



Instruções de
Utilização REF: LPT
xxxR/G

Sondas específicas do subtelômero



APENAS PARA USO PROFISSIONAL PORTUGUÊS

Mais informações disponíveis em www.ogt.com

A hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) é uma técnica que permite detetar seqüências 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 seqüências 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 cromossômica 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 seqüência complementar. Após a hibridização, a sonda de ADN não ligada e não especificamente ligada é removida e o ADN é contracorante para efeitos de visualização. A microscopia de fluorescência permite então a visualização da sonda hibridizada no material alvo.

Informações sobre a sonda

Os rearranjos cromossômicos que envolvem as extremidades dos cromossomas revelaram-se uma importante causa de doenças genéticas, dada a natureza rica em genes das regiões adjacentes aos telómeros¹. A importância de tais rearranjos cromossômicos do subtelômero foi claramente demonstrada pela sua associação observada a atrasos cognitivos inexplicáveis e anomalias congénitas².

As sondas individuais específicas do subtelômero foram utilizadas para se concentrarem em regiões do subtelômero específicas e resultaram na delimitação de síndromes como o síndrome de deleção do cromossoma 1p36^{3,10} e o síndrome de deleção 22q13.3⁴. Estão também a ser descobertas aplicações para as sondas na investigação de perturbações autistas⁵, abortos recorrentes⁶ e patologias hematológicas⁷.

As sondas específicas do subtelômero da CytoCell estão localizadas na região mais distal do ADN específico do cromossoma em cada cromossoma. Para além deste material de seqüência única está a região de 100 a 300 kb de telômero associada à repetição seguida pelo limite de 3 a 20 kb da seqüência de repetição em tandem (TTAGGG)_n⁸.

As sondas foram escolhidas a partir da seqüência única mais distal para proporcionar a melhor especificidade possível, sendo também aplicáveis para a utilização de rotina no exame da enumeração e integridade do subtelômero.

O conjunto original de sondas de segunda geração é derivado de clones PAC⁹ e foi estabelecido em conjunto com o Instituto de Medicina Molecular, parte da Universidade de Oxford, no Reino Unido¹¹. As melhorias contínuas do produto levaram a algumas substituições com clones BAC (150 kb) ou cosmídeos alternativos (35–40 kb) para proporcionar uma melhor força de sinal ou especificidade cromossômica.

Especificação da sonda

A gama de sondas específicas do subtelômero identifica 41 dos 46 telómeros humanos, uma vez que exclui os telómeros do braço p dos cromossomas acrocêntricos. Os braços p dos cromossomas X e Y partilham o mesmo clone subtelômero (839D20) que os braços q dos cromossomas X e Y (C8.2/1 e 225F6) devido à natureza pseudoautosômica destas regiões. As sondas são diretamente marcadas com uma substância fluorescente vermelha ou verde. Para especificações da sonda detalhadas consulte a Tabela 1.

Tabela 1: Especificações da sonda

Sonda	Número de catálogo	Nome do clone	Marcador	Número de registo (se disponível)
1p	LPT 01PR/G	CEB108	RH120573	-
1q	LPT 01QR/G	160H23	GDB:315525	D1S3739
2p	LPT 02PR/G	dJ892G20	D2S2983	D2S2983
2q NP	LPT 02QNPR/G	172113	D2S447	D2S2986
3p	LPT 03PR/G	dJ1186B18	D3S4559	D3S4559
3q	LPT 03QR/G	196F4	D3S1272	D3S1272
4p	LPT 04PR/G	36P21	D4S3360	D4S3360
4q	LPT 04QR/G	963K6	D4S139	-
5p	LPT 05PR/G	189N21	RH120167	-

5q	LPT 05QR/G	240G13	D5S2907	D5S2907
6p	LPT 06PR/G	62111	STS-H99640	-
6q	LPT 06QR/G	57H24	D6S2522	D6S2522
7p	LPT 07PR/G	109a6	RH104000	RH104000
7q	LPT 07QR/G	2000a5	RH48601	RH48601
8p	LPT 08PR/G	dJ580L5	RH40619	D8S2333
8q	LPT 08QR/G	489D14	D8S595	D8S1925
9p	LPT 09PR/G	43N6	RH65569	RH65569
9q	LPT 09QR/G	112N13	D9S2168	D9S2168
10p	LPT 10PR/G	306F7	STS-N35887	D10S2488
10q	LPT 10QR/G	137E24	RH44494	RH44494
11p	LPT 11PR/G	dJ908H22	D11S2071	D11S2071
11q	LPT 11QR/G	dJ770G7	D11S4974	D11S4974
12p	LPT 12PR/G	496A11	D12S200	D12S200
12q	LPT 12QR/G	221K18	RH81094	D12S2343
13q	LPT 13QR/G	163C9	D13S1825	D13S1825
14q	LPT 14QR/G	dJ820M16	D14S1420	D14S1420
15q	LPT 15QR/G	154P1	D15S936	D15S936
16p	LPT 16PR/G	12114	SHGC-16929(UCSC)	D16S3400
16q	LPT 16QR/G	240G10	RH80305	RH80305
17p	LPT 17PR/G	202L17 2111b1	D17S2199	D17S2199
17q	LPT 17QR/G	362K4	362K4 For and Rev	D17S2200
18p	LPT 18PR/G	74G18	D18S552	D18S552
18q	LPT 18QR/G	dJ964M9	D18S1390	D18S1390
19p	LPT 19PR/G	dJ546C11	D19S676E	-
19q	LPT 19QR/G	F21283	RH102404	RH102404
20p	LPT 20PR/G	dJ1061L1	D20S210	D20S502
20q	LPT 20QR/G	81F12	RH10656	-
21q	LPT 21QR/G	63H24	D21S1446	D21S1575
22q	LPT 22QR/G	99K24 N85a3	D22S1726	D22S1726
XpYp **	LPT XYPR/G	839D20	DXYS129	DXYS129
XqYq ***	LPT XYQR/G	225F6 C8.2/1	DXYS154 SYBL1	Z43206 -

A letra R especifica uma marcação vermelha e a letra G uma marcação verde

**Esta sonda é específica para os braços p dos cromossomas X e Y.

***Esta sonda é específica para os braços q dos cromossomas X e Y.

Este kit contém apenas uma das sondas da gama de sondas específicas do subtelômero marcadas diretamente.

Materiais fornecidos

Sonda: 15 µl por frasco (5 testes)

Quantidade de sonda específica do subtelômero vermelho ou verde: mínimo de 40 ng/teste

A sonda é produzida numa forma concentrada. É marcada com uma substância fluorescente vermelha ou verde. A sonda é fornecida em solução de hibridização (formamida, sulfato de dextrano; SSC).

Solução de hibridização (formamida, sulfato de dextrano; SSC): 150 µl por frasco

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

- Para utilização em diagnóstico *in vitro*. Apenas para uso profissional.
- Use luvas quando manusear sondas de ADN e o contracorante DAPI.
- 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.
- 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.
- Todos os materiais perigosos devem ser eliminados de acordo com as diretrizes da sua instituição relativamente à eliminação de resíduos perigosos.
- Os utilizadores deste produto têm de ser capazes de distinguir visualmente entre as cores vermelha, azul e verde.

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

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

O microscópio de fluorescência deve ser verificado antes da sua utilização para garantir o seu correto funcionamento. O óleo de imersão deve ser adequado para utilização em microscopia de fluorescência e formulado para baixa autofluorescência. As recomendações do fabricante devem ser seguidas relativamente à vida útil da lâmpada e à duração dos filtros.

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 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. Centrifugue os tubos brevemente antes de os utilizar.
6. Certifique-se de que a solução da sonda é uniformemente misturada com uma pipeta.
7. Utilizando pontas de pipetas novas, remova (volume final de 10 µl de solução de sonda):
 - para uma **hibridização de sonda única**: 3 µl de sonda e 7 µl de solução de hibridização por teste
 - para uma hibridização de duas sondas: 3 µl de cada sonda e 4 µl de solução de hibridização por teste
 - para uma hibridização de três sondas: 3 µl de cada sonda e 1 µl de solução de hibridização por teste
 e transfira para um tubo de microcentrifugação. Coloque rapidamente 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.
16. Cubra a amostra com uma lamela, elimine eventuais bolhas e deixe a cor desenvolver-se no escuro durante 10 minutos.
17. 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

1. Não é recomendado o aquecimento ou envelhecimento das lâminas, uma vez que tal pode reduzir a fluorescência do sinal.
2. As condições de hibridização podem ser negativamente afetadas pela utilização de reagentes que não sejam os fornecidos ou recomendados pela Cytocell Ltd.
3. 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.
4. 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.
5. Uma desnaturação incompleta pode resultar em ausência de sinal e uma desnaturação excessiva também pode resultar numa ligação não específica.

Resultados esperados para uma hibridização de sonda única

Uma amostra normal irá apresentar um sinal na região telomérica de cada um dos homólogos cromossómicos relevantes ou 2 sinais em células interfásicas.

Sonda	Número de catálogo	Hibridizações cruzadas conhecidas
8p	LPT08PR/G	8p com 1p e 3q
9q	LPT09QR/G	9q com 10p, 16p, 18p e XqYq
11p	LPT11PR/G	11p com 17p
11q	LPT11QR/G	11q com 12q (intersticial)
12p	LPT12PR/G	12P com 6p e 20q

14q	LPT14QR/G	14q com centrómero 16
17q	LPT17QR/G	17q com 1p, 5q, 6q e 11p
19p	LPT19PR/G	19p com 20q
20q	LPT20QR/G	20q com 6p
22q	LPT22QR/G	22q com 2q (intersticial)

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. O não cumprimento do protocolo pode alterar o desempenho do ensaio e produzir resultados errados.

Informações Adicionais

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

T: +44 (0)1223 294048

E: techsupport@cytocell.com

W: www.oqt.com

Bibliografia Saccone S *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 1992;89:4913-7

1. Flint J *et al.*, Nat Genet 1997;15(3):252-7
2. Heilstedt HA *et al.*, Clin Genet 2003;64(4):310-6
3. Luciani JJ *et al.*, J Med Genet 2003;40(9):690-6
4. Wolff DJ *et al.*, Genet in Med 2002;4(1):10-4
5. Yakut S *et al.*, Clin Genet 2002;61(1):26-31
6. Tosi S *et al.*, Genes Chrom Cancer 1999;25(4):384-92
7. Moyzis RK *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 1988;85:6622-6
8. Knight SJL *et al.*, Am J Hum Genet 2000;67:320-32
9. Institute of Molecular Medicine and National Institute of Health Collaboration, Nat Genet 1997;14:86-9
10. Knight SJL *et al.*, Eur J Hum Genet 1997;5:1-6
11. Macina RA *et al.*, Hum Mol Genet 1994;3(10):1847-53
13. Fan YS *et al.*, Genet Med 2001;3(6):416-21
14. Knight SJ, Flint J, J Med Genet 2000;37(6):401-9

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

Patentes e Marcas Comerciais

CytoCell é uma marca registada da Cytocell Ltd.



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.oqt.com