



A Sismex Group Company



Instrukcja użytkownika
REF: LPA 004

Zestaw Prenatal 18 Enumeration Probe Kit



WYŁĄCZNIE DO UŻYTKU PROFESJONALNEGO

POLSKI

Dalsze informacje dostępne pod adresem www.ogt.com

Fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (FISH, Fluorescence *In Situ* Hybridisation) 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.

Informacje o sondzie

Oznaczenia firmy CytoCell do badań prenatalnych techniką fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH) są przeznaczone do szybkiego i dokładnego wykrywania najczęściej spotykanych zaburzeń chromosomalnych płodu. Zestaw sond jest przeznaczony do wykrywania i ilościowego oznaczania chromosomu 18. w jądrach interfazowych niehodowanych komórek płynu owodniowego przy użyciu techniki FISH. Wyniki tego oznaczenia należy wykorzystywać w połączeniu z wynikami analizy kariotypu płodu. Trisomia chromosomu 18., która wywołuje zespół Edwardsa, występuje z częstością 1 na 6000–8000 żywych urodzeń. Choroba ta dotyczy wyłącznie płci żeńskiej¹. Obraz kliniczny tej choroby jest zróżnicowany, choć w wielu przypadkach stwierdza się opóźnienie wzrostu, wady serca i anomalie twarzoczaszki, a także możliwe nieprawidłowości w budowie kończyn i nerek².

Specyfikacja sondy

Centromer chromosomu 18., 18p11.1 – q11.1 (D18Z1), kolor niebieski



Sonda dla centromeru chromosomu 18. jest bezpośrednio wyznakowaną niebieskim fluoroforem sondą DNA swoistą względem sekwencji alfa-satelitarnego DNA obecnych w regionie D18Z1 chromosomu 18.

Dostarczone materiały

Sonda: 50 µl na fiolkę (5 testów) lub 100 µl na fiolkę (10 testów)
Ilość sondy dla centromeru chromosomu 18. (D18Z1) wyznakowanej niebieskim fluoroforem: 112–140 ng/test
Sonda jest dostarczana we wstępnie wymieszanym roztworze hybrydyzacyjnym (formamid; siarczan dekstranu; SSC) i jest gotowa 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 słupek dużą ilością wody.

4. DAPI jest potencjalnym czynnikiem rakotwórczym. Zachować ostrożność podczas pracy z tym produktem; nosić rękawiczki i fartuch laboratoryjny. Przy usuwaniu słupek 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 37°C i 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. Niebieski fluorofor wykazuje specyficzność względem widma Aqua i DEAC (wymagany jest pojedynczy filtr pasmowo-przepustowy Aqua lub DEAC). Do jednoczesnej obserwacji wszystkich niebieskiego fluoroforu i barwnika DAPI można użyć potrójnego filtra pasmowo-przepustowego DAPI/FITC/Texas Red.

Przygotowanie próbek

Zestaw do badań prenatalnych jest przeznaczony do stosowania z niehodowanymi amniocytami utrwalonymi w utrwalaczu Carnoy'a (patrz procedura poniżej). Próbkę płynu owodniowego należy pobrać zgodnie z wytycznymi obowiązującymi w laboratorium lub placówce.

Nie należy używać próbek płynu owodniowego, które wydają się krwawe lub brązowe, ponieważ mogą one zawierać krew matki, co może doprowadzić do uzyskania fałszywych wyników.

Zalecany protokół

Przygotowanie próbek świeżego płynu owodniowego do procedury FISH:

1. Wirować 2–5 ml z całej próbki płynu owodniowego przez 7 minut przy 180 x g, ostrożnie usunąć supernatant, nie naruszając osadu komórkowego.
2. Ponownie zawiesić osad w 2 ml roztworu KCl o stężeniu 0,075 M. Pozostawić w temperaturze pokojowej na 5 minut.
3. Dodać 2 ml świeżego utrwalacza (metanol:lodowaty kwas octowy w stosunku 3:1) do komórek/roztworu hipotonicznego; dodać pierwszy ml kroplami, ciągle mieszając. Dobrze wymieszać.
4. Wirować zawiesinę przez 5 minut przy 280 x g, ostrożnie usunąć supernatant i ponownie zawiesić osad w 2 ml świeżego utrwalacza.
5. Po wykonaniu tego kroku utrwalone próbki można przenieść do zamrażarki i przechowywać w temperaturze -20°C.
6. Jeśli próbka nie będzie mrożona, wirować próbkę przy 280 x g przez 5 minut. Usunąć maksymalną ilość supernatantu, nie naruszając osadu komórkowego. Ostukać próbkę w celu ponownego zawieszenia osadu w małej ilości pozostałego płynu.
7. W celu przygotowania preparatu do procedury FISH wkropić zawiesinę komórek bezpośrednio na szkiełko. Pozostawić do wyschnięcia na powietrzu.

Zalecana procedura wstępnej obróbki preparatu:

1. Zanurzyć szkiełko z preparatem przygotowanym z niehodowanych amniocytów w 2x stężonym roztworze SSC na 1 godzinę w temperaturze 37°C.
2. Zanurzyć szkiełko w świeżo przygotowanym roztworze roboczym pepsyny (5 mg pepsyny w 100 ml roztworu HCl o stężeniu 0,01 M) na 13 minut w temperaturze 37°C.
3. Zanurzyć szkiełko w buforowanej fosforanem soli fizjologicznej (PBS) na 5 minut w temperaturze pokojowej.
4. Zanurzyć szkiełko w roztworze po utrwaleniu (roztwór formaldehydu o stężeniu 0,95%: 1,0 ml roztworu formaldehydu o stężeniu 37%, 0,18 g MgCl₂ i 39,0 ml buforu PBS) na 5 minut w temperaturze pokojowej.
5. Zanurzyć szkiełko w buforze PBS na 5 minut w temperaturze pokojowej.
6. Zanurzyć szkiełko w roztworze etanolu o stężeniu 70% w temperaturze pokojowej. Pozostawić szkiełko w kąpeli etanolowej na 1 minutę.
7. Wyciąć szkiełko z roztworu etanolu o stężeniu 70%. Powtórzyć krok 6 z użyciem roztworu etanolu o stężeniu 85%, a następnie etanolu o stężeniu 100%.
8. Pozostawić do wyschnięcia na powietrzu.

Protokół FISH

(Uwaga: Należy ograniczyć ekspozycję sondy na światło w laboratorium)

Przygotowanie szkiełek (pomiąć ten krok, jeśli szkiełko poddano obróbce wstępnej zgodnie z przedstawionym powyżej protokołem)

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 próbówki 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 antyfade na każdy obszar, w którym przeprowadzono hybrydyzację.
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.

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 postarzanie 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.

Interpretacja wyników

Czułość i swoistość procedury FISH są uzależnione od szeregu parametrów, które różnią się w zależności od typu komórki, używanej sondy, zastosowanych technik pracy z komórkami oraz w obrębie danego laboratorium. W związku z tym zalecamy, aby przy stosowaniu zestawu do badań prenatalnych każde laboratorium posiadało własny materiał wzorcowy i określało własne wartości odcięcia dla oznaczeń FISH dla próbek prawidłowych kariotypowo i aneuploidalnych (w celu uzyskania wytycznych należy skontaktować się z firmą CytoCell).

Wyniki oczekiwane

W prawidłowej komórce powinny być widoczne 2 sygnały niebieskie (2N). W komórkach z trisomią chromosomu 18. powinny być widoczne 3 sygnały niebieskie (3N).

Ograniczenia

Test ten nie wykrywa strukturalnych nieprawidłowości chromosomów i mozaikowości chromosomowej.

Nie umożliwia również wykrycia nieprawidłowości liczby chromosomów innych niż opisane powyżej.

Test nie jest przeznaczony do oceny ryzyka wystąpienia trisomii.

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

1. <http://www.ogrd.com/content/7/1/81/abstract>
2. Cereda and Carey. Orphanet J Rare Dis 2012; 7:81

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