



A Sysmex Group Company



Instrukcja użytkownika  
REF: LPU 025-S / LPU 025

## SHOX Probe



WYŁĄCZNIE DO UŻYTKU PROFESJONALNEGO

POLSKI

Dalsze informacje dostępne pod adresem [www.ogt.com](http://www.ogt.com)

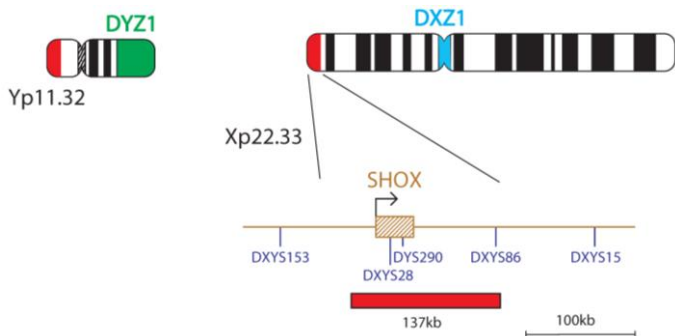
Fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (Fluorescence *In Situ* Hybridisation, FISH) to technika, która umożliwia wykrywanie sekwencji DNA na chromosomach metafazowych lub w jądrach interfazowych obecnych w utrwalonych próbkach cytogenetycznych. Technika ta obejmuje wykorzystanie sond DNA, które hybrydują 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 dostępną 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 SHOX (short stature homeobox-containing gene) jest zlokalizowany w regionie pseudoautosomalnym (PAR1) chromosomów X i Y, na prążkach Xp22.33 i Yp11.32<sup>1</sup>. Gen koduje czynnik transkrypcyjny złożony z 292 i 225 aminokwasów (odpowiednio SHOXa i SHOXb), a białka powstałe po translacji tego genu różnią się regionami końców C. SHOX to swoiste komórkowo białko zawierające homeodomenę zaangażowane w regulację cyklu komórkowego i wzrostu komórek oraz aktywację transkrypcji w komórkach osteogennych<sup>2</sup>. Haploinsuficjencja genu SHOX jest czynnikiem etiologicznym niskorosłości idiopatycznej i niskorosłości obserwowanej w zespole Turnera<sup>3</sup>. Homozygotyczny ubytek genu SHOX skorelowano z dysplazją mezo-meliczną Langer'a. Wykazano również, że heterozygotyczne mutacje genu SHOX prowadzą do dyschondrosteozy Leriego-Weilla<sup>4</sup>. Częstość występowania niedoboru SHOX wynosi od 1:2000 do 1:5000 w populacji ogólnej i od 1:40 do 1:150 w populacji niskich osób<sup>5,6</sup>.

### Specyfikacja sondy

SHOX, Xp22.33/Yp11.32, kolor czerwony  
DYZ1, Yq12, kolor zielony  
DXZ1, Xp11.1-q11.1, kolor niebieski



Sonda SHOX Probe ma długość 137 kb, jest wyznakowana czerwonym fluoroforem i obejmuje region, który zawiera cały gen SHOX wraz z flankującym DNA na chromosomach Y i X. Mieszanka 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 SHOX Probe wyznakowanej czerwonym fluoroforem: 20-25 ng/test  
Ilość sondy DYZ1 Probe wyznakowanej zielonym fluoroforem: 21-26 ng/test  
Ilość sondy DXZ1 Probe wyznakowanej niebieskim fluoroforem: 90-112 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 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. Łażnia 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. Barwiace 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 próbki 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 mieszanki 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 mieszankę 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 postarzanie 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 osoby płci męskiej (XY) powinny być widoczne dwa sygnały czerwone, jeden sygnał zielony i jeden sygnał niebieski (2C, 1Z, 1N). W komórce z delecją genu SHOX powinny być widoczne jeden sygnał czerwony, jeden sygnał zielony i jeden sygnał niebieski (1C, 1Z, 1N).

W prawidłowej komórce osoby płci żeńskiej (XX) powinny być widoczne dwa sygnały czerwone i dwa sygnały niebieskie (2C, 2N). W komórce z delecją genu SHOX powinny być widoczne jeden sygnał czerwony i dwa sygnały niebieskie (1C, 2N).

## 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.

## 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

- Rao E *et al.*, Nat Genet 1997;16:54-63
- Rao E *et al.*, Hum Mol Genet 2001;10:3083-91
- Clement-Jones M *et al.*, Hum Mol Genet. 2000 Mar 22;9(5):695-702
- Robertson S *et al.*, J Med Genet. 2000 Dec;37(12):959-64
- Leka SK *et al.*, Hormones 2006;5:107-18
- Jorge AL *et al.*, Clin Endocri 2007;66:130-5

	<b>PL:</b> Zawartość wystarczająca do <n> testów
	<b>PL:</b> 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



<b>REF</b>	<b>PL:</b> Numer katalogowy
	<b>PL:</b> Wyrób medyczny do diagnostyki <i>in vitro</i>
	<b>PL:</b> Kod partii
	<b>PL:</b> Zajrzyj do instrukcji używania
	<b>PL:</b> Wytwórca
	<b>PL:</b> Użyć do daty
	<b>PL:</b> Dopuszczalna temperatura