



A Sysmex Group Company



Instrukcja użytkownika
REF: LPU 004-S / LPU 004

DiGeorge/VCFS TUPLE1 and 22q13.3 Deletion Probe Combination



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 nieswoicie 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

Zespół DiGeorge'a

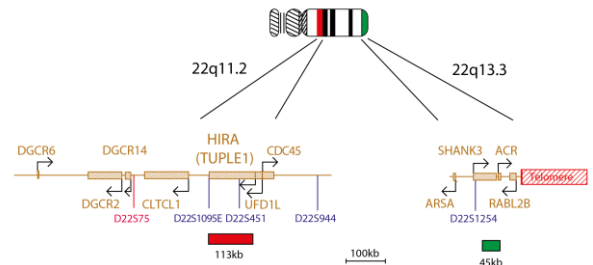
Zespół DiGeorge'a¹, a także wiele zespołów wad wrodzonych, w tym zespół podniebieno-sercowo-twarzowy (Velocardiofacial Syndrome, VCFS)², charakteryzują się delecją w obrębie regionu 22q11.2 chromosomu 22.^{2,3,4,5} Delecje w obrębie chromosomu 22. są zbiorczo określane akronimem CATCH22 utworzonym od angielskich słów opisujących kliniczne objawy — którymi są wady serca, wady twarzy, wrodzony brak grasicy, rozszczep podniebienia i hipokalcemia/nadczynność tarczycy — wywołane delecją w obrębie chromosomu 22. Ponadto u około 29% pacjentów z izolowanymi wadami podziału stożka i pnia naczyniowego wykazano obecność mikrodelecji w obrębie regionu 22q11.2⁶. Częstość występowania tych wad jest szacowana na od 1:4000 do 1:9700 żywych urodzeń⁷, a zatem delecja w obrębie regionu 22q11.2 stanowi jedną z najczęstszych wad genetycznych. Region o długości około 2 Mz, nazywany krytycznym regionem DiGeorge'a (DiGeorge Critical Region, DGCR), ulega delecji najczęściej — dochodzi do niej nawet u 90% pacjentów^{5,8,9}. W obrębie regionu DGCR wyszczególniono minimalny region krytyczny o długości 300–480 kZ^{10,11}, który obejmuje kilka genów, w tym geny TUPLE1 (HIRA), TBX1, SLC25A1 (CTP) i CLT2.

Zespół delecji 22q13.3

Zespół delecji 22q13.3 objawia się rozpoznawalnym fenotypem charakteryzującym się hipotonią, opóźnieniem lub całkowitym zahamowaniem rozwoju mowy, ogólnym opóźnieniem rozwoju, prawidłowym lub przyspieszonym wzrostem i drobnymi cechami dysmorficznymi^{12,13}. Niektóre delecje końcowego regionu chromosomu 22q są widoczne w badaniu cytogenetycznym. Zgłoszono jednak kilka przypadków delecji kryptycznych^{12,14}, co sugeruje, że rzeczywista częstość występowania delecji telomerów chromosomu 22q może być większa niż wcześniej sądzono. Podczas kilku obserwacji pacjentów z delecją w obrębie regionu 22q13.3 wykazano, że sekwencja genu SHANK3 (ProSAP2)²⁰, kodującego białko strukturalne gęstości postsynaptycznej synaps pobudzających i ulegającego ekspresji w korze mózgu i móżdżku¹⁵, została zaburzona^{15,16,17} lub doszło do delecji części tego genu¹⁸, co sprawia, że jest on rozpatrywany jako gen kandydacki potencjalnie odpowiadający za występowanie tego zespołu. Przypadki delecji różnią się drastycznie wielkością — może ona obejmować region od 130 kZ do 9 Mz^{18,19,20}. Zastosowanie sond subtelermycznych chromosomu 22q, dystalnych względem genu ARSA, jest zatem zalecane do badań wszystkich delecji regionu 22q13.3^{20,21}.

Specyfikacja sondy

TUPLE1, 22q11.2, kolor czerwony
N85A3, 22q13.3, kolor zielony



Sonda TUPLE1 Probe ma długość 113 kZ, jest wyznakowana czerwonym fluoroforem i obejmuje większość sekwencji genu TUPLE1 (HIRA). Sonda N85A3 (45 kZ), wyznakowana zielonym fluoroforem, jest umiejscowiona w regionie 22q13.3 i obejmuje telomeryczny koniec genu SHANK3, umożliwiając identyfikację delecji regionu 22q13.3 położonych najbardziej dystalnie. Te dwie unikalne sekwencje pełnią funkcję wzajemnych sond kontrolnych i umożliwiają identyfikację chromosomu 22.

Dostarczone materiały

Sonda: 50 µl na fiolkę (5 testów) lub 100 µl na fiolkę (10 testów)
Ilość sondy TUPLE1 Probe wyznakowanej czerwonym fluoroforem: 15–19 ng/test
Ilość sondy N85A3 Probe wyznakowanej zielonym fluoroforem: 40–50 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. 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 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 przeniesienie 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. Barwiacze Coplina z tworzywa sztucznego lub szklane.
7. Szczypczyki.
8. Olejek imersyjny odpowiedni do obiektów 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 obiektu 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 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 ograniczyć 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.

- 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.
- Pobrać 10 µl roztworu sond na test i przenieść pobraną objętość do próbówki mikrowirówkowej. 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 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 antyfade 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 powinny być widoczne dwa sygnały czerwone i dwa sygnały zielone (2C, 2Z). W komórce z delecją genu DGCR — sekwencji docelowej dla sondy — powinny być widoczne jeden sygnał czerwony i dwa zielone sygnały kontrolne (1C, 2Z), a w komórce z delecją subtelerowej sondy (2C, 1Z) powinny być widoczne dwa czerwone sygnały kontrolne i jeden sygnał zielony (2C, 1Z).

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

- Pinsky L, DiGeorge AM, J Pediatr 1965;66:1049-54
- Shprintzen RJ *et al.*, Cleft Palate J 1978;15:56-62
- Burn J *et al.*, J Med Genet 1993;30:822-4
- Wilson DI *et al.*, J Med Genet 1993;30:852-6
- Driscoll DA *et al.*, J Am Hum Genet 1992;50:924-33
- Goldmuntz E *et al.*, J Med Genet 1993;30:807-12
- Tezenas Du Montcel S *et al.*, J Med Genet 1996;33:719
- Driscoll DA *et al.*, Am J Med Genet 1992;44(2):261-8
- Scambler PJ *et al.*, Genomics 1991;10:201-6
- Halford S *et al.*, Hum Mol Genet 1993;2(12):2099-107
- Carlson C *et al.*, Am J Hum Genet 1997;61:620-9
- Phelan MC *et al.*, Am J Med Genet 2001;101(2):91-9
- Phelan MC. Orphanet Journal of Rare Diseases 2008, 3:14
- Prasad C *et al.*, Clin Genet 2000;57(2):103-9
- Beeckers TM *et al.*, J Neurochem 2002;81(5):903-10

- Bonaglia MC *et al.*, Am J Hum Genet 2001;69(2):261-8
- Anderlid BM *et al.*, Hum Genet 2002;110(5):439-43
- Wilson HL *et al.*, J Med Genet 2003;40(8):575-84
- Dupont C *et al.*, French Speaking Cytogeneticists Association Congress 2003
- Luciani J *et al.*, J Med Genet 2003;40(9):690-6
- Chen CP *et al.*, Prenat Diagn 2003;23(6):504-8

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. 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

