



A Sysmex Group Company



Instruções de Utilização
REF: LPU 024-S/LPU 024

Saethre-Chotzen/Williams-Beuren Probe Combination



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.

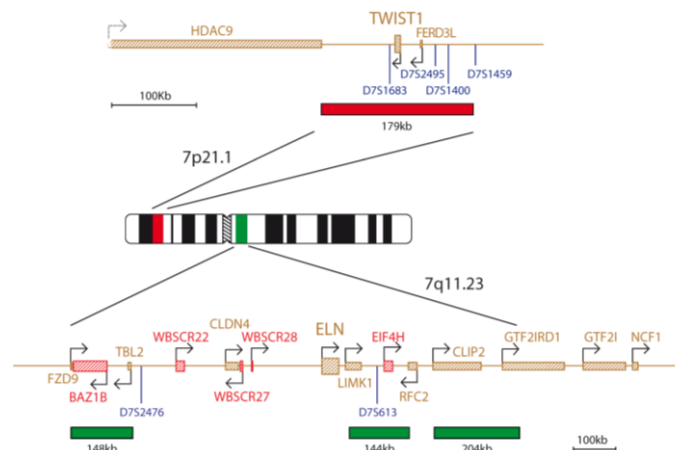
Informações sobre a sonda

A síndrome Saethre-Chotzen é uma doença rara, congénita, autossómica dominante, caracterizada por anomalias craniofaciais e dos membros¹. A incidência desta síndrome é estimada em 1 em 25 000–50 000 nascidos vivos, embora devido ao fenótipo ser frequentemente muito suave, é possível que a síndrome esteja a ser pouco diagnosticada¹. A identificação de TWIST1 (um fator de transcrição em hélice-loop-hélice básico na banda do cromossoma 7p21.1) como um gene causador^{2,3} provou ser fundamental para o diagnóstico deste distúrbio fenotípico variável¹.

A síndrome de Williams-Beuren (WBS) é um raro distúrbio do desenvolvimento neurológico causado por uma deleção (de aprox. 1,5–1,8 Mb de tamanho e que contém cerca de 28 genes⁵) na banda do cromossoma 7q11.23⁴. A incidência estimada desta síndrome é de 1 em 7500 a 20 000 nascidos vivos^{5,6}. Os pacientes apresentam uma aparência facial tipo "elfo" distintiva, problemas no tecido conjuntivo, estenose aórtica supravalvar (SVAS), atraso no crescimento, anomalias renais, hipercalcemia transitória, hiperacusia e atraso mental⁷. A haploinsuficiência ou hemizigiosidade do gene da elastina (ELN) foi identificada como sendo responsável pelo SVAS^{8,9}, porém nenhuma das outras características clínicas da síndrome foi inequivocamente atribuída a genes específicos no interior da região deletada do WBS. Estas correlações genótipo-fenótipo são mais complexas nos pacientes com WBS, uma vez que se demonstrou que a deleção também tem um efeito nos genes normais do número de cópias que avizinham os pontos de quebra de deleção¹⁰.

A combinação Saethre-Chotzen/Williams-Beuren contém uma sonda vermelha que cobre o gene TWIST1 para a síndrome de Saethre-Chotzen e uma sonda verde que cobre a área em redor do gene ELN na região deletada da síndrome de Williams-Beuren.

Especificação da sonda
TWIST1, 7p21.1, Vermelho
WBSCR, 7q11.23, Verde



A TWIST1 Probe tem de comprimento 179 kb, é marcada a vermelho e abrange uma região que inclui a totalidade do gene TWIST1 e o ADN do flanco. A sonda da região de Williams-Beuren, marcada a verde, é constituída por três clones não sobrepostos (148 kb, 144 kb e 204 kb), que abrange grande parte da região de deleção.

Materiais Fornecidos

Sonda: 50 µl por frasco (5 testes) ou 100 µl por frasco (10 testes)

Quantidade de sonda vermelha de TWIST1: 48–60 ng/teste

Quantidade de sonda verde de WBSCR: 11–13 ng/teste

As sondas são fornecidas pré-misturadas em solução de hibridização (formamida; sulfato de dextrano; SSC) e estão prontas para uso.

Contracorante: 150 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 teratógeno. 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. Todos os materiais perigosos devem ser eliminados de acordo com as diretrizes da sua instituição relativamente à eliminação de resíduos perigosos.

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. Os frascos de sonda e de contracorante têm de ser conservados num local escuro.

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. O filtro passa-banda triplo DAPI/FITC/Texas Red é ideal para visualizar todas as substâncias fluorescentes e DAPI simultaneamente.

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 do FISH

(Nota: Certifique-se de que a exposição da sonda 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.
6. Certifique-se de que a solução da sonda é uniformemente misturada com uma pipeta.
7. Retire 10 µl de sonda por cada teste e transfira-os para um tubo de microcentrifugação. Reponha 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

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

Hibridização

11. Coloque a lâmina num recipiente húmido resistente à luz a 37 °C (+/- 1 °C) durante toda a noite.

Lavagens pós-hibridização

12. Retire a lamela e todos os vestígios de cola com cuidado.
13. Mergulhe a lâmina em SSC 0,4x (pH 7,0) a 72 °C (+/- 1 °C) durante 2 minutos sem agitar.
14. 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.
15. Drene a lâmina e aplique 10 µl de DAPI Antifade em cada amostra.
16. Cubra a amostra com uma lamela, elimine eventuais bolhas e deixe a cor desenvolver-se no escuro durante 10 minutos.
17. Visualize com um microscópio de fluorescência.

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

1. Não é recomendado o aquecimento ou envelhecimento das lâminas, uma vez que tal pode reduzir a fluorescência do sinal.
2. As condições de hibridização podem ser negativamente afetadas pela utilização de reagentes que não sejam os fornecidos ou recomendados pela CytoCell Ltd.
3. Recomenda-se vivamente a utilização de um termómetro calibrado para medir as temperaturas das soluções, banhos-maria e incubadoras, visto que estas temperaturas são críticas para o desempenho ideal do produto.
4. 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.
5. Uma desnaturação incompleta pode resultar em ausência de sinal e uma desnaturação excessiva também pode resultar numa ligação não específica.

Resultados Esperados

Numa célula normal, esperam-se dois sinais vermelhos e dois sinais verdes (2R, 2G). Uma célula com uma deleção de TWIST1 deve ter um sinal vermelho e dois verdes (1R, 2G). Uma célula com uma deleção de WBSCR deve ter dois sinais vermelhos e um verde (2R, 1G). Este dispositivo destina-se a detetar perdas genómicas maiores do que a região abrangida pelos clones vermelho e verde deste conjunto de sondas. Perdas genómicas fora desta região ou as perdas parciais desta região poderão não ser detetadas com este produto.

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.





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

Bibliografia

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;5:929-43
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	PT: Número de catálogo
IVD	PT: Dispositivo de diagnóstico <i>in vitro</i>
LOT	PT: Código de lote
	PT: Consulte as Instruções de utilização
	PT: Fabricante
	PT: Prazo de validade
	PT: Limites de temperatura
	PT: Suficiente para <n> testes
CONT	PT: Conteúdo

Patentes e Marcas Comerciais

CytoCell é uma marca registada da CytoCell Ltd. Este produto contém tecnologia licenciada pela Life Technologies Corporation e está disponível apenas para uso em diagnósticos humanos ou para fins de investigação na área das ciências da vida.

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

