



Instrukcja użytkownika
REF: LPT xxxR/G

Subtelomere Specific Probes



WYŁĄCZNIE DO UŻYTKU PROFESJONALNEGO
POLSKI

Dalsze informacje dostępne pod adresem www.ogt.com

Fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (Fluorescence *In Situ* Hybridisation, FISH) to technika, która umożliwia wykrywanie sekwencji DNA na chromosomach metafazowych lub w jądrach interfazowych obecnych w utrwalonych próbkach cytogenetycznych. Technika ta obejmuje wykorzystanie sond DNA, które hybrydują do całych chromosomów lub pojedynczych unikalnych sekwencji, i stanowi istotne uzupełnienie klasycznych metod cytogenetycznych. Ostatnie odkrycia wskazują, że ta wartościowa technika może być obecnie wykorzystywana jako kluczowe narzędzie diagnostyczne w chromosomalnych analizach prenatalnych, hematologicznych i patologicznych. Docelowa sekwencja DNA, po utrwaleniu i denaturacji, staje się dostępna do przyłączenia do zdenaturowanej w podobny sposób, fluorescencyjnie wyznakowanej sondy DNA o sekwencji komplementarnej. Po hybrydyzacji niezwiązane i nieswoiste związane sondy DNA są usuwane, a DNA jest barwiony kontrastowo w celu jego uwidocznienia. Sondy zhybrydowane do materiału docelowego można obserwować pod mikroskopem fluorescencyjnym.

Informacje o sondzie

Rearanżacje chromosomowe obejmujące końce chromosomów stanowią istotną przyczynę chorób genetycznych — wynika to z faktu, że w regionach przylegających do telomerów znajduje się wiele genów¹. Znaczenie takich subtelomerycznych rearanżacji chromosomowych wyraźnie potwierdza zaobserwowany związek takich zmian z upośledzeniem umysłowym i wadami wrodzonymi o nieznanej etiologii².

W celu zbadania konkretnych regionów subtelomerycznych wykorzystano sondy swoiste względem poszczególnych subtelomerów. Doprowadziło to do wyodrębnienia zespołów związanych ze zmianami w obrębie chromosomów, takich jak zespół delecji 1p36^{3,10} i zespół delecji 22q13.3⁴. Sondy te znajdują również zastosowanie w badaniach zaburzeń ze spektrum autyzmu⁵, nawracających poronień⁶ i nowotworów złośliwych układu krwiotwórczego⁷.

Sondy swoiste względem subtelomerów firmy CytoCell są ukierunkowane na najbardziej dystalny region chromosomowego DNA specyficzny dla każdego chromosomu. Dystalnie w stosunku do tego materiału o unikalnej sekwencji znajduje się region o długości 100–300 kz składający się z powtórzeń powiązanych z telomerami, po którym występuje struktura cap o długości 3–20 kz obejmująca tandemowo powtórzoną sekwencję (TTAGGG)^{8,9}.

Sondy dobrano na podstawie położonej najbardziej dystalnie unikalnej sekwencji, aby zapewnić największą możliwą do osiągnięcia swoistość i jednocześnie umożliwić wykorzystywanie ich do rutynowych badań obejmujących zliczanie regionów subtelomerycznych i ocenę ich integralności.

Oryginalny zestaw sond drugiej generacji uzyskano przy użyciu klonów PAC⁹ we współpracy z Instytutem Medycyny Molekularnej będącym częścią Uniwersytetu Oksfordzkiego w Wielkiej Brytanii¹¹. W wyniku ciągłego udoskonalania produktu klony te zastąpiono alternatywnymi klonami kosmidów (35–40 kz) lub BAC (150 kz) w celu zwiększenia siły sygnału lub swoistości względem chromosomu.

Specyfikacja sondy

Gama sond swoistych względem subtelomerów umożliwia identyfikację 41 z 46 ludzkich telomerów, ponieważ nie obejmuje ona sond swoistych względem telomerów ramion p chromosomów akrocentrycznych. Ramiona p chromosomów X i Y współdzielą ten sam klon subtelomerów (839D20), podobnie jak ramiona q chromosomów X i Y (C8.2/1 i 225F6), ze względu na pseudoautosomalny charakter tych regionów. Sondy są bezpośrednio wyznakowane czerwonym lub zielonym fluoroforem. Tabela 1 zawiera szczegółową specyfikację sond.

Tabela 1: Specyfikacja sond

Sonda	Numer katalogowy	Nazwa klonu	Marker	Numer dostępu (o ile jest dostępny)
1p	LPT 01PR/G	CEB108	RH120573	-
1q	LPT 01QR/G	160H23	GDB:315525	D1S3739
2p	LPT 02PR/G	dJ892G20	D2S2983	D2S2983
2q NP	LPT 02QNP/R/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	121I4	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 i Rev	D17S2200
18p	LPT 18PR/G	74G18	D18S552	D18S552
18q	LPT 18QR/G	dJ964M9	D18S1390	D18S1390
19p	LPT 19PR/G	dJ546C11	D19S876E	-
19q	LPT 19QR/G	F21283	RH102404	RH102404
20p	LPT 20PR/G	dJ1081L1	D20S210	D20S502
20q	LPT 20QR/G	81F12	RH10856	-
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 -

„R” oznacza czerwony barwnik, a „G” zielony barwnik

**Ta sonda jest swoista względem ramion p chromosomów X i Y.

***Ta sonda jest swoista względem ramion q chromosomów X i Y.

Ten zestaw zawiera tylko jedną z sond z gamy bezpośrednio wyznakowanych sond swoistych względem subtelomerów.

Dostarczone materiały

Sonda: 15 µl na fiolkę (5 testów)

Ilość sondy swoistej względem subtelomeru wyznakowanej zielonym fluoroforem: co najmniej 40 ng/test

Sonda jest produkowana w postaci skoncentrowanej. Sonda jest bezpośrednio wyznakowana czerwonym lub zielonym fluoroforem. Sonda jest dostarczana w roztworze hybrydyzacyjnym (formamid; siarczan dekstranu; SSC).

Roztwór hybrydyzacyjny (formamid; siarczan dekstranu; SSC): 150 µl na fiolkę

Barwnik kontrastowy: 150 µl na fiolkę (15 testów)

Barwnikiem kontrastowym jest odczynnik DAPI antifade (ES: 0,125 µg/ml DAPI (4,6-diamidyno-2-fenylindol)).

Ostrzeżenia i środki ostrożności

- Do diagnostyki *in vitro*. Wyłącznie do użytku profesjonalnego.
- Podczas pracy z sondami DNA i barwnikiem kontrastowym DAPI należy nosić rękawiczki.
- Mieszanie sond zawierających formamid, który wykazuje działanie teratogenne; nie wdychać oparów i nie dopuszczać do kontaktu ze skórą. Nosić rękawiczki oraz fartuch laboratoryjny i pracować pod wyciągiem. Przy usuwaniu spłukać dużą ilością wody.
- DAPI jest potencjalnym czynnikiem rakotwórczym. Zachować ostrożność podczas pracy z tym produktem; nosić rękawiczki i fartuch laboratoryjny. Przy usuwaniu spłukać dużą ilością wody.
- Wszystkie materiały stwarzające zagrożenie należy wyrzucać zgodnie z wytycznymi placówki dotyczącymi usuwania odpadów stwarzających zagrożenie.
- Użytkownicy tego produktu muszą być w stanie rozróżnić czerwony, niebieski i zielony kolor.

Przechowywanie i postępowanie z produktem

Zestaw należy przechowywać w zamrażarce w temperaturze od -25°C do -15°C do daty ważności wskazanej na etykiecie zestawu. Fiolki z sondami i barwnikiem kontrastowym należy przechowywać w ciemności.

Sprzęt wymagany, ale niedostarczany

- Płyta grzewcza (ze stabilną płytą i możliwością dokładnej kontroli temperatury do 80°C).
- Mikropipety i końcówki umożliwiające przenoszenie różnych objętości cieczy w zakresie 1–200 µl.
- Łażnia wodna z możliwością dokładnej kontroli temperatury na poziomie 72°C.
- Probówki mikrowirówkowe (0,5 ml).
- Mikroskop fluorescencyjny (patrz część „Zalecenia dotyczące mikroskopu fluorescencyjnego”).
- Barwiacz Coplina z tworzywa sztucznego lub szklane.
- Szczypczyki.
- Olejek immersyjny odpowiedni do obiektywów mikroskopowych klasy fluorescencyjnej.
- Wirówka laboratoryjna.
- Szkiełka mikroskopowe.
- Szkiełka nakrywkowe o wymiarach 24x24 mm.
- Stoper.
- Inkubator nastawiony na temperaturę 37°C.
- Klej kauczukowy.

Zalecenia dotyczące mikroskopu fluorescencyjnego

W celu optymalnej wizualizacji sondy zalecane jest używanie 100-watowej lampy rtęciowej i obiektywu planapochromatycznego przy powiększeniu x63 lub x100. Do jednoczesnej obserwacji wszystkich fluoroforów i barwnika DAPI optymalnie nadaje się potrójny filtr pasmowo-przepustowy DAPI/FITC/Texas Red. Przed użyciem mikroskopu fluorescencyjnego należy sprawdzić, czy działa on prawidłowo. Należy stosować olejek immersyjny odpowiedni do mikroskopii fluorescencyjnej o składzie odpowiednim do niskiej autofluorescencji. Należy

przestrzegać zaleceń producenta dotyczących okresu żywotności lampy i wieku filtrów.

Przygotowanie próbek

Zestaw zaprojektowano do użytku na komórkach krwi obwodowej z hodowli utrwalonych w utrwalczu Carnoya. Komórki należy przygotować zgodnie z wytycznymi obowiązującymi w laboratorium lub placówce. Należy przygotować próbki suszone na powietrzu na szkiełkach mikroskopowych zgodnie ze standardowymi procedurami cytogenetycznymi.

Protokół FISH

(Uwaga: Należy możliwie ograniczyć ekspozycję sondy na światło w laboratorium).

Przygotowanie szkiełek

1. Wkropić próbkę komórek na szkiełko mikroskopowe. Pozostawić do wyschnięcia.
2. Zanurzyć szkiełko w 2x stężonym roztworze SSC na 2 minuty w temperaturze pokojowej; nie wstrząsać.
3. Odwodnić próbkę, korzystając z szeregu alkoholowego (etanol w stężeniu 70%, 85% i 100%); zanurzać szkiełko w każdym roztworze alkoholu na 2 minuty w temperaturze pokojowej.
4. Pozostawić do wyschnięcia.

Denaturacja wstępna

5. Wyjąć roztwór sond z zamrażarki i pozostawić go do ogrzania do temperatury pokojowej. Przed użyciem roztworu należy krótko odwirować probówkę.
6. Wymieszać roztwór sond pipetą w celu zapewnienia jego jednorodności.
7. Za pomocą świeżych końcówek do pipety pobrać (do objętości końcowej roztworu sond równej 10 µl):
 - w przypadku **hybrydyzacji z użyciem jednej sondy**: 3 µl sondy i 7 µl roztworu hybrydyzacyjnego na test
 - w przypadku hybrydyzacji z użyciem dwóch sond: 3 µl każdej sondy i 4 µl roztworu hybrydyzacyjnego na test
 - w przypadku hybrydyzacji z użyciem trzech sond: 3 µl każdej sondy i 1 µl roztworu hybrydyzacyjnego na testi przenieść całą objętość roztworu sond do probówki mikrowirówkowej. Bezwzględnie włożyć pozostały roztwór sond z powrotem do zamrażarki.
8. Umieścić roztwór sond i szkiełko z próbką na płycie grzewczej o temperaturze 37°C (+/-1°C) na 5 minut w celu ich wstępnego ogrzania.
9. Wkropić 10 µl mieszaniny sond na próbkę komórek i ostrożnie nanieść szkiełko nakrywkowe. Zakleić szkiełko klejem kauczukowym i poczekać na jego całkowite wyschnięcie.

Denaturacja

10. Denaturować jednocześnie próbkę i mieszaninę sond, ogrzewając szkiełko na płycie grzewczej o temperaturze 75°C (+/-1°C) przez 2 minuty.

Hybrydyzacja

11. Umieścić szkiełko w wilgotnym, światłoszczelnym pojemniku w temperaturze 37°C (+/-1°C) na noc.

Płukania po hybrydyzacji

12. Ostrożnie zdjąć szkiełko nakrywkowe i usunąć wszelkie pozostałości kleju.
13. Zanurzyć szkiełko w 0,4x stężonym roztworze SSC (pH 7,0) w temperaturze 72°C (+/-1°C) na 2 minuty; nie wstrząsać.
14. Pozwolić, aby szkiełko ociekło, a następnie zanurzyć je w 2x stężonym roztworze SSC ze środkiem Tween-20 w stężeniu 0,05% (pH 7,0) w temperaturze pokojowej na 30 sekund; nie wstrząsać.
15. Pozwolić, aby szkiełko ociekło, a następnie nanieść 10 µl barwnika DAPI antifade na każdą próbkę.
16. Przykryć szkiełkiem nakrywkowym, usunąć wszelkie pęcherzyki powietrza i pozostawić szkiełko w ciemności na 10 minut, aby umożliwić rozwój barw.
17. Obejrzeć pod mikroskopem fluorescencyjnym.

Stabilność wykonanych preparatów

Preparaty poddane procedurze FISH nadają się do analizy przez maksymalnie 1 miesiąc, o ile są przechowywane w ciemności w temperaturze pokojowej lub niższej.

Zalecenia dotyczące procedury

1. Nie jest zalecane wypiekanie ani postarzanie preparatów, ponieważ może to zmniejszyć fluorescencję sygnału.
2. Stosowanie odczynników innych niż dostarczone lub zalecane przez firmę CytoCell Ltd może mieć negatywny wpływ na warunki hybrydyzacji.
3. Na potrzeby pomiaru temperatury roztworów, łaźni wodnych i inkubatorów zdecydowanie zalecane jest korzystanie ze skalibrowanego termometru, ponieważ temperatury te są kluczowe dla optymalnego działania produktu.
4. Stężenia, wartości pH i temperatury roztworów wykorzystywanych do płukania są istotne, gdyż mało surowe warunki mogą doprowadzić do nieswoistego wiązania sondy, a zbyt surowe warunki mogą spowodować brak sygnału.
5. Niecałkowita denaturacja może spowodować brak sygnału, a nadmierna denaturacja może również doprowadzić do nieswoistego wiązania.

Wyniki oczekiwane w przypadku hybrydyzacji z użyciem jednej sondy

W prawidłowej próbce obserwowany będzie sygnał w regionie telomerycznym każdego z odpowiednich homologów chromosomów lub 2 sygnały w komórkach interfazowych.

Sonda	Numer katalogowy	Znane hybrydyzacje krzyżowe
8p	LPT08PR/G	8p z 1p i 3q
9q	LPT09QR/G	9q z 10p, 16p, 18p i XqYq
11p	LPT11PR/G	11p z 17p
11q	LPT11QR/G	11q z 12q (interstycjalnie)
12p	LPT12PR/G	12p z 6p i 20q
14q	LPT14QR/G	14q z centromerem 16
17q	LPT17QR/G	17q z 1p, 5q, 6q i 11p
19p	LPT19PR/G	19p z 20q
20q	LPT20QR/G	20q z 6p
22q	LPT22QR/G	22q z 2q (interstycjalnie)

Ograniczenia

Raportowanie i interpretacja wyników metody FISH powinny być zgodne z profesjonalnymi standardami praktyki i dokonywane z uwzględnieniem innych informacji klinicznych i diagnostycznych. Zestaw ten należy traktować jako uzupełnienie innych diagnostycznych testów laboratoryjnych. Z tego względu nie należy inicjować żadnych działań terapeutycznych wyłącznie na podstawie wyniku uzyskanego metodą FISH. Nieprzestrzeganie protokołu może wpłynąć na skuteczność oznaczenia i doprowadzić do uzyskania błędnych wyników.

Dodatkowe informacje

W celu uzyskania dodatkowych informacji na temat produktu należy skontaktować się z działem wsparcia technicznego firmy CytoCell.






Tel.: +44 (0)1223 294048

E-mail: techsupport@cytoCELL.com

Strona WWW: www.oqt.com

Piśmiennictwo

1. Saccone S *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 1992;89:4913-7
2. Flint J *et al.*, Nat Genet 1997;15(3):252-7
3. Heilstedt HA *et al.*, Clin Genet 2003;64(4):310-6
4. Luciani JJ *et al.*, J Med Genet 2003;40(9):690-6
5. Wolff DJ *et al.*, Genet in Med 2002;4(1):10-4
6. Yakut S *et al.*, Clin Genet 2002;61(1):26-31
7. Tosi S *et al.*, Genes Chrom Cancer 1999;25(4):384-92
8. Moyzis RK *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 1988;85:6622-6
9. Knight SJL *et al.*, Am J Hum Genet 2000;67:320-32
10. Institute of Molecular Medicine and National Institute of Health Collaboration, Nat Genet 1997;14:86-9
11. Knight SJL *et al.*, Eur J Hum Genet 1997;5:1-6
12. 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	PL: Numer katalogowy
IVD	PL: Wyrób medyczny do diagnostyki <i>in vitro</i>
LOT	PL: Kod partii
	PL: Zajrzyj do instrukcji używania
	PL: Wytwórca
	PL: Użyć do daty
	PL: Dopuszczalna temperatura
	PL: Zawartość wystarczająca do <n> testów
CONT	PL: Zawartość

Patenty i znaki towarowe

CytoCell jest zastrzeżonym znakiem towarowym firmy CytoCell Ltd.



CytoCell Ltd.

Oxford Gene Technology,
418 Cambridge Science
Park, Milton Road,
Cambridge, CB4 0PZ, UK
Tel.: +44(0)1223 294048
Faks.: +44(0)1223 294986
E: probes@cytoCELL.com
Strona WWW: www.oqt.com