



A Sysmex Group Company



Instrukcja użytkownika
REF: LPU 019-S / LPU 019

Smith-Magenis (RAI1)/Miller-Dieker Probe Combination



WYŁĄCZNIE DO UŻYTKU PROFESJONALNEGO

POLSKI

Dalsze informacje dostępne pod adresem www.ogt.com

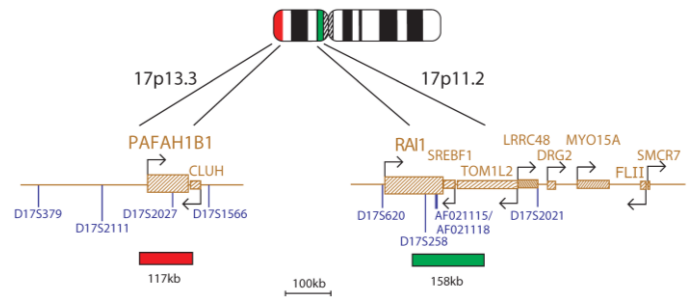
Fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (Fluorescence *In Situ* Hybridisation, FISH) to technika, która umożliwia wykrywanie sekwencji DNA na chromosomach metafazowych lub w jądrach interfazowych obecnych w utrwalonych próbkach cytogenetycznych. Technika ta obejmuje wykorzystanie sond DNA, które hybrydują 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 Smith-Magenis (Smith-Magenis Syndrome, SMS) to zespół mnogich wad wrodzonych charakteryzujący się opóźnieniem umysłowym, zaburzeniami neurobehawioralnymi, zaburzeniami snu, niskorosłością, drobnymi cechami dysmorficznymi twarzy, twarzoczaszki i szkieletu, wrodzonymi wadami serca i wadami nerek^{1,2}. Jest to jeden z najczęściej wykrywanych u ludzi zespołów mikrodelekcji. Zespół ten powiązany z interstycjalną delecją prążka 17p11.2 chromosomu². Wyniki badań molekularnych przeprowadzonych na próbkach pochodzących od pacjentów z SMS sugerują, że minimalny region objęty delecją (Minimally Deleted Region, MDR) rozciąga się na długość około 700 kb^{3,5}, chociaż najczęściej długość regionu objętego delecją wynosi około 4 Mb⁴. Proksymalna granica regionu MDR jest zlokalizowana w obrębie regionu nakładania się genów FLII i LLGL1, a dystalna granica — w obrębie genu PEMT³. Z zespołem tym powiązane delecje i mutacje genu RAI1 (Retinoic Acid Induced 1), który leży w obrębie regionu MDR^{3,5,6,7}. Wykazano, że gen RAI1 jest głównym genem odpowiedzialnym za większość cech zespołu SMS^{8,9}. Delecja w obrębie regionu 17p11.2 prowadzi do zespołu SMS, natomiast duplikacja tego samego regionu powoduje podobne pod względem objawów — jednak opisywane jako odrębna jednostka chorobowa — zaburzenie nazywane zespołem Potockiej-Lupskiego¹⁰. Cechy fenotypowe tego zespołu są w dużym stopniu zbliżone do cech zespołu SMS, chociaż na ogół zespół ten charakteryzuje się ich mniejszym nasileniem. Zespół Potockiej-Lupskiego ma jednak pewne unikalne cechy kliniczne¹⁰. Typowa duplikacja obejmuje ten sam region o długości 4 Mb, co delecja obserwowana w zespole SMS, ponieważ w obu zespołach pośredniczy niealleliczna rekombinacja homologiczna pomiędzy flankującymi regionami powtórzeń małej liczby kopii (Low Copy Repeat, LCR)⁴. Zespół Millera-Diekera (Miller-Dieker Syndrome, MDS) to zespół mnogich wad odznaczający się klasyczną licencęfalią, charakterystycznym wyglądem twarzy, a czasami także innymi wadami wrodzonymi¹¹. Niemalże wszystkie przypadki tego zespołu powiązane z widocznymi lub submikroskopowymi rearanżacjami w obrębie prążka 17p13.3 chromosomu¹². Sekwencja izolowanej licencęfali (Isolated Lissencephaly Sequence, ILS) obejmuje klasyczną licencęfalię bez dodatkowych poważnych wad¹³. U niemalże 40% pacjentów z tym schorzeniem wykryto submikroskopowe delecje prążka 17p13.3 chromosomu¹². Zespół MDS jest uznawany za jeden z zespołów przyległych genów, w którym do obserwowanych złożonych wad fenotypowych prowadzi delecja fizycznie przylegających do siebie genów. Gen PAFAH1B1 (LIS1) jest zlokalizowany w regionie 17p13.3 i został uznany za gen, którego nieprawidłowości odpowiadają za licencęfalię w zespołach MDS i ILS^{14,15}. Delecje obserwowane u pacjentów z zespołem MDS zawsze obejmują gen PAFAH1B1, a także inne loci położone telomerycznie, które rozciągają się na odległość ponad 250 kb¹⁴.

Specyfikacja sondy

LIS1 (PAFAH1B1), 17p13.3, kolor czerwony
RAI1, 17p11.2, kolor zielony



Sonda Miller-Dieker (LIS1) Probe ma długość 117 kb, jest wyznakowana czerwonym fluoroforem i obejmuje cały gen LIS1 (PAFAH1B1). Sonda Smith-Magenis (RAI1) Probe ma długość 158 kb, jest wyznakowana zielonym fluoroforem i obejmuje centromeryczny koniec genu RAI1 oraz marker D17S258. Te dwie unikalne sekwencje pełnią funkcję wzajemnych sond kontrolnych i umożliwiają identyfikację chromosomu 17.

Dostarczone materiały

Sonda: 50 µl na fiolkę (5 testów) lub 100 µl na fiolkę (10 testów)
Ilość sondy LIS1 (PAFAH1B1) Probe wyznakowanej czerwonym fluoroforem: 23-29 ng/test
Ilość sondy RAI1 Probe wyznakowanej zielonym fluoroforem: 9-11 ng/test
Sondy są dostarczane we wstępnie wymieszanym roztworze hybrydizacyjnym (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

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

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.

- 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.
- Pozostawić do wyschnięcia.

Denaturacja wstępna

- Wyjąć roztwór sond z zamrażarki i pozostawić go do ogrzania do temperatury pokojowej.
- Wymieszać roztwór sond pipetą w celu zapewnienia jego jednorodności.
- Pobrać 10 µl roztworu sond na test i przenieść pobraną objętość do próbki mikrowirówkowej. Bezwzględnie włożyć pozostały roztwór sond z powrotem do zamrażarki.
- Umieścić roztwór sond i szkiełko z próbką na płycie grzewczej o temperaturze 37°C (+/-1°C) na 5 minut w celu ich wstępnego ogrzania.
- Wkropić 10 µl mieszaniny sond na próbkę komórek i ostrożnie nanieść szkiełko nakrywkowe. Zakleić szkiełko klejem kauczukowym i poczekać na jego całkowite wyschnięcie.

Denaturacja

- Denaturować jednocześnie próbkę i mieszaninę sond, ogrzewając szkiełko na płycie grzewczej o temperaturze 75°C (+/-1°C) przez 2 minuty.

Hybrydyzacja

- Umieścić szkiełko w wilgotnym, światłoszczelnym pojemniku w temperaturze 37°C (+/-1°C) na noc.

Płukania po hybrydyzacji

- Ostrożnie zdjąć szkiełko nakrywkowe i usunąć wszelkie pozostałości kleju.
- Zanurzyć szkiełko w 0,4x stężonym roztworze SSC (pH 7,0) w temperaturze 72°C (+/-1°C) na 2 minuty; nie wstrząsać.
- 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.
- Pozwolić, aby szkiełko ociekło, a następnie nanieść 10 µl barwnika DAPI antifade na każdą próbkę.
- Przykryć szkiełkiem nakrywkowym, usunąć wszelkie pęcherzyki powietrza i pozostawić szkiełko w ciemności na 10 minut, aby umożliwić rozwój barw.
- 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

- Nie jest zalecane wypiekanie ani postarzenie preparatów, ponieważ może to zmniejszyć fluorescencję sygnału.
- Stosowanie odczynników innych niż dostarczone lub zalecane przez firmę CytoCell Ltd może mieć negatywny wpływ na warunki hybrydyzacji.
- 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.
- 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.
- 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 LIS1 (PAFAH1B1) — sekwencji docelowej dla sondy — powinny być widoczne jeden sygnał czerwony i dwa zielone sygnały kontrolne (1C, 2Z), a w komórce z delecją genu RAI1 — sekwencji docelowej dla sondy — powinny być widoczne dwa czerwone sygnały kontrolne 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@cytoCELL.com

Strona WWW: www.ogt.com

Piśmiennictwo

- Smith ACM *et al.*, Am J Hum Genet 1986;24:393-414
- Vlangos CN *et al.*, Am J Med Genet 2005;132A(3):278-82
- Lupski. Nature Genetics 2007; 39:S43 - S47
- Girirajan S *et al.*, J Med Genet 2005;42:820-8
- Bi W *et al.*, Am J Med Genet 2006;140(22):2454-63
- Slager RE *et al.*, Nat Genet 2003;33:466-8
- Schoumans J *et al.*, Eur J Med Genet 2005;48(3):290-300
- Girirajan S *et al.*, Genet Med 2006;8(7):417-27
- Potocki *et al.*, Am J Hum Genet 2007; 80 (4): 633-649
- Dobyns WB *et al.*, Am J Hum Genet 1991;48:584-94
- Dobyns WB *et al.*, J Am Med Assoc 1993;270:2838-42

- Dobyns WB *et al.*, Neurology 1992;42:1375-88
- Chong SS *et al.*, Hum Mol Genet 1997;6(2):147-55
- Lo Nigro C *et al.*, Hum Mol Genet 1997;6(2):157-

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@cytoCELL.com
W: www.ogt.com