

# Vysis 4q12 Tri-Color Rearrangement FISH Probe Kit

pl

Vysis  
4q12 Tri-Color  
Rearrangement  
FISH Probe Kit

REF 05N52-020

G60753R06

B5N52P

**UWAGA:** Zmiany wyróżniono kolorem szarym.

Objaśnienia użytych symboli	
	Wytwórca
<b>REF</b>	Numer katalogowy
<b>LOT</b>	Numer partii
<b>IVD</b>	Wyrób medyczny do diagnostyki <i>in vitro</i>
	Przechowywać w temp. -20 °C (± 10 °C).
	Niebezpieczeństwo
	Zagrozenie biologiczne
	Uwaga: Sprawdź w dołączonej dokumentacji.
	Użyć przed
	Zajrzyj do instrukcji używania.
<b>EC REP</b>	Autoryzowany przedstawiciel

## Przeznaczenie

Zestaw sond Vysis 4q12 Tri-Color Rearrangement FISH Probe Kit przeznaczony jest do wykrywania rearanżacji w chromosomie 4q12 z zaangażowaniem regionu FIP1L1-PDGFRα przy użyciu fluorescencyjnej hybrydizacji *in situ* (FISH).

## Wprowadzenie

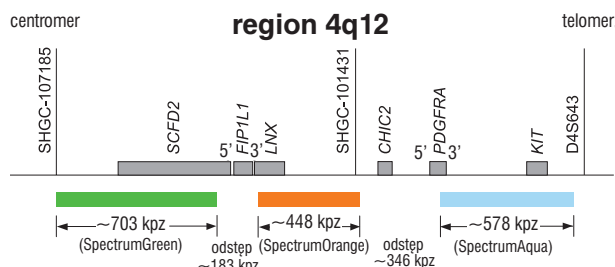
Przewlekła białaczka eozynofilowa (ang. *Chronic Eosinophilic Leukemia*, CEL) jest opisana przez Światową Organizację Zdrowia (WHO) jako nowotwór, w którym klonalna proliferacja komórek prekursorowych eozynofili prowadzi do długotrwałej eozynofilii.<sup>1</sup> Anomalia chromosomowa, del(4)(q12q12), powoduje fuzję genów FIP1L1 oraz PDGFRα i występuje u 40-60% pacjentów chorych na CEL.<sup>2</sup> Sonda Vysis LSI 4q12 Tri-Color Rearrangement Probe jest wykorzystywana do detekcji delekcji o wielkości ok. 800 kpz, obejmującej LNX oraz CHIC2, i następującej po niej fuzji genów FIP1L1 oraz PDGFRα.<sup>3</sup> Według obecnego systemu klasyfikacji WHO nowotwory mieloproliferacyjne przebiegające z eozynofilią oraz nieprawidłowościami genów PDGFRα, PDGFRβ lub FGFR1 stanowią odrębną kategorię diagnostyczną, podczas gdy białaczka CEL bez aberracji tych i kilku innych genów zaliczana jest do kategorii białaczki CEL, niesklasyfikowanej gdzie indziej.<sup>1</sup>

## Opis sondy

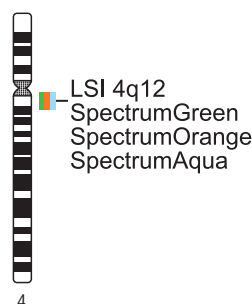
Wyznakowana na zielono (SpectrumGreen) sonda obejmuje obszar o wielkości około 703 kpz (chr4:53159272-53862621; March 2006 assembly)<sup>4</sup> i jest położona centromerycznie względem regionu genu FIP1L1.

Wyznakowana na pomarańczowo (SpectrumOrange) sonda obejmuje obszar o wielkości około 448 kpz (chr4:54045936-54494304; March 2006 assembly)<sup>4</sup> i jest położona pomiędzy regionami genów FIP1L1 oraz CHIC2.

Wyznakowana na jasnoniebiesko (SpectrumAqua) sonda obejmuje obszar o wielkości około 578 kpz (chr4:54840090-55418505; March 2006 assembly)<sup>4</sup> i rozciąga się od telomerycznego końca regionu genu PDGFRα poza region genu KIT.



## Vysis 4q12 Tri-Color Rearrangement FISH Probe



## Odczynniki

### 1. Vysis LSI 4q12 Tri-Color Rearrangement Probe

(nr części: 30-231042)

(1 fiołka, 20 µL w jednej fiołce). 425 ng/µL, sonda DNA znakowana fluoroforem oraz blokujące DNA w Tris-EDTA.

### 2. Vysis LSI/WCP Hybridization Buffer (nr części: 30-804824)

(1 fiołka, 150 µL w jednej fiołce). Siarczan dekstranu, formamid, SSC (pH 7,0).

Karty charakterystyki dla wszystkich dostarczonych odczynników są dostępne u przedstawiciela firmy Abbott Molecular.

## Zasady przechowywania

Zestaw sond Vysis 4q12 Tri-Color Rearrangement FISH Probe Kit należy przechowywać w temp. -20 °C (± 10 °C) bez dostępu światła.

## Warunki transportowania

Zestaw sond Vysis 4q12 Tri-Color Rearrangement FISH Probe Kit jest transportowany w suchym lodzie.

Jeśli stan dostarczonych odczynników jest inny niż zalecany na opakowaniu bądź odczynniki są uszkodzone, należy skontaktować się z przedstawicielem firmy Abbott Molecular.

## Ostrzeżenia i środki ostrożności

### **IVD** Wyrób medyczny do diagnostyki *in vitro*

Wyłącznie do diagnostyki *in vitro*

Sonda Vysis LSI 4q12 Tri-Color Rearrangement Probe



**UWAGA:** Preparat ten zawiera materiały pochodzenia ludzkiego i/lub potencjalnie zakaźne składniki. Nie istnieje żadna znana metoda badawcza, która mogłaby w pełni zagwarantować, że produkty pochodzenia ludzkiego lub inaktywowane mikroorganizmy nie będą źródłem zakażenia. Z tymi odczynnikami oraz próbkami pochodzenia ludzkiego należy obchodzić się jak z materiałem zakaźnym, przestrzegając procedur laboratoryjnych dotyczących bezpieczeństwa, jak np. procedur opisanych w publikacji „Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories”,<sup>6</sup> standardach OSHA dotyczących patogenów przenoszonych drogą krwi (*Standards on Bloodborne Pathogens*),<sup>7</sup> w dokumencie CLSI M29-A3<sup>8</sup> oraz innych odpowiednich praktyk związanych z bezpieczeństwem biologicznym.<sup>9</sup> A zatem wszystkie materiały pochodzenia ludzkiego należy traktować jako potencjalnie zakaźne. Do środków ostrożności należą między innymi następujące wskazania:

- Podczas pracy z badanymi próbkami lub odczynnikami nosić rękawice ochronne.
- Nie pipetować ustami.
- W miejscach, w których opracowuje się tego typu materiały, nie spożywać pokarmów, nie spożywać napojów, nie palić, nie nakładać kosmetyków ani szkieł kontaktowych.
- Wszelkie miejsca, w których doszło do rozlania się badanych próbek, wyczyścić i zdezynfekować przy pomocy prątkobójczego środka dezynfekującego, takiego jak 1,0% podchloryn sodu, lub innego odpowiedniego środka o podobnym działaniu.<sup>6</sup>
- Wszystkie potencjalnie zakaźne materiały odkazić, a następnie usuwać zgodnie z lokalnymi, jak i ogólnokrajowymi przepisami.<sup>9</sup>

#### Bufor Vysis LSI/WCP Hybridization Buffer

Składniki warunkujące stopień zagrożenia na oznakowaniu:

- formamid

Zastosowanie mają poniższe ostrzeżenia:



#### Uwaga

H360	Może działać szkodliwie na płodność lub na dziecko w łonie matki.
P201	Przed użyciem zapoznać się ze specjalnymi środkami ostrożności.
P202	Nie używać przed zapoznaniem się i zrozumieniem wszystkich środków bezpieczeństwa.
P280	Stosować rękawice ochronne/odzież ochronną/ochronę oczu.
P308+P313	W PRZYPADKU narażenia lub styczności: Zasięgnąć porady/zgłosić się pod opiekę lekarza.
P405	Przechowywać pod zamknięciem.
P501	Zawartość/pojemnik usuwać zgodnie z miejscowymi przepisami.

**UWAGA:** Do wyłącznego stosowania przez użytkowników profesjonalnych. Składniki warunkujące stopień zagrożenia na oznakowaniu: formamid.

#### Przygotowanie odczynników

**UWAGA:** Tam gdzie zaznaczono, przeprowadzać pomiar pH roztworów w temperaturze otoczenia. O ile nie wskazano inaczej, należy używać pehametru z elektrodą szklaną.

#### Roztwór 20X SSC

Dokładnie wymieszać 132 g roztworu 20X SSC z 400 mL oczyszczonej wody. Zmierzyć pH i doprowadzić je do wartości 5,3 przy użyciu HCl. Dodać oczyszczoną wodę do uzyskania końcowej objętości 500 mL. Wymieszać i przefiltrować przez filtr o wielkości porów 0,45 µm. Przechowywać w temperaturze otoczenia. Roztwór wyjściowy wylać po upływie 6 miesięcy lub wcześniej w przypadku stwierdzenia śladów zmętnienia lub zanieczyszczenia roztworu.

#### Roztwór płuczący 2X SSC/0,1% NP-40

Dokładnie wymieszać 100 mL roztworu 20X SSC (pH 5,3) z 850 mL oczyszczonej wody. Dodać 1 mL NP-40. Dokładnie wymieszać do całkowitego rozpuszczenia NP-40. Zmierzyć pH i doprowadzić je do wartości 7,0 ± 0,2 przy użyciu NaOH. Dodać oczyszczoną wodę

do uzyskania końcowej objętości 1 litra. Wymieszać i przefiltrować przez filtr o wielkości porów 0,45 µm. Przechowywać w temperaturze otoczenia. Roztwór wyjściowy wylać po upływie 6 miesięcy lub wcześniej w przypadku stwierdzenia śladów zmętnienia lub zanieczyszczenia roztworu.

#### Roztwór do denaturacji (70% formamid/2X SSC)

Dokładnie wymieszać 49 mL formamidu, 7 mL roztworu 20X SSC (pH 5,3) i 14 mL oczyszczonej wody w szklanym kominku do barwienia. Zmierzyć pH, używając pasków do pomiaru pH, aby stwierdzić, czy wartość pH mieści się w zakresie 7,0 do 8,0. Między użyciami przechowywać w zamkniętym naczyniu w temp. 2 do 8 °C. Wylać po upływie 7 dni.

#### Roztwory etanolu (70%, 85%, 100%)

Przygotować powyższe rozcieńczenia (v/v) 100% etanolu z użyciem oczyszczonej wody. Między użyciami przechowywać w zamkniętym naczyniu w temperaturze otoczenia. Roztwory wyjściowe wylać po upływie 6 miesięcy.

#### Roztwór płuczący do procedury szybkiego płukania 0,4X SSC/0,3% NP-40

Dokładnie wymieszać 20 mL roztworu 20X SSC (pH 5,3) z 950 mL oczyszczonej wody. Dodać 3 mL NP-40. Dokładnie wymieszać do całkowitego rozpuszczenia NP-40. Zmierzyć pH i doprowadzić je do wartości 7,0 do 7,5 przy użyciu NaOH. Dodać oczyszczoną wodę do uzyskania końcowej objętości 1 litra. Wymieszać i przefiltrować przez filtr o wielkości porów 0,45 µm. Przechowywać w temperaturze otoczenia. Roztwór wyjściowy wylać po upływie 6 miesięcy lub wcześniej w przypadku stwierdzenia śladów zmętnienia lub zanieczyszczenia roztworu.

**Przechowywanie sondy DNA LSI:** Sonda DNA LSI powinna być przechowywana w temp. -20 °C (± 10 °C) bez dostępu światła.

**Degradacja:** Fluorofory szybko ulegają fotobłaknięciu. Ograniczenie dostępu światła do wszystkich roztworów i preparatów zawierających fluorofory zmniejsza tę degradację. Wszystkie kroki, które można wykonać bez dostępu światła, takie jak inkubacje i przemycanie, należy przeprowadzać w ciemności.

**Uwagi dotyczące procedury:** Przed użyciem wszystkie odczynniki powinny zostać rozmrożone w temperaturze otoczenia, a następnie każdą próbkę należy odwirować przez 2 do 3 sekund w standardowej mikrowirówce stołowej.

#### Pobranie i przygotowanie próbki do analizy

Komórki krwi obwodowej lub szpiku kostnego powinny zostać poddane hodowli, a następnie zbierane, utrwalane oraz umieszczane na szkiełkach mikroskopowych zgodnie ze standardowymi procedurami cytogenetycznymi.

#### Procedura

##### Wymagane materiały

- Vysis LSI 4q12 Tri-Color Rearrangement Probe
- Vysis LSI/WCP Hybridization Buffer

##### Materiały wymagane, lecz niedostarczone

- 12N HCl (do regulacji pH roztworów płuczących)
- 1N NaOH (do regulacji pH roztworów płuczących)
- Szklane kominki (naczynia Coplina)
- Skalibrowany termometr
- Pęseta
- Cylinder miarowy (1000 mL)
- Mieszadło magnetyczne
- Etanol
- Mikrowirówka
- Końcówki do pipet mikrolitrowych o zakresie od 1 do 10 µL
- Pipeta mikrolitrowa o zakresie od 1 do 10 µL
- Pehametr
- Odtłuszczone szkiełka mikroskopowe
- Oczyszczona woda
- Timer
- Worteks
- Łażnia wodna (37 °C i 72 °C)
- Mikroskop fluorescencyjny
- Inkubator o temp. 37 °C
- 20X SSC
- NP-40
- Formamid (ultraczysty)
- Barwnik kontrastowy DAPI II
- Płyta grzejna do preparatów

**Przygotować trzy kominki do barwienia:** Do jednego kominka wlać 70 mL 100% EtOH, do drugiego - 70 mL 85% EtOH, a do trzeciego - 70 mL 70% EtOH. Używać w temperaturze otoczenia. Wylać po 7 dniach lub w przypadku nadmiernego rozcieńczenia bądź wyparowania roztworu.

Dla uzyskania optymalnych wyników należy upewnić się, czy odczynniki zostały przygotowane i są używane w odpowiednich temperaturach podanych w instrukcji używania.

Pomiar temperatury roztworów powinien być wykonany wewnątrz kominków przy użyciu skalibrowanego termometru.

### Przygotowanie próbki docelowej

**UWAGA:** Kominki zawierające roztwór do denaturacji doprowadzić do temperatury otoczenia. Umieścić kominki z roztworem w łaźni wodnej o temp.  $73 \pm 1^\circ\text{C}$  na ok. 30 minut przed użyciem w celu doprowadzenia roztworu do wymaganej temperatury.

- Upewnić się, czy temperatura roztworu do denaturacji wynosi  $73 \pm 1^\circ\text{C}$ . Aby utrzymać właściwą temperaturę roztworu do denaturacji, należy zanurzać cztery preparaty równocześnie. Jeśli barwione są mniej niż cztery preparaty, należy dołożyć pustych szkiełek o temperaturze otoczenia tak, aby razem było ich cztery.
- Zanurzyć preparaty w roztworze do denaturacji na 5 minut.  
**UWAGA:** Do jednego kominka nie należy wkładać więcej niż cztery preparaty równocześnie.
- Odwodnić preparaty przez 1 minutę w 70% EtOH, następnie przez 1 minutę w 85% EtOH i 1 minutę w 100% EtOH.  
**UWAGA:** Zostawić preparaty w 100% EtOH do momentu, w którym będzie możliwe wysuszenie wszystkich preparatów i nałożenie mieszaniny sondy.

### Przygotowanie mieszaniny sondy

- Składniki dla poszczególnych obszarów docelowych dodać do próbki mikrowirówkowej w temperaturze otoczenia:  
7  $\mu\text{L}$  buforu hybrydizacyjnego LSI/WCP  
1  $\mu\text{L}$  sondy  
2  $\mu\text{L}$  oczyszczonej wody  
**UWAGA:** W celu przeprowadzenia równoczesnej hybrydyzacji dwóch lub trzech sond, każdej znakowanej innym fluoroforem, należy dodać 1 mikrolitr każdej sondy. Dopełnić oczyszczoną wodą w celu otrzymania łącznej objętości sondy i wody równej 3 mikrolitry.
- Probówkę poddać wirowaniu przez 1 do 3 sekund.
- Zmieszać na worteksie i ponownie odwirować.
- Umieścić probówkę w łaźni wodnej o temp.  $73 \pm 1^\circ\text{C}$  na 5 minut.
- Wyjąć probówkę z łaźni wodnej.
- Umieścić probówkę na płycie grzejnej rozgrzanej do temp. 45 do  $50^\circ\text{C}$  do momentu, w którym będzie możliwe nałożenie sondy na badane, docelowe DNA.  
**UWAGA:** Jeśli preparaty są już gotowe w momencie zdenaturowania sondy, można zaaplikować sondę na docelowe DNA bezpośrednio po jej denaturacji.

### Hybrydyzacja sondy do próbki docelowej

**UWAGA:** Przygotować wilgotną komorę poprzez wyłożenie hermetycznego pojemnika na preparaty papierowym ręcznikiem nasączonym wodą. Umieścić w inkubatorze o temp.  $37^\circ\text{C}$ .

- Wyjąć preparaty ze 100% EtOH.
- Wysuszyć preparaty, opierając dolną krawędź szkiełka na bibule i wycierając do sucha spód szkiełka ręcznikiem papierowym.
- Umieścić preparaty na płycie grzejnej o temp. 45 do  $50^\circ\text{C}$  na maksymalnie 2 minuty dla odparowania resztek EtOH.
- Nałożyć 10  $\mu\text{L}$  mieszaniny sondy na wybrany, docelowy region preparatu i natychmiast przykryć szkiełkiem nakrywkowym. Powtórzyć te czynności dla kolejnych obszarów docelowych.
- Uszczelnić szkiełko nakrywkowe przy użyciu kleju kauczkowego.
- Umieścić preparaty w nagrzanej komorze wilgotnej, a następnie wstawić komorę do inkubatora o temp.  $37^\circ\text{C}$  na 6 do 16 godzin.

Dla większości sond LSI uzyskanie zadowalającego sygnału rozpoczyna się po 12- do 16-godzinnej hybrydyzacji.

### Płukanie preparatu

**UWAGA:** Dla próbek uzyskanych z materiału zatopionego w parafinie należy zastąpić roztwór płuczący 2X SSC/0,3% NP-40 roztworem płuczącym 0,4X SSC/0,3% NP-40.

### Przygotowanie roztworów płuczących:

- Wlać 70 mL 0,4X SSC/0,3% NP-40 do kominka do barwienia. Umieścić kominek w łaźni wodnej o temp.  $73 \pm 1^\circ\text{C}$  co najmniej 30 minut przed użyciem. Zużyć przygotowany roztwór tego samego dnia, resztę wylać.
- Wlać 70 mL 2X SSC/0,1% NP-40 do kominka do barwienia. Używać w temperaturze otoczenia. Zużyć przygotowany roztwór tego samego dnia, resztę wylać.

**UWAGA:** Dla utrzymania właściwej temperatury roztworu 0,4X SSC/0,3% NP-40 należy płukać cztery preparaty równocześnie. Jeśli barwionych jest mniej niż cztery preparaty, należy dołożyć pustych szkiełek o temperaturze otoczenia tak, aby razem było ich cztery.

Rozpocząć odmierzenie czasu w momencie, kiedy wszystkie cztery szkiełka są zanurzone.

- Usunąć szkiełko nakrywkowe z preparatu i natychmiast zanurzyć preparat w 0,4X SSC/0,3% NP-40. Poruszać preparatami przez 1 do 3 sekund. Powtórzyć ww. czynności z pozostałymi preparatami.
- Wyjąć preparaty po 2 minutach.

**UWAGA:** Przed rozpoczęciem płukania następnych czterech szkiełek należy upewnić się, czy temperatura roztworu płuczającego wynosi  $73 \pm 1^\circ\text{C}$ .

- Zanurzyć preparaty w 2X SSC/0,1% NP-40. Poruszać preparatami przez 1 do 3 sekund. Wyjąć preparaty po upływie od 5 sekund do 1 minuty.

### Wizualizacja hybrydyzacji

- Wysuszyć preparaty na powietrzu, w ciemności.
- Nanieść 10  $\mu\text{L}$  barwnika kontrastowego DAPI II na obszar docelowy, a następnie nałożyć szkiełko nakrywkowe.

Oglądać preparaty przy użyciu odpowiedniego zestawu filtrów w optymalnie ustawionym mikroskopie fluorescencyjnym. Podane poniżej zestawy filtrów optycznych pozwolą na wizualizację fluoroforów użytych podczas hybrydyzacji.

Użycie filtra Vysis...	pozwala na równoczesne wzbudzenie i emisję...
DAPI/Orange	fluoroforu DAPI i SpectrumOrange
DAPI/Green	fluoroforu DAPI i SpectrumGreen
Aqua/Green/Orange	fluoroforu SpectrumAqua, SpectrumGreen i SpectrumOrange
DAPI/Orange/Green	fluoroforu DAPI, SpectrumOrange i SpectrumGreen
DAPI/Aqua/Green/Orange	fluoroforu DAPI, SpectrumAqua, SpectrumGreen i SpectrumOrange

**Przechowywanie:** Preparaty przechowywane w temp.  $-20^\circ\text{C}$  i chronione przed dostępem światła mogą być badane przynajmniej przez trzy tygodnie po hybrydyzacji.

### Zastosowanie kodenaturacji

Kodenaturacja jest procesem, który upraszcza procedurę fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH) poprzez połączenie, jednoczesną denaturację badanej próbki i mieszaniny sondy. Zazwyczaj kodenaturacja jest przeprowadzana poprzez umieszczenie preparatów z badaną próbką, z nałożonymi sondami i szkiełkami nakrywkowymi, na płycie grzejnej lub w inkubatorze/suszarce, gdzie ustalono temperaturę właściwą dla denaturacji. Preparaty są zwykle wyjmowane po 2 do 10 minutach i umieszczane w inkubatorze, w temperaturze właściwej dla hybrydyzacji.

Warunki kodenaturacji zalecane w publikacjach są zróżnicowane w zakresie temperatury i czasu, w zależności od specyficznego zastosowania oraz typu badanej próbki. Opisane tu parametry są zalecane do użycia z systemem Vysis ThermoBrite Denaturation/ Hybridization System i stanowią zestaw parametrów wyjściowych. W zależności od rodzaju badanych próbek może zaistnieć potrzeba dalszej optymalizacji. Efekt hybrydyzacji z użyciem kodenaturacji może różnić się od efektu hybrydyzacji z zastosowaniem osobnej denaturacji próbki badanej i jej odwodnienia przed nałożeniem sondy.

## Przygotowanie preparatu do kodenaturacji

1. Składniki dla poszczególnych obszarów docelowych dodać do próbki mikrowirówkowej w temperaturze otoczenia:
  - 7 µL buforu hybrydizacyjnego LSI/WCP
  - 1 µL sondy
  - 2 µL oczyszczonej wody**UWAGA:** W celu przeprowadzenia równoczesnej hybrydizacji dwóch lub trzech sond, każdej znakowanej innym fluoroforem, należy dodać 1 µL każdej sondy. Dodać oczyszczoną wodę do otrzymania łącznej objętości sondy i wody równej 3 µL.
2. Probówkę poddać wirowaniu przez 1 do 3 sekund.
3. Zmieszać na worteksie i ponownie odwirować.
4. Nałożyć 10 µL mieszaniny sondy na preparat i natychmiast przykryć szkiełkiem nakrywkowym.
5. Uszczelnić szkiełko nakrywkowe przy użyciu kleju kauczkowego.

## Ustawianie parametrów systemu denaturacji/hybrydizacji

Podane poniżej wskazówki dotyczą parametrów wyjściowych systemu *ThermoBrite Denaturation/Hybridization System*. W celu uzyskania dalszych informacji dotyczących obsługi systemu, patrz Instrukcja obsługi ThermoBrite.

Podczas pracy z systemem ThermoBrite może być konieczne dopasowanie warunków denaturacji i hybrydizacji. Dalsze wskazania, patrz rozdziały dotyczące wykrywania i usuwania określonych problemów w niniejszej instrukcji używania.

1. Dla hodowli z limfocytów i szpiku kostnego ustawić temperaturę denaturacji (*Melt Temp*) na 73°C, zaś jej czas (*Melt Time*) - na 1 minutę. Dla próbek zatopionych w parafinie ustawić temperaturę denaturacji (*Melt Temp*) na 73°C, zaś jej czas (*Melt Time*) - na 5 minut.
2. Ustawić temperaturę hybrydizacji (*Hyb Temp*) na 37°C, zaś czas hybrydizacji (*Hyb Time*) - od 4 godzin do hybrydizacji całonocnej.
3. Po upływie czasu hybrydizacji wypłukać preparaty z zastosowaniem szybkiej procedury płukania.
4. Wysuszyć preparaty na powietrzu, w ciemności.
5. Nanieść 10 µL barwnika kontrastowego na obszar docelowy, a następnie nałożyć szkiełko nakrywkowe.

## Procedury kontroli jakości

Równocześnie z próbkami pacjenta mogą być oznaczane kontrole: dodatnia i ujemna.

## Oczekiwane rezultaty

Oczekiwanym wzorem sygnału prawidłowego sondy Vysis LSI 4q12 Tri-Color Rearrangement Probe są dwa trójkolorowe sygnały fuzyjne: zielono-pomarańczowo-jasnoniebieskie.<sup>3</sup>

Oczekiwanym wzorem sygnału nieprawidłowego sondy Vysis LSI 4q12 Tri-Color Rearrangement Probe jest jeden trójkolorowy sygnał fuzyjny: zielono-pomarańczowo-jasnoniebieski oraz jeden dwukolorowy sygnał fuzyjny: zielono-jasnoniebieski, świadczący o delecji regionu intronowego oraz fuzyji genów FIP1L1 oraz PDGFRA.<sup>3</sup> W przypadku wystąpienia translokacji insercyjnej regionu LNX, CHIC2 nieprawidłowym wzorem znakowania jest jeden trójkolorowy sygnał fuzyjny: zielono-pomarańczowo-jasnoniebieski, jeden dwukolorowy sygnał fuzyjny: zielono-jasnoniebieski i jeden sygnał pomarańczowy.<sup>3</sup> Mogą pojawić się też inne wzory sygnałów nieprawidłowych. Przy ich interpretacji przydatna może być analiza metafaz.

## Ograniczenia stosowania

Dla badań interfazy każde laboratorium powinno ustalić analityczną wartość normy dla punktu odcięcia (*cut-off*) dla żądanego wzoru sygnału nieprawidłowego. Jedną z metod, którą można w tym celu zastosować, opisali Wiktor i wsp.<sup>5</sup>

## Wyniki sprawiające problemy w teście z kodenaturacją

Morfologia chromosomów obserwowana po hybrydizacji z użyciem kodenaturacji może różnić się od obrazu uzyskanego dla preparatu badanego, poddanego denaturacji i odwodnieniu przed nałożeniem sondy.

Problem	Możliwe rozwiązanie
Hybrydizacja krzyżowa	<p>Powtórzyć analizę z inną próbką, stosując jedną z poniższych modyfikacji:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Podwyższyć temperaturę 0,4X SSC/0,3% NP-40 o 2°C. W razie potrzeby, kontynuować podwyższanie temperatury do czasu uzyskania akceptowanej intensywności sygnału.</li><li>• Obniżyć temperaturę denaturacji o 2°C.</li></ul>
Słaby sygnał sondy	<p>Powtórzyć analizę z inną próbką, stosując jedną z poniższych modyfikacji:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Wydłużyć czas hybrydizacji.</li><li>• Podwyższyć temperaturę denaturacji. Jeśli będzie to konieczne, kontynuować podwyższanie temperatury do czasu uzyskania zadowalającej morfologii.</li><li>• Wypłukać preparaty w 0,4X SSC/0,3% NP-40 w temp. 70 do 73°C.</li></ul>
Sygnał rozproszony ( <i>speckling</i> )	<p>Powtórzyć hybrydizację, stosując jedną z poniższych modyfikacji:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Obniżyć temperaturę denaturacji o 2°C.</li><li>• Skrócić czas denaturacji.</li></ul> <p><b>UWAGA:</b> W razie potrzeby zredukować temperaturę lub czas denaturacji do czasu uzyskania sygnału o akceptowanej intensywności.</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Wypłukać preparaty w 0,4X SSC/0,3% NP-40 w temp. 73 do 76°C.</li></ul>
Słaba morfologia metafaz	<p>Powtórzyć analizę z nową próbką, stosując jedną z poniższych modyfikacji:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Obniżyć temperaturę denaturacji o 2°C.</li><li>• Skrócić czas denaturacji.</li></ul> <p><b>UWAGA:</b> W razie potrzeby zredukować temperaturę lub czas denaturacji do czasu uzyskania sygnału o akceptowanej intensywności.</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Preparaty poddać obróbce wstępnej:<ol style="list-style-type: none"><li>1. Przygotować roztwór 2X SSC/1% paraformaldehydu.</li><li>2. Zanurzyć szkiełko w roztworze 2X SSC/1% paraformaldehydu na 1 minutę.</li><li>3. Zanurzyć szkiełko kilka razy w oczyszczonej wodzie.</li><li>4. Odwodnić szkiełko w serii płukań EtOH (70%, 85%, 100%) po 1 minucie.</li><li>5. Wysuszyć szkiełko i kontynuować procedurę przygotowania preparatu do kodenaturacji.</li></ol></li><li>• Jeśli morfologia metafaz nie poprawiła się, należy zmodyfikować sposób użycia systemu ThermoBrite:<ol style="list-style-type: none"><li>1. Przygotować 280 µL roztworu do denaturacji, który stanowi 70% formamid/2X SSC (196 µL formamidu/ 28 µL 2X SSC/56 µL oczyszczonej wody).</li><li>2. Uruchomić program <i>ThermoBrite Hold Temp</i> z temperaturą ustawioną na 73°C.</li><li>3. Umieścić 10 µL roztworu do denaturacji, który stanowi 70% formamid/2X SSC, na każdy obszar docelowy i przykryć szkiełkiem nakrywkowym.</li><li>4. Gdy system ThermoBrite osiągnie temp. 73°C, należy umieścić szkiełko na powierzchni grzejnej. Zamknąć pokrywę.</li><li>5. Wyjąć preparaty po 3 minutach.</li><li>6. Usunąć szkiełko nakrywkowe.</li><li>7. Kontynuować etap dehydracji w procesie przygotowywania próbki docelowej dla przeprowadzenia procedury bez kodenaturacji.</li></ol></li></ul>



## Wskazówki i usuwanie problemów

Przy oglądaniu wyników analizy FISH należy sprawdzić, czy mikroskop jest właściwie wyregulowany i czy działa optymalnie.

Poniższa lista zestawia niezadowalające rezultaty, jakie można uzyskać, stosując sondy LSI. Lista zawiera prawdopodobne przyczyny i sugestie, które mogą poprawić jakość uzyskanych wyników.

Problem	Prawdopodobna przyczyna	Możliwe rozwiązanie
Zniekształcona morfologia chromosomów	Zbyt szybko wysuszone preparaty z naniesionym materiałem w trakcie przygotowywania	Podnieść temperaturę łaźni wodnej (następuje zwiększenie wilgotności) podczas nakapywania preparatów. Obniżyć temperaturę płyty grzejnej do podgrzewania preparatów w trakcie przygotowywania próbki. Przedłużyć czas suszenia, co najmniej na całą noc w temperaturze otoczenia, a następnie pozwolić dojrzeć preparatom co najmniej 24 godziny w temperaturze otoczenia. Nie prażyć preparatów w wysokiej temperaturze.
	Nadmierna denaturacja próbki	Upewnić się, czy roztwór do denaturacji został wykonany zgodnie z zaleceniami podanymi w instrukcji używania. Upewnić się, czy temperatura roztworu do denaturacji przed zanurzeniem preparatów wynosi $73 \pm 1^\circ\text{C}$ ; obniżyć temperaturę do $72^\circ\text{C}$ . Skrócić czas denaturacji o 1 do 3 minut.
	Preparaty z naniesionym materiałem nie zostały całkowicie wysuszone przed zanurzeniem w roztworze do denaturacji.	Ogrzać preparaty do temp. $45$ do $50^\circ\text{C}$ przed denaturacją lub odwozić preparaty w serii płukań EtOH (70%, 85%, 100%) po 1 minucie.
	Denaturacji poddano zbyt świeży materiał.	Pozostawić preparaty na co najmniej 24 godziny w temperaturze otoczenia, aby dojrzały.
Silne tło widoczne na preparacie	Szkiełka nie były dostatecznie odtłuszczone przed przygotowaniem preparatów.	Przed nakrapianiem zawiesiny dokładnie wyczyścić szkiełka, zanurzając je w EtOH, a następnie dokładnie wytrzeć ściereczką bezpyłową.
	Resztki komórek na preparacie	Trzykrotnie przemyć peletkę komórek świeżym utrwalczem i powtórzyć procedurę nakrapiania zawiesiny na szkiełko.
	Metafazy o dobrym rozproszeniu dojrzewały przez prażenie lub zawierają cytoplazmę.	Wydłużyć czas zanurzenia preparatu w roztworze do denaturacji preparatu do 10 minut.
	Nieodpowiedni sposób płukania preparatów po hybrydyzacji	Upewnić się, czy roztwory płuczące zostały wykonane zgodnie z zaleceniami podanymi w instrukcji używania. Upewnić się, czy pH i temperatura roztworów płuczających są właściwe. Usunąć szkiełko nakrywkowe. Powtórzyć procedurę płukania.

Problem	Prawdopodobna przyczyna	Możliwe rozwiązanie
Silne tło widoczne na preparacie (c.d.)	Roztwory płuczające były używane zbyt długo lub przechowywane w niewłaściwych warunkach.	Upewnić się, czy roztwory płuczające zawierające formamid są przechowywane w temp. $4^\circ\text{C}$ . Nie używać po upływie 7 dni lub w przypadku częstego stosowania. Usuwać wszystkie inne roztwory płuczające po upływie 1 dnia. Upewnić się, czy pH roztworów płuczających zawierających formamid wynosi $7,0$ do $8,0$ .
	Oglądanie efektu hybrydyzacji przy użyciu filtrów szerokopasmowych	Przełączyć na filtry o mniejszej szerokości pasma (przepuszczające węższe spektrum) lub wielopasmowe (wielowzbudzeniowe) dla zredukowania świecenia tła.
Słaby sygnał lub brak sygnału	Niewłaściwa denaturacja preparatów	Upewnić się, czy temperatura roztworu do denaturacji w kominku przed zanurzeniem preparatów wynosi $73 \pm 1^\circ\text{C}$ . Zwiększyć temperaturę roztworu denaturującego do $74^\circ\text{C}$ . Wydłużyć czas zanurzenia preparatu w roztworze do denaturacji o 2 do 4 minut.
	Preparaty nie były wykonane w sposób odpowiedni dla procedury FISH.	Skontaktować się z przedstawicielem firmy Abbott Molecular, aby uzyskać protokół opisujący sposób przygotowania próbki dla FISH.
	Preparaty po nakrapianiu zawiesiny dojrzewały w nieodpowiednich warunkach.	Przed przeprowadzeniem procedury FISH przechować preparaty 24 godziny w temperaturze otoczenia, aby pozwolić im dojrzeć.
	Preparaty z naniesionym materiałem nie zostały całkowicie wysuszone przed zanurzeniem w roztworze do denaturacji.	Ogrzać preparaty do temp. $45$ do $50^\circ\text{C}$ przed denaturacją lub odwozić preparaty w serii płukań EtOH (70%, 85%, 100%) po 1 minucie.
	Materiał był uprzednio barwiony dla uzyskania prążków G.	Użycie preparatów uprzednio barwionych dla uzyskania prążków G może wymagać korekty procedury barwienia GTG i/lub protokołu hybrydyzacji. Dalsze informacje dotyczące tej procedury można uzyskać u przedstawiciela firmy Abbott Molecular. Ewentualnie wykonać preparatykę FISH na świeżym materiale.
Sonda nie została dodana.		Przygotować nową mieszaninę sondy. Pozwolić, aby sonda całkowicie się rozmroziła. Wymieszać składniki na wytrząsarce laboratoryjnej lub używając pipety; krótko odwirować. Powoli pipetować sondę.
	Sonda, bufor hybrydyzacyjny lub mieszanina sondy nie były dobrze wymieszane przed użyciem.	Wymieszać składniki na wytrząsarce lub używając pipety; krótko odwirować.

Problem	Prawdopodobna przyczyna	Możliwe rozwiązanie
Słaby sygnał lub brak sygnału (c.d.)	Sondy nieprawidłowo rozcieńczone do hybrydyzacji	Stosować objętości podane w procedurze testu w celu zachowania właściwych proporcji mieszaniny sondy (7 $\mu$ L buforu hybrydyzacyjnego : 1 $\mu$ L sondy : 2 $\mu$ L oczyszczonej wody). Upewnić się, czy pipeta jest skalibrowana. Przed użyciem odczekać, aż bufor hybrydyzacyjny ulegnie całkowitemu rozmrożeniu i osiągnie temperaturę otoczenia. Pipetować powoli.
	Sonda nieodpowiednio zdenaturowana <b>UWAGA:</b> Nie dotyczy sond zawieszonych w buforze hybrydyzacyjnym i poddanych denaturacji.	Upewnić się, czy temperatura łaźni wodnej zastosowana do denaturacji mieszaniny sondy wynosi $73 \pm 1^\circ\text{C}$ . Denaturować mieszaninę sond przez 5 minut.
	Sonda nie została naniesiona na obszar docelowy natychmiast po jej zdenaturowaniu.	Zaplanować procedurę tak, aby sonda została nałożona na obszar docelowy natychmiast po wyjęciu preparatów z 100% roztworu EtOH. Upewnić się, czy etanol został odparowany z preparatu przed nałożeniem sondy. Bezpośrednio po wyjęciu z łaźni wodnej o temp. $73 \pm 1^\circ\text{C}$ umieścić probówkę z mieszaniną sondy na płycie grzejnej o temp. 45 do $50^\circ\text{C}$ . Przechowywać ją tam w trakcie nakładania sondy na preparat. Wykonywać procedurę na takiej ilości preparatów, która pozwoli na utrzymanie prawidłowych wartości temperatury i czasu trwania poszczególnych etapów.
	Przesuszenie mieszaniny sondy na preparacie	Po nałożeniu mieszaniny sondy natychmiast przykryć szkiełkiem nakrywkowym obszar docelowy preparatu. Po usunięciu szkiełka nakrywkowego przed płukaniem pohybrydyzacyjnym natychmiast zanurzyć preparat w roztworze płuczającym; dopiero później zdjąć szkiełko nakrywkowe z kolejnego preparatu.
	Pęcherzyki powietrza uwięzione pod szkiełkiem nakrywkowym podczas hybrydyzacji	Nałożyć szkiełko nakrywkowe, dotykając najpierw powierzchni mieszaniny sondy nałożonej na preparat. Umieścić preparat na suszce (bibule) szkiełkiem nakrywkowym do dołu i bardzo delikatnie wycisnąć widoczne pęcherzyki.

Problem	Prawdopodobna przyczyna	Możliwe rozwiązanie
Słaby sygnał lub brak sygnału (c.d.)	Nieodpowiednie warunki hybrydyzacji	Upewnić się, czy zastosowano wymagany czas i temperaturę hybrydyzacji. Upewnić się, czy temperatura w inkubatorze wynosi $37^\circ\text{C}$ . Uszczelnić szkiełko nakrywkowe, nie pozostawiając luk. Wydłużyć czas hybrydyzacji.
	Nieprawidłowe warunki płukania lub roztwory płuczające	Upewnić się, czy roztwory płuczające zostały przygotowane zgodnie z zaleceniami podanymi w instrukcji używania. Upewnić się, czy temperatura roztworów płuczających podczas płukania była właściwa. Upewnić się, czy termometr i pehametr są prawidłowo skalibrowane. Usunąć szkiełko nakrywkowe przed zanurzeniem preparatów w roztworze płuczającym.
	Sondy lub badane próbki przechowywane w niewłaściwych warunkach	Nierozcieńczoną sondę przechowywać w temp. $-20^\circ\text{C}$ ( $\pm 10^\circ\text{C}$ ) bez dostępu światła. Preparaty niepoddane hybrydyzacji i odwodnione przechowywać w temp. $-20^\circ\text{C}$ ( $\pm 10^\circ\text{C}$ ) przez dłuższy czas, a w temperaturze otoczenia przez krótki okres czasu. Preparaty poddane hybrydyzacji przechowywać do 3 tygodni w temp. $-20^\circ\text{C}$ ( $\pm 10^\circ\text{C}$ ) bez dostępu światła.
	Użyty niewłaściwy barwnik kontrastowy Zbyt jaskrawy barwnik kontrastowy	Usunąć szkiełko nakrywkowe. Zanurzyć preparat na 5 minut w 2X SSC/0,1% NP-40 w temperaturze otoczenia; odwodnić preparat w serii płukań EtOH (70%, 85%, 100%) po 1 minucie. Wysuszyć preparat na powietrzu i ponownie nałożyć barwnik kontrastowy.
	Wynik hybrydyzacji oglądano przy użyciu niewłaściwego zestawu filtrów.	Filtry wielopasmowe (wielowzbudzeniowe) dostarczają mniej światła niż filtry jednopasmowe, tak więc sygnał sondy może wydawać się słabszy. Użyć filtra właściwego dla zastosowanego fluoroforu. Dla uzyskania dalszych informacji skontaktować się z przedstawicielem firmy Abbott Molecular.
	Konfiguracja mikroskopu lub obiektywów nie jest odpowiednia dla obserwacji rezultatów barwienia FISH lub filtry w mikroskopie są uszkodzone.	Skontaktować się z producentem mikroskopu.

Problem	Prawdopodobna przyczyna	Możliwe rozwiązanie
Niska specyficzność sygnału	Sondy nieprawidłowo rozcieńczone; często zbyt duża ilość sondy w oznaczeniu	Upewnić się, czy mieszanina sond została wykonana zgodnie ze wskazówkami podanymi w instrukcji używania.
	Nieodpowiednie warunki hybrydizacji	Upewnić się, czy temperatura w inkubatorze wynosi 37 °C. Upewnić się, czy do mieszaniny sond dodano odpowiednią ilość buforu hybrydizacyjnego.
	Zbyt niska temperatura płukania	Utrzymywać stałą temperaturę kąpeli w roztworach płuczających przez umieszczanie w kominku nie więcej niż czterech preparatów równocześnie; przed zanurzeniem następnej partii preparatów upewnić się, czy temperatura roztworu płuczającego jest prawidłowa.
	Za słabo działa roztwór płuczający.	Upewnić się, czy roztwory płuczające zostały wykonane zgodnie z zaleceniami podanymi w instrukcji używania.  UWAGA: Im niższe stężenie soli (SSC), tym wyższe stężenie formamidu i NP-40, a tym samym wzmocnione działanie roztworu płuczającego.
Jaskrawy lub błady barwnik kontrastowy	Barwnik kontrastowy wygląda błado: próbka nie została całkowicie odwodniona przed nałożeniem barwnika lub olejek dostał się do barwnika.	Usunąć szkiełko nakrywkowe. Zanurzyć preparat na 5 minut w 2X SSC/0,1% NP-40 o temperaturze otoczenia; odwodnić preparat w serii płukań EtOH (70%, 85%, 100%) po 1 minucie. Wysuszyć preparat na powietrzu i ponownie nałożyć barwnik kontrastowy.
	Niewłaściwe stężenie barwnika kontrastowego <b>UWAGA:</b> Barwnik kontrastowy DAPI I jest osiem razy bardziej stężony niż barwnik kontrastowy DAPI II.	Jeśli barwienie DAPI jest zbyt jaskrawe, przed nałożeniem na preparat rozcieńczyć barwnik roztworem przeciwdziałającym wyświecaniu (ang. <i>antifade solution</i> , nr kat. 06J29-010).
	Barwnik kontrastowy jest przeterminowany lub był zbyt długo poddany na działanie światła.	Barwnik przechowywać w temp. -20 °C (± 10 °C) bez dostępu światła i podczas stosowania. Upewnić się, czy nie upłynęła data ważności barwnika.

## Piśmiennictwo

1. Swerdlow SH, Campo E, and Harris NL et al. WHO classification of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues. *International Agency for Research on Cancer, Lyon*. 2008;51,68-73.
2. Heim S and Mitelman F. *Cancer Cytogenetics*. 3<sup>rd</sup> edition Hoboken New Jersey: Wiley-Blackwell; 2009:219.
3. Fink SR, Belongie KJ, Paternoster SF, et al. Validation of a new three-color fluorescence in situ hybridization (FISH) method to detect CHIC2 deletion, FIP1L1/PDGFR fusion and PDGFR translocations. *Leukemia Research*. 2009;33(6):843–846.
4. Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, et al. The Human Genome Browser at UCSC. *Genome Res*. 2002;12(6):996-1006
5. Wiktor AE, Van Dyke DL, Stupka PJ, et al. Preclinical validation of fluorescence in situ hybridization assays for clinical practice. *Genet Med*. 2006;8(1):16-23.
6. US Department of Health and Human Services. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*. 5th ed. Washington, DC: US Government Printing Office; December 2009. [Dostępne także online. Wpisz> [www.cdc.gov](http://www.cdc.gov), wyszukaj>BMBL5>sprawdź rozdziały III oraz IV.]
7. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration. 29 CFR Part 1910.1030. *Bloodborne Pathogens*.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections: Approved Guideline – Third Edition*. CLSI Document M29-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2005.
9. World Health Organization. *Laboratory Biosafety Manual*. 3rd ed. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2004.

## Pomoc techniczna:

W przypadku problemów technicznych prosimy o kontakt z firmą Abbott Molecular w Polsce lub o odwiedzenie strony internetowej firmy Abbott Molecular pod adresem <http://www.abbottmolecular.com>.

Adres autoryzowanego przedstawiciela (AR)

**Abbott GmbH**  
Max-Planck-Ring 2  
65205 Wiesbaden, Germany  
Tel.: +49-6122-580

Sonda Vysis LSI 4q12 Tri-Color Rearrangement Probe objęta jest patentem europejskim EP 0 549 709 B1 przyznanym firmie Abbott Molecular.

CEP, LSI, WCP, Vysis, SpectrumGreen, SpectrumOrange, SpectrumAqua, SpectrumBlue, SpectrumGold oraz ThermoBrite są znakami towarowymi grupy spółek należących do firmy Abbott podlegających różnym jurysdykcjom.

Wszystkie pozostałe znaki towarowe stanowią własność poszczególnych firm.



Abbott Molecular Inc.  
Des Plaines, IL 60018 USA



Abbott GmbH  
Max-Planck-Ring 2  
65205 Wiesbaden, Germany

© 2010, 2020 Abbott. Wszelkie prawa zastrzeżone.

[www.abbottmolecular.com](http://www.abbottmolecular.com)

lipiec 2020