



A Sysmex Group Company



Instrukcja użytkownika  
REF: LPU 013-S / LPU 013

## Cri-Du-Chat/SOTOS Probe Combination



WYŁĄCZNIE DO UŻYTKU PROFESJONALNEGO

POLSKI

Dalsze informacje dostępne pod adresem [www.ogt.com](http://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 zhybrydowane do materiału docelowego można następnie obserwować pod mikroskopem fluorescencyjnym.

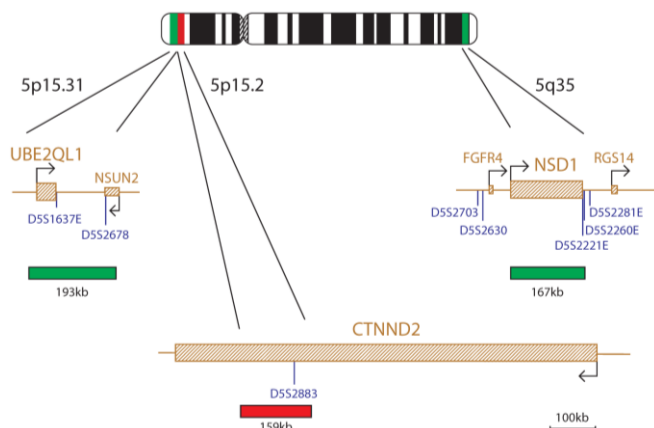
### Informacje o sondzie

Zespół cri du chat (zespół „kocięgo krzyku”) to zespół mnogich wad wrodzonych odznaczający się opóźnieniem umysłowym, mikrocefalią, nietypową budową twarzy i charakterystycznym płaczem w okresie noworodkowym, przypominającym miauczenie kota.

Zespół cri du chat powiązany z obecnością delecji części ramienia krótkiego chromosomu 5.; delecje te różnią się wielkością<sup>1</sup>. Szacowana częstość występowania tego zespołu wynosi 1 na 20 000–50 000 urodzeń<sup>2</sup>, sprawiając, że jest to jeden z częściej spotykanych zespołów związanych z delecjami. Krytyczny region chromosomu odpowiedzialny za piskliwy płacz został zmapowany do proksymalnej części prążka 5p15.3 chromosomu<sup>3</sup>. Region odpowiedzialny za pozostałe cechy zespołu został zmapowany do prążka 5p15.2<sup>3,4,5</sup>. Zespół Sotosa to zespół wad neurologicznych odznaczający się charakterystycznym wyglądem twarzy, nadmiernym wzrostem w dzieciństwie i opóźnieniem rozwoju<sup>6</sup>. Z zespołem Sotosa powiązane również przypadki powstawania nowotworów złośliwych<sup>7</sup>. Gen NSD1 kodujący metylotransferazę histonów, która bierze udział w regulacji chromatyny<sup>8</sup>, został zidentyfikowany jako gen, którego sekwencja ulega zaburzeniu przez miejsce złamania w regionie 5q35 u pacjentów będących nosicielami translokacji chromosomowej<sup>9</sup>. Haploinsuficjencja genu NSD1 wydaje się być głównym czynnikiem powodującym zespół Sotosa.

### Specyfikacja sondy

Cri-Du-Chat (CTNND2), 5p15.2, kolor czerwony  
Cri-Du-Chat (UBE2QL1), 5p15.31, kolor zielony  
SOTOS, 5q35, kolor zielony



Sonda CTNND2 Probe ma długość 159 kb, jest wyznakowana czerwonym fluoroforem i obejmuje region, który zawiera gen D5S2883. Sonda UBE2QL1 Probe ma długość 193 kb, jest wyznakowana zielonym fluoroforem i obejmuje region, który zawiera markery D5S1637E i D5S2678, oraz cały gen UBE2QL1. Sonda SOTOS Probe ma długość 167 kb, jest wyznakowana zielonym fluoroforem i obejmuje gen NSD1. Te trzy unikalne sekwencje pełnią funkcję wzajemnych sond kontrolnych i umożliwiają identyfikację chromosomu 5.

### Dostarczone materiały

**Sonda:** 50 µl na fiolkę (5 testów) lub 100 µl na fiolkę (10 testów)  
Ilość sondy Cri-Du-Chat (CTNND2) Probe wyznakowanej czerwonym fluoroforem: 18-22 ng/test  
Ilość sondy Cri-Du-Chat (UBE2QL1) Probe wyznakowanej zielonym fluoroforem: 42-53 ng/test  
Ilość sondy SOTOS Probe wyznakowanej zielonym fluoroforem: 42-53 ng/test  
Sondy są dostarczane we wstępnie wymieszanym roztworze hybrydacyjnym (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. Mieszany 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 przenoszenie różnych objętości cieczy w zakresie 1–200 µl.
3. Łażnia 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 próbki 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 zielone i dwa żółte sygnały fuzyjne (2Z, 2Ż). W komórce z delecją genu UBE2QL1 — sekwencji docelowej dla sondy — powinny być widoczne jeden sygnał czerwony, jeden żółty sygnał fuzyjny i dwa sygnały zielone (1C, 1Ż, 2Z), a w komórce z delecją genu CTNND2 — sekwencji docelowej dla sondy — powinny być widoczne jeden żółty sygnał fuzyjny i trzy sygnały zielone (1Ż, 3Z). W komórce z delecją genu NSD1 powinny być widoczne dwa żółte sygnały fuzyjne i jeden sygnał zielony (2Ż, 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

- Lejeune J *et al.*, C R Hebd Seances Acad Sci 1963;257:3098-102
- Niebuhr E *et al.*, Hum Genet 1978;44:227-75
- Mainardi PC *et al.*, J Med Genet 2001;38:151-8
- Overhauser J *et al.*, Hum Mol Genet 1994;3:247-52
- Wu Q *et al.*, Eur J Hum Genet 2005;13:475-85
- Cole TR and Hughes HE, J Med Genet 1994;31(1):20-32
- Maldonado V *et al.*, Am J Dis Child 1984;138:486-8
- Tatton-Brown K and Rahman N, Eur J Hum Genet 2007;15:264-71
- Kurotaki N *et al.*, Nat Genet 2002;30:365-6

REF	PL: Numer katalogowy
IVD	PL: Wyrób medyczny do diagnostyki <i>in vitro</i>
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. 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.ogt.com

