



Instructions For Use

REF: PMP 802 / PMP 804 / PMP 803

Chromoprobe Multiprobe® OctoChrome™



FOR PROFESSIONAL USE ONLY

ENGLISH/FRANÇAIS/ITALIANO/DEUTSCH/ESPAÑOL

Further information available at www.cytocell.com

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

Probe Information

Cytocell's Chromoprobe Multiprobe® OctoChrome™ combines the utility of an 8 square Multiprobe device and the whole chromosome painting probe (labelled in 3 different colours), to allow all 24 chromosomes to be identified on a single slide. The OctoChrome™ device allows the simultaneous analysis of the whole genome on one slide in one hybridisation.

Probe Specification

Each square of the OctoChrome™ device carries whole chromosome painting probes for three different chromosomes in three different colour fluorophores, red, green and blue (Texas Red, FITC and Aqua/DEAC spectra respectively) which are visible simultaneously with a DAPI/FITC/Texas Red triple filter or specific single filters.

The arrangement of chromosome combinations on the OctoChrome™ device has been designed to facilitate the identification of the non-random chromosome rearrangements found in the most common leukaemias (Figure 1).

The OctoChrome™ is intended for FISH on metaphase chromosomes from fixed cultured peripheral blood cells.

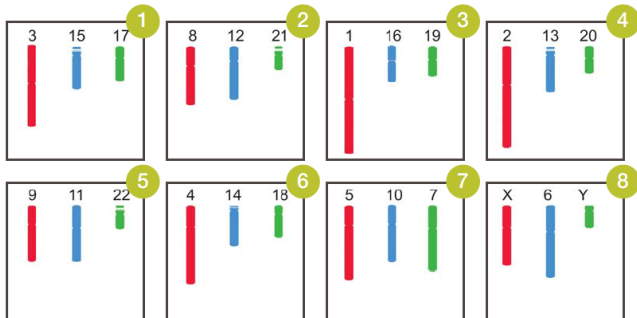


Figure 1. Location of the probes on the Chromoprobe Multiprobe® OctoChrome™.

Materials Provided

Each kit contains the following reagents, which are sufficient for either 2 (PMP 802), 5 (PMP 804) or 10 (PMP 803) patient samples:

- 2, 5 or 10 Chromoprobe Multiprobe® OctoChrome™ devices coated with directly labelled probes:
Amount of red painting probe: 12-16ng per square
Amount of green painting probe: 36-51 ng per square
Amount of blue painting probe: 112-122ng per square
- 4, 7 or 12 glass slides printed with a special template
- 500µl Hybridisation Solution (Formamide, Dextran Sulphate, SSC)
- 1 Cytocell Slide Surface Thermometer
- 1 Cytocell Chromoprobe Multiprobe® Hybridisation Chamber

Warnings and Precautions

- For *in vitro* diagnostic use. For professional use only.
- Wear gloves when handling Hybridisation solution, DNA probes and DAPI counterstain.
- Hybridisation Solution contains 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.
- Dispose of all hazardous materials according to your institution's guidelines for hazardous waste disposal.
- Operators must be capable of visually distinguishing between red, blue and green.
- Failure to adhere to the protocol may affect the performance and lead to false positive/negative results.

Storage and Handling

The Chromoprobe Multiprobe® kit should be stored at 2-8°C until the expiry date indicated on the kit label. Do not freeze.

Equipment and Materials Necessary but not Supplied

- 500µl Counterstain (DAPI antifade (ES: 0.125µg/ml DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole)).
- 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.
- Timer.
- 37°C water bath without stirrer.

Fluorescence Microscope Recommendation

Use a 100-watt mercury lamp and plan apochromat objectives x63 or x100 for optimal visualisation. Use a triple bandpass filter DAPI/FITC/Texas Red for optimal visualisation of the green and red fluorophores and DAPI simultaneously. The aqua fluorophore has specificity to the Aqua and DEAC spectrum (single bandpass Aqua or DEAC filter is required).

Check the fluorescence microscope before use to ensure it is operating correctly. Use immersion oil that is suitable for fluorescence microscopy and formulated for low autofluorescence. Avoid mixing DAPI Antifade with microscope immersion oil as this will obscure signals. Follow manufacturers' recommendations in regards to the life of the lamp and the age of the filters.

Sample Preparation

The Chromoprobe Multiprobe® OctoChrome™ is designed for use on cultured peripheral blood cells fixed in Carnoy's fixative that should be prepared according to the laboratory or institution guidelines.

Prepare air dried samples on Cytocell Chromoprobe Multiprobe® template slides according to Cytocell's protocol below. Baking or otherwise ageing slides is not recommended as it may reduce signal fluorescence.

Chromoprobe Multiprobe® Protocol

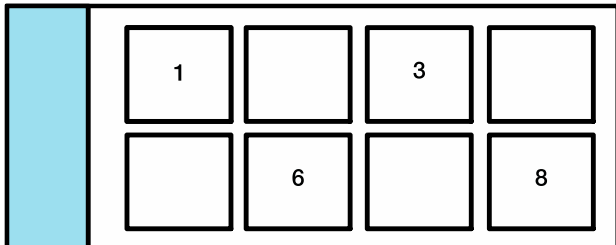
Please note: The probes used on the Chromoprobe Multiprobe® device are directly labelled with fluorophores, which are light sensitive. Ensure that exposure of the probes to laboratory lights is limited at all times (it is not necessary to work in the dark).

1. Slide preparation

- Clean a template slide. Soak the template slide for 2 minutes in 100% methanol and polish dry with a clean soft tissue.
- Establish the correct mitotic index. It is important that the intended sample has a sufficiently high mitotic index to allow detection of chromosome abnormalities. To check the density of the sample, using a micropipette (e.g. a Gilson P10 or P20) pipette 4µl of the cell suspension onto one of the areas of the spare template slide and allow to air dry. The small volume used means that you usually have to gently touch the slide with the pipette tip to transfer the suspension. Examine by phase contrast microscopy. If the cell density is too high, dilute the suspension with fresh fixative. If the mitotic index is too low, spin down the fixed cell suspension at 160xg for 10 minutes. Note the volume of supernatant, remove, and re-suspend the cell pellet in a smaller volume of fresh fixative. If cell sample density has been altered, spot 4µl of the concentrated sample onto another square of your test slide and re-examine by phase contrast microscopy.

Please Note: 50µl is the minimum volume required for the protocol.

- c) Quality control of samples. Samples should be examined for cytoplasm since this will interfere with the *in situ* protocol. If the chromosomes appear to be enclosed by a granular material when examined under phase contrast microscopy, then this will compromise results. One method for reducing cytoplasm is to spot 4µl of your sample onto the template slide and watch the fixative as it spreads out: in the normal situation, the fixative will spread to maximum, recede and then evaporate. To clean up any cytoplasm we have found that effective results are achieved if a fresh drop of fixative is allowed to fall onto the spot at the point when the spreading fixative has reached its maximum. Allow the drop of fixative to evaporate and re-examine the spot.
- d) Spotting of the slide. Pipette 4µl of cell suspension onto all 8 areas of the template slide in a sequence of alternating squares as shown below. This will prevent the cell spreads from interfering with each other.



- e) Once the first group of drops has air-dried, spot the remaining squares with 4µl drops in the same manner. After the slide has dried, examination of the slide under phase contrast will reveal whether any squares have been missed. If spots have been missed, or squares have too few cells, simply spot those squares again: it is not necessary to re-spot a new slide. If upon examination of the slide, a square has insufficient cells/metaphases, further drop(s) of suspension can be added to increase the cell density.

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

2. Preparation of the Chromoprobe Multiprobe® device and template slide

- Ensure that the Chromoprobe Multiprobe® Hybridisation Chamber is in the 37°C water bath and allow it to equilibrate to 37°C (+/- 1°C). This may take up to an hour if the water bath has been switched on from cold.
- Mix the hybridisation solution by repeated pipetting and pre-warm a 25µl aliquot per device to 37°C. Also pre-warm each device by placing it on a 37°C hotplate label side down. Do not touch the raised surfaces of the device.
- Immerse template slides containing fixed samples in 2xSSC for 2 minutes at room temperature (RT) without agitation.
- Whilst the device is still at 37°C, dehydrate template slides containing fixed samples through an ethanol series (2 minutes each in 70%, 85% and 100%) at RT, air dry and place at 37°C hotplate to warm up.
- Add 2µl of pre-warmed hybridisation solution to each of the eight areas on the pre-warmed device using a P10 micropipette while it remains on a 37°C hotplate.

3. Positioning of template slide over the device

- Carefully invert the template slide over the device such that the number 1, which is now upside down, is located over the top right hand area of the device. To help locate square 1 (Chromosomes 3, 15 & 17), its position on the device has been marked with an orange dot).
- Make sure that the template slide is carefully aligned with the matching areas on the device. Carefully lower the slide over the device so that the drops of hybridisation solution make contact with the slide. Apply gentle, even pressure to ensure that the hybridisation solution is spread to the edges of each of the raised areas on the device.
- Lift the slide carefully holding the frosted end of the glass slide and invert so that the template slide is underneath the device. Make sure the device does not smear across the template slide as this could cause cross-contamination of the probes.
- Place at 37°C (+/- 1°C) (hotplate or incubator) for 10 minutes.

4. Instructions for use of the Cytocell Slide Surface Thermometer

- The temperature of the 75°C hotplate should be checked with the Cytocell Slide Surface Thermometer before proceeding to denaturation.
- To use the thermometer properly, place it onto the surface of the hotplate and wait until the different segments stop changing colour. The actual temperature is indicated by a deep aqua colour.

Please note:

- When the segments appear granular and the colours no longer appear uniform and regular, the thermometer should be discarded as it is exhausted. The life span of each thermometer should, however, easily be sufficient for a ten-device kit.
- This thermometer is a liquid crystal device and although reusable, it must be treated with care to ensure a reasonable life span. The thermometer must only be used to check the temperature of a hotplate; it must not be used to monitor the hotplate performance over time.

5. Denaturation

Please note: A PCR thermal cycler-heating block is NOT suitable for use in place of solid bed hotplate for this procedure.

- Transfer the slide/device sandwich to the hotplate taking particular care to hold it level. Ensure the sample slide is in good contact with the hotplate.
- Denature on the hotplate at 75°C (+/- 1°C) for 5 minutes.

6. Hybridisation

Place the slide/device sandwich in the pre-warmed Chromoprobe Multiprobe® Hybridisation Chamber, replace the lid and float the chamber in the 37°C (+/- 1°C) water bath (non-stirring) overnight.

Please note:

- Do not seal the lid on the hybridisation chamber.
- Do not place a lid on the water bath.
- Do not hybridise in an incubator.
- Please ensure that the hybridisation chamber is completely dry (i.e. no water or damp tissue inside the chamber).

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

7. Post-hybridisation stringent washes

Please note: Avoid processing more than two slides through the stringency washes at any one time.

- Remove the device carefully from the slide.
- Immerse the slide in 0.4xSSC (pH 7.0) at 72°C (+/- 1°C) for 2 minutes without agitation.
- Drain the slide and immerse it in 2xSSC, 0.05% Tween-20 at RT (pH 7.0) for 30 seconds without agitation.

8. Mounting and visualisation of results

- Drain the slide and apply 20µl of DAPI antifade to each end of the slide.
- Cover with a coverslip (24x50mm or 24x60mm), remove any bubbles and allow the colour to develop in the dark for 10 minutes.
- View with a fluorescence microscope.

Please note: Certain types of microscope have slide holders, which make it difficult to view the extreme ends of the slide. If this occurs then simply turn the slide through 180°, which will help with the viewing of the slide.

Stability of Finished Slides

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

Procedural Recommendations

- Baking or ageing of slides may reduce signal fluorescence
- Hybridisation conditions may be adversely affected by the use of reagents other than those provided or recommended by Cytocell Ltd.
- Use a calibrated thermometer for measuring temperatures of solutions, waterbaths and incubators as these temperatures are critical for optimum product performance.
- 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.
- Incomplete denaturation can result in lack of signal and over denaturation can also result in non-specific binding.
- Over hybridisation can result in additional or unexpected signals.
- Users should optimise the protocol for their own samples prior to using the test for diagnostic purposes.
- Slides should be independently scored by two analysts.
- Suboptimal conditions may result in non-specific binding that may be misinterpreted as a probe signal.

Expected Results

- The acrocentric chromosome painting probes contain short arm material. This is shared between the D & G group chromosomes, so cross-hybridisation in these regions may be observed.
- The chromosome 16 whole chromosome painting probe may show faint cross-hybridisation to the heterochromatic regions of chromosome Y.
- The Y chromosome painting probe contains the pseudoautosomal regions common with the X chromosome. Consequently, cross-hybridisation may be observed in these regions.
- Chromosomes 1, 5 and 19 have centromeric DNA sequences in common. Consequently cross-hybridisations in these regions may be observed between these chromosomes.
- Chromosome 1 whole chromosome painting probe may show a brighter signal at 1p36.
- Whole chromosome painting probes do not cover the Heterochromatic blocks in chromosomes 1, 9 and 16.

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 affect the performance and lead to false positive/negative results. This kit has not been validated for purposes outside of the intended use stated.

Additional Information

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

T: +44 (0)1223 294048

E: techsupport@cytoCell.com

W: www.cytoCell.com

FRANÇAIS

L'hybridation *in situ* par fluorescence (FISH) est une technique qui permet de détecter des séquences ADN sur les chromosomes en métaphase ou sur les noyaux interphasiques d'échantillons cytogénétiques fixés cultivés ou non cultivés. La technique utilise des sondes ADN qui s'hybrident aux chromosomes entiers ou à des séquences spécifiques, et sert de test complémentaire à la cytogénétique classique. De récents développements ont démontré que cette technique informative peut maintenant être utilisée comme un outil diagnostique essentiel lors de l'analyse des chromosomes en prénatal, hématologie et pathologie. L'ADN cible, après fixation, est traité par la chaleur et à la formamide pour dénaturer la double hélice, la rendant simple hélice. L'ADN cible est alors disponible pour hybridation avec une sonde ADN complémentaire simple brin, dénaturée de la même manière et marquée avec un fluorochrome. Après l'hybridation, l'ADN non hybridé et l'ADN non lié spécifiquement sont éliminés par une série de lavages stringents et l'ADN est ensuite contre-coloré. Un microscope à fluorescence permet ensuite la visualisation de la sonde hybridée sur l'ADN cible.

Informations sur les sondes

Le panel Chromoprobe Multiprobe® OctoChrome™ de CytoCell combine le principe d'un dispositif Multiprobe à 8 cases et l'ensemble des sondes peintures chromosomiques (marquées en 3 couleurs différentes), pour permettre l'identification des 24 chromosomes sur une seule lame. Le dispositif OctoChrome™ permet l'analyse simultanée du génome entier sur une seule lame en une seule hybridation.

Caractéristiques de la sonde

Chaque case du dispositif OctoChrome™ contient l'ensemble des sondes peintures chromosomiques pour trois chromosomes différents, chacune des 3 sondes étant marquée avec un fluorochrome de couleur différente, rouge, vert et bleu (spectres Texas Red, FITC et Aqua/DEAC respectivement), qui sont visibles simultanément avec un filtre triple passe-bande DAPI/FITC/Texas ou des filtres individuels spécifiques.

La disposition des combinaisons chromosomiques sur le dispositif OctoChrome™ a été conçue pour faciliter l'identification des réarrangements chromosomiques non aléatoires présents dans les leucémies les plus courantes (figure 1).

Le dispositif OctoChrome™ est prévu pour une hybridation *in situ* avec des sondes fluorescentes, effectuée sur des chromosomes métaphasiques provenant de cellules de sang périphérique cultivées et fixées.

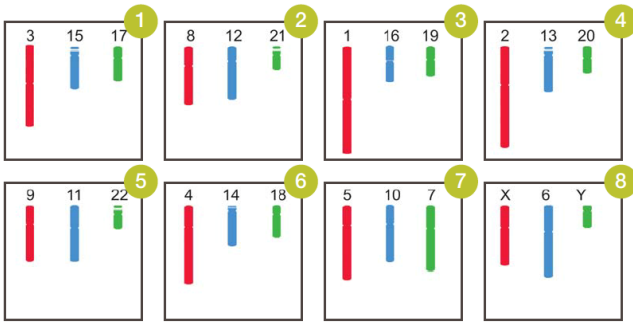


Figure 1. Emplacement des sondes sur le Multiprobe Chromoprobe® OctoChrome™.

Conditionnement

Chaque trousse contient les réactifs nécessaires pour tester 2 (PMP 802), 5 (PMP 804) ou 10 (PMP 803) échantillons de patient :

- 2, 5 ou 10 dispositifs Chromoprobe Multiprobe® OctoChrome™ coatés avec des sondes de peinture directement marquées.
Quantité de sonde de peinture marquée en rouge : 2,5-5ng par case
Quantité de sonde de peinture marquée en vert : 7,5-12,5ng par case
Quantité de sonde de peinture marquée en bleu : 15-25ng par case
- 4, 7 ou 12 lames en verre imprimées avec un motif particulier.
- 500µl de solution d'hybridation (formamide, sulfate de dextrane, SSC)
- 1 thermomètre de surface (CytoCell Slide Surface Thermometer)
- 1 chambre d'hybridation CytoCell Chromoprobe Multiprobe®

Avertissements et précautions

- Pour des applications de diagnostic *in vitro*. Pour une utilisation professionnelle uniquement.
- Portez des gants lors de la manipulation de la solution d'hybridation, des sondes DNA et de contre-colorant DAPI.
- La solution d'hybridation contient du formamide, qui est tératogène. N'inhaliez pas les vapeurs et évitez tout contact avec la peau. Portez des gants et une blouse de laboratoire, et manipulez sous une hotte. Lors de la mise au rebut, rincez avec une grande quantité d'eau.
- Le DAPI est potentiellement cancérigène. Manipulez-le avec précaution; portez des gants et une blouse de laboratoire. Lors de la mise au rebut, rincez avec une grande quantité d'eau.
- Mettez au rebut toutes les matières dangereuses conformément aux directives de votre institution en matière de mise au rebut des déchets dangereux.
- Visuellement, les opérateurs doivent être en mesure de faire la différence entre le rouge, le bleu et le vert.
- Si le protocole n'est pas respecté, la performance peut être affectée et des résultats erronés/positifs/négatifs peuvent être obtenus.

Conservation et manipulation

La trousse Chromoprobe Multiprobe® doit être conservée entre 2 et 8°C jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette de la trousse. Ne pas congeler.

Équipement et matériaux nécessaires mais non fournis

- 500µl de contre-colorant (DAPI antifade (ES: 0,125µg/mL DAPI (4,6-diamidino-2-phénylindole))).
- Plaque chauffante (avec bloc et contrôle de la température jusqu'à 80°C).
- Micropipettes 1µl - 200µl.
- Bain-marie avec contrôle de la température à 72°C.
- Tubes à microcentrifugation (0,5ml).
- Microscope à fluorescence (Voir la section Microscope et filtres).

- Jarres en plastique ou en verre.
- Forceps.
- Huile à immersion pour microscope à fluorescence.
- Centrifugeuse de paillasse.
- Lamelles en verre pour fluorescence (24 x 50 mm)
- Chronomètre.
- Bain-marie à 37°C sans agitateur.

Microscope et filtres

Utilisez une lampe au mercure de 100-watts et planifiez des objectifs apochromatiques de x63 ou x100 pour une visualisation optimale. Utilisez un filtre passe-bande triple DAPI/FITC/Texas Red pour une visualisation optimale et simultanée des fluorophores verts et rouges et DAPI. L'aqua fluorophore a une spécificité pour le spectre Aqua et DEAC (un filtre passe-bande unique Aqua ou DEAC est requis).

Contrôlez le microscope à fluorescence avant toute utilisation pour vous assurer qu'il fonctionne correctement. Utilisez une huile d'immersion appropriée pour la microscopie à fluorescence et formulée pour l'autofluorescence faible. Évitez de mélanger la solution DAPI antifade avec de l'huile d'immersion pour microscope, car cela assombrit les signaux. Suivez les recommandations du fabricant relatives à la durée de vie de la lampe et des filtres.

Préparation des échantillons

La trousse Chromoprobe Multiprobe® OctoChrome™ est conçue pour une utilisation sur des cellules de sang périphérique cultivées, fixées avec le fixateur de Carnoy et devant être préparées selon les protocoles en vigueur dans le laboratoire ou l'institution.

Préparer les échantillons séchés à l'air sur les lames échantillons CytoCell Chromoprobe Multiprobe® selon le protocole CytoCell ci-dessous. La cuisson ou le vieillissement des lames n'est pas recommandé, ceci pouvant réduire l'intensité du signal fluorescent.

Protocole Chromoprobe Multiprobe®

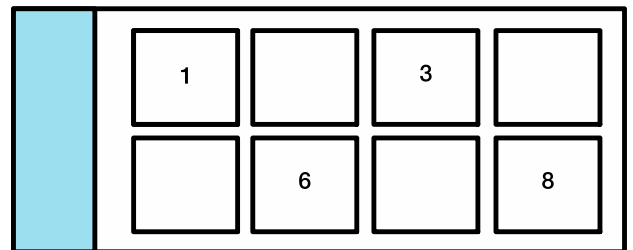
Remarque : les sondes utilisées pour le dispositif Chromoprobe Multiprobe® sont directement marquées avec des fluorophores photosensibles. S'assurer que l'exposition des sondes aux lumières du laboratoire est limitée en permanence (il n'est pas nécessaire de travailler dans l'obscurité).

1. Préparation des lames

- Nettoyage d'une lame échantillon. Plonger la lame échantillon dans un bain méthanol 100% pendant 2 minutes et sécher avec un tissu doux.
- Définir l'index mitotique correct. Il est important que l'échantillon ait un index mitotique élevé afin de permettre la détection d'anomalies chromosomiques. Pour vérifier la densité de l'échantillon, utiliser une micropipette (par exemple, Gilson P10 ou P20), pipeter 4µl de suspension cellulaire et déposer sur l'une des surfaces de la lame échantillon de réserve, puis laisser sécher à l'air. Vu le petit volume utilisé, vous devez généralement toucher légèrement la lame avec l'embout de la pipette pour transférer la suspension. Examiner avec un microscope à contraste de phase. Si la densité cellulaire est trop élevée, diluer la suspension avec du fixateur frais. Si l'index mitotique est trop faible, centrifuger la suspension de cellules fixées à 160g pendant 10 minutes. Noter le volume de surnageant, éliminer le et resuspendre le culot cellulaire dans un plus faible volume de fixateur frais. Si la densité de l'échantillon cellulaire a été modifiée, déposer 4µl de l'échantillon concentré sur une autre case de votre lame d'essai, et vérifier de nouveau au microscope à contraste de phase.

Remarque : un volume minimum de 50µl est requis par le protocole.

- Contrôle de la qualité des échantillons. Les échantillons doivent être examinés afin de s'assurer de l'absence de cytoplasme, celui-ci pouvant perturber le protocole *in situ*. Si les chromosomes semblent être enveloppés par une substance granulaire lors de l'examen au microscope à contraste de phase, les résultats seront compromis. Une méthode pour réduire le cytoplasme consiste à déposer 4µl d'échantillon sur la lame échantillon et observer la façon dont le fixateur s'étale. Normalement, le fixateur s'étale au maximum, se rétracte, puis s'évapore. Pour éliminer le cytoplasme, nous avons constaté que des résultats efficaces sont obtenus si l'on dépose une goutte de fixateur frais sur le dépôt lorsque l'étalement du fixateur est maximal. Laisser la goutte de fixateur s'évaporer et examiner de nouveau le dépôt.
- Dépôt sur la lame. Pipeter et déposer 4µl de suspension cellulaire sur chacune des 8 cases de la lame échantillon, selon un motif en quinconce comme illustré ci-dessous. Ceci évitera que les gouttes de suspension cellulaire interfèrent entre elles lors de leur étalement.



- Lorsque le premier groupe de gouttes a séché, déposer de la même façon 4µl de suspension cellulaire dans les cases restantes. Lorsque la lame est sèche, un examen de la lame en contraste de phase permettra de s'assurer qu'aucune case n'a été oubliée. S'il manque des gouttes, ou si des cases comportent trop peu de cellules, redéposer simplement d'autres gouttes sur ces cases. Il n'est pas nécessaire de réparer une nouvelle lame. Si après examen de la lame, une case ne présente pas suffisamment de cellules/métaphases, il est possible de redéposer d'autres gouttes de suspension afin d'augmenter la densité cellulaire.

Remarque : si les métaphases semblent sur-étalées, nettoyer complètement une nouvelle lame échantillon dans du méthanol et effectuer un nouveau dépôt, puis laisser sécher chaque goutte avant de passer au dépôt suivant.

2. Préparation du dispositif Chromoprobe Multiprobe® et de la lame échantillon

- Vérifier que la chambre d'hybridation Chromoprobe Multiprobe® se trouve dans un bain-marie à 37°C et laisser équilibrer à 37°C (+/- 1°C). Ceci peut prendre jusqu'à une heure au maximum si le bain-marie était froid au départ.
- Mélanger la solution d'hybridation en pipétant plusieurs fois et préchauffer un aliquote de 25µl par dispositif à 37°C. Préchauffer également chaque dispositif en le plaçant sur une plaque chauffante à 37°C et en vérifiant que l'étiquette est placée au-dessous. Ne pas toucher les surfaces hautes du dispositif.
- Plonger les lames comportant les échantillons fixés dans du tampon 2xSSC pendant 2 minutes, à température ambiante sans agitation.
- Alors que le dispositif est toujours à 37°C, déshydrater les lames comportant les échantillons fixés dans une série de bains d'éthanol (2 minutes dans chaque bain,

70%, 85% et 100%) à température ambiante, laisser sécher à l'air et placer sur la plaque chauffante à 37°C pour démarrer.

- e) Ajouter 2µl de solution d'hybridation préchauffée sur chacune des 8 cases du dispositif chauffé à l'aide d'une micropipette P10 pendant que celui-ci est encore sur la plaque chauffante à 37°C.

3. Positionnement de la lame échantillon sur le dispositif

- e) Retourner délicatement la lame échantillon sur le dispositif, de telle sorte que la case numéro 1, qui est à présent inversée, soit positionnée en haut et à droite du dispositif Pour faciliter la localisation de la case 1 (Chromosomes 3, 15 & 17), sa position sur le dispositif a été marquée avec un point orange
- b) Veillez à ce que la lame échantillon soit bien alignée sur les cases complémentaires du dispositif. Appliquez délicatement la lame sur le dispositif afin que les gouttes de solution d'hybridation entrent en contact avec la lame. Appuyez légèrement en exerçant la même pression, afin de garantir que la solution d'hybridation est étalée sur les bords de chacune des surfaces hautes du dispositif.
- c) Soulevez délicatement la lame en tenant l'extrémité dépolie de la lame de verre et retournez afin que la lame échantillon soit en dessous du dispositif. S'assurer que le dispositif ne glisse pas sur la lame échantillon, car ceci pourrait entraîner des contaminations croisées entre les sondes.
- d) Placer à 37°C (+/- 1°C) (plaque chauffante ou incubateur) pendant 10 minutes.

4. Mode d'emploi du thermomètre Cytocell Slide Surface Thermometer

- a) La température de la plaque chauffante (75°C) doit être vérifiée avec le thermomètre Cytocell Slide Surface Thermometer avant de procéder à l'étape de dénaturation.
- b) Pour utiliser le thermomètre correctement, le placer sur la surface de la plaque chauffante et attendre que les différents segments cessent de changer de couleur. La bonne température est indiquée par une couleur vert opale.

Remarque :

- c) Si les segments apparaissent granuleux et de couleur non uniforme et non régulière, le thermomètre doit être jeté, car il est usé. Toutefois, la durée de vie de chaque thermomètre devrait être bien suffisante pour l'utilisation d'une trousse de 10 tests.
- d) Ce thermomètre est un dispositif à cristaux liquides et bien que réutilisable, il doit être manipulé avec précaution pour garantir une durée de vie raisonnable. Le thermomètre ne doit être utilisé que pour vérifier la température d'une plaque chauffante ; il ne doit pas être utilisé pour surveiller le fonctionnement de la plaque chauffante à mesure que le temps passe.

5. Dénaturation

Remarque : un bloc chauffant de thermocycleur PCR NE peut PAS être utilisé pour remplacer une plaque chauffante en lit fixe pour ce protocole.

- a) Transférer l'ensemble lame/dispositif sur la plaque chauffante en faisant bien attention de la maintenir horizontalement. S'assurer que la lame échantillon est bien en contact avec la plaque chauffante.
- b) Dénaturer sur la plaque chauffante à 75°C (+/- 1°C) pendant 5 minutes.

6. Hybridation

Placer l'ensemble lame/dispositif dans la chambre d'hybridation Chromoprobe Multiprobe®, remettre le couvercle et laisser flotter la chambre dans un bain-marie à 37°C (+/- 1°C) (sans agitation) pendant une nuit.

Remarque :

- a) Ne pas sceller le couvercle de la chambre d'hybridation.
- b) Ne pas placer un couvercle sur le bain-marie.
- c) Ne pas hybrider dans un incubateur.
- d) Veuillez vous assurer que la chambre d'hybridation est bien sèche (c'est-à-dire, aucune eau ou tissu humide à l'intérieur de la chambre).

L'humidité à l'intérieur de la chambre est cruciale pour une hybridation optimale. Les taux corrects seront obtenus en suivant ces étapes.

7. Lavages stringents de post-hybridation

Remarque : éviter de traiter plus de 2 lames à la fois lors de l'étape de lavages stringents.

- a) Retirer délicatement le dispositif de la lame.
- b) Plonger la lame dans un tampon 0,4xSSC (pH 7,0) à 72°C (+/- 1°C) pendant 2 minutes, sans agitation.
- c) Égoutter la lame et la plonger dans un tampon 2xSSC, Tween-20 à 0,05% à température ambiante (pH 7,0) pendant 30 secondes, sans agitation.

8. Montage et visualisation des résultats

- a) Égoutter la lame et déposer 20µl de DAPI antifade sur chaque extrémité de la lame.
- b) Couvrir avec une lamelle (24 x 50mm), éliminer toute bulle et laisser la couleur se développer dans l'obscurité pendant 10 minutes.
- c) Visualiser avec un microscope à fluorescence.

Remarque : certains types de microscope sont équipés de porte-lame, ce qui peut compliquer la visualisation des extrémités de la lame. Si c'est le cas, tourner simplement la lame de 180° pour en faciliter la vue.]

Stabilité des lames

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

Recommandations

- La cuisson ou le vieillissement des diapositives peut réduire la fluorescence du signal.
- Les conditions d'hybridation peuvent être affectées négativement si des réactifs autres que ceux fournis ou recommandés par Cytocell Ltd. sont utilisés.
- Utilisez un thermomètre étalonné pour mesurer les températures des solutions, des bains d'eau et des incubateurs, car ces températures sont essentielles à la performance optimale du produit.
- La concentration, le pH et la température de la solution de rinçage sont importants car une faible stringence peut entraîner une liaison non spécifique de la sonde et une stringence trop élevée peut entraîner une absence de signal.
- Une dénaturation incomplète peut entraîner une absence de signal et une dénaturation trop élevée peut entraîner également une liaison non spécifique.
- Une dénaturation trop élevée peut générer des signaux supplémentaires ou inattendus.
- Avant toute utilisation du test à des fins de diagnostic, les utilisateurs devront optimiser le protocole pour leurs propres échantillons.
- Les diapositives devront être notées indépendamment par deux analystes.
- Des conditions sous-optimales peuvent entraîner une liaison non spécifique susceptible d'être interprétée comme un signal de la sonde.

Résultats attendus

- Les sondes de peinture des chromosomes acrocentriques comportent du matériel de bras court, partagé entre les chromosomes des groupes D et G, de sorte qu'une

hybridation croisée peut être constatée dans ces régions.

- La sonde de peinture de chromosome entier spécifique du chromosome 16 peut présenter une faible hybridation croisée dans les régions hétérochromatiques du chromosome Y.
- La sonde de peinture spécifique du chromosome Y contient les régions pseudoautosomales communes avec le chromosome X. Par conséquent, une hybridation croisée peut être observée dans ces régions.
- Les chromosomes 1, 5 et 19 possèdent en commun des séquences d'ADN centromérique. Par conséquent, des hybridations croisées peuvent être observées entre ces chromosomes.
- La sonde de peinture de chromosome entier spécifique du chromosome 1 peut présenter un signal plus intense en 1p36.
- Les sondes de peinture de chromosome entier ne couvrent pas les blocs hétérochromatiques des chromosomes 1, 9 et 16.

Limitations

Le signalement et l'interprétation des résultats FISH doivent être conformes aux normes de pratique professionnelle et doivent tenir compte des autres informations cliniques et diagnostics. Ce kit tient lieu de succédané aux autres tests diagnostics de laboratoire et aucune action thérapeutique ne doit être initiée sur la base des résultats FISH uniquement. Si le protocole n'est pas respecté, la performance peut être affectée et des résultats erronés/positifs/négatifs peuvent être obtenus.

Ce kit n'a pas été validé pour une utilisation en dehors du cadre prévu et indiqué.

Informations supplémentaires

Pour plus d'informations sur le produit, veuillez contacter l'Assistance technique Cytocell.

T: +44 (0)1223 294048

E: techsupport@cytoce ll.com

W: www.cytocell.com

ITALIANO

Introduzione

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

Informazioni sulle sonde

Chromoprobe Multiprobe® OctoChrome™ Cytocell unisce l'utilità di un dispositivo Multiprobe a 8 quadrati all'intera sonda cromosomica painting (marcata in 3 diversi colori), per consentire di identificare tutti e 24 i cromosomi su un singolo vetrino. Il dispositivo OctoChrome™ consente l'analisi simultanea dell'intero genoma su un vetrino in un'ibridazione.

Informazioni sulle sonde

Ciascun quadrato del dispositivo OctoChrome™ porta intere sonde cromosomiche painting per tre diversi cromosomi in tre diversi colori di fluoroforo, rosso, verde e blu (rispettivamente spettro Texas Red, FITC e Aqua/DEAC) che sono visibili contemporaneamente con un triplo filtro DAPI/FITC/Texas Red o singoli filtri specifici. L'arrangiamento delle combinazioni cromosomiche del dispositivo OctoChrome™ è stato concepito per facilitare l'identificazione dei riarrangiamenti cromosomici non-random trovati nelle leucemie più comuni (Figura 1). Il dispositivo OctoChrome™ è destinato per FISH su cromosomi in metafase da cellule del sangue periferico coltivate fissate.

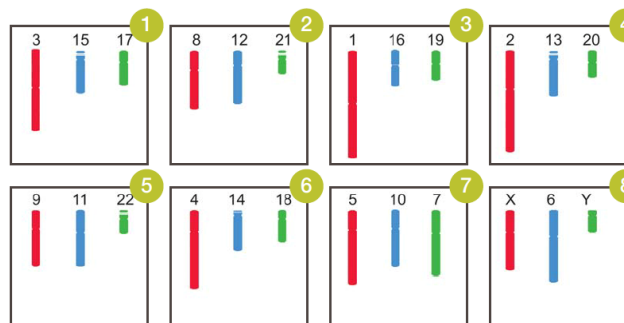


Figura 1. Posizione delle sonde sul Chromoprobe Multiprobe® OctoChrome™.

Ogni kit contiene i seguenti reagenti, sufficienti per 2 (PMP 802), 5 (PMP 804) o 10 (PMP 803) campioni del paziente:

- 2, 5 o 10 dispositivi Chromoprobe Multiprobe® OctoChrome™ rivestiti con sonde painting marcate direttamente.
Quantità di sonda painting rossa: 2,5-5ng per quadrato
Quantità di sonda painting verde: 7,5-12,5ng per quadrato
Quantità di sonda painting blu: 15-25ng per quadrato
- 4, 7 o 12 vetrini con impresso uno stampo specifico
- 500µl di soluzione di ibridazione (formamide, destrano solfato, SSC)
- 1 termometro di superficie per vetrini Cytocell
- 1 camera di ibridazione Chromoprobe Multiprobe® Cytocell

Avvertenze e misure precauzionali

- Per uso diagnostico *in vitro*. Solo per uso professionale.
- Indossare i guanti durante la manipolazione della soluzione di ibridazione, delle sonde di DNA e della colorazione di contrasto DAPI.
- La soluzione di ibridazione contiene formamide, che è un teratogeno; non inalare i fumi ed evitare il contatto con la pelle. Indossare guanti, camicia da laboratorio e manipolare in una cappa aspirante. Per lo smaltimento, sciacquare abbondantemente con acqua.
- DAPI è un potenziale cancerogeno. Maneggiare con cura; indossare guanti e camicia da laboratorio. Per lo smaltimento, sciacquare abbondantemente con acqua.
- Lo smaltimento dei materiali pericolosi deve avvenire nel rispetto delle normative interne relative allo smaltimento dei rifiuti pericolosi.
- Gli operatori devono essere in grado di distinguere visivamente tra rosso, blu e verde.

7. Il mancato rispetto del protocollo può influire sulle prestazioni e generare risultati falsi positivi o falsi negativi.

Conservazione e utilizzo

Il kit Chromoprobe Multiprobe® deve essere conservato a 2-8°C fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta. Non congelare.

Attrezzature e materiali richiesti ma non in dotazione

- 500µl di controcolorante (antifade DAPI (ES: 0,125µg/ml di DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindolo))).
- Piastra riscaldante (con - un controllo accurato della temperatura fino ad 80°C).
- Micropipette a volume variabile compreso tra 1µl - 200µl.
- Bagno termostato con controllo accurato della temperatura a 72°C.
- Provette da microcentrifuga (0,5ml).
- Microscopio a fluorescenza (riferirsi alla sezione Configurazione ottimale del microscopio e dei filtri).
- Contenitori di Coplin in plastica o vetro.
- Pinzette.
- Olio per lenti ad immersione del microscopio a fluorescenza.
- Centrifuga da banco
- ..Vetrini coprioggetto per microscopio a fluorescenza (24 x 50 mm)
- Timer.
- Bagnomaria a 37°C senza agitatore.

Configurazione ottimale del microscopio e dei filtri

Per una visualizzazione ottimale, utilizzare una lampada al mercurio da 100-W e obiettivi apocromatici piani di tipo x63 o x100. Per una visualizzazione ottimale e simultanea dei fluorofori rossi e verdi e DAPI, utilizzare un filtro passa banda triplo DAPI/FITC/Texas Red. Il fluoroforo dell'acqua ha una specificità allo spettro Aqua e DEAC (è richiesto un filtro passa banda singolo Aqua o DEAC).

Prima dell'uso, verificare il corretto funzionamento del microscopio a fluorescenza. Utilizzare olio da immersione adatto per microscopia a fluorescenza e formulato per bassa auto-fluorescenza. Evitare di mischiare la soluzione DAPI Antifade con l'olio da immersione per microscopio poiché questo oscura i segnali. Seguire le raccomandazioni dei produttori relative alla durata della lampada e all'età dei filtri.

Preparazione del campione

Il Chromoprobe Multiprobe® OctoChrome™- è destinato all'uso su cellule di sangue periferico in coltura fissate con fissativo di Carnoy da preparare seguendo le linee guida del laboratorio o dell'istituzione.

Preparare i campioni asciugati all'aria sui vetrini a stampo del Chromoprobe Multiprobe® Cytocell in conformità con il protocollo Cytocell riportato qui sotto. Si consiglia di essiccare a caldo o processare altrimenti i vetrini in quanto si potrebbe ridurre la fluorescenza del segnale.

Protocollo Chromoprobe Multiprobe®

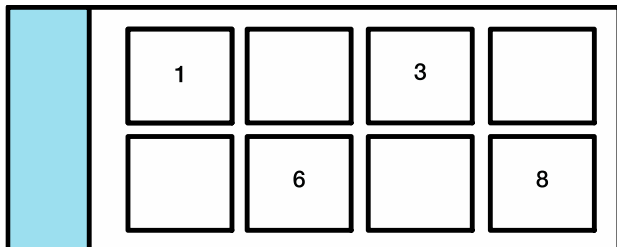
N.B.: le sonde utilizzate con il dispositivo Chromoprobe Multiprobe® sono marcate direttamente con fluorofori, che sono sensibili alla luce. Verificare che in ogni fase venga limitata l'esposizione delle sonde alle luci del laboratorio (non è necessario lavorare al buio).

1. Preparazione del vetrino

- Pulire un vetrino a stampo. Immergerlo per 2 minuti in metanolo al 100% e asciugarlo minuziosamente con un panno morbido pulito.
- Determinare l'indice mitotico corretto. È importante che i campioni designati abbiano un indice mitotico sufficientemente alto da consentire la rilevazione della anomalie cromosomiche. Per verificare la densità del campione, pipettare con una micropipetta (es. una Gilson P10 o P20) 4µl della sospensione cellulare su una delle aree del vetrino a stampo vuoto e lasciare asciugare all'aria. Vista l'entità minima del volume utilizzato, di solito per trasferire la sospensione sarà necessario toccare delicatamente il vetrino con la punta della pipetta. Esaminare al microscopio a contrasto di fase. Se la densità cellulare è troppo elevata, diluire la sospensione con dell'altro fissativo. Se l'indice mitotico è troppo basso, centrifugare a bassa velocità la sospensione cellulare fissata a 160g per 10 minuti. Osservare il volume del surrinate, rimuoverlo e risospendere il pellet cellulare in un volume inferiore di fissativo. Se la densità del campione cellulare è stata modificata, trasferire 4µl del campione concentrato in un altro riquadro del vetrino per il test e riesaminarlo al microscopio a contrasto di fase.

N.B.: 50 µl è il volume minimo necessario per il protocollo.

- Controllo della qualità dei campioni. Si deve verificare l'eventuale presenza di citoplasma nei campioni, che interferirebbe con il protocollo *in situ*. Se all'osservazione al microscopio a contrasto di fase i cromosomi appaiono circondati da materiale granulare, i risultati del test saranno compromessi. Un metodo per ridurre la presenza di citoplasma è trasferire 4µl del campione sul vetrino a stampo e osservare la propagazione del fissativo. In condizioni normali, il fissativo raggiunge un'espansione massima, si ritira e quindi evapora. Per ripulire efficacemente il campione da eventuali tracce di citoplasma, un sistema efficace consiste nel lasciare cadere una goccia di fissativo sul campione nel momento in cui il fissativo in espansione ha raggiunto il suo massimo. Lasciare evaporare la goccia di fissativo e riesaminare il campione.
- Trasferimento sul vetrino. Pipettare 4µl di sospensione cellulare su tutte le 8 aree del vetrino a stampo procedendo su riquadri alternati come indicato qui sotto. Così facendo si eviterà che l'espansione delle cellule provochi interferenze reciproche.



- Una volta che la prima serie di gocce si è asciugata all'aria, trasferire gocce da 4µl nei riquadri ancora vuoti, con la stessa modalità. Dopo che il vetrino si è asciugato, osservandolo al microscopio a contrasto di fase si potrà verificare se tutti i riquadri sono stati riempiti. Se così non fosse, o se qualche riquadro contenesse un numero insufficiente di cellule, basterà ripetere il trasferimento su questi riquadri: non è necessario ripetere il trasferimento su un altro vetrino. Se esaminando il vetrino si notasse un riquadro con un numero insufficiente di cellule o di metafasi, aggiungere una o più gocce di sospensione per aumentare la densità cellulare.

N.B.: se le metafasi appaiono troppo diffuse, pulire accuratamente un nuovo vetrino a stampo in metanolo ed effettuare un nuovo trasferimento facendo asciugare ogni goccia prima di procedere con la successiva.

2. Preparazione del dispositivo Chromoprobe Multiprobe® e del vetrino a stampo

- Accertarsi che la Camera di ibridizzazione Chromoprobe Multiprobe® sia nel bagnomaria a 37°C e lasciare che si equilibri a 37°C (+/- 1°C). Se il bagnomaria è stato acceso con acqua fredda potrebbe essere necessaria anche un'ora.
- Miscelare la soluzione di ibridizzazione pipettando ripetutamente e preriscaldare a 37°C un'aliquota da 25µl per dispositivo. Pre-riscaldare inoltre ogni dispositivo ponendolo su una piastra a 37°C con l'etichetta rivolta verso il basso. Non toccare le superfici in rilievo del dispositivo.
- Immergere i vetrini a stampo contenenti i campioni fissati in 2xSSC per 2 minuti a temperatura ambiente (TA) senza agitare.
- Mentre il dispositivo è ancora a 37°C, disidratate i vetrini a stampo contenenti i campioni fissati con diluizioni di etanolo in serie (70%, 85% e 100%, 2 minuti ciascuno) a TA, asciugare all'aria e riscaldare su una piastra a 37°C.
- Aggiungere, con una micropipetta P10, 2µl di soluzione di ibridizzazione preriscaldata a ognuna delle 8 aree presenti sul dispositivo preriscaldato, mentre è ancora sulla piastra a 37°C.

3. Posizionamento del vetrino a stampo sul dispositivo

- Capovolgere con cura il vetrino a stampo sul dispositivo in modo che il numero 1, che ora è a testa in giù, si trovi sopra l'area in alto a destra del dispositivo. Per facilitare la localizzazione del riquadro numero 1 (Cromosomi 3, 15 & 17), la sua posizione sul dispositivo è stato contrassegnato con un punto arancione).
- Verificare il preciso allineamento del vetrino a stampo con le corrispondenti aree del dispositivo. Abbassare con cura il vetrino sul dispositivo in modo che le gocce di soluzione di ibridizzazione entrino in contatto con il vetrino. Applicare una pressione leggera ed uniforme per fare sì che la soluzione di ibridizzazione diffonda fino ai margini di ciascuna delle aree in rilievo del dispositivo.
- Sollevarlo con cura il vetrino tenendolo per l'estremità smerigliata e capovolgerlo in modo che il vetrino stesso si trovi al di sotto del dispositivo. Accertarsi che il dispositivo non strisci lungo il vetrino a stampo, causando la contaminazione crociata delle sonde.
- Porre su una piastra o un incubatore a 37°C (+/- 1°C) per 10 minuti.

4. Istruzioni per l'uso del termometro di superficie per vetrini Cytocell

- Prima di procedere alla denaturazione, con il termometro di superficie per vetrini Cytocell controllare che la temperatura della piastra sia di 75°C.
- Per utilizzare il termometro in modo appropriato, posizionarlo sulla superficie della piastra e attendere che i diversi segmenti smettano di cambiare colore. La temperatura effettiva è indicata da un colore turchese intenso.
N.B.:
- Quando i segmenti hanno un aspetto granulare ed i colori non sono più uniformi e regolari, il termometro deve essere eliminato perché esaurito. La durata di ogni termometro, tuttavia, dovrebbe essere sufficiente per un kit da 10 dispositivi.
- Il termometro è un dispositivo a cristalli liquidi e, benché riutilizzabile, deve essere trattato con cura per garantire una durata adeguata. Il termometro deve essere utilizzato solo per controllare la temperatura delle piastre, non per effettuare il monitoraggio delle loro prestazioni nel tempo.

5. Denaturazione

N.B.: per questa procedura NON è possibile utilizzare un blocco riscaldante del termociclatore per la PCR al posto di una piastra solida.

- Trasferire sulla piastra l'insieme vetrino/dispositivo facendo molta attenzione a tenerlo in posizione orizzontale. Verificare che il vetrino con i campioni sia bene a contatto con la piastra.
- Denaturare sulla piastra a 75°C (+/- 1°C) per 5 minuti.

6. Ibridizzazione

Porre l'insieme vetrino/dispositivo nella camera di ibridizzazione Chromoprobe Multiprobe® preriscaldata, riposizionare il coperchio e far fluttare la camera nel bagnomaria a 37°C (+/- 1°C) (senza agitazione) per tutta la notte.

N.B.:

- Non sigillare il coperchio sulla camera di ibridizzazione.
- Non chiudere il bagnomaria con un coperchio.
- Non effettuare l'ibridizzazione in un incubatore.
- Accertarsi che la camera di ibridizzazione sia completamente asciutta (cioè che all'interno della camera non vi siano acqua o panni umidi).

Il livello di umidità all'interno della camera è essenziale per una ibridizzazione ottimale. Per ottenere i livelli corretti procedere come indicato qui sotto.

7. Lavaggi stringenti post-ibridizzazione

N.B.: non sottoporre alla procedura dei lavaggi stringenti più di due vetrini per volta.

- Rimuovere con cura il dispositivo dal vetrino.
- Immergere il vetrino in 0,4xSSC (pH 7,0) a 72°C (+/- 1°C) per 2 minuti senza agitare.
- Fare sgocciolare il vetrino e immergerlo in 2xSSC, 0,05% Tween-20 a TA (pH 7,0) per 30 secondi senza agitare.

8. Montaggio e visualizzazione dei risultati

- Fare sgocciolare il vetrino e applicare a ogni estremità 20µl di antifade DAPI.
- Coprire con un coprioggetto (24 x 50mm), rimuovere eventuali bolle e lasciare che il colore si sviluppi al buio per 10 minuti.
- Osservare con un microscopio a fluorescenza.

N.B.: alcuni microscopi hanno un supporto per vetrini che rende difficile visualizzare le estremità del vetrino stesso. In questo caso è sufficiente ruotare il vetrino di 180° per agevolarne la visualizzazione.

Stabilità del vetrino finito

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

Raccomandazioni per l'uso

- La cottura o l'invecchiamento dei vetrini potrebbe ridurre la fluorescenza del segnale.
- Le condizioni di ibridazione potrebbero essere influenzate negativamente dall'uso di reagenti diversi da quelli forniti o raccomandati da Cytocell Ltd.
- Usare un termometro calibrato per misurare la temperatura delle soluzioni, dell'acqua e degli incubatori, poiché queste temperature sono fondamentali per ottimizzare le prestazioni del prodotto.
- Le concentrazioni, il pH e la temperatura del lavaggio sono importanti, in quanto una stringenza bassa potrebbe causare un legame non specifico della sonda, mentre una stringenza troppo elevata potrebbe causare un'assenza di segnale.
- La denaturazione incompleta può causare un'assenza di segnale, mentre anche una denaturazione eccessiva può causare un legame non specifico.
- Un eccesso di ibridazione può causare segnali aggiuntivi o imprevisti.
- Gli utenti sono tenuti a ottimizzare il protocollo a seconda dei loro campioni, prima di utilizzare il test per finalità diagnostiche.
- I vetrini devono essere valutati indipendentemente da due analisti.

- In caso di legami non specifici potrebbero verificarsi delle condizioni non ottimali, che potrebbero essere erroneamente interpretate come segnali della sonda.

Risultati attesi

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

Limitazioni

La creazione dei report e l'interpretazione dei risultati FISH devono essere coerenti con gli standard professionali procedurali e devono prendere in considerazione anche altri dati clinici e diagnostici. Questo kit è pensato come aggiuntivo rispetto ad altri test diagnostici di laboratorio; l'azione terapeutica non deve essere avviata sulla sola base dei risultati FISH. Il mancato rispetto del protocollo può influire sulle prestazioni e generare risultati falsi positivi o falsi negativi. Questo kit non è stato convalidato per finalità diverse da quelle dichiarate nella sezione sull'uso previsto.

Informazioni aggiuntive

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

DEUTSCH

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

Sondeninformation

Chromoprobe Multiprobe® OctoChrome™ von Cytocell kombiniert den Nutzen eines Multisondenapparats mit 8 Quadranten in fixierten zytogenetischen Proben nachgewiesen werden können. Dabei werden DNA-Sonden verwendet, die an ganze Chromosomen oder einzelne, einmalige Sequenzen hybridisieren. Kürzliche Entwicklungen haben gezeigt, dass diese nützliche Technik nun auch als essentielles diagnostisches Werkzeug für pränatale, hämatologische und pathologische Chromosomenanalysen eingesetzt werden kann. Nachdem die zu untersuchende DNA fixiert und denaturiert wurde, kann die Fluoreszenz markierte, einzelsträngige Sonde daran binden. Nach der Hybridisierung werden nicht gebundene sowie unspezifisch gebundene DNA-Sonden durch eine Reihe von Waschvorgängen entfernt und die DNA zur Visualisierung gegengefärbt. Unter dem Fluoreszenzmikroskop wird dann die hybridisierte Sonde am Zielmaterial erkennbar.

Sondeninformation

Jedes Quadrat des OctoChrome™ Geräts enthält Ganzchromosomen-Färbungs sonden für drei unterschiedliche Chromosomen in drei verschiedenen Farbfärbungen, rot, grün und blau (Texas Rot®, FITC- beziehungsweise Aqua/DEAC-Spektren), die simultan mit einem DAPI/FITC/Texas Rot-Dreifachfilter oder spezifischen Einzelfiltern sichtbar sind. Die Anordnung von Chromosomenkombinationen in dem OctoChrome™ Gerät wurde entwickelt, um die Identifizierung nicht-statistischer Chromosomenumlagerungen zu erleichtern, die sich in den häufigsten Leukämieformen finden (Abbildung 1). Das OctoChrome™ ist für FISH an Metaphasen-Chromosomen aus fixierten kultivierten peripheren Blutzellen vorgesehen.

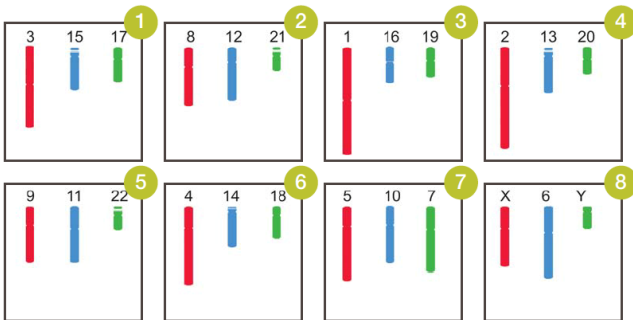


Abbildung 1. Standort der Sonden auf dem Chromoprobe Multiprobe® OctoChrome™.

Kitkomponenten

Jedes Kit enthält die folgenden Reagenzien, die für 2 (PMP 802), 5 (PMP 804) oder 10 (PMP 803) Patientenproben ausreichen:

- 2, 5 oder 10 Chromoprobe Multiprobe® OctoChrome™ die mit direkt markierten Painting- Sonden beschichtet sind.
Menge der roten Färbungs sonde: 2,5-5ng pro Quadrat
Menge der grünen Färbungs sonde: 7,5-12,5ng pro Quadrat
Menge der blauen Färbungs sonde: 15-25ng pro Quadrat
- 4, 7 oder 12 Glasobjektträger, die mit einem speziellen Templat bedruckt sind
- 500µl Hybridisierungslösung (Formamid, Dextransulfat, SSC)
- 1 Cytocell Oberflächenthermometer für Objektträger
- 1 Cytocell Chromoprobe Multiprobe® Hybridisierungskammer

Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen

- Für *In-vitro*-Diagnostik. Nur zur professionellen Verwendung.
- Beim Umgang mit der Hybridisierungslösung, DNA-Sonden und DAPI-Kontrastfärbung sind Handschuhe zu tragen.
- Die Hybridisierungslösung enthält Formamid, das zu den Teratogenen gehört; Dampf nicht einatmen und Hautkontakt vermeiden. Tragen Sie Handschuhe und einen Laborkittel und verwenden Sie die Lösung in der Nähe eines Laborabzugschrankes. Bei der Entsorgung mit viel Wasser nachspülen.

- DAPI ist ein potentielles Karzinogen. Es ist mit Vorsicht zu handhaben. Tragen Sie Handschuhe und einen Laborkittel. Bei der Entsorgung mit viel Wasser nachspülen.
- Alle gefährlichen Materialien sind in Übereinstimmung mit den Richtlinien Ihrer Einrichtung zur Entsorgung von gefährlichen Abfällen zu entsorgen.
- Anwender müssen optisch zwischen rot, grün und blau unterscheiden können.
- Eine mangelnde Einhaltung des Protokolls kann die Leistung beeinträchtigen und zu falsch positiven/negativen Ergebnissen führen.

Lagerung und Behandlung

Das Chromoprobe Multiprobe® Kit wird bis zum Ablauf des auf dem Kitetikett angegebenen Haltbarkeitsdatums bei 2-8°C gelagert. Nicht einfrieren.

Erforderliche, aber nicht mitgelieferte Ausrüstung und Materialien

- 500µl Gegenfärbung (DAPI Antifade (ES: 0,125µg/ml DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindol)))
- Heizplatte (mit stabiler Heizplatte und genauer Temperaturregelung bis 80°C).
- Mikropipetten mit variablem Volumen von 1 µl – 200µl.
- Wasserbad mit genauer Temperaturkontrolle bei 72°C.
- Mikro-Zentrifugenröhrchen (0,5ml).
- Fluoreszenzmikroskop (siehe auch "Empfehlungen zum Fluoreszenzmikroskop").
- Coplin-Färbetrog aus Kunststoff oder Glas.
- Pinzette.
- Für Fluoreszenzobjektive geeignetes Immersionsöl.
- Tischzentrifuge.
- Fluoreszenztaugliche Glasdeckplättchen (24 x 50mm)
- Timer.
- Wasserbad mit 37°C ohne Rührer.

Empfehlungen zum Fluoreszenzmikroskop

Verwenden Sie eine 100-Watt-Quecksilberdampfampe und die Objektive Plan-Apochromat x63 oder x100 für eine optimale Visualisierung. Verwenden Sie einen DAPI/FITC/Texas Red Dreifach-Bandpassfilter für eine optimale gleichzeitige Visualisierung der grünen und roten Fluorophore und DAPI. Das Aqua-Fluorophor weist eine Spezifität für das Aqua und DEAC Spektrum auf (einfacher Aqua oder DEAC Bandpassfilter wird benötigt). Das Fluoreszenzmikroskop ist vor der Verwendung zu überprüfen, um sicherzustellen, dass es korrekt funktioniert. Es ist ein Immersionsöl zu verwenden, das für Fluoreszenzmikroskopie geeignet ist und für geringe Autofluoreszenz formuliert wurde. Eine Vermischung von DAPI Antifade mit Mikroskop-Immersionöl ist zu vermeiden, da dies die Signale verschleiern kann. Die Herstellerempfehlungen bezüglich der Lebensdauer der Lampe und dem Alter der Filter sind zu befolgen.

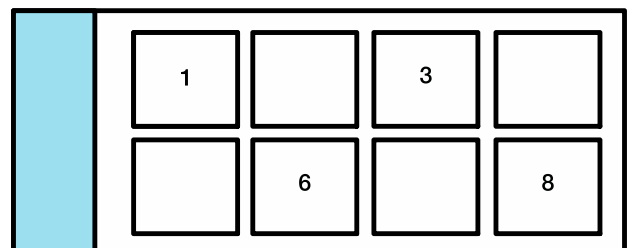
Probenvorbereitung

Chromoprobe Multiprobe® OctoChrome™ ist für die Verwendung mit kultivierten peripheren Blutzellen, die in Carnoy's Fixativ fixiert sind, ausgelegt und sollte nach den Leitlinien des Labors oder Instituts vorbereitet werden. Präparieren Sie die luftgetrocknete Probe auf Cytocell Chromoprobe Multiprobe® Templat-Objektträgern gemäß dem folgenden Cytocell Protokoll. Wärmebehandlung oder Reifung der Objektträger ist nicht empfehlenswert, da dies zu einer verringerten Signalfluoreszenz führen kann.

Chromoprobe Multiprobe® Protokoll

Bitte beachten: Die mit dem Chromoprobe Multiprobe® Gerät verwendeten Sonden sind direkt mit Fluorophoren markiert und somit lichtempfindlich. Bitte stellen Sie sicher, dass die Sonde nur in begrenztem Umfang der Strahlung von Laborlampen ausgesetzt ist (es ist nicht notwendig, im Dunklen zu arbeiten).

- Vorbereitung des Objektträgers**
 - Einen Templat-Objektträger reinigen. Den Templat-Objektträger 2 min lang in 100% Methanol eintauchen und mit einem sauberen, weichen Tissueuch trockenpolieren.
 - Korrekten Mitoseindex bestimmen. Der Nachweis von Chromosomenabnormalitäten ist nur dann möglich, wenn die vorgesehene Probe einen ausreichend hohen Mitoseindex aufweist. Zur Überprüfung der Dichte der Probe mithilfe einer Mikropipette (z. B. Gilson P10 oder P20) 4µl der Zellsuspension auf einen der Bereiche des freien Templat-Objektträgers pipettieren und an der Luft trocknen lassen. Das kleine Volumen bedeutet, dass der Objektträger leicht mit der Pipettenspitze berührt werden sollte, um die Suspension zu transferieren. Mittels Phasenkontrastmikroskopie untersuchen. Wenn die Zelldichte zu hoch ist, die Suspension mit frischem Fixativ verdünnen. Wenn der Mitoseindex zu niedrig ist, die fixierte Zellsuspension mit 160xg 10 min lang zentrifugieren. Das Volumen des Überstands notieren, diesen abgießen und das Zellpellet in einem kleineren Volumen an frischem Fixativ erneut suspendieren. Nach Änderung der Zellprobendichte 4µl der konzentrierten Probe auf ein weiteres Quadrat des Objektträgers tüpfeln und erneut durch Phasenkontrastmikroskopie untersuchen.
- Bitte beachten:** Für das Protokoll ist ein Mindestvolumen von 50µl erforderlich.
- Qualitätskontrolle der Proben. Proben müssen auf Zytoplasma untersucht werden, da dies das In-situ-Protokoll stört. Wenn die Chromosomen bei der Untersuchung mittels Phasenkontrastmikroskopie von einem granulösen Material eingeschlossen zu sein scheinen, können keine exakten Ergebnisse erzielt werden. Eine Methode zur Reduktion des Zytoplasmas besteht darin, 4µl der Probe auf den Templat-Objektträger zu tüpfeln und das Fixativ bei der Ausbreitung zu beobachten: Das Fixativ breitet sich unter normalen Umständen maximal aus, weicht zurück und verdampft dann. Wir haben festgestellt, dass die Aufreinigung von Zytoplasma dann am erfolgreichsten ist, wenn in dem Augenblick, in dem das sich ausbreitende Fixativ seine maximal Ausdehnung erreicht hat, ein frischer Tropfen Fixativ auf den Flecken fallen gelassen wird. Den Tropfen Fixativ verdampfen lassen und den Flecken neu untersuchen.
- Tüpfeln des Objektträgers. 4µl Zellsuspension in einer Sequenz von alternierenden Quadranten wie anschließend gezeigt auf alle 8 Bereiche des Templat-Objektträgers pipettieren. Dies verhindert, dass sich ausbreitende Proben gegenseitig stören.



- Nachdem dem Trocknen der ersten Gruppe von Tropfen an Luft 4µl in derselben Weise auf die restlichen Quadrate tüpfeln. Nach dem Trocknen des Objektträgers zeigt die Untersuchung des Objektträgers unter Phasenkontrast, ob Quadrate ausgelassen wurden. Wenn Quadrate nicht getüpfelt wurden oder

zu wenig Zellen aufweisen, diese Quadrate einfach erneut tüpfeln. Das Präparieren eines neuen Objektträgers ist nicht erforderlich. Wenn ein Quadrat bei der Untersuchung des Objektträgers zu wenige Zellen/Metaphasen aufweist, können 1 oder mehrere Tropfen Suspension zugefügt werden, um die Zelldichte zu erhöhen.

Bitte beachten: Wenn die Metaphasen zu stark ausgebreitet erscheinen, wird ein neuer Templat-Objektträger gründlich in Methanol gereinigt und erneut getüpfelt, wobei jeder Fleck trocken muss, ehe der nächste aufgetüpfelt wird.

2. Vorbereitung von Chromoprobe Multiprobe® Gerät und Templat-Objektträger

- Kontrollieren, dass sich die Chromoprobe Multiprobe® Hybridisierungskammer im 37°C warmen Wasserbad befindet. Kammer auf 37°C (+/- 1°C) erwärmen lassen. Dies kann bis zu einer Stunde dauern, wenn das Wasserbad kalt eingeschaltet wird.
- Hybridisierungslösung durch wiederholtes Pipettieren mischen, und pro Gerät eine 25µl Aliquote auf 37°C erwärmen. Auch jedes Gerät vorwärmen, indem es mit der Etikettenseite nach unten auf eine 37°C warme Heizplatte gelegt wird. Die erhabenen Oberflächen des Geräts nicht berühren.
- Templat-Objektträger, die fixierte Proben enthalten, 2 min bei Raumtemperatur (RT) ohne Schütteln in 2xSSC eintauchen.
- Während das Gerät noch 37°C warm ist, die Templat-Objektträger, welche fixierte Proben enthalten, mithilfe einer Ethanolreihe (jeweils 2 min in 70%, 85% und 100%) bei RT entwässern, an der Luft trocknen lassen und zum Aufwärmen auf eine 37°C warme Heizplatte legen.
- 2µl vorgewärmte Hybridisierungslösung mithilfe einer P10 Mikropipette auf jeden der 8 Bereiche des vorgewärmten Geräts geben, während es auf der 37°C warmen Heizplatte bleibt.

3. Positionierung des Templat-Objektträgers über dem Gerät

- Templat-Objektträger über dem Gerät vorsichtig umdrehen, so dass sich die Nummer 1, die nun nach unten weist, über dem oberen rechten Bereich des Geräts befindet. Um Quadrat 1 leichter finden zu können (Chromosomen 3, 15 & 17 seine Position auf dem Gerät mit einem orangefarbenen Punkt markiert).
- Kontrollieren, dass der Templat-Objektträger sorgfältig an den entsprechenden Bereichen des Geräts ausgerichtet ist. Objektträger vorsichtig über dem Gerät absenken, damit die Tropfen der Hybridisierungslösung Kontakt mit dem Objektträger erhalten. Sanften gleichmäßigen Druck ausüben, damit sichergestellt ist, dass sich die Hybridisierungslösung zu den Rändern jedes der erhabenen Bereiche auf dem Gerät ausbreitet.
- Objektträger vorsichtig anheben, dazu das gefrostete Ende des Glasobjektträgers halten und den Träger umdrehen, so dass sich der Templat-Objektträger unter dem Gerät befindet. Kontrollieren, dass der Templat-Objektträger nicht durch das Gerät verschmiert wird, da dies zu Kreuzverunreinigung der Sonden führen kann.
- 10 min lang bei 37°C (+/- 1°C) (Heizplatte oder Inkubator) stehen lassen.

4. Anweisungen zur Verwendung des Cytocell Oberflächenthermometers für Objektträger

- Vor Beginn der Denaturierung mithilfe des Cytocell Oberflächenthermometers für Objektträger überprüfen, ob die Heizplatte 75°C warm ist.
- Korrekte Anwendung des Thermometers: Thermometer auf die Oberfläche der Heizplatte legen und warten, bis die verschiedenen Segmente ihre Farbe nicht mehr ändern. Die tatsächliche Temperatur wird durch eine tiefblaue Farbe angezeigt.

Bitte beachten:

- Wenn die Segmente körnig aussehen und die Farben nicht länger einheitlich und regelmäßig erscheinen, ist das Thermometer verbraucht und muss entsorgt werden. Die Lebensdauer jedes Thermometers sollte jedoch für ein Kit mit 10 Geräten ohne Weiteres ausreichen.
- Das Thermometer ist ein Flüssigkristallgerät. Obgleich es wiederverwendbar ist, muss es achtsam behandelt werden, um eine angemessene Lebensdauer sicherzustellen. Das Thermometer darf nur zur Prüfung der Temperatur einer Heizplatte verwendet werden. Es darf nicht eingesetzt werden, um die Leistung der Heizplatte über eine längere Zeit zu überwachen.

5. Denaturierung

Bitte beachten: Für dieses Verfahren darf die Festbett-Heizplatte NICHT durch den Heizblock eines PCR-Thermocyclers ersetzt werden.

- Die sandwichförmige Objektträger/Gerät-Anordnung auf die Heizplatte transferieren, wobei besonders darauf geachtet werden muss, sie waagrecht zu halten. Kontrollieren, dass der Probenobjektträger ausreichend Kontakt mit der Heizplatte hat.
- Auf der Heizplatte bei 75°C (+/- 1°C) 5 min lang denaturieren.

6. Hybridisierung

Die sandwichförmige Objektträger/Gerät-Anordnung in die vorgewärmte Chromoprobe Multiprobe® Hybridisierungskammer legen, den Deckel wieder auflegen und die Kammer im 37°C (+/- 1°C) warmen Wasserbad mit (ohne Rühren) über Nacht schweben lassen.

Bitte beachten:

- Deckel auf der Hybridisierungskammer nicht versiegeln.
- Keinen Deckel auf das Wasserbad legen.
- Nicht in einem Inkubator hybridisieren.
- Bitte sicherstellen, dass die Hybridisierungskammer vollständig trocken ist (d. h. weder Wasser noch feuchtes Gewebe im Inneren der Kammer ist).

Die Feuchtigkeit in der Kammer ist für die optimale Hybridisierung sehr wichtig. Das korrekte Niveau mithilfe der obigen Schritte aufrechterhalten.

7. Stringente Wäschen nach der Hybridisierung

Bitte beachten: Nicht mehr als zwei Objektträger gleichzeitig während der stringenten Wäschen verarbeiten.

- Gerät vorsichtig von dem Objektträger entfernen.
- Objektträger 2 min lang ohne Rühren in 0,4xSSC (pH 7,0) eintauchen.
- Objektträger abtropfen lassen und 30 Sekunden lang ohne Durchmischen in 2xSSC, 0,05% Tween-20 bei RT (pH 7,0) eintauchen.

8. Aufziehen und Visualisierung der Ergebnisse

- Objektträger abtropfen lassen und an jedem Ende des Objektträgers 20µl DAPI Antifade aufbringen.
- Mit einem Deckglas (24 x 50mm) abdecken, die Luftblasen entfernen und die Farbe 10 min lang im Dunkeln entwickeln lassen.
- Unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachten.

Bitte beachten: Einige Mikroskoptypen haben Objektträgerhalter, die es erschweren, die äußersten Enden des Objektträgers zu betrachten. Falls dies vorkommt, einfach den Objektträger um 180° drehen, um seine Betrachtung zu erleichtern.

Stabilität der fertigen Objektträger

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

Empfehlungen zur Durchführung

- Das Backen oder Altern der Objektträger kann das Fluoreszenzsignal verringern.
- Die Hybridisierungskonditionen können durch die Verwendung von anderen als den von Cytocell Ltd. zur Verfügung gestellten oder empfohlenen Reagenzien nachteilig 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 Waschlösung, pH-Wert und Temperaturen sind besonders wichtig, da eine niedrige Stringenz zu einer unspezifischen Bindung der Probe und eine zu hohe Stringenz zu einem fehlenden Signal führen kann.
- Eine unvollständige Denaturierung kann zu einem fehlenden Signal und eine Überdenaturierung ebenfalls zu einer unspezifischen Bindung führen.
- Eine Überhybridisierung kann zu zusätzlichen oder unerwarteten Signalen führen.
- Benutzer sollten das Protokoll für ihre eigenen Proben optimieren, bevor der Test für diagnostische Zwecke verwendet wird.
- Die Objektträger sind von zwei Analysten unabhängig voneinander zu bewerten.
- Suboptimale Konditionen können zu einer unspezifischen Bindung führen, die als Probenignal fehlinterpretiert werden kann.

Zu erwartende Ergebnisse

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

Einschränkungen

Die Angabe und Auswertung der FISH-Ergebnisse muss konsistent anhand von professionellen Laborstandards erfolgen und muss andere klinische und diagnostische Informationen berücksichtigen. Dieses Set ist als Ergänzung zu anderen diagnostischen Labortests zu verstehen und therapeutische Maßnahmen sollten nicht allein auf Grundlage der FISH-Ergebnisse eingeleitet werden.

Eine mangelnde Einhaltung des Protokolls kann die Leistung beeinträchtigen und zu falsch positiven/negativen Ergebnissen führen.

Dieses Set wurde nicht für andere Zwecke als dem angegebenen Verwendungszweck geprüft.
Weitere Informationen:
 Weitere Produktinformationen erhalten Sie vom Technischen Kundendienst von Cytocell.
 T: +44 (0)1223 294048
 E: techsupport@cytocell.com
 W: www.cytocell.com

ESPAÑOL

La hibridación *in situ* fluorescente (FISH) es una técnica que permite detectar secuencias de ADN en cromosomas metafásicos o núcleos interfásicos en muestras citogenéticas y fijadas. En la técnica se utiliza una sonda de ADN que hibrida los cromosomas completos o las secuencias únicas simples y es un complemento útil para la citogenética clásica. Recientes estudios indican que esta es una técnica que puede aplicarse como herramienta esencial de diagnóstico prenatal, hematológico y patológico. Después de la fijación, el ADN diana se trata con calor para desnaturalizar el ADN bicatenario haciendo que resulte monocatenario. El ADN diana queda entonces disponible para hibridarlo con una sonda de ADN igualmente desnaturalizado, monocatenario marcado con fluorescencia que tiene una secuencia complementaria. Después de la hibridación la sonda de ADN no específicamente hibridada y no hibridada se elimina y se aplica un contraste al ADN para su visualización. El uso de un microscopio de fluorescencia permite la visualización de la sonda hibridada en el material utilizado.

Información sobre las sondas

Chromoprobe Multiprobe® OctoChrome™ de Cytocell combina la utilidad de un dispositivo Multiprobe de 8 cuadrados y la sonda de pintado de cromosoma completo (marcada en 2 colores diferentes), para poder identificar los 24 cromosomas en un único porta. El dispositivo OctoChrome™ permite analizar simultáneamente todo el genoma en un porta en una hibridación.

Especificaciones de las sondas

Cada cuadrado del dispositivo OctoChrome™ lleva las sondas de pintado de todo el cromosoma para 3 cromosomas diferentes en 3 fluoróforos de diferente color, a saber, rojo, verde y azul (espectros de Rojo de Texas, FITC y Aqua/DEAC, respectivamente), que son visibles simultáneamente con un filtro triple de DAPI/FITC/Rojo de Texas o filtros sencillos específicos.

La organización de las combinaciones cromosómicas en el dispositivo OctoChrome™ facilita la identificación de las reorganizaciones cromosómicas no aleatorias observadas en la mayoría de las leucemias comunes (Figura 1).

OctoChrome™ está previsto para FISH en cromosomas en metafase de células sanguíneas periféricas cultivadas y fijadas.

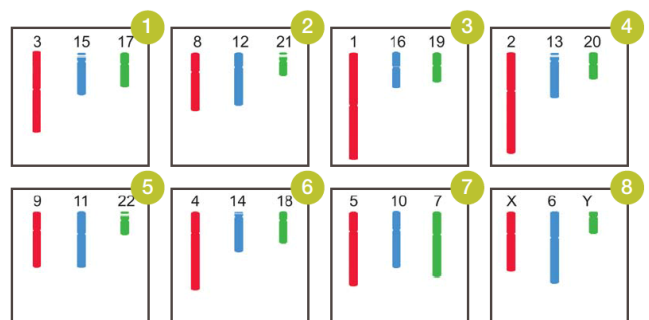


Figura 1. Ubicación de las sondas en la Multiprobe Chromoprobe® OctoChrome™.

1. Cada kit contiene los siguientes reactivos, suficiente para 2 (PMP 802), 5 (PMP 804) o 10 (PMP 803) muestras de pacientes:
2. 5 o 10 aparatos Chromoprobe Multiprobe® OctoChrome™ recubiertos con sondas marcadas directamente.
Cantidad de la sonda de pintado roja: 2,5-5ng por cuadrado
Cantidad de la sonda de pintado verde: 7,5-12,5ng por cuadrado
Cantidad de la sonda de pintado azul: 15-25ng por cuadrado
3. 4, 7 o 12 portas de vidrio impresos con una rejilla especial
4. 500µl de solución de hibridación (formamida, sulfato de dextrano, SSC)
5. 1 termómetro para la superficie de los portas Cytocell
6. 1 cámara de hibridación del Chromoprobe Multiprobe® de Cytocell

Advertencias y precauciones

1. Para diagnóstico *in vitro*. Solo para uso profesional.
2. Utilice guantes para al manipular la solución de hibridación, las sondas de ADN y la contratinción DAPI.
3. La solución de hibridación contiene formamida, que es un teratógeno; no inhale el vapor ni permita que entre en contacto con la piel. Utilice guantes, bata de laboratorio y manipule en una campana extractora de humos. Para eliminarla, aclare con abundante agua.
4. La contratinción DAPI puede producir cáncer. Manipúlela con cuidado; utilice guantes y bata de laboratorio. Para eliminarla, aclare con abundante agua.
5. Deseche todos los materiales peligrosos conforme a las directrices de su institución respecto a la eliminación de residuos peligrosos.
6. Los operadores deben ser capaces de diferenciar visualmente los colores rojo, azul y verde.
7. No seguir el protocolo puede influir en el rendimiento y causar resultados falsos positivos/negativos.

Almacenamiento y manejo

El kit Chromoprobe Multiprobe® debe almacenarse a 2-8°C hasta la fecha de caducidad que se indica en el envase. No congelar.

Equipos y material necesario pero no incluido

1. 500µl de contratinción (DAPI antifade (ES: 0,125µg/ml de DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol))).
2. Placa caliente (con una placa sólida y un control de temperatura preciso hasta 80°C).
3. Micropipetas de volumen variable (rango 1µl - 200µl).
4. Baño de agua con control preciso de temperatura a 72°C.
5. Tubos de microcentrifugado (0.5ml).
6. Microscopio de fluorescencia (lea la sección Recomendaciones para el microscopio de fluorescencia).
7. Recipientes de cristal y de plástico.
8. Pinzas.
9. Microscopio de fluorescencia con objetivo de inmersión en aceite.
10. Centrífuga de banco.
11. Cubre de cristal para fluorescencia (24 x 50mm).
12. Cronómetro.
13. Baño maría a 37°C sin agitador.

Recomendaciones para el microscopio de fluorescencia

Utilice una lámpara de mercurio de 100 Watt y objetivos apocromáticos planos x63 o x100 para una visualización óptima. Utilice un filtro triple paso banda DAPI/FITC/Texas Red para visualizar los fluoróforos rojos y verdes y DAPI de manera óptima. El fluoróforo aqua presenta especificidad por el espectro Aqua y DEAC (es necesario un filtro DEAC o Aqua paso banda).

Compruebe el microscopio de fluorescencia antes de usarlo para asegurarse de que funciona correctamente. Utilice un aceite de inmersión que sea adecuado para el microscopio de fluorescencia y esté formulado para una baja autofluorescencia. Evite mezclar DAPI Antifade con aceite de inmersión para microscopio, ya que esto impediría una visualización precisa de los resultados. Siga las recomendaciones de los fabricantes respecto a la vida útil de la lámpara y la edad de los filtros.

Preparación de la muestra

El Chromoprobe Multiprobe® OctoChrome™ está diseñado para trabajar con células de sangre periférica fijadas con la solución de fijación de Carnoy que debe prepararse según las instrucciones del laboratorio o la institución.

Prepare las muestras secadas al aire en los portas con rejilla Chromoprobe Multiprobe® de Cytocell según el protocolo de Cytocell que se incluye a continuación. No se recomienda calentar ni madurar los portas de otro modo ya que puede reducir la fluorescencia de la señal.

Protocolo para Chromoprobe Multiprobe®

Observación: Las sondas que se emplean en el aparato Chromoprobe Multiprobe® están marcadas directamente con fluorocromos sensibles a la luz. Asegúrese de que las sondas están expuestas a las luces del laboratorio durante el mínimo tiempo posible (no es necesario trabajar sin luz).

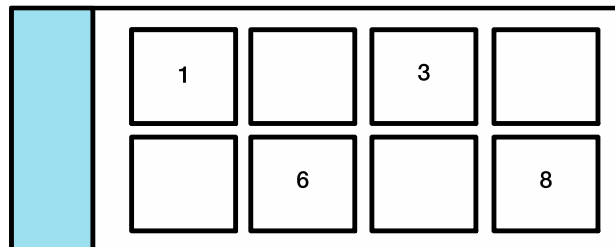
1. Preparación de los portas

1. Limpieza de un porta con rejilla. Sumerja el porta con rejilla durante 2 minutos en metanol 100% y seque y abrillante con un paño suave.
2. Determinación del índice mitótico correcto. Es importante que la muestra que vaya a emplear tenga un índice mitótico lo suficientemente alto para poder detectar anomalías en los cromosomas. Para comprobar la densidad de la muestra, pipetee 4µl de la suspensión celular con ayuda de una micropipeta (por ejemplo una Gilson P10 o P20) en una de las áreas libres del porta con rejilla y déjelos secar al aire. Como el volumen que se usa es muy pequeño, normalmente debe tocar suavemente el porta con la punta de la pipeta para transferir la suspensión. Examine el porta al microscopio de contraste de fases. Si la densidad celular es demasiado alta, diluya la suspensión con fijador preparado reciente. Si el índice mitótico es demasiado bajo, centrifugue la suspensión celular a 160 x g durante 10 minutos. Anote el volumen del sobrenadante, descártelo y resuspenda el sedimento de células en un volumen menor de fijador reciente. Si se ha alterado la densidad de la muestra de células, siembre 4µl de la muestra concentrada sobre otra casilla de prueba del porta y vuelva a examinar al microscopio de contraste de fases.

Observación: El volumen mínimo necesario para el protocolo es de 50µl.

3. Control de calidad de las muestras. Las muestras deben examinarse para determinar la presencia de citoplasma, ya que este interfiere con el protocolo *in situ*. Si los cromosomas parecen estar incluidos en un material granuloso cuando se examinan al microscopio de contraste de fases, los resultados se verán afectados. Un método para reducir el citoplasma es sembrar 4µl de la muestra sobre el porta con rejilla y observar cómo se extiende el fijador: en situación normal, el fijador se extenderá al máximo, retrocederá y después se evaporará. Para limpiar el citoplasma, se ha comprobado que se consiguen buenos resultados si se deja caer una gota de fijador reciente sobre el punto en que se ha realizado la siembra cuando la extensión del fijador haya alcanzado el máximo. Deje evaporar el fijador y vuelva a examinar la siembra.

4. Siembra del porta. Pipetee 4µl de suspensión celular en las 8 zonas del porta con rejilla según la secuencia de casillas alternas que se muestra a continuación. Esto evitará que las siembras de células interfieran entre sí.



5. Una vez que se ha secado al aire el primer grupo de gotas, siembre las casillas restantes con gotas de 4 µl del mismo modo. Cuando se haya secado el porta, examínelo al microscopio de contraste de fases para comprobar que no falta ninguna de las casillas. Si falta alguna, o si las casillas tienen pocas células, simplemente vuelva a sembrar esas casillas: no es necesario utilizar un porta nuevo. Si al examinar el porta, una casilla tiene un número insuficiente de células/metafases, pueden añadirse más gota(s) de la suspensión para aumentar la densidad celular.

Observación: Si las metafases aparecen demasiado dispersas, limpie un nuevo porta con rejilla cuidadosamente en metanol y vuelva a sembrar dejando que cada gota se seque antes de pasar a la siguiente.

2. Preparación del aparato Chromoprobe Multiprobe® y del porta con rejilla

1. Asegúrese de que la cámara de hibridación del Chromoprobe Multiprobe® está al baño maría a 37°C y déjelo llegar al equilibrio a 37°C (+/- 1°C). Esto puede llevar hasta una hora si el baño maría se enciende estando frío.
2. Mezcle la solución de hibridación pipeteando repetidamente y precaliente una alícuota de 25µl por cada aparato a 37°C. Precaliente también cada aparato colocándolo sobre una placa calefactora a 37°C con el lado de la etiqueta hacia abajo. No toque las superficies elevadas del aparato.
3. Sumerja los portas con rejilla que contienen las muestras fijadas en 2xSSC durante 2 minutos a temperatura ambiente (TA) sin agitar.
4. Mientras el aparato está todavía a 37°C, deshidrate los portas con rejilla que contienen las muestras fijadas en una serie de etanol (2 minutos para cada una de las concentraciones: 70%, 85% y 100%) a TA, déjelos secar al aire y colóquelos sobre una placa calefactora a 37°C para calentarlos.
5. Usando una micropipeta P10, añada 2µl de solución de hibridación precalentada a cada una de las 8 zonas del aparato precalentado sobre una placa calefactora a 37°C.

3. Colocación del porta con rejilla sobre el aparato

1. Con cuidado invierta el porta con rejilla sobre el aparato de tal forma que el número 1, que ahora está boca arriba, quede en la zona superior derecha del aparato (cromosomas 3, 15 & 17), su posición sobre el dispositivo ha sido marcado con un punto naranja.
2. Asegúrese de que el porta con rejilla queda perfectamente alineado con las zonas correspondientes del aparato. Con cuidado ponga el porta sobre el aparato de forma que las gotas de la solución de hibridación entren en contacto con el porta. Aplique una presión suave y homogénea para asegurarse de que la solución de hibridación se extiende hasta los bordes de cada una de las zonas elevadas del aparato.
3. Levante el porta con cuidado sujetándolo por el extremo esmerilado del porta de vidrio e inviértalo de forma que el porta con rejilla quede por debajo del aparato. Asegúrese de que el aparato no gotee sobre el porta con rejilla ya que esto podría provocar contaminación cruzada de las sondas.
4. Póngalo a 37°C (+/- 1°C) (placa calefactora o incubadora) durante 10 minutos.

4. Instrucciones del termómetro de superficie para los portas Cytocell

1. Debe comprobarse que la temperatura de la placa calefactora está a 75°C con el termómetro de superficie para los portas Cytocell antes de realizar la desnaturalización.
2. Para usar el termómetro correctamente, colóquelo sobre la superficie de la placa calefactora y espere hasta que los distintos segmentos dejen de cambiar de color. La temperatura real se indica con un marcado color aqua.

Observación:

3. Si los segmentos tienen aspecto granuloso y los colores no son uniformes y regulares, debe desecharse el termómetro ya que se ha gastado. La vida útil de cada termómetro debería, fácilmente, ser suficiente para un kit de diez aparatos.
4. Este termómetro es un aparato de cristal líquido y, aunque reutilizable, debe tratarse con cuidado para que la vida útil sea razonable. El termómetro únicamente debe emplearse para controlar la temperatura de la placa calefactora; no debe usarse para controlar la función de la placa calefactora durante todo el tiempo.

5. Desnaturalización

Observación: Para este procedimiento NO puede emplearse un bloque calefactor de ciclado térmico para PCR en lugar de la placa calefactora de lecho sólido.

1. Transfiera el sándwich de porta y aparato a la placa calefactora poniendo especial atención a que esté horizontal. Asegúrese de que el porta con las muestras hace buen contacto con la placa calefactora.
2. Desnaturalice sobre la placa calefactora a 75°C (+/- 1°C) durante 5 minutos.

6. Hibridación

Introduzca el sándwich de porta y aparato en la cámara de hibridación precalentada del Chromoprobe Multiprobe®, vuelva a poner la tapa y deje la cámara flotando al baño maría a 37°C (+/- 1°C) (sin agitar) toda la noche.

Observación:

1. No selle la tapa de la cámara de hibridación.
2. No cubra el baño maría.
3. No realice la hibridación en una incubadora.
4. Asegúrese de que la cámara de hibridación está totalmente seca (es decir, que no queda agua ni materiales húmedos en la cámara).

La humedad del interior de la cámara es vital para una hibridación óptima. Para conseguir un nivel correcto, debe seguir estos pasos.

7. Lavados estringentes posthibridación

Observación: Evite realizar los lavados estringentes con más de dos portas a la vez.

1. Retire el aparato del porta con cuidado.
2. Sumerja el porta en 0,4xSSC (pH 7,0) a 72°C (+/- 1°C) durante 2 minutos sin agitar.

- c) Escorra el porta y sumérrjalo en 2xSSC, Tween-20 al 0,05% a TA (pH 7,0) durante 30 segundos sin agitar.

8. Montaje y visualización de los resultados

- a) Escorra el porta y aplique 20µl de DAPI antifade en cada extremo del porta.
 b) Tápelo con un cubre (24 x 50mm), quite las burbujas y deje que el color aparezca durante 10 minutos.
 c) Obsérvelo al microscopio de fluorescencia.

Observación: Algunos tipos de microscopio tienen pinzas de sujeción para los portas que pueden dificultar la visualización de los extremos del porta. Si esto sucediera, simplemente gire el porta 180°, lo que ayudará a la observación del porta.

Estabilidad de los portaobjetos terminados

Los portaobjetos de FISH permanecen analizables durante 1 mes si se han almacenado en la oscuridad y por debajo de la temperatura ambiente.

Recomendaciones de procedimiento

1. La cocción o el envejecimiento de las láminas puede reducir la fluorescencia de la señal
2. Las condiciones de hibridación pueden verse afectadas negativamente por el uso de reactivos que no hayan sido suministrados o recomendados por Cytocell Ltd.
3. Use un termómetro calibrado para medir la temperatura de las soluciones, de los baños maría y de las incubadoras, ya que estas temperaturas son cruciales para un rendimiento óptimo del producto.
4. Las concentraciones de lavado, pH y temperaturas son importantes, dado que la baja rigurosidad puede resultar en una fijación no específica de la sonda y una rigurosidad demasiado alta puede dar lugar a una falta de señal.
5. Una desnaturalización incompleta puede dar lugar a una falta de señal y una sobredesnaturalización puede dar lugar a una fijación no específica.
6. La sobrehibridación puede dar lugar a señales inesperadas o adicionales.
7. Los usuarios deben optimizar los protocolos para sus propias muestras, antes de utilizar el ensayo para fines de diagnóstico.
8. Las láminas deberán ser marcadas de manera independiente por dos analistas.
9. Las condiciones insuficientes pueden dar lugar a una fijación no específica, que podría malinterpretarse como una señal de sonda.

Resultados esperados

1. Las sondas de pintado de cromosomas acrocéntricos contienen material de los brazos cortos. Este es común a los cromosomas de los grupos D y G, de forma que puede observarse una hibridación cruzada entre estas regiones.
2. La sonda de pintado de cromosomas enteros del cromosoma 16 puede mostrar una leve hibridación cruzada con las regiones heterocromáticas del cromosoma Y.
3. La sonda de pintado del cromosoma Y contiene las regiones pseudoautosómicas que comparte con el cromosoma X. Por tanto, puede observarse hibridación cruzada en estas regiones.
4. Los cromosomas 1, 5 y 19 contienen secuencias comunes de ADN centromérico. Por ello, pueden observarse hibridaciones cruzadas entre estos cromosomas en estas regiones.
5. La sonda de pintado de cromosomas enteros del cromosoma 1 puede mostrar una señal más fuerte en 1p36.
6. Las sondas de pintado de cromosomas enteros no cubren los bloques heterocromáticos de los cromosomas 1, 9 y 16.

Limitaciones

Los informes y la interpretación de resultados FISH deberán ser consistentes con los estándares profesionales de práctica y deberán tener en cuenta otra información de diagnóstico y clínica. El kit está pensado como un adjunto a otros ensayos de laboratorio de diagnóstico. No deben iniciarse acciones terapéuticas que se basen únicamente en el resultado FISH. No seguir el protocolo puede influir en el rendimiento y causar resultados falsos positivos/negativos. Este kit no se ha validado para fines diferentes al uso previsto declarado.

Información adicional

Si desea obtener información adicional sobre el producto, póngase en contacto con el Departamento de soporte técnico de Cytocell.
 T: +44 (0)1223 294048
 E: techsupport@cytozell.com
 W: www.cytozell.com

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

Patents and Trademarks

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

The Chromoprobe principle is covered by international patents WO9314223, EP0623177. The design of the Multiprobe is a registered design and is also covered by a Design Patent No. 420,745.

This product contains technology licensed from Life Technologies Corporation and is available for human diagnostics or life science research use only.



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