

### Instructions For Use

REF: LPS 036-S / LPS 036

### P16 Deletion Probe



PROFESSIONAL USE ONLY

ENGLISH/FRANÇAIS/ITALIANO/DEUTSCH/ESPAÑOL

Further information available at [www.cytocell.com](http://www.cytocell.com)

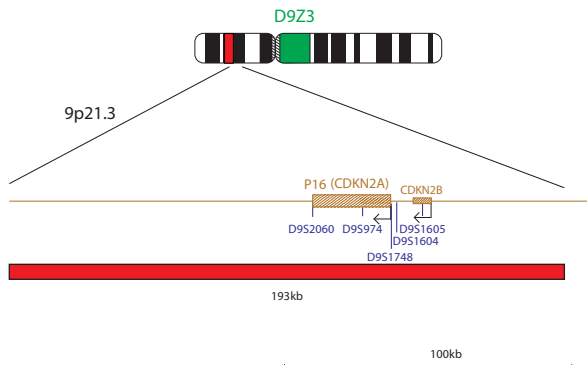
Fluorescence *In Situ* Hybridisation (FISH) is a technique that allows DNA sequences to be detected on metaphase chromosomes or in interphase nuclei from fixed cytogenetic samples. The technique uses DNA probes that hybridise to entire chromosomes or single unique sequences, and serves as a powerful adjunct to classic cytogenetics. Recent developments have meant that this valuable technique can now be applied to the assessment of solid tumour biopsies as well, which can provide important information for prediction of tumour progression. Current methodologies, namely immunohistochemistry or Southern blotting can provide information at the gene expression level but, when carried out on tissue sections (either cryostat or paraffin embedded), FISH can provide information at a gene level, *in situ*, at the precise site within the tumour. This can reveal cell-to-cell heterogeneity and enable the detection of small clones of genetically distinct cells.

#### Probe Information

Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) is the most frequent form of aggressive lymphoma and deletions of the P16 (now known as CDKN2A) locus occur in approximately one-third of DLBCL patients<sup>1</sup>. The CDKN2A gene encodes a cyclin dependent kinase inhibitor that functions in the control of phosphorylation of Retinoblastoma (RB), a protein that is frequently hypermethylated in lymphomas<sup>2</sup>. There are two proteins produced by the CDKN2A gene, P16 and P14ARF, the latter being an alternate reading frame product. These protein products have been linked to two tumour suppressor pathways, the RB pathway and the p53 pathway. P16 inhibits phosphorylation of RB, whereas P14ARF targets MDM2, a P53 inhibitory protein, for degradation. A deletion of the CDKN2A gene would therefore disturb both pathways<sup>3</sup>. Losses of CDKN2A are significantly associated with a shorter survival after treatment<sup>4</sup>.

#### Probe Specification

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



The P16 probe, labelled in red, covers a 193kb region of 9p21.3, extending from 105kb telomeric of P16 (CDKN2A) gene to 46kb centromeric of CDKN2B. The probe mix also contains a control probe for chromosome 9 (D9Z3, the heterochromatic block at 9q12) labelled in green.

#### Materials Provided

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

Amount of Red P16 probe: 160-200ng/test

Amount of Green D9Z3 probe: 120-150ng/test

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

**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.
15. Aquarius® Tissue Pretreatment Kit (LPS 100).

#### 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. Alternatively for viewing red and green fluorophores use dual bandpass filter FITC/Texas Red.

#### Sample Preparation

This Kit has been designed for use on:

- Formalin Fixed Paraffin Embedded (FFPE) Tissue sections or Tissue Microarrays (TMA), 4µm - 6µm thick tissue sections should be used.
- Peripheral blood samples or cultured bone marrow cells fixed in Carnoy's fixative air dried on a microscope slides according to standard cytogenetic procedures.

All samples should be prepared according to the laboratory or institution guidelines.

#### FISH Protocol

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

#### FFPE Procedure

##### Tissue Sample Pretreatment

Tissue sample pretreatment should be done according to the laboratory or institution guideline. For optimal results use the Aquarius® Tissue Pretreatment Kit (LPS 100).

##### Pre-Denaturation

1. Remove the probe from the freezer and allow it to warm to room temperature (RT)
2. Ensure that the probe solution is uniformly mixed with a pipette.
3. Remove 10µl - 15µl (depending on the size of the tissue) of probe per test, and transfer it to a microcentrifuge tube. Quickly return the remaining probe to -20°C.
4. Place the probe and the sample slide to prewarm on a 37°C (+/- 1°C) hotplate for 5 minutes.
5. Spot 10µl - 15µl of probe mixture onto the sample and carefully apply a coverslip. Seal with rubber solution glue and allow the glue to dry completely.

##### Denaturation

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

##### Hybridisation

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

##### Post-Hybridisation Washes

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

#### Peripheral Blood or Cultured Bone Marrow Procedure

##### 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 - 15µl 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.

#### Comments

Hybridisation efficiency and tissue morphology are usually negatively correlated. Aggressive pretreatment procedures improving hybridisation efficiency (e.g. an extended enzyme digestion time) tend to destroy cell structure and tissue morphology. However, mild pretreatment saving tissue structures may not be sufficient for probe penetration and successful FISH results.

The optimal length of heat pretreatment and enzyme digestion time will depend on the age of the block, the tissue composition, and quality of tissue fixation. Enzyme digestion should be decreased for core biopsies and any sections that contain few tumour cells or have large areas of necrosis. These samples need to be handled particularly carefully to avoid over-digestion.

#### Stability of Finished Slides

FISHed slides remain analysable for up to 1 month if stored in the dark below 4°C.

#### Procedural Recommendations

1. Baking or ageing of slides containing peripheral blood samples or bone marrow is not recommended as it may reduce signal fluorescence.
2. Hybridisation conditions may be adversely affected by the use of reagents other than those provided or recommended by Cytocell Ltd.
3. The use of a calibrated thermometer is strongly recommended for measuring temperatures of solutions, waterbaths, and incubators, as these temperatures are critical for optimum product performance.
4. The wash concentrations, pH and temperatures are important as low stringency can result in non-specific binding of the probe and too high stringency can result in a lack of signal.
5. Incomplete denaturation can result in lack of signal and over denaturation can also result in non-specific binding.

#### Expected Results

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

#### Limitations

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

#### Additional Information

For additional product information please contact the Cytocell Technical Support Department.  
T: +44 (0)1223 294048  
E: techsupport@cytocell.com  
W: www.cytocell.com

### FRANÇAIS

L'hybridation in situ par fluorescence (FISH) est une technique qui permet de détecter des séquences ADN sur les chromosomes métaphasiques ou sur les noyaux interphasiques d'échantillons cytogénétiques fixés. La technique s'appuie sur des sondes ADN qui s'hybrident aux chromosomes entiers ou à des séquences spécifiques, et représente un outil complémentaire très efficace pour la cytogénétique classique. De récents développements ont démontré que cette technique extrêmement utile peut maintenant être utilisée pour évaluer les biopsies de tumeurs solides et permettre l'obtention de données importantes pour la prédiction de la progression tumorale.

Les méthodologies actuelles, à savoir l'immunohistochimie ou le transfert de Southern, peuvent fournir des informations au niveau de l'expression génique, mais la technique FISH, lorsqu'elle est appliquée à des coupes tissulaires (soit sur coupes au cryostat ou après inclusion dans la paraffine), peut fournir des informations au niveau des gènes, in situ, du

site intratumoral précisément concerné. Ceci permet de déceler l'hétérogénéité entre les cellules et de détecter de petits clones de cellules génétiquement distinctes.

#### Caractéristiques de la sonde

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

La sonde P16, marquée en rouge, couvre une région de 193kb de 9p21.3, s'étendant d'une région télomérique de 105kb du gène P16 (CDKN2A) à une région centromérique de 46kb de CDKN2B. Le mélange de sondes contient également une sonde de contrôle du chromosome 9 (D9Z3, le bloc hétérochromatique à 9q12) marquée en vert.

#### Conditionnement

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

Quantité de sonde [P16, rouge]: 160-200ng/test

Quantité de sonde D9Z3, vert: 120-150ng/test

La sonde est fournie prémélangée prête-à-l'emploi dans le tampon d'hybridation (formamide, sulfate de dextran, SSC).

**Contre-colorant:** 150µl par tube (15 tests)

Le contre-colorant est le DAPI antifade (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 les matières dangereuses doivent être éliminées selon les réglementations concernant l'élimination des déchets dangereux en vigueur dans votre établissement.

#### 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 de volume variable et gamme d'embouts de 1µl - 200µl.
3. Bain-marie avec contrôle précis de la température à 72°C.
4. Tubes à microcentrifugation (0,5ml).
5. Microscope à fluorescence (Voir la section Microscope à fluorescence recommandés).
6. Bocaux Coplin en plastique ou en verre.
7. Pincettes.
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 à base de caoutchouc.
15. Aquarius® Tissue Pretreatment Kit (LPS 100).

#### Microscope à fluorescence recommandés

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

#### Préparation des échantillons

Ce kit a été conçu pour utilisation sur :

- des coupes tissulaires fixées dans du formol et incluses en paraffine (FFPE) ou des microréseaux de tissus (« microarrays » ou TMA). Il y a lieu d'utiliser des coupes tissulaires d'une épaisseur de 4 µm - 6 µm.
- des cellules de sang périphérique ou de moelle osseuse cultivées et fixées avec du fixateur de Carnoy. Les échantillons doivent être préparés sur des lames de microscope séchées à l'air selon les procédures standard de cytogénétique.

Tous les échantillons doivent être préparés selon les protocoles en vigueur dans le laboratoire ou l'établissement.

#### Protocole FISH

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

#### Protocole sur échantillons FFPE

##### Prétraitement des échantillons de tissu

Le prétraitement des échantillons de tissu doit être effectué conformément aux directives du laboratoire ou de l'établissement. Pour de meilleurs résultats, utiliser le Aquarius® Tissue Pretreatment Kit (LPS 100).

#### Pré-dénaturation

1. Retirer la sonde du congélateur et la laisser se remettre à température ambiante (TA).
2. Bien homogénéiser la sonde en pipetant plusieurs fois.
3. Prélever 10µl - 15µl (en fonction de la taille du tissu) de sonde par test et placer dans un tube à microcentrifugation. Remettre rapidement le tube avec le restant de sonde à -20°C.
4. Mettre la sonde et la lame échantillon à préchauffer sur une plaque chauffante à 37°C (+/- 1°C) pendant 5 minutes.
5. Déposer 10µl - 15µl de sonde sur l'échantillon et couvrir avec une lamelle. Sceller avec de la colle à base de caoutchouc et laisser sécher.

#### Dénaturation

6. Dénaturer simultanément la sonde et l'échantillon en plaçant la lame sur une plaque chauffante à 75°C (+/- 1°C) pendant 5 minutes.

#### Hybridation

7. Incuber la lame pendant une nuit à 37°C (+/- 1°C) dans un récipient humide et à l'abri de la lumière.

#### Lavages post-hybridation

8. Retirer la lamelle et éliminer toute trace de colle à base de caoutchouc.
9. Laver la lame dans du tampon 0,4xSSC (pH 7,0) à 72°C (+/- 1°C) pendant 2 minutes sans agiter.
10. Egoutter la lame et laver dans du tampon 2xSSC, 0,05% Tween-20 (pH 7,0) à TA pendant 30 secondes sans agiter.
11. Sécher la lame et appliquer 10µl - 15µl de DAPI antifade sur chaque échantillon.
12. Recouvrir d'une lamelle, éliminer les bulles et laisser la coloration apparaître à l'abri de la lumière pendant 10 minutes.
13. Visualiser avec un microscope à fluorescence.

## Commentaires:

L'efficacité de l'hybridation et la morphologie du tissu d'habitude ont une corrélation négative. Les méthodes de prétraitement agressives améliorant l'efficacité d'hybridation (p.ex. un long temps de digestion enzymatique) ont tendance à détruire la structure cellulaire et la morphologie du tissu. Néanmoins, les méthodes de prétraitement douces conservant les structures de tissu souvent ne sont pas suffisantes pour la pénétration de la sonde et l'obtention de bons résultats de FISH.

La durée optimale de prétraitement thermique et de digestion enzymatique dépendra de l'âge du bloc, de la composition du tissu et de la qualité de la fixation du tissu. La digestion enzymatique devrait être réduite pour les biopsies au trocar et pour toutes les coupes ne contenant que quelques cellules tumorales ou présentant de larges plages de nécrose. Ces échantillons doivent être utilisés avec une précaution particulière pour éviter une digestion excessive.

## Protocole sur cellules de sang périphérique ou de moelle osseuse cultivées

### Préparation de la lame échantillon

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

### Pré-dénaturation

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

### Dénaturation

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

### Hybridation

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

### Lavages post-hybridation

12. Retirer la lamelle et éliminer toutes traces de rubber cément.
13. Laver la lame dans du tampon 0.4xSSC (pH 7.0) à 72°C (+/- 1°C) pendant 2 minutes.
14. Egoutter la lame et laver dans du tampon 2xSSC, 0.05% Tween-20 (pH 7.0) à température ambiante pendant 30 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.

### Stabilité des lames

Les lames sont analysables pendant un mois si elles sont conservées à l'abri de la lumière et à au dessous de 4°C.

### Recommandations

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

### Interprétation des résultats

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

### Limitations

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

### Informations supplémentaires

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

## ITALIANO

L'ibridazione fluorescente *in situ* (Fluorescence *In Situ* Hybridisation, FISH) è una tecnica che consente di rilevare le sequenze del DNA su cromosomi metafasi o in nuclei interfasi da campioni citogenetici fissati. La tecnica utilizza sonde di DNA che ibridizzano con gli interi cromosomi o con singole sequenze e fungono da potente aggiunta alla citogenetica classica. Recenti sviluppi hanno fatto sì che ora questa valida tecnica possa essere applicata anche alla valutazioni di biopsie di tumori solidi, il che può fornire importanti informazioni per la previsione della progressione del tumore stesso. Le metodologie attuali, vale a dire all'immunostochimica o il Southern blotting possono fornire informazioni a livello di espressione genica ma, quando eseguite su sezioni di tessuto (sia al criostato che incluse in paraffina), la FISH può fornire informazioni a livello di gene, *in situ*, al sito preciso all'interno del tumore. Questo può rivelare l'eterogeneità tra cellula e cellula e consentire l'individuazione di piccoli cloni di cellule geneticamente distinte.

### Specifiche della sonda

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

La sonda P16, marcata in rosso, copre una regione di 193kb del 9p21.3, con una lunghezza da 105kb telomerici del gene P16 (CDKN2A) fino a 46kb centromerici di CDKN2B. Il mix della sonda contiene anche una sonda di controllo per il cromosoma 9 (D9Z3, il blocco eterocromatico al 9q12) marcata in verde.

## Materiali forniti

**Sonda:** 50µl per flaconcino (5 test) o 100µl per flaconcino (10 test)

Quantità di sonda P16 rosso probe: 160-200ng/test

Quantità di sonda D9Z3 verde probe: 120-150ng/test

Le sonde sono fornite premiscelate nella soluzione di ibridazione (formammide; destrano solfato; SSC) e pronte per l'uso.

**Colorante di contrasto:** 150µl per flaconcino (15 test)

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

## Avvertenze e precauzioni

1. Per uso diagnostico *in vitro*. Solo per uso professionale.
2. Quando si maneggiano le sonde e il colorante di contrasto DAPI, è necessario indossare guanti.
3. Le miscele delle sonde contengono formammide, una sostanza teratogena. Non respirare i fumi ed evitare il contatto con la pelle. Indossare guanti e camicia da laboratorio e maneggiare sotto cappa chimica. Per lo smaltimento, sciacquare con grandi quantità di acqua.
4. Il DAPI è un potenziale cancerogeno. Maneggiare con cura, indossare guanti e camicia da laboratorio. Per lo smaltimento, sciacquare con grandi quantità di acqua.
5. Lo smaltimento dei materiali pericolosi deve avvenire nel rispetto delle normative interne dell'istituzione relative allo smaltimento dei rifiuti pericolosi.

## Conservazione e manipolazione

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

1. Piastra riscaldante (dotata di superficie d'appoggio e controllo accurato della temperatura fino a 80°C).
2. Micropipette a volume variabile con capacità da 1µl a 200µl e relativi puntali.
3. Microscopio a fluorescenza con controllo accurato della temperatura a 72°C.
4. Provette da microcentrifuga (0,5ml).
5. Microscopio a fluorescenza (fare riferimento alla sezione Caratteristiche consigliate per il microscopio a fluorescenza).
6. Vaschette di Coplin in plastica o in vetro.
7. Pinzette.
8. Olio di immersione per obiettivi per microscopia a fluorescenza.
9. Centrifuga da banco.
10. Vetrini per microscopia.
11. Vetrini copri oggetto da 24x24mm.
12. Timer.
13. Incubatore a 37°C.
14. Colla tipo mastice.
15. Aquarius® Tissue Pretreatment Kit (LPS 100).

## Caratteristiche consigliate per il microscopio a fluorescenza

Per una visualizzazione ottimale della sonda si consiglia di utilizzare una lampada al mercurio da 100 watt e obiettivi planapocromatici 63x o 100x. Il filtro triplo DAPI/FITC/Texas Red è ottimale per visualizzare contemporaneamente tutti e tre i fluorofori e il DAPI. In alternativa, utilizzare il doppio filtro passabanda FITC/Texas Red per visualizzare i fluorofori rosso e verde.

## Preparazione del campione

Questo kit è stato studiato per essere utilizzato su:

- Devono essere utilizzate sezioni di tessuto incluse in paraffina fissate in formalina (Formalin Fixed Paraffin Embedded, FFPE) o microarray tissutali con spessore 4µm - 6µm.
- Campioni di sangue periferico o colture di cellule di midollo osseo fissate con fissativo di Carnoy e lasciate asciugare all'aria su vetrini da microscopio secondo le procedure citogenetiche standard.

Tutti i campioni devono essere preparati secondo le linee direttrici del laboratorio o dell'istituzione.

## Protocollo della FISH

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

## Procedura FFPE

### Pretrattamento del campione di tessuto

Il pretrattamento del campione di tessuto deve essere eseguito secondo il protocollo in uso nel proprio laboratorio o istituzione. Per risultati ottimali utilizzare il Aquarius® Tissue Pretreatment Kit (LPS100).

### Pre-dénaturatione

1. Rimuovere la sonda dal congelatore e attendere che raggiunga la temperatura ambiente (TA).
2. Mescolare con una pipetta la soluzione della sonda in modo da renderla omogenea.
3. Trasferire in una provetta da microcentrifuga 10µl - 15µl (a seconda delle dimensioni del tessuto) di sonda per ciascun test da eseguire. Riporre rapidamente la sonda non utilizzata a -20°C.
4. Pre-riscaldare la sonda e il vetrino con il campione su una piastra riscaldante a 37°C (+/- 1°C) per 5 minuti.
5. Collocare 10µl - 15µl di miscela della sonda sul campione e cellulare e coprire delicatamente con un vetrino copri oggetto. Sigillare con una colla tipo mastice e attendere che la colla si asciughi completamente.

### Dénaturatione

6. Dénaturare contemporaneamente il campione e la sonda riscaldando il vetrino su una piastra riscaldante a 75°C (+/- 1°C) per 5 minuti.

### Ibridazione

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

### Lavaggi post-ibridazione

8. Rimuovere accuratamente il vetrino copri oggetto e qualsiasi residuo di colla.
9. Lavare il vetrino in 0.4xSSC (pH 7.0) a 72°C (+/- 1°C) per 2 minuti, senza agitazione.
10. Scolare il vetrino e lavare in 2xSSC, Tween-20 0,05% (pH 7.0) a TA per 30 secondi senza agitazione.
11. Scolare il vetrino e applicare 10µl - 15µl di DAPI antifade su ciascun campione.
12. Coprire con un vetrino copri oggetto, rimuovere eventuali bolle e attendere lo sviluppo del colore per 10 minuti lasciando il vetrino al buio.
13. Esaminare con un microscopio a fluorescenza.

### Commenti:

L'efficacia dell'ibridazione e la morfologia tissutale sono solitamente correlate in modo negativo. Procedure di pretrattamento aggressivo che aumentano l'efficacia dell'ibridazione (ad es., tempi prolungati di digestione enzimatica) tendono a distruggere la struttura cellulare e la morfologia tissutale. Tuttavia, un pretrattamento blando suscettibile di salvare le strutture tissutali potrebbe non essere sufficiente per garantire la penetrazione della sonda e per garantire risultati positivi di FISH.

La durata ottimale del prettreatment al calore e della digestione enzimatica dipenderà dall'età del blocco, dalla composizione tissutale e dalla qualità del fissaggio tissutale. La digestione enzimatica deve essere ridotta al minimo per biopsie percutanee e per qualsiasi sezione suscettibile di contenere un numero ridotto di cellule tumorali o caratterizzata da vaste aree necrotizzate. I campioni devono essere manipolati con particolare attenzione al fine di evitare un'eccessiva digestione.

### Sangue periferico o coltura di midollo osseo Procedura

#### Preparazione del vetrino

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

#### Pre-denaturazione

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

#### Denaturazione

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

#### Ibridazione

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

#### Lavaggi post-ibridazione

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

#### Stabilità dei vetrini ultimati

I vetrini sottoposti a FISH restano analizzabili per circa 1 mese se conservati al buio se conservata al buio sotto i 4°C

#### Raccomandazioni per la procedura

1. L'utilizzo del forno o l'invecchiamento di vetrini contenenti campioni di sangue periferico non sono consigliati perché potrebbero ridurre la fluorescenza del segnale.
2. Le condizioni di ibridazione potrebbero essere influenzate negativamente dall'impiego di reagenti diversi da quelli forniti o consigliati da CytoCELL Ltd.
3. È fortemente consigliato l'uso di un termometro calibrato per la misurazione delle temperature delle soluzioni, dei bagni termostati e degli incubatori in quanto queste temperature sono di fondamentale importanza per il funzionamento ottimale del prodotto.
4. Le concentrazioni, il pH e la temperatura dei lavaggi sono di fondamentale importanza in quanto condizioni di stringenza blande possono favorire un legame aspecifico della sonda, mentre condizioni di stringenza troppo elevate possono determinare l'assenza di segnale.
5. Una denaturazione incompleta può determinare l'assenza di segnale, mentre una denaturazione eccessiva può produrre un legame aspecifico.

#### Interpretazione dei risultati

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

#### Limitazioni

La referenziazione 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 alle tecniche citogenetiche classiche e azione terapeutica non deve essere messa in atto esclusivamente sulla base del risultato di FISH.

#### Informazioni aggiuntive

Per informazioni aggiuntive sul prodotto con tattare il Reparto di Assistenza Tecnica CytoCELL.

T: +44 (0)1223 294048

E: techsupport@cytoCELL.com

W: www.cytoCELL.com

### DEUTSCH

Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) ist eine Technik, mit der der Nachweis von DNA-Sequenzen auf Metaphasechromosomen oder in Interphasezellkernen fixierter zytogenetischer Proben erbracht werden kann. Die Technik nutzt DNA-Sonden, die auf ganze Chromosomen oder einzelne eindeutige Sequenzen hybridisieren, und dient als leistungsfähige Ergänzung zur klassischen Zytogenetik. Seit Kurzem ist es möglich, diese wertvolle Technik nun auch für die Auswertung von Biopsien solider Tumore anzuwenden, was wichtige Informationen für die Vorhersage der Tumorphase liefert. Aktuelle Methoden, wie z. B. Immunhistochemie oder Southern-Blotting, können Informationen auf Genexpressionsniveau bereitstellen. Mit der FISH-Technik hingegen erhält man, sofern diese entweder am Kryostat oder an in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitten durchgeführt wird, Informationen auf Genniveau an genau der untersuchten Stelle innerhalb des Tumors (*in situ*). Hierdurch können Heterogenitäten zwischen den einzelnen Zellen sowie kleine Klone genetisch verschiedenartiger Zellen aufgezeigt werden.

#### Sondenspezifikation

P16 9p21.3 Region, rot

D9Z3 9q12 Region, grün

Die P16-Sonde, rot markiert, deckt eine 193kb-Region von 9p21.3 ab, die sich telomerisch von 105kb des P16 (CDKN2A)-Gens bis 46kb zentromerisch von CDKN2B erstreckt. Die Sondenmischung enthält außerdem eine Kontrollsonde für Chromosom 9 (D9Z3, den heterochromatischen Block bei 9q12), grün markiert.

#### Bestandteile des Kits

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

Menge an P16 rot Sonde: 160-200ng/Test

Menge an D9Z3 grün Sonde: 120-150ng/Test

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

#### Farbstoff für die Gegenfärbung: 150µl pro Röhrchen (15 Tests)

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

#### Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen

1. Zur Verwendung in der *in vitro* Diagnostik. Durchführung ausschließlich durch qualifiziertes Laborpersonal.
2. Beim Umgang mit DNA-Sonden und dem DAPI Farbstoff Handschuhe tragen.
3. Sondernmischungen 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.
4. DAPI ist ein potenzielles 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 Platte und genauer Temperatursteuerung bis 80°C).
2. Mikropipetten mit unterschiedlichen Volumen von 1µl - 200µl.
3. Wasserbad mit genauer Temperatursteuerung bei 72°C.
4. Mikrozentrifugenröhrchen (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. Zeituhr.
13. 37°C-Inkubator.
14. Gummilösung zum Versiegeln der Deckglasränder.
15. Aquarius® Tissue Pretreatment Kit (LPS 100).

#### 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 und DAPI optimal geeignet. Alternativ dazu kann zur Beobachtung des roten und des grünen Fluorophors ein Zweifach-Bandpassfilter FITC/Texas Red verwendet werden.

#### Probenvorbereitung

Dieses Kit ist speziell der Verwendung bei:

- formalinfixierten, paraffineingebetteten Gewebeschnitten (FFPE-Gewebeschnitte) oder Gewebe-Microarrays (Tissue-Microarray, TMA) mit einer Dicke von 4 µm – 6 µm.
- in Carnoy's Fixativ fixierten, auf einem Mikroskop-Objektträger gemäß zytogenetischer Standardmethoden luftgetrockneten, peripheren Blutproben oder kultivierten Knochenmarkzellen.

Alle Proben sind nach den Richtlinien des Labors oder der Einrichtung zu präparieren.

#### FISH-Protokoll

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

#### FFPE-Verfahren

##### Vorbereitung von Gewebeproben

Gewebeproben werden gemäß den Richtlinien des Labors oder der Einrichtung vorbereitet. Optimale Ergebnisse werden mit dem Aquarius® Tissue Pretreatment Kit (LPS 100) erzielt.

#### Prä-denaturierung

1. Nehmen Sie die Sonde aus dem Gefrierschrank und lassen Sie diese sich auf Zimmertemperatur aufwärmen.
2. Mischen der Sondenlösung durch mehrmaliges Aufpipettieren
3. Pro Test 10µl - 15µl (je nach Größe des Gewebes) Sonde entnehmen und in ein Mikrozentrifugenröhrchen geben. Bewahren Sie die restliche Sonde bei -20°C auf.
4. Sonde und Probenobjektträger 5 Minuten auf einer Heizplatte bei 37°C (+/- 1°C) vorwärmen.
5. 10µl - 15µl Sondenmischung auf die Zellprobe auftropfen und Deckglas sorgfältig auflegen. Mit Gummikleber-Lösung versiegeln und vollständig trocknen lassen.

#### Denaturierung

6. Denaturieren sie Probe und Sonde gleichzeitig durch 5 minutiges Erwärmen des Objektträgers auf einer Heizplatte bei 75°C (+/- 1°C).

#### Hybridisierung

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

#### Waschen nach der Hybridisierung

8. Deckglas und alle Kleberspuren vorsichtig entfernen.
9. Objektträger 2 Minuten lang bei 72°C (+/- 1°C) in 0,4xSSC (pH 7,0) waschen.
10. Objektträger abtropfen lassen und 30 Sekunden bei Zimmertemperatur in 2xSSC, 0,05% Tween-20 (pH 7,0), waschen.
11. Objektträger abtropfen lassen und 10µl - 15µl DAPI Antifade zu jeder Probe geben.
12. Mit einem Deckglas abdecken, die Luftblasen entfernen und 10 Minuten unter Lichtschutz entwickeln lassen.
13. Unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachten.

#### Bemerkungen:

Wirkungsgrad der Hybridisierung und Gewebemorphologie stehen gewöhnlich in negativem Zusammenhang. Aggressive Vorbereitungsverfahren, die zu einem erhöhten Wirkungsgrad der Hybridisierung beitragen (z.B. eine verlängerte Enzymverdauungszeit), zerstören oft die Zellstrukturen und die Gewebemorphologie. Dennoch sind milde Vorbereitungsverfahren, durch die die Gewebestrukturen erhalten bleiben, oft nicht ausreichend für das Eindringen der Sonde und erfolgreiche FISH Ergebnisse. Die optimale Länge der Wärmebehandlung und Enzymverdauung hängt vom Alter des Blocks, der Gewebeszusammensetzung und der Qualität der Gewebefixierung ab. Die Enzymverdauung sollte für Kerngewebe sowie jegliche Schnitte, die nur wenige Tumorzellen oder große Nekrosebereiche enthalten, verkürzt werden. Solche Proben müssen besonders sorgfältig behandelt werden, um eine übermäßige Zersetzung zu vermeiden.

#### Verfahren für periphere Blutproben oder kultivierte Knochenmarkzellen

##### Vorbereitung des Objektträgers

1. Zellprobe auf Objektträger auftropfen und trocknen lassen.

- Den Objektträger en 2xSSC für 2 Minuten bei RT eintauchen (schütteln nicht notwendig).
- Dehydration mittels Alkoholreihe (70%, 85% und 100%), jeweils für 2 Minuten bei RT.
- Trocknen lassen.

#### Prä-denaturierung

- Nehmen Sie die Sonde aus dem Gefrierschrank und lassen Sie diese sich auf Zimmertemperatur aufwärmen.
- Mischen der Sondenlösung durch mehrmaliges Aufpipettieren
- Pro Test 10µl Sonde entnehmen und in ein Mikrozentrifugenröhrchen geben. Bewahren Sie die restliche Sonde bei -20°C auf.
- Sonde und Probenobjektträger 5 Minuten auf einer Heizplatte bei 37°C (+/- 1°C) vorwärmen.
- 10µl Sondenmischung auf die Zellprobe auftropfen und Deckglas sorgfältig auflegen. Mit Gummikleber-Lösung versiegeln und vollständig trocknen lassen.

#### Denaturierung

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

#### Hybridisierung

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

#### Waschen nach der Hybridisierung

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

#### Stabilität der fertigen Objektträger

Objektträger mit FISH-Proben können bis zu einem Monat lang analysiert werden, wenn sie im Dunkeln bei oder unter 4°C aufbewahrt werden.

#### Empfehlungen zur Durchführung

- Erhitzen oder Altern von Objektträgern mit peripheren Blutproben oder Knochenmark wird nicht empfohlen, da dies zu einer Verminderung der Signalfluoreszenz kann.
- Durch die Verwendung von Reagenzien, die nicht von Cytocell Ltd. empfehlensind, 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 niedrig stringente Bedingungen zu nicht spezifischer Bindung der Sonde führen kann und zu hohe Stringenz zum Verlust des Signals.
- Unvollständige Denaturierung kann zu einem Verlust des Signals führen und übermäßige Denaturierung kann zu nicht spezifischer Bindung der Sonde führen.

#### Zu erwartende Ergebnisse

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

#### Einschränkungen

Protokollierung und Interpretation der FISH-Tests müssen den fachlichen Standards für die Praxis entsprechen und unter Berücksichtigung anderer klinischer und diagnostischer Informationen erfolgen.

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 fluorescente *in situ* (FISH) es una técnica que permite detectar secuencias de ADN en cromosomas metafásicos o núcleos interfásicos de muestras citogenéticas fijas. La técnica utiliza sondas de ADN que hibridan con cromosomas enteros o secuencias únicas individuales, y constituye una potente herramienta auxiliar para la citogenética clásica. En recientes desarrollos se ha señalado que esta valiosa técnica puede aplicarse también ahora para evaluar las biopsias de tumores sólidos, que pueden aportar información importante para predecir la progresión tumoral. Las metodologías actuales, como la inmunohistoquímica o la técnica de Southern, pueden proporcionar datos a nivel de expresión génica, aunque, si se realizan cortes de tejido (criostato o inclusión en parafina), con la FISH se puede obtener información a nivel génico, *in situ*, en el punto exacto en el interior del tumor. Esto puede poner de manifiesto la heterogeneidad intercelular y permitir la detección de pequeños clones de células genéticamente distintas.

#### Especificaciones de las sondas

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

La sonda P16, marcada en rojo, cubre una región de 193kb de 9p21.3, extendiéndose 105kb telomérica del gen P16 (CDKN2A) hasta 46kb centromérica de CDKN2B. La combinación de sondas también contiene una sonda de control para el cromosoma 9 (D9Z3, el bloque heterocromático en 9q12) marcada en verde.

#### Material incluido

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

Cantidad de rojo P16 sonda: 160-200ng/análisis

Cantidad de verde D9Z3 sonda: 120-150ng/análisis

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

**Contratinción:** [50µl por vial (15 análisis)]

La tinción se realiza con DAPI Antifade (ES: 0,125µg/ml de DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol)).

#### Advertencias y precauciones

- Para diagnóstico *in vitro*. Sólo para uso profesional.
- Utilizar guantes al manipular las sondas de ADN y la contratinción DAPI.
- La sonda contiene formamida, que es teratogénica; 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 contratinción 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 manipulación

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

#### Material necesario pero no incluido

- Placa calefactora (con una placa estable y un control de temperatura preciso hasta 80°C).
- Micropipetas y puntas de volumen variable (de 1µl a 200µl).
- Baño maría con control preciso de temperatura a 72°C.
- Tubos de microcentrifugación (0,5ml).
- Microscopio de fluorescencia (véase la sección Recomendaciones sobre el microscopio de fluorescencia).
- Cubetas Coplin de cristal y de plástico.
- Pinzas.
- Aceite de inmersión para objetivos de microscopio de fluorescencia.
- Centrífuga sobremesa.
- Portaobjetos para microscopio.
- Cubreobjetos de 24x24mm.
- Temporizador.
- Incubadora a 37°C.
- Pegamento de solución de caucho.
- Aquarius® Tissue Pretreatment Kit (LPS 100).

#### Recomendaciones sobre el microscopio de fluorescencia

Para una visualización óptima de la sonda, se recomienda utilizar una lámpara de mercurio de 100 vatios y objetivos Plan-Apochromat de 63 o 100 aumentos. El triple filtro pasabanda DAPI/FITC/Texas Red es óptimo para ver simultáneamente los tres fluorocromos y DAPI. Para los fluorocromos rojo y verde debe emplearse el doble filtro pasabanda FITC/Texas Red

#### Preparación de las muestras

Este Kit se ha diseñado para utilizar en:

- Cortes histológicos fijados e incluidos en parafina (FFPE) o micromatrices histológicas (TMA), se deberán utilizar cortes de 4 µm – 6 µm de grosor.
- Muestras de sangre periférica o células de médula ósea cultivadas tratadas con fijador de Carnoy y secadas al aire en portaobjetos según los procedimientos citogenéticos habituales.

Todas las muestras deben prepararse según las instrucciones del laboratorio o la institución.

#### Protocolo para la FISH

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

#### Procedimiento para los FFPE

##### Pretratamiento de las muestras de tejido

El pretratamiento de las muestras de tejido debe realizarse de acuerdo con los protocolos del laboratorio o institución. Para un mejor resultado utilice el Aquarius® Tissue Pretreatment Kit (LPS 100).

##### Antes de la desnaturalización

- Saque la sonda del congelador a -20°C y deje que se caliente a temperatura ambiente (TA).
- Asegúrese de que la solución de la sonda queda homogéneamente mezclada con una pipeta.
- Extraiga 10µl - 15µl (dependiendo del tamaño de la muestra) de la sonda por análisis e introduzcalos en un tubo de microcentrifugación. Rápidamente vuelva a almacenar el resto de la sonda a -20°C.
- Precalente la sonda y el portaobjetos de la muestra en una placa calefactora a 37°C (+/- 1°C) durante 5 minutos.
- Vierta 10µl - 15µl de la solución de la sonda sobre la muestra de células y coloque cuidadosamente un cubreobjetos. Selle con pegamento de solución de caucho y deje que el pegamento se seque completamente.

##### Desnaturalización

- Desnaturalice la muestra y la sonda simultáneamente calentando el porta sobre la placa calefactora a 75°C (+/- 1°C) durante 5 minutos.

##### Hibridación

- Introduzca el porta en un recipiente húmedo y opaco a 37°C (+/- 1°C) y déjelo toda la noche.

##### Lavados posthibridación

- Quite el cubreobjetos y los restos del pegamento cuidadosamente.
- Sumerja el portaobjetos en 0,4xSSC (pH 7,0) a 72°C (+/- 1°C) durante 2 minutos sin agitar.
- Deje escurrir el portaobjetos y sumérjalo en 2xSSC, 0,05% de Tween-20 (pH 7,0) a TA durante 30 segundos sin agitar.
- Escurre el portaobjetos y añada 10µl - 15µl de DAPI antifade sobre cada muestra.
- Coloque un cubreobjetos, extraiga las burbujas y deje revelar el color en un lugar oscuro durante 10 minutos.
- Visualice con un microscopio de fluorescencia.

##### Comentarios:

La eficiencia de la hibridación y la morfología tisular son inversamente proporcionales. Los procedimientos de pretratamiento agresivos que mejoran la eficiencia de la hibridación (por ejemplo, un tiempo de digestión enzimática más prolongado) tienden a destruir la estructura celular y la morfología tisular. Sin embargo, un pretratamiento suave que resguarde las estructuras tisulares puede no bastar para que la sonda penetre bien y los resultados de FISH sean adecuados.

La duración óptima del pretratamiento térmico y de la digestión enzimática dependerá de la edad del bloque, la composición del tejido y la calidad de la fijación tisular. La digestión enzimática debe reducirse en caso de biopsias de punción con aguja gruesa y en cualquier sección que contenga pocas células tumorales o tengan zonas vastas de necrosis. Estas muestras deben manipularse con especial atención para evitar una digestión excesiva.

#### Procedimiento para la sangre periférica o la médula ósea cultivada

##### Preparación del portaobjetos

- Extender la muestra en un portaobjetos. Dejarlo secar.
- Sumerja el portaobjetos en 2xSSC durante 2 minutos a temperatura ambiente sin agitación.
- Dehidrate 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 microcentrífuga. Vuelva a almacenar el resto de la sonda a -20°C.

8. Precalente el portaobjetos y la muestra en una placa caliente a 37°C (+/- 1°C) durante 5 minutos.
9. Ponga 10µl de sonda sobre el portaobjetos y aplique cuidadosamente el cubreobjetos. Selle con solución de goma y deje secar completamente.

#### Desnaturalización

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

#### Hibridación

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

#### Lavados post-hibridación

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

#### Estabilidad de los portaobjetos terminados

Los portaobjetos sometidos a la técnica FISH pueden analizarse durante 1 mes si se conservan en un lugar oscuro debajo de 4°C.

#### Recomendaciones para los procedimientos

1. No se recomienda calentar ni madurar los portas con muestras de sangre periférica ni de médula ósea ya que puede reducir la fluorescencia de la señal.
2. Las condiciones de hibridación pueden verse afectadas negativamente si se emplean reactivos distintos de los suministrados o recomendados por CytoCELL Ltd.
3. Se recomienda encarecidamente el uso de un termómetro de precisión para medir las temperaturas de soluciones, baños maría e incubadores ya que estas temperaturas son cruciales para un resultado óptimo del producto.
4. Las concentraciones de los lavados, el pH y las temperaturas son importantes ya que unas condiciones poco rigurosas pueden provocar una hibridación inespecífica de la sonda y unas condiciones demasiado rigurosas pueden derivar en una falta de señal.
5. Una desnaturalización incompleta puede provocar falta de señal y una desnaturalización excesiva también puede originar una hibridación inespecífica.

#### Interpretación de los resultados

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

#### Limitaciones

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

#### Información adicional

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






T: +44 (0)1223 294048

E: techsupport@cytoCELL.com

W: www.cytoCELL.com

#### References/Bibliographie/Bibliographia/Literatur/Bibliografía

1. Guney *et al.*, Genes Chromosomes Cancer. 2012 Sep;51(9):858-67
2. Chim *et al.*, Hum Pathol. 2007 Dec;38(12):1849-57
3. Møller *et al.*, Leukemia. 1999 Mar;13(3):453-9
4. Jardín *et al.*, Blood. 2010 Aug 19;116(7):1092-104

<b>REF</b>	<b>EN:</b> Catalogue number <b>DE:</b> Bestellnummer <b>FR:</b> Référence du catalogue <b>IT:</b> Numero di catalogo <b>ES:</b> Número de catálogo
<b>IVD</b>	<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>LOT</b>	<b>EN:</b> Batch code <b>DE:</b> Ch.-B. <b>FR:</b> Code du lot <b>IT:</b> Codice lotto <b>ES:</b> Código de lote
	<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> Consulte las instrucciones de uso
	<b>EN:</b> Manufacturer <b>DE:</b> Hersteller <b>FR:</b> Fabricant <b>IT:</b> Prodotto da <b>ES:</b> Fabricante
	<b>EN:</b> Use by <b>DE:</b> Haltbarkeitsdatum <b>FR:</b> A utiliser avant <b>IT:</b> Scadenza <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 <n> Tests <b>FR:</b> Suffisant pour <n> tests <b>IT:</b> Sufficiente per <n> test <b>ES:</b> Válido para <n> análisis
<b>CONT</b>	<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