

'Painting Probes' für menschliche Chromosomen, DIG-markiert

100 µl für 10 *in situ* Hybridisierungen (bei Verwendung von 22 × 22 mm Deckgläsern)

Version 3, März 2000

Stabil bei –15 bis –25° C

Produktbeschreibung

'Painting Probes' für menschliche Chromosomen werden aus isolierten (flow-sorted) menschlichen Chromosomen hergestellt. Die DNA-Sonden werden *in vitro* mit Digoxigenin-11-dUTP* (DIG-dUTP) in einer Nick-Translation markiert. Die Fragmentlängenverteilung der Sonde weist ein Maximum bei 200–500 Basen auf. Die 'Painting Probes' werden als gebrauchsfertige Mischungen in Hybridisierungslösung (50% Formamid, 2 × SSC, 10% Dextranulfat) geliefert. Die Hybridisierungslösung enthält Blocking-DNA, um die Hybridisierung an repetitive genomische Sequenzen zu unterdrücken. Die Menge ist bei Verwendung von 22 × 22 mm oder 18 × 18 mm Deckgläsern ausreichend für 10 *in situ* Hybridisierungen.

Form Wäßrige Lösung, Hybridisierungspuffer mit 50% Formamid.

Typische Analyse Dot Blot-Analyse (mit dem DIG Nucleic Acid Detection Kit* können 1.0 pg der DIG-markierten Sonde detektiert werden) und *in situ* Hybridisierung von Metaphase-Spreitungen von menschlichen Chromosomen.

Stabilität und Aufbewahrung Die DIG-markierte Sonde ist bei –15 bis –25° C stabil.

Toxizität Das Produkt enthält Formamid, welches bei Inhalation, im Kontakt mit Haut und Augen oder beim Verschlucken als toxisch eingestuft ist. Tragen Sie einen geeigneten persönlichen Schutz einschließlich Handschuhen, Augenschutz und Labormantel.
R61: Kann das Kind im Mutterleib schädigen.
S24/25-26-37-45-53.

Erhältliche 'Painting Probes'

Sonde		Best. Nrn.
Human chromosome	1 painting probe, DIG-markiert	1 939 696
Human chromosome	2 painting probe, DIG-markiert	1 989 723
Human chromosome	3 painting probe, DIG-markiert	1 939 700
Human chromosome	4 painting probe, DIG-markiert	1 939 718
Human chromosome	5 painting probe, DIG-markiert	1 989 731
Human chromosome	6 painting probe, DIG-markiert	1 836 366
Human chromosome	7 painting probe, DIG-markiert	1 888 765
Human chromosome	8 painting probe, DIG-markiert	1 836 374
Human chromosome	9 painting probe, DIG-markiert	2 012 936
Human chromosome	10 painting probe, DIG-markiert	1 989 740
Human chromosome	11 painting probe, DIG-markiert	1 989 758
Human chromosome	12 painting probe, DIG-markiert	1 888 773
Human chromosome	13 painting probe, DIG-markiert	1 836 382
Human chromosome	14 painting probe, DIG-markiert	1 939 726
Human chromosome	15 painting probe, DIG-markiert	1 888 781
Human chromosome	16 painting probe, DIG-markiert	1 939 734
Human chromosome	17 painting probe, DIG-markiert	1 836 404
Human chromosome	18 painting probe, DIG-markiert	1 836 412
Human chromosome	19 painting probe, DIG-markiert	1 888 790

Fortsetzung in der nächsten Spalte

Erhältliche 'Painting Probes', Wiederholung

Sonde		Best. Nrn.
Human chromosome	20 painting probe, DIG-markiert	1 888 803
Human chromosome	21 painting probe, DIG-markiert	1 836 439
Human chromosome	22 painting probe, DIG-markiert	1 836 447
Human chromosome	X painting probe, DIG-markiert	2 012 944
Human chromosome	Y painting probe, DIG-markiert	1 836 455

Weitere Information über „Painting Probes“ erhalten Sie von Ihrer zuständigen RMB-Vertretung.

Anwendung

Ganze menschliche Chromosomen werden durch Hybridisierung mit DIG-markierten 'Painting Probes' in Metaphase-Spreitungen und Interphase-Nuclei-Preparationen markiert und identifiziert (1,2). Die Sonden werden als gebrauchsfertige Mischungen geliefert. Die Lösung enthält unmarkierte kompetitive DNA, welche die Hybridisierung an repetitive Sequenzen verhindert (3).

Die Markierungs-Sonden können verwendet werden:

- zur Identifikation menschlicher Chromosomen oder subchromosomaler Fragmente in hybriden Zell-Linien,
- zum Nachweis von chromosomalen Translokationen und Rearrangements,
- zum Nachweis von Marker-Chromosomen, sowohl in normalen, als auch in Tumorzellen,
- zur Genkartierung.

Die DIG-markierten Sonden werden mit Anti-DIG-Fluorescein*, Anti-DIG-Rhodamin* oder Anti-DIG-AMCA* detektiert. 'Painting Probes' "färben" das gesamte Chromosom. In Cohybridisierungs-Experimenten können Sequenz-spezifische Sonden zur Detektion spezifischer Genloci eingesetzt werden und mit kontrastierenden Fluorophoren visualisiert werden.

Metaphase-Präparation aus Vollblut

Benötigte Reagenzien und Lösungen

- PBS
- Lymphozyten-Separationsmedium (z.B. Histopaque 107, Sigma)
- Ethidiumbromid
- Colcemid
- Fixativ (frisch hergestellte Mischung aus Methanol/Eisessig 3:1, vorgekühlt auf –15 bis –25° C)
- Chromosomenmedium (z.B. Medium 1A, Gibco BRL)
- KCl, 75 mM

Standardvorschrift

1. 12 ml heparinisiertes Vollblut mit 12 ml PBS mischen.
2. 18 ml Lymphozyten-Separationsmedium vorsichtig mit der Vollblut/ PBS-Mischung überschichten.
3. 30 min bei 2100 Upm bei 2-8° C zentrifugieren (dabei wird ein Dichte-gradient erzeugt).
4. Die Interphase-Schicht, die die Lymphozyten enthält, vorsichtig abziehen.
5. Mit 40 ml PBS waschen.
6. 10 min bei 1000 Upm (15-25° C) zentrifugieren und den Überstand bis auf ca. 1 ml verwerfen.
7. Das Zell-Pellet vorsichtig im verbleibenden PBS resuspendieren.
8. 30 ml PBS hinzufügen und waschen.
9. 10 min bei 1000 Upm (15-25° C) zentrifugieren, Überstand verwerfen.
10. Zellen in Chromosomen-Medium bei einer Zelldichte von 10⁶ Zellen/ml resuspendieren.
11. 71 h bei 37° C und 7% CO₂ in einem CO₂-Inkubator inkubieren.
12. Nach 71 h Ethidiumbromid bis zu einer Endkonzentration von 5-10 µg/ml zugeben.
13. Zusätzliche 30 min bei 37° C in einem CO₂-Inkubator inkubieren.
14. Colcemid bis zu einer Endkonzentration von 100 ng/ml zufügen, und 30 min in einem CO₂-Inkubator inkubieren.
15. Bei 1000 Upm (15-25° C) 10 min zentrifugieren.
16. Den Überstand bis auf ca. 1 ml entfernen und verwerfen.
17. Die Zellen resuspendieren und langsam 10 ml auf 37° C vorgewärmtes KCl tropfenweise zufügen. Nach jedem Tropfen vorsichtig mischen.
18. 12-20 min bei 37° C inkubieren.
19. Präfixierung: 7 Tropfen frisch hergestelltes, auf -15 bis -25° C vorgekühltes Fixativ zufügen.
20. Bei 1000 Upm 10 min (2-8° C) zentrifugieren.
21. Den Überstand bis auf ca. 1 ml entfernen und verwerfen.
22. Die Zellen vorsichtig resuspendieren, tropfenweise 10 ml Fixativ (-15 bis -25° C) hinzufügen und 30 min auf Eis inkubieren.
23. Bei 1000 Upm 10 min (2-8° C) zentrifugieren.
24. Den Überstand bis auf ca. 1 ml entfernen und verwerfen.
25. Die Schritte 22 bis 24 fünf weitere Male wiederholen (Inkubation auf Eis bei Schritt 22 ist nicht notwendig).
26. Die Zellen in 1-2 ml Fixativ resuspendieren.
27. Vor der Spreitung sollte das Metaphase-Präparat mindestens 24 h bei -15 bis -25° C aufbewahrt werden. Eine längere Aufbewahrung in Fixativ ist ebenfalls möglich.

Spreitung der Metaphase-Präparate auf Objektträgern

1. Die Objektträger, wie folgt, behandeln:
 - Kurz in einer 1:1-Mischung aus Ethanol und Ether waschen.
 - An der Luft trocknen lassen.
 - 2 x mit bidest. Wasser waschen.
2. Die Metaphasen-Präparate aus einer Höhe von ca. 50 cm auf einem feuchten Objektträger auftropfen.
3. Die Präparate an der Luft trocknen lassen (zur besseren Ausbreitung der Chromosomen das Präparat vor dem Trocknen einige Minuten in einer Feuchtigkeitskammer aufbewahren).

Aufbewahrung der Objektträger

Die Objektträger können in 70% Ethanol bei 2-8° C mindestens 6 Wochen, oder trocken bei -60° C oder niedriger mindestens ein Jahr aufbewahrt werden (in Behältern, die sich in verschlossenen Plastikbeuteln mit Trockenmittel befinden). Die Lagerung beeinflusst die Hybridisierungsqualität der Metaphasen nicht.

In situ Hybridisierung**Benötigte Reagenzien und Lösungen**

- 20 x SSC (3 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat), pH 7,0
- 100% Ethanol
- 85% Ethanol
- 70% Ethanol
- PBS
- RNase A*, 100 mg/ml in H₂O
- Klebstoff (Rubber Cement, "Fixogum")
- Formamid, deionisiert
- Anti-DIG-Fluorescein oder Anti-DIG-Rhodamin oder Anti-DIG-AMCA
- DAPI* oder Propidiumjodid, Stammlösung zu 5 mg/ml in H₂O
- 'Antifading'- Lösung
- Tween¹ 20
- Blockierungsreagenz*
- 1 M Natriumphosphatpuffer

Vorschrift**Vorbereitung der Objektträger**

(zum Erhalt guter Resultate die Präparate auf den Objektträgern mehrere Tage altern lassen, bevor eine *in situ* Hybridisierung durchgeführt wird)

1. Objektträger aus dem Ethanol nehmen und an der Luft trocknen lassen. (Wenn die Objektträger bei -70° C gelagert wurden, vor dem Trocknen 1 Stunde bei 2-8° C belassen).
2. Denaturierungslösung frisch herstellen:
 - 35 ml deionisiertes Formamid
 - 5 ml 20 x SSC
 - 2,5 ml 1 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,0
 - 7,5 ml bidest. Wasser
 pH-Wert prüfen und auf ca. pH 7,0 einstellen.
3. Denaturierungslösung auf 70° C vorwärmen, Temperatur prüfen (die Temperatur sollte nicht unter 68° C absinken).
4. Präparate 2 min bei 70° C denaturieren.
5. Objektträger sofort in ein Coplin-Gefäß mit 70% eiskaltem Ethanol überführen, 5 min inkubieren.
6. Objektträger in ein Coplin-Gefäß mit 85% eiskaltem Ethanol überführen, 5 min inkubieren.
7. Objektträger in ein Coplin-Gefäß mit 100% eiskaltem Ethanol überführen, 5 min inkubieren.
8. Die Präparate an der Luft trocknen lassen.

'Painting Probe'-Präparation

1. 'Painting Probe' kurz vortexen.
2. 10 µl in ein Mikrozentrifugenröhrchen geben und 5-10 min bei 75° C denaturieren.
3. Kurz zentrifugieren, um die Sonde am Boden zu sammeln.
4. Zur Vorhybridisierung der Sonde mit der Blocking-DNA 30-60 min bei 37° C inkubieren.

- Hybridisierung**
1. 10 µl der vorhybridisierten Probe auf das denaturierte Chromosomenpräparat geben.
 2. Mit einem 22 × 22 mm Deckglas abdecken.
 3. Das Deckglas am Objektträger mit 'Rubber Cement' festkleben.
 4. Die Objektträger in eine Feuchtigkeitskammer überführen und mindestens 16 Stunden bei 37° C inkubieren.

- Waschen**
1. Objektträger 15 min in einem Schüttel-Wasserbad bei 42° C mit 50% Formamid, 2 × SSC (pH 7,0) waschen.
 2. Objektträger 2 mal mit 2 × SSC, 0,1% Tween 20, pH 7,0 bei 15-25° C 5 min unter Schütteln waschen.

- Detektion**
1. Blockierung (**optional**):
 - Objektträger 30 min bei 37° C in 50 ml PBS mit 1-3% Blockierungsreagenz inkubieren
 2. Detektion:
 - Anti-DIG-Fluorescein oder Anti-DIG-Rhodamin oder Anti-DIG-AMCA 1:200 in PBS, welches 1% Blockierungsreagenz enthält, verdünnen.
 - 100 µl auf den Objektträger geben, mit Deckglas (24 × 60 mm) abdecken und im Dunkeln 30-60 min in einer Feuchtigkeitskammer inkubieren.
 - Objektträger im Dunkeln 2 mal mit 2 × SSC, 0,1% Tween 20, pH 7,0 bei 15-25° C 5 min unter Schütteln waschen.
 3. Gegenfärbung:
 - Die Objektträger in 50 ml PBS mit 1 µl DAPI (5 mg/ml) oder 1 µl Propidiumjodid (5 mg/ml) 5 min im Dunkeln bei 15-25° C inkubieren.
 - Objektträger kurz mit Wasser waschen.
 - Objektträger an der Luft im Dunkeln trocknen lassen.
 4. Eindecken:
 - Einen Tropfen 'Antifading'-Lösung zugeben und mit einem 22 × 22 mm Deckglas abdecken. Für eine längere Aufbewahrung die Kanten des Deckglases mit Nagellack versiegeln. Die Objektträger im Dunkeln bei -15 bis -25° C aufbewahren.

Die Signale werden mit einem Fluoreszenzmikroskop mit geeigneten Filtern detektiert. Die Emissionswellenlänge beträgt 523 nm für Fluorescein, 597 nm für Rhodamin und 474 nm für AMCA. Falls die Detektion mit Anti-DIG-AMCA durchgeführt wird, wird die Verwendung von Propidiumjodid (Wellenlänge der Emission 617 nm) zum Gegenfärben anstelle von DAPI (Wellenlänge der Emission 470 nm) empfohlen. Die Belichtungszeit für die photographische Dokumentation muß empirisch ermittelt werden.

Fehlerbehebung

Starker Untergrund

1. Nach dem Waschen (analog Protokoll) zusätzliche Wasch-Schritte anschließen: Objektträger in **auf 60° C vorgewärmtes** SSC geben und unter Schütteln 5 min bei **15-25° C** waschen. 3 × wiederholen. Je nach Stärke des Hintergrunds mit 2 × SSC beginnen und nach Bedarf die Stringenz auf 1 × SSC oder 0,1 × SSC erhöhen. Dabei darauf achten, daß die spezifischen Signale nicht verloren gehen.
2. RNase-Behandlung zur Reduktion von Zelltrümmer auf den Metaphasen: Die Objektträger vor dem Denaturieren 30 min bei 37° C in 50 ml 2 × SSC mit 50 µl RNase A (100 mg/ml) inkubieren.
3. Vor der Detektion einen Blockierungsschritt durchführen (siehe Schritt 1 der Detektionsvorschrift)

Schwaches Signal

1. Alle Temperaturwerte überprüfen.
2. Das Signal mit dem Fluorescent Antibody Enhancer Set für die DIG-Detektion* verstärken.
3. Verschiedene 'Antifading'-Lösungen austesten.
4. Die Leitfähigkeit des Formamids testen (sollte unter 20 µOhm⁻¹ liegen).
5. Den pH-Wert der Formamid-enthaltenen Lösungen überprüfen (sollte pH 7,0 sein).

Nichtspezifische Signale auf akrozentrischen Chromosomen

Die Verwendung einer 'Painting Probe' bei akrozentrischen Chromosomen (menschliche Chromosomen Nr. 13, 14, 15, 21, 22) kann unspezifische Signale an den kurzen Armen anderer akrozentrischer Chromosomen verursachen. Diese sind bedingt durch die Kreuz-Hybridisierung mit ribosomalen Genen. Eine unspezifische Kreuz-Hybridisierung kann durch Erhöhung der Wasch-Stringenz unterdrückt werden (siehe Kapitel Starker Untergrund, Punkt 1). Dies kann aber zu schwächeren spezifischen Signalen führen.

Verwandte Produkte

Produkt	Best. Nrn.
DIG Nick Translation Mix	1 745 816
Biotin Nick Translation Mix	1 745 824
Nick Translation Mix	1 745 808
Cot-1 DNA, human	1 581 074
Satelliten DNA-Sonden, Mensch	siehe Katalog
DIG PRINS Reaction Set	1 695 932
PRINS Oligonucleotid-Primer	siehe Katalog
Rhodamin PRINS Reaction Set	1 768 514
Anti-DIG-Fluorescein	1 207 741
Anti-DIG-Rhodamin	1 207 750
Anti-DIG-AMCA	1 533 878
DAPI	236 276
HNPP Fluorescent Detection Set	1 758 888
Fluorescent Antibody Enhancer Set für die DIG Detektion	1 768 596
Blockierungsreagenz	1 096 176
Colcemid	295 892
RNase I	1 732 684

Literatur

1. Pinkel, D. et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 9138-9142.
2. Lichter, P. & Cremer, T. (1992) in: *Human Cytogenesis - A practical approach*, (Rooney, D.E. & Czepulkowski, B.H., Hrsg.), S. 157-192.
3. Lichter, P. et al. (1988) *Human. Genet.* **80**, 224-234.

* zu beziehen von Roche Molecular Biochemicals

¹⁾Tween ist ein Warenzeichen der ICI Americas, Inc., USA

E-mail Address	Country
argentina.biochem@roche.com	Argentina
biochem.au@roche.com	Australia
Gerhard.Muehlbauer@roche.com	Austria
biochem.be@roche.com	Belgium
Valent@mbox.cit.bg	Bulgaria
africhem@camnet.cm	Cameroon
biochem.ca@roche.com	Canada
biochem.cn@roche.com	China
Info@medisell.com.cy	Cyprus
Bm-comp@bm-comp.cz	Czech Republic
dk.biochem@roche.com	Denmark
ou.melestrum@neti.ee	Estonia
pharsc.et@telecom.net.et	Ethiopia
helsinki.biochem_diagnostics@roche.com	Finland
biochem.fr@roche.com	France
mannheim.biochemInfo@roche.com	Germany
Bm_roche@hotmail.com	India
h.hajian@tebtech.com	Iran
tubanegin@istn.irost.com	Iran
Dyn@netvision.net.il	Israel
it.biochem@roche.com	Italy
bmkkbio@cet.co.jp	Japan
pharmakp@net2000ke.com	Kenya
Bmskorea@chollan.net	Korea
react@ncc.moc.kw	Kuwait
Raitis@invitros.lv	Latvia
Sakkijha@rdleb.com	Lebanon
Gintaras@eksma.lt	Lithuania
diagnostics@prophac.lu	Luxembourg
Vccl@vol.net.mt	Malta
Aiouche.echo@dounia.net.ma	Morocco
biocheminfo.nl@roche.com	Netherlands
biochem.nz@roche.com	New Zealand
bofungwu@linkserve.com.ng	Nigeria
biochem.se@roche.com	Norway
biochem.pt@roche.com	Portugal
Topdiag@fx.ro	Romania
roche.sg@roche.com	Singapore
roche.diagnostics@siol.net	Slovenia
south_africa.bioboffin@roche.com	South Africa
biochem.es@roche.com	Spain
biochem.se@roche.com	Sweden
BiochemInfo.CH@roche.com	Switzerland
Jean-Marie.kindbeiter@roche.com	Tunisia
bmuae@emirates.net.ae	United Arab Emirates
uk.biochem@roche.com	United Kingdom
biochemts.us@roche.com	USA
Mvalentiner@telcel.net.ve	Venezuela
dusica@eunet.yu	Yugoslavia
biochemts.row@roche.com	All other countries

<http://biochem.roche.com/pack-insert/1939696b.pdf>

Argentina 541 954 5555; **Australia** (02) 9899 7999; **Austria** (01) 277 87; **Belgium** (02) 247 4930; **Brazil** +55 (11) 3666 3565; **Bulgaria** +35929625408; **Cameroon** 237-370269; **Canada** (450) 086 7050; (800) 361 2070; **Chile** 00 56 (2) 22 33 737 (central) 00 56 (2) 22 32 099 (Exec); **China** 86 21 6427 5586; **Colombia** 0057-1-3412797; **Cyprus** +357-2-311362; **Czech Republic** (0324) 45 54, 58 71-2; **Denmark** +45 363 999 58; **Egypt** 20-2-3619047; **Estonia** 372-7-447600; **Ethiopia** 251-1-552799; **Finland** +358 9 525 333 66; **France** 04 76 76 30 87; **Germany** (0621) 759 8568; **Greece** 3 (01) 67 40 238; **Hong Kong** (852) 2485 7596; **India** +91-22-8379906; **Indonesia** 62 (021) 252 3820 ext. 755; **Iran** +98-21-8072374 / +98-21-8797027; **Israel** 972-6- 6380569; **Italy** 039 247 4109-4181; **Japan** 03 3432 3155; **Kenya** +254-2-750112; **Korea** 82-2-3471-6500; **Kuwait** +965-4837859; **Latvia** 371-787828309; **Lebanon** Fax: 00961-1-399667; **Lithuania** 370-2-729715; **Luxembourg** +352-496098; **Malta** Fax: +356-341087; **Morocco** Fax: +212-2-944040; **Malaysia** 60 (03) 755 5039; **Mexico** (5) 227 8967; **Netherlands** (036) 539 4911; **New Zealand** (09) 276 4157; **Nigeria** +234-1-521767; **Norway** (47) 23 373300; **Philippines** (632) 810 7246; **Poland** +48 (22) 22 66 84 305; **Portugal** (01) 4171717; **Republic of Ireland** 1 800 40 90 41; **Romania** +40-1-2123763; **Russia** (49) 621 759 8636 Fax: (49) 621 759 8611; **Saudia Arabia** +966-1-4010364; **Singapore** 0065 272 9200; **Slovenia** +386 61 1363528; **South Africa** (011) 886 2400; **South Korea** 02 569 6902; **Spain** (93) 201 4411; **Sweden** (08) 404 8800; **Switzerland** +41 (41) 799 6161; **Taiwan** (02) 736 7125; **Thailand** 66 (2) 274 07 08 (12 line); **Turkey** 0090 212 216 32 80; **United Arab Emirates** +971-4-694351; **United Kingdom** (0800) 521578; **USA** (800) 428 5433; **Venezuela** Fax: +0058-4810697; **Yugoslavia** +381 11 137163.



Roche Diagnostics GmbH
Roche Molecular Biochemicals
Sandhofer Strasse 116
D-68305 Mannheim
Germany