



A Sysmex Group Company



Instrukcja użytkownika
REF: LPU 006-S / LPU 006

Angelman (UBE3A/D15S10) Probe



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 następnie obserwować pod mikroskopem fluorescencyjnym.

Informacje o sondzie

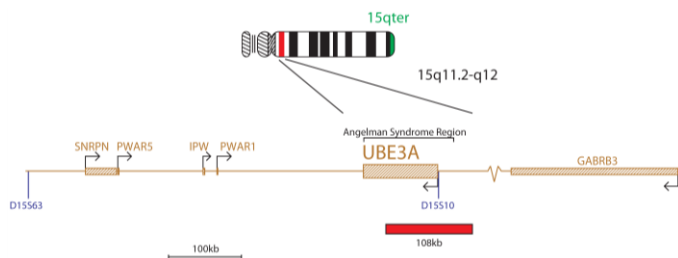
U 70% pacjentów z zespołem Angelmana (Angelman Syndrome, AS) obserwowana jest duża delecja *de novo* o długości 3–4 Mz w regionie 15q11.2-q13 matczyńskiego chromosomu^{1,2,3}. W pozostałych 30% przypadków przyczynami wystąpienia tego zespołu są uniparentalna disomia tego samego regionu ojcowskiego chromosomu (~2%), defekty imprintingu genowego (~2–3%) i mutacje genu UBE3A¹.

Gen UBE3A leży w obrębie minimalnego regionu krytycznego AS⁴, telomerycznie względem genu SNRPN w odległości około 400 kz. W przypadku tego genu obserwowana jest preferencyjna ekspresja matczynego allelu w mózgu⁵ i obecność mutacji u 20–30% pacjentów z zespołem AS z prawidłową metylacją i biparentalnym udziałem regionu 15q11-13. Jest on uznawany za jeden z genów przyczyniających się do wystąpienia zespołu AS^{4,5}.

Sonda komplementarna z regionem charakterystycznym dla zespołu Angelmana obejmuje sekwencję genomowego DNA o długości około 108 kz, jest komplementarna z większą częścią genu UBE3A i obejmuje locus D15S10. Sonda ta może być wykorzystywana do identyfikacji delekcji regionu charakterystycznego dla zespołu AS, chociaż nie umożliwia wykrycia małych wewnątrzgenowych delekcji ani mutacji genu UBE3A. Sonda może być również wykorzystywana pomocniczo do określania charakteru delekcji w zespole Pradera-Williego wykrytej za pomocą sondy SNRPN/imprinting Centre (patrz produkt o numerze LPU005). Duże delekcje o długości 3–4 Mz w regionie 15q11-13 prowadzą do usunięcia regionów obu sond (SNRPN/IC i UBE3A/D15S10). Mniejsze delekcje, obejmujące regiony sond IC i SNRPN, nie spowodują usunięcia sond UBE3A/D15S10. Delekcje te mogą wskazywać na znacznie większe ryzyko dziedziczenia choroby (prawdopodobnie poprzez przekazywanie delekcji wewnątrzom przez babcię), a nosiciele i ich rodziny mogą wymagać dalszych badań⁶.

Specyfikacja sondy

UBE3A, 15q11.2-q12, kolor czerwony
15qter, 15q26.3, kolor zielony



Sonda Angelman (UBE3A/D15S10) Probe ma długość 108 kz, jest wyznakowana czerwonym fluoroforem i obejmuje większą część genu UBE3A oraz marker D15S10. Sonda swoista względem subtelomeru 15qter (klon 154P1) jest wyznakowana zielonym fluoroforem, umożliwia identyfikację chromosomu 15. i pełni funkcję sondy kontrolnej.

Dostarczone materiały

Sonda: 50 µl na fiolkę (5 testów) lub 100 µl na fiolkę (10 testów)
Ilość sondy UBE3A Probe wyznakowanej czerwonym fluoroforem: 70-88 ng/test
Ilość sondy 15qter Probe wyznakowanej zielonym fluoroforem: 72-90 ng/test
Sondy są dostarczane we wstępnie wymieszanym roztworze hybrydyzacyjnym (formamid; siarczan dekstranu; SSC) i są gotowe do użycia.

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.
- Mieszanki 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.

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”).
- Barwiacze Coplina z tworzywa sztucznego lub szklane.
- Szczypczyki.
- Olejek imersyjny odpowiedni do obiektów 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.

Przygotowanie próbki

Zestaw zaprojektowano do użytku na komórkach krwi obwodowej z hodowli utrwalonych w utrwalaczku 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

- Wkropić próbkę komórek na szkiełko mikroskopowe. Pozostawić do wyschnięcia.
- Zanurzyć szkiełko w 2x stężonym roztworze SSC na 2 minuty w temperaturze pokojowej; nie wstrząsać.
- 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.
- Pozostawić do wyschnięcia.

Denaturacja wstępna

- Wyjąć roztwór sond z zamrażarki i pozostawić go do ogrzania do temperatury pokojowej.
- Wymieszać roztwór sond pipetą w celu zapewnienia jego jednorodności.
- Pobrać 10 µl roztworu sond na test i przenieść pobraną objętość do probówki mikrowirówkowej. Bezwzględnie włożyć pozostały roztwór sond z powrotem do zamrażarki.
- Umieścić roztwór sond i szkiełko z próbką na płycie grzewczej o temperaturze 37°C (+/-1°C) na 5 minut w celu ich wstępnego ogrzania.
- Wkropić 10 µl mieszaniny sond na próbkę komórek i ostrożnie nanieść szkiełko nakrywkowe. Zakleić szkiełko klejem kauczukowym i poczekać na jego całkowite wyschnięcie.

Denaturacja

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

Hybrydyzacja

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

Płukania po hybrydyzacji

- Ostrożnie zdjąć szkiełko nakrywkowe i usunąć wszelkie pozostałości kleju.
- Zanurzyć szkiełko w 0,4x stężonym roztworze SSC (pH 7,0) w temperaturze 72°C (+/-1°C) na 2 minuty; nie wstrząsać.
- 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.
- Pozwolić, aby szkiełko ociekło, a następnie nanieść 10 µl barwnika DAPI antifade na każdą próbkę.
- Przykryć szkiełkiem nakrywkowym, usunąć wszelkie pęcherzyki powietrza i pozostawić szkiełko w ciemności na 10 minut, aby umożliwić rozwój barw.
- 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

- Nie jest zalecane wypiekanie ani postarzanie preparatów, ponieważ może to zmniejszyć fluorescencję sygnału.
- Stosowanie odczynników innych niż dostarczone lub zalecane przez firmę CytoCell Ltd może mieć negatywny wpływ na warunki hybrydyzacji.
- 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.
- 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.
- Niecałkowita denaturacja może spowodować brak sygnału, a nadmierna denaturacja może również doprowadzić do nieswoistego wiązania.

Wyniki oczekiwane

W prawidłowej komórce powinny być widoczne dwa sygnały czerwone i dwa sygnały zielone (2C, 2Z). W komórce z delecją genu UBE3A powinny być widoczne jeden sygnał czerwony i dwa zielone sygnały kontrolne (1C, 2Z).

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. Ten wyrób jest przeznaczony do wykrywania ubytków genomowych większych niż region obejmowany przez czerwony klon zawarty w tym zestawie sond. Produkt ten może nie umożliwić wykrycia ubytków genomowych, do których doszło poza tym regionem, lub częściowych ubytków, do których doszło w tym regionie.

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.ogt.com

References/Bibliographie/Bibliographia/Literatur/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

	PL: Zawartość wystarczająca do <n> testów
	PL: Zawartość

REF	PL: Numer katalogowy
	PL: Wyrób medyczny do diagnostyki <i>in vitro</i>
	PL: Kod partii
	PL: Zajrzyj do instrukcji używania
	PL: Wytwórca
	PL: Użyć do daty
	PL: Dopuszczalna temperatura

	PL: Zawartość wystarczająca do <n> testów
	PL: Zawartość

Patenty i znaki towarowe

CytoCell jest zastrzeżonym znakiem towarowym firmy CytoCell Ltd. Ten produkt zawiera technologię na licencji firmy Life Technologies Corporation i jest dostępny do użytku wyłącznie na potrzeby diagnostyki człowieka lub badań z zakresu nauk przyrodniczych.



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.ogt.com