



ZytoLight

FISH-Tissue Implementation Kit

REF Z-2028-5 Σ 5

REF Z-2028-20 Σ 20

Do fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH) z zastosowaniem dowolnej sondy *ZytoLight* FISH



Wyrób medyczny do diagnostyki *in vitro*
zgodnie z dyrektywą 98/79/WE

1. Przeznaczenie

Zestaw *ZytoLight* FISH-Tissue Implementation Kit jest przeznaczony do stosowania wraz z sondami *ZytoLight* FISH w celu detekcji aberracji genetycznych, np. translokacji, delecji, amplifikacji i chromosomowych aneuploidii, w preparatach utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie, metodą fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH).

Interpretacja wyników musi być wykonana przez wykwalifikowanego patologa w kontekście klinicznej historii pacjenta w odniesieniu do pozostałych klinicznych i patologicznych danych pacjenta.

2. Znaczenie kliniczne

Genetyczne aberracje, np. translokacje, delecje i/lub amplifikacje są związane z różnymi ludzkimi nowotworami. Chromosomowe aneuploidie obserwuje się w wielu wrodzonych zaburzeniach.

3. Zasada testu

Technika fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH) umożliwia wykrywanie i wizualizację określonych sekwencji kwasów nukleinowych w preparatach komórkowych. Fluorescencyjnie oznakowane fragmenty DNA, nazwane sondami, i ich komplementarne docelowe nici DNA w preparatach są wspólnie denaturowane, a następnie łączą się podczas hybrydyzacji. Niespecyficzne i niezwiązane fragmenty sondy są usuwane przez stopniowe przemywanie. Po barwieniu kontrastowym DNA za pomocą DAPI, zhybrydowane fragmenty sondy są zwizualizowane za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego wyposażonego w filtry wzbudzenia i emisji specyficzne dla fluorochromów, którymi fragmenty sondy FISH zostały oznakowane.

4. Dostarczane odczynniki

Zestaw *ZytoLight* FISH-Tissue Implementation Kit składa się z:

Kod	Składnik	Ilość		Pojemnik
		5	20	
PT1	<u>Heat Pretreatment Solution Citric</u>	150 ml	500 ml	Butelka z zakrętką (duża)
ES1	<u>Pepsin Solution</u>	1 ml	4 ml	Butelka z zakrapiaczem z białą zakrętką
WB1	<u>Wash Buffer SSC</u>	210 ml	560 ml	Butelka z zakrętką (duża)
WB2	<u>25x Wash Buffer A</u>	50 ml	2x50 ml	Butelka z zakrętką (średnia)
MT7	<u>DAPI/DuraTect-Solution</u>	0.2 ml	0.8 ml	Naczynie reakcyjne, Niebieska przykrywka
	Instrukcja użycia	1	1	

Z-2028-5 (5 testów): Składniki **ES1** i **MT7** są wystarczające na 5 reakcji. Składnik **WB2** jest wystarczający na 5x 3 barwiacze po 70 ml każdy. Składnik **PT1** jest wystarczający na 2 barwiacze po 70 ml każdy. Składnik **WB1** jest wystarczający na 3 barwiacze po 70 ml każdy.

Z-2028-20 (20 testów): Składniki **ES1** i **MT7** są wystarczające na 20 reakcji. Składnik **WB2** jest wystarczający na 11x 3 barwiacze po 70 ml każdy. Składnik **PT1** jest wystarczający na 7 barwiaczy po 70 ml każdy. Składnik **WB1** jest wystarczający na 8 barwiaczy po 70 ml każdy.

5. Materiały wymagane, ale nie dostarczane

- Sonda *ZytoLight* FISH
- Pozytywny i negatywny preparat kontrolny
- Szkiełka mikroskopowe pozytywnie naładowane
- Szkiełka mikroskopowe, niepokryte
- Łażnia wodna (70°C)
- Hybrydyzator lub płyta grzewcza
- Hybrydyzator lub komora wilgotność ciowa w ciepłarni do hybrydyzacji
- Regulowane pipety (10 μ l, 25 μ l)
- Barwiacze
- Timer
- Skalibrowany termometr
- Etanol lub odczynnik alkoholowy
- Ksylen
- Dejonizowana lub destylowana woda
- Szkiełka nakrywkowe (22 mm x 22 mm, 24 mm x 60 mm)
- Rubber cement, np. Fixogum Rubber Cement (Nr. kat. E-4005-50/-125) lub podobny
- Odpowiednio utrzymany mikroskop fluorescencyjny (400-1000x)
- Olejek immersyjny zatwierdzony do mikroskopii fluorescencyjnej
- Odpowiedni zestaw filtrów

6. Przechowywanie i obsługa

Składniki zestawu muszą być przechowywane w 2-8°C. Dodatkowo DAPI/DuraTect-Solution (**MT7**) muszą być chronione przed światłem. Powróć do warunków przechowywania natychmiast po użyciu. Jeśli te warunki przechowywania są przestrzegane, zestaw będzie działał, bez utraty wydajności, przynajmniej do daty ważności wydrukowanej na etykiecie. Nie należy używać odczynników po upływie terminu ważności podanego na etykiecie.

7. Ostrzeżenia i środki ostrożności

- Przeczytaj instrukcję użytkowania przed użyciem!
- Nie stosować odczynników po przekroczeniu daty ważności!
- Produkt ten zawiera substancje (w małym stężeniu i objętości), które są szkodliwe dla zdrowia i potencjalnie zakaźne. Unikaj jakiegokolwiek bezpośredniego kontaktu z odczynnikami. Podejmij odpowiednie środki ochronne (stosuj rękawiczki ochronne, okulary ochronne i odzież laboratoryjną)!

- Jeśli odczynniki wejdą w kontakt ze skórą, natychmiast oplucz skórę dużą ilością wody!
- Karta charakterystyki substancji niebezpiecznej jest dostępna na żądanie profesjonalnego użytkownika.
- Nie używaj ponownie odczynników.
- Próbkę nie mogą wyschnąć podczas etapów hybrydyzacji i płukania!
- **DAPI/DuraTect-Solution (MT7)** nie powinien być wystawiany na działanie światła, szczególnie silnego światła, przez dłuższy czas, tj. w miarę możliwości należy wykonać wszystkie czynności w ciemności i/lub stosując pojemniki chroniące przed światłem!

Zwroty wskazujące rodzaj zagrożenia i określające środki ostrożności dla PT1, WB1 i WB2:

Składnikiem określającym zagrożenie jest mieszanina: 5-chloro-2-metylo-4-isotiazolin-3-onu [nr WE 247-500-7] i 2-metylo-2H-isotiazol-3-onu [nr WE 220-239-6] (3:1).



Uwaga

H317	Może powodować reakcję alergiczną skóry.
P261	Unikać wdychania pyłu/dymu/gazu/mgły/par/rozpylonej cieczy.
P272	Zanieczyszczonej odzieży ochronnej nie wносить poza miejsce pracy.
P280	Stosować rękawice ochronne/odzież ochronną/ochronę oczu/ochronę twarzy.
P302+P352	W PRZYPADKU KONTAKTU ZE SKÓRĄ: Umyć dużą ilością wody.
P333+P313	W przypadku wystąpienia podrażnienia skóry lub wysypki: Zasięgnąć porady/zgłosić się pod opiekę lekarza.
P362+P364	Zanieczyszczonej odzieży zdjąć i wyprać przed ponownym użyciem.

8. Ograniczenia

- Do zastosowań w diagnostyce *in vitro*.
- Tylko do użytku profesjonalnego.
- Interpretacja kliniczna jakiegokolwiek pozytywnego zabarwienia lub jego braku musi być wykonana w kontekście historii klinicznej, morfologii, innych kryteriów histopatologicznych, a także innych badań diagnostycznych. Obowiązkiem wykwalifikowanego patologa jest zaznajomienie się z sondami FISH, odczynnikami, panelami diagnostycznymi i metodami stosowanymi do wytwarzania barwionego preparatu. Barwienie musi być wykonane w certyfikowanym, licencjonowanym laboratorium pod nadzorem patologa, który jest odpowiedzialny za przeglądanie wybarwionych preparatów i zapewnienie odpowiedniej kontroli pozytywnej i negatywnej.
- Wybarwienie preparatów, szczególnie intensywność sygnału i barwienie tła, zależy od obróbki i przetwarzania próbki przed barwieniem. Nieodpowiednie utralanie, zamrażanie, rozmrażanie, płukanie, suszenie, podgrzewanie krojenie, lub zanieczyszczenie innym materiałem lub płynami może powodować artefakty lub fałszywe wyniki. Niespójne wyniki mogą wynikać ze zmian w metodach utralania i zatapiania, jak również wynikać z nieprawidłowości w próbce.
- Wydajność została zatwierdzona przy użyciu procedur opisanych w niniejszej instrukcji użytkownika. Modyfikacje tych procedur mogą zmienić wydajność i muszą zostać zatwierdzone przez użytkownika.

9. Substancje zakłócające

Czerwone krwinki krwi obecne w próbce mogą wykazywać autofluorescencję, która utrudnia rozpoznawanie sygnału.

Następujące utralacze są niekompatybilne z FISH:

- Utralacz Bouin'a
- Utralacz B5
- Utralacze kwasne (np. kwas pikrynowy)
- Utralacz Zenker'a
- Alkohole (stosowane samodzielnie)
- Chlorek rtęci

- Utralacz formaldehyd/cynk
- Utralacz Hollande'a
- Niebuforowana formalina

10. Przygotowanie próbek

Zalecenia:

- Utrwalanie w 10% neutralnej buforowanej formalinie przez 24 h w temperaturze pokojowej (18-25°C).
- Rozmiar próbki $\leq 0.5 \text{ cm}^3$.
- Stosuj parafinę jakości premium.
- Zatapianie powinno się odbywać w temperaturze poniżej 65°C.
- Przygotuj skrawki o grubości 2-4 μm .
- Stosuj szkiełka mikroskopowe pozytywnie naładowane.
- Utrwalaj przez 2-16 h w 50-60°C.

11. Obróbka wstępna produktu

25x Wash Buffer (WB2) należy przygotować zgodnie z instrukcjami części 12 „Procedura testu”. Wszystkie pozostałe odczynniki zestawu są gotowe do użycia. Nie jest wymagana rekonstrukcja, mieszanie lub rozcieńczanie.

12. Procedura testu

12.1 Dzień 1

Etap przygotowawczy

- (1) *Przygotuj dwie serie etanolu (70%, 90% i 100% roztwory etanolu):* Rozcieńcz 100% etanol z wodą dejonizowaną lub destylowaną. Roztwory mogą przechowywać w odpowiednich pojemnikach i ponownie wykorzystać.
- (2) *Heat Pretreatment Solution Citric (PT1):* Podgrzej do 98°C.
- (3) *Wash Buffer SSC (WB1):* Przenieść do temperatury pokojowej (RT).
- (4) *ZytoLight FISH Probe:* Przenieść do RT przed użyciem, chroniąc przed światłem.

Opcjonalnie, podczas wykonywania dodatkowego etapu utralania:

(mocno zalecane, jeśli utralanie tkanki nie jest optymalne)
Przygotuj 1% roztwór formaldehydu korzystając z zestawu Formaldehyde Dilution Buffer Set (PT-0006-100)

Etap wstępny (odparafinowanie/roteoliza)

- (1) Inkubuj szkiełka przez 10 min w 70°C (np., na płycie grzewczej).
- (2) Inkubuj szkiełka 2x przez 10 min w ksylenie.
- (3) Inkubuj w 100%, 100%, 90% i 70% etanolu, każdy przez 5 min.
- (4) Przepłucz 2x po 2 min w dejonizowanej lub destylowanej wodzie.
- (5) Inkubuj przez 15 min w podgrzany buforze Heat Pretreatment Solution Citric (PT1) do temperatury 98°C.

Nie zalecamy stosowanie więcej niż osiem szkiełek w barwiaczu.

- (6) Natychmiast przenieść szkiełka do dejonizowanej lub destylowanej wody, przepłucz 2x po 2 min i odsącz lub zlej wodę.
- (7) Nanieś (kroplami) **Pepsin Solution** (E51) na preparat i inkubuj przez 15 min w 37°C w komorze wilgotnościowej.

W zależności od wielu czynników, np. natury i czasu utralania, grubości preparatu i charakteru tkanek/komórek, mogą być wymagane różne czasy inkubacji. Zgodnie z wytycznymi inkubacji zalecamy 2 – 30 min inkubacji dla próbek tkankowych i 2 – 15 min dla próbek cytologicznych. Zasadniczo zaleca się ustalenie optymalnego czasu proteolizy w badaniach wstępnych

- (8) Płucz przez 5 min w **Wash Buffer SSC** (WB1).

Opcjonalnie, podczas wykonywania dodatkowego etapu utralania:

Inkubuj szkiełka przez 15 min w 1% roztworze formaldehydu, a następnie płucz przez 5 min w Wash Buffer SSC (WB1)

- (9) Płucz przez 1 min w dejonizowanej lub destylowanej wodzie.
- (10) Odwodnienie: w 70%, 90% i 100% etanolu, każdy po 1 min
- (11) Wsusz na powietrzu szkiełka.

Uwaga: Przed zastosowaniem sondy upewnij się, że preparaty są całkowicie suche, ponieważ resztkowa wilgość może zmniejszyć intensywność sygnału i/lub wpłynąć na morfologię tkanki.

Denaturacja i hybrydyzacja

- (1) Nanieś pipetą 10 µl sondy ZytoLight FISH Probe na każdy przygotowany wstępnie preparat.

Unikaj długiej ekspozycji sondy na światło.

- (2) Nakryj preparat szkiełkiem nakrywkowym 22 mm x 22 mm (unikaj zamknięcia bąbli powietrza) i uszczelnij preparat.

Rekomendujemy stosowanie rubber cement (np. Fixogum) do uszczelniania preparatów.

- (3) Umieść szkiełka na płycie grzewczej lub hybrydyzatorze i denaturuj preparaty przez 10 min w 75°C.

- (4) Przenieś szkiełka do komory wilgotnościowej i hybryduj przez noc w temperaturze 37°C (np. w ciepłarni hybrydyzatora).

Istotne jest, aby tkanki/komórki nie wyschły podczas etapu hybrydyzacji.

12.2 Dzień 2

Etap przygotowawczy

- (1) *Przygotowanie 1x Wash Buffer A:* Rozcieńcz 1 część 25x Wash Buffer A (WB2) z 24 częściami dejonizowanej lub destylowanej wody. Napełnij 3 barwiacze przygotowanym 1x Wash Buffer A i podgrzej do temperatury 37°C.
- (2) DAPI/DuraTect-Solution (MT7): Przenieś do RT przed użyciem chroniąc przed światłem.

Obróbka po hybrydyzacji i detekcja

- (1) Ostrożnie usuń rubber cement lub klej.
- (2) Usuń szkiełko nakrywkowe przez zanurzenie w 1x buforze płuczącym A w 37 °C przez 1-3 min.
- (3) Przemyj za pomocą 1x Wash Buffer A 2x po 5 min w 37°C.

1x Wash Buffer A powinien być podgrzany. Sprawdź termometrem, jeśli to konieczne.

- (4) Inkubuj szkiełka w 70%, 90% i 100% etanolu, każdy po 1 min.
- (5) Wyszuszyć szkiełka na powietrzu chroniąc przed światłem.
- (6) Nanieś pipetą 25 µl DAPI/DuraTect-Solution (MT7) na szkiełka. Unikając zamknięcia bąbli powietrza przykryj próbki szkiełkiem nakrywkowym (24 mm x 60 mm). Inkubuj w ciemności przez 15 min.

Korzystanie z obciążonej końcówki od pipety w celu zwiększenia wielkości otworu, może ułatwić proces pipetowania. Unikaj długiej ekspozycji na światło.

- (7) Przechowuj szkiełka w ciemności. W przypadku dłuższych okresów przechowywania, powinno się to odbywać w 2-8°C.
- (8) Ocena materiału próbki jest przeprowadzana za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej. Potrzebne są zestawy filtrów dla następujących zakresów długości fal:

Barwnik fluorescencyjny	Wzbudzenie	Emisja
ZyBlue	418 nm	467 nm
ZyGreen	503 nm	528 nm
ZyGold	532 nm	553 nm
ZyOrange	547 nm	572 nm
ZyRed	580 nm	599 nm

13. Interpretacja wyników

Przy użyciu odpowiednich zestawów filtrów w interfazach lub metafazach normalnych komórek lub komórek bez aberracji chromosomów, pojawiają się dwa sygnały na sondę/znacznik fluorescencyjny, z wyjątkiem sond skierowanych na chromosomy X i/lub Y, co skutkuje brakiem do dwóch sygnałów na sondę/znacznik fluorescencyjny, w zależności od płci. W komórkach z aberracjami chromosomowymi inny wzorzec sygnału może być widoczny w interfazach lub metafazach. Aby uzyskać więcej informacji na temat interpretacji wyników, należy zapoznać się z odpowiednią instrukcją sondy.

14. Rekomendowane procedury kontroli jakości

W celu monitorowania prawidłowego przygotowania próbek i odczynników testowych do każdego testu należy dołączyć kontrole wewnętrzne i zewnętrzne. Jeśli wewnętrzne i/lub zewnętrzne kontrole nie wykazują odpowiedniego zabarwienia, wyniki z próbkami od pacjentów muszą być uznane za nieważne.

Kontrola wewnętrzna: Nienowotworowe komórki w obrębie próbki, które wykazują normalny wzorzec sygnału, np. fibroblasty.

Zewnętrzna kontrola: Walidowane preparaty z kontrolą dodatnią i ujemną.

15. Charakterystyka wydajności

Zapoznaj się z instrukcją użycia odpowiedniej sondy.

16. Utylizacja

Utylizacja odczynników musi odbyć się zgodnie z lokalnymi przepisami.

17. Rozwiązywanie problemów

Każde odchylenie od instrukcji obsługi może prowadzić do gorszych wyników barwienia lub braku zabarwienia.

Słabe sygnały lub brak sygnałów

Możliwa przyczyna	Działanie
Niedostępna sekwencja docelowa	Zastosuj odpowiednią kontrolę docelową
Komórki lub tkanki nie są odpowiednio utrwalone	Zoptymalizuj czas utrwalaania i utrwalacz lub wprowadź dodatkowy etap utrwalaania opisany w części 12 „Procedura testu”
Nieprawidłowa temperatura etapu termicznej obróbki, proteolizy, denaturacji, hybrydyzacji lub przemywania.	Sprawdź temperaturę wszystkich wykorzystywanych urządzeń technicznych za pomocą skalibrowanego termometru
Proteolityczna obróbka wstępna nie została przeprowadzona prawidłowo	Zoptymalizuj czas inkubacji pepsyny, wydłuż lub skróć jeśli to konieczne
Odparowanie sondy	Gdy używasz hybrydyzatora obowiązkowe jest stosowanie mokrych pasów / napełnionych wodą zbiorników. Gdy używasz ciepłarki wymagane jest użycie komory wilgotnościowej. W dodatku szkiełko nakrywkowe powinno być dokładnie uszczelnione, np. Fixogumem w celu zabezpieczenia przed wyschnięciem podczas hybrydyzacji
Zbyt niskie stężenie buforu płuczącego	Sprawdź stężenie <u>Wash Buffer A</u>
Stare roztwory do odwadniania	Przygotuj świeże roztwory do odwadniania
Nieprawidłowo ustawiony mikroskop fluorescencyjny	Dostosuj poprawnie
Stosowanie nieodpowiednich zestawów filtrów	Stosuj zestawy filtrów odpowiednich do fluorochromów sondy. <i>Filtry z potrójnym pasmem zapewniają mniej światła w porównaniu z zestawami filtrów jedno lub dwupasmowymi.</i> <i>W konsekwencji sygnały mogą wydawać się słabsze przy użyciu tych zestawów filtrów z potrójnym pasmem.</i>
Obraz sondy/fluorochromu nieprawidłowy	Wykonaj etapy hybrydyzacji i płukania w ciemności

Sygnaly krzyż owe hybrydyzacji; wysokie tło

Możliwa przyczyna	Działanie
Niekompletne odparafinowanie	Użyj ś wierz ych roztworów, sprawdź czas usuwania parafiny
Zbyt silna proteolityczna obróbka wstępna	Zredukuj czas inkubacji z pepsyną
Zbyt duża objętość sondy w obszarze	Zredukuj objętość sondy na materiale/obszarze, rozprowadź sondę kroplami w celu uniknięcia lokalnej koncentracji
Szkłeczka schłodzona do temperatury pokojowej przed hybrydyzacją	Przenieś szybko szkłeczka do temperatury 37°C
Zbyt wysokie stężenie buforu płuczającego	Sprawdź stężenie <u>Wash Buffer A</u>
Zbyt niska temperatura płukania po hybrydyzacji	Sprawdź temperaturę; podnieś ją jeśli to konieczne
Odwodnienie próbek pomiędzy poszczególnymi etapami inkubacji	Zapobiegaj odwodnieniu próbek przez uszczelnienie szkiełek i przeprowadzenie inkubacji w wilgotnym środowisku

Zdegradowana morfologia tkanki

Możliwa przyczyna	Działanie
Komórka lub tkanka nie zostały utrwalone prawidłowo	Zoptymalizuj czas utrwalania i utrwalcz lub zastosuj dodatkowy etap utrwalania, jak to zostało opisane w „12. Procedura testu”
Proteolityczna obróbka wstępna nie została przeprowadzona prawidłowo	Zoptymalizuj czas inkubacji pepsyny, wydłuż lub skróć, jeśli to konieczne
Niewystarczające wysuszenie przed aplikacją sondy	Wydłuż suszenie

Zachodzące na siebie jądra komórkowe

Możliwa przyczyna	Działanie
Niewłaściwa grubość skrawków tkanek	Przygotuj skrawki o grubości 2-4 μm

Preparat spłynął ze szkiełka

Możliwa przyczyna	Działanie
Szkłeczka z nieodpowiednią powłoką	Zastosuj odpowiednie szkiełka (pozytywnie naładowane)
Zbyt silna proteolityczna obróbka wstępna	Zredukuj czas inkubacji z pepsyną

Słabe barwienie kontrastowe

Możliwa przyczyna	Działanie
Niskie stężenie roztworu DAPI	Zamiast tego użyj <u>DAPI/DuraTect-Solution (ultra)</u> (Prod. No. MT-0008-0.8)
Zbyt krótki czas inkubacji z DAPI	Dostosuj czas inkubacji z DAPI

18. Literatura

- Kievits T, et al. (1990) *Cytogenet Cell Genet* **53**: 134-6.
- Wilkinson DG: *In Situ Hybridization, A Practical Approach*, Oxford University Press (1992) ISBN 0 19 963327 4.

Nasi eksperci są gotowi odpowiedzieć na Państwa pytania. Prosimy o kontakt: help@zytovision.com



ZytoVision GmbH
Fischkai 1
27572 Bremerhaven/ Germany
Telefon: +49 471 4832-300
Fax: +49 471 4832-509
www.zytovision.com
Email: info@zytovision.com

Znaki towarowe:

ZytoVision® i ZytoLight® to znaki towarowe ZytoVision GmbH.