



A Sysmex Group Company



Instruções de Utilização
REF: LPS 038-S / LPS 038

IGK Breakpart Probe



APENAS PARA USO PROFISSIONAL

PORTUGUÊS

Mais informações disponíveis em www.ogt.com

A hibridação *in situ* por fluorescência (FISH) é uma técnica que permite detetar sequências de ADN em cromossomas metafásicos ou em núcleos interfásicos de amostras citogenéticas fixadas. A técnica recorre a sondas de ADN que se hibridizam com cromossomas inteiros ou sequências únicas individuais e serve de forte adjuvante à citogenética clássica. Desenvolvimentos recentes fizeram com que esta valiosa técnica possa agora ser aplicada também à avaliação de biopsias de tumores sólidos, o que pode fornecer informações importantes para a previsão da progressão do tumor. As metodologias atuais, nomeadamente a imuno-histoquímica ou a "Southern blotting", podem fornecer informações ao nível da expressão genética. Quando é realizada em secções de tecido (quer incluído em crióstato ou parafina), a FISH pode fornecer informações ao nível do gene, *in situ*, no local exato dentro do tumor. Isto pode revelar a heterogeneidade entre células e permitir a deteção de pequenos clones de células geneticamente distintas.

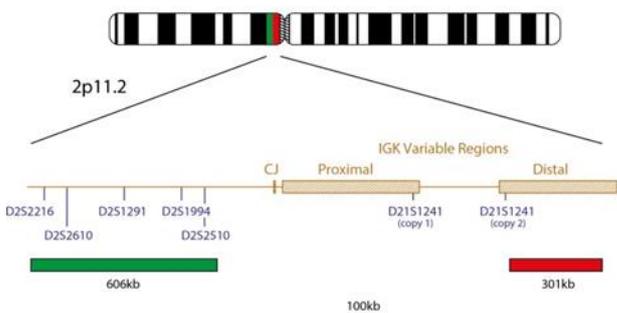
Informações Sobre as Sondas

As translocações que envolvem os loci de imunoglobulina são eventos recorrentes em vários subtipos de linfomas de células B. Além das translocações que envolvem o locus IGH, têm sido descritas translocações variantes em 5–10% das neoplasias de células B que envolvem o locus kappa da cadeia leve da imunoglobulina (IGK) no 2p11.2 ou o locus lambda da cadeia leve da imunoglobulina (IGL) no 22q11^{1,2}. As translocações mais conhecidas que envolvem os loci da cadeia leve da IG são as translocações de Burkitt variantes t(2;8)(p12;q24) e t(8;22)(q24;q11) presentes em até 21% de todos os linfomas de Burkitt³. Outras translocações envolvem o oncogene BCL6: t(2;3)(p12;q27) e t(3;22)(q27;q11) e o locus BCL2: t(2;18)(p12;q21) e t(18;22)(q21;q11)⁵. As translocações que envolvem os loci de cadeia leve da IG levam geralmente à rutura na região de junção do respetivo locus². O IGK tem uma estrutura largamente duplicada, sendo as regiões de genes duplicados 96–100% idênticas. A cópia proximal do IGK está presente num contig de 542 kb com 22 segmentos de gene de variável potencialmente funcional (IGKV) e 18 pseudogenes mais cinco segmentos (J) de junção e um segmento de gene constante do IGK (IGKC). A cópia distal é um contig de 433 kb com 21 segmentos de genes IGKV potencialmente funcionais e 15 pseudogenes. As duas cópias são separadas por uma sequência de ADN de 800 kb sem qualquer segmento IGKV¹.

Especificação das Sondas

IGK, 2p11.2, Vermelho
IGK, 2p11.2, Verde

CMP-H034 v005.00



O produto de IGK consiste numa sonda de 301 kb, marcada a vermelho, que abrange parte da região Variável distal do IGK, e numa sonda verde, que abrange uma região de 606 kb telomérica aos segmentos de Junção e segmento Constante do IGK. A sonda verde estende-se a partir de uma posição telomérica

ao marcador D2S2216 e continua até uma posição centromérica ao marcador D2S2510.

Materiais Fornecidos

Sonda: 50 µl por frasco (5 testes) ou 100 µl por frasco (10 testes)

Quantidade de sonda vermelha de IGK: 40–50 ng/teste

Quantidade de sonda verde de IGK: 150–187,5 ng/teste

As sondas são fornecidas pré-misturadas em solução de hibridação (formamida; sulfato de dextrano; SSC) e estão prontas a serem utilizadas.

Contracorante: 150 µl por frasco (15 testes)

O contracorante é o DAPI Antifade (ES: 0,125 µg/ml DAPI [4,6-diamidino-2-fenilindol]).

Advertências e Precauções

1. Para utilização em diagnóstico *in vitro*. Apenas para uso profissional.
2. Use luvas quando manusear sondas de ADN e o contracorante DAPI.
3. As misturas de sondas contêm formamida, que é um teratogénico; não inalar vapores nem permitir o contacto com a pele. Use luvas, uma bata de laboratório e manuseie num exaustor de laboratório. Ao eliminar, utilizar grandes quantidades de água.
4. O DAPI é um potencial agente cancerígeno. Manuseie com cuidado; use luvas e uma bata de laboratório. Ao eliminar, utilizar grandes quantidades de água.
5. Todos os materiais perigosos devem ser eliminados de acordo com as diretrizes da sua instituição relativamente à eliminação de resíduos perigosos.

Conservação e Manuseamento

O kit deve ser conservado num congelador a uma temperatura entre -25 °C e -15 °C até ao prazo de validade indicado no rótulo do kit. Os frascos de sonda e de contracorante têm de ser conservados num local escuro.

Equipamento Necessário, mas Não Fornecido

1. Placa quente (com uma placa sólida e controlo exato da temperatura até 80 °C).
2. Micropipetas e pontas de volume variável, entre 1 µl e 200 µl.
3. Banho-maria com controlo exato da temperatura de 72 °C.
4. Tubos de microcentrifugação (0,5 ml).
5. Microscópio de fluorescência (ver secção "Recomendação de Microscópio de Fluorescência").
6. Jarras de Coplin em plástico ou vidro.
7. Pinça.
8. Óleo de imersão para lentes de microscópio de fluorescência.
9. Centrífuga de bancada.
10. Lâminas de microscópio.
11. Lamelas de 24 x 24 mm.
12. Temporizador.
13. Incubadora a 37 °C.
14. Cola de solução de borracha.
15. Tissue Pretreatment Kit (LPS 100).

Recomendação de Microscópio de Fluorescência

Para obter a melhor visualização possível da sonda, recomendamos uma lâmpada de mercúrio de 100 Watts e lentes planas apocromáticas 63x ou 100x. O filtro passa-banda triplo DAPI/FITC/Texas Red é ideal para visualizar todas as substâncias fluorescentes e DAPI simultaneamente. Alternativamente, para a visualização de substâncias fluorescentes vermelhas e verdes, utilize o filtro passa-banda duplo FITC/Texas Red.

Preparação de Amostras

Este kit foi concebido para utilização em:

- Secções de tecido fixado em formalina e incluído em parafina (FFPE) ou microarrays de tecido (TMA); devem ser utilizadas secções de tecido com uma espessura de 4 µm–6 µm.
- Amostras de sangue periférico ou culturas de células da medula óssea fixadas no fixador de Carnoy e secas ao ar em lâminas de microscópio de acordo com procedimentos citogenéticos padrão.

Todas as amostras devem ser preparadas de acordo com as diretrizes do laboratório ou da instituição.

Protocolo FISH

(Nota: Certifique-se de que a exposição da sonda às luzes do laboratório seja sempre limitada)

Procedimento de FFPE

Pré-tratamento das Amostras de Tecido

O pré-tratamento das amostras de tecido deve ser feito de acordo com as diretrizes do laboratório ou da instituição em causa. Para obter os melhores resultados, utilize o Tissue Pretreatment Kit (LPS 100).

Pré-desnaturação

1. Retire a sonda do congelador e deixe-a aquecer até à temperatura ambiente (TA)
2. Certifique-se de que a solução de sonda é uniformemente misturada com uma pipeta.
3. Retire 10 µl–15 µl (consoante o tamanho do tecido) de sonda por cada teste e transfira-os para um tubo de microcentrifugação. Reponha rapidamente o restante volume da sonda no congelador.
4. Coloque a sonda e a lâmina da amostra numa placa quente a 37 °C (+/-1 °C) durante 5 minutos para pré-aquecimento.
5. Coloque 10 µl–15 µl da solução de sonda na amostra e aplique uma lamela com cuidado. Vede com cola de solução de borracha e deixe a cola secar completamente.

Desnaturação

- Desnatura a amostra e a sonda em simultâneo aquecendo a lâmina numa placa quente a 75 °C (+/-1 °C) durante 5 minutos.

Hibridação

- Coloque a lâmina num recipiente húmido e resistente à luz a 37 °C (+/-1 °C) durante a noite.

Lavagens Pós-hibridação

- Retire a lamela e todos os vestígios de cola com cuidado.
- Mergulhe a lâmina em SSC 0,4x (pH 7,0) a 72 °C (+/-1 °C) durante 2 minutos sem agitar.
- Drene a lâmina e mergulhe-a em SSC 2x e 0,05% de Tween-20 à TA (pH 7,0) durante 30 segundos sem agitar.
- Drene a lâmina e aplique 10 µl–15 µl de DAPI Antifade em cada amostra.
- Cubra a amostra com uma lamela, elimine eventuais bolhas e deixe que a cor se desenvolva no escuro durante 10 minutos.
- Visualize com um microscópio de fluorescência.

Procedimento de Sangue Periférico ou Culturas de Medula Óssea

Preparação das Lâminas

- Coloque uma gota de amostra celular numa lâmina de vidro para microscópio. Deixe secar.
- Mergulhe a lâmina em SSC 2x durante 2 minutos à temperatura ambiente (TA) sem agitar.
- Desidrate cada uma numa série de etanol (70%, 85% e 100%) durante 2 minutos à TA.
- Deixe secar.

Pré-desnaturação

- Retire a sonda do congelador e deixe-a aquecer até à TA.
- Certifique-se de que a solução de sonda é uniformemente misturada com uma pipeta.
- Retire 10 µl de sonda por cada teste e transfira-os para um tubo de microcentrifugação. Reponha rapidamente o restante volume da sonda no congelador.
- Coloque a sonda e a lâmina da amostra numa placa quente a 37 °C (+/-1 °C) durante 5 minutos para pré-aquecimento.
- Coloque 10 µl de solução de sonda na amostra de células e aplique uma lamela com cuidado. Vede com cola de solução de borracha e deixe a cola secar completamente.

Desnaturação

- Desnatura a amostra e a sonda em simultâneo aquecendo a lâmina numa placa quente a 75 °C (+/-1 °C) durante 2 minutos.

Hibridação

- Coloque a lâmina num recipiente húmido e resistente à luz a 37 °C (+/-1 °C) durante a noite.

Lavagens Pós-hibridação

- Retire a lamela e todos os vestígios de cola com cuidado.
- Mergulhe a lâmina em SSC 0,4x (pH 7,0) a 72 °C (+/-1 °C) durante 2 minutos sem agitar.
- Drene a lâmina e mergulhe-a em SSC 2x e 0,05% de Tween-20 à TA (pH 7,0) durante 30 segundos sem agitar.
- Drene a lâmina e aplique 10 µl–15 µl de DAPI Antifade em cada amostra.
- Cubra a amostra com uma lamela, elimine eventuais bolhas e deixe que a cor se desenvolva no escuro durante 10 minutos.
- Visualize com um microscópio de fluorescência.

Comentários

Normalmente, a eficiência da hibridação e a morfologia do tecido estão negativamente relacionadas. Os procedimentos de pré-tratamento agressivos que melhoram a eficiência da hibridação (por exemplo, um tempo prolongado de digestão enzimática) tendem a destruir a estrutura das células e a morfologia dos tecidos. No entanto, o pré-tratamento suave poupando as estruturas de tecido pode não ser suficiente para a penetração da sonda e para obter resultados de FISH bem-sucedidos.

A duração ideal do pré-tratamento térmico e do tempo de digestão enzimática dependerá da idade do bloco, da composição do tecido e da qualidade da fixação do tecido. A digestão enzimática deve ser reduzida para biopsias de agulha grossa e quaisquer secções que contenham poucas células tumorais ou que tenham grandes áreas de necrose. Estas amostras têm de ser manuseadas com especial cuidado para evitar uma digestão excessiva.

Estabilidade das Lâminas Acabadas

As lâminas de FISH permanecem analisáveis durante um período máximo de 1 mês se conservadas no escuro a uma temperatura inferior a 4 °C.

Recomendações para o Procedimento

- Não é recomendado o aquecimento ou envelhecimento de lâminas que contém amostras de sangue periférico ou medula óssea, uma vez que tal pode reduzir a fluorescência do sinal.
- As condições de hibridação podem ser negativamente afetadas pela utilização de reagentes que não sejam os fornecidos ou recomendados pela CytoCell Ltd.
- Recomenda-se vivamente a utilização de um termómetro calibrado para medir as temperaturas das soluções, banhos-maria e incubadoras, uma vez que tais temperaturas são críticas para o ótimo desempenho do produto.
- As temperaturas, o pH e as concentrações de lavagem são importantes, uma vez que condições pouco rigorosas podem resultar em ligação não específica da sonda, e condições demasiado rigorosas podem resultar na ausência de sinal.
- Uma desnaturação incompleta pode resultar em ausência de sinal, e uma desnaturação excessiva também pode resultar em ligação não específica.

Resultados Esperados

Na célula normal, esperam-se dois sinais vermelhos/verdes (podem aparecer como amarelos, A) (2A). Uma translocação resultará em 1Verm, 1Verd, 1A: um sinal verde e um sinal vermelho dos cromossomas translocados e um sinal fundido vermelho/verde (podem aparecer como amarelo) do cromossoma normal.

Limitações

A comunicação e a interpretação de resultados FISH devem ser consistentes com as normas da prática profissional e devem tomar em consideração outras informações clínicas e de diagnóstico. Este kit destina-se a ser utilizado como adjuvante de outros testes de diagnóstico laboratoriais e não deve ser iniciada qualquer medida terapêutica apenas com base nos resultados da FISH.

Informações Adicionais

Para obter mais informações sobre o produto, contacte o departamento de assistência técnica da CytoCell.

T: +44 (0)1223 294048

E: techsupport@cytoCell.com

W: www.ogt.com

Bibliografia

- Poulseu TS *et al.*, Leukemia 2002;16:2148-55
- Martin-Subero JI *et al.*, Int J Cancer 2002;98:470-4
- Kornblau SM *et al.*, Hematol Oncol 1991;9:63-78
- Chaganti SR *et al.*, Genes Chromosomes Cancer 1998;23:323-7
- Tashiro S *et al.*, Oncogene 1992;7:573-7

	REF	PT: Número de catálogo
	IVD	PT: Dispositivo de diagnóstico <i>in vitro</i>
	LOT	PT: Código de lote
		PT: Consultar as instruções de utilização
		PT: Fabricante
		PT: Prazo de validade
		PT: Limites de temperatura
		PT: Suficiente para <n> testes
	CONT	PT: Conteúdo

Patentes e Marcas Comerciais

CytoCell é uma marca registada da CytoCell Ltd.

Este produto contém tecnologia licenciada pela Life Technologies Corporation e está disponível apenas para uso em diagnósticos humanos ou para fins de investigação na área das ciências da vida.

CytoCell Ltd.

Oxford Gene Technology,
418 Cambridge Science Park,
Milton Road,
Cambridge, CB4 0PZ, Reino Unido
T: +44(0)1223 294048
F: +44(0)1223 294986
E: probes@cytoCell.com
W: www.ogt.com

