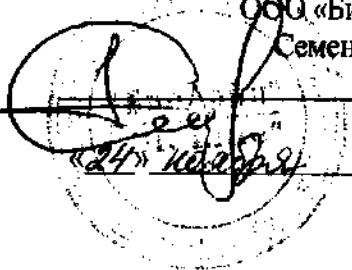


«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор
ООО «БиоЛайн»
Семенов А.В.


24 ноября 2010 г.
М.П.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению Реагентов in vitro для определения хромосомных перестроек методом флуоресцентной гибридизации (FISH) производства: «Цитоселл Лтд», Великобритания (Cytocell Ltd)

1. НАЗНАЧЕНИЕ
2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА
 - 2.1. Принцип действия
 - 2.2. Состав набора
3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ
4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ
5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ
6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ
7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА
8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ
9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ
10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

1. Назначение

Реагенты CytocellTM производства ЦитоСелл Лтд. используются для выявления соответствующих ДНК последовательностей в интерфазных хромосомах или на метафазных пластинках в исследуемых клеточных образцах для определения хромосомных перестроек методом флюоресцентной гибридизации (FISH).

2. Характеристика реагента

2.1 Принцип действия

Флюоресцентная *in situ* гибридизация (FISH) позволяет определить хромосомные перестройки в образцах клеток с использованием специфичного ДНК-фрагмента.

Флюоресцентно меченый ДНК-фрагмент представляет собой нуклеотидную последовательность ограниченного размера, комплементарную определенному участку ядерной ДНК. Связываясь с соответствующими последовательностями ДНК в исследуемом образце, ДНК-фрагмент позволяет выявить локализацию этих последовательностей. Результаты исследования наблюдают и регистрируют с использованием флюоресцентного микроскопа.

2.2 Состав набора

Реагент содержит смесь меченных флюоресцентным красителем фрагментов ДНК в гибридизационном буфере, а также краситель для хромосом DAPI.

3. Аналитические и диагностические характеристики

Данные реагенты необходимы для определения специфичных хромосомных перестроек, играющих важную роль в развитии ряда онкогематологических заболеваний. Выявление хромосомных перестроек играет значительную роль в диагностике и выборе необходимой терапии для пациента.

4. Меры предосторожности

- Продукт предназначен для диагностики *in vitro*.
- Используйте перчатки при работе с реагентом.
- Раствор пробы содержит формамид, обладающий тератогенным эффектом; не вдыхайте пары, избегайте контакта с кожей. При работе используйте перчатки, лабораторный халат, используйте для работы вытяжной шкаф. При попадании реагента на кожу смыть большим количеством воды.
- Краситель DAPI является потенциальным канцерогеном. Работайте с соблюдением методов предосторожности: используйте перчатки и лабораторную одежду. При попадании реагента на кожу смыть большим количеством воды.
- Соблюдайте инструкции по работе с опасными материалами; нормативные документы по утилизации опасных отходов.

5. Оборудование и материалы

Для приготовления цитогенетических препаратов необходимы следующее оборудование и материалы:

- 1) нагревательный столик с контролем температуры на 80⁰C
- 2) лабораторная посуда
- 3) микропипетки объемом 1-200 мкл
- 4) водяная баня с контролем температуры
- 5) пробирки для центрифугирования объемом 0,5мл
- 6) флюоресцентный микроскоп

- 7) стаканчики для отмывки стекол
- 8) пинцет
- 9) иммерсионное масло для флюоресцентного микроскопа
- 10) настольная центрифуга

6. Анализируемые образцы

Образцы клеток периферической крови, костного мозга, культивируемых клеток

7. Проведение анализа:

подготовка образцов

- 1) Для приготовления образцов клеток периферической крови человека и костного мозга клетки необходимо фиксировать с помощью жидкости Карнуа в соответствии с протоколом подготовки стандартных цитогенетических препаратов, нанести на предметные стекла, высушить образцы.
- 2) Промыть подготовленные образцы в цитратном буфере (2x SSC).
- 3) Дегидратировать препарат проведением через серию спиртов (70%, 85%, 100% по 2 минуты при комнатной температуре). Высушить.

пре-денатурация

- 4) реагент, хранящийся при температуре -20°C , разморозить при комнатной температуре, перемешать пипетированием.
- 5) 10 мкл реагента нанести в пробирку для микроцентрифугирования и прогреть при температуре 37°C 10 минут
- 6) нанести 10 мкл пробы на образец и аккуратно закрыть покровным стеклом. Нанести по краю покровного стекла изолирующий клей.

денатурация

- 7) Денатурировать образец и пробу нагреванием на столике при температуре 75°C 2 минуты.

гибридизация

- 8) Поместить образцы во влажную темную камеру при температуре 37°C на 12 часов.

отмывки

- 9) Осторожно удалить клей и покровное стекло с препарата
- 10) промыть стекла с образцами в 0,4x SSC (pH 7,0) при температуре 72°C в течение двух минут.
- 11) Промыть буфером (2x SSC, 0,05% Tween-20 (pH 7,0)) при комнатной температуре в течение 30 секунд.
- 12) Высушить стекла с образцами, нанести 10 мкл раствора для заключения.
- 13) Закрыть образец покровным стеклом, поместить в темное место.

8. Регистрация результатов

Готовые препараты анализируются с помощью флюоресцентного микроскопа, с использованием соответствующих фильтров для регистрации флюоресцентных сигналов. Оценивается цвет, количество и расположение флюоресцентного сигнала, указывающее на наличие хромосомной перестройки.

9. Учет результатов реакции

В состав каждого реагента входят ДНК-фрагменты к регионам возможной хромосомной перестройки, а так же фрагмент ДНК маркирующий соответствующую хромосому. Таким образом каждая проба содержит внутренний контроль. Регистрация всех необходимых флюоресцентных сигналов свидетельствует о достоверности результатов исследования.

10. Условия хранения и эксплуатации набора

Реагенты хранят при температуре -20°C . Реагенты не следует применять после истечения срока годности, указанного на этикетке.

Готовые препараты могут сохраняться до 1 месяца в темноте при комнатной температуре.

Генеральный директор ООО «БиоЛайн»

Александр Владимирович Семенов/

24 ноября 2010г.

М.П.