



A Sysmex Group Company



Instrukcja użytkownika
REF: LPU 024-S / LPU 024

Saethre-Chatzen/Williams-Beuren Probe Combination



WYŁĄCZNIE DO UŻYTKU PROFESJONALNEGO

POLSKI

Dalsze informacje dostępne pod adresem www.ogt.com

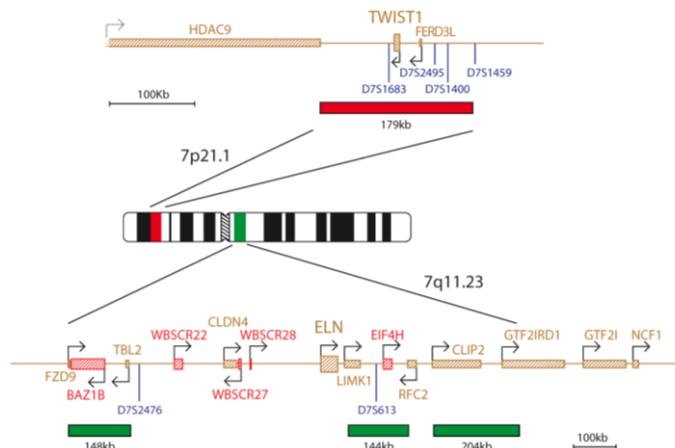
Fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (Fluorescence *In Situ* Hybridisation, FISH) to technika, która umożliwia wykrywanie sekwencji DNA na chromosomach metafazowych lub w jądrach interfazowych obecnych w utrwalonych próbkach cytogenetycznych. Technika ta obejmuje wykorzystanie sond DNA, które hybrydują 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 nieswoiście 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

Zespół Saethre-Chatzena to rzadki zespół wad wrodzonych dziedziczny autosomalnie dominująco charakteryzujący się wadami twarzoczaszki i kończyn¹. Szacowana częstość występowania tego zespołu wynosi 1 na 25 000–50 000 żywych urodzeń, choć ze względu na to, że cechy fenotypowe zwykle mają bardzo łagodny charakter, możliwe jest, że zespół ten jest niedostatecznie diagnozowany¹. Identyfikacja genu TWIST1 (gen kodujący czynnik transkrypcyjny o podstawowym motywie białkowym helisa-pętla-helisa zlokalizowany na prążku 7p21.1 chromosomu) jako genu odpowiadającego za występowanie tego zespołu^{2,3} okazała się nieoceniona w diagnostyce tego fenotypowo zmiennego zespołu wad¹. Zespół Williamsa-Beurena (Williams-Beuren Syndrome, WBS) to rzadki zespół zaburzeń neurorozwojowych spowodowany delecją (regionu o długości ok. 1,5–1,8 Mz zawierającego około 28 genów⁶) zachodzącą w obrębie prążka 7q11.23 chromosomu⁴. Szacowana częstość występowania tego zespołu wynosi 1 na 7500–20 000 żywych urodzeń^{5,6}. U pacjentów z tym zespołem obserwuje się charakterystyczny „elfi” wygląd twarzy, problemy z tkanką łączną, nadzastawkowe zwężenie aorty (Supravalvular Aortic Stenosis, SVAS), opóźnienie wzrostu, wady nerek, przejściową hiperkalcemię, zwiększoną ostrość słuchu i opóźnienie umysłowe⁷. Jako przyczynę SVAS zidentyfikowano haploinsuficjencję lub hemizygotyczność genu elastyny (ELN)^{8,9}, jednak żadna z innych cech klinicznych zespołu nie została jednoznacznie przypisana konkretnym genom znajdującym się w obrębie regionu, którego delecja wykrywana jest w zespole WBS. Ustalenie korelacji genotyp-fenotyp u pacjentów z zespołem WBS stwarza trudności, ponieważ wykazano, że delecja ma również wpływ na geny o prawidłowej liczbie kopii, które sąsiadują z miejscami złamań biorącymi udział w delecji¹⁰. Produkt Saethre-Chatzen/Williams-Beuren Probe Combination zawiera sondę wyznakowaną czerwonym fluoroforem, która obejmuje gen TWIST1 badany w celu wykrycia zespołu Saethre-Chatzena, oraz sondę wyznakowaną zielonym fluoroforem, która obejmuje obszar okalający gen ELN w regionie, który ulega delecji w zespole Williamsa-Beurena.

Specyfikacja sondy

TWIST1, 7p21.1, kolor czerwony
WBSCR, 7q11.23, kolor zielony



Sonda TWIST1 Probe ma długość 179 kZ, jest wyznakowana czerwonym fluoroforem i obejmuje region, który zawiera cały gen TWIST1 i flankujący DNA. Sonda swoista względem regionu ulegającego delecji w zespole Williamsa-Beurena jest wyznakowana zielonym fluoroforem i składa się z trzech niezachodzących na siebie klonów (148 kZ, 144 kZ i 204 kZ), które obejmują większość regionu ulegającego delecji.

Dostarczone materiały

Sonda: 50 µl na fiolkę (5 testów) lub 100 µl na fiolkę (10 testów)
Ilość sondy TWIST1 Probe wyznakowanej czerwonym fluoroforem: 48-60 ng/test
Ilość sondy WBSCR Probe wyznakowanej zielonym fluoroforem: 11-13 ng/test
Sondy są dostarczane we wstępnie wymieszanym roztworze hybrydacyjnym (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.
- 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 służyć dużą ilością wody.
- DAPI jest potencjalnym czynnikiem rakotwórczym. Zachować ostrożność podczas pracy z tym produktem; nosić rękawiczki i fartuch laboratoryjny. Przy usuwaniu służyć 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”).
- Barwiacz Coplina z tworzywa sztucznego lub szklane.
- Szczypczyki.
- Olejek imersyjny odpowiedni do obiektywów mikroskopowych klasy fluorescencyjnej.
- Wirówka laboratoryjna.
- Szkiełka mikroskopowe.
- Szkiełka nakrywkowa 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 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.
6. Wymieszać roztwór sond pipetą w celu zapewnienia jego jednorodności.
7. Pobrać 10 µl roztworu sond na test i przenieść pobraną objętość do próbki mikrowirówkowej. Bezzwłocznie 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 postarzenie 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 prawidłowej komórce powinny być widoczne dwa sygnały czerwone i dwa sygnały zielone (2C, 2Z). W komórce z delecją genu TWIST1 powinny być widoczne jeden sygnał czerwony i dwa sygnały zielone (1C, 2Z). W komórce z delecją genu WBSCR powinny być widoczne dwa sygnały czerwone i jeden sygnał zielony (2C, 1Z).

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 czerwone i zielone klony zawarte 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@cytozell.com

Strona WWW: www.ogt.com

Piśmiennictwo

1. Orphanet # ORPHA794: www.orpha.net
2. Howard TD *et al.*, Nat Genet 1997;15:36-41
3. El Ghouzzi V *et al.*, Nat Genet 1997;15:42-6
4. Francke U *et al.*, Hum Mol Genet 1999;8:1947-54
5. Stromme *et al.* J. Child. Neurol 2002;17:269-71
6. OMIM #194050. www.omim.org/194050
7. Pober BR and Dykens EM. Child Adolesc Psychiatr Clin North Am 1996;5:929-

8. Li DY *et al.*, Hum Mol Genet 1997;6:1021-8
9. Tassabehji M *et al.*, Hum Mol Genet 1997;6:1029-36
10. Merla *et al.* Am J Hum Genet 2006; 79:332-341

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@cytozell.com
W: www.ogt.com

