



**ZytoLight**

## **SPEC 18/CEN X/Y Triple Color Probe**

**REF** Z-2163-200

$\Sigma$  20 (0.2 ml)

Do jakościowej detekcji ludzkich specyficznych sekwencji chromosomu 18 i alfa satelit chromosomów X i Y metodą fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH)



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

### 1. Przeznaczenie

ZytoLight SPEC 18/CEN X/Y Triple Color Probe (PL119) jest przeznaczony do jakościowej detekcji ludzkich specyficznych sekwencji chromosomu 18 i alfa satelit chromosomów X i Y w próbkach cytologicznych utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie takich jak komórki białaczkowe 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

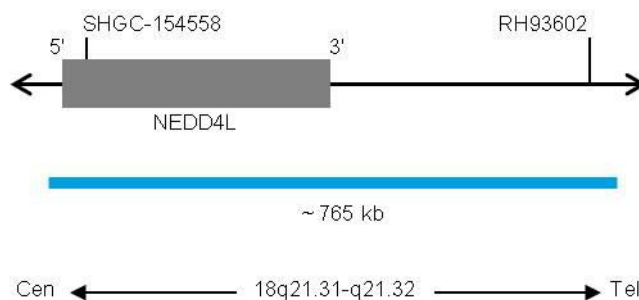
Technika fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH) umożliwia wykrywanie i wizualizację określonych sekwencji kwasów nukleinowych w preparatach komórkowych. Fluorescencyjnie oznakowane fragmenty DNA, nazwane sondami, i ich komplementarne docelowe nici DNA w preparatach są wspólnie denaturowane, a 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 SPEC 18/CEN X/Y Triple Color Probe składa się z:

- ZyBlue (wzbudzenie 418 nm/emisja 467nm) wyznakowane polinukleotydy (~37 ng/ $\mu$ l), których docelowe sekwencje są zmapowane w 18q21.31-q21.32\* (chr18:55,690,725-56,455,119) (patrz Rys. 1).
- ZyGreen (wzbudzenie 503 nm/emisja 528 nm) wyznakowane polinukleotydy (~4.5 ng/ $\mu$ l), których docelowe sekwencje są zmapowane w Xp11.1-q11.1 specyficznych dla alfa satelity regionu centromerowego DXZ1 chromosomu X.
- ZyOrange (wzbudzenie 547 nm/emisja 572 nm) wyznakowane polinukleotydy (~1.5 ng/ $\mu$ l), których docelowe sekwencje są zmapowane w Yp11.1-q11.1 specyficznych dla alfa satelity regionu centromerowego DYZ3 chromosomu Y.
- Bufor do hybrydyzacji oparty na formamidzie

\* zgodnie z Human Genome Assembly GRCh37/hg19



Rys. 1: SPEC 18 Mapa sondy (bez skali)

ZytoLight SPEC 18/CEN X/Y Triple Color Probe jest dostępny w jednym rozmiarze:

- Z-2163-200: 0.2 ml (20 reakcji po 10  $\mu$ l 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
- Barwiacze
- Skalibrowany termometr
- Regulowane pipety (10  $\mu$ l, 25  $\mu$ l)
- Etanol lub odczynnik alkoholowy
- Dejonizowana lub destylowana woda
- Szkiełka nakrywkowa (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
- Łażnia 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
- Łażnia wodna (37°C, 98°C)
- Ksilen

## 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 opłucz 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 środki ostrożności:

Składnik determinujący zagrożenie to formamid.



### Niebezpieczeństwo

|           |  |
|-----------|--|
| H351      | Podejrzewa się, że powoduje 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 środkami ostrożności.                        |
| P202      | Nie używać przed zapoznaniem się i zrozumieniem wszystkich środków 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 styczenia: 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 utrwalenie, zamrażanie, rozmrażanie, płukanie, suszenie, podgrzewanie, krojenie lub zanieczyszczenie innym preparatem

lub płynami może być źródłem artefaktów lub fałszywych wyników. Niespójne wyniki mogą być wynikiem różnych odmian metod utrwalania i zatapiania, a także obecności nieprawidłowości w próbce.

- Sonda powinna być użyta do detekcji loci opisanej w części 3 „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 utrwalacze są niekompatybilne z FISH:

- Utrwalacz Bouin'a
- Utrwalacz B5
- Utrwalacze kwaśne (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 cm<sup>3</sup>.
- Stosuj parafinę jako ści 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 odwiruj.

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

*Istotne jest, aby próbki nie wysychały podczas etapu hybrydyzacji.*

#### Obróbka po hybrydyzacji

Przygotuj obróbkę po hybrydyzacji (płukanie, 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 użytkownika zestawu ZytoLight FISH-Tissue 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 bąbli 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 10 min w 75°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.*

### Obróbka po hybrydyzacji

Przygotuj przeprowadzanie obróbki po hybrydyzacji (płukanie, barwienie różnicujące, mikroskop fluorescencyjny) zgodnie z instrukcją użytkownika 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 użytkownika zestawu ZytoLight FISH-Cytology Implementation Kit.

**Dokładność:** Lokalizacja hybrydyzacji sondy oceniona na metafazowych wymazach kariotypów normalnych samców. We wszystkich badanych próbkach sonda hybrydowała wyłącznie z oczekiwanymi loci. Nie zaobserwowano dodatkowych sygnałów ani krzyżowych hybrydyzacji. Dlatego dokładność została obliczona na 100%.

**Czułość i analityczność:** W celu oceny wrazliwości 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 i analityczność została obliczona na 100%.

**Specyficzność i analityczność:** W celu oceny specyficzności analitycznej sonda była oceniana na podstawie metafazowych wymazach kariotypów normalnych samców. We wszystkich badanych próbkach sonda hybrydowała wyłącznie z oczekiwanymi loci i żadnymi innymi loci. Dlatego specyficzność i analityczność została obliczona na 100%.

### Preparaty FFPE

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

**Dokładność:** Lokalizacja hybrydyzacji sondy oceniona na metafazowych wymazach kariotypów normalnych samców. We wszystkich badanych próbkach sonda hybrydowała wyłącznie z oczekiwanymi loci. Nie zaobserwowano dodatkowych sygnałów ani krzyżowych hybrydyzacji. Dlatego dokładność została obliczona na 100%.

**Czułość i analityczność:** W celu oceny wrazliwości 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 i analityczność została obliczona na 100%.

**Specyficzność i analityczność:** W celu oceny specyficzności analitycznej sonda była oceniana na podstawie metafazowych wymazach kariotypów normalnych samców. We wszystkich badanych próbkach sonda hybrydowała wyłącznie z oczekiwanymi loci i żadnymi innymi loci. Dlatego specyficzność i analityczność 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 użytkownika 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 utwalacz lub zastosuj dodatkowy etap utrwalania jak to zostało opisane w "procedurze testu" w instrukcji użytkownika zestawu <u>ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit</u>   |
| Nieprawidłowa temperatura wstępnej obróbki cieplnej, 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   |
| Odparowanie sondy  | Gdy używasz hybrydyzatora obowiązkowe jest stosowanie mokrych pasów / napełnionych wodą zbiorników. Gdy używasz ciepłarki wymagane jest użytkownika 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.<br><i>Filtry z potrójnym pasmem zapewniają mniej światła w porównaniu z zestawami filtrów jedno lub dwupasmowymi.</i><br><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   |
|---|---|
| Niekompletne odparafinowanie              | Użyj świeżych 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](mailto:help@zytovision.com)



ZytoVision GmbH  
Fischkai 1  
27572 Bremerhaven/ Germany  
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)

#### Znaki towarowe:

ZytoVision® i ZytoLight® to znaki towarowe ZytoVision GmbH.