



A Sysmex Group Company



Instructions For Use
REF: RU-LPH 079-S / RU-LPH 079

E2A/PBX1 Translocation, Dual Fusion Probe

Research Use Only

PROFESSIONAL USE ONLY

ENGLISH/FRANÇAIS/ITALIANO/DEUTSCH/ESPAÑOL

Further information available at www.ogt.com

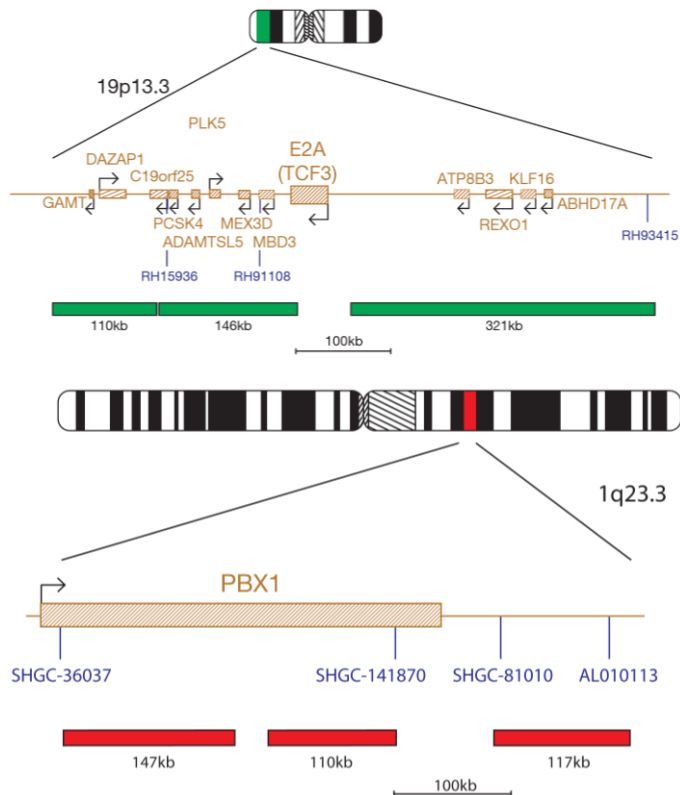
Fluorescence *In Situ* Hybridisation (FISH) is a technique that allows DNA sequences to be detected on metaphase chromosomes or in interphase nuclei from fixed cytogenetic samples. The technique uses DNA probes that hybridise to entire chromosomes or single unique sequences, and serves as a powerful adjunct to classic cytogenetics. Recent developments have meant that this valuable technique can now be applied as an essential 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.

Intended Use

This product is intended to be used for research use only and is not for use in diagnostic procedures.

Probe Specification

E2A, 19p13.3, Green
PBX1, 1q23.3, Red



The E2A probe, labelled in green, contains two probes (110kb and 146kb) that cover the 3' end of the E2A (TCF3) gene and flanking region and a 321kb probe that covers a region 5' (centromeric) to the gene. The PBX1 probe, labelled in

red, contains two probes (147kb and 110kb) that map within the PBX1 gene and a 117kb probe that maps 3' (telomeric) to the gene.

Materials Provided

Probe: 50µl per vial or 100µl per vial

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

Counterstain: 150µl per vial

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

Warnings and Precautions

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

Storage and Handling

The kit should be stored between -25°C to -15°C in a freezer until the expiry date indicated on the kit label. The probe and counterstain vials must be stored in the dark.

Protocol Recommendations

Equipment Necessary but not Supplied

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

Fluorescence Microscope Recommendation

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

Sample Preparation

Sample preparation should be performed according to the laboratory or institution guidelines.

Prepare air dried samples on microscope slides according to standard cytogenetic procedures.

FISH Protocol

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

Slide preparation

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

Pre-Denaturation

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

Denaturation

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

Hybridisation

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

Post-Hybridisation Washes

12. Remove the coverslip and all traces of glue carefully.
13. Immerse the slide in 0.4xSSC (pH 7.0) at 72°C (+/- 1°C) for 2 minutes without agitation.
14. Drain the slide and immerse it in 2xSSC, 0.05% Tween-20 at RT (pH 7.0) for 30 seconds without agitation.
15. Drain the slide and apply 10µl of DAPI antifade onto each sample.

- Cover with a coverslip, remove any bubbles and allow the colour to develop in the dark for 10 minutes.
- View with a fluorescence microscope.

Stability of Finished Slides

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

Procedural Recommendations

- Baking or ageing of slides is not recommended as it may reduce signal fluorescence.
- Hybridisation conditions may be adversely affected by the use of reagents other than those provided or recommended by CytoCell Ltd.
- The use of a calibrated thermometer is strongly recommended for measuring temperatures of solutions, waterbaths, and incubators as these temperatures are critical for optimum product performance.
- 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.

Expected Results

In a normal cell, two red and two green signals (2R, 2G) should be visible. Cells carrying the balanced t(1;19)(q23;p13.3) should show one red, one green and two yellow fusion signals (may appear as red and green signals close together) (1R, 1G, 2Y). Cells carrying the unbalanced der(19)t(1;19)(q23;p13.3) should show two red, one green and one yellow signal (2R, 1G, 1Y), representing the normal chromosomes 1 (red), normal chromosome 19 (green) and the der(19) (yellow).

Additional Information

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

T: +44 (0)1223 294048

E: techsupport@cytoCELL.com

W: www.ogt.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 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.

Utilisation Prévue

Ce produit est destiné à être utilisé à des fins de recherche uniquement et n'est pas destiné à être utilisé dans les procédures de diagnostic.

Caractéristiques de la sonde

Sonde de la région E2A, 19p13.3 en vert

Sonde de la région PBX1, 1q23.3 en rouge

La sonde E2A, marquée en vert, contient deux sondes (110kb et 146kb) qui couvrent l'extrémité 3' du gène E2A (TCF3) et la région l'encadrant et une sonde de 321kb qui couvre une région 5' (centromérique) au gène. La sonde PBX1, marquée en rouge, contient deux sondes (147kb et 110kb) qui couvrent l'intérieur du gène PBX1 et une sonde 117kb qui couvre 3' (télomérique) au gène.

Conditionnement

Sonde : 50µl par tube ou 100µl par tube

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

Contre-colorant: 150µl par tube

Le contre-colorant est le DAPI antifading (ES: 0.125µg/ml DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole)).

Avertissements et précautions

- Pour la recherche uniquement. Pas destiné à être utilisé dans les procédures de diagnostic. Pour usage professionnel uniquement.
- Porter des gants lors de la manipulation des sondes ADN et du contre-colorant DAPI.
- La sonde contient de la formamide qui est un tératogène. Ne pas respirer les vapeurs. Ne pas mettre en contact avec la peau. Porter des gants, une blouse de laboratoire et manipuler sous une hotte. Après élimination, rincer abondamment avec de l'eau.
- Le DAPI est un carcinogène potentiel. Manipuler avec précaution. Porter des gants et une blouse de laboratoire. Après élimination, rincer abondamment avec de l'eau.
- Toutes matières dangereuses doivent être éliminées selon les réglementations en vigueur dans votre institution pour l'élimination des déchets dangereux.

Conservation et manipulation

Le kit devra être stocké au congélateur entre -25°C et -15°C jusqu'à la date d'expiration figurant sur l'étiquette du kit. La sonde et le contre-colorant doivent être conservés à l'abri de la lumière.

Recommandations sur les protocoles

Équipement nécessaire non fourni

- 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 pailleuse.
- Lames de microscope.
- Lamelles 24x24mm.
- Chronomètre.

- Incubateur à 37°C.
- Colle Rubber cement.

Microscope et filtres

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

Préparation des échantillons

La préparation de l'échantillon doit être effectuée conformément aux recommandations du guide des bonnes pratiques en cytogénétique.

Préparer les lames de microscope avec les échantillons séchés à l'air selon les procédures standard de cytogénétique.

Protocole FISH

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

Préparation de la lame échantillon

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

Pré-dénaturation

- Retirez la sonde du congélateur et laissez-la réchauffer à température ambiante.
- Assurez-vous que la solution de la sonde est mélangée de manière homogène avec une pipette.
- Retirez 10µl de sonde par test et transférez-les dans un tube de microcentrifugation. Remplacez rapidement le reste de sonde dans le congélateur.
- Mettez la sonde et la lame échantillon à préchauffer sur une plaque chauffante à 37°C (+1°C) pendant 5 minutes.
- Déposer 10µl de sonde sur l'échantillon et couvrir avec une lamelle. Sceller avec du rubber cément et laisser sécher.

Dénaturation

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

Hybridation

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

Lavages post-hybridation

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

Stabilité des lames

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

Recommandations

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

Résultats attendus

Dans une cellule normale, deux signaux rouges et deux signaux verts (2R, 2V) doivent être visibles. Du fait de la proximité des signaux verts, ces deux signaux peuvent se chevaucher et apparaître comme un seul signal dans une petite partie des cellules. Les cellules portant l'équilibré t(1;19)(q23;p13.3) devraient générer un rouge, un vert, et deux jaunes fusion signals (ils peuvent apparaître comme des signaux rouges et verts proches) (1R, 1V, 2J). Les cellules portant le der(19)t(1;19)(q23;p13.3) déséquilibré devraient générer deux rouge, un vert, et un jaune signal (2R, 1V, 1J), représentant les chromosomes normaux 1 (rouges), le chromosome normal 19 (vert), et le der(19) (jaune).

Informations supplémentaires

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

T: +44 (0)1223 294048

E: techsupport@cytoCELL.com

W: www.ogt.com

ITALIANO

L'ibridazione *in situ* in fluorescenza (Fluorescence *In Situ* Hybridisation - FISH) è una tecnica che permette di rilevare sequenze di DNA su cromosomi in metafase o in nuclei in interfase di campioni citogenetici fissati, o in coltura dopo prelievo. La tecnica prevede l'utilizzo di sonde di DNA in grado di ibridare con l'intero cromosoma o con singole sequenze. La FISH costituisce quindi un potente strumento in aggiunta alle tecniche citogenetiche classiche. Recenti sviluppi hanno reso possibile che questa preziosa tecnica può ora essere applicata come strumento 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.

Destinazione d'uso

Questo prodotto è destinato ad essere utilizzato solo per scopi di ricerca e non per l'uso in procedure diagnostiche.

Specifiche della sonda

Regione E2A, 19p13.3 verde

Regione PBX1, 1q23.3, rosso

La sonda E2A marcata in verde, consiste in due sonde (110kb e 146kb) che coprono l'estremità 3' del gene E2A (TCF3) e la regione a fianco e da una sonda di 321kb che copre la

regione 5' (centromerica) rispetto al gene. La sonda PBX1, marcata in rosso, costituita da due sonde (147kb e 110kb) con mappatura all'interno del gene PBX1 e una sonda di 117kb con mappatura in 3' (telomerica) rispetto al gene.

Materiali forniti

Sonda: 50µl per provetta o 100µl per provetta

La sonda è fornita già miscelata e pronta per l'uso nella soluzione di ibridazione (Formamide; Destrano solfato; SSC).

Colorante di contrasto: 150µl per provetta

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

Avvertenze e misure precauzionali

1. Per uso ricerca. Non per l'uso in procedure diagnostiche. Per uso professionale.
2. Quando si manipolano le sonde ed il colorante di contrasto DAPI è necessario indossare i guanti.
3. Le miscele di sonda contengono formamide, una sostanza teratogena. Non respirare i fumi ed evitare il contatto con la pelle. Indossare guanti, camice da laboratorio e maneggiare in una cappa aspirante. Per lo smaltimento, lavare con grandi quantità di acqua.
4. Il DAPI è un potenziale cancerogeno. Maneggiare con cura, indossare guanti ed un camice da laboratorio. Per lo smaltimento, lavare con grandi quantità di acqua.
5. Eseguire lo smaltimento dei materiali pericolosi nel rispetto delle normative interne dell'istituzione relative allo smaltimento dei residui tossici.

Conservazione e utilizzo

Conservare il kit in congelatore a una temperatura compresa tra -25°C e -15°C fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta. I flaconcini della sonda e del colorante di contrasto devono essere conservati al buio.

Protocollo Raccomandazioni

Apparecchiature necessari non forniti

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

Configurazione ottimale del microscopio e dei filtri

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

Preparazione del campione

La preparazione del campione deve essere eseguita secondo le linee guida del laboratorio o dell'istituzione.

Stendere i campioni da analizzare su vetrini da microscopia secondo le procedure citogenetiche standard.

Protocollo

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

Preparazione del vetrino

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

Pre-denaturazione

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

Denaturazione

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

Ibridazione

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

Lavaggi post-ibridazione

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

Stabilità del vetrino finito

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

Raccomandazioni per l'uso

1. L'eccessivo riscaldamento o l'invecchiamento dei vetrini non è raccomandato in quanto potrebbe ridurre la fluorescenza del segnale.
2. Le condizioni di ibridazione potrebbero essere influenzate negativamente dall'impiego di reagenti differenti rispetto a quelli forniti o raccomandati da Cytocell Ltd.
3. L'utilizzo di un termometro calibrato è fortemente raccomandato per la misurazione delle temperature delle soluzioni, dei bagni termostati e degli incubatori in quanto queste temperature sono di fondamentale importanza per la performance ottimale del prodotto.
4. Le concentrazioni del lavaggio (stringenza), il pH e la temperatura sono di fondamentale importanza in quanto condizioni di stringenza blande possono favorire un legame non

specifico della sonda e condizioni di stringenza troppo elevate possono condurre alla perdita del segnale.

5. La denaturazione incompleta può tradursi in una perdita del segnale mentre una denaturazione eccessiva può anche tradursi in un legame non specifico.

Risultati attesi

In una cellula normale devono essere visibili due segnali rossi e due verdi (2R, 2G). A causa della vicinanza dei segnali verdi, questi due segnali possono sovrapporsi e apparire come un unico segnale in una piccola parte di cellule. Le cellule portatrici della traslocazione bilanciata t(1;19)(q23;p13.3) devono evidenziare un rosso, uno verde, e due segnali fusione gialli (possono apparire come segnale rosso e verde vicini) (1R, 1G, 2Y). Le cellule portatrici di der sbilanciato (19)t(1;19)(q23;p13.3) devono evidenziare due rossi, uno verde, e uno fusione giallo segnale (2R, 1G, 1Y) che rappresentano i cromosomi 1 normali (rosso), il cromosoma 19 normale (verde), e il der(19) (giallo).

Informazioni aggiuntive

Per informazioni aggiuntive sul prodotto contattare il Dipartimento di Assistenza Tecnica Cytocell.

T: +44 (0)1223 294048

E: techsupport@cytocell.com

W: www.ogt.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 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 Waschküchen entfernt und die DNA zur Visualisierung gegengefärbt. Unter dem Fluoreszenzmikroskop wird dann die hybridisierte Sonde am Zielmaterial erkennbar.

Verwendungszweck

Dieses Produkt ist ausschließlich zu Forschungszwecken bestimmt und nicht für die Anwendung in diagnostischen Verfahren.

Sondenspezifikation

E2A, 19p13.3 Region, grün

PBX1, 1q23.3 Region, rot

Die grün markierte E2A-Sonde enthält zwei Sonden (110kb und 146kb), die das 3'-Ende des E2A (TCF3)-Gens und den flankierenden Bereich abdecken, sowie eine 321kb-Sonde, die einen Bereich 5' (zentromer) zum Gen abdeckt. Die rot markierte PBX1-Sonde enthält zwei Sonden (147kb und 110kb), die innerhalb des PBX1 abbilden, und eine 117kb-Sonde, die 3' (telomer) zum Gen abbildet.

Kitkomponenten

Sonde: 50µl pro Röhrchen oder 100µl pro Röhrchen

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

Gegenfärbung:

150µl pro Röhrchen
Die Gegenfärbung besteht aus DAPI antifade (ES: 0,125µg/ml DAPI (4,6-Diamidino-2-Phenylindol)).

Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen

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

Lagerung und Behandlung

Das Kit sollte bis zum Verfallsdatum, welches auf dem Etikett angegeben ist, in einem Gefrierschrank bei einer Temperatur zwischen -25°C und -15°C gelagert werden. Die Röhrchen mit den Sonden und der Gegenfärbung müssen im Dunkeln aufbewahrt werden.

Protokoll Empfehlungen

Benötigte, aber nicht mitgelieferte Laborgeräte

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

Empfehlungen zum Fluoreszenzmikroskop

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

Probenvorbereitung

Die Probenvorbereitung sollte entsprechend der Richtlinien des Labors, bzw. des Institutes durchgeführt werden.

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

FISH-Protokoll

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

Vorbereitung des Objektträgers

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

Prä-denaturierung

5. Entnehmen Sie die Probe aus dem Gefrierschrank und lassen Sie sie Raumtemperatur annehmen.
6. Stellen Sie sicher, dass die Probenlösung gleichmäßig mit einer Pipette gemischt wird.
7. Entnehmen Sie pro Test 10µl der Probe und füllen Sie sie in ein Mikrozentrifugengefäß um. Stellen Sie die restliche Probe schnell wieder zurück in den Gefrierschrank.
8. Sonde und Probenobjektträger 5 Minuten auf einer Heizplatte bei 37°C (+/- 1°C) vorwärmen.
9. 10µl Sondenmischung auf die Zellprobe auftropfen und Deckglas sorgfältig auflegen. Mit Gummikleber-Lösung versiegeln und vollständig trocknen lassen.

Denaturierung

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

Hybridisierung

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

Waschen nach der Hybridisierung

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

Stabilität der fertigen Objektträger

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

Empfehlungen zur Durchführung

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

Zu erwartende Ergebnisse

In einer normalen Zelle sollten zwei rote, zwei grüne und zwei blaue Signale (2R, 2GR, 2B) sichtbar sein. Wegen der engen Nähe der grünen Signale können sich diese beiden Signale überlappen und bei einem kleinen Anteil der Zellen als ein Signal erscheinen. Zellen, die das balancierte t(1;19)(q23;p13.3) tragen, sollten ein rotes, ein grünes, zwei blaue und zwei gelbe Fusionssignale zeigen (können als eng beieinander liegende rote und grüne Signale erscheinen) (1R, 1G, 2B, 2Y). Zellen, die das unbalancierte der(19)t(1;19)(q23;p13.3) tragen, sollten zwei rote, ein grünes, zwei blaue und ein gelbes Signal (2R, 1G, 2B, 1Y) tragen, die für die normalen Chromosomen 1 (rot), das normale Chromosom 19 (grün), die normalen Chromosomen 17 (blau) und das der(19) (gelb) stehen.

Weitere Informationen:

Weitere Produktinformationen erhalten Sie vom Technischen Kundendienst von CytoCell.

T: +44 (0) 1223 294048

E: techsupport@cytoCELL.com

W: www.ogt.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 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.

Uso Previsto

Este producto está diseñado para ser utilizado en investigación y no en procedimientos de diagnóstico.

Especificaciones de la sonda

Región E2A, 19p13.3 en verde

Región PBX1, 1q23.3 en rojo

La sonda E2A, marcada en verde, contiene dos sondas (110kb y 146kb) que abarcan el extremo 3' del gen E2A (TCF3) y la región que lo flanquea y una sonda de 321kb que abarca una región en posición relativa 5' (centromérica) respecto al gen. La sonda PBX1, marcada en rojo, contiene dos sondas (147kb y 110kb) localizadas en el gen PBX1 y una sonda de 117kb localizada en posición relativa 3' (telomérica) respecto al gen.

Material proporcionado

Sonda: 50µl por vial o 100µl por vial

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

Contraste: 150µl por vial

DAPI Antifade (ES: 0.125µg/ml DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol)).

Avisos y precauciones

1. Para uso en investigación. No en procedimientos de diagnóstico. Sólo para uso profesional.
2. Utilizar guantes al manipular las sondas de ADN y la contraindicación DAPI.
3. La sonda contiene formamida, que es teratogénica; no respire los vapores y evite el contacto con la piel. Utilizar guantes, bata de laboratorio y manipular utilizando la campana de humos. Para eliminarla, aclarar con abundante agua.
4. La contraindicación DAPI puede producir cáncer. Manipular con cuidado; utilizar guantes y bata de laboratorio. Para eliminarla, aclarar con abundante agua.

5. Las sustancias peligrosas deben eliminarse de acuerdo con las instrucciones de su institución en relación con la eliminación de sustancias peligrosas.

Almacenamiento y manejo

El kit debe almacenarse en un congelador a una temperatura comprendida entre -25°C y -15°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del kit. Los viales de contraste y de sonda deben almacenarse en un lugar oscuro.

Protocolo Recomendado

Equipo necesarios pero no proporcionados

1. Placa caliente (con una placa sólida y un control de temperatura preciso hasta 80°C).
2. Micropipetas de volumen variable (rango 1µl - 200µl).
3. Baño de agua con control preciso de temperatura a 72°C.
4. Tubos de microcentrifugado (0.5ml).
5. Microscopio de fluorescencia (lea la sección Recomendaciones para el microscopio de fluorescencia).
6. Recipientes de cristal y de plástico.
7. Pinzas.
8. Microscopio de fluorescencia con objetivo de inmersión en aceite.
9. Centrífuga de banco.
10. Portaobjetos para microscopio.
11. Cubreobjetos de 24x24mm.
12. Cronómetro.
13. Incubador 37°C.
14. Pegamento.

Recomendaciones para el microscopio de fluorescencia

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

Preparación de la muestra

La preparación de la muestra se debe realizar de acuerdo con las instrucciones del laboratorio o la institución.

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

Protocolo FISH

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

Preparación del portaobjetos

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

Antes de la desnaturalización

5. Retire la sonda del congelador y deje que alcance la temperatura ambiente.
6. Asegúrese de que la solución de la sonda quede homogéneamente mezclada con una pipeta.
7. Retire 10µl de la sonda en cada prueba y transfíralo a un tubo de microcentrífuga. Vuelva a colocar la solución que quede en la sonda al congelador.
8. Precaliente el portaobjetos y la muestra en una placa caliente a 37°C (+/- 1°C) durante 5 minutos.
9. Ponga 10µl de sonda sobre el portaobjetos y aplique cuidadosamente el cubreobjetos. Selle con solución de goma y deje secar completamente.

Desnaturalización

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

Hibridación

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

Lavados post-hibridación

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

Estabilidad de los portaobjetos terminados

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

Resultados esperados

En una célula normal, se deben observar dos señales rojas, dos verdes y dos azules (2R, 2V, 2Az). Debido a la estrecha proximidad de las señales verdes, estas dos señales se pueden superponer y verse como una sola en una pequeña proporción de las células. Las células portadoras de t(1;19)(q23;p13.3) equilibrada deben mostrar una señal roja, una verde, dos azules y dos señales fusionadas amarillas (pueden observarse como señales rojas y verdes muy juntas) (1R, 1V, 2Az, 2A). Las células portadoras de der(19)t(1;19)(q23;p13.3) desequilibrada deben mostrar dos señales rojas, una verde, dos azules y una amarilla (2R, 1V, 2Az, 1A), que representan los cromosomas 1 normales (rojo), el cromosoma 19 normal (verde), los cromosomas 17 normales (azul) y la der(19) (amarillo).

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.ogt.com

REF	EN: Catalogue number DE: Bestellnummer FR: Référence du catalogue IT: Riferimento di Catalogo ES: Número de catálogo
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: Fabbricante ES: Fabricante
	EN: Use by DE: Verwendbar bis FR: Utiliser jusqu'au IT: Utilizzare entro ES: Fecha de caducidad
	EN: Temperature limitation DE: Temperaturbegrenzung FR: Limites de température IT: Limiti di temperatura ES: Limitación de temperatura
CONT	EN: Contents DE: Inhalt FR: Contenu IT: Contenuto ES: Contenido

Patents and Trademarks

CytoCell is a registered trademark of Cytozell Ltd.
This product contains technology licensed from Life Technologies Corporation and is available for research use only.



Cytocell Ltd.
Oxford Gene Technology,
418 Cambridge SciencePark,
Milton Road,
Cambridge, CB4 0PZ, UK
T: +44(0)1223 294048
F: +44(0)1223 294986
E: probes@cytozell.com
W: www.ogt.com