



A Sysmex Group Company



Instrukcja użytkownika
REF: LPE xxxR/G

Satellite Enumeration Probes



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 obserwować pod mikroskopem fluorescencyjnym.

Ograniczenia

Ten test nie jest przeznaczony do użytku jako samodzielny test diagnostyczny, do badań prenatalnych, populacyjnych badań przesiewowych, badań przyłóżkowych ani do samotestowania. Ten produkt jest przeznaczony wyłącznie do użytku profesjonalnego w laboratorium; wszystkie wyniki powinny być interpretowane przez personel posiadający odpowiednie kwalifikacje, z uwzględnieniem innych istotnych wyników testów.

Ten produkt nie został zatwierdzony do stosowania dla typów próbek lub chorób innych niż określone w części dotyczącej przeznaczenia.

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.

Nieprzestrzeganie protokołu może wpłynąć na skuteczność testu i doprowadzić do uzyskania wyników fałszywie pozytywnych/negatywnych.

Ten zestaw nie został zatwierdzony do stosowania w celach innych niż określone w części dotyczącej przeznaczenia.

Informacje o sondzie

Sondy satelitarne firmy CytoCell wykazują swoistość względem ludzkich chromosomów. Są to wielokrotnie powtórzone sekwencje ludzkiego DNA znajdujące się w obrębie centromeru, w pobliżu centromeru lub w bloku heterochromatycznym każdego z 24 chromosomów. Sondy umożliwiają identyfikację i zliczanie chromosomów ludzkich w komórkach interfazowych lub chromosomów metafazowych w próbkach krwi obwodowej.

Specyfikacja sondy

Sondy są produkowane w postaci skoncentrowanej, dzięki czemu w razie potrzeby możliwe jest wymieszanie maksymalnie trzech skoncentrowanych sond satelitarnych firmy CytoCell w celu wykorzystania ich w jednej reakcji hybrydyzacji. Na reakcję hybrydyzacji wymagana jest objętość końcowa roztworu sond równa 10 µl.

Sondy są bezpośrednio wyznakowane czerwonym (widmo Texas Red) lub zielonym (widmo FITC) fluoroforem. Tabela 1 zawiera szczegółową specyfikację sond.

Tabela 1: Specyfikacja sond

Chr	Numer katalogowy*	Locus	Region chromosomu	Klasa DNA
1	LPE 001R/G	D1Z1	1q12	satelita typu III
2	LPE 002R/G	D2Z2	2p11.1-q11.1	α-satelita
3	LPE 003R/G	D3Z1	3p11.1-q11.1	α-satelita

4	LPE 004R/G	D4Z1	4p11.1-q11.1	α-satelita
1/5/19	LPE 005R/G	D1Z7 D5Z2 D19Z3	1p11.1-q11.1 5p11.1-q11.1 19p11.1-q11.1	α-satelita
6	LPE 006R/G	D6Z1	6p11.1-q11.1	α-satelita
7	LPE 007R/G	D7Z1	7p11.1-q11.1	α-satelita
8	LPE 008R/G	D8Z2	8p11.1-q11.1	α-satelita
9	LPE 009R/G	D9Z3	9q12	satelita typu III
10	LPE 010R/G	D10Z1	10p11.1-q11.1	α-satelita
11	LPE 011R/G	D11Z1	11p11.1-q11.1	α-satelita
12	LPE 012R/G	D12Z3	12p11.1-q11.1	α-satelita
13/21	LPE 013R/G	D13Z1 D21Z1	13p11.1-q11.1 21p11.1-q11.1	α-satelita
14/22	LPE 014R/G	D14Z1 D22Z1	14p11.1-q11.1 22p11.1-q11.1	α-satelita
15	LPE 015R/G	D15Z4	15p11.1-q11.1	α-satelita
16	LPE 016R/G	D16Z2	16p11.1-q11.1	α-satelita
17	LPE 017R/G	D17Z1	17p11.1-q11.1	α-satelita
18	LPE 018R/G	D18Z1	18p11.1-q11.1	α-satelita
20	LPE 020R/G	D20Z1	20p11.1-q11.1	α-satelita
X	LPE 0XR/G	DXZ1	Xp11.1-q11.1	α-satelita
Y	LPE 0YcR/G	DYZ3	Yp11.1-q11.1	α-satelita
Y	LPE 0YqR/G	DYZ1	Yq12	satelita typu III

*„R” oznacza czerwony barwnik, a „G” zielony barwnik

Ten zestaw zawiera tylko jedną z sond z gamy bezpośrednio wyznakowanych ludzkich sond alfa-satelitarnych i klasycznych sond satelitarnych.

Dostarczone materiały

Sonda: 15 µl na fiolkę (5 testów)

Ilość sondy satelitarnej wyznakowanej czerwonym fluoroforem: co najmniej 3,33 ng/test

Ilość sondy satelitarnej wyznakowanej zielonym fluoroforem: co najmniej 6,67 ng/test

Sonda jest produkowana w postaci skoncentrowanej. Sonda jest dostarczana w roztworze hybrydyzacyjnym (formamid; siarczan dekstranu; SSC).

Roztwór hybrydyzacyjny (formamid; siarczan dekstranu; SSC): 150 µl na fiolkę

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

- Do diagnostyki *in vitro*. Wyłącznie do użytku profesjonalnego.
- Podczas pracy z sondami DNA i barwnikiem kontrastowym DAPI należy nosić rękawiczki.
- 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.
- DAPI jest potencjalnym czynnikiem rakotwórczym. Zachować ostrożność podczas pracy z tym produktem; nosić rękawiczki i fartuch laboratoryjny. Przy usuwaniu spłukać dużą ilością wody.
- Wszystkie materiały stwarzające zagrożenie należy wyrzucać zgodnie z wytycznymi placówki dotyczącymi usuwania odpadów stwarzających zagrożenie.
- Należy upewnić się, że stosowane są prawidłowe czasy hybrydyzacji i stężenia roztworu SSC zgodnie z instrukcjami protokołu dla poszczególnych sond.

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

- Płyta grzewcza (ze stabilną płytą i możliwością dokładnej kontroli temperatury do 80°C).
- Mikropipety i końcówki umożliwiające przenoszenie różnych objętości cieczy w zakresie 1–200 µl.
- Łaźnia wodna z możliwością dokładnej kontroli temperatury na poziomie 72°C.
- Probówki mikrowirówkowe (0,5 ml).
- Mikroskop fluorescencyjny (patrz część „Zalecenia dotyczące mikroskopu fluorescencyjnego”).
- Barwiacze Coplina z tworzywa sztucznego lub szklane.
- Szczypczyki.
- Olejek imersyjny odpowiedni do obiektów mikroskopowych klasy fluorescencyjnej.
- Wirówka laboratoryjna.
- Szkiełka mikroskopowe.
- Szkiełka nakrywkowa o wymiarach 24x24 mm.
- Stoper.

- Inkubator nastawiony na temperaturę 37°C.
- Klej kauczukowy.

Zalecenia dotyczące mikroskopu fluorescencyjnego

W celu optymalnej wizualizacji sondy zalecane jest używanie 100-watowej lampy rтięciennej 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 próbek

Zestaw zaprojektowano do użyciu na komórkach krwi obwodowej z hodowli utrwalonych w utrwalczu 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

- Wkropić próbkę komórek na szkiełko mikroskopowe. Pozostawić do wyschnięcia.
- 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.
- Za pomocą świeżych końcówek do pipety pobrać (do objętości końcowej roztworu sond równej 10 µl):
 - w przypadku **hybrydyzacji z użyciem jednej sondy**: 3 µl sondy i 7 µl roztworu hybrydyzacyjnego na test
 - w przypadku **hybrydyzacji z użyciem dwóch sond**: 3 µl każdej sondy i 4 µl roztworu hybrydyzacyjnego na test
 - w przypadku **hybrydyzacji z użyciem trzech sond**: 3 µl każdej sondy i 1 µl roztworu hybrydyzacyjnego na test
- przenieść całą objętość roztworu sond do próbki mikrowirówkowej. Delikatnie wytrząsać próbkę w celu wymieszania jej zawartości i odwirować pulsacyjnie w mikrowirówce. 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 **1 godzinę lub na całą noc. Dotyczy sond LPE 005R/G, LPE 016R i LPE 020R/G; 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 **0,25x stężonym roztworze SSC** (pH 7,0) w temperaturze 72°C (+/-1°C) na 2 minuty; nie wstrząsać*. **Dotyczy sond LPE 005R/G, LPE 016R i LPE 020R/G; 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.

*W przypadku uzyskania słabego sygnału należy powtórzyć procedurę FISH, używając 0,4x stężonego roztworu SSC do płukania po hybrydyzacji.

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 przypadku hybrydyzacji z użyciem jednej sondy

Z uwagi na różnice liczby kopii sekwencji powtórzeniowych między chromosomami obserwowane będą różnice we względnej wielkości sygnałów między chromosomami.

- W przypadku użycia jednej z sond satelitarnych dla chromosomów 1.–12. i 15.–20. (z wyjątkiem sondy 1/5/19) w próbie diploidalnej powinien być obserwowany sygnał fluorescencyjny na poziomie centromeru u obu chromosomów z danej pary.
- W przypadku użycia sondy dla chromosomów 1/5/19 w próbie diploidalnej powinien być obserwowany sygnał fluorescencyjny na poziomie centromeru u każdego chromosomu z par 1., 5. i 19.
- W przypadku użycia sondy dla chromosomów 13/21 lub 14/22 w próbie diploidalnej powinien być obserwowany sygnał fluorescencyjny na poziomie centromeru u obu chromosomów z danych par — 13. i 21. lub 14. i 22.

Znana reaktywność krzyżowa

- Sonda satelitarna typu III dla chromosomu 1. może wykazywać słabą hybrydyzację krzyżową względem chromosomu 9., 5. i 19.
- Sonda α-satelitarna dla chromosomu 2. może wykazywać słabą hybrydyzację krzyżową względem chromosomu 20.
- Sonda α-satelitarna dla chromosomu 4. może wykazywać słabą hybrydyzację krzyżową względem chromosomu 8. lub 9.
- Sonda α-satelitarna dla chromosomu 10. może wykazywać słabą hybrydyzację krzyżową względem chromosomu 9., 10. lub 11.
- Sonda α-satelitarna dla chromosomu 11. może wykazywać słabą hybrydyzację krzyżową względem centromerów chromosomu 17. i chromosomu X.
- Sonda α-satelitarna dla chromosomu 12. może wykazywać słabą hybrydyzację krzyżową względem centromerów chromosomu 3., 6., 7. i 10.
- Sonda α-satelitarna dla chromosomu 17. może wykazywać słabą hybrydyzację krzyżową względem centromerów chromosomu 11. i chromosomu X.
- Sonda α-satelitarna dla chromosomu 19. może wykazywać słabą hybrydyzację krzyżową względem chromosomu 1. i 5.
- Sonda α-satelitarna dla chromosomu X może wykazywać słabą hybrydyzację krzyżową względem centromerów chromosomu Y, chromosomu 11. i 17.
- Sonda α-satelitarna dla chromosomu XcYc może wykazywać słabą hybrydyzację krzyżową względem chromosomu Y i centromerów chromosomu 11. i 17.
- Sonda α-satelitarna/satelitarna typu III dla chromosomu XcYc może wykazywać słabą hybrydyzację krzyżową względem centromerów chromosomu Y i centromerów chromosomu 11. i 17.
- Sonda α-satelitarna dla chromosomu Yc może wykazywać słabą hybrydyzację krzyżową względem chromosomu X.

Ryzyko zającia hybrydyzacji krzyżowej można zmniejszyć, wykonując płukanie w surowych warunkach przy użyciu 0,25x stężonego roztworu SSC zamiast 0,4x stężonego roztworu SSC.

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

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.

**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