



A Sismex Group Company



Instrukcja użytkownika
REF: LPU 016-S / LPU 016

Kallmann (KAL1)/STS Probe Combination



WYŁĄCZNIE DO UŻYTKU PROFESJONALNEGO

POLSKI

Dalsze informacje dostępne pod adresem www.ogt.com

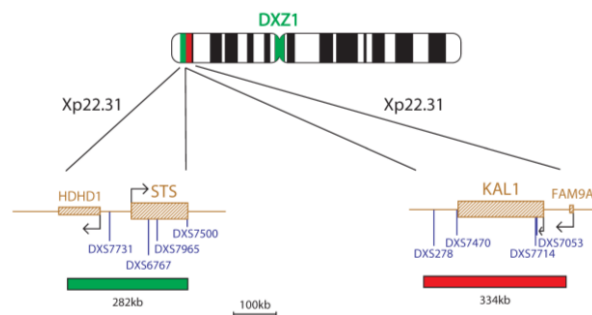
Fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (Fluorescence *In Situ* Hybridisation, FISH) to technika, która umożliwia wykrywanie sekwencji DNA na chromosomach metafazowych lub w jądrach interfazowych obecnych w utrwalonych próbkach cytogenetycznych. Technika ta obejmuje wykorzystanie sond DNA, które hybrydują 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 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

Zespół Kallmanna (Kallmann Syndrome, KS) to choroba rozwojowa charakteryzująca się anosmią³ i hipogonadyzmem hipogonadotropowym (HH), który odpowiada za brak spontanicznego dojrzewania płciowego¹. Zespół Kallmanna to niejednorodna grupa genetycznych zaburzeń rozwojowych, która występuje z częstotnością wynoszącą około 1 przypadek na 8000 mężczyzn i 1 przypadek na 40 000 kobiet². Wyróżniane są trzy tryby dziedziczenia tego zespołu: związany z chromosomem X, autosomalny dominujący i autosomalny recesywny^{1,4}. Wykazano, że mutacje w genie KAL1 zlokalizowanym w regionie Xp22.3 prowadzą do zespołu KS związanego z chromosomem X⁵. Gen KAL1 zawiera 14 eksonów i rozciąga się na długość 200 kb. Nieprawidłowości genu KAL1 zgłaszane u pacjentów z zespołem KS obejmują mutacje zmiany sensu i typu nonsens, mutacje miejsc splicingowych, delecje wewnętrzgenowe i submikroskopowe delecje chromosomowe obejmujące cały gen KAL1⁷. Niedobór sulfatazy steroidowej (Steroid Sulphatase Deficiency, STS), nazywany również rybią łuską związaną z chromosomem X⁸, jest drugą najczęściej rozpoznawaną postacią rybiej łuski i jednym z najczęściej występujących u ludzi zaburzeń związanych z niedoborem enzymów. Niedobór enzymu STS prowadzi do regularnego rogowacenia skóry i powstawania ciemnych, nawarstwiających się płatów⁹. Gen kodujący to białko zostaje zmapowany do dystalnego krótkiego ramienia chromosomu X, który nie podlega procesowi inaktywacji chromosomu X, i charakteryzuje się najwyższym wskaźnikiem delecji chromosomowych wśród wszystkich zaburzeń genetycznych¹⁰. Całkowitą delecję genu STS stwierdzono u ponad 90% pacjentów¹¹. Delecje te mogą obejmować również sąsiadujące geny, prowadząc do zespołów przyległych genów. Niedobór STS może być zatem powiązany z zespołem KS¹².

Specyfikacja sondy

KAL1, Xp22.31, kolor czerwony
STS, Xp22.31, kolor zielony
DXZ1, Xp11.1-q11.1, kolor zielony



Sonda KAL1 Probe ma długość 334 kb, jest wyznakowana czerwonym fluoroforem i obejmuje cały gen KAL1 oraz markery DXS278 i DXS7053. Sonda STS Probe ma długość 282 kb, jest wyznakowana zielonym fluoroforem i obejmuje gen STS oraz większą część sekwencji genów HDHD1A i STS. Mieszanka sond zawiera również sondę kontrolną dla centromeru chromosomu X (DXZ1) wyznakowaną zielonym fluoroforem.

Dostarczone materiały

Sonda: 50 µl na fiolkę (5 testów) lub 100 µl na fiolkę (10 testów)
Ilość sondy KAL1 Probe wyznakowanej czerwonym fluoroforem: 10-12 ng/test
Ilość sondy STS Probe wyznakowanej zielonym fluoroforem: 79-99 ng/test
Ilość sondy DXZ1 Probe wyznakowanej zielonym fluoroforem: 8-10 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 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 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 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 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 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 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 antifade na każdą próbkę.
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.

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. 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.

Wyniki oczekiwane

W prawidłowej komórce osoby płci męskiej (XY) powinny być widoczne jeden sygnał czerwony i dwa sygnały zielone (1C, 2Z) lub jeden żółty sygnał fuzyjny i jeden sygnał zielony (1Z, 1Z). W komórce z delecją w obrębie regionów genów KAL1 i STS powinien być widoczny jeden zielony sygnał kontrolny (0C, 1Z), w komórce z delecją genu STS powinny być widoczne jeden sygnał czerwony i jeden sygnał zielony (1C, 1Z), a w komórce z delecją genu KAL1 powinny być widoczne dwa sygnały zielone (0C, 2Z).

W prawidłowej komórce osoby płci żeńskiej (XX) powinny być widoczne dwa sygnały czerwone i cztery sygnały zielone (2C, 4Z) lub dwa sygnały żółte i dwa sygnały zielone (2Z, 2Z). W komórce z delecją w obrębie regionów genów KAL1 i STS powinny być widoczne jeden sygnał żółty i dwa zielone sygnały kontrolne (1Z, 2Z), w komórce z delecją genu STS powinny być widoczne jeden sygnał żółty, jeden sygnał czerwony i dwa sygnały zielone (1Z, 1C, 2Z), a w komórce z delecją genu KAL1 powinny być widoczne jeden sygnał żółty i trzy sygnały zielone (1Z, 3Z).

Sondy komplementarne z regionami genów STS i KAL1 mogą wykazywać silną hybrydyzację krzyżową z chromosomem Y w związku z obecnością sekwencji homologicznych w tym regionie.

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.oqt.com

Piśmiennictwo

1. Kallmann FJ *et al.*, Am J Ment Defic 1944;48:203-36
2. Hu Y *et al.*, Int J Biochem Cell Biol 2003;35:1157-62
3. Hockaday TD, Postgrad Med J 1966;42:572-4

4. White BJ, Am J Med Genet 1983;15:417-35
5. Hardelin JP *et al.*, Human Mol Genet 1993;2:373-7
6. Del Castillo I *et al.*, Nat Genet 1992;2:305-10
7. Izumi Y *et al.*, Endocr J 2001;48:143-9
8. Wells RS *et al.*, Arch Dermatol 1965;92(1):1-6
9. Valdes-Flores M *et al.*, J Invest Dermatol. 2001;116(3):456-8.
10. Hernandez-Martin A *et al.*, Br J Dermatol 1999;141(4):617-27
11. Hazan C *et al.*, Dermatology Online 2005;11(4):12
12. Paige DG *et al.*, Br J Dermatol 1994;131(5):622-9

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
T: +44(0)1223 294048
F: +44(0)1223 294986
E: probes@cytoCell.com
W: www.oqt.com