A Sysmex Group Company

CytoCell

Instrukcja użytkowania
REF: LPE 008B / LPE 012B / LPE 017B

Satellite Enumeration Probes

CE IVD

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 hybrydyzują 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.

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 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 niebieskim fluoroforem (widmo Aqua lub DEAC). Tabela 1 zawiera szczegółową specyfikację sond.

Tabela 1: Specyfikacja sond

Chr	Numer katalogowy*	Locus	Region chromosomu	Klasa DNA
8	LPE 008B	D8Z2	8p11.1-q11.1	α-satelita
12	LPE 012B	D12Z3	12p11.1-q11.1	α-satelita
17	LPE 017B	D17Z1	17p11.1-q11.1	α-satelita

***„B" oznacza niebieski barwnik**

Ten zestaw zawiera tylko jedną z sond z gamy bezpośrednio wyznakowanych niebieskim fluoroforem sond łączących się z ludzkimi sekwencjami alfa-satelitarnymi.

Dostarczone materiały
Sonda: 30 µl na fiolkę (10 testów)
Ilość sondy D8Z2 wyznakowanej niebieskim fluoroforem: 63,5–91,5 ng/test
Ilość sondy D12Z3 wyznakowanej niebieskim fluoroforem: 19,2 ng/test
Ilość sondy D17Z1 wyznakowanej niebieskim fluoroforem: 14,4 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-fenyloindol)).

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, 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.
6. Operatorzy muszą być w stanie rozróżniać czerwony, niebieski i zielony kolor.

Przechowywanie i postępowanie z produktem
Zestaw należy przechowywać w zamrażarce w temperaturze od -25ºC do -15ºC do daty ważności wskazanej na etykiecie zestawu. Fiolki z sondami i barwnikiem kontrastowym należy przechowywać w ciemności. Należy możliwie ograniczać ekspozycję sondy i barwnika kontrastowego na światło w laboratorium.

Sprzęt wymagany, ale niedostarczany
1. Płyta grzewcza (ze stabilną płytą i możliwością dokładnej kontroli temperatury do 80ºC).
2. Mikropipety i końcówki umożliwiające przenoszenie różnych objętości cieczy w zakresie 1–200 µl.
3. Łaźnia wodna z możliwością dokładnej kontroli temperatury na poziomie 72ºC.
4. Probówki mikrowirówkowe (0,5 ml).
5. Mikroskop fluorescencyjny (patrz część „Zalecenia dotyczące mikroskopu fluorescencyjnego").
6. Barwiacze 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 37ºC.
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. Niebieski fluorofor wykazuje specyficzność względem widma Aqua i DEAC (wymagany jest pojedynczy filtr pasmowo-przepustowy Aqua lub DEAC).
Przed użyciem mikroskopu fluorescencyjnego należy sprawdzić, czy działa on prawidłowo. Należy stosować olejek imersyjny odpowiedni do mikroskopii fluorescencyjnej o składzie odpowiednim do niskiej autofluorescencji. Należy przestrzegać zaleceń wytwórcy dotyczących okresu żywotności lampy i wieku filtrów.

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 i barwnika kontrastowego na światło w laboratorium).

Przygotowanie szkiełek
1. Wkropić próbkę komórek na szkiełko mikroskopowe. Pozostawić do wyschnięcia.
2. Zanurzyć szkiełko w 2x stężonym roztworze SSC w temperaturze pokojowej na 2 minuty; 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. Przed użyciem roztworu należy krótko odwirować probówki.
6. Wymieszać roztwór sond pipetą w celu zapewnienia jego jednorodności.
7. 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

   i przenieść do probówki mikrowirówkowej. Delikatnie wytrząsać probówkę w celu wymieszania jej zawartości i odwirować pulsacyjnie w mikrowirówce. Bezzwłocznie włożyć pozostały roztwór sond z powrotem do zamrażarki.
8. Umieścić roztwór sond i szkiełko z próbką na płycie grzewczej o temperaturze 37ºC (+/-1ºC) 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 75ºC (+/-1ºC) przez 2 minuty.

Hybrydyzacja
11. Umieścić szkiełko w wilgotnym, światłoszczelnym pojemniku w temperaturze 37ºC (+/-1ºC) na 1 godzinę lub na całą noc.

Płukania po hybrydyzacji
12. Ostrożnie zdjąć szkiełko nakrywkowe i usunąć wszelkie pozostałości kleju.
13. Zanurzyć szkiełko w 0,25x stężonym roztworze SSC (pH 7,0) w temperaturze 72ºC (+/-1ºC) 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 zajście reakcji barwnej.
17. 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
1. Wypiekanie lub postarzanie preparatów może zmniejszyć fluorescencję sygnału.
2. Stosowanie odczynników innych niż dostarczone lub zalecane przez firmę Cytocell Ltd. może mieć negatywny wpływ na warunki hybrydyzacji.
3. Do pomiaru temperatury roztworów, łaźni wodnych i inkubatorów należy używać 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.
6. Nadmierna hybrydyzacja może spowodować otrzymanie dodatkowych lub nieoczekiwanych sygnałów.
7. Przed użyciem testu do celów diagnostycznych użytkownicy powinni zoptymalizować protokół dla własnych próbek.

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 próbce diploidalnej w 70–90% analizowanych komórek powinien być widoczny sygnał fluorescencyjny na poziomie centromeru obu odpowiednich chromosomów z pary.

Znana reaktywność krzyżowa
Sonda LPE017B może wykazywać słabą hybrydyzację krzyżową z regionem centromerowym chromosomu 11. i chromosomu X.
Sonda LPE012B może wykazywać słabą hybrydyzację krzyżową z regionem centromerowym chromosomu 3., 6., 7. i 10.

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.
Nieprzestrzeganie protokołu może wpłynąć na skuteczność testu i jego wyniki.

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
IVD	**PL:** Wyrób do diagnostyki *in vitro*
LOT	**PL**: Kod partii
	PL: Zajrzyj do instrukcji używania
	PL: Wytwórca
	PL: Użyć do daty
	PL: Dopuszczalna temperatura
	PL: Zawartość wystarczająca do <n> testów
CONT	**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, Wielka Brytania
Tel.: +44(0)1223 294048
Faks: +44(0)1223 294986
E-mail: probes@cytocell.com
Strona WWW: www.ogt.com