



A Sysmex Group Company



Instruções de Utilização  
REF: LPU 006-S/LPU 006

## Angelman (UBE3A/D15S10) Probe



APENAS PARA USO PROFISSIONAL

PORTUGUÊS

Mais informações disponíveis em [www.ogt.com](http://www.ogt.com)

A hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) é uma técnica que permite detetar sequências de ADN em cromossomas metafásicos ou em núcleos interfásicos de amostras citogenéticas fixadas. A técnica recorre a sondas de ADN que se hibridizam com cromossomas inteiros ou sequências únicas individuais e serve de forte adjuvante à citogenética clássica. Desenvolvimentos recentes fizeram com que esta valiosa técnica possa agora ser aplicada como uma ferramenta de diagnóstico essencial na análise cromossómica pré-natal, hematológica e patológica. O ADN alvo, após fixação e desnaturação, está disponível para emparelhamento com uma sonda de ADN marcada por fluorescência e desnaturada de forma semelhante, que tem uma sequência complementar. Após a hibridização, a sonda de ADN não ligada e não especificamente ligada é removida e o ADN é contracorado para efeitos de visualização. A microscopia de fluorescência permite então a visualização da sonda hibridizada no material alvo.

### Informações sobre a sonda

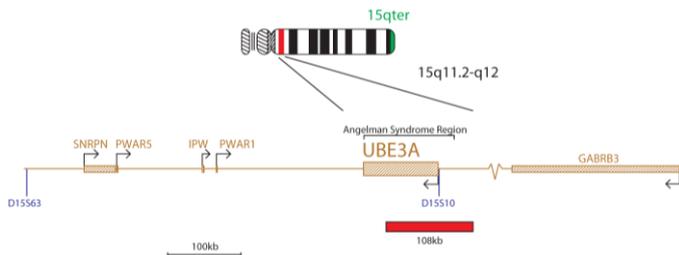
Em 70% dos pacientes com a síndrome de Angelman (AS), é observada uma grande deleção materna *de novo* de 3–4 Mb em 15q11.2-q13<sup>1,2,3</sup>. Os restantes 30% de casos têm causas subjacentes tais como a dissomia uniparental paterna da mesma região (~2%), defeitos de impressão (~2–3%) e mutações do gene UBE3A<sup>1</sup>.

O gene UBE3A encontra-se no interior da região crítica mínima do AS<sup>4</sup>, aproximadamente a 400 kb teloméricos ao gene SNRPN. Apresenta uma expressão preferencial do alelo materno no cérebro<sup>5</sup> e sofre mutações em 20–30% dos pacientes com AS com metilação normal e contribuição biparental de 15q11-13. É considerado um dos genes causadores do AS<sup>4,5</sup>.

A sonda da região de Angelman abrange aproximadamente 108 kb de ADN genómico, tem como alvo o gene UBE3A e inclui o locus D15S10. Esta sonda pode ser utilizada para identificar deleções da região de AS, embora não detete pequenas deleções intragénicas ou mutações do UBE3A. A sonda também pode ser utilizada para ajudar a determinar a natureza de uma deleção da síndrome de Prader-Willi detetada com a sonda SNRPN/Centro de impressão (consulte LPU005). Deleções grandes, de 3–4 Mb do 15q11-13 vão causar a deleção de ambas as regiões da sonda (SNRPN/IC e UBE3A/D15S10). Deleções mais pequenas que incorporem o IC e o SNRPN, não irão causar a eliminação da sonda UBE3A/D15S10. Estas supressões podem indicar um risco muito mais elevado de recorrência (possivelmente através de uma herança matrilinear) e os portadores e as suas famílias, podem exigir uma investigação mais aprofundada<sup>6</sup>.

### Especificação da sonda

UBE3A, 15q11.2-q12, Vermelho  
15qter, 15q26.3, Verde



A Angelman (UBE3A/D15S10) Probe tem um comprimento de 108 kb, é marcada de vermelho e abrange a maior parte do gene UBE3A e inclui o marcador D15S10. A sonda específica do subtelómero 15qter (clone 154P1), marcada de verde, permite a identificação do cromossoma 15 e atua como sonda de controlo.

### Materiais Fornecidos

Sonda: 50 µl por frasco (5 testes) ou 100 µl por frasco (10 testes)

Quantidade de sonda vermelha de UBE3A: 70–88 ng/teste  
Quantidade de sonda verde de 15qter: 72–90 ng/teste  
As sondas são fornecidas pré-misturadas em solução de hibridização (formamida; sulfato de dextrano; SSC) e estão prontas para uso.

**Contracorante:** 150 µl por frasco (15 testes)

O contracorante é o DAPI Antifade (ES: 0,125 µg/ml DAPI [4,6-diamidino-2-fenilindol]).

### Advertências e Precauções

1. Para utilização em diagnóstico *in vitro*. Apenas para uso profissional.
2. Use luvas quando manusear sondas de ADN e o contracorante DAPI.
3. As soluções de sonda contêm formamida, que é um teratógeno. Não inale vapores provenientes das mesmas nem permita o contacto com a pele. Use luvas, uma bata de laboratório e manuseie num exaustor de laboratório. Para a respetiva eliminação, lave com um grande volume de água.
4. O DAPI é um potencial agente cancerígeno. Manuseie com cuidado. Use luvas e uma bata de laboratório. Para a respetiva eliminação, lave com um grande volume de água.
5. Todos os materiais perigosos devem ser eliminados de acordo com as diretrizes da sua instituição relativamente à eliminação de resíduos perigosos.

### Conservação e Manuseamento

O kit deve ser conservado num congelador a uma temperatura entre -25 °C e -15 °C, até ao prazo de validade indicado no rótulo do kit. Os frascos de sonda e de contracorante têm de ser conservados num local escuro.

### Equipamento necessário, mas não fornecido

1. Placa quente (com uma placa sólida e controlo exato da temperatura até 80 °C).
2. Micropipetas e pontas de volume variável, entre 1 µl e 200 µl.
3. Banho-maria com controlo exato da temperatura de 72 °C.
4. Tubos de microcentrifugação (0,5 ml).
5. Microscópio de fluorescência (ver secção "Recomendação de Microscópio de Fluorescência").
6. Jarras de Coplin em plástico ou vidro.
7. Pinça.
8. Óleo de imersão de lentes para microscópio de fluorescência.
9. Centrifugadora de bancada.
10. Lâminas de microscópio.
11. Lamelas de 24 x 24 mm.
12. Temporizador.
13. Incubadora a 37 °C.
14. Cola de solução de borracha.

### Recomendação de Microscópio de Fluorescência

Para obter a melhor visualização possível da sonda, recomendamos uma lâmpada de mercúrio de 100 watts e lentes planas apocromáticas 63x ou 100x. O filtro passa-banda triplo DAPI/FITC/Texas Red é ideal para visualizar todas as substâncias fluorescentes e DAPI simultaneamente.

### Preparação das Amostras

O kit destina-se a ser utilizado em células de sangue periférico em culturas fixadas no fixador de Carnoy que deve ser preparado de acordo com as diretrizes do laboratório ou instituição. Prepare amostras secas ao ar em lâminas de microscópio, de acordo com os procedimentos citogenéticos padrão.

### Protocolo do FISH

(Nota: Certifique-se de que a exposição da sonda às luzes do laboratório está sempre limitada).

### Preparação das lâminas

1. Coloque uma gota de amostra celular numa lâmina de microscópio de vidro. Deixe secar.
2. Mergulhe a lâmina em SSC 2x durante 2 minutos à temperatura ambiente (TA) sem agitar.
3. Desidrate numa série de etanol (70%, 85% e 100%), cada uma durante 2 minutos à TA.
4. Deixe secar.

### Pré-desnaturação

5. Retire a sonda do congelador e deixe-a aquecer até à TA.
6. Certifique-se de que a solução da sonda é uniformemente misturada com uma pipeta.
7. Retire 10 µl de sonda por cada teste e transfira-os para um tubo de microcentrifugação. Reponha o restante volume da sonda no congelador.
8. Coloque a sonda e a lâmina da amostra numa placa quente a 37 °C (+/-1 °C) durante 5 minutos para pré-aquecimento.
9. Coloque 10 µl da solução de sonda na amostra de células e aplique uma lamela com cuidado. Vede com cola de solução de borracha e deixe a cola secar completamente.

### Desnaturação

10. Desnature a amostra e a sonda em simultâneo aquecendo a lâmina numa placa quente a 75 °C (+/-1 °C) durante 2 minutos.

### Hibridização

11. Coloque a lâmina num recipiente húmido resistente à luz a 37 °C (+/-1 °C) durante toda a noite.

### Lavagens pós-hibridização

12. Retire a lamela e todos os vestígios de cola com cuidado.
13. Mergulhe a lâmina em SSC 0,4x (pH 7,0) a 72 °C (+/-1 °C) durante 2 minutos sem agitar.
14. Drene a lâmina e mergulhe-a em SSC 2x e 0,05% de Tween-20 à TA (pH 7,0) durante 30 segundos sem agitar.
15. Drene a lâmina e aplique 10 µl de DAPI Antifade em cada amostra.

- Cubra a amostra com uma lamela, elimine eventuais bolhas e deixe a cor desenvolver-se no escuro durante 10 minutos.
- Visualize com um microscópio de fluorescência.

#### Estabilidade das lâminas acabadas

As lâminas de FISH permanecem analisáveis durante, no máximo, um mês, se conservadas no escuro a uma temperatura igual ou inferior à TA.

#### Recomendações para o Procedimento

- Não é recomendado o aquecimento ou envelhecimento das lâminas, uma vez que tal pode reduzir a fluorescência do sinal.
- As condições de hibridização podem ser negativamente afetadas pela utilização de reagentes que não sejam os fornecidos ou recomendados pela CytoCell Ltd.
- Recomenda-se vivamente a utilização de um termómetro calibrado para medir as temperaturas das soluções, banhos-maria e incubadoras, visto que estas temperaturas são críticas para o desempenho ideal do produto.
- As concentrações de lavagem, o pH e as temperaturas são importantes, visto que condições pouco rigorosas podem resultar numa ligação não específica da sonda e condições demasiado rigorosas podem resultar na ausência de sinal.
- Uma desnaturação incompleta pode resultar em ausência de sinal e uma desnaturação excessiva também pode resultar numa ligação não específica.

#### Resultados Esperados

Numa célula normal, esperam-se dois sinais vermelhos e dois sinais verdes (2R, 2G). Uma célula com uma deleção de UBE3A deve ter um sinal vermelho e dois controlos verdes (1R, 2G).

#### Limitações

A comunicação e interpretação dos resultados da FISH devem ser consistentes com as normas da prática profissional e devem tomar em consideração outras informações clínicas e de diagnóstico. Este kit destina-se a ser utilizado como adjuvante de outros testes de diagnóstico laboratoriais e não deve ser iniciada qualquer medida terapêutica apenas com base nos resultados da FISH. Este dispositivo destina-se a detetar perdas genómicas maiores do que a região abrangida pelo clone vermelho deste conjunto de sondas. Perdas genómicas fora desta região ou as perdas parciais desta região poderão não ser detetadas com este produto.

#### Informações Adicionais

Para obter mais informações sobre o produto, contacte o departamento de assistência técnica da CytoCell.

T: +44 (0)1223 294048

E: techsupport@cytozell.com

W: www.ogt.com

#### Bibliografia

- OMIM entry #105830 <http://www.omim.org/entry/105830>
- Butler MG, Am J Med Genet 1990;35:319-32
- Clayton-Smith J, Pembrey M, E J Med Genet 1992;29:412-5
- Sutcliffe JS *et al.*, Genome Res 1997;7:368-77
- Rougeulle C, Lalande M, Neurogenetics 1998;1:229-37
- Ming *et al.*, Am. J. Med. Genet. 92: 19-24, 2000

<b>REF</b>	<b>PT:</b> Número de catálogo
	<b>PT:</b> Dispositivo de diagnóstico <i>in vitro</i>
	<b>PT:</b> Código de lote
	<b>PT:</b> Consulte as Instruções de utilização
	<b>PT:</b> Fabricante
	<b>PT:</b> Prazo de validade
	<b>PT:</b> Limites de temperatura
	<b>PT:</b> Suficiente para <n> testes
	<b>PT:</b> Conteúdo

#### Patentes e Marcas Comerciais

CytoCell é uma marca registada da CytoCell Ltd.

Este produto contém tecnologia licenciada pela Life Technologies Corporation e está disponível apenas para uso em diagnósticos humanos ou para fins de investigação na área das ciências da vida.



#### 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@cytozell.com  
W: [www.ogt.com](http://www.ogt.com)