



**ZytoLight**

## **SPEC SMARCB1/22q12 Dual Color Probe**

REF Z-2178-50

Σ 5 (0.05 ml)

Pro kvalitativní detekci delecí lidského genu SMARCB1 a lidské 22q12 specifické sekvence fluorescenční *in situ* hybridizací (FISH)



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

### 1. Použití

ZytoLight SPEC SMARCB1/22q12 Dual Color Probe (PL137) je určen k použití pro kvalitativní detekci delecí lidského genu SMARCB1 a lidské 22q12 specifické sekvence 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

Gen SMARCB1 (související se SWI/SNF, spojený s matricí, na aktinu závislý regulátor chromatinu, podrodina b, člen 1, alias INI1, SNF5 nebo BAF47) se nachází na chromozomu 22q11.23 a kóduje supresor nádoru. Rhabdoidní nádory jsou vysoce zhoubné novotvary, které se typicky objevují v dětství a raném dětství. Jsou klasifikovány jako atypické teratoidní/rhabdoidní tumory (AT/RT), pokud se vyskytují v CNS, nebo jako maligní rhabdoidní tumory (MRT), pokud jsou nalezeny v renálních nebo extrarenálních místech. Naprostá většina AT/RT a MRT je charakterizována ztrátou funkce genu SMARCB1 v důsledku delecí nebo mutací. Molekulární změny jsou často bialelické, což vede k úplné ztrátě tohoto tumor supresorového genu, a tím k progresi buněčného cyklu. U pacientů se zárodečnými změnami SMARCB1, včetně delecí, duplikací a mutací, bylo zjištěno, že mají predispozici k maligním rhabdoidním nádorům a schwannomatóze. Navíc bylo zjištěno, že delece genu SMARCB1 se vyskytují u pacientů s vysoce agresivním renálním medulárním karcinomem (RMC), epiteloidním sarkomem a špatně diferencovaným karcinomem. Identifikace fluorescenční hybridizace *in situ* s delecí SMARCB1 (FISH) může představovat silný doplňkový diagnostický nástroj užitečný v diferenciální diagnostice rhabdoidních nádorů. Prenatální testování by navíc mělo být prováděno v situacích, kdy byly v rodině zdokumentovány změny SMARCB1.

### 3. Princip testu

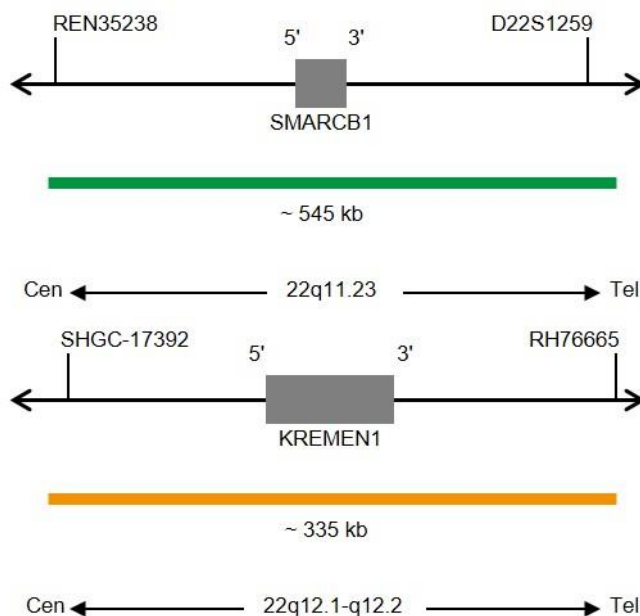
Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) je technika, která umožňuje detekci a vizualizaci specifických sekvencí nukleových kyselin v buněčných preparátech. Fluorescenčně označené úseky DNA, tzv. FISH próby, a jejich komplementární cílové úseky DNA v preparátech jsou společně denaturovány a následně 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 reagenty

ZytoLight SPEC SMARCB1/22q12 Dual Color Probe se skládá z:

- ZyGreen (excitace 503 nm/ emise 528 nm) označené polynukleotidy (~10.0 ng/μl), s cílovými sekvencemi v 22q11.23\* (chr22:23,887,951-24,431,064) nesoucí SMARCB1 genovou oblast (viz Obr.1).
- ZyOrange (excitace 547 nm/ emise 572 nm) označené polynukleotidy (~1.5 ng/μl), s cílovými sekvencemi v 22q12.1-22q12.2\* (chr22:29,340,078-29,673,440) (viz Obr.1).
- Hybridizační pufr založený na formamidu

\* V souladu s knihovnou lidského genomu GRCh37/hg19



Obr. 1: Horní: SPEC SMARCB1 Mapa sondy, Spodní: SPEC 22q12 Mapa sondy (mimo měřítka)

ZytoLight SPEC SMARCB1/22q12 Dual Color Probe dostupný v jedné velikosti:

- Z-2178-50: 0.05 ml (5 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 velkými 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 ve 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 obstarejte speciální instrukce.
P202	Nepoužívejte, dokud jste si nepřepčetli 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, morfologie, 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, mražení, 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 nádoby 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.

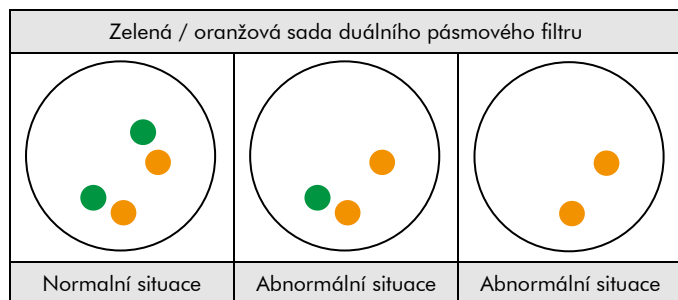
## 13. Interpretace výsledků

Při použití vhodných sad filtrů se hybridizační signály sondy jeví zeleně (SMARCB1 genová oblast) a oranžově (22q12 lokus).

**Normální situace:** V interfázích normálních buněk nebo buněk bez delece zahrnující oblast genu SMARCB1 se objeví dva oranžové signály a dva zelené signály (viz obrázek č.2).

**Abnormální situace:** V buňce s delecí ovlivňující oblast genu SMARCB1 bude pozorován snížený počet zelených signálů. Delece ovlivňující pouze části oblasti genu SMARCB1 mohou vést k normálnímu vzoru signálu 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 s 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. Při použití hybridizační pece, SMARCB1ké komoty, by mělo být krycí skříčka zcela uzavřená, 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
Použití nesprávného setu filtrů	Použijte set filtrů, které jsou odpovídající fluochromům próby. <i>Trojité 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 skříčka a provádění inkubace ve vlhkém prostředí.

**Poškozená morfologie**

Možná příčina	Řešení
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>
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 µm 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**

- Calderaro J, et al. (2012) *Histopathology* 61: 428-35.
- Eaton KW, et al. (2011) *Pediatr Blood Cancer* 56: 7-15.
- Kievits T, et al. (1990) *Cytogenet Cell Genet* 53: 134-6.
- Mobley BC, et al. (2010) *Acta Neuropathol* 120: 745-53.
- Roberts CW & Biegel JA (2009) *Cancer Biol Ther* 8: 412-6.
- Sullivan LM, et al. (2013) *Mod Pathol* 26: 385-92.
- Wilkinson DG: *In Situ Hybridization, A Practical Approach*, Oxford University Press (1992) ISBN 0 19 963327 4.

Naši experti jsou Vám k dispozici zodpovědět Vaše otázky. Prosím kontaktuje [helptech@zytovision.com](mailto:helptech@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.