



A Sysmex Group Company



Instruções de Utilização

REF: LPE 008B / LPE 012B / LPE 017B

Sondas de enumeração satélite



APENAS PARA USO PROFISSIONAL

PORTUGUÊS

Mais informações disponíveis em www.ogt.com

A hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) é uma técnica que permite detetar sequências de ADN em cromossomas metafásicos ou em núcleos interfásicos de amostras citogenéticas fixadas. A técnica recorre a sondas de ADN que se hibridizam com cromossomas inteiros ou sequências únicas individuais e serve de forte adjuvante à citogenética clássica. Desenvolvimentos recentes fizeram com que esta valiosa técnica possa agora ser aplicada como uma ferramenta de diagnóstico essencial na análise cromossómica pré-natal, hematológica e patológica. O ADN alvo, após fixação e desnaturação, está disponível para emparelhamento com uma sonda de ADN marcada por fluorescência e desnaturada de forma semelhante, que tem uma sequência complementar. Após a hibridização, a sonda de ADN não ligada e não especificamente ligada é removida e o ADN é contracorado para efeitos de visualização. A microscopia de fluorescência permite então a visualização da sonda hibridizada no material alvo.

Informações sobre a sonda

As sondas satélite são específicas para cromossomas humanos. São sequências altamente repetidas de ADN humano encontradas no bloco centromérico, pericentromérico ou heterocromático de cada um dos 24 cromossomas. As sondas permitem a identificação e enumeração de cromossomas humanos em células em interfase ou cromossomas em metafase de amostras de sangue periférico.

Especificação da sonda

As sondas são produzidas numa forma concentrada para permitir a mistura, se necessário, de até três sondas na mesma hibridização, da gama de sondas satélite concentradas da CytoCell. É necessário um volume final de 10 µl de solução de sonda por hibridização.

As sondas são marcadas diretamente com uma substância fluorescente azul (espectro Aqua ou DEAC). Para especificações da sonda detalhadas consulte a Tabela 1.

Tabela 1: Especificações da sonda

Cromossoma	Número de catálogo*	Lócus	Região do cromossoma	Classe ADN
8	LPE 008B	D8Z2	8p11.1-q11.1	Satélite-α
12	LPE 012B	D12Z3	12p11.1-q11.1	Satélite-α
17	LPE 017B	D17Z1	17p11.1-q11.1	Satélite-α

*A letra B especifica uma marcação azul

O kit contém apenas uma das sondas da gama de sondas satélite alfa humanas marcadas diretamente a azul.

Materiais fornecidos

Sonda: 30 µl por frasco (10 testes)

Quantidade de sonda D8Z2 azul: 63,5–91,5 ng/teste

Quantidade de sonda D12Z3 azul: 19,2 ng/teste

Quantidade de sonda D17Z1 azul: 14,4 ng/teste

A sonda é produzida numa forma concentrada. É fornecida em solução de hibridização (formamida, sulfato de dextrano; SSC).

Solução de hibridização (formamida, sulfato de dextrano; SSC): 150 µl por frasco

Contracorante: 130 µl por frasco (15 testes)

O contracorante é o DAPI Antifade (ES: 0,125 µg/ml DAPI [4,6-diamidino-2-fenilindol]).

Advertências e Precauções

1. Para utilização em diagnóstico *in vitro*. Apenas para uso profissional.
2. Use luvas quando manusear sondas de ADN e o contracorante DAPI.
3. As soluções de sonda contêm formamida, que é um teratígeno. Não inale vapores provenientes das mesmas nem permita o contacto com a pele. Use luvas, uma bata de laboratório e manuseie num exaustor de laboratório. Para a respetiva eliminação, lave com um grande volume de água.
4. O DAPI é um potencial agente cancerígeno. Manuseie com cuidado. Use luvas e uma bata de laboratório. Para a respetiva eliminação, lave com um grande volume de água.
5. Elimine todos os materiais perigosos de acordo com as diretrizes da sua instituição para a eliminação de resíduos perigosos.
6. Os operadores têm de ser capazes de distinguir visualmente entre as cores vermelha, azul e verde.

Conservação e Manuseamento

O kit deve ser conservado num congelador a uma temperatura entre -25 °C e -15 °C, até ao prazo de validade indicado no rótulo do kit. Conserve os frascos da sonda e do contracorante num local escuro. Certifique-se de que a exposição da sonda e do contracorante às luzes do laboratório está sempre limitada.

Equipamento necessário, mas não fornecido

1. Placa quente (com uma placa sólida e controlo exato da temperatura até 80 °C).
2. Micropipetas e pontas de volume variável, entre 1 µl e 200 µl.
3. Banho-maria com controlo exato da temperatura de 72 °C.
4. Tubos de microcentrifugação (0,5 ml).
5. Microscópio de fluorescência (ver secção "Recomendação de Microscópio de Fluorescência").
6. Jarras de Coplin em plástico ou vidro.
7. Pinça.
8. Óleo de imersão de lentes para microscópio de fluorescência.
9. Centrifugadora de bancada.
10. Lâminas de microscópio.
11. Lamelas de 24 x 24 mm.
12. Temporizador.
13. Incubadora a 37 °C.
14. Cola de solução de borracha.

Recomendação de Microscópio de Fluorescência

Para obter a melhor visualização possível da sonda, recomendamos uma lâmpada de mercúrio de 100 Watts e lentes planas apocromáticas 63x ou 100x. A substância fluorescente azul tem especificidade para o espectro Aqua e DEAC (é necessário um filtro passa-banda simples Aqua ou DEAC). Verifique o microscópio de fluorescência antes de o utilizar para garantir que está a funcionar corretamente. Utilize um óleo de imersão que seja adequado à microscopia de fluorescência e formulado para baixa autofluorescência. Siga as recomendações do fabricante relativamente à vida útil da lâmpada e à duração dos filtros.

Preparação das Amostras

O kit destina-se a ser utilizado em células de sangue periférico em culturas fixadas no fixador de Carnoy que deve ser preparado de acordo com as diretrizes do laboratório ou instituição. Prepare amostras secas ao ar em lâminas de microscópio, de acordo com os procedimentos citogenéticos padrão.

Protocolo FISH

(Nota: Certifique-se de que a exposição da sonda e do contracorante às luzes do laboratório está sempre limitada).

Preparação das lâminas

1. Coloque uma gota de amostra celular numa lâmina de microscópio de vidro. Deixe secar.
2. Mergulhe a lâmina em SSC 2x durante 2 minutos à temperatura ambiente (TA) sem agitar.
3. Desidrate numa série de etanol (70%, 85% e 100%), cada uma durante 2 minutos à TA.
4. Deixe secar.

Pré-desnaturação

5. Retire a sonda do congelador e deixe-a aquecer até à TA. Centrifugue os tubos brevemente antes de os utilizar.
6. Certifique-se de que a solução da sonda é uniformemente misturada com uma pipeta.
7. Utilizando pontas de pipetas novas, remova (volume final de 10 µl de solução de sonda):
 - para uma **hibridização de sonda única**: 3 µl de sonda e 7 µl de solução de hibridização por teste
 - para uma **hibridização de duas sondas**: 3 µl de cada sonda e 4 µl de solução de hibridização por teste
 - para uma **hibridização de três sondas**: 3 µl de cada sonda e 1 µl de solução de hibridização por teste
 e transfira para um tubo de microcentrifugação. Agite gentilmente no vórtex para misturar e centrifugue de forma intermitente na microcentrifugadora. Coloque rapidamente o restante volume da sonda no congelador.
8. Coloque a sonda e a lâmina da amostra numa placa quente a 37 °C (+/- 1 °C) durante 5 minutos para pré-aquecimento.
9. Coloque 10 µl da solução de sonda na amostra de células e aplique uma lamela com cuidado. Vede com cola de solução de borracha e deixe a cola secar completamente.

Desnaturação

- Desnatura a amostra e a sonda em simultâneo aquecendo a lâmina numa placa quente a 75 °C (+/-1 °C) durante 2 minutos.

Hibridização

- Coloque a lâmina num recipiente húmido resistente à luz a 37 °C (+/-1 °C) entre uma hora e toda a noite.

Lavagens pós-hibridização

- Retire a lamela e todos os vestígios de cola com cuidado.
- Mergulhe a lâmina em SSC 0,25x (pH 7,0) a 72 °C (+/-1 °C) durante 2 minutos sem agitar*.
- Drene a lâmina e mergulhe-a em SSC 2x e 0,05% de Tween-20 à TA (pH 7,0) durante 30 segundos sem agitar.
- Drene a lâmina e aplique 10 µl de DAPI Antifade em cada amostra.
- Cubra a amostra com uma lamela, elimine eventuais bolhas e deixe a cor desenvolver-se no escuro durante 10 minutos.
- Visualize com um microscópio de fluorescência.

* Se o sinal final é fraco, repita a FISH, utilizando SSC 0,4x em lavagem pós-hibridização.

Estabilidade das lâminas acabadas

As lâminas de FISH permanecem analisáveis durante, no máximo, um mês, se conservadas no escuro a uma temperatura igual ou inferior à TA.

Recomendações para o Procedimento

- O envelhecimento e aquecimento das lâminas pode reduzir a fluorescência do sinal.
- As condições de hibridização podem ser negativamente afetadas pela utilização de reagentes que não sejam os fornecidos ou recomendados pela CytoCell Ltd.
- Utilize um termómetro calibrado para medir as temperaturas das soluções, aparelhos de banho-maria e incubadoras, visto que essas temperaturas são críticas para o ótimo desempenho do produto.
- As concentrações de lavagem, o pH e as temperaturas são importantes, visto que condições pouco rigorosas podem resultar numa ligação não específica da sonda e condições demasiado rigorosas podem resultar na ausência de sinal.
- Uma desnaturação incompleta pode resultar em ausência de sinal e uma desnaturação excessiva também pode resultar numa ligação não específica.
- Uma hibridização excessiva pode resultar em sinais adicionais ou inesperados.
- Os utilizadores devem otimizar o protocolo para as suas próprias amostras antes de utilizarem o teste para efeitos de diagnóstico.

Resultados esperados para uma hibridização de sonda única

Irão existir diferenças no tamanho relativo dos sinais observados entre cromossomas devido à diferença no número de cópia das sequências repetidas entre cromossomas. Uma amostra diploide deve apresentar um sinal fluorescente no centrómero de ambos os cromossomas correspondentes em 70–90% das células analisadas.

Reatividade Cruzada Conhecida

A sonda LPE017B pode apresentar uma hibridização cruzada leve na região centromérica dos cromossomas 11 e X.

A sonda LPE012B pode apresentar uma hibridização cruzada leve na região centromérica dos cromossomas 3, 6, 7 e 10.

Limitações

A comunicação e interpretação dos resultados da FISH devem ser consistentes com as normas da prática profissional e devem tomar em consideração outras informações clínicas e de diagnóstico. Este kit destina-se a ser utilizado como adjuvante de outros testes de diagnóstico laboratoriais e não deve ser iniciada qualquer medida terapêutica apenas com base nos resultados da FISH.

O não cumprimento do protocolo pode afetar o desempenho do produto e os resultados.

Informações Adicionais

Para obter mais informações sobre o produto, contacte o departamento de assistência técnica da CytoCell.

T: +44 (0)1223 294048

E: techsupport@cytoCELL.com

W: www.ogt.com

REF	PT: Número de catálogo
	PT: Dispositivo de diagnóstico <i>in vitro</i>
	PT: Código de lote
	PT: Consulte as Instruções de utilização
	PT: Fabricante
	PT: Prazo de validade
	PT: Limites de temperatura
	PT: Suficiente para testes
	PT: Conteúdo

Patentes e Marcas Comerciais

CytoCell é uma marca registada da CytoCell Ltd.



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