



ZytoLight CEN X/Yq12 Dual Color Probe

REF Z-2016-50  5 (0.05 ml)

REF Z-2016-200  20 (0.2 ml)

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



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

1. Przeznaczenie

ZytoLight CEN X/Yq12 Dual Color Probe (PL3) jest przeznaczony do jakościowej detekcji ludzkich alfa satelit chromosomów X klasycznych satelit III ludzkiego chromosomu 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/Yq12 Dual Color Probe składa się z:

- ZyOrange (wzbudzenie 547 nm/emisja 572 nm) wyznakowane polinukleotydy (~1.5 ng/μl), których docelowe sekwencje są zmapowane w Xp11.1-q11.1 specyficznych dla alfa satelity regionu centromerowego DXZ1 chromosomu X.
- ZyGreen (wzbudzenie 503 nm/emisja 528 nm) wyznakowane polinukleotydy (~4.5 ng/μl), których docelowe sekwencje są zmapowane w Yq12 specyficznych dla klasycznych satelit III regionu centromerowego DYZ1 chromosomu Y.
- Bufor do hybrydyzacji oparty na formamidzie

ZytoLight CEN X/Yq12 Dual Color Probe jest dostępny w dwóch rozmiarach:

- Z-2016-50: 0.05 ml (5 reakcji po 10 μl każda)
- Z-2016-200: 0.2 ml (20 reakcji po 10 μl każda)

4. Materiały wymagane, ale nie dostarczane

- Pozytywny i negatywny preparat kontrolny
- Hybrydyzator lub płyta grzewcza
- Hybrydyzator lub komora wilgotnościowa w ciepłarni do hybrydyzacji
- Timer
- Barwiaczce
- Skalibrowany termometr
- Regulowane pipety (10 μl, 25 μl)
- Etanol lub odczynnik alkoholowy
- 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

Preparaty cytologiczne

- ZytoLight FISH-Cytology Implementation Kit (Nr. kat. Z-2099-20)
- Szkiełka mikroskopowe, niepokryte
- Łaźnia 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 mikroskopowe, pozytywnie naładowane
- Łaźnia 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. Powrót 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 ołucz skórę dużą ilością wody!
- Karta charakterystyki substancji niebezpiecznej jest dostępna na żądanie profesjonalnego użytkownika.

- Nie używaj 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 siły ostrożności:

Składnik determinujący zagrożenie to formamid.



Niebezpieczeństwo

| | |
|-----------|--|
| H351 | Podrażnia skórę, może powodować raka. |
| H360FD | Może działać szkodliwie na płodność. Może działać szkodliwie na dziecko w tonie matki. |
| H373 | Może powodować uszkodzenie narządów poprzez długotrwałe lub powtarzane narażenie. |
| P201 | Przed użyciem zapoznać się ze specjalnymi siłami ostrożności. |
| P202 | Nie używać przed zapoznaniem się i zrozumieniem wszystkich sił 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 utwalenie, zamrażanie, rozmrażanie, płuwanie, suszenie, podgrzewanie, krojenie lub zanieczyszczenie innym preparatem lub płynami może być źródłem artefaktów lub fałszywych wyników. Niepójne wyniki mogą być wynikiem różnych odmian metod utwalania 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 utwalacze są niekompatybilne z FISH:

- Utrwalacz Bouin'a
- Utrwalacz B5
- Utrwalacze kwasne (np. kwas pikrynowy)
- Utrwalacz Zenker'a
- Alkohole (stosowane samodzielnie)
- Chlorek rtęci
- Utrwalacz formaldehyd/cynk
- Utrwalacz Hollande'a
- Niezbuforowana 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 rozcieńczanie. Przed użyciem przenieś sondę do temperatury pokojowej (18-25°C), chroniąc przed światłem. Przed otwarciem fiolki zamieszaj w wortexie i krótko odwiń.

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 błędną powietrzą) 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. Przeprowadź hybrydyzację od 2 h do 16 h (np. przez noc) w 37°C poprzez przeniesienie szkiełek do hybrydyzatora lub do komory wilgotnościowej w ciemności.

Istotne jest, aby próbki nie wysychały podczas etapu hybrydyzacji.

Obróbka po hybrydyzacji

Przygotuj obróbkę po hybrydyzacji (płuwanie, 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 użytkowania zestawu ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit.

Denaturacja i hybridyzacja

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 hybridyzatorze i denaturuj preparaty przez 10 min w 75°C.
4. Przenieś szkiełka do komory wilgotnościowej i hybridyzuj przez noc w temperaturze 37°C (np. w cieplarni hybridyzatora).

Istotne jest, aby próbki nie wysychały podczas etapu hybridyzacji.

Obróbka po hybridyzacji

Przygotuj przeprowadzenie obróbki po hybridyzacji (płukanie, barwienie różnicujące, mikroskop fluorescencyjny) zgodnie z instrukcją użytkowania 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

Preparaty cytologiczne

Wydajność została oceniona zgodnie z instrukcją użytkowania zestawu ZytoLight FISH-Cytology Implementation Kit.

Dokładność: Lokalizacja hybridyzacji sondy oceniona na metafazowych wymazach kariotypów normalnych samców. We wszystkich badanych próbkach sonda hybridyzowała wyłącznie z oczekiwanymi loci. Nie zaobserwowano dodatkowych sygnałów ani krzyżowych hybridyzacji. 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 hybridyzowała wyłącznie z oczekiwanymi loci i żadnymi innymi loci. Dlatego specyficzność analityczna została obliczona na 100%.

Preparaty FFPE

Wydajność została oceniona zgodnie z instrukcją użytkowania zestawu ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit.

Dokładność: Lokalizacja hybridyzacji sondy oceniona na metafazowych wymazach kariotypów normalnych samców. We wszystkich badanych próbkach sonda hybridyzowała wyłącznie z oczekiwanymi loci. Nie zaobserwowano dodatkowych sygnałów ani krzyżowych hybridyzacji. 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 hybridyzowała 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 użytkowania zestawu ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit.

Słabe sygnały lub brak sygnałów

| Możliwa przyczyna | Działanie |
|--|---|
| Niedostępna sekwencja docelowa | Zastosuj odpowiednią kontrolę docelową |
| 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 użytkowania zestawu <u>ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit</u> |
| Nieprawidłowa temperatura wstępnej obróbki cieplnej, proteolizy, denaturacji, hybridyzacji, 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 hybridyzatora obowiązkowe jest stosowanie mokrych pasów / napełnionych wodą zbiorników. Gdy używasz cieplarki wymagane jest użytkowanie komory wilgotnościowej. W dodatku szkiełko nakrywkowe powinno być dokładnie uszczelnione, np. Fixogumem w celu zabezpieczenia przed wyschnięciem podczas hybridyzacji |
| Zbyt niskie stężenie buforu płuczącego | Sprawdź stężenie buforu płuczącego |
| 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 hybridyzacji i płukania w ciemności |

Sygnały krzyżowe hybridyzacji; wysokie tło

| Możliwa przyczyna | Działanie |
|---|--|
| Niekompletne odparafinowanie | Użyj słabszych 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 <u>ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit</u> |
| 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 |
|---|-----------------------------------|
| 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 <u>DAPI/DuraTect-Solution (ultra)</u> (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 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.