



FlexISH

BCL2/BCL6 DistingulSH Probe

REF Z-2283-50 Σ 5 (0.05 ml)

REF Z-2283-200 Σ 20 (0.2 ml)

Floresan *in situ* hibridizasyon (FISH) ile 18q21.33'te BCL2 genini ve 3q27.3'te BCL6 genini içeren translokasyonların kalitatif tespiti için



Vücut dışında kullanılan (*in vitro*) tıbbi tanı cihazı
98/79/EC AB Yönetmeliğine göre

1. Kullanım amacı

FlexISH BCL2/BCL6 DistingulSH Probe (PL238) Non-Hodgkin lenfoma (NHL) dokuları gibi formalin-fikse, parafine gömülü örneklerde 18q21.33'te BCL2 genini ve 3q27.3'te BCL6 genini içeren translokasyonların floresan *in situ* hibridizasyon (FISH) ile kalitatif tespitinde kullanılmak içindir. Bu prob FlexISH-Tissue Implementation Kit (Prod. No. Z-2182-5/-20) ile kombine olarak kullanılmak içindir.

Sonuçların yorumlanması hastanın diğer klinik ve patolojik verileri dikkate alınarak hastanın klinik geçmişi kapsamında yetkin bir patoloj tarafından yapılmalıdır.

2. Klinik bağlantısı

Bu prob kullanılarak BCL2 ve BCL6 yeniden düzenlenmeleri eş zamanlı olarak tespit edilebilir ve buna ek olarak bu kromozom bölgelerini etkileyen anormallikler arasında teker teker ayırım yapılabilir.

BCL2, apoptozisi regüle eden ve B hücrelerinde eksprese edilen bir mitokondriyal membran proteinini kodlar. BCL6, lenf gelişiminin ve fonksiyonunun regülasyonunda rol alan bir transkripsiyon represörü olarak çalışan bir proteini kodlar. BCL2 ve BCL6 yeniden düzenlenmeleri çeşitli Non-Hodgkin lenfomada sıklıkla bulunur. Buna ek olarak, BCL2 ve BCL6 yeniden düzenlenmelerinin MYC yeniden düzenlenmeleri ile birlikte meydana geldiği bilinir. Ya BCL2 ya da BCL6 anormalliği ile birlikte olan MYC yeniden düzenlenmelerine double-hit B hücreli lenfomalar (DHL) denir ve çok agresif oldukları ve prognozun zayıf olduğu bilinir. Nadir olarak MYC, BCL2 ve BCL2 yeniden düzenlenmelerinin aynı zamanda görüldüğü triple-hit B hücreli lenfomalar (THL) meydana gelir. DSÖ'nün hematopoietik ve lenf dokuları tümörlerinin sınıflandırılmasının revize 4. baskısına göre DHL ve THL; MYC ve BCL2 ve/veya BCL6 yeniden düzenlenmeli yüksek-dereceli B hücreli lenfoma olarak sınıflandırılır. Bu nedenle, BCL2 ve/veya BCL6 yeniden düzenlenmelerinin floresan *in situ* hibridizasyon (FISH) ile tespiti tanı ve prognoz bakımından ilgili olabilir.

3. Test prensibi

Floresan *in situ* hibridizasyon (FISH) tekniği hücre preparatlarında spesifik nükleik asit dizilerinin tespit edilmesine ve görüntülenmesine izin verir. FISH probları denen floresan işaretli DNA fragmentleri ve bunların preparatlardaki komplementer hedef DNA iplikleri birlikte denatüre edilir ve sonra da hibridizasyon sırasında kaynaşmaları sağlanır. Daha sonra da, spesifik olmayan ve bağlanma yapmayan prob fragmentleri güçlü yıkama adımları ile ortadan kaldırılır. DAPI ile DNA'nın zıt boyanmasının ardından, hibridize olmuş prob fragmentleri, FISH prob fragmentlerinin doğrudan işaretlendiği florokromlara spesifik eksitasyon ve emisyon filtreleri bulunan bir floresan mikroskobu ile görüntülenir.

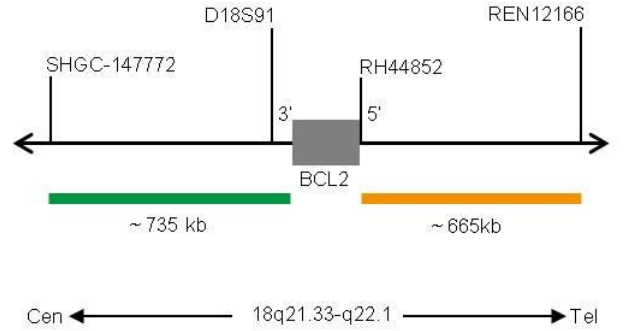
4. Sağlanan reaktifler

FlexISH BCL2/BCL6 DistingulSH Probe şunları içerir:

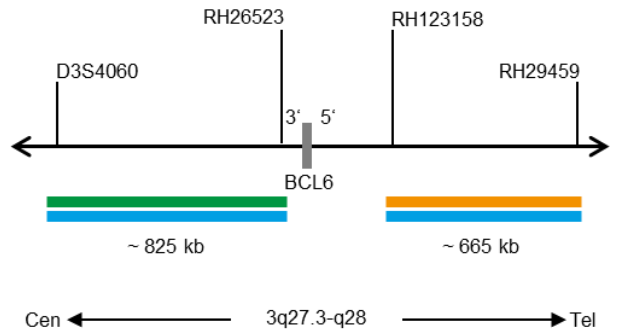
- ZyGreen (eksitasyon 503 nm/emisyon 528 nm) işaretli polinükleotidler (~10.0 ng/μl), 18q21.33* (chr18:60,046,152-60,779,138) konumunda bulunan BCL2 kırılma noktası bölgesinin proksimalindeki ve 3q27.3* (chr3:186,578,337-187,403,834) konumunda bulunan BCL6 kırılma noktası bölgesinin proksimalindeki dizileri hedef alır (bknz. Şekil 1 ve Şekil 2).
- ZyOrange (eksitasyon 547 nm/emisyon 572 nm) işaretli polinükleotidler (~2.5 ng/μl), 18q21.33-q22.1* (chr18:60,994,528-61,658,503) konumunda bulunan BCL2 kırılma noktası bölgesinin distalindeki ve 3q27.3-q28* (chr3:187,744,962-188,411,425) konumunda bulunan BCL6 kırılma noktası bölgesinin distalindeki dizileri hedef alır (bknz. Şekil 1 ve Şekil 2).
- ZyBlue (eksitasyon 418 nm/emisyon 467 nm) işaretli polinükleotidler (~70.0 ng/μl), 3q27.3* (chr3:186,578,337-187,403,834) konumunda bulunan, BCL6 kırılma noktası bölgesinin proksimalinde yeşil-ışaretili BCL6 polinükleotidleri ile birlikte yer alan dizileri ve 3q27.3-q28* (chr3:187,744,962-188,411,425) konumunda bulunan, BCL6 kırılma noktası bölgesinin distalinde turuncu-ışaretili BCL6 polinükleotidleri ile birlikte yer alan dizileri hedef alır (bknz. Şekil 2).

- Formamid tabanlı hibridizasyon tamponu

*Human Genome Assembly GRCh37/hg19'a göre.



Şekil 1: SPEC BCL2 Probe yapısı (ölçekli değildir)



Şekil 2: SPEC BCL6 Probe yapısı (ölçekli değildir)

FlexISH BCL2/BCL6 DistingulSH Probe iki şekilde temin edilir:

- Z-2283-50: 0.05 ml (5 reaksiyon, her biri 10 μl)
- Z-2283-200: 0.2 ml (20 reaksiyon, her biri 10 μl)

5. Gerekli diğer malzemeler

- FlexISH-Tissue Implementation Kit (Prod. No. Z-2182-5/-20)
- Pozitif ve negatif kontrol örnekleri
- Mikroskop lamları, pozitif yüklü
- Su banyosu (37°C, 98°C)
- Hibridizasyon cihazı veya sıcak levha
- Hibridizasyon cihazı veya hibridizasyon etüvünde nemli kutu
- Ayarlanabilir pipetler (10 µl, 25 µl)
- Boyama kapları veya banyoları
- Zaman Sayacı
- Kalibre edilmiş termometre
- Etanol veya reaktif dereceli alkol
- Ksilen
- Deiyonize veya distile su
- Lamel (22 mm x 22 mm, 24 mm x 60 mm)
- Lastik yalıtım solüsyonu, örn., Fixogum Rubber Cement (Ürün No. E-4005-50/-125) veya benzeri
- Uygun donanımlı floresan mikroskobu (400-1000x)
- Floresan mikroskobu için onaylanmış immersiyon yağı
- Uygun filtre setleri

6. Saklama ve kullanma koşulları

2-8°C'de dik olarak ve ışıktan koruyarak saklayın.

ışıktan koruyarak kullanın. Kullandıktan sonra hemen saklama koşullarına ulaştırın. Reaktifleri etiketleri üzerinde belirtilen son kullanma tarihlerinden sonra kullanmayın. Ürünü, uygun şekilde kullanıldığında ve saklandığında etiketi üzerinde belirtilen son kullanma tarihine kadar kullanılabilir.

7. Uyarılar ve önlemler

- Prob uzun süreli olarak ışığa, özellikle de güçlü ışığa maruz kalmamalıdır, yani, tüm adımlar mümkün olduğu ölçüde karanlıkta ve/veya ışık geçirmez kutular içinde yürütülmelidir!
- Kullanmadan önce kullanma kılavuzunu okuyun!
- Son kullanma tarihi gelen ürünleri kullanmayın!
- Bu ürün sağlığa zararlı ve potansiyel olarak enfeksiyöz maddeler içerir (düşük konsantrasyonlarda ve hacimlerde). Reaktiflere doğrudan temas etmekten sakının. Uygun önlemleri alın (tek kullanımlık eldiven, koruyucu gözlük ve laboratuvar giysisi giyin)!
- Reaktifler cilt ile temas ederse cildi derhal bol miktarda su ile yıkayın!
- Profesyonel kullanıcılar için istedikleri takdirde ulaşabilecekleri bir güvenlik bilgi formu bulunmaktadır.
- Reaktifleri tekrar kullanmayın.
- Örnekler arasında çapraz kontaminasyon olmasından sakının, aksi halde hatalı sonuçlara yol açılabilir.

Zararlılık ve önlem ifadeleri:

Zararlılık belirleyici bileşen Formamid'tir.



Tehlike

H319	Ciddi göz tahrişine yol açar.
H351	Kansere yol açma şüphesi var.
H360FD	Üremeye zarar verebilir. Doğmamış çocukta hasara yol açabilir.
H373	Uzun süreli veya tekrarlı maruz kalma sonucu organlarda hasara yol açabilir.
P201	Kullanmadan önce özel talimatları okuyun.
P260	Tozunu/dumanını/gazını/sisini/buharını/spreyini solumayın.
P280	Koruyucu eldiven/koruyucu kıyafet/göz koruyucu/yüz koruyucu kullanın.
P305+P351+P338	GÖZ İLE TEMASI HALİNDE: Su ile birkaç dakika dikkatlice durulayın. Takılı ve yapması kolaysa, kontak lensleri çıkartın. Durulamaya devam edin.
P308+P313	Maruz kalınma veya etkileşme halinde İSE: Tıbbi yardım/bakım alın.
P337+P313	Kilit altında saklayın.

8. Sınırlamalar

- Yalnızca vücut dışı (*in vitro*) tıbbi tanı amaçlı kullanım içindir.
- Yalnızca profesyonel kullanım içindir.
- Herhangi bir pozitif boyanmanın veya boyanma olmamasının klinik yorumlaması başka tanı testleri ile birlikte klinik geçmiş, morfoloji ve diğer histopatolojik kriterler kapsamında yapılmalıdır. Preparatın boyanmasında kullanılan FISH problemleri, reaktifler, tanı panelleri ve yöntemleri hakkında bilgi sahibi olmak yetkin bir patoloğun sorumluluğudur. Boyama işlemi onaylı ve lisanslı bir laboratuvarında, boyanmış lamların incelenmesinden sorumlu olan ve pozitif ve negatif kontrollerin yeterliliğini garanti eden bir patoloğun gözetiminde yapılmalıdır.
- Örneğin boyanması, özellikle de sinyalin yoğunluğu ve zemin boyanması, örneğin boyamadan önce geçtiği işlem ve hazırlık süreçlerine bağlıdır. Kötü fiksasyon, dondurma, çözme, yıkama, kurutma, ısıtma, kesit alma veya diğer örneklerle ya da sıvılarla kontamine etme artefaktlara veya yanlış sonuçlara yol açabilir. Tutarsız sonuçlar fiksasyon ve gömme yöntemlerindeki değişkenliklerden ve de örneğin kendi içinde olan düzensizliklerden meydana gelebilir.
- Prob yalnızca 4. "Sağlanan reaktifler" bölümünde tanımlanan lokusların tespit edilmesi için kullanılmalıdır.
- Ürünün performansı bu kullanma kılavuzunda tanımlanan prosedürler kullanılarak doğrulanmıştır. Bu prosedürlerde yapılan değişiklikler performansı değiştirebilir ve doğrulanması kullanıcı tarafından yapılmalıdır.

9. Etkileşimli maddeler

Örnek içinde bulunan alyuvarlar otofloresan gösterebilir ve sinyalin tanınmasına engel olabilir.

Aşağıdaki fiksatifler FISH ile uyumlu değildir:

- Bouin's fiksatif
- B5 fiksatif
- Asidik fiksatifler (örn., pikrik asit)
- Zenker's fiksatif
- Alkoller (tek başına kullanıldığında)
- Civa klorür
- Formaldehit/çinko fiksatif
- Hollande's fiksatif
- Tamponsuz formalin

10. Örneklerin hazırlanması

Örnekleri FlexISH-Tissue Implementation Kit kullanma kılavuzunda belirtilen şekilde hazırlayın.

11. Ürünün kullanıma hazırlanması

Ürün kullanıma hazırdır. Yeniden sulandırmaya, karıştırmaya veya dilüsyon yapmaya gerek yoktur. Kullanmadan önce probun oda sıcaklığına (18-25°C) ulaşmasına izin verin, ışıktan koruyun. Tüpü açmadan önce vorteks ile çalkalayın ve kısaca spin edin.

12. Çalışma prosedürü

Örneğin ön işlemi

Örneğin ön işlemini (parafin giderme, proteoliz) FlexISH-Tissue Implementation Kit kullanma kılavuzuna göre yapın.

Denatürasyon ve hibridizasyon

1. Ön işlemi yapılmış her bir örneğin üzerine 10 µl prob pipetleyin.
2. Örnekleri 22 mm x 22 mm boyutlarında bir lamel ile kapatın (hava kabarcığı bırakmadan) ve lamelin yalıtımını sağlayın.
Yalıtım için lastik solüsyonu (örn., Fixogum) kullanılmasını öneririz.
3. Lamları bir sıcak levha üzerine ya da bir hibridizasyon cihazına yerleştirin ve örnekleri 75°C'de 10 dakika denatüre edin.
4. Lamları ya bir hibridizasyon cihazına ya da etüv içindeki bir nemli kutuya aktarın ve 37°C'de 2 saat ile 16 saat (yani gece boyu) arasında bir süre hibridize edin.

Hibridizasyon aşamasında örneklerin kurumaması gerekir.

Hibridizasyon sonrası

Hibridizasyon sonrası işlemleri (yıkama, zıt boyama, floresan mikroskobu incelemesi) FlexISH-Tissue Implementation Kit kullanma kılavuzuna göre yapın.

13. Sonuçların yorumlanması

Uygun filtre setleri kullanıldığında probun hibridizasyon sinyalleri yeşil (BCL2 ve BCL6 kırılma noktası bölgesinin proksimali), turuncu (BCL2 ve BCL6 kırılma noktası bölgesinin distali) ve mavi (BCL6 kırılma noktası bölgesinin proksimali ve distali) olarak gözlenir.

Normal durum: Normal hücrelerin veya BCL2 veya BCL6 gen bölgesini içeren yeniden düzenlenmesi olmayan hücrelerin interfazlarında uygun bir iki bant geçişli filtre seti ile dört yeşil/turuncu birleşik sinyal, uygun bir tek bant geçişli filtre seti ile iki mavi sinyal gözlenir (bkz. Şekil 3).

Anormal durum: Bir BCL2 translokasyonundan etkilenmiş bir 18q21.33-q22.1 lokusu mavi sinyaller ile birlikte yer almayan ayrı bir yeşil sinyal ve ayrı bir turuncu sinyal ile belli olur. Bir BCL6 translokasyonundan etkilenmiş bir 3q27.3-q28 lokusu her biri bir mavi sinyal ile birlikte yer alan ayrı bir yeşil sinyal ve ayrı bir turuncu sinyal ile belli olur (bkz. Şekil 3).

Üst üste gelen yeşil ve turuncu sinyaller sarı olarak görülebilir.

	Yeşil/Turuncu İki Bant Geçişli Filtre Seti	Mavi Tek Bant Geçişli Filtre Seti	Birleştirilmiş Görsel veya Üç Bant Geçişli Filtre Seti
Normal hücreler			
BCL2 yeniden düzenlenmesi			
BCL6 yeniden düzenlenmesi			

Şekil 3: Normal ve anormal hücre çekirdeklerinde beklenen sonuçlar

Bazı anormal örneklerde yukarıda belirtilenden farklı bir sinyal modeli oluşturabilen başka sinyal dağılımları gözlenebilir ve bu varyant yeniden düzenlenmelerini gösterir. Beklenmeyen sinyal modelleri daha fazla araştırılmalıdır.

Lütfen dikkat edin:

- Kromatinin yoğunluğunu kaybetmesinden dolayı tek FISH sinyalleri küçük kümeler gibi görünebilir. Bu yüzden, aralarında 1 sinyal çapından daha düşük veya ona eşit mesafe bulunan aynı büyüklükteki iki veya üç sinyal tek sinyal sayılmalıdır.
- Üst üste olan hücre çekirdeklerini değerlendirmeyin.
- Aşırı sindirilmiş hücre çekirdeklerini (çekirdek içinde görülen karanlık alanlar sayesinde belli olur) saymayın.
- Güçlü otofloresan gösteren hücre çekirdeklerini saymayın; bunlar sinyal tanınmasına engel olurlar.
- Negatif veya spesifik olmayan bir sonuç çok sayıda etken sebebiyle meydana gelebilir (17. Bölüme bakınız).
- Sonuçları doğru yorumlamak için kullanıcı bu ürünü tanı prosedürlerinde kullanmadan önce ulusal ve/veya uluslararası yönergelerle göre doğrulamalıdır.

14. Önerilen kalite kontrol prosedürleri

İşlenen örneklerin ve test reaktiflerinin doğru performans gösterdiklerini izlemek için her deneye iç ve dış kontroller dahil edilmelidir. İç ve/veya dış kontroller uygun boyanma göstermezse hasta örnekleri ile alınan sonuçlar geçersiz kabul edilmelidir.

İç kontrol: Örnek içindeki normal sinyal modeli gösteren neoplastik olmayan hücreler, örn., fibroblastlar.

Dış kontrol: Doğrulanmış pozitif ve negatif kontrol örnekleri.

15. Performans özellikleri

Doğruluk: Proben hibridizasyon lokasyonu karyotip olarak normal bir erkeğin metafaz yaymalarında değerlendirilmiştir. Test edilen tüm örneklerde prob yalnızca beklenen lokuslara hibridize olmuştur. Başka sinyal veya çapraz-hibridizasyon gözlenmemiştir. Bu yüzden doğruluk %100 olarak hesaplanmıştır.

Analitik duyarlılık: Analitik duyarlılık değerlendirmesinde prob, karyotip olarak normal erkeklerin metafaz yaymalarında değerlendirilmiştir. Test edilen tüm örneklerde tüm hücre çekirdeklerinde beklenen normal sinyal modeli gözlenmiştir. Bu yüzden analitik duyarlılık %100 olarak hesaplanmıştır.

Analitik özgüllük: Analitik özgüllük değerlendirmesinde prob, karyotip olarak normal erkeklerin metafaz yaymalarında değerlendirilmiştir. Test edilen tüm örneklerde tüm sinyaller yalnızca beklenen hedef lokuslara hibridize olmuş, başka lokusa olmamıştır. Bu yüzden analitik özgüllük %100 olarak hesaplanmıştır.

16. Atık bertarafı

Reaktiflerin bertarafı yerel düzenlemelere uygun olarak yapılmalıdır.

17. Sorun giderme

Çalışma talimatlarına uyulmaması hatalı sonuçların alınmasına veya sonuç alınmamasına sebep olabilir.

Zayıf sinyaller veya hiç sinyal bulunmaması

Olası sebep	Önlem
Hedef dizi bulunmuyor	Uygun kontroller kullanın
Örnek doğru fikse olmamış	Fiksasyon süresini ve fiksatifi optimize edin
Isı ön işlemi, proteoliz, denatürasyon, hibridizasyon veya güçlü yıkama sıcaklığı doğru değil	Kullanılan tüm teknik araçların sıcaklığını kalibre edilmiş bir termometre ile kontrol edin
Proteolitik ön işlem doğru yapılmamış	Pepsin inkübasyon süresini optimize edin, gerekirse artırın veya azaltın
Prob buharlaşması	Bir hibridizasyon cihazı kullanırken ıslak şeritlerin / su dolu haznelerin kullanılması zorunludur. Bir hibridizasyon etüvü kullanırken bir nemli kutunun kullanılması gerekir. Ayrıca, hibridizasyon sırasında örneğin kurumasını önlemek için lamel iyice yalıtılmalıdır (örn. Fixogum ile)
Çok düşük konsantrasyonlu güçlü yıkama tamponu	Güçlü yıkama tamponunun konsantrasyonunu kontrol edin
Eski dehidrasyon solüsyonları	Taze dehidrasyon solüsyonları hazırlayın
Floresan mikroskobu yanlış ayarlanmış	Doğru ayarlayın
Uygun olmayan filtre setleri kullanılmış	Proben florokromlarına uygun filtre setleri kullanın. <i>Üç bant geçişli filtre setleri tek veya iki bant geçişli filtrelere göre daha az ışık sağlar. Sonuç olarak, bu üç bant geçişli filtre setleri kullanıldığında sinyaller daha zayıf görünebilir</i>
Probların/floroforların ışıktan zarar görmesi	Hibridizasyon ve yıkama adımlarını karanlıkta yapın

Çapraz hibridizasyon sinyalleri; kötü zemin

Olası sebep	Önlem
Parafin giderme tamamlanmamış	Taze solüsyonlar kullanın; parafin giderme işleminin süresini kontrol edin
Proteolitik ön işlem çok güçlü	Pepsin inkübasyon süresini azaltın

Alana düşen prob hacmi çok yüksek	Örneğe/alana düşen prob hacmini azaltın, bir yerde fazla olmasını önlemek için probu damlatarak dağıtın
Lamlar hibridizasyondan önce oda sıcaklığına soğutulmuş	Lamları çabucak 37°C'ye geçirin
Güçlü yıkama tamponunun konsantrasyonu çok yüksek	Güçlü yıkama tamponunun konsantrasyonunu kontrol edin
Hibridizasyonu takip eden yıkamanın sıcaklığı çok düşük	Sıcaklığı kontrol edin; gerekirse yükseltin
İnkübasyon adımları arasında örnekler dehidre olmuş	Lamların yalıtımını sağlayarak ve inkübasyonu nemli ortamda yaparak dehidrasyon olmasını önleyin

Hücre çekirdekleri üst üste gelmiş

Olası sebep	Önlem
Doku kesitlerinin kalınlıkları uygun değil	2-4 µm kalınlığında mikrotom kesitleri alın

Doku morfolojisi bozulmuş

Olası sebep	Önlem
Hücre veya doku örneği doğru fikse olmamış	Fiksasyon süresini ve fiksatifi optimize edin
Proteolitik ön işlem doğru yapılmamış	Pepsin inkübasyon süresini optimize edin
Probun uygulanmasından önce yeterli kurutma yapılmamış	Havada kuruma süresini uzatın

Örnek lama iyi yapışmamış

Olası sebep	Önlem
Lamın kaplaması uygun değil	Uygun lamlar (pozitif yüklü) kullanın
Proteolitik ön işlem çok güçlü	Pepsin inkübasyon süresini düşürün

Zayıf zıt boyanma

Olası sebep	Önlem
DAPI solüsyonunun konsantrasyonu düşük	<u>DAPI/DuraTect-Solution (ultra)</u> (Ürün No. MT-0008-0.8) kullanın
DAPI inkübasyon süresi çok kısa	DAPI inkübasyon süresini ayarlayın

18. Literatür

- Aukema SM, et al. (2011) *Blood* 117: 2319-31.
- Khelfer Y, et al. (2017) *Curr Oncol Rep* 19: 74.
- Kieviets T, et al. (1990) *Cytogenet Cell Genet* 53: 134-6.
- Swerdlow SH, et al. (2016) *Blood* 127: 2375-90.
- Wang W, et al. (2015) *Am J Surg Pathol* 39: 1132-1139.
- Wilkinson DG: In Situ Hybridization, A Practical Approach, *Oxford University Press* (1992) ISBN 0 19 963327 4.

Uzmanlarımız sorularınızı yanıtlamaya hazırdır. Lütfen help@zytovision.com adresine yazınız.



ZytoVision GmbH
Fischkai 1
27572 Bremerhaven/ Germany
Telefon: +49 471 4832-300
Faks: +49 471 4832-509
www.zytovision.com
E-postal: info@zytovision.com

Ticari markalar:

ZytoVision® ve F/xtSH® ZytoVision GmbH'nin ticari markalarıdır.