



FlexISH- Tissue Implementation Kit

REF Z-2182-5 Σ 5

REF Z-2182-20 Σ 20

Fluoreszcens in situ hibridizációs (FISH) eljárásokban
való felhasználásra

4250380N8486



In vitro diagnosztikai orvosi eszköz

IVDR (EU) 2017/746 szerint

1. Javasolt alkalmazás

A FlexISH-Tissue Implementation Kit a FlexISH próbákkal kombinálva, formalinban fixált, paraffinba ágyazott mintákon fluoreszcens *in situ* hibridizációval (FISH) történő alkalmazására szolgál.

A termék kizárólag professzionális használatra készült. A termékkel végzett valamennyi vizsgálatot minősített, engedéllyel rendelkező anatómiai patológiai laboratóriumban, patológus/humángenetikus felügyelete mellett, szakképzett személyzetnek kell elvégeznie.

2. A vizsgálat elve

A fluoreszcens *in situ* hibridizációs (FISH) technika lehetővé teszi specifikus nukleinsav-szekvenciák kimutatását és vizualizálását sejtkészítményekben. A fluoreszcensen jelölt DNS-törödékek, az úgynevezett FISH-szondák és a preparátumokban lévő komplementer cél-DNS-szálak együttesen denaturálódnak, majd a hibridizáció során hagyják, hogy a DNS-törödékek egymáshoz kapcsolódjanak. Ezt követően a nem specifikus és nem kötött szondafragmentumokat szigorú mosási lépésekkel távolítják el. A DNS DAPI-val történő ellenfestése után a hibridizált szondafragmentumokat fluoreszcens mikroszkóp segítségével vizualizáljuk, amely olyan gerjesztő és emissziós szűrőkkel van felszerelve, amelyek specifikusak azokra a fluorokrómokra, amelyekkel a FISH-szondafragmentumokat közvetlenül jelölték.

3. Rendelkezésre bocsátott reagensek

A FlexISH-Tissue Implementation Kit két méretben kapható, és a következőkből áll:

Kód:	Komponens	Mennyiség		Konténer
		20 Σ	5	
PT1	<u>Heat Pretreatment Solution Citric</u>	500 ml	150 ml	Csavaros kupakos üveg (nagy)
ES1	<u>Pepsin Solution</u>	4 ml	1 ml	Cseppentős üveg, fehér kupakkal
WB10	<u>5x FlexISH Wash Buffer</u>	500 ml	150 ml	Csavaros kupakos üveg (nagy)
MT7	<u>DAPI/DuraTect-Solution</u>	0.8	0.2	Reakcióedény, kék fedél
	Instructions for use	1	1	

Z-2182-5 (5 vizsgálat): ES1 és MT7 komponensek 5 reakcióhoz elegendőek. A WB10 komponens 3x 3 db, egyenként 70 ml-es festőedényhez elegendő. A PT1 komponens elegendő 2 db, egyenként 70 ml-es festőedényhez.

Z-2182-20 (20 vizsgálat): Az ES1 és MT7 komponensek 20 reakcióhoz elegendőek. A WB10 komponens 11x 3 darab, egyenként 70 ml-es festőedényhez elegendő. A PT1 komponens 7 darab, egyenként 70 ml-es festőedényhez elegendő.

4. Szükséges, de nem biztosított anyagok

- FlexISH probe
- Pozitív és negatív kontrollminták
- Mikroszkópos tárgylemezek, pozitív töltésű
- Vízfürdő (37 °C, 98 °C)
- Hibridizáló vagy főzőlap
- Hibridizáló vagy páraakna a hibridizációs kemencében
- Állítható pipetták (10 µl, 25 µl)
- Festőedények vagy fürdők
- Időzítő
- Kalibrált hőmérő
- Etanol vagy reagens alkohol
- Xilol
- Deionizált vagy desztillált víz
- fedőlemezek (22 mm x 22 mm, 24 mm x 60 mm)
- Gumicement, pl. Fixogum Rubber Cement (Prod. No. E-4005-50/-125) vagy hasonló.
- Megfelelően karbantartott fluoreszcens mikroszkóp (400-1000x)
- Fluoreszcens mikroszkópiához jóváhagyott merülőolaj
- Megfelelő szűrőkészletek

5. Tárolás és kezelés

Tárolása 2-8 °C-on, függőleges helyzetben. Felhasználást követően azonnal a tárolási feltételek alkalmazandóak. Ne használja a reagenseket a címkén feltüntetett lejárati időn túl. A termék a címkén feltüntetett lejárati ideig őrzi meg stabilitását megfelelően kezelés mellett.

6. Figyelmeztetések és óvintézkedések

- Használat előtt olvassa el a használati utasítást!
- Ne használja a reagenseket a lejárati idő letelte után!
- Ez a termék olyan anyagokat tartalmaz (kis koncentrációban és térfogatban), amelyek az egészségre károsak és potenciálisan fertőzőek. Kerülje a közvetlen érintkezést a reagensekkel. Tegyen megfelelő védőintézkedéseket (használgon eldobható kesztyűt, védőszemüveget és laboratóriumi öltözetet)!
- Jelentsen a gyártónak és az illetékes hatóságnak a termékkel kapcsolatban minden súlyos eseményt a helyi előírásoknak megfelelően!

- Ha a reagens bőrrrel érintkezik, azonnal öblítse le bő vízzel!
- Foglalkozásszerű felhasználók részére igény esetén anyagbiztonsági adatlapot biztosítunk.
- Ne használja fel újra a termékeket, kivéve, ha az újrafelhasználás kifejezetten engedélyezett!
- A minták keresztyszennyeződését kerülni kell, mert ez hibás eredményhez vezethet.
- A hibridizáció és a mosás során a mintákat nem szabad kiszáritani.

Az ES1 speciális címkézése:

EUH208	pepsin A-t tartalmaz. Allergiás reakciót válthat ki.
EUH210	Kérésre biztonsági adatlap kapható..

Veszély- és óvintézkedési nyilatkozatok az PT1 és WB10 esetében:

A veszélyt meghatározó komponens a reakcióközeg: EK-szám: 247-500-7] és 2-metil-2H-izotiazol-3-on [EK-szám: 220-239-6] (3:1).



Figyelem

H317	Allergiás bőrreakciót válthat ki.
P261	Kerülje a por/füst/gáz/köd/gőzök/permet belélegzését.
P272	Szennyezett munkaruhát tilos kivinni a munkahely területéről.
P280	Védőkesztyű/védőruha/szemvédő/arcvédő/hallásvédelem/... használata kötelező.
P302+P352	HA BŐRRE KERÜL: Lemosás bő vízzel
P333+P313	Bőrirritáció vagy kiütések megjelenése esetén: orvosi ellátást kell kérni.
P362+P364	A szennyezett ruhadarabot le kell vetni és újbóli használat előtt ki kell mosni.

Veszély- és óvintézkedési nyilatkozatok az MT7 esetében:

Ez a próba az 1272/2008/EK rendelet szerint nem minősül veszélyesnek.

7. Korlátozások

- *In vitro* diagnosztikai használatra.
- Csak szakképzett felhasználók részére.
- Csak nem-automatizált használatra.
- Bármely pozitív festődés vagy annak hiánya esetén, a klinikai interpretációt a klinikai anamnézis, a morfológia, az egyéb kórszövettani kritériumok, valamint az egyéb diagnosztikai tesztek összefüggésében kell elvégezni. A szakképzett patológus/humángenetikus felelőssége, hogy ismerje az ISH-próbákat, reagenseket, diagnosztikai paneleket és a festett készítmény előállításához használt módszereket. A festést minősített, engedéllyel rendelkező laboratóriumban kell elvégezni patológus/humángenetikus felügyelete mellett, aki a festett tárgylemezek áttekintéséért és a pozitív és negatív kontrollok biztosításáért is felelős.
- A minta festése, különösen a jelintenzitás és a háttérfestés erőssége a festést megelőző mintakezeléstől és feldolgozástól függ. A minta nem megfelelő fixálása, fagyasztása, felolvasztása, mosása, szárítása, melegítése, metszése vagy más mintákkal és folyadékokkal való keresztyszennyezése műtermékek vagy hamis eredmények kialakulásához vezethet. Ellentmondó eredmények eredhetnek a minta rögzítési és beágyazási eltéréseiből, valamint magában a mintában rejlő egyenlőtlen feltételekből.
- A teljesítmény érvényesítése a jelen használati útmutatóban leírt eljárásokkal történt. Ezen eljárások módosítása megváltoztathatja a teljesítményt, és ezeket a felhasználónak ellenőriznie kell. Ez az IVD csak akkor rendelkezik CE-tanúsítvánnyal, ha az ebben az útmutatóban leírtak szerint használják, a rendeltetészerű használat keretein belül.

8. Interferenciát kiváltó anyagok

A mintában lévő vörösvértestek autofluoreszcenciát mutathatnak, ami akadályozza a jelfelismerést.

A következő fixálószerrek nem kompatibilisek a FISH-vél:

- Bouin-fixáló
- B5 fixáló
- savas fixálók (pl. pikrinsav)
- Zenker-fixáló
- Alkohokok (önmagukban használva)
- Higany-klorid
- Formaldehid/cink fixáló
- Hollande fixáló
- Nem pufferelt formalin

9. A minták előkészítése

Ajánlások:

- Fixálás 10% semleges pufferelt formalinban 24 órán keresztül szobahőmérsékleten (RT, 18°C-25°C).
- Mintaméret $\leq 0,5 \text{ cm}^3$.
- Használjon prémium minőségű paraffint.
- A beágyazást 65 °C-nál alacsonyabb hőmérsékleten kell végezni.
- Készítsen 2-4 μm -es mikrotomos metszeteket.
- Használjon pozitív töltésű tárgylemezeket.
- Fixáljuk a szövetszelvényeket 2-16 órán át 50-60 °C-on.

10. A reagens előkészítése

Az 5x FlexSH Wash Buffer (WB10) a 11. pontban leírtak szerint kell előkezelni. „Assay procedure” (Vizsgálati eljárás). A készlet összes többi reagensét azonnal felhasználásra kész állapotban kell használni. Nincs szükség rekonstitúcióra, keverésre vagy hígításra.

11. Vizsgálati eljárás

11.1 11.1 1. nap

Előkészítő lépések

1. Készítsünk etanol-sorozatot (70%-os, 90%-os és 100%-os etanolos oldatok): Hígítsuk fel a 100%-os etanolt ionmentesített vagy desztillált vízzel. Ezek az oldatok megfelelő tartályokban tárolhatók és újra felhasználhatók.
2. Heat Pretreatment Solution EDTA (PT2): Melegítse 98 °C-ra egy lefedett festőedénybe..
3. FlexSH Probe: Használat előtt hozza szobahőmérsékletre, védje a fénytől. Az injekciós üveg felnyitása előtt keverjük össze vortexeléssel és rövid ideig forgassuk le.

Előkezelés (viaszmentesítés/proteolízis)

1. Inkubálja a tárgylemezeket 2x 5 percig xilolban.
2. Inkubáljuk 100%-os, 100%-os, 90%-os és 70%-os etanolban, egyenként 2 percig.
3. Mossunk 2x 2 percig ionmentesített vagy desztillált vízben.
4. Inkubáljuk 20 percig 98°C-on előmelegített Heat Pretreatment Solution Citric (PT1).

Javasoljuk, hogy festőedényenként legfeljebb nyolc tárgylemezt használjon. A tárgylemezek bemerítését követően ellenőrizze a téglében lévő Citromsavas hőelkezelő oldat hőmérsékletét, és kezdje el az időt, amint az oldat hőmérséklete elérte a 95°C-ot.

5. Azonnal helyezze át a tárgylemezeket ionmentesített vagy desztillált vízbe, mossa 2x 2 percig, majd öntse le vagy törölje le a vizet.
6. Vigyen fel (cseppenként) Pepsin Solution (ES1) a mintákra, és inkubálja 15 percig 37°C-on, pára kamrában.

Az **ES1** csapadékot képezhet, amely nem befolyásolja a minőséget

Több tényezőtől, pl. a rögzítés jellegétől és időtartamától, a metszetek vastagságától és a minták jellegétől függően különböző inkubációs időkre lehet szükség. Az inkubációs időre vonatkozó iránymutatásként 2-30 perc inkubációs időt ajánlunk. Általános szabályként javasoljuk, hogy a proteolízis optimális idejét előzetes vizsgálatok során állapítsa meg.

- Mossunk 2x 2 percig ionmentesített vagy desztillált vízben.
- Dehidratálás: 70%-os, 90%-os és 100%-os etanolban, egyenként 1 percig.
- Légszáras szakaszok.

Ügyeljen arra, hogy a szonda felhelyezése előtt a metszeteket teljesen megszáritsa, mivel a maradék nedvesség csökkentheti a jel intenzitását és/vagy befolyásolhatja a minta morfológiáját.

Denaturáció és hibridizáció

- Pipetázzon 10 µl FlexISH Probe-t minden előkezelt mintára.
Kerülje a szonda hosszú ideig tartó fényhatását.
- Fedje le a mintákat egy 22 mm x 22 mm-es fedőlappal (kerülje el a beszorult buborékokat), és zárja le a fedőlapot.

A tömítéshez gumicement (pl. Fixogum Rubber Cement) használatát javasoljuk.

- Helyezze a tárgylemezeket forró lemezre vagy hibridizátorra, és denaturálja a mintákat 10 percig 75°C-on.
- Végezze el a hibridizációt 2 órától 16 óráig (azaz egy éjszakán át) 37 °C-on, vagy a tárgylemezeket hibridizáló készülékbe, vagy pára kamrába és hibridizációs kemencébe helyezve.

Alapvető fontosságú, hogy a szövet/sejtminták ne száradjanak ki a hibridizációs lépés során.

11.2 1. és 2. nap

Előkészítő lépések

- 5x FlexISH Wash Buffer: *mosópuffer elkészítése*: Hígítson fel 1 rész 5x FlexISH Wash Buffer (WB10) 4 rész deionizált vagy desztillált vízzel. Töltsön meg három festőedényt az 1x FlexISH Wash Buffer , egy edényt melegítsen elő 72°C-ra, két edényt pedig tartson szobahőmérsékleten.
- DAPI/DuraTect-Solution (MT7): Használat előtt szobahőmérsékletre kell hozni, fénytől óvni kell.

Hibridizálás és kimutatás

- Óvatosan távolítsa el a gumibetétet vagy a ragasztót.
- A fedőlemezeket szobahőmérsékleten 1-2 percre 1x FlexISH Wash Buffer pufferbe merítve távolítsa el.

To facilitate the removal of the coverslip, this step can alternatively be performed for 2 min at 37°C.

- Mossuk az 1x FlexISH Wash Buffer pufferrel 10 percig 72°C-on.
Az 1x FlexISH Wash Buffer elő kell melegíteni. Szükség esetén hőmérővel ellenőrizze. Ne használjon nyolcnál több tárgylemezt festőedényenként.
- Mossuk az 1x FlexISH Wash Buffer pufferrel 3 percig szobahőmérsékleten..
- Inkubálja a tárgylemezeket 70%-os, 90%-os és 100%-os etanolban, egyenként 1 percig.
- A mintákat a levegőn, fénytől védve szárítsa meg.
- Pipetázzon 25 µl DAPI/DuraTect-Solution (MT7) a tárgylemezekre. A beszorult buborékok elkerülése érdekében fedjük le a mintákat fedőlemezrel (24 mm x 60 mm). Inkubáljuk sötétben 15 percig.

A nyílás méretének növelése érdekében levágott pipettahegy használata megkönnyítheti a pipetázási folyamatot. Kerülje a hosszú fényhatást.

- A tárgylemezeket sötétben tárolja. Hosszabb tárolás esetén ez 2-8 °C-on történjen.
- A mintaanyag kiértékelése fluoreszcens mikroszkópiával történik. A következő hullámhossz-tartományokhoz szükséges szűrőkészletekre van szükség:

Fluoreszkáló festék	Gerjesztés	Kibocsátás
ZyBlue	418 nm	467 nm
ZyGreen	503 nm	528 nm
ZyGreen 2.0	493 nm	518 nm
ZyGold	532 nm	553 nm
ZyOrange	547 nm	572 nm
ZyRed	580 nm	599 nm

12. Az eredmények kiértékelése

Megfelelő szűrőkészletek alkalmazásával normál sejtek vagy kromoszóma-rendellenességeket nem mutató sejtek interfázisaiban vagy metafázisaiban

szondánként/fluoreszcens jelölésenként két jel jelenik meg, kivéve az X és/vagy Y kromoszómákat célzó szondákat, amelyek esetében nemtől függően szondánként/fluoreszcens jelölésenként egy-két jel nem jelenik meg. A kromoszóma-aberrációkkal rendelkező sejtekben az interfázisokban vagy metafázisokban eltérő jelmintázat látható. Az eredmények értelmezésével kapcsolatos további részletekért kérjük, olvassa el a megfelelő szonda kézikönyvét.

13. Ajánlott minőségellenőrzési eljárások

Olvassa el a megfelelő ZytoVision próba használati utasítását.

14. Teljesítményjellemzők

Olvassa el a megfelelő ZytoVision próba használati utasítását.

15. Eltávolítás

A reagensek hulladékként történő elhelyezését az országos szabályozásokkal összhangban kell elvégezni.

16. Hibaelhárítás

A kezelési utasításoktól való bármilyen eltérés rosszabb festési eredményhez vagy egyáltalán nem festéshez vezethet. További információkért kérjük, olvassa el a www.zytovision.com honlapot.

Gyenge jelek vagy egyáltalán nincs jel

Lehetséges ok	Javasolt teendő
Nem megfelelően rögzített sejt- vagy szövetminta	Optimalizálja a rögzítési időt és a fixálószer.
Nem megfelelően végzett proteolitikus előkezelés	Optimalizálja a pepszin inkubációs idejét, szükség esetén növelje vagy csökkentse azt.
Szonda párolgás	A hibridizáló használata esetén a nedves csikok/vízzel töltött tartályok használata kötelező. Hibridizáló kemence használata esetén a pára kamra használata kötelező. Ezenkívül a fedőlemezt teljesen le kell zárni, pl. Fixogummal, hogy megakadályozzuk a minta kiszáradását a hibridizáció során.
Nem megfelelő szűrőkészletek használata	Használjon a szonda fluorokrómjainak megfelelő szűrőkészleteket. <i>A háromszoros sávszűrő-készletek kevesebb fényt biztosítanak az egy- vagy kétsávszűrő-készletekhez képest. Következésképpen a jelek halványabbnak tűnhetnek e háromsávú szűrő-készletek használatával.</i>

Kereszt hibridizációs jelek; zajos háttér

Lehetséges ok	Javasolt teendő
Nem teljes viaszmentesítés	Használjon friss oldatokat; ellenőrizze a viaszmentesítés időtartamát.
Túl erős proteolitikus előkezelés	Csökkentse a pepszin inkubációs idejét
A tárgylemezeket hibridizáció előtt szobahőmérsékletre kell hűteni.	A tárgylemezeket gyorsan helyezze át 37 °C-ra

Morfológia romlott

Lehetséges ok	Javasolt teendő
A sejt- vagy szövetmintát nem megfelelően rögzítették	Optimalizálja a rögzítési időt és a fixálószer
Nem megfelelően végzett proteolitikus előkezelés	Optimalizálja a pepszin inkubációs idejét, szükség esetén csökkentse azt.
Elégtelen szárítás a szonda felhelyezése előtt	Légszárítás meghosszabbítása

Átfedő magok

Lehetséges ok	Javasolt teendő
A szöveti metszetek nem megfelelő vastagsága	Készítsünk 2-4 µm-es mikrotomos metszeteket

A minta lebeg a tárgylemezről

Lehetséges ok	Javasolt teendő
Túl erős proteolitikus előkezelés	Csökkentse a pepszin inkubációs idejét

Gyenge ellenfesték

Lehetséges ok	Javasolt teendő
Alacsony koncentrációjú DAPI-oldat	Használjon helyette <u>DAPI/DuraTect-Solution (ultra)</u> (Prod. No. MT-0008-0.8).
Túl rövid DAPI inkubációs idő	A DAPI inkubációs idő beállítása

17. Irodalom

- 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.

18. Felülvizsgálat

Felülvizsgálat	A változás leírása
1.2.1	11. Vizsgálati eljárás ZyGreen 2.0 hozzáadva



www.zytovision.com

Kérjük, látogasson el www.zytovision.com weboldalra a legfrissebb használati utasításokért, valamint a különböző nyelvű használati utasításokért.

Szakembereink készséggel válaszolnak kérdéseikre.
Vegye fel velünk a kapcsolatot a helptech@zytovision.com címen.



ZytoVision GmbH
Fischkai 1
27572 Bremerhaven/ Németország
Phone: +49 471 4832-300
Fax: +49 471 4832-509
www.zytovision.com
Email: info@zytovision.com

Védjegy:

A ZytoVision® és a F/exSH® a ZytoVision GmbH védjegyei.