



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 utwralonych 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 utwraleniu 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 zhybrydyzowane 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 kbp składający się z powtórzeń powiązanych z telomerami, po którym występuje struktura cap o długości 3–20 kbp 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 klonów te zastąpiono alternatywnymi klonami kosmidów (35–40 kbp) lub BAC (150 kbp) 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	1721T13	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	469D14	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
13p	LPT 13PR/G	163C9	D13S1825	D13S1825
14p	LPT 14PR/G	dJ820M16	D14S1420	D14S1420
15p	LPT 15PR/G	154P1	D15S936	D15S936
16p	LPT 16PR/G	121I4	SHGC-16929(UCSC)	D16S3400
16q	LPT 16QR/G	240G10	RH80305	RH80305
17p	LPT 17PR/G	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	dJ1061L1	D20S210	D20S502
20q	LPT 20QR/G	81F12	RH10856	-
21q	LPT 21QR/G	63H24	D21S1446	D21S1575
22q	LPT 22QR/G	99K24	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.
- Mieszaniny sond zawierają 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 rozróżniać 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.
- Łaźnia wodna z możliwością dokładnej kontroli temperatury na poziomie 72°C.
- Probówki mikrowirówkowe (0,5 ml).
- Mikroskop fluorescencyjny (patrz część „Zalecenia dotyczące mikroskopu fluorescencyjnego”).
- Barwiącze Coplin a tworzywa sztuczne lub szklane.
- Szczypczyki.
- Olejek imersyjny 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 imersyjny 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 utrwalaczu 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 ograniczać 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 próbki.
- 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 próbki 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

Glosariusz symboli

EN ISO 15223-1:2021 — „Wyroby medyczne — Symbole do stosowania wraz z informacjami dostarczonymi przez producenta — Część 1: Wymagania ogólne” (© International Organization for Standardization)		
Symbol	Tytuł	Numer referencyjny
	pl: Wytwórca	5.1.1
	pl: Autoryzowany przedstawiciel we Wspólnocie Europejskiej/Unii Europejskiej	5.1.2
	pl: Użyć do daty	5.1.4
	pl: Kod partii	5.1.5
	pl: Numer katalogowy	5.1.6
	pl: Trzymać z dala od światła słonecznego	5.3.2
	pl: Dopuszczalna temperatura	5.3.7
	pl: Zajrzyj do instrukcji używania	5.4.3
	pl: Zajrzyj do elektronicznej instrukcji używania	5.4.3
	pl: Ostrzeżenie	5.4.4
	pl: Wyrób medyczny do diagnostyki <i>in vitro</i>	5.5.1
	pl: Zawartość wystarczająca do <n> testów	5.5.5
	pl: Niepowtarzalny kod identyfikacyjny wyrobu	5.7.10
Symbole EDMA dla odczynników i składników IVD, wersja: październik 2009 r.		
Symbol	Tytuł	Numer referencyjny

CONT	pl: Zawartość (lub „zawiera”)	ND.
------	-------------------------------	-----

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.ogt.com