



A Sysmex Group Company



Instrukcja użytkownika
REF: LPE 0XYc / LPE 0XYq

Dual Labelled Satellite Probe Sets



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 zhybrydyzowane do materiału docelowego można obserwować pod mikroskopem fluorescencyjnym.

Informacje o sondzie

Sondy satelitarne firmy CytoCell wykazują swoistość względem ludzkich chromosomów. Są to wielokrotnie powtórzone sekwencje ludzkiego DNA znajdujące się w obrębie centromeru, w pobliżu centromeru lub w bloku heterochromatycznym każdego z 24 chromosomów. Sondy umożliwiają identyfikację i zliczanie chromosomów ludzkich w komórkach interfazowych lub chromosomów metafazowych w próbkach krwi obwodowej.

Specyfikacja sondy

XYc

DXZ1, Xp11.1-q11.1, kolor zielony

DYZ3, Yp11.1-q11.1, kolor czerwony

XYq

DXZ1, Xp11.1-q11.1, kolor zielony

DYZ1, Yq12, kolor czerwony

Sonda α -satelitarna dla chromosomu X (DXZ1) i sonda α -satelitarna dla chromosomu Y (DYZ3)

Ten zestaw sond do zliczania obejmuje swoiste względem chromosomów sekwencje powtórzone alfoidalnego DNA zlokalizowane w centromerach chromosomu X i chromosomu Y.

Sonda α -satelitarna dla chromosomu X (DXZ1) i sonda satelitarna typu III dla chromosomu Y (DYZ1)

Ten zestaw sond do zliczania obejmuje swoiste względem chromosomów sekwencje powtórzone DNA zlokalizowane w centromerze chromosomu X i bloku heterochromatycznym chromosomu Y.

Dostarczone materiały

Sonda: 100 μ l na fiolkę (10 testów)

XYc

Ilość sondy α -satelitarnej dla chromosomu X: 0,6ng/test

Ilość sondy α -satelitarnej dla chromosomu Y: 500ng/test

XYq

Ilość sondy α -satelitarnej dla chromosomu X: 0,6ng/test

Ilość sondy satelitarnej typu III dla chromosomu Y: 8,3ng/test

Sondy są dostarczane w roztworze hybrydyzacyjnym (formamid; siarczan dekstranu; SSC) i są gotowe do użycia. Sonda DNA jest bezpośrednio wyznakowana: sondy dla chromosomu X zielonym fluoroforem, a sondy dla chromosomu Y czerwonym fluoroforem.

Barwnik kontrastowy: 150 μ l na fiolkę (15 testów)

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

Ostrzeżenia i środki ostrożności

1. Do diagnostyki *in vitro*. Wyłącznie do użytku profesjonalnego.
2. Podczas pracy z sondami DNA i barwnikiem kontrastowym DAPI należy nosić rękawiczki.
3. 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.
4. DAPI jest potencjalnym czynnikiem rakotwórczym. Zachować ostrożność podczas pracy z tym produktem; nosić rękawiczki i fartuch laboratoryjny. Przy usuwaniu spłukać dużą ilością wody.
5. 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

1. Płyta grzewcza (ze stabilną płytą i możliwością dokładnej kontroli temperatury do 80°C).
2. Mikropipety i końcówki umożliwiające przenoszenie różnych objętości cieczy w zakresie 1–200 μ l.
3. Łaźnia wodna z możliwością dokładnej kontroli temperatury na poziomie 72°C.
4. Probówki mikrowirówkowe (0,5 ml).
5. Mikroskop fluorescencyjny (patrz część „Zalecenia dotyczące mikroskopu fluorescencyjnego”).
6. Barwiacze Coplina z tworzywa sztucznego lub szklane.
7. Szczypczyki.
8. Olejek imersyjny odpowiedni do obiektywów mikroskopowych klasy fluorescencyjnej.
9. Wirówka laboratoryjna.
10. Szkiełka mikroskopowe.
11. Szkiełka nakrywkowe o wymiarach 24x24 mm.
12. Stoper.
13. Inkubator nastawiony na temperaturę 37°C.
14. 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 próbek

Zestaw zaprojektowano do użytku na komórkach krwi obwodowej z hodowli lub komórkach szpiku kostnego 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.
6. Wymieszać roztwór sond pipetą w celu zapewnienia jego jednorodności.
7. Pobrać 10 μ l roztworu sond na test i przenieść pobraną objętość 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 μ l 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 1 godzinę.

Plukania 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 μ l 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.

*W przypadku obserwacji sygnału tła w kroku 13 można przepłukać szkiełka przy użyciu 0,25x stężonego roztworu SSC zamiast 0,4x stężonego roztworu SSC w celu zwiększenia surowości warunków płukania.

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 hybrydacji.
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

Sonda α -satelitarna dla chromosomu X (DXZ1) i sonda α -satelitarna dla chromosomu Y (DYZ3)

1. W próbce diploidalnej osoby płci żeńskiej w 98–100% analizowanych komórek powinien być widoczny zielony sygnał fluorescencyjny na poziomie centromeru każdego chromosomu X.
2. W próbce diploidalnej osoby płci męskiej w 98–100% analizowanych komórek powinien być widoczny zielony sygnał fluorescencyjny na poziomie centromeru chromosomu X oraz czerwony sygnał fluorescencyjny na poziomie centromeru chromosomu Y.
3. Sonda nie umożliwia wykrycia konstytucyjnych ani nabytych strukturalnych nieprawidłowości chromosomów płciowych.
4. Sonda umożliwia jedynie identyfikację stosunku komórek dawcy i biorcy w próbkach szpiku kostnego pochodzących od biorców przeszczepu szpiku kostnego płci przeciwnej. Nie umożliwia odróżnienia komórek nowotworu złośliwego od komórek prawidłowych.
5. Konstytucyjna aneuploidia chromosomów płci u pacjenta lub dawcy utrudnia zliczanie sygnałów i interpretację testu w przypadku stosowania sondy do monitorowania pacjentów po przeszczepie szpiku kostnego od osoby płci przeciwnej.

Sonda α -satelitarna dla chromosomu X (DXZ1) i sonda satelitarna typu III dla chromosomu Y (DYZ1)

1. W próbce diploidalnej osoby płci żeńskiej w 98–100% analizowanych komórek powinien być widoczny zielony sygnał fluorescencyjny na poziomie centromeru każdego chromosomu X.
2. W próbce diploidalnej osoby płci męskiej w 98–100% analizowanych komórek powinien być widoczny zielony sygnał fluorescencyjny na poziomie centromeru chromosomu X oraz czerwony sygnał fluorescencyjny w regionie heterochromatyny chromosomu Y.
3. Sonda nie umożliwia wykrycia konstytucyjnych ani nabytych strukturalnych nieprawidłowości chromosomów płciowych.
4. Sonda umożliwia jedynie identyfikację stosunku komórek dawcy i biorcy w próbkach szpiku kostnego pochodzących od biorców przeszczepu szpiku kostnego płci przeciwnej. Nie umożliwia odróżnienia komórek nowotworu złośliwego od komórek prawidłowych.
5. Konstytucyjna aneuploidia chromosomów płci u pacjenta lub dawcy utrudnia zliczanie sygnałów i interpretację testu w przypadku stosowania sondy do monitorowania pacjentów po przeszczepie szpiku kostnego od osoby płci przeciwnej.

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.





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@cytozell.com

Strona WWW: www.ogt.com

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@cytozell.com
Strona WWW: www.ogt.com