



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