



**ZytoLight**

## **SPEC PTEN/CEN 10 Dual Color Probe**

**REF** Z-2078-50  $\Sigma$  5 (0.05 ml)

**REF** Z-2078-200  $\Sigma$  20 (0.2 ml)

Pro kvalitativní detekci delecí lidského genu PTEN a alfa satelitů chromozomu 10 fluorescenční *in situ* hybridizací (FISH)



Prostředek pro lékařskou *in vitro* diagnostiku  
V souladu s EU nařízením 98/79/EC

### 1. Použití

ZytoLight SPEC PTEN/CEN 10 Dual Color Probe (PL37) je určen k použití pro kvalitativní detekci delecí lidského genu PTEN a alfa satelitů chromozomu 10 formalinem fixovaných, v parafínech zalitých vzorků jmetodou fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH). Průběh je určen k použití v kombinaci s ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit (Prod. No. Z-2028-5/-20).

Interpretace výsledků musí být prováděna kvalifikovaným patologem, v kontextu s klinickou historií pacienta a s ohledem na ostatní klinické a patologické nálezy.

### 2. Klinický význam

Nádorový supresorový gen PTEN (fosfatázový a tensinový homolog), často označovaný jako MMAC1 (mutovaný u mnohočetných pokročilých rakovin 1), je lokalizován na 10q23.31 a kóduje 47 kDa duálně specifickou fosfatázu, která má jak lipidovou, tak proteinovou fosfatázovou aktivitu. Jeho inaktivace vede ke konstitutivní aktivaci dráhy PI3K/AKT a následnému zvýšení syntézy proteinů, progresi buněčného cyklu, migrace a přežití. Delece postihující dlouhé raménko chromozomu 10 byly detekovány u 30 až 50 % časných a pokročilých sporadických melanomů a asi 40 až 70 % karcinomů prostaty. U obou nádorových jednotek byla ztráta PTEN spojena se špatným klinickým výsledkem. V současné době vstoupilo do klinických studií několik léků zaměřených na dráhu PI3K/AKT pro terapii solidních nádorů.

### 3. Princip testu

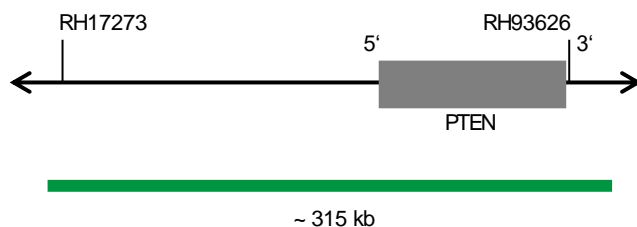
Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) je technika, která umožňuje detekci a vizualizaci specifických sekvencí nukleových kyselin v buněčných preparátech. Fluorescenčně označené úseky DNA, tzv. FISH próby, a jejich komplementární cílové úseky DNA v preparátech jsou společně denaturovány a následně je umožněno jejich spárování v průběhu hybridizace. Poté jsou nespecifické a nenavázané fragmenty prób odstraněny pomocí důkladných oplachovacích kroků. Po dobarvení DNA pomocí DAPI jsou hybridizované úseky DNA vizualizovány pomocí fluorescenčního mikroskopu vybaveného excitačními a emisními filtry specifickými pro fluorochromy, se kterými byly FISH próby označeny.

### 4. Potřebné reagensie

ZytoLight SPEC PTEN/CEN 10 Dual Color Probe se skládá z:

- ZyGreen (excitace 503 nm/ emise 528 nm) označené polynukleotidy (~10.0 ng/μl), s cílovými sekvencemi v 10q23.2-q23.31\* (chr10:89,440,649-89,755,790) nesoucí PTEN genovou oblast (viz Obr.1).
- ZyOrange (excitace 547 nm/ emise 572 nm) označené polynukleotidy (~1.5 ng/μl), s cílovými sekvencemi v 10p11.1-q11.1 specifické pro alfa satelitní centromerickou oblast D10Z1 chromozomu 10.
- Hybridizační pufr založený na formamidu

\* V souladu s knihovnou lidského genomu GRCh37/hg19



Obr. 1: SPEC PTEN Mapa sondy (mimo měřítko)

ZytoLight SPEC PTEN/CEN 10 Dual Color Probe dostupný ve dvou velikostech:

- Z-2078-50: 0.05 ml (5 reakcí po 10 μl každá)
- Z-2078-200: 0.2 ml (20 reakcí po 10 μl každá)

### 5. Vybavení, které je vyžadováno, ale není součástí dodávky

- ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit (Prod. No. Z-2028-5/-20)
- Pozitivní a negativní kontrolní vzorky
- Mikroskopická sklíčka, pozitivně nabitá
- Vodní lázeň (37°C, 98°C)
- Hybridizér nebo vyhřívaná ploténka
- Hybridizér nebo vlhká komůrka v hybridizační troubě
- Pipety (10 μl, 25 μl)
- Stopky
- Barvicí nádoby nebo lázně
- Kalibrováný teploměr
- Xylen
- Ethanol (alkohol)
- Deionizovaná nebo destilovaná voda
- Krycí sklíčka (22 x 22 mm, 24 x 60 mm)
- Lepidlo, např. Fixogum Rubber Cement (Katalog.č. E-4005-50/-125) nebo podobné
- Fluorescenční mikroskop s odpovídajícím vybavením (400 - 1000x)
- Imerzní olej určený pro fluorescenční mikroskop
- Odpovídající sada filtrů

## 6. Skladování a zacházení

Skladujte při teplotě 2-8 °C, ve vzpřímené pozici, chráněné před sluncem. Používejte chráněné před sluncem. Vraťte do skladovacích podmínek okamžitě po použití. Nepoužívejte reagentie po uplynutí doby expirace uvedené na štítku.

## 7. Varování a preventivní opatření

- Před použitím si přečtěte instrukce!
- Nepoužívejte reagentie po uplynutí doby expirace!
- Tento produkt obsahuje látky (v nízkých koncentracích a objemech), které jsou škodlivé pro zdraví a potenciálně infekční. Vyvarujte se přímého kontaktu s reagentiemi. Používejte přiměřené ochranné prostředky (jednorázové rukavice, ochranné brýle a laboratorní plášť).
- V případě kontaktu s kůží omyjte okamžitě velkým množstvím vody!
- Pro profesionální uživatele je na vyžádání dostupný bezpečnostní list.
- Nepoužívejte reagentie opakovaně.
- Vyvarujte se vzájemné kontaminace vzorů, neboť to může vést k chybným výsledkům.
- Průba by neměla být po delší dobu vystavena světlu, speciálně ne silnému světlu, tzn., že všechny kroky by se měly provádět ve tmě a/nebo za použití tmavých, světlo nepropouštějících nádobek.

### Rizika:

Složka určuj riziko je formamid.



### Nebezpečí

|           |   |
|-----------|---|
| H351      | Podezření na vyvolání rakoviny.   |
| H360FD    | Může poškodit reprodukční schopnost. Může poškodit plod v těle matky.                 |
| H373      | Může způsobit poškození orgánů při prodloužené nebo opakované expozici.               |
| P201      | Před použitím si obzvláště přečtěte speciální instrukce.                              |
| P202      | Nepoužívejte, dokud jste si nepřčetli všechny bezpečnostní pokyny a neporozuměli jim. |
| P260      | Nevdechujte prach/dým/plyn/mlhu/páry/aerosoly.  |
| P280      | Používejte ochranné rukavice/ochranný oděv/ochranné brýle/obličejový štít.            |
| P308+P313 | Při expozici nebo podezření na ni: Vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření.               |
| P405      | Skladujte uzamčené.   |

## 8. Omezení

- Pouze pro *in vitro* diagnostiku.
- Pouze pro profesionální uživatele.
- Klinická interpretace jakéhokoliv pozitivního barvení nebo jeho chybění musí být hodnocena v kontextu klinické historie, morfolgie, ostatních histopatologických kritérií a stejně tak i ostatních diagnostických testů. Je odpovědností kvalifikovaného patologa být obeznámený s FISH průbami, reagentiemi, diagnostickými panely a metodami používanými k barvení preparátů. Barvení musí být prováděno v certifikované, licencované laboratoři pod dozorem patologa, který je odpovědný za prohlížení obarvených sklů a vyhodnocení odpovídajících pozitivních a negativních kontrol.
- Barvení preparátu, obzvláště intenzita a barvení pozadí závisí na zacházení se vzorkem před barvením. Neodpovídající fixace, mrazení, tání, oplachování a sušení, var, krájení nebo kontaminace jinými vzorky nebo tekutinami může vést k artefaktům nebo falešným výsledkům. Nekonzistentní výsledky mohou být výsledkem variací ve fixaci a prosycovacích metodách, stejně tak jako nepravidelnostmi uvnitř vzorku.

- Průba má být používána pouze pro detekci lokusů popsaných v odstavci 4.
- Barvení bylo validováno za použití metod popsaných v těchto instrukcích pro použití. Obměny těchto procedur mohou vést ke změnám barvení a mají být validovány uživatelem.

## 9. Interferující látky

Pokud jsou ve vzorku přítomny červené krvinky, mohou jevit autofluorescenci, která ztěžuje detekci hledaných signálů

Následující fixační tekutiny jsou nekompatibilní (nevhodné) pro FISH:

- Bouinův roztok
- B5 fixace
- Kyselá fixativa (např. kys. pikrová)
- Zenkerova fixační tekutina
- Alkoholy (pokud jsou používány samostatně)
- Chlorid rtuti
- Formaldehyd/zinkové fixativum
- Hollandovo fixativum
- Nepufrovaný formalin

## 10. Příprava vzorků

- Fixace v 10% neutrálním pufrovaném formalínu po dobu 24h při pokojové teplotě (18-25°C).
- Připravte tkáňové vzorky  $\leq 0,5 \text{ m}^3$ .
- Používejte parafin nejvyšší (prémiové) kvality.
- Prosycení by mělo být prováděno při teplotě nižší než 65°C.
- Připravte řezy o tloušťce 2-4  $\mu\text{m}$ .
- Používejte pozitivně nabitá skla.
- Fixujte po dobu 2-16h při teplotě 50-60°C.

## 11. Příprava před použitím

Produkt je ready-to-use, tedy připraven k přímému použití. Není vyžadována žádná obnova, mísení nebo ředění. Před použitím přineste průbu do pokojové teploty (18-25 °C), chraňte před světlem. Před otevřením nádobky promíchejte krátce ve vortexu a stočte.

## 12. Pracovní postup

### Příprava vzorku

Připravte vzorek podle instrukcí uvedených u [ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit](#).

### Denaturace a hybridizace

1. Napípepujte 10  $\mu\text{l}$  průby na každý předpřipravený vzorek.
  2. Přikryjte vzorky krycím sklíčkem 22 mm x 22 mm (vyvarujte se vytvoření bublin) a zalepte krycí sklíčko.
- Doporučujeme použít speciální lepidlo např. Fixogum.*
3. Umístěte skla na horkou plotěnku nebo do hybridizéru a denaturujte vzorky 10 min při 75°C.
  4. Přeneste skla do vlhké komůrky nebo hybridizujte přes noc při 37 °C (např. v hybridizační troubě).

*Je zcela zásadní, aby vzorky v průběhu hybridizačního kroku nevyschly.*

### Post-hybridizace

Posthybridizační kroky (oplach, dobarvení, fluorescenční mikroskopie) provádějte podle instrukcí uvedených v [ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit](#).

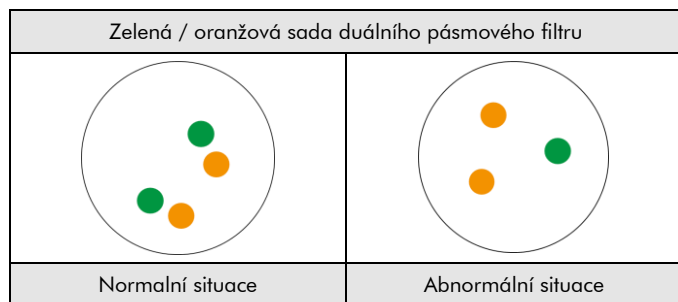
## 13. Interpretace výsledků

Při použití vhodných sad filtrů se hybridizační signály sondy jeví zeleně (PTEN genová oblast) a oranžově (CEN 10).

**Normální situace:** V interfázích normálních buněk nebo buněk bez delece zahrnující oblast genu PTEN se objeví dva oranžové signály a dva zelené signály (viz obrázek č.2).

**Abnormální situace:** V buňce s delecí ovlivňující oblast genu PTEN bude pozorován snížený počet zelených signálů. Delece postihující pouze části oblastí genu PTEN mohou vést k normálnímu signálovému vzoru se zelenými signály zmenšené velikosti (viz obrázek č.2).

Př překrývající se signály se mohou jevit jako žluté signály.



Obr. Č. 2 : Předpokládaný normální výsledek a abnormální jádra

Jiná distribuce (rozmístění) signálů může být pozorována v některých abnormálních vzorcích, která může vést ve výsledku k jinému vzoru signálů, než jsou popsány výše, indikující variantní přestavby. Nečekané vzory signálů by měly být dále dovyšetřeny.

#### Vemte v potaz:

- Kvůli rozvolněnému chromatinu se mohou jednotlivé signály jevit jako malé shluky signálů. A proto dva nebo tři signály stejné velikosti, které jsou ve vzdálenosti, která je menší než průměr jednoho signálu, mají být počítány jako jeden signál.
- Nehodnoťte překrývající se jádra.
- Nepočítejte příliš natrávená jádra (rozpoznatelná podle přítomnosti tmavých oblastí uvnitř jader).
- Nepočítejte jádra se silnou autofluorescencí, která znesnadňuje rozpoznání signálů.
- Negativní nebo neočekávaný výsledek může být způsoben vícečetnými faktory, viz odst. 17.
- Za účelem správného hodnocení výsledků musí uživatel před použitím produktu provést validaci v souladu s národními a/nebo mezinárodními doporučeními.

## 14. Doporučené postupy kontroly kvality

Za účelem zajištění správných postupů má být ke každému testu přiřazena vnitřní a vnější kontrola. Pokud tyto kontroly selžou při demonstraci správného barvení, výsledky vzorku pacienta musí být hodnoceny jako invalidní.

**Vnitřní kontrola:** Nenádorové buňky uvnitř vzorku, ve kterých je patrný normální vzor signálů.

**Externí kontrola:** Ověřené (validované) pozitivní a negativní kontrolní vzorky.

## 15. Výkonnostní charakteristiky

**Přesnost:** Místo hybridizace sondy bylo hodnoceno na metafázových spreadech karyotypově normálního samce. Ve všech testovaných vzorcích hybridizovala sonda pouze na očekávané lokusy. Nebyly pozorovány žádné další signály nebo křížové hybridizace. Proto byla vypočítána přesnost na 100%.

**Analytická citlivost:** Pro analytické stanovení citlivosti byla sonda vyhodnocena na metafázových spreadech karyotypicky normálních samců. Všechna jádra ukázala očekávaný normální signál ve všech testovaných vzorcích. Analytická citlivost byla proto vypočtena na 100%.

**Analytická specifita:** Pro stanovení analytické specifity byla sonda vyhodnocena na metafázových spreadech karyotypicky normálních samců. Ve všech testovaných vzorcích hybridizovaly všechny signály pouze se očekávanými cílovými lokusy a žádnými jinými lokusy. Analytická specifita byla proto vypočtena na 100%.

## 16. Likvidace odpadů

Likvidace reagentů musí být provedena v souladu s lokálními zákony.

## 17. Řešení problémů

Jakákoliv odchylka od návodu k obsluze může vést k horším výsledkům barvení nebo k žádnému znečištění.

### Slabé nebo vůbec žádné signály

| Možná příčina  | Řešení   |
|--|--|
| Žádné dostupné cílové sekvence   | Použijte vhodnou kontrolu.   |
| Buňky nebo tkáň nebyly fixovány správně  | Optimalizujte fixační čas nebo aplikujte postfixační kroky popsaných v kapitole 12 „Pracovní postup“ v návodu <a href="#">ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit</a>   |
| Nesprávná příprava teplem, natrávení, denaturace, hybridizace nebo teplota oplachu | Zkontrolujte teplotu u vše zařízení, u kterých je kalibrovaný teploměr   |
| Proteolytická předběžná úprava není řádně provedena                                | Optimalizujte inkubační dobu pepsinu, Zvyšte nebo snižte.  |
| Odpařování sondy   | Při použití hybridizéru, je nutné použít mokré proužky / nádrže naplněné vodou.<br>Při použití hybridizační pece, vlhké komoty, by mělo být krycí sklíčko zcela uzavřené, např. Fixogum, aby se zabránilo vysychání vzorků během hybridizace |
| Příliš nízká koncentrace promývacího pufru   | Zkontrolujte koncentraci promývacího pufru   |
| Staré odvodňovací roztoky  | Připravte čerstvé odvodňovací roztoky.   |
| Špatné nastavení fluorescenčního mikroskopu  | Nastavte správně   |
| IPoužití nesprávného setu filtrů   | Použijte set filtrů, které jsou odpovídající fluochromům próby.<br><i>Troitě filtry poskytují méně světla v porovnání s jednoduchými nebo duálními filtry. Navíc signály se mohou při použití trojitěho filtru jevit bledší.</i>             |
| Poškození próby světlem  | Hybridizační a promývací kroky provádějte ve tmě.  |

### Zkřížené hybridizační signály, šum na pozadí

| Možná příčina  | Řešení  |
|--|---|
| Nekompletní odparafinování                                     | Používejte čerstvé roztoky; zkontrolovat délku odparafinování   |
| Příliš silné natrávení   | Zkraťte inkubaci s pepsinem.  |
| Příliš velký objem próby na plochu vzorku                      | Snižte objem próby na řez, rozmístěte próbu po kapkách, abyste se vyhnuli příliš vysoké místní koncentraci. |
| Preparáty jsou vychladlé na pokojovou teplotu před hybridizací | Přeneste preparáty krátce do 37 °C  |
| Příliš vysoká koncentrace promývacího pufru                    | Zkontrolujte koncentraci promývacího pufru.   |
| Oplachovací teplota po hybridizaci je příliš nízká             | Zkontrolujte teplotu a zvyšte ji, pokud je to nutné   |
| Vysušení vzorků mezi jednotlivými kroky inkubace               | Zabraňte vysušení pomocí přilepení krycího sklíčka a provádění inkubace ve vlhkém prostředí.                |

**Poškozená morfologie**

| Možná příčina  | Řešení  |
|--|---|
| Buňky nebo tkáň nebyly fixovány správně                        | Optimalizujte fixační čas nebo aplikujte postfixační kroky popsanych v kapitole 12 „Pracovní postup“ v návodu <u>ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit</u> |
| Příprava natrávením není provedena správně                     | Optimalizujte dobu inkubace s pepsinem, zkratěte nebo prodlužte, je-li potřeba  |
| Nedostatečné oschnutí preparátu na vzduchu před aplikací próby | Prodlužte osušení.  |

**Překrývání jader**

| Možná příčina                    | Řešení  |
|----------------------------------|---|
| Nevhodná tloušťka tkáňových řezů | Připravte 2-4 $\mu\text{m}$ microtomové řezy. |

**Vzorek uplavává ze sklíčka**

| Možná příčina              | Řešení                        |
|----------------------------|-------------------------------|
| Nevhodný povrch sklíčka    | Použijte vhodná sklíčka.      |
| Natrávením je příliš silné | Snižte inkubační dobu pepsinu |

**Slabé barvení**

| Možná příčina                  | Řešení  |
|--------------------------------|---|
| Nízká koncentrace roztoku DAPI | Používejte DAPI/DuraTect-Solution (ultra) (Prod. No. MT-0008-0.8) |
| Příliš krátká doba inkubace    | Prodlužte dobu inkubace s DAPI.                                   |

**18. Literatura**

- Ach T, et al. (2013) *Virchows Arch* 462: 65-72.
- Cairns P, et al. (1997) *Cancer Res* 57: 4997-5000.
- Dahia PLM, et al. (1999) *Hum Mol Genet* 8: 185-93.
- Devilee P, et al. (1988) *Genomics* 3: 1-7.
- Ettl T, et al. (2012) *Br J Cancer* 106: 719-26.
- Ettl T, et al. (2014) *Head Neck* 36: 517-23.
- Healy E, et al. (1998) *Oncogene* 16: 2213-8.
- Kievits T, et al. (1990) *Cytogenet Cell Genet* 53: 134-6.
- Li J, et al. (1997) *Science* 275: 1943-7.
- Robertson GP, et al (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 9418-23.
- Swoboda A, et al. (2011) *Genes Chromosomes Cancer* 50: 680-8.
- Weng LP, et al. (2001) *Hum Mol Genet* 10: 599-604.
- Wilkinson DG: *In Situ Hybridization, A Practical Approach*, Oxford University Press (1992) ISBN 0 19 963327 4.
- Yoshimoto M, et al. (2006) *Cancer Genet Cytogenet* 169: 128-37.
- Yoshimoto M, et al. (2007) *Br J Cancer* 97: 678-85.

Naši experti jsou Vám k dispozici zodpovědět Vaše otázky. Prosím kontaktujte [help@zytovision.com](mailto:help@zytovision.com)



ZytoVision GmbH  
Fischkai 1  
27572 Bremerhaven/Německo  
Telefon: +49 471 4832-300  
Fax: +49 471 4832-509  
[www.zytovision.com](http://www.zytovision.com)  
Email: [info@zytovision.com](mailto:info@zytovision.com)

**Ochranná známka:**

ZytoVision® a ZytoLight® jsou pod ochrannou známkou ZytoVision GmbH.