



A Sysmex Group Company



Instrukcja użytkownika  
REF: LPU 010-S / LPU 010

## DiGeorge/VCFS N25 and 22q13.3 Deletion 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 DiGeorge'a

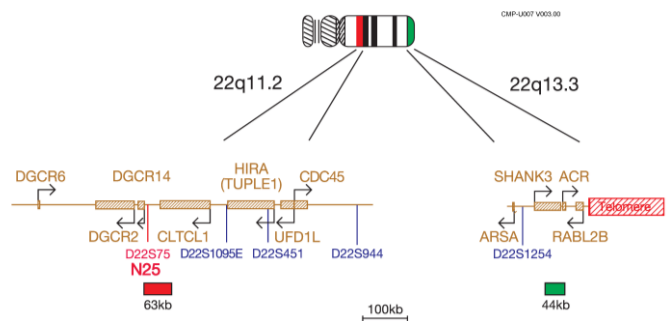
Zespół DiGeorge'a<sup>1</sup>, a także wiele zespołów wad wrodzonych, w tym zespół podniebieno-sercowo-twarzowy (Velocardiofacial Syndrome, VCFS)<sup>2</sup>, charakteryzują się delecją w obrębie regionu 22q11.2 chromosomu 22.<sup>2,3,4,5</sup> Delecje w obrębie chromosomu 22. są zbiorczo określane akronimem 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 22q11.2<sup>6</sup>. Częstość występowania tych wad jest szacowana na od 1:4000 do 1:9700 żywych urodzeń<sup>7</sup>, 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<sup>5,8,9</sup>. W obrębie regionu DGCR wyszczególniono minimalny region krytyczny o długości 300–480 kb<sup>10,11</sup> który obejmuje kilka genów, w tym geny TUPLE1 (HIRA), TBX1, SLC25A1 (CTP) i CLTCL1.

### 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<sup>12,13</sup>. Niektóre delecje końcowego regionu chromosomu 22q są widoczne w badaniu cytogenetycznym. Zgłoszono jednak kilka przypadków delecji krytycznych<sup>12,14</sup>, 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)<sup>20</sup>, kodującego białko strukturalne gęstości postsynaptycznej synaps pobudzających i ulegającego ekspresji w korze mózgu i mózdzku<sup>15</sup>, została zaburzona<sup>15,16,17</sup> lub doszło do delecji części tego genu<sup>18</sup>, co sprawia, że jest on rozpatrywany jako gen kandydatki potencjalnie odpowiadający za występowanie tego zespołu. Przypadki delecji różnią się drastycznie wielkością — może ona obejmować region od 130 kb do 9 Mz<sup>18,19,20</sup>. Zastosowanie sond subtelomerycznych chromosomu 22q, dystalnych względem genu ARSA, jest zatem zalecane do badań wszystkich delecji regionu 22q13.3<sup>20,21</sup>.

### Specyfikacja sondy

N25, 22q11.2, kolor czerwony  
N85A3, 22q13.3, kolor zielony



Sonda N25 Probe ma długość 63 kb, jest wyznakowana czerwonym fluoroforem i obejmuje region z markerem D22S75 i centromerycznym końcem genu CLTCL1. Sonda N85A3 (44 kb), wyznakowana zielonym fluoroforem, jest umiejscowiona na prążku 22q13.3 i obejmuje telomeryczny koniec genu SHANK3, umożliwiając identyfikację delecji prążka 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 N25 Probe wyznakowanej czerwonym fluoroforem: 23-28 ng/test  
Ilość sondy N85A3 Probe wyznakowanej zielonym fluoroforem: 30-38 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

- Do diagnostyki *in vitro*. Wyłącznie do użytku profesjonalnego.
- Podczas pracy z sondami DNA i barwnikiem kontrastowym DAPI należy nosić rękawiczki.
- Mieszanie 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.
- DAPI jest potencjalnym czynnikiem rakotwórczym. Zachować ostrożność podczas pracy z tym produktem; nosić rękawiczki i fartuch laboratoryjny. Przy usuwaniu słupek dużą ilością wody.
- 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

- Płyta grzewcza (ze stabilną płytą i możliwością dokładnej kontroli temperatury do 80°C).
- Mikropipety i końcówki umożliwiające przenoszenie różnych objętości cieczy w zakresie 1–200 µl.
- Łaźnia wodna z możliwością dokładnej kontroli temperatury na poziomie 72°C.
- Probówki mikrowirówkowe (0,5 ml).
- Mikroskop fluorescencyjny (patrz część „Zalecenia dotyczące mikroskopu fluorescencyjnego”).
- Barwiacze Coplina z tworzywa sztucznego lub szklane.
- Szczypczyki.
- Olejek imersyjny odpowiedni do obiektów mikroskopowych klasy fluorescencyjnej.
- Wirówka laboratoryjna.
- Szkiełka mikroskopowe.
- Szkiełka nakrywkowe o wymiarach 24x24 mm.
- Stoper.
- Inkubator nastawiony na temperaturę 37°C.
- 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 utrwalańcu Carnoy. 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

- Wkropić próbkę komórek na szkiełko mikroskopowe. Pozostawić do wyschnięcia.
- 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 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 antyfady 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 N25 — sekwencji docelowej dla sondy — powinny być widoczne jeden sygnał czerwony i dwa zielone sygnały kontrolne (1C, 2Z), a w komórce z delecją subtelomerowej sondy 22q 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
IVD	PL: Wyrób medyczny do diagnostyki <i>in vitro</i>
LOT	PL: Kod partii
	PL: Zatrzyj 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