



REF: RU-LPS 018-S/RU-LPS 018

**FGFR1 Breakpart/Amplification Probe****Research Use Only**Further information available at [www.ogt.com](http://www.ogt.com)

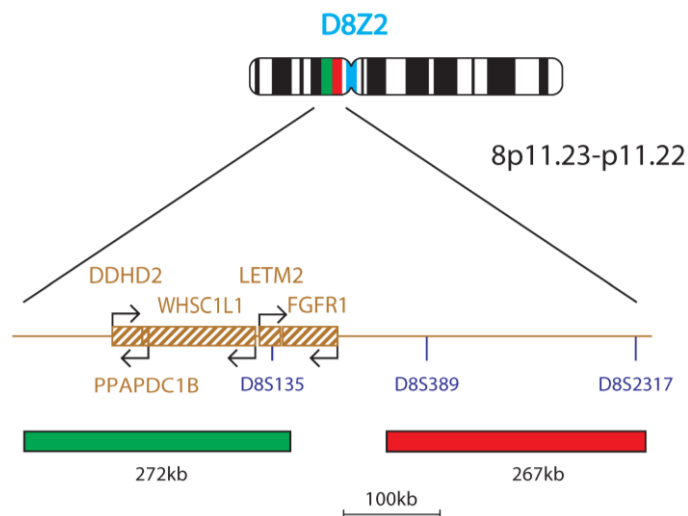
Fluorescence *In Situ* Hybridisation (FISH) is a technique that allows the visualisation of DNA sequences upon chromosomes. The technique uses DNA probes that hybridise to entire chromosomes or single unique sequences, and serves as a powerful adjunct to classic cytogenetics. Recent developments have 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**

FGFR1, 8p11.23-p11.22, Red  
 FGFR1, 8p11.23-p11.22, Green  
 D8Z2, 8p11.1-q11.1, Blue



The FGFR1 Breakpart/Amplification probe consists of a green 272 kb probe and a red 267 kb probe, which are positioned on each side of the FGFR1 gene. The 8-centromere probe in blue acts as a control for chromosome 8.

**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 the 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 at -20°C until the expiry date indicated on the kit label. The probe and counterstain vials must be stored in the dark.

**Protocol Recommendations**

For use on Formalin Fixed Paraffin Embedded (FFPE) tissue sections, Tissue Microarrays (TMA), peripheral blood samples or cultured bone marrow cells.

**Equipment Necessary but not Supplied**

1. Hotplate (with a solid plate and accurate temperature control up to 80°C).
2. Variable volume micropipettes and tips range 1µl - 200µl.
3. Water bath with accurate temperature control at 72°C.
4. Microcentrifuge tubes (0.5ml).
5. Fluorescence microscope (Please see Fluorescence Microscope Recommendation section).
6. Plastic or glass coplin jars.
7. Forceps.
8. Fluorescence grade microscope lens immersion oil.
9. Bench-top centrifuge.
10. Microscope slides.
11. 24x24mm coverslips.
12. Timer.
13. 37°C incubator.
14. Rubber solution glue.
15. Tissue Pretreatment Kit (LPS 100).

**Fluorescence Microscope Recommendation**

For optimal visualisation of the probe we recommend a 100-watt mercury lamp and plan apochromat objectives x63 or x100. The Triple bandpass filter DAPI/FITC/Texas Red is optimal for viewing all fluorophores and DAPI simultaneously. Alternatively for viewing red and green fluorophores use dual bandpass filter FITC/Texas Red. The blue fluorophore has specificity to the Aqua and DEAC spectrum (single bandpass Aqua or DEAC filter is required).

**Sample Preparation**

Samples should be prepared according to the laboratory or institution guidelines. For tissue FISH, 4µm - 6µm thick FFPE tissue sections should be used.

**FISH Protocol**

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

**FFPE Procedure****Tissue Sample Pretreatment**

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

**Pre-Denaturation**

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

**Denaturation**

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

**Hybridisation**

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

**Post-Hybridisation Washes**

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

**Comments**

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

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

**Peripheral blood or cultured bone marrow Procedure**

## Slide preparation

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

## Pre-Denaturation

5. Remove the probe from the freezer and allow it to warm to RT.
6. Ensure that the probe solution is uniformly mixed with a pipette.
7. Remove 10µl of probe per test, and transfer it to a microfuge tube. Quickly return the remaining probe to -20°C.
8. Place the probe and the sample slide to prewarm on a 37°C (+/- 1°C) hotplate for 5 minutes.
9. Spot 10µl of probe mixture onto the cell sample and carefully apply a coverslip. Seal with rubber solution glue and allow the glue to dry completely.

## Denaturation

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

## Hybridisation

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

## Post-Hybridisation Washes

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

## Stability of Finished Slides

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

## Procedural Recommendations

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

## Expected Results

In a normal cell due to the close juxtaposition of the probes, 2 yellow fusion and 2 blue control signals will be observed (2Y, 2B). In the event of a 8p11 translocation one split and one fused signal will be observed resulting in 1 yellow, 1 red, 1 green, 2 blue conformation (1Y, 1R, 1G, 2B). In the event of an amplification of the FGFR1 gene 3 or more yellow fusion and 2 blue control signals will be observed (3+Y, 2B).

## Additional Information

For additional product information please contact the CytoCell Technical Support Department.  
T: +44 (0)1223 294048  
E: techsupport@cytoCELL.com  
W: www.cgt.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 FGFR1, 8p11.23-p11.22, en Rouge  
Sonde de la région FGFR1, 8p11.23-p11.22, en Vert  
Sonde de la région D8Z2, 8p11.1-q11.1 en Bleu

La sonde FGFR1 est composée d'une sonde verte 267kb et d'une sonde rouge 272kb positionnées sur chaque côté du gène FGFR1. La sonde bleu du centromère permet de contrôler le chromosome 8.

## Conditionnement

Sonde : 50µl par tube ou 100µl par tube

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

## Contre-colorant: 150µl par tube

Le contre-colorant est le DAPI antifade (ES: 0,125µg/ml DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole)).

## Avvertissements et précautions

1. Pour la recherche uniquement. Pas destiné à être utilisé dans les procédures de diagnostic. Pour usage professionnel uniquement.
2. 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.
4. Le DAPI est un carcinogène potentiel. Manipuler avec précaution. Porter des gants et une blouse de laboratoire. Après élimination, rincer abondamment avec de l'eau.
5. Toutes les matières dangereuses doivent être éliminées selon les réglementations concernant l'élimination des déchets dangereux en vigueur dans votre établissement.

## Conservation et manipulation

Le kit doit être conservé à -20°C jusqu'à la date d'expiration indiquée sur le kit. La sonde et le contre-colorant doivent être conservés à l'abri de la lumière.

## Recommandations sur les protocoles

Pour l'utilisation sur des coupes de tissu inclus en paraffine, de microarrays de tissu (TMA), des cellules de sang périphérique ou de moelle osseuse cultivées

## Équipement nécessaire non fourni

1. Plaque chauffante (avec bloc et contrôle de la température jusqu'à 80°C).
2. Micropipettes de volume variable et gamme d'embouts de 1µl - 200µl.
3. Bain-marie avec contrôle précis de la température à 72°C.
4. Tubes à microcentrifugation (0,5ml).
5. Microscope à fluorescence (Voir la section Microscope à fluorescence recommandés).
6. Bocal Coplin en plastique ou en verre.
7. Pinces.
8. Huile à immersion pour microscope à fluorescence.
9. Centrifugeuse de paillasse.
10. Lames de microscope.
11. Lamelles 24x24mm.
12. Chronomètre.
13. Incubateur à 37°C.
14. Colle à base de caoutchouc.
15. Tissue Pretreatment Kit (LPS 100).

## Microscope à fluorescence recommandés

Pour une visualisation optimale de la sonde, nous recommandons l'utilisation d'une lampe à mercure de 100 watts et d'objectifs plan apochromatiques x63 ou x100. Le filtre triple bande DAPI/FITC/Texas Red est optimal pour la visualisation des 3 fluorochromes et du DAPI simultanément. Pour la visualisation des fluorochromes rouge et vert, utiliser le filtre double bande FITC/Texas Red. Le fluorochrome bleu a une spécificité par rapport au spectre Aqua ou DEAC (un filtre triple bande Aqua ou DEAC est requis).

## Préparation des échantillons

La préparation de l'échantillon doit être effectuée conformément aux recommandations du guide des bonnes pratiques en cytogénétique. Pour tissu FISH, des échantillons fixés au formol et inclus en paraffine d'une épaisseur de 4µm - 6µm doivent être utilisés.

## Protocole FISH

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

## Protocole sur échantillons FFPE

### Prétraitement des échantillons de tissu

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

### Pré-dénaturation

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

### Dénaturation

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

### Hybridation

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

### Lavages post-hybridation

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

### Commentaires:

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

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

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

### Préparation de la lame échantillon

1. Déposer l'échantillon cellulaire sur une lame propre. Laisser sécher.

- 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

- Retirer la sonde du congélateur à -20°C et la laisser préchauffer à température ambiante.
- Bien homogénéiser la sonde en pipetant plusieurs fois.
- Prélever 10µl de sonde par test et placer dans un tube à microcentrifugation. Remettre le tube avec le restant de sonde à -20°C.
- Mettre 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.
- Egoutter la lame et laver dans du tampon 2xSSC, 0,05% Tween-20 (pH 7.0) à température ambiante pendant 30 seconde 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 sont analysables pendant un mois si elles sont conservées à l'abri de la lumière et à au dessous de 4°C.

#### 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, 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.

#### Interprétation des résultats

Dans une cellule normale, les sondes étant juxtaposées à proximité les unes des autres, 2 signaux de fusion jaunes et 2 signaux de contrôle bleus seront observés (2Y, 2B). Dans le cas d'une translocation 8p11, un signal de dédoublement et un signal de fusion seront observés, entraînant une conformation à 1 signal jaune, 1 rouge, 1 vert, 2 bleus (1Y, 1R, 1G, 2B). Dans le cas d'une amplification du gène FGFR1, 3 signaux de fusion jaunes ou plus et 2 signaux de contrôle bleus seront observés (3+Y, 2B).

#### 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 e 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 patologia. 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 FGFR1, 8p11.23-p11.22, Rosso  
Regione FGFR1, 8p11.23-p11.22, Verde  
Regione D8Z2, 8p11.1-q11.1, Blu

La sonda FGFR1 contiene una sonda etichettata in verde di 267kb e una sonda etichettata in rosso di 272kb, posizionate su ciascun lato del gene FGFR1. La sonda centromerica etichettata in blu agisce come sonda di controllo per il cromosoma 8.

#### Materiali forniti

**Sonda:** 50µl per provetta o 100µl per provetta  
Le sonde sono fornite premiscelate nella soluzione di ibridazione (formamide; destrano solfato; SSC) e pronte per l'uso.

#### Colorante di contrasto:

150µl per provetta  
Il colorante di contrasto è costituito da DAPI antifade (ES: 0,125µg/ml DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindolo)).

#### Avvertenze e precauzioni

- Per uso ricerca. Non per l'uso in procedure diagnostiche. Solo per uso professionale.
- Quando si maneggiano le sonde e il colorante di contrasto DAPI, è necessario indossare guanti.
- Le miscele delle sonde contengono formamide, una sostanza teratogena. Non respirare i fumi ed evitare il contatto con la pelle. Indossare guanti e camice da laboratorio e maneggiare sotto cappa chimica. Per lo smaltimento, sciacquare con grandi quantità di acqua.

- Il DAPI è un potenziale cancerogeno. Maneggiare con cura, indossare guanti e camice da laboratorio. Per lo smaltimento, sciocquare con grandi quantità di acqua.
- Lo smaltimento dei materiali pericolosi deve avvenire nel rispetto delle normative interne dell'istituzione relative allo smaltimento dei rifiuti pericolosi.

#### Conservazione e manipolazione

Conservare il kit a -20°C fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta. I flaconcini della sonda e del colorante di contrasto devono essere conservati al buio.

#### Protocollo Raccomandazioni

Per l'uso su sezioni tissutali incluse in paraffina, matrici tissutali ad alta densità (TMA) campioni di sangue periferico o colture di cellule di midollo osseo

#### Apparecchiature necessarie ma non fornite

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

#### Caratteristiche consigliate per il microscopio a fluorescenza

Per una visualizzazione ottimale della sonda si consiglia di utilizzare una lampada al mercurio da 100 watt e obiettivi planapocromatici 63x o 100x. Il filtro triplo DAPI/FITC/Texas Red è ottimale per visualizzare contemporaneamente tutti e tre i fluorofori e il DAPI. In alternativa, utilizzare il doppio filtro passabanda FITC/Texas Red per visualizzare i fluorofori rosso e verde. Il fluoroforo blu presenta specificità per lo spettro di Aqua e DEAC (è necessario un filtro passa-banda per Aqua o DEAC).

#### Preparazione del campione

La preparazione del campione deve essere eseguita secondo le linee guida del laboratorio o dell'istituzione.  
Per tessuto FISH devono essere utilizzati campioni di tessuto fissati in formalina e inclusi in paraffina con uno spessore da 4µm - 6µm.

#### Protocollo della FISH

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

#### Procedura FFPE

##### Pretrattamento del campione di tessuto

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

#### Pre-denaturazione

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

#### Denaturazione

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

#### Ibridazione

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

#### Lavaggi post-ibridazione

- Rimuovere accuratamente il vetrino copri oggetto e qualsiasi residuo di colla.
- Lavare il vetrino in 0,4xSSC (pH 7.0) a 72°C (+/- 1°C) per 2 minuti, senza agitazione.
- Scolare il vetrino e lavare in 2xSSC, Tween-20 0,05% (pH 7.0) a TA per 30 secondi senza agitazione.
- Scolare il vetrino e applicare 10µl - 15µl di DAPI antifade su ciascun campione.
- Coprire con un vetrino copri oggetto, rimuovere eventuali bolle e attendere lo sviluppo del colore per 10 minuti lasciando il vetrino al buio.
- Esaminare con un microscopio a fluorescenza.

#### Commenti:

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

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

#### Sangue periferico o coltura di midollo osseo Procedura

##### Preparazione del vetrino

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

#### Pre-denaturazione

- Rimuovere la sonda dal congelatore a -20°C e lasciarla riscaldare a TA.
- Accertarsi che la soluzione della sonda sia uniforme pipettando ripetutamente con delicatezza.

- Pipettieren 10µl von Sonden für Test und einfüllen in eine Provette von einer Mikrozentrifuge. Wiederholen Sie die Sonden nicht bei -20°C.
- Pre-risaldieren die Sonden, die Vetro und die Koprioggeto auf einer Platte, die auf 37°C (+/- 1°C) für 5 Minuten.
- Caricare 10µl von Mischung der Sonden auf die Zellen und abdecken mit einem Deckglas. Versiegeln mit einer Lösung, die Gummi enthält und trocknen lassen.

#### Denaturierung

- Denaturieren gleichzeitig die Probe und die Sonden, indem man die Vetro auf einer Platte, die auf 75°C (+/- 1°C) für 2 Minuten.

#### Ibridierung

- Die Vetro in einer feuchten Kammer, die nicht durch Licht, bei 37°C (+/- 1°C) für die Nacht.

#### Lavagen nach der Ibridierung

- Entfernen Sie sorgfältig die Vetro Koprioggeto und alle Spuren von Kleber.
- Waschen die Vetro in 0,4xSSC (pH 7,0) bei 72°C (+/- 1°C) für 2 Minuten, ohne Agitation.
- Waschen die Vetro und waschen in 2xSSC, Tween-20 0,05% (pH 7,0) bei TA für 30 Sekunden ohne Agitation.
- Waschen die Vetro und anwenden 10µl von DAPI Antifade auf jede Probe.
- Abdecken mit einer Vetro Koprioggeto, entfernen eventuelle Blasen und abdecken für 10 Minuten, während die Vetro im Dunkeln.
- Analysieren Sie mit einem Mikroskop die Fluoreszenz.

#### Stabilität der Vetro

Die Vetro, die für FISH verwendet werden, sind für etwa 1 Monat bei -20°C in einer feuchten Kammer bei 4°C.

#### Empfehlungen für die Prozedur

- Übermäßiges Erhitzen oder Altern der Vetro ist nicht empfohlen, da dies zu einer Verringerung der Fluoreszenz führen kann.
- Die Bedingungen der Ibridierung können durch negative Einflüsse von der Verwendung von Reagenzien, die von anderen Anbietern empfohlen werden, beeinflusst werden.
- Es wird empfohlen, ein Thermometer zu verwenden, um die Temperatur der Lösungen, der Bäder, der Thermostate und der Inkubatoren zu überwachen, da diese Temperaturen von grundlegender Bedeutung für die Funktion der Vetro sind.
- Die Konzentrationen, der pH-Wert und die Temperatur der Lavagen sind von grundlegender Bedeutung, da diese Bedingungen von stringenter Blässe zu einer Bindung der Sonden führen können, während Bedingungen von stringenter Höhe die Abwesenheit von Signalen bestimmen.
- Ein unvollständiges Denaturieren kann die Abwesenheit von Signalen bestimmen, während ein übermäßiges Denaturieren zu einer Abwesenheit von Signalen führen kann.

#### Interpretation der Ergebnisse

In einer normalen Zelle, aufgrund der Nähe der Sonden, werden 2 Signale der Fusion (gelb) und 2 Signale der Kontrolle (blau), oder 2Y, 2B. In der eventuellen Translokation der 8p11, werden 2 Signale der Fusion (gelb) und 2 Signale der Kontrolle (blau) beobachtet, die von der Fusion (gelb) und 2 Signale der Kontrolle (blau), die von 3+Y, 2B.

#### Informationsaggiuntive

Für weitere Informationen zum Produkt wenden Sie sich an das Technische Support-Team von CytoCell.  
T: +44 (0)1223 294048  
E: techsupport@cytoCELL.com  
W: www.oigt.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 Waschwäschungen entfernt und die DNA zur Visualisierung gefärbt. Unter dem Fluoreszenzmikroskop wird dann die hybridisierte Sonde am Zielmaterial erkennbar.

#### Verwendungszweck

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

#### Sondenspezifikation

FGFR1, 8p11.23-p11.22, Region, Rot  
FGFR1, 8p11.23-p11.22, Region, Grün  
D8Z2, 8p11.1-q11.1, Region, Blau

Die FGFR1 Sonde besteht aus einer grünen 267kb Sonde und einer roten 272kb Sonde, die an einem Ende der FGFR1 Gene angelegt werden. Die Centromersonde mit blauer Markierung dient zur Kontrolle für Chromosom 8.

#### Bestandteile des Kits

**Sonde:** 50µl pro Röhrchen oder 100µl pro Röhrchen  
Die Sonden werden vorgemischt und gebrauchsfertig in Hybridisierungslösung geliefert (Formamid, Dextranulfat, SSC).

#### Farbstoff für die Gegenfärbung:

150µl pro Röhrchen  
Der Farbstoff für die Gegenfärbung ist DAPI Antifade (ES: 0,125µg/ml DAPI (4,6-Diamidino-2-Phenylindol)).

#### Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen

- Nur für Forschungszwecke. Bestimmt nicht für die Anwendung in diagnostischen Verfahren. Durchführung ausschließlich durch qualifiziertes Personal.
- Beim Umgang mit DNA-Sonden und dem DAPI Farbstoff Handschuhe tragen.
- Sondenmischungen enthalten Formamid, das Teratogen ist. Keine Dämpfe einatmen und Hautkontakt vermeiden. Handschuhe und Labormantel tragen und unter einer Abzugshaube arbeiten. Bei der Entsorgung mit viel Wasser nachspülen.
- DAPI ist ein potenzielles Karzinogen. Vorsichtig damit umgehen, Handschuhe und Labormantel tragen. Bei der Entsorgung mit viel Wasser nachspülen.
- Alle Gefahrstoffe sollten gemäß den Ihren hausinternen Richtlinien zur Gefahrfachentsorgung entsorgt werden.

#### Lagerung und Behandlung

Das Kit sollte bis zum Ablaufdatum, das auf dem Kit-Etikett angegeben ist, bei -20°C gelagert werden. Die Röhrchen mit den Sonden und der Gegenfärbung müssen im Dunkeln aufbewahrt werden.

#### Protokoll Empfehlungen

Für den Einsatz auf paraffineingebetteten Gewebeschnitten oder Tissue-Microarrays (TMA), peripheren Blutproben oder kultivierten Knochenmarkzellen

#### Benötigte, aber nicht mitgelieferte Laborgeräte

- Heizplatte (mit stabiler Platte und genauer Temperatursteuerung bis 80°C).
- Mikropipetten mit unterschiedlichen Volumina von 1µl - 200µl.
- Wasserbad mit genauer Temperatursteuerung bei 72°C.
- Mikrozentrifugenröhrchen (0,5ml).
- Fluoreszenzmikroskop (siehe auch „Empfehlungen zum Fluoreszenzmikroskop“).
- Coplin-Färbetrog aus Kunststoff oder Glas.
- Pinzette.
- Für Fluoreszenzobjektive geeignetes Immersionsöl.
- Tischzentrifuge.
- Objekttäger für das Mikroskop.
- 24x24mm Deckgläser.
- Zeituhr.
- 37°C-Inkubator.
- Gummilösung zum Versiegeln der Deckglasränder.
- Tissue Pretreatment Kit (LPS 100).

#### Empfehlungen zum Fluoreszenzmikroskop

Für die optimale Visualisierung der Probe empfehlen wir die Verwendung planapochromatischer Objektive mit 63-facher oder 100-facher Vergrößerung sowie einer 100-Watt Quecksilberlampe. Das Dreifach-Bandpassfilter DAPI/FITC/Texasrot ist für die simultane Beobachtung aller drei Fluorophore und DAPI optimal geeignet. Alternativ dazu kann zur Beobachtung des roten und des grünen Fluorophors ein Zweifach-Bandpassfilter FITC/Texas Red verwendet werden. Das blaue Fluorophor hat eine Spezifität gegenüber dem Aqua- oder DEAC-Spektrum (ein Aqua- oder DEAC-Einfach-Bandpassfilter ist erforderlich).

#### Probenvorbereitung

Die Probenvorbereitung sollte entsprechend der Richtlinien des Labors, bzw. des Institutes durchgeführt werden.  
Für Gewebe FISH, sind 4µm - 6µm dicke formalinfixierte und paraffineingebettete Gewebeproben zu verwenden.

#### FISH-Protokoll

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

#### FFPE-Verfahren

##### Vorbereitung von Gewebeproben

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

##### Prä-denaturierung

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

##### Denaturierung

- Denaturieren Sie Probe und Sonde gleichzeitig durch 5 minütiges Erwärmen des Objekttägers auf einer Heizplatte bei 75°C (+/- 1°C).

##### Hybridisierung

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

##### Waschen nach der Hybridisierung

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

##### Bemerkungen:

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

#### Verfahren für periphere Blutproben oder kultivierte Knochenmarkzellen

##### Vorbereitung des Objekttägers

- Zellprobe auf Objekttäger auftragen und trocknen lassen.
- Den Objekttäger in 2xSSC für 2 Minuten bei RT eintauchen (schütteln nicht notwendig).
- Dehydratation mittels Alkoholreihe (70%, 85% und 100%), jeweils für 2 Minuten bei RT.
- Trocknen lassen.

##### Prä-denaturierung

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

##### Denaturierung

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

##### Hybridisierung

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

##### Waschen nach der Hybridisierung

- Deckgläschen y todas las huellas de pegamento despegar.
- Objekträger 2 minutos en 0,4 x SSC (pH 7,0) a 72°C (+/- 1°C) lavar.
- Objekträger gotear y lavar en 2 x SSC, 0,05% Tween-20 en RT, (pH 7,0), lavar.
- En el objetträger gotear y lavar 10 µl de DAPI antifade para cada muestra.
- Con un vidrio cubren, las burbujas despegar y 10 minutos en luz protegida desarrollar.
- Bajo el microscopio de fluorescencia observar.

#### Estabilidad de los portaobjetos

Objekträger con FISH pueden ser analizados hasta un mes, si se guardan en la oscuridad o a 4°C.

#### Recomendaciones para la realización

- Se recomienda, la evaluación de inmediato, ya que la señal de fluorescencia con el tiempo se debilita. El calor también puede afectar la señal de fluorescencia.
- Al usar reactivos, asegúrese de que no haya contaminación. Las condiciones de hibridación pueden ser influenciadas negativamente.
- Se recomienda, para la medición de temperatura, el uso de baños de agua y incubadores con un termómetro calibrado, ya que estas temperaturas para el mejor rendimiento del producto son críticas.
- La concentración de las soluciones, el pH y la temperatura son importantes, ya que las condiciones de hibridación no específicas de la sonda pueden conducir a una pérdida de señal.
- Una hibridación incompleta puede conducir a una pérdida de señal y una hibridación no específica puede conducir a una pérdida de señal.

#### Resultados esperados

Debido a la proximidad de las muestras de prueba, en una normal célula se ven 2 verdes y 2 azules. En el caso de una t(8p11-21) translocación, se ven 2 verdes y 2 azules fusionados, así como 2 verdes y 2 azules. En el caso de una amplificación de FGFR1, se ven 3 o más verdes fusionados y 2 azules. Los resultados de control se observan (3+Y, 2B).

#### Información adicional:

Para más información, consulte al servicio al cliente técnico de 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 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 las sondas

Región FGFR1, 8p11.23-p11.22, en Rojo  
Región FGFR1, 8p11.23-p11.22, en Verde  
Región D8Z2, 8p11.1-q11.1, en Azul

La sonda FGFR1 contiene una sonda verde de 267kb y una roja de 272kb que se colocan a cada lado del gen FGFR1. La sonda centromérica azul actúa como control para el cromosoma 8

#### Material incluido

**Sonda:** 50 µl por vial o 100 µl por vial  
Las sondas se presentan premezcladas en la solución de hibridación (formamida; sulfato de dextrano; SSC) y listas para usar.

#### Contratención:

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

#### Advertencias y precauciones

- Para uso en investigación No en procedimientos de diagnóstico. Sólo para uso profesional.
- Utilizar guantes al manipular las sondas de ADN y la contratención DAPI.
- La sonda contiene formamida, que es teratogénica; no respire los vapores y evite el contacto con la piel. Utilizar guantes, bata de laboratorio y manipular utilizando la campana de humos. Para eliminarla, aclarar con abundante agua.
- La contratención DAPI puede producir cáncer. Manipular con cuidado; utilizar guantes y bata de laboratorio. Para eliminarla, aclarar con abundante agua.
- Las sustancias peligrosas deben eliminarse de acuerdo con las instrucciones de su institución en relación con la eliminación de sustancias peligrosas.

#### Almacenamiento y manipulación

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

#### Protocolo Recomendado

Para uso en secciones de tejido embebido en parafina, matrices tisulares (TMA), muestras de sangre periférica o células de médula ósea cultivadas

#### Material necesario pero no incluido

- Placa calefactora (con una placa estable y un control de temperatura preciso hasta 80°C).
- Micropipetas y puntas de volumen variable (de 1 µl a 200 µl).
- Baño maría con control preciso de temperatura a 72°C.
- Tubos de microcentrifugación (0,5 ml).
- Microscopio de fluorescencia (véase la sección Recomendaciones sobre el microscopio de fluorescencia).
- Cubetas Coplin de cristal y de plástico.
- Pinzas.
- Aceite de inmersión para objetivos de microscopio de fluorescencia.
- Centrífuga sobremesa.
- Portaobjetos para microscopio.
- Cubreobjetos de 24x24 mm.
- Temporizador.
- Incubadora a 37°C.

- Pegamento de solución de caucho.
- Tissue Pretreatment Kit (LPS 100).

#### Recomendaciones sobre el microscopio de fluorescencia

Para una visualización óptima de la sonda, se recomienda utilizar una lámpara de mercurio de 100 vatios y objetivos Plan-Apochromat de 63 o 100 aumentos. El triple filtro pasabanda DAPI/FITC/Texas Red es óptimo para ver simultáneamente los tres fluorocromos y DAPI. Para los fluorocromos rojo y verde debe emplearse el doble filtro pasabanda FITC/Texas Red. El fluorocromo azul tiene especificidad por el espectro Aqua o DEAC (se necesita filtro pasabanda sencillo Aqua o DEAC).

#### Preparación de la muestra

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

En el caso de tejido FISH, deben emplearse muestras de tejido embebido en parafina y fijado en formalina de entre 4 µm - 6 µm de grosor.

#### Protocolo para la FISH

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

#### Procedimiento para los FFPE

##### Pretratamiento de las muestras de tejido

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

#### Antes de la desnaturalización

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

#### Desnaturalización

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

#### Hibridación

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

#### Lavados post-hibridación

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

#### Comentarios:

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

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

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

##### Preparación del portaobjetos

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

#### Antes de la desnaturalización

- Saque la sonda del congelador a -20°C y deje que se caliente a TA.
- Asegúrese de que la solución de la sonda es uniforme mezclando varias veces con la pipeta.
- Extraiga 10 µl de la sonda por prueba, poner en un tubo de microcentrifuga. Vuelva a almacenar el resto de la sonda a -20°C.
- Pre caliente el portaobjetos y la muestra en una placa caliente a 37°C (+/- 1°C) durante 5 minutos.
- Ponga 10 µl de sonda sobre el portaobjetos y aplique cuidadosamente el cubreobjetos. Selle con solución de goma y deje secar completamente.

#### Desnaturalización

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

#### Hibridación

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

#### Lavados post-hibridación

- Quite el cubreobjetos y los restos de goma cuidadosamente.
- Lave el portaobjetos en 0,4xSSC (pH 7,0) a 72°C (+/- 1°C) durante 2 minutos.
- Seque el portaobjetos y lávelo en 2 x SSC, 0,05% Tween-20 (pH 7,0) a TA durante 30 segundos sin agitación.
- Escorra el portaobjetos y añada 10 µl de DAPI antifade sobre cada muestra.
- Aplique un cubreobjetos, elimine burbujas y deje reposar en oscuridad durante 10 minutos.
- Obsérvelo con el microscopio de fluorescencia.

#### Estabilidad de los portaobjetos terminados

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

#### Recomendaciones para los procedimientos

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

#### Interpretación de los resultados

En una célula normal, dada la cercana yuxtaposición de las sondas, se observarán 2 señales de fusión amarillas y 2 señales de control azules (2A, 2Az). En el caso de una translocación 8p11, se observarán una señal de separación y una señal de fusión que darán como resultado una conformación de 1 señal amarilla, 1 roja, 1 verde y 2 azules (1A, 1R, 1V, 2Az). En el caso de una amplificación del gen FGFR1, observará 3 o más señales de fusión amarillas y 2 señales de control azules (3+A, 2Az).






#### Información adicional

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

T: +44 (0)1223 294048

E: techsupport@cytoCELL.com

W: www.ogt.com

<b>REF</b>	<b>EN:</b> Catalogue number <b>DE:</b> Bestellnummer <b>FR:</b> Référence du catalogue <b>IT:</b> Riferimento di Catalogo <b>ES:</b> Número de catálogo
	<b>EN:</b> Batch code <b>DE:</b> Loscode <b>FR:</b> Code du lot <b>IT:</b> Codice di lotto <b>ES:</b> Código
	<b>EN:</b> Consult instructions for use <b>DE:</b> Gebrauchsanweisung beachten <b>FR:</b> Consulter la notice d'utilisation <b>IT:</b> Consultare le istruzioni per l'uso <b>ES:</b> Consúltense las instrucciones de uso
	<b>EN:</b> Manufacturer <b>DE:</b> Hersteller <b>FR:</b> Fabricant <b>IT:</b> Fabbricante <b>ES:</b> Fabricante
	<b>EN:</b> Use by <b>DE:</b> Verwendbar bis <b>FR:</b> Utiliser jusqu'au <b>IT:</b> Utilizzare entro <b>ES:</b> Fecha de caducidad
	<b>EN:</b> Temperature limitation <b>DE:</b> Temperaturbegrenzung <b>FR:</b> Limites de température <b>IT:</b> Limiti di temperatura <b>ES:</b> Limitación de temperatura
<b>CONT</b>	<b>EN:</b> Contents <b>DE:</b> Inhalt <b>FR:</b> Contenu <b>IT:</b> Contenuto <b>ES:</b> Contenido

#### Patents and Trademarks

CytoCell is a registered trademark of CytoCell Ltd.

This product contains technology licensed from Life Technologies Corporation and is available for research use only.



#### CytoCell Ltd.

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