




ZytoFast

human Ig-kappa/Ig-lambda Probe

REF T-1017-400  40 (0.4 ml)

İnsan Ig-kappa (κ) ve Ig-lambda (λ) mRNA'sının kromojenik *in situ* hibridizasyon (CISH) ile eş zamanlı kalitatif tespiti için



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

1. Kullanım amacı

ZytoFast human Ig-kappa/Ig-lambda Probe (PF22), insan Ig-kappa (κ) ve Ig-lambda (λ) hafif zincir mRNA'sının lenfomalar gibi formalin-fikse, parafine gömülü örneklerde kromojenik *in situ* hibridizasyon (CISH) ile eş zamanlı kalitatif tespitinde kullanılmak içindir.

Bu prob ya ZytoFast human Ig-kappa/Ig-lambda CISH Kit (Ürün No. T-1005-40) ya da ZytoFast human Ig-kappa/Ig-lambda Permanent CISH Kit (Ürün No. T-1105-40) ile kombine olarak kullanılmak içindir.

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

2. Klinik bağlantısı

B hücreleri (B lenfositleri olarak da bilinir) kemik iliğinde lenf kök hücrelerinden gelişir. Her B hücresi klonu birbirinin aynısı olan iki ağır ve birbirinin aynısı olan iki hafif zincirden meydana gelen kendine has bir antikor molekülü eksprese eder. Hafif zincirler ya κ -ya da λ -tipidir. Kappa-lambda oranının belirlenmesi neoplastik ve reaktif lenfoid proliferasyonların ayırt edilmesinde fayda sağlar. Batı dünyasının en yaygın hematolojik malinliği olan malin melanomda κ veya λ hafif zincirlerin poliklonal ekspresyonunun monoklonal ekspresyonunun aksine, bir reaktif hiperplazi gösterdiği düşünülür. Ig- κ ve Ig- λ 'nın immünohistokimya ile tespit edilmesi genellikle aşırı zemin boyanması gösterirken *in situ* hibridizasyon gerçekten de zemin boyanması olmayan bir sinyal avantajı sağlayarak belli bir lenfosit popülasyonunun klonallığının güvenli ve basit bir şekilde analiz edilmesine izin verir.

3. Test prensibi

Kromojenik *in situ* hibridizasyon (CISH) tekniği hücre preparatlarında spesifik nükleik asit dizilerinin tespit edilmesine ve görüntülenmesine imkan verir. CISH problemleri denenen hapten-ışaretili nükleotid fragmentleri ve preparatlardaki komplementer hedef dizileri birlikte denatüre edilirler ve sonrada hibridizasyon ile birbirine kaynamaları sağlanır.

Daha sonra, spesifik olmayan ve bağlanma yapmamış prob fragmentleri güçlü yıkama adımları ile ortamdaki uzaklaştırılır. İşaretili probun dupeks oluşumu proba yönelik enzim konjuge edilmiş antikorlar ile görünür hale getirilir. Kromojenik substratlar ile meydana gelen enzimatik reaksiyon renkli çöktellerin oluşmasına yol açar. Hibridize olmuş problemler hücre çekirdeğinin bir çekirdek boyası ile zıt boyanmasından sonra ışık mikroskopunda görüntülenebilir.

4. Sağlanan reaktifler

ZytoFast human Ig-kappa/Ig-lambda Probe (PF22) şunlardan oluşur:

- Ig-kappa hafif zincir sabit bölgelerini kodlayan mRNA dizilerini hedef alan digoksinin-ışaretili oligonükleotidler (~ 1 ng/ μ l).
- Ig-lambda hafif zincir sabit bölgelerini kodlayan mRNA dizilerini hedef alan biyotin-ışaretili oligonükleotidler (~ 1 ng/ μ l).

ZytoFast human Ig-kappa/Ig-lambda Probe tek şekilde temin edilir:

- T-1017-400: 0.4 ml (40 reaksiyon, her biri 10 μ l)

5. Gerekli diğer malzemeler

- ZytoFast human Ig-kappa/Ig-lambda CISH Kit (Ürün No. T-1005-40) veya ZytoFast human Ig-kappa/Ig-lambda Permanent CISH Kit (Ürün No. T-1105-40)
- Pozitif ve negatif kontrol örnekleri
- Mikroskop lamaları, pozitif yüklü
- Su banyosu (55°C, 98°C)
- Hibridizasyon cihazı veya sıcak levha
- Hibridizasyon cihazı veya hibridizasyon etüvünde nemli kutu
- Ayarlanabilir, kalibre edilmiş pipetler (10 μ l, 100 μ l, 1000 μ l)
- 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 çözümü, örn., Fixogum Rubber Cement (Ürün No. E-4005-50/-125) veya benzeri
- Uygun donanımlı ışık mikroskobu (100-200x)

6. Saklama ve kullanma koşulları

2-8°C'de dik olarak saklayın. Kullandıktan sonra hemen saklama koşullarına ulaştırın. Reaktifleri etiketleri üzerinde belirtilen son kullanma tarihlerinden sonra kullanmayın. Ürün, uygun şekilde kullanıldığında ve saklandığında etiketi üzerinde belirtilen son kullanma tarihine kadar kullanılabilir.

7. Uyarılar ve önlemler

- 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 giysileri giyin)!
- Reaktifler cilt ile temas ederse cildi derhal bol miktarda su ile yıkayın!
- Web sitemizde (www.zytovision.com) bir güvenlik bilgi formu bulunmaktadır.
- Reaktifleri tekrar kullanmayın.
- Örnekler arasında çapraz kontaminasyon olmasından sakının, aksi halde hatalı sonuçlara yol açılabilir.
- Hibridizasyon ve yıkama adımları sırasında örneklerin kurumasına izin verilmemelidir.

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 CISH problemleri, reaktifler, tanı panelleri ve yöntemleri hakkında bilgi sahibi olmak yetkin bir patoloğun sorumluluğudur. Boyama işlemi onaylı ve lisanslı bir laboratuvarında, boyanmış lamaların 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 değişikliklerden ve de örneğin kendi içinde olan düzensizliklerden meydana gelebilir.
- Prob yalnızca 4. "Sağlanan reaktifler" bölümünde belirtilen hedef dizilerin tespit edilmesi için kullanılmalıdır.
- Ürünün performansı bu kullanma kılavuzunda tanımlanan prosedürler kullanılarak doğrulanmıştır. Bu prosedürlerde yapılan değişiklikler performansı değiştirebilir ve doğrulaması kullanıcı tarafından yapılmalıdır.

9. Etkileşimli maddeler

Aşağıdaki fiksatifler ISH 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

Öneriler:

- Herhangi bir adımda örnekler arasında çapraz kontaminasyon olmasından sakının, aksi halde hatalı sonuçlara yol açılabilir.
- Oda sıcaklığında (18-25°C) 24 saat %10 nötral tamponlu formalin ile fiksasyon.
- Örnek büyüklüğü $\leq 0.5 \text{ cm}^3$.
- En üst kalitede parafin kullanın.
- Gömme işlemi 65°C'den daha düşük sıcaklıklarda yapılmalıdır.
- Mikrotom ile 3-5 μm kalınlığında kesitler alın.
- Pozitif yüklü mikroskop lamaları kullanın.
- 50-60°C'de 2-16 saat fikse edin.

11. Ürünün kullanıma hazırlanması

Ürün kullanıma hazırdır. Yeniden sulandırmaya, karıştırmaya veya dilüsyon yapmaya gerek yoktur. Kullanmadan önce probu hibridizasyon sıcaklığına (55°C) ulaştırın ve iyice karıştırın.

12. Çalışma prosedürü

Örneğin ön işlemi

Örneğin ön işlemini (örn: parafin giderme, proteoliz) ZytoFast human Ig-kappa/Ig-lambda CISH Kit veya ZytoFast human Ig-kappa/Ig-lambda Permanent CISH Kit kullanma kılavuzuna göre yapın.

Denatürasyon ve hibridizasyon

1. Ön işlemi yapılmış örneğin üzerine 10 μl prob pipetleyin.
2. Örnekleri 22 mm x 22 mm lamel ile kapatın (hava kabarcığı bırakmayın) ve lamelin yalıtımını sağlayın.

Yalıtım için lastik solüsyonu (örn: Fixogum) kullanılmasını öneririz.

3. Lamaları bir sıcak levha üzerine ya da bir hibridizasyon cihazına yerleştirin ve örnekleri 75°C'de 5 dakika denatüre edin.
4. Lamaları bir nemli kutuya aktarın ve 55°C'de 2 saat hibridize edin (örn: bir hibridizasyon etüvünde).

Hibridizasyon aşamasında örneklerin kurumaması gerekir.

Hibridizasyon sonrası ve tespit

Hibridizasyon sonrası işlemleri (yıkama, tespit, zıt boyama, kapama, mikroskop incelemesi) ZytoFast human Ig-kappa/Ig-lambda CISH Kit kullanma kılavuzuna göre yapın.

13. Sonuçların yorumlanması

ZytoFast human Ig-kappa/Ig-lambda CISH Kit (Ürün No. T-1005-40) kullanıldığında hibridize olmuş digoksigenin-işaretleli κ -oligonükleotidler parlak kırmızı bir boyanma (AEC), biyotin-işaretleli λ -oligonükleotidler kuvvetli mavi-menekşe bir boyanma (NBT/BCIP) modeli gösterir.

ZytoFast human Ig-kappa/Ig-lambda Permanent CISH Kit (Ürün No. T-1105-40) kullanıldığında hibridize olmuş digoksigenin-işaretleli κ -oligonükleotidler güçlü yeşil bir boyanma (HRP-Green), biyotin-işaretleli λ -oligonükleotidler parlak kırmızı bir boyanma (Permanent Red) modeli gösterir.

Plazma B hücrelerinde bir pozitif reaktivite sitoplazmik boyanma ile belli olur.

Normal lenf dokusunda kappa-lambda oranı kabaca 2:1'dir. Kappa-lambda oranı >3:1 veya <0,3:1 olduğu durumlar monoklonallığın göstergesidir.

Lütfen dikkat:

- Sinyallerin kolayca görülebilmesi için sinyallerin en az 100-büyütmeye görüntülenmesi gerekir.
- Nekroz, üst üste gelen hücre çekirdekleri, aşırı sindirilmiş hücre çekirdekleri ve zayıf sinyal yoğunluğu gösteren hücre çekirdekleri olan bölgeleri değerlendirmeyin.
- Çok sayıda etken negatif veya spesifik olmayan sonuçlara neden olabilir (17 "Sorun giderme" bölümüne bakın).
- Sonuçların doğru yorumlanması için kullanıcı bu ürünü tanı prosedürlerinde kullanmadan önce ulusal ve/veya uluslar arası kılavuzlara göre doğrulamasını yapmalıdır.

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: Örnekte bulunan bir plazma B hücresi ya Ig-kappa ya da Ig-lambda boyanma modeli gösterecektir. Örnekte bulunan B hücresi tipinde olmayan hücreler bir boyanma modeli göstermeyecektir.

Dış kontrol: Doğrulanmış pozitif ve negatif kontrol örnekleri.

15. Performans özellikleri

ZytoFast human Ig-kappa/Ig-lambda Probe'un performansı hafif-zincir restriksiyonu pozitif ve negatif doku örneklerinde kromojenik *in situ* hibridizasyon (CISH) yapılarak değerlendirilmiştir. Kullanılan doku örneklerinin hafif-zincir restriksiyon durumları referans yöntemler ile bu çalışmadan önce değerlendirilmiştir.

Analitik duyarlılık: Analitik duyarlılık %100 olarak hesaplanmıştır.

Analitik özgüllük: 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
Hücre veya doku örneği doğru fikse olmamış	Fiksasyon süresini ve fiksatif optimize edin
Proteoliz, hibridizasyon, denatürasyon, güçlü yıkama veya antikor inkübasyonu sıcaklığı doğru değil	Kullanılan tüm teknik araçların sıcaklığını kalibre edilmiş bir termometre ile kontrol edin. Sıcaklığı kritik olan solüsyonlarda her zaman aynı sayıda lam kullanın.
Proteolitik ön işlem doğru yapılmamış	Fiksasyonun yapısı ve süresi, kesitlerin kalınlığı ve dokunun/hücrelerin yapısı gibi çok sayıda faktöre bağlı olarak farklı inkübasyon süreleri gerekebilir. Ön denemeler yaparak pepsin inkübasyonu için optimum süreyi belirleyin.
Hibridizasyon süresi çok kısa	Hibridizasyonu en az 2 saat yapın; gerekirse hibridizasyon süresini uzatın.
Çok düşük konsantrasyonlu yıkama tamponu	Yıkama tamponunun konsantrasyonunu kontrol edin.
Dehidrasyon solüsyonları eski	Taze dehidrasyon solüsyonları hazırlayın.
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 kurummasını önlemek için lamel iyice yalıtılmalıdır (örn. Fixogum ile)
Kromojenik substratın hazırlanması yeterli değil	Renk substratlarını damlatarak değil kalibrasyonlu pipet kullanarak hazırlayın
Renk substratlarının inkübasyon sıcaklığı doğru değil	Kullanılan tüm teknik araçların sıcaklığını kalibre edilmiş bir termometre ile kontrol edin.
Zıt boyama süresi çok uzun	Zıt boyama süresi örneğin yapısına bağlıdır ve buna göre optimize edilmelidir. Koyu zıt boyanma olmasından kaçının çünkü pozitif boyanma sinyallerini engelleyebilir.
Hedef dizi bulunmuyor	Pepsin inkübasyon süresini doğrulamak için ZytoFast 28S rRNA (+) Control Probe (PF50) gibi pozitif kontrol kullanın. Testin performansını doğrulamak için pozitifliği doğrulanmış doku kullanın.
Zıt boyamada mavileştirme düzgün yapılmamış	Mavileştirme için soğuk akan çeşme suyu kullanın; ılık veya sıcak su ya da mavileştirme reaktifleri kullanmayın

Sinyaller çok kuvvetli

Olası sebep	Önlem
Yapılan proteoliz ön işlemleri çok uzun	Fiksasyonun yapısı ve süresi, kesitlerin kalınlığı ve dokunun/hücrelerin yapısı gibi çok sayıda faktöre bağlı olarak farklı inkübasyon süreleri gerekebilir. Ön denemeler yaparak pepsin inkübasyonu için optimum süreyi belirleyin.
Substrat reaksiyonu çok yoğun	Substrat inkübasyon süresini kısıtlın; substrat solüsyonunu kullanma kılavuzunda verilen sıcaklığın üzerine ısıtmayın.

Sinyaller soluk veya birbirine girmiş

Olası sebep	Önlem
Uygun olmayan kapama solüsyonu kullanılmış	Yalnızca kit ile birlikte verilen veya kullanma kılavuzunda önerilen kapama solüsyonunu kullanın. Yabancı madde içermeyen solüsyonları kullanın; kapama bandı kullanmayın

Düzensiz veya yalnızca bazı kısımlarda çok hafif boyanma

Olası sebep	Önlem
Parafin giderme tamamlanmamış	Taze solüsyonlar kullanın; parafin giderme işleminin süresini kontrol edin
Reaktif hacmi çok düşük	Reaktif hacminin doku alanını kaplamaya yetecek miktarda olmasını sağlayın
Hibridizasyon öncesinde veya kapama sırasında hava kabarcıkları kalmış	Hava kabarcığı bırakmayın

Tutarsız sonuçlar

Olası sebep	Önlem
Probun uygulanmasından önce yeterli kurutma yapılmamış	Havada kuruma süresini uzatın
Pepsinin, antikorların ve/veya renk substratlarının uygulanmasından önce doku üzerinde çok fazla su/yıkama tamponu kalmış	Doku kesiti üzerindeki fazla sıvının emdirilerek veya lamı sallayarak giderilmesini sağlayın. Küçük miktardaki su/yıkama tamponu kalıntısı teste etki etmez
Dokunun fiksasyon ve gömme yöntemlerinde değişiklikler var	Fiksasyon ve gömme yöntemlerini optimize edin
Doku kesiti kalınlığında değişiklikler var	Kesit almayı optimize edin

Doku morfolojisi bozulmuş

Olası sebep	Önlem
Hücre veya doku örneği doğru fikse olmamış	Fiksasyon süresini ve fiksatif optimize edin
Proteolitik ön işlem doğru yapılmamış	Pepsin inkübasyon süresini optimize edin

Kötü zemin

Olası sebep	Önlem
Güçlü yıkama sıcaklığı doğru değil	Kullanılan tüm teknik araçların sıcaklığını kalibre edilmiş bir termometre ile kontrol edin. Sıcaklığı kritik olan solüsyonlarda her zaman aynı sayıda lam kullanın. Sıcaklık inkübasyonu olan adımlarda sekizden fazla lam kullanılmamasını öneririz
Lamlar iyice yıkanmamış	Belirtilen adımlarda taze ve yeterli miktarda yıkama tamponu ve deiyonize veya distile su kullanın.
Kesitler hibridizasyon sırasında veya sonrasında bir zaman kurumuş	Kesitlerin kurumasını önleyin; nemli kutu kullanın; lameli düzgün şekilde yalıtın
Substrat inkübasyon süresi uzun	Substrat inkübasyon süresini düşürün
Parafin giderme tamamlanmamış	Taze solüsyonlar kullanın; parafin giderme işleminin süresini kontrol edin
Proteolitik ön işlem çok güçlü	Pepsin inkübasyon süresini optimize edin
Lamlar hibridizasyondan önce oda sıcaklığına soğutulmuş	Lamları çabucak hibridizasyon sıcaklığına aktarın
Doku-antikör etkileşimi	Doku-spesifik zemin boyanması olup olmadığını görmek için <u>ZytoFast RNA (-) Control Probe (PF33)</u> gibi negatif kontrol problemleri kullanın

Sinyaller üst üste gelmiş

Olası sebep	Önlem
Doku kesitlerinin kalınlıkları uygun değil	3-5 µm kalınlığında mikrotom kesitleri alın

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

18. Literatür

- Erber WN, et al. (1993) *Pathology* 25: 63-7.
- Hieter PA, et al. (1980) *Cell* 22: 197-207.
- Hieter PA, et al. (1981) *Nature* 294: 536-40.
- Marti GE, et al. (2005) *Br J Haematol* 130: 325-32.
- McNicol AM, Farquharson MA (1997) *J Pathol* 182: 250-61.
- Pringle JH, et al. (1990) *J Pathol* 162: 197-207.
- Wilkinson DG: *In Situ Hybridization, A Practical Approach*, Oxford University Press (1992) ISBN 0 19 963327 4.

Uzmanlarımız sorularınızı yanıtlamaya hazırdır.
Lütfen helptech@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 ZytoFast® ZytoVision GmbH'nin ticari markalarıdır.