

Vysis RARA Break Apart FISH Probe Kit

pl

Vysis RARA Break Apart FISH Probe Kit

REF 05N46-020

G66547R05

B5N46P

UWAGA: Zmiany wyróżniono kolorem szarym.

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

Przeznaczenie

Zestaw sond Vysis RARA Break Apart FISH Probe Kit przeznaczony jest do wykrywania rearanżacji chromosomowych, obejmujących region genu RARA na chromosomie 17q21, z użyciem techniki fluorescencyjnej hybrydizacji *in situ* (FISH).

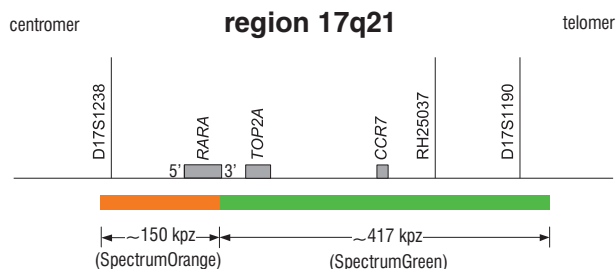
Wprowadzenie

Ostra białaczka promielocytowa (ang. *acute promyelocytic leukemia*, APL) związana jest z rearanżacjami chromosomowymi z zaangażowaniem genu receptora alfa kwasu retinowego (RARA) na chromosomie 17q21 oraz zmiennych partnerów genowych.^{1,3,4} W większości przypadków APL dochodzi do fuzji genu RARA z genem białaczki promielocytowej (ang. *promyelocytic leukemia*, PML) zlokalizowanym na 15q22, prowadząc do translokacji t(15;17). Opisano także inne typy fuzji genu RARA z genem dla „palca cynkowego” białaczki promielocytowej (ang. *promyelocytic leukemia zinc finger*, PLZF; 11q13), genem dla nukleofosminy (ang. *nucleophosmin*, NPM, 5q35), genem dla jądrowego aparatu mitotycznego (ang. *nuclear mitotic apparatus*, NuMA; 11q23), genem będącym przekaźnikiem sygnału oraz aktywatorem transkrypcji 5b (STAT5B, 17q21) oraz genem PRKAR1A (kinaza białkowa, zależna od cAMP, regulatorowa, typu I, alfa, 17q23-q24).^{1,3,4}

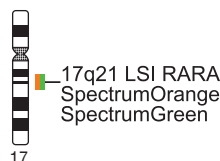
Zestaw sondy Vysis RARA Break Apart FISH Probe Kit zastosowano w kilku badaniach w celu wykrycia rearanżacji na chromosomie 17q21 z zaangażowaniem genu RARA.^{4,5,6,7}

Opis sondy

Wyznakowana na pomarańczowo (SpectrumOrange) sonda o wielkości około 150 kpz (chr17:35612650-35762683; March 2006 assembly, UCSC Genome Browser)⁸ leży w większości centromerycznie względem regionu złamania genu RARA, zlokalizowanego w intronie 2.^{1,2} Sonda rozciąga się około 4 kpz poza intron 2. Wyznakowana na zielono (SpectrumGreen) sonda o wielkości około 417 kpz (chr17:35762877-36180271; March 2006 assembly, UCSC Genome Browser)⁸ jest położona telomerycznie względem regionu złamania genu RARA.



LSI RARA Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe



Odczynniki

1. Vysis LSI RARA Dual Color Break Apart Rearrangement Probe (nr części: 30-191011)

(1 fiołka, 20 µL w jednej fiołce) 400 ng/µL. Sonda DNA znakowana fluoroforem oraz blokujące DNA w buforze Tris-EDTA.

2. Vysis LSI/WCP Hybridization Buffer (nr produktu: 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 RARA Break Apart FISH Probe Kit należy przechowywać w temp. -20 °C (± 10 °C) bez dostępu światła.

Warunki transportowania

Zestaw sond Vysis RARA Break Apart FISH Probe Kit jest transportowany w suchym lodzie.

Jeśli stan dostarczonych odczynników jest inny niż podany na etykiecie 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 RARA Dual 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”¹⁰, standardach OSHA dotyczących patogenów przenoszonych drogą krwi (Standards on Bloodborne Pathogens)¹¹, w dokumencie CLSI M29-A3¹² oraz innych odpowiednich praktyk związanych z bezpieczeństwem biologicznym.¹³ 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.¹⁰
- Wszystkie potencjalnie zakaźne materiały odkazić, a następnie utylizować zgodnie z lokalnymi, jak i ogólnokrajowymi przepisami.¹³

Bufor Vysis LSI/WCP Hybridization Buffer

Składniki warunkujące stopień zagrożenia umieszczone na etykiecie:

- formamid

Zastosowanie mają poniższe środki ostrożności:



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 styczości: Zasięgnąć porady/zgłosić się pod opiekę lekarza.
P405	Przechowywać pod zamknięciem.
P501	Zawartość / pojemnik usuwać zgodnie z miejscowymi przepisami.

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 wynoszącej 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 wynoszącej 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 wynoszącej 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 pod wpływem światła. Zmniejszenie natężenia światła podczas obróbki wszystkich roztworów i preparatów zawierających fluorofory powoduje zmniejszenie tej degradacji. Wszystkie kroki, które można wykonać bez dostępu światła, takie jak inkubacje i przemycanie, należy przeprowadzać w ciemności.

Uwagi dotyczące procedury: Przed użyciem odczynnik rozmrażać w temperaturze otoczenia, a następnie każdą probówkę wirować przez 2 do 3 sekund w standardowej stołowej mikrowirówce.

Pobranie i przygotowanie próbki do analizy

Komórki 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 RARA Dual Color Break Apart 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 do barwienia (naczynia Coplina)
- Skalibrowany termometr
- Pęseta
- Cylinder miarowy (1000 mL)
- Mieszanina magnetyczna
- 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
- Łaźnia wodna (37 °C i 72 °C)
- Mikroskop fluorescencyjny
- Inkubator o temp. 37 °C
- 20X SSC
- NP-40
- Formamid (o wysokim stopniu czystości)
- Barwnik kontrastowy DAPI II
- Płyta grzejna do preparatów

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

W celu 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 do barwienia zawierające roztwór do denaturacji doprowadzić do temperatury otoczenia. Przed użyciem umieścić kominki z roztworem w łaźni wodnej o temp. $73 \pm 1^\circ\text{C}$ na ok. 30 minut w celu doprowadzenia roztworu do wymaganej temperatury.

1. 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 barwionych jest mniej niż cztery preparaty, należy dołożyć pustych szkiełek o temperaturze otoczenia tak, aby razem było ich cztery.

2. Zanurzyć preparaty w roztworze do denaturacji na 5 minut.

UWAGA: W jednym kominku do barwienia nie należy zanurzać więcej niż cztery preparaty równocześnie.

3. Odwozić 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

1. Dodawać poniższe składniki dla poszczególnych obszarów docelowych do próbki mikrowirówkowej w temperaturze otoczenia:

7 μL buforu hybrydacyjnego LSI/WCP

1 μL sondy

2 μL oczyszczonej wody

UWAGA: W celu przeprowadzenia równoczesnej hybrydacji dwóch lub trzech sond, każdej znakowanej innym fluoroforem, należy dodać jeden mikrolitr każdej sondy. Dodać oczyszczoną wodę do otrzymania łącznej objętości sondy i wody równej trzem mikrolitrom.

2. Probówkę poddać wirowaniu przez 1 do 3 sekund.
3. Zmieszać na worteksie i ponownie odwirować.
4. Umieścić probówkę w łaźni wodnej o temp. $73 \pm 1^\circ\text{C}$ na 5 minut.
5. Wyjąć probówkę z łaźni wodnej.
6. Umieścić probówkę na płycie grzejnej rozgrzanej do temp. 45 do 50°C do momentu, w którym będzie możliwe nałożenie sondy na docelowe DNA.

UWAGA: Jeśli preparaty są już gotowe w momencie zdenaturowania sondy, można zaaplikować sondę na docelowe DNA bezpośrednio po jej denaturacji.

Hybrydizacja sondy do próbki docelowej

UWAGA: Przygotować wilgotną komorę poprzez wyłożenie hermetycznego pojemnika na preparaty papierowym ręcznikiem nasączonym wodą. Umieścić w inkubatorze o temp. 37°C .

1. Wyjąć preparaty ze 100% EtOH.
2. Wysuszyć preparaty, opierając dolną krawędź szkiełka na bibule i wycierając do sucha spód szkiełka ręcznikiem papierowym.
3. Umieścić preparaty na płycie grzejnej o temp. 45 do 50°C na maksymalnie dwie minuty dla odparowania resztek EtOH.
4. Nałożyć 10 μL mieszaniny sondy na jeden docelowy obszar preparatu i natychmiast przykryć szkiełkiem nakrywkowym. Powtórzyć te czynności dla kolejnych obszarów docelowych.
5. Uszczelnić szkiełko nakrywkowe przy użyciu kleju kauczukowego.
6. Umieścić preparaty w nagrzanej komorze wilgotnej, a następnie wstawić komorę do inkubatora o temp. 37°C na 6 do 16 godzin.

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

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 zanurzenia czwartego szkiełka.

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

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

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

Wizualizacja hybrydizacji

1. Wysuszyć preparaty na powietrzu, w ciemności.
2. Nanieść 10 μL 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 hybrydizacji.

Użycie filtra Vysis...	pozwala na równoczesne wzbudzenie i emisję fluoroforów...
DAPI/Orange	DAPI i fluorofor pomarańczowy (SpectrumOrange)
DAPI/Green	DAPI i fluorofor zielony (SpectrumGreen)
Aqua/Green/Orange	fluorofor jasnoniebieski (SpectrumAqua), zielony (SpectrumGreen) oraz pomarańczowy (SpectrumOrange)
DAPI/Orange/Green	DAPI, fluorofor pomarańczowy (SpectrumOrange) i zielony (SpectrumGreen)
DAPI/Aqua/Green/Orange	DAPI, spektrum jasnoniebieskie (SpectrumAqua), spektrum zielone (SpectrumGreen) i spektrum pomarańczowe (SpectrumOrange)

Przechowywanie: Preparaty przechowywane w temp. -20°C i chronione przed dostępem światła mogą być badane przez co najmniej trzy tygodnie po hybrydizacji.

Zastosowanie kodenaturacji

Kodenaturacja jest procesem, który upraszcza procedurę fluorescencyjnej hybrydizacji *in situ* (FISH) poprzez połączoną, 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 hybrydizacji.

Warunki kodenaturacji zalecane w publikacjach są zróżnicowane w zakresie temperatury i czasu, wskazując na konieczność optymalizacji tych warunków 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 hybrydizacji z użyciem kodenaturacji może różnić się od efektu hybrydizacji z zastosowaniem osobnej denaturacji próbki badanej i jej odwożenia przed nałożeniem sondy.

Przygotowanie preparatu do kodenaturacji

1. Dodawać poniższe składniki dla poszczególnych obszarów docelowych do próbki mikrowirówkowej w temperaturze otoczenia:
 - 7 μL buforu hybrydacyjnego 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 kauczukowego.

Ustawianie parametrów systemu denaturacji/hybrydyzacji

Podane poniżej wskazówki dotyczą parametrów wyjściowych systemu ThermoBrite Denaturization/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 hybrydyzacji. Dalsze wskazania, patrz rozdziały dotyczące wykrywania i usuwania określonych problemów w niniejszej instrukcji użytkownika.

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 hybrydyzacji (*Hyb Temp*) na 37 °C, zaś czas hybrydyzacji (*Hyb Time*) - od 4 godzin do hybrydyzacji całonocnej.
3. Po upływie czasu hybrydyzacji 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 powinny być oznaczane kontrole: dodatnia i ujemna.

Oczekiwane rezultaty

Oczekiwany prawidłowy wzorek sygnału dla sondy Vysis LSI RARA Dual Color Break Apart Rearrangement Probe są dwa sygnały fuzyjne. Oczekiwany nieprawidłowy wzorek sondy Vysis LSI RARA Dual Color Break Apart Rearrangement Probe jest jeden sygnał pomarańczowy, jeden sygnał zielony i jeden sygnał fuzyjny. Mogą pojawić się też inne wzory sygnałów nieprawidłowych. Przy ich interpretacji przydatna może być analiza metafaz.

Ograniczenia stosowania

W przypadku analizy interfazy każde laboratorium powinno ustalić analityczną wartość normy dla punktu odcięcia (cutoff) dla wzoru sygnału nieprawidłowego przy użyciu odpowiednich technik, opisanych m.in. przez takich autorów jak Wiktor.⁹

Usuwanie problemów dotyczących wyników w teście z kodenaturacją

Morfologia chromosomów obserwowana podczas hybrydyzacji z użyciem kodenaturacji może różnić się od obrazu uzyskanego przed nałożeniem sondy po uprzedniej denaturacji i odwodnieniu preparatu badanego.

Problem	Możliwe rozwiązanie
Hybrydyzacja krzyżowa	<p>Powtórzyć analizę z inną próbką, stosując jedną z poniższych modyfikacji:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Podwyższyć temperaturę 0,4X SSC/0,3% NP-40 o 2°C. Jeśli będzie to konieczne, kontynuować podwyższanie temperatury aż do uzyskania sygnału o akceptowalnej intensywności. • Obniżyć temperaturę denaturacji o 2°C.
Słaby sygnał sondy	<p>Powtórzyć analizę z inną próbką, stosując jedną z poniższych modyfikacji:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Wydłużyć czas hybrydyzacji. • Podwyższyć temperaturę denaturacji. Jeśli będzie to konieczne, kontynuować podwyższanie temperatury aż do uzyskania akceptowalnej morfologii. • Wypłukać preparaty w 0,4X SSC/0,3% NP-40 w temp. 70 do 73°C.

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

Wskazówki i usuwanie problemów

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

Poniższa lista zestawia niezadowolające rezultaty, jakie można uzyskać, stosując sondy LSI. Lista zawiera prawdopodobne przyczyny i zalecenia, 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°C . Skrócić czas zanurzenia preparatu w roztworze do 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°C przed denaturacją lub odvodnić preparaty w serii płukań w EtOH (70%, 85%, 100%) kolejno 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 nakraplaniem zawiesiny zanurzyć szkiełka w EtOH, a następnie dokładnie wytrzeć ściereczką bezpyłową.
	Resztki komórek na preparacie	Trzykrotnie przemyć peletkę komórek świeżym utrwalcaczem i powtórzyć procedurę nakraplania zawiesiny na szkiełko.
	Płytki metafazowe dojrzewały przez prażenie lub zawierają cytoplazmę.	Wydłużyć czas zanurzenia preparatu w roztworze do denaturacji 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°C . Wylać po upływie 7 dni lub w przypadku częstego stosowania. Wylać wszystkie inne roztwory płuczające po 1 dniu. 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 do barwienia przed zanurzeniem preparatów wynosi $73 \pm 1^\circ\text{C}$. Podnieść temperaturę roztworu denaturującego do 74°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 protokoły opisujące sposób przygotowania próbki dla FISH.
	Preparaty po nakraplaniu 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°C przed denaturacją lub odvodnić preparaty w serii płukań w EtOH (70%, 85%, 100%) kolejno po 1 minucie.
	Materiał był uprzednio barwiony metodą GTG.	Użycie preparatów uprzednio barwionych do badania FISH z użyciem trypsiny i barwnika Giemsa może wymagać korekty procedury barwienia i/lub protokołu hybrydyzacji. Dalsze informacje dotyczące barwienia przed analizą FISH można uzyskać u przedstawiciela firmy Abbott Molecular. Ewentualnie wykonać preparatykę FISH na świeżym materiale.
	Sonda nie została dodana.	Przygotować nową mieszaninę sondy. Odczekać, aż sonda ulegnie całkowitemu rozmrożeniu. Wymieszać składniki na wytrząsarce laboratoryjnej lub używając pipety; krótko odwirować. Powoli pipetować sondę.
	Sonda, bufor hybrydyzacyjny lub mieszanina sondy nie zostały dobrze wymieszane przed użyciem.	Wymieszać składniki na wytrząsarce laboratoryjnej 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 µL buforu hybrydyzacyjnego: 1 µL sondy: 2 µL oczyszczonej wody). Upewnić się, czy pipeta jest skalibrowana. Przed użyciem odczekać, aż bufor hybrydyzacyjny ulegnie całkowitemu rozmrożeniu i osiągnie temperaturę otoczenia; powoli pipetować.
	Sonda nieodpowiednio zdenaturowana UWAGA: 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 sondę 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 EtOH 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°C . Przechowywać ją tam w trakcie nakładania mieszaniny sondy na preparat. Wykonywać procedurę na takiej tylko 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 płuczącym; 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.)	Nieprawidłowe warunki hybrydyzacji	Upewnić się, czy zastosowano wymagany czas i temperaturę hybrydyzacji. Upewnić się, czy temperatura inkubatora wynosi 37°C . Dobrze uszczelnić szkiełko nakrywkowe przy użyciu spoiwa elastycznego, nie pozostawiając luk. Wydłużyć czas hybrydyzacji.
	Nieprawidłowe warunki płukania lub roztwory płuczące	Upewnić się, czy roztwory płuczące zostały wykonane zgodnie z zaleceniami podanymi w instrukcji używania. Upewnić się, czy temperatura roztworów płuczących podczas płukania była właściwa. Upewnić się, czy termometry i pehametry są prawidłowo skalibrowane. Usunąć szkiełko nakrywkowe przed zanurzeniem preparatu w roztworze płuczącym.
	Sondy lub badane próbki były przechowywane w niewłaściwych warunkach.	Nierozcieńczoną sondę przechowywać w temp. -20°C ($\pm 10^\circ\text{C}$) bez dostępu światła. Preparaty niepoddane hybrydyzacji i odwodnione przechowywać w temp. -20°C ($\pm 10^\circ\text{C}$) przez dłuższy czas, a w temperaturze otoczenia przez krótki czas. Preparaty poddane hybrydyzacji przechowywać w temp. -20°C ($\pm 10^\circ\text{C}$) bez dostępu światła do 3 tygodni.
	Użyto niewłaściwego barwnika kontrastowego. Barwnik kontrastowy zbyt jaskrawy	Usunąć szkiełko nakrywkowe. Zanurzyć preparaty na 5 minut w 2X SSC/0,1% NP-40 o temperaturze otoczenia; odwodnić preparat w serii płukań w EtOH (70%, 85%, 100%) kolejno po 1 minucie. Wysuszyć preparat na powietrzu i ponownie nałożyć barwnik kontrastowy.
	Oglądano wynik hybrydyzacji przy użyciu niewłaściwego zestawu filtrów.	Filtry wielopasmowe (wielowzbudzeniowe) dostarczają mniej światła niż filtry jednopasmowe, tak więc sygnał sondy może wydawać się słabszy, jeśli ogląda się go przy użyciu filtrów wielopasmowych. Użyć filtra właściwego dla zastosowanego fluoroforu. W celu uzyskania dalszych informacji skontaktować się z przedstawicielem firmy Abbott Molecular.
	Konfiguracja mikroskopu lub obiektywów nie jest odpowiednia dla obserwacji rezultatów badania FISH lub filtry w mikroskopie są uszkodzone.	Skontaktować się z producentem mikroskopu.

Problem	Prawdopodobna przyczyna	Możliwe rozwiązanie
Niska specyficzność sygnałów	Sondy nieprawidłowo rozcieńczone; często zbyt duża ilość sondy w oznaczeniu.	Upewnić się, czy mieszanina sond została wykonana zgodnie z zaleceniami podanymi w instrukcji używania.
	Nieprawidłowe warunki hybrydyzacji	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 kąpieli w roztworach płuczających przez umieszczanie w jednym kominku nie więcej niż 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 blade; preparaty nie zostały całkowicie odwodnione przed nałożeniem barwnika lub olejek dostał się do barwnika.	Usunąć szkiełko nakrywkowe. Zanurzyć preparaty na 5 minut w 2X SSC/0,1% NP-40 o temperaturze otoczenia; odwodnić preparat w serii płukań w EtOH (70%, 85%, 100%) kolejno po 1 minucie. Wysuszyć preparat na powietrzu i ponownie nałożyć barwnik kontrastowy.
	Niewłaściwe stężenie barwnika kontrastowego UWAGA: Barwnik DAPI I jest osiem razy bardziej stężony niż barwnik DAPI II.	Jeśli barwienie 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, również podczas stosowania. Upewnić się, czy nie minęła data ważności barwnika.

Piśmiennictwo

- Redner R. Variations on a theme: the alternate translocations in APL. Review. *Leukemia*. 2002;16:1927-32.
- Hasan S, Mays A, Ottone T, et al. Molecular analysis of t(15;17) genomic breakpoints in secondary acute promyelocytic leukemia arising after treatment of multiple sclerosis. *Blood*. 2008;112: 3383-90.
- Grimwade D, Biondi A, Mozziconacci MJ, et al. Characterization of acute promyelocytic leukemia cases lacking the classic t(15;17): results of the European Working Party. *Blood*. 2000;96:1297-1308.
- Catalano A, Dawson M, Somana K, et al. The PRKAR1A gene is fused to RARA in a new variant acute promyelocytic leukemia. *Blood*. 2007;110:4073-76.
- Park TS, Kim JS, Song J, et al. Acute promyelocytic leukemia with insertion of PML exon 7a and partial deletion of exon 3 of RARA: a novel variant transcript related to aggressive course and not detected with real-time polymerase chain reaction analysis. *Cancer Genetics and Cytogenetics*. 2009;188:103-107.

- Kang L, Smith S, Kaiser-Rogers K, et al. Two cases of acute myeloid leukemia with t(11;17) associated with varying morphology and immunophenotype: rearrangement of the MLL gene and a region proximal to the RARA gene. *Cancer Genetics and Cytogenetics*. 2005;159:168-173.
- Lee G, Christina S, Tien S, et al. Acute promyelocytic leukemia with PML-RARA fusion on i(17q) and therapy-related acute myeloid leukemia. *Cancer Genetics and Cytogenetics*. 2005;159:129-136.
- Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, et al. The Human Genome Browser at UCSC. *Genome Res*. 2002;12(6):996-1006.
- 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.
- US Department of Health and Human Services. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*. 5th ed. Washington, DC: US Government Printing Office; December 2009. [Także dostępne online. Wpisz> www.cdc.gov, wyszukaj>BMBL5>sprawdź rozdziały III oraz IV.]
- US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration. 29 CFR Part 1910.1030. *Bloodborne Pathogens*.
- 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.
- World Health Organization. *Laboratory Biosafety Manual*. 3rd ed. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2004.

Pomoc techniczna:

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


Adres autoryzowanego przedstawiciela (AR)

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

Sondy Vysis LSI RARA Dual Color Break Apart Rearrangement Probe są chronione patentem europejskim EP 0 549 709 B1, przyznany 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



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

© 2010, 2020 Abbott. Wszelkie prawa zastrzeżone.

www.abbottmolecular.com

lipiec 2020

