 1,0ml de formaldehído a 37%, 0,18g de MgCl<sub>2</sub> y 39,0ml de PBS) durante 5 minutos a TA.
- Sumerja el portaobjetos con PBS a TA durante 5 minutos.
- Sumerja el portaobjetos en etanol al 70% a TA. Deje el portaobjetos sumergido en el baño de etanol durante 1 minuto.
- Retire el portaobjetos del etanol al 70%. Repita el paso 6 con etanol al 85%, seguido de etanol al 100%.
- Deje secar al aire.

**Protocolo FISH (omite este paso si el portaobjetos ha sido pretratado según el protocolo anterior)**

(Nota: asegúrese de limitar la exposición de la sonda a la luz del laboratorio en todo momento).

- Sumergir el portaobjetos en 2 x SSC durante 2 minutos a temperatura ambiente (TA) sin agitación.
- Deshidratar en mezclas progresivas de etanol (70%, 85% y 100%), cada una durante 2 minutos a TA.
- Dejar secar.

**Antes de la desnaturalización**

- Sacar la sonda del congelador y dejar que alcance temperatura ambiente (TA). Dar un pulso de centrifuga a los tubos antes de su uso.
- Mezclar uniformemente la solución de la sonda con una pipeta.
- Colocar las mezclas de sondas y el portaobjetos de muestra sobre una placa calefactora a 37°C (+/- 1°C) para precalentarlos durante 5 minutos.
- Colocar 3µl de mezcla de sondas sobre la zona diana correspondiente y colocar un cubreobjetos de 12mm con cuidado. Sellar con adhesivo de solución de caucho y dejar que seque por completo.

**Desnaturalización**

- Desnaturalizar la muestra y la sonda simultáneamente, calentado los portaobjetos en una placa calefactora a 75°C (+/- 1°C) durante 2 minutos.

**Hibridación**

- Colocar el portaobjetos en un recipiente húmedo y opaco a 37°C (+/- 1°C) durante toda la noche.

**Lavados después de la hibridación**

- Retirar el cubreobjetos y todos los restos de adhesivo meticulosamente.
- Sumergir el portaobjetos en 0,4 x SSC (pH 7,0) a 72°C (+/- 1°C) durante 2 minutos sin agitación.
- Drenar el portaobjetos y sumergirlo en 2 x SSC, 0,05% de Tween-20 a TA (pH 7,0) durante 30 segundos sin agitación.
- Drenar el portaobjetos y aplicar 10µl de DAPI antifade sobre cada extremo de cada portaobjetos.
- Tapar con un cubre de 22 x 50mm, quitar las burbujas y dejar revelar el color durante 10 minutos en ausencia de luz.
- Observar con un microscopio de fluorescencia.

**Estabilidad de los portaobjetos terminados**

Los portas sometidos a la técnica FISH se pueden analizar durante 1 mes si se guardan en un lugar oscuro a temperatura ambiente o inferior.

**Recomendaciones para el procedimiento**

- No se recomienda sobrecalentar ni dejar envejecer los portaobjetos, ya que puede reducirse la fluorescencia de la señal.
- El uso de reactivos distintos a los suministrados o recomendados por CytoCELL Ltd puede afectar negativamente las condiciones de hibridación.
- Se recomienda encarecidamente utilizar un termómetro calibrado para medir las temperaturas de las soluciones, baños maría e incubadoras, ya que estas temperaturas son críticas para un funcionamiento óptimo del producto.
- Las concentraciones, el pH y las temperaturas de los lavados son importantes, ya que una rigurosidad baja puede provocar una unión no específica de la sonda y una rigurosidad excesiva puede derivar en la falta de señal.
- Una desnaturalización incompleta puede ocasionar falta de señal y una desnaturalización excesiva también puede provocar una unión no específica.

**Resultados previstos**

Las células normales deben mostrar los resultados que se indican en la tabla siguiente. Para las mezclas 1 y 2, el número de señales azules normales será distinto dependiendo de si el sujeto es hombre (1 azul) o mujer (2 azul). Cualquier desviación de los resultados indicados a continuación se debe considerar anómala.

Mezcla	Resultados normales previstos
Mezcla 01	2 verde, 2 naranja, 2 amarillo, 1 o 2 azul (2V, 2N, 2Am, 1/2Az)
Mezcla 02	2 verde, 2 naranja, 2 amarillo, 1 o 2 azul (2V, 2N, 2Am, 1/2Az)
Mezcla 03	2 verde, 2 naranja, 2 amarillo, 2 azul (2V, 2N, 2Am, 2Az)
Mezcla 04	2 verde, 2 naranja, 2 amarillo, 2 azul (2V, 2N, 2Am, 2Az)
Mezcla 05	2 verde, 2 naranja (2V, 2N)
Mezcla 06	2 verde, 2 naranja, 2 amarillo, 2 azul (2V, 2N, 2Am, 2Az)
Mezcla 07	2 verde, 2 naranja, 2 amarillo, 2 azul (2V, 2N, 2Am, 2Az)
Mezcla 08	2 verde, 2 naranja, 2 amarillo, 2 azul (2V, 2N, 2Am, 2Az)
Mezcla 09	2 verde, 2 naranja, 2 amarillo, 2 azul (2V, 2N, 2Am, 2Az)
Mezcla 10	2 verde, 2 naranja, 2 amarillo, 2 azul (2V, 2N, 2Am, 2Az)
Mezcla 11	2 verde, 2 naranja, 2 amarillo, 2 azul (2V, 2N, 2Am, 2Az)
Mezcla 12	2 verde, 2 naranja, 2 amarillo, 2 azul (2V, 2N, 2Am, 2Az)
Mezcla 13	2 verde, 2 naranja (2V, 2N)
Mezcla 14	2 verde, 2 naranja, 2 azul (2V, 2N, 2Az)
Mezcla 15	2 verde, 2 naranja (2V, 2N)

**Reactividad cruzada conocida**

Mezcla	Reactividad cruzada conocida
Mezcla 01	Ninguna
Mezcla 02	Ninguna
Mezcla 03	22q con 2q (pericentromérica)
Mezcla 04	Ninguna
Mezcla 05	Ninguna
Mezcla 06	Ninguna
Mezcla 07	14q con 16 (centromérica)

Mezcla 08	8p a región telomérica XpYp
Mezcla 09	9q al cromosoma 1 (intersticial)
Mezcla 10	Ninguna
Mezcla 11	11p a 17p
Mezcla 12	Ninguna
Mezcla 13	Ninguna
Mezcla 14	Ninguna
Mezcla 15	20q a 6p y 4q (intersticial)

**Limitaciones**









Los informes y la interpretación de los resultados de la prueba FISH deben ser conformes con los estándares de la práctica profesional y deben tener en consideración otros datos clínicos y diagnósticos. El objetivo de este kit es complementar a otras pruebas analíticas diagnósticas y no se deben iniciar acciones terapéuticas basándose únicamente en los resultados de la prueba FISH. Si no se sigue el protocolo, se pueden alterar los resultados del test y obtener resultados erróneos.

**Información adicional**

Si desea más información sobre el producto, póngase en contacto con el Departamento de Asistencia Técnica de CytoCELL.  
Tel.: +44 (0)1223 294048  
Email: techsupport@cytoCELL.com  
Web: www.cytoCELL.com

**References/Bibliographie/Bibliographia/Literatur/Bibliografia**

- de Vries *et al.*, J Med Genet 2001;38:145–150
- Knight *et al.*, Am. J. Hum. Genet. 2000; 67:320–332
- Knight *et al.*, Eur J Hum Genet. 1997 Jan-Feb;5(1):1-8
- Ravnan *et al.*, J Med Genet. 2006;43:478–489

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