



ZytoLight CEN X/Y Dual Color Probe

REF Z-2120-200  20 (0.2 ml)

Do jakościowej detekcji ludzkich alfa satelit chromosomów X i Y metodą fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH)



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

1. Przeznaczenie

ZytoLight CEN X/Y Dual Color Probe (PL77) jest przeznaczony do jakościowej detekcji ludzkich alfa satelit chromosomów X i Y w próbkach cytologicznych utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie metodą fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH). Sonda jest przeznaczona do stosowania w połączeniu z zestawem ZytoLight FISH Implementation Kits (Nr. kat. Z-2028-5/-20, lub Z-2099-20).

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

2. 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.

3. Dostarczone odczynniki

ZytoLight CEN X/Y Dual Color Probe składa się z:

- ZyGreen (wzbudzenie 503 nm/emisja 528 nm) wyznakowane polinukleotydy (~4.5 ng/ μ l), których docelowe sekwencje są zmapowane w Xp11.1-q11.1 specyficznych dla alfa satelity regionu centromerowego DXZ1 chromosomu X.
- ZyOrange (wzbudzenie 547 nm/emisja 572 nm) wyznakowane polinukleotydy (~1.5 ng/ μ l), których docelowe sekwencje są zmapowane w Yp11.1-q11.1 specyficznych dla alfa satelity regionu centromerowego DYZ3 chromosomu Y.
- Bufor do hybrydyzacji oparty na formamidzie

ZytoLight CEN X/Y Dual Color Probe jest dostępny w jednym rozmiarze:

- Z-2120-200: 0.2 ml (20 reakcji po 10 μ l każda)

4. Materiały wymagane, ale nie dostarczane

- Pozytywny i negatywny preparat kontrolny
- Hybrydizator lub płyta grzewcza
- Hybrydizator lub komora wilgotnościowa w ciepłarni do hybrydyzacji
- Timer
- Barwiacze
- Skalibrowany termometr
- Regulowane pipety (10 μ l, 25 μ l)
- Etanol lub odczynnik alkoholowy
- Dejonizowana lub destylowana woda
- Szkiełka nakrywkowa (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

Preparaty cytologiczne

- ZytoLight FISH-Cytology Implementation Kit (Nr. kat. Z-2099-20)
- Szkiełka mikroskopowa, niepokryte
- Łażnia wodna (70°C)
- 2x Saline-Sodium Citrate (SSC), np., z 20x SSC Solution (Nr. kat. WB-0003-50)

Preparaty FFPE

- ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit (Nr. kat. Z-2028-5/-20)
- Szkiełka mikroskopowa, pozytywnie naładowane
- Łażnia wodna (37°C, 98°C)
- Ksylen

5. Przechowywanie i obsługa

Przechowywać w temperaturze 2-8°C w pozycji pionowej chroniąc przed światłem.

Używać chroniąc przed światłem. Powrócić do warunków przechowywania natychmiast po użyciu. Nie należy używać odczynników po upływie terminu ważności podanego na etykiecie. Produkt jest stabilny do daty ważności podanej na etykiecie, gdy jest odpowiednio przechowywany.

6. Ostrzeżenie 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. Unikać 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 opłucz skórę dużą ilością wody!
- Karta charakterystyki substancji niebezpiecznej jest dostępna na żądanie profesjonalnego użytkownika.
- Nie używać ponownie odczynników.
- Unikaj krzyżowego zanieczyszczenia próbek, które może prowadzić do błędnych wyników.
- Sonda nie powinna być ekspozycja na światło, zwłaszcza silne światło, przez dłuższy okres czasu, np. wszystkie kroki powinny zostać wykonane, jeśli to możliwe, w ciemności i/lub używając pojemników odpornych na światło!

Zwroty wskazujące rodzaj zagrożenia i określające stopień ostrożności:

Składnik determinujący zagrożenie to formamid.

**Niebezpieczeństwo**

H351	Podejrzewa się, że powoduje raka.
H360FD	Może działać szkodliwie na płodność. Może działać szkodliwie na dziecko w łonie matki.
H373	Może powodować uszkodzenie narządów poprzez długotrwałe lub powtarzane narażenie.
P201	Przed użyciem zapoznać się ze specjalnymi środkami ostrożności.
P202	Nie używać przed zapoznaniem się i zrozumieniem wszystkich środków bezpieczeństwa.
P260	Nie wdychać pyłu/dymu/gazu/mgły/par/rozpylonej cieczy.
P280	Stosować rękawice ochronne/odzież ochronną/ochronę oczu/ochronę twarzy.
P308+P313	W przypadku narażenia lub styczności: Zasięgnąć porady/zgłosić się pod opiekę lekarza.
P405	Przechowywać pod zamknięciem.

7. 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 utrwalenie, zamrażanie, rozmrażanie, płukanie, suszenie, podgrzewanie, krojenie lub zanieczyszczenie innym preparatem lub płynami może być źródłem artefaktów lub fałszywych wyników. Niespójne wyniki mogą być wynikiem różnych odmian metod utrwalania i zatapiania, a także obecności nieprawidłowości w próbce.
- Sonda powinna być użyta do detekcji loci opisanej w części 4 „Dostarczone odczynniki”.
- Wydajność została zatwierdzona przy użyciu procedur opisanych w niniejszej instrukcji użytkowania. Modyfikacje tych procedur mogą zmienić wydajność i muszą zostać zatwierdzone przez użytkownika.

8. Substancje zakłócające

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

Następujące utrwalacze są niekompatybilne z FISH:

- Utrwalacz Bouin'a
- Utrwalacz B5
- Utrwalacze kwaśne (np. kwas pikrynowy)
- Utrwalacz Zenker'a
- Alkohole (stosowane samodzielnie)
- Chlorek rtęci
- Utrwalacz formaldehyd/cynk
- Utrwalacz Hollande'a
- Niebuforowana formalina

9. Przygotowanie próbek**Preparaty cytologiczne**

- Przygotuj próbki tak jak zostało to opisane w instrukcji użycia zestawu ZytoLight FISH-Cytology Implementation Kit.

Preparaty FFPE

- Utrwalanie w 10% neutralnej buforowanej formalinie przez 24 h w temperaturze pokojowej (18-25°C).
- Rozmiar próbki ≤ 0.5 cm³.
- 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.

10. Obróbka wstępna produktu

Produkt jest gotowy do użycia. Nie jest wymagana rekonstrukcja, mieszanie lub rozcieńczenie. Przed użyciem przenieś sondę do temperatury pokojowej (18-25°C), chroniąc przed światłem. Przed otwarciem fiolki zamieszaj w wortexie i krótko odwiruj.

11. Procedura testu**Preparaty cytologiczne****Obróbka wstępna próbki**

Przygotuj obróbkę wstępną próbki zgodnie z instrukcją użycia zestawu ZytoLight FISH-Cytology Implementation Kit.

Denaturacja i hybrydyzacja

1. Nanieś pipetą 10 μl sondy na każdy przygotowany wstępnie preparat.
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 5 min w 72°C.
4. Przenieś szkiełka do komory wilgotnościowej i hybryduj przez noc w temperaturze 37°C (np. w ciepłarni hybrydyzatora).

Istotne jest, aby próbki nie wysychały podczas etapu hybrydyzacji.

Obróbka po hybrydyzacji

Przygotuj obróbkę po hybrydyzacji (płukanie, barwienie kontrastowe, mikroskop fluorescencyjny) zgodnie z instrukcją użycia zestawu ZytoLight FISH-Cytology Implementation Kit.

Preparaty FFPE

Obróbka wstępna próbek

Przygotuj obróbkę wstępną próbek (odparafinowanie, proteolizę) zgodnie z instrukcją użycia zestawu ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit.

Denaturacja i hybrydyzacja

1. Nanieś pipetą 10 µl sondy na każdy przygotowany wstępnie preparat.
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 cieplarni hybrydyzatora).

Istotne jest, aby próbki nie wysychały podczas etapu hybrydyzacji.

Obróbka po hybrydyzacji

Przygotuj przeprowadzenie obróbki po hybrydyzacji (płukanie, barwienie różnicujące, mikroskop fluorescencyjny) zgodnie z instrukcją użycia zestawu ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit

12. 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.

Kontrola zewnętrzna: Walidowane preparaty z kontrolą dodatnią i ujemną.

13. Charakterystyka wydajności

Dokładność: Lokalizacja hybrydyzacji sondy oceniona na metafazowych wymazach kariotypów normalnych samców. We wszystkich badanych próbkach sonda hybrydowała wyłącznie z oczekiwanymi loci. Nie zaobserwowano dodatkowych sygnałów ani krzyżowych hybrydyzacji. Dlatego dokładność została obliczona na 100%.

Czułość analityczna: W celu oceny wrażliwości analitycznej sonda była oceniana na podstawie metafazowych wymazach kariotypów normalnych samców. Wszystkie jądra komórkowe wykazały oczekiwany prawidłowy wzorzec sygnału we wszystkich badanych próbkach. Dlatego czułość analityczna została obliczona na 100%.

Specyficzność analityczna: W celu oceny specyficzności analitycznej sonda była oceniana na podstawie metafazowych wymazach kariotypów normalnych samców. We wszystkich badanych próbkach sonda hybrydowała wyłącznie z oczekiwanymi loci i żadnymi innymi loci. Dlatego specyficzność analityczna została obliczona na 100%.

14. Utylizacja

Utylizacja odczynników musi odbywać się zgodnie z lokalnymi przepisami.

15. Rozwiązywanie problemów

Każde odchylenie od instrukcji obsługi może prowadzić do gorszych wyników barwienia lub braku zabarwienia. Niektóre wskazówki zawarte w tej sekcji mają zastosowanie tylko w przypadku użycia zestawu ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit.

Słabe sygnały lub brak sygnałów

Możliwa przyczyna	Działanie
Niedostępna sekwencja docelowa	Zastosuj odpowiednią kontrolę

Komórka lub tkanka nie została prawidłowo utrwalona	Zoptymalizuj czas utrwalania i utrwalacz lub zastosuj dodatkowy etap utrwalania jak to zostało opisane w "procedurze testu" w instrukcji użycia zestawu <u>ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit</u>
Nieprawidłowa temperatura wstępnej obróbki cieplnej, proteolizy, denaturacji, hybrydyzacji, lub płukania	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 buforu płuczącego
Stare roztwory do odwadniania	Przygotuj się wiesz i 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

Sygnały krzyżowe hybrydyzacji; wysokie tło

Możliwa przyczyna	Działanie
Niekompletne odparafinowanie	Użyj się wiesz odczynników; 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
Szkiełka schłodzone do temperatury pokojowej przed hybrydyzacją	Przenieś szybko szkiełka do temperatury 37°C
Zbyt wysokie stężenie buforu płuczącego	Sprawdź stężenie buforu płuczącego
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 przeprowadzanie inkubacji w wilgotnym środowisku

Zdegradowana morfologia

Możliwa przyczyna	Działanie
Komórka lub tkanka nie zostały utrwalone prawidłowo	Zoptymalizuj czas utrwalania i utrwalacz lub zastosuj dodatkowy etap utrwalania jak to zostało opisane w "procedurze testu" w instrukcji użytkowania zestawu <i>ZytoLight</i> FISH-Tissue Implementation Kit
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 ścianek skrawków tkanek	Przygotuj skrawki o grubości 2-4 μm

Preparat spłynął ze szkiełka

Możliwa przyczyna	Działanie
Szkiełka z nieodpowiednią powłoką	Zastosuj odpowiednie szkiełka
Zbyt silna proteolityczna obróbka wstępna	Zredukuj czas inkubacji z pepsyną

Słabe barwienie kontrastowe

Możliwa przyczyna	Działanie
Niskie stężenie roztworu DAPI	Zamiast tego użyj <i>DAPI/DuraTect-Solution (ultra)</i> (Nr. kat. MT-0008-0.8)
Zbyt krótki czas inkubacji z DAPI	Dostosuj czas inkubacji z DAPI

16. Literatura

- Kievits T, et al. (1990) *Cytogenet Cell Genet* 53: 134-6.
- Klinger K, et al. (1992) *Am J Hum Genet* 51: 55-65.
- Waye JS, Willard HF (1987) *Nucleic Acids Res* 15: 7549-69.
- 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 helptech@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.