



ZytoLight FISH-Cytology Implementation Kit

REF Z-2099-20

20

Do fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH) stosując dowolną sondę *ZytoLight* FISH



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

1. Przeznaczenie

Zestaw *ZytoLight* FISH-Cytology Implementation Kit jest przeznaczony do stosowania w połączeniu z sondami *ZytoLight* FISH do wykrywania aberracji genetycznych, np. translokacji, delecji, amplifikacji i aneuploidii chromosomowych w próbkach cytologicznych za pomocą 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

Aberracje genetyczne, np. translokacje, delecje i/ lub amplifikacje, są związane z różnymi ludzkimi nowotworami. Chromosomowe aneuploidie są obserwowane w wielu chorobach wrodzonych.

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. Dostarczone odczynniki

ZytoLight FISH-Cytology Implementation Kit składa się z:

| Kod | Składnik | Ilość | Pojemnik |
|-----|--|-------------|---|
| | | Σ 20 | |
| ES2 | <u>Cytology Pepsin Solution</u> | 4 ml | Butelka z zakraplaczem, przezroczysta nasadka |
| WB5 | <u>20x Wash Buffer TBS</u> | 50 ml | Butelka z zakrętką |
| PT4 | <u>10x MgCl₂</u> | 50 ml | Butelka z zakrętką |
| PT5 | <u>10x PBS</u> | 50 ml | Butelka z zakrętką |
| WB7 | <u>Cytology Stringency Wash Buffer SSC</u> | 500 ml | Butelka z zakrętką (duż a) |
| WB8 | <u>Cytology Wash Buffer SSC</u> | 500 ml | Butelka z zakrętką (duż a) |
| MT7 | <u>DAPI/DuraTect-Solution</u> | 0.8 ml | Naczynie reakcyjne, Niebieska przykrywka |
| | Instrukcja użycia | 1 | |

Z-2099-20 (20 testów): Składniki **ES2** i **MT7** są wystarczające na 20 reakcji. Składniki **PT4**, **PT5**, **WB7** i **WB8** są wystarczające na 7 barwiaczy po 70 ml każdy. Składnik **WB5** jest wystarczający na 14 barwiaczy po 70 ml każdy.

5. Materiały wymagane, ale nie dostarczane

- Sonda *ZytoLight* FISH
- Pozytywny i negatywny preparat kontrolny
- Szkiełka mikroskopowe, niepokryte
- Łażnia wodna (70°C)
- Hybrydyzator lub płyta grzewcza
- Hybrydyzator lub komora wilgotnościowa w ciepłarni do hybrydyzacji
- Regulowane pipety (10 μ l, 25 μ l)
- Barwiacze
- Timer
- Skalibrowany termometr
- Etanol lub odczynnik alkoholowy
- 37% formaldehyd, wolny od kwasów, lub 10% neutralna zbuforowana formalina
- 2x Saline-Sodium Citrate (SSC), np., z 20x SSC Solution (Nr. kat. WB-0003-50)
- 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

6. Odpowiedni zestaw filtrów

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. 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.
- 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 rodki ostrożności dla PT4, PT5, WB5, WB7 i WB8:

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 | Zanieczyszczoną odzież 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 zamrażanie, rozmrażanie, płukanie, suszenie, podgrzewanie, lub zanieczyszczenie innym preparatem lub płynami może powodować artefakty lub fałszywe wyniki.
- 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.

10. Przygotowanie próbek

Inkubować szkiełka przez 2 min w roztworze 2x SSC w 73 ° C w celu postarzenia chemicznego bezpośrednio przed proteolizą.

Alternatywnie, starzenie preparatów można przeprowadzić przez inkubację próbek przez noc (12-16 h) w 37 ° C.

11. Obróbka wstępna produktu

20x Wash Buffer TBS (WB5), 10x MgCl₂ (PT4) i 10x PBS (PT5) należy poddać wstępnej obróbce zgodnie z instrukcjami w części 12 "Procedura testu". Składniki (PT4) i (PT5) mogą formować precipitaty w 2-8°C. Jeśli to konieczne przed użyciem podgrzej do 37°C przez 10 min aż precipitaty

rozpuszczą się całkowicie. Wszystkie pozostałe odczynniki zestawu są gotowe do użycia. Nie jest wymagane rekonstrukcja, mieszanie lub rozcieńczenie.

12. Procedura testu

12.1 Dzień 1

Obróbka wstępna próbki

- Przygotowanie 1x Wash Buffer TBS: Rozcieńczyć 1 część do 20x Wash Buffer TBS (WB5) z 19 częściami dejonizowanej lub destylowanej wody.
- Przygotowanie roztworu 1% formaldehydu: Na 100 ml 1% roztworu formaldehydu zmieszaj 2,7 ml 37% formaldehydu wolnego od kwasów lub 25 ml neutralnej buforowanej formaliny (4% formaldehyd) z 10 ml 10x MgCl₂ (PT4) i 10 ml 10x PBS (PT5) i dopełnić do objętości 100 ml wodą dejonizowaną lub destylowaną. Dokładnie wymieszaj.
- Przygotowanie serii etanolu (roztwory etanolu 70%, 90% i 100%): Rozcieńcz 7, 9 i 10 części do 100% etanolu z odpowiednio 3, 1 i 0 częściami wody dejonizowanej lub destylowanej. Roztwory można przechowywać w odpowiednich pojemnikach i ponownie wykorzystywać.

Etap wstępny (Proteoliza/Dodatkowe utrwalanie)

- (1) Nanieś (kroplami) Cytologia Pepsin Solution (ES2) na próbkę cytologiczną i inkubuj przez 10 minut w 37 ° C w komorze wilgotnościowej.

W zależności od wielu czynników, np. natury i czasu utrwalania, jak również charakteru komórek, mogą być wymagane różne czasy inkubacji. Zalecamy 5-15 min inkubacji dla próbek cytologicznych. Zasadniczo zaleca się ustalenie optymalnego czasu proteolizy w badaniach wstępnych.

- (2) Inkubuj szkiełka przez 5 min w 1x Wash Buffer TBS.
- (3) Inkubuj szkiełka przez 5 min w 1% roztworze formaldehydu.
- (4) Inkubuj szkiełka przez 5 min w 1x Wash Buffer TBS.
- (5) Dehydratacja: w 70%, 90% i 100% etanolu, każdy po 1 min.

Wysusz próbki na powietrzu.

Denaturacja i hybrydyzacja

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

Unikaj długiej ekspozycji sondy na światło.

- (2) Nakryj preparat szkiełkiem nakrywkowym 22 mm x 22 mm (unikaj zamknięcia błędnego 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 cieplarni hybrydyzatora).

Istotne jest, aby próbki nie wysychały podczas etapu hybrydyzacji.

12.2 Dzień 2

Etapy przygotowawcze

- Cytology Stringency Wash Buffer SSC (WB7): Podgrzać do 70°C.
- Cytology Wash Buffer SSC (WB8): Przenieść do temperatury pokojowej.
- DAPI/DuraTect-Solution (MT7): Przed użyciem przenieść do temperatury pokojowej chroniąc przed światłem.

Obróbka po hybrydyzacji i detekcja

- (1) Ostrożnie usuń rubber cement lub klej.
- (2) Ostrożnie usuń szkiełko nakrywkowe.
- (3) Przepłucz przy użyciu buforu do płukania Cytology Stringency Wash Buffer SSC (WB7) przez 2 min w 70°C.

Bufor Cytology Stringency Wash Buffer SSC powinien być wcześniej podgrzany. Sprawdź w razie potrzeby za pomocą termometru.

Zalecamy użycie czterech szkiełek w barwiaku. W razie potrzeby użyj pustych szkiełek, aby ustawić liczbę na cztery.

- (4) Przepłucz przy użyciu buforu do płukania Cytology Wash Buffer SSC (WB8) przez 1 min w temperaturze pokojowej.

Bufor Cytology Wash Buffer SSC powinien być wcześniej podgrzany do temperatury pokojowej. Sprawdź w razie potrzeby za pomocą termometru.

- (5) Wysusz próbki na powietrzu chroniąc przed światłem.
 (6) Nanieś pipetą 25 µl DAPI/DuraTect-Solution (MT7) na szkiełko. Unikając zamkniętych bąbli powietrza przykryj próbki szkiełkiem nakrywkowym (24 mm x 60 mm). Inkubuj w ciemności przez 15 min.

Korzystanie z obcięcia 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.

Kontrola zewnętrzna: 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 |
| Nieprawidłowa temperatura 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 |
| Odprowadzenie 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 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 |

Sygnały krzyżowe hybrydyzacji; wysokie tło

| Możliwa przyczyna | Działanie |
|---|--|
| 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 szkiełko 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 |

Morfologia uległa degradacji

| Możliwa przyczyna | Działanie |
|--|--|
| Proteolityczna obróbka wstępna nie została przeprowadzona prawidłowo | Zoptymalizuj czas inkubacji pepsyny, wydłuż lub skróć jeśli to konieczne |
| Niewystarczające wysuszenie przed aplikacją sondy | Wydłuż suszenie |

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 |

18. Literature

- 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 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.