



A Sysmex Group Company



Instrukcja użytkowania
REF: LPU 026-S / LPU 026

SRY Probe



WYŁĄCZNIE DO UŻYTKU PROFESJONALNEGO

POLSKI

Dalsze informacje dostępne pod adresem www.ogt.com

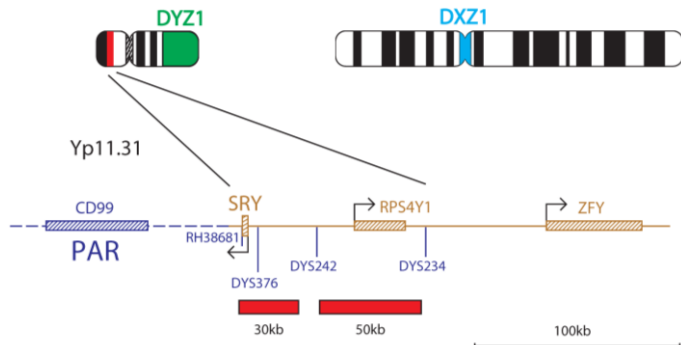
Fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (Fluorescence *In Situ* Hybridisation, FISH) to technika, która umożliwia wykrywanie sekwencji DNA na chromosomach metafazowych lub w jądrach interfazowych obecnych w utrwalonych próbkach cytogenetycznych. Technika ta obejmuje wykorzystanie sond DNA, które hybrydują 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 zhybrydyzowane do materiału docelowego można następnie obserwować pod mikroskopem fluorescencyjnym.

Informacje o sondzie

Gen SRY (sex-determining region Y) zlokalizowany na prążku Yp11.31 to główny przełącznik genetyczny odpowiadający za determinację płci u ssaków¹. Koduje on czynnik transkrypcyjny, który należy do rodziny białek wiążących DNA o wysokiej ruchliwości elektroforetycznej (High Mobility Group, HMG)². U ssaków prowadzi on do aktywacji różnicowania gonad w jądra³. Zygoty ludzkie z mutacjami genu SRY rozwijają się w osobniki o płci żeńskiej z chromosomami płci XY, natomiast zygoty z chromosomami płci XX w obecności genu SRY prezentują fenotyp męski z okazjonalnie występującą niejednoznacznością narządów płciowych^{4,5}. Translokacje chromosomów X i Y są zgłaszane rzadko, ale często prowadzą do odwrócenia płci biologicznej⁶.

Specyfikacja sondy

SRY, Yp11.31, kolor czerwony
DYZ1, Yq12, kolor zielony
DXZ1, Xp11.1-q11.1, kolor niebieski



Produkt SRY Probe zawiera dwie niezachodzące na siebie sondy o długości 30 kZ i 50 kZ, wyznakowane czerwonym fluoroforem. Sondy te obejmują cały gen SRY i flankujący DNA, w tym gen RPS4Y1. Mieszanina sond zawiera również sondę kontrolną dla centromeru chromosomu X (DXZ1) wyznakowaną niebieskim fluoroforem i sondę kontrolną dla chromosomu Y (DYZ1, blok heterochromatyczny w regionie Yq12) wyznakowaną zielonym fluoroforem.

Dostarczone materiały

Sonda: 50 µl na fiolkę (5 testów) lub 100 µl na fiolkę (10 testów)
Ilość sondy SRY Probe wyznakowanej czerwonym fluoroforem: 36-46 ng/test
Ilość sondy DYZ1 Probe wyznakowanej zielonym fluoroforem: 36-45 ng/test
Ilość sondy DXZ1 Probe wyznakowanej niebieskim fluoroforem: 127-159 ng/test

Sondy są dostarczane we wstępnie wymieszanym roztworze hybrydyzacyjnym (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. Mieszanki 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 spłukać dużą ilością wody.
4. DAPI jest potencjalnym czynnikiem rakotwórczym. Zachować ostrożność podczas pracy z tym produktem; nosić rękawiczki i fartuch laboratoryjny. Przy usuwaniu spłukać dużą ilością wody.
5. Wszystkie materiały stwarzające zagrożenie należy wyrzucić 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. Barwiacz 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 czerwonego i zielonego fluoroforu oraz barwnika kontrastowego optymalnie nadaje się potrójny filtr pasmowo-przepustowy DAPI/FITC/Texas Red. Niebieski fluorofor wykazuje specyficzność względem widma Aqua i DEAC (wymagany jest pojedynczy filtr pasmowo-przepustowy Aqua lub DEAC).

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 probówki mikrowirówkowej. Bezwzględnie 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 osoby płci męskiej (XY) powinny być widoczne jeden sygnał czerwony, jeden sygnał zielony i jeden sygnał niebieski (1C, 1Z, 1N). W komórce z delecją w regionie obejmowanym przez wyznakowane czerwonym fluoroforem klony zawarte w tym zestawie sond (region ten obejmuje gen SRY) powinny być widoczne jeden sygnał zielony i jeden sygnał niebieski (1Z, 1N). W przypadku genotypu żeńskiego (XX) z fenotypem męskim mogą być obserwowane jeden sygnał czerwony i dwa sygnały niebieskie (1C, 2N). Mogą być również obserwowane inne nietypowe wzorce sygnału.

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.

Produkt ten może nie umożliwić wykrycia ubytków genomowych, do których doszło poza regionem obejmowanym przez wyznakowane czerwonym fluoroforem klony zawarte w tym zestawie sond, lub częściowych ubytków 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

1. Kashimada *et al.*, Development 2010 ;137:3921-3930
2. Sinclair AH *et al.*, Nature 1990;346:240-4
3. Koopman P *et al.*, Nature 1991;351:117-21
4. Iida T *et al.*, Hum Mol Genet 1994;3:1437-8
5. Kusz K *et al.*, J Med Gene 1999;36:452-6
6. Ellaithi M *et al.*, BMC Ped 2006;6:11

| | |
|---|---|
|  | 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
Tel.: +44(0)1223 294048
Faks.: +44(0)1223 294986
E: probes@cytoCell.com
Strona WWW: www.ogt.com

| | |
|---|---|
| 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 |