



A Sysmex Group Company



Instruções de Utilização  
REF: LPU 005-S/LPU 005

## Prader-Willi/Angelman (SNRPN) Probe



APENAS PARA USO PROFISSIONAL

PORTUGUÊS

Mais informações disponíveis em [www.ogt.com](http://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.

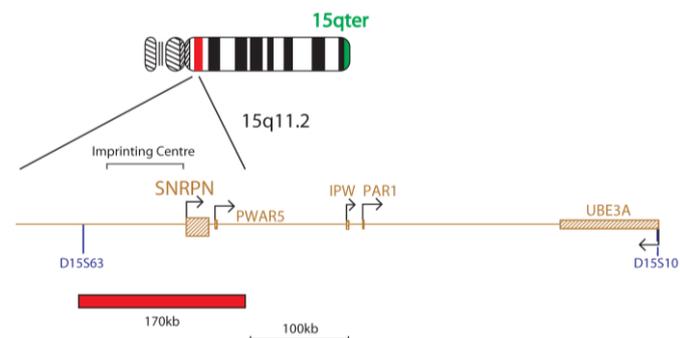
### Informações sobre a sonda

A síndrome de Prader-Willi (PWS) e a síndrome de Angelman (AS) são distúrbios neurogenéticos distintos causados respetivamente pela perda de funções de genes no cromossoma 15 (bandas 15q11-13), no cromossoma herdado paternalmente ou maternalmente<sup>1</sup>. Em 70% dos pacientes é observada uma grande deleção intersticial de 3–4 Mb<sup>1,2</sup>. Em cerca de 3% dos pacientes é observado um defeito de impressão, causado por uma epimutação ou uma microdeleção do Centro de impressão (IC, Imprinting centre)<sup>1,3</sup>. A dissomia uniparental, na qual ambos os cromossomas 15 são herdados do mesmo progenitor, é responsável pela maioria dos restantes pacientes com PWS/AS<sup>1</sup>.

O gene SNRPN é um dos quatro loci impressos que são expressos a partir da região do cromossoma 15 paterno (15q11-13) e mapeia até à região minimamente deletada (MDR) envolvida no PWS<sup>5</sup>. A sua localização no cromossoma e o estado de impressão sugerem que desempenha um possível papel na etiologia do PWS<sup>4</sup>.

O centro de impressão (IC) mapeia até 100 kb de uma região próxima ao SNRPN. As deleções ou mutações parentais no IC prejudicam o processo de impressão em 15q11-13 e causam uma de duas doenças distintas nos seus descendentes<sup>5,6</sup>. A maior parte das deleções nas impressões de PWS envolvem SNRPN e têm aproximadamente 200 kb de tamanho. As eliminações de impressões AS são pequenas (aproximadamente 40 kb), envolvem a região BD3 e não incluem SNRPN.

**Especificação da sonda**  
SNRPN, 15q11.2, Vermelho  
15qter, 15q26.3, Verde



A Prader-Willi/Angelman (SNRPN) Probe tem de comprimento 170 kb, é marcada a vermelho e abrange a totalidade do gene SNRPN, bem como todo o centro de impressão. A sonda específica do subtelómero 15qter (clone 154P1), marcada a verde, permite a identificação do cromossoma 15 e atua como sonda de controlo.

### Materiais Fornecidos

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

Quantidade de sonda vermelha de SNRPN: 22–27 ng/teste

Quantidade de sonda verde de 15qter: 27–34 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 teratogénico. 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 tripla 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. Desnature 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 SNRPN deve ter um sinal vermelho e dois controlos verdes (1R, 2G).

### 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. Este dispositivo destina-se a detetar perdas genómicas maiores do que a região abrangida pelo clone vermelho deste conjunto de sondas. Perdas genómicas fora desta região ou as perdas parciais desta região poderão não ser detetadas com este produto.

### 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. Butler MG. *Curr Genomics*. 2011 May; 12(3): 204–215
2. Clayton-Smith J and Pembrey M. *J Med Genet* 1992;29:412-5
3. Buiting K *et al.*, *Am J Hum Genet* 1998;63(1):170-80
4. Glenn C *et al.*, *Am J Hum Genet* 1996;58:335-46
5. Buiting K *et al.*, *Nat Genet* 1995;9:395-400
6. Dittrich B *et al.*, *Nat Genet* 1996;14:163-70

	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 <n> testes
	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