

# Vysis MDM2/CEP 12 FISH Probe Kit

pl

Vysis MDM2/CEP 12 FISH Probe Kit

**REF** 01N15-010

**G60866R03**

**B1N15P**

**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).
	Uwaga: Sprawdź w dołączonej dokumentacji.
	Zagrożenia biologiczne
	Niebezpieczeństwo
	Użyć przed
	Zajrzyj do instrukcji używania.
<b>EC REP</b>	Autoryzowany przedstawiciel

## Przeznaczenie

Zestaw sond Vysis MDM2/CEP 12 FISH Probe Kit jest przeznaczony do wykrywania liczby kopii docelowego obszaru sondy LSI MDM2 zlokalizowanego na chromosomie 12q15 z użyciem techniki fluorescencyjnej hybrydizacji *in situ* (FISH).

## Wprowadzenie

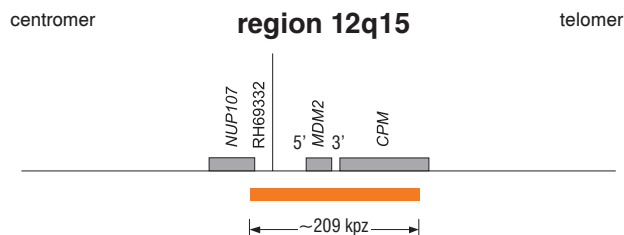
W regionie chromosomowym 12q13-q15 często dochodzi do translokacji i amplifikacji w mięsakach tkanek miękkich<sup>1</sup> oraz przewlekłej białaczce limfocytowej<sup>2-5</sup> u ludzi. Region ten obejmuje gen MDM2 (ang. *mouse double minute 2*). MDM2 hamuje aktywność transkrypcyjną białka p53, wiążąc się z nim i przenosząc go do cytoplazmy.<sup>1</sup> Powoduje to inaktywację supresora nowotworowego i powstawanie guzów, co w końcowym efekcie prowadzi do raka.

Zestaw sond Vysis MDM2/CEP 12 FISH Probe Kit wykorzystuje dwukolorową sondę przeznaczoną do detekcji liczby kopii obszaru docelowego sondy LSI MDM2 zlokalizowanego na chromosomie 12q15 przy użyciu metody FISH.

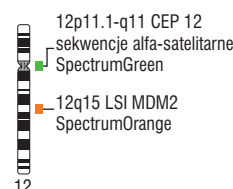
## Opis sondy

Wyznakowana na pomarańczowo (SpectrumOrange) sonda o wielkości około 209 kpz (chr12:67 420 133-67 629 503; March 2006 assembly)<sup>6</sup> obejmuje gen MDM2 na chromosomie 12q15.

Wyznakowana na zielono sonda SpectrumGreen CEP 12 hybryduje do alfoidalnych sekwencji, znajdujących się w obrębie centromeru chromosomu 12 (12p11.1-q11).



## LSI MDM2 SpectrumOrange Probe



## Odczynniki

### 1. Vysis LSI MDM2 SpectrumOrange/CEP 12 SpectrumGreen Probes (nr części: 30-231098)

(1 fiołka, 10 µL w jednej fiołce). 175 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 MDM2/CEP 12 FISH Probe Kit należy przechowywać w temp. -20 °C (± 10 °C), bez dostępu światła.

## Warunki transportowania

Zestaw sond Vysis MDM2/CEP 12 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*

### Sondy Vysis LSI MDM2 SpectrumOrange/CEP 12 SpectrumGreen Probes

**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>7</sup> standardach OSHA dotyczących patogenów przenoszonych drogą krwi (*Standards on Bloodborne Pathogens*),<sup>8</sup> w dokumencie CLSI M29-A3<sup>9</sup> oraz innych odpowiednich praktyk

związanych z bezpieczeństwem biologicznym.<sup>10</sup> A zatem wszystkie materiały pochodzenia ludzkiego należy traktować jako potencjalnie zakażne. 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 stosować kosmetyków ani nie dotykać szkielek 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>7</sup>
- Wszystkie potencjalnie zakażne materiały odkazić, a następnie usuwać zgodnie z lokalnymi, jak i ogólnokrajowymi przepisami.<sup>10</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.

#### Środki ostrożności dotyczące użytkowania

- Zestaw sond Vysis MDM2/CEP 12 FISH Probe Kit jest przeznaczony do użytku wyłącznie z próbkami, z którymi obchodzono się i które przechowywano zgodnie z opisem podanym w niniejszej instrukcji używania.
- Zestawu sond Vysis MDM2/CEP 12 FISH Probe Kit nie stosować po upływie daty ważności.
- Należy przestrzegać zaleceń podanych w instrukcji używania. Niezastosowanie się do tych zaleceń może spowodować uzyskiwanie błędnych wyników.

#### Środki ostrożności dotyczące pracy laboratorium

- Wszelkie materiały pochodzenia biologicznego powinny być traktowane jako czynniki potencjalnie zakażne. Jako że często nie jest możliwe stwierdzenie ich zakaźności, podczas pracy ze wszystkimi próbkami pochodzenia ludzkiego i szkiełkami kontrolnymi należy przestrzegać uniwersalnych środków ostrożności.
- Próbkę należy chronić przed działaniem kwasów, silnych zasad oraz wysokich temperatur. Czynniki te powodują uszkodzenie DNA oraz mogą doprowadzić do uzyskania błędnych wyników testu FISH.
- Nieprzestrzeganie wszystkich procedur denaturacji preparatów, hybrydyzacji i detekcji może skutkować uzyskaniem nieakceptowalnych lub błędnych wyników.
- Fluorofory szybko ulegają degradacji pod wpływem światła. Ograniczenie dostępu światła do wszystkich preparatów i zestawów sond zawierających fluorofory, jak również przechowywanie preparatów i zestawów sond bez dostępu światła, zmniejsza tę degradację. Dotyczy to wszystkich kroków, w trakcie których opracowuje się hybrydizowany preparat. Wszystkie etapy procedury, do przeprowadzenia których nie jest wymagane światło (inkubacje, płukania itd.), należy przeprowadzać bez dostępu światła lub przy słabym świetle.
- Zestaw sond Vysis MDM2/CEP 12 FISH Probe Kit zawiera formamid, który jest substancją teratogenną. Unikać zanieczyszczenia skóry i błon śluzowych.
- Do pomiaru temperatury roztworów, temperatury w łaźniach wodnych i inkubatorach należy używać skalibrowanych termometrów.
- Przed każdym użyciem należy zawsze sprawdzić temperaturę roztworów płuczających, mierząc temperaturę roztworu w kominku do barwienia przy użyciu skalibrowanego termometru.

- Wszystkie substancje niebezpieczne należy usuwać zgodnie z zasadami usuwania materiałów niebezpiecznych obowiązującymi w danej placówce.

#### Procedura testu

##### Wymagane materiały

- Vysis LSI MDM2 SpectrumOrange/CEP 12 SpectrumGreen Probes
- Vysis LSI/WCP Hybridization Buffer

##### Materiały wymagane, lecz niedostarczone

##### Odczynniki laboratoryjne

- Olejek imersyjny odpowiedni do mikroskopii fluorescencyjnej
- Etanol (100%). Przechowywać w temperaturze pokojowej.
- Oczyszczona woda
- Klej kauczukowy
- 12 N HCl
- 1 N NaOH
- DAPI II Counterstain/Antifade (nr kat. 06J50-001)
- 20X SSC (nr kat. 02J10-032)
- NP-40 (nr kat. 07J05-001)

##### Sprzęt laboratoryjny

- Odtuszczone szklane szkiełka mikroskopowe
- Szklane szkiełka nakrywkowe o wymiarach 22 mm x 22 mm
- Pipeta mikrolitrowa (o zakresie od 1 do 10 µL) oraz jałowe końcówki
- Timer
- Mikrowirówka
- Cylindry miarowe (100 do 1000 mL)
- Łaźnie wodne (70 do 80 °C)
- Łaźnia wodna (37 °C)
- Znacznik (ołówek) z diamentową końcówką lub marker odporny na działanie rozpuszczalnika
- Pęseta
- Strzykawka jednorazowego użytku (5 mL)
- Pipety jednorazowego użytku (5 do 20 mL)
- Kominki do barwienia (barwiacz typu Coplin) (sugerowany typ: produkt firmy Wheaton, nr kat. 900570, kominek pionowy)
- Mikroskop fluorescencyjny wyposażony w zalecane filtry (patrz rozdział „Sprzęt mikroskopowy i akcesoria”)
- Skalibrowany termometr
- Kasetka na szkiełka mikroskopowe z zamykaną pokrywą i pochłaniaczem wilgoci
- Mieszanina magnetyczna
- Pehametr
- Worteks
- Filtry o wielkości porów 0,45 µm
- Płyta grzejna do preparatów (45 do 50 °C)
- Aparat ThermoBrite®
- Wkłady do kontroli wilgotności w aparacie ThermoBrite

##### Sprzęt mikroskopowy oraz akcesoria

**Mikroskop** Do oględzin rezultatów hybrydyzacji wymagany jest mikroskop fluorescencyjny z systemem epiiluminacji. W celu uzyskania optymalnego przebiegu oględzin preparatu FISH należy sprawdzić, czy mikroskop działa prawidłowo. Mikroskop przystosowany do oględzin rezultatów typowego barwienia DNA barwnikiem DAPI, jodkimi propidyny lub kwinkaryną może nie być odpowiedni do pracy z testami FISH. Zaleca się rutynowe czyszczenie mikroskopu oraz okresowe regulowanie, zwłaszcza regulowanie/centrowanie lampy rtęciowej, jeśli jest wymagane, przez inżyniera serwisowego producenta.

**Źródło światła wzbudzającego** Rekomendowane źródło światła wzbudzającego to 100-watowa lampa rtęciowa lub jej odpowiednik o zbliżonym natężeniu oraz spektrum emitowanego światła. Należy się skonsultować z inżynierem serwisowym producenta w celu upewnienia się, że system iluminacji fluorescencyjnej jest właściwy do oględzin próbek oznaczanych metodą FISH. Należy zapisać liczbę godzin pracy żarówki i wymienić ją, zanim upłynie wyznaczony czas jej zużycia. Należy upewnić się, czy lampa jest właściwie wyregulowana, jeśli jest to wymagane.

**Obiektyw** Stosując mikroskop ze 100-watową lampą rtęciową lub 100-watową lampą o długiej żywotności, należy stosować obiektyw do fluorescencji z imersją olejową, o aperturze  $\geq 0,75$ . Obiektyw powiększający 40-krotnie z okulem powiększającym 10-krotnie jest właściwy do skanowania próbek w celu wybrania obszarów odpowiednich do zliczania sygnałów. Satysfakcjonujące rezultaty zliczania sygnałów FISH uzyskuje się przy użyciu obiektywów

achromatycznych z imersją olejową, powiększających 63-krotnie lub 100-krotnie.

**Olejek imersyjny** Do obiektywów należy używać olejku imersyjnego przewidzianego dla niewielkiej autofluorescencji i przeznaczonego do użytku w mikroskopii fluorescencyjnej.

**Filtry** Hybrydyzacja sondy SpectrumOrange do jej obszarów docelowych DNA widoczna jest poprzez zastosowanie pomarańczowego barwnika fluorescencyjnego. Hybrydyzacja sondy SpectrumGreen do jej obszarów docelowych DNA widoczna jest poprzez zastosowanie zielonego barwnika fluorescencyjnego. DNA, które nie hybrydyzowało do sond, będzie zabarwione na niebiesko w wyniku zastosowania barwnika kontrastowego DAPI II.

## Protokół badania

Przed przystąpieniem do przygotowywania próbek, patrz rozdział „**OSTRZEŻENIA I ŚRODKI OSTROŻNOŚCI**” w niniejszej instrukcji używania.

## Przygotowanie odczynnika roboczego

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

Przygotować rozcienienia (v/v) 70% oraz 85% etanolu, stosując 100% etanol i oczyszczoną wodę. Tak przygotowane roztwory przechowywać w temperaturze pokojowej w szczelnie zamkniętych pojemnikach. Rozcieńczone roztwory można stosować przez okres jednego tygodnia, chyba że doszło do wyparowania, rozcieńczenia lub zmętnienia roztworu na skutek wielokrotnego użycia.

### Roztwór 20X SSC

Rozpuścić 66 g soli 20X SSC przy użyciu 200 mL oczyszczonej wody w odpowiednim naczyniu. Zmierzyć pH w temperaturze pokojowej za pomocą pehametru i doprowadzić je do wartości 5,3 przy użyciu 12 N HCl, jeśli zajdzie taka potrzeba. Przenieść roztwór do cylindra miarowego i dodać oczyszczoną wodę do uzyskania końcowej objętości wynoszącej 250 mL. Tak przygotowany roztwór wymieszać i przefiltrować przez filtr o wielkości porów wynoszącej 0,45 µm. Przygotowany roztwór wyjściowy przechowywać w temperaturze pokojowej. Roztwór wyjściowy wylać po upływie 6 miesięcy lub wcześniej w przypadku stwierdzenia śladów zmętnienia lub zanieczyszczenia roztworu.

### Roztwór 2X SSC

Dokładnie wymieszać 100 mL 20X SSC z 850 mL oczyszczonej wody w odpowiednim naczyniu. Zmierzyć pH w temperaturze pokojowej za pomocą pehametru, aby sprawdzić, czy pH wynosi  $7,0 \pm 0,2$ . Jeśli zajdzie taka potrzeba, doprowadzić pH do tej wartości przy użyciu 1N NaOH. Dodać oczyszczoną wodę do uzyskania końcowej objętości 1 litra. Wymieszać i przefiltrować przez filtr o wielkości porów wynoszącej 0,45 µm. Przygotowany roztwór wyjściowy przechowywać w temperaturze pokojowej. Roztwór wyjściowy wylać po upływie 6 miesięcy lub wcześniej w przypadku stwierdzenia śladów zmętnienia lub zanieczyszczenia roztworu.

### Roztwór płuczący 0,4X SSC/0,3% NP-40

Dokładnie wymieszać 20 mL roztworu 20X SSC i 950 mL oczyszczonej wody w odpowiednim naczyniu. Dodać 3 mL NP-40 i dokładnie wymieszać aż do całkowitego rozpuszczenia NP-40. Zmierzyć pH w temperaturze pokojowej za pomocą pehametru i doprowadzić je do wartości 7,0 do 7,5 przy użyciu 1 N NaOH. Dodać oczyszczoną wodę do uzyskania końcowej objętości 1 litra. Wymieszać i przefiltrować przez filtr o wielkości porów wynoszącej 0,45 µm. Przygotowany roztwór wyjściowy przechowywać w temperaturze pokojowej. Roztwór wyjściowy wylać po upływie 6 miesięcy lub wcześniej w przypadku stwierdzenia śladów zmętnienia lub zanieczyszczenia roztworu. Roztwór używany w badaniu wymieniać po każdym dniu pracy.

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

Używając odpowiedniego naczynia, dokładnie wymieszać 100 mL roztworu 20X SSC z 850 mL oczyszczonej wody. Dodać 1 mL NP-40 i dokładnie wymieszać aż do całkowitego rozpuszczenia NP-40. Zmierzyć pH w temperaturze pokojowej za pomocą pehametru i doprowadzić je do wartości  $7,0 \pm 0,2$  przy użyciu 1 N NaOH. Dodać oczyszczoną wodę do uzyskania końcowej objętości 1 litra. Wymieszać i przefiltrować przez filtr o wielkości porów wynoszącej 0,45 µm. Przygotowany roztwór wyjściowy przechowywać w temperaturze pokojowej. Roztwór wyjściowy wylać po upływie 6 miesięcy lub wcześniej w przypadku stwierdzenia śladów zmętnienia lub zanieczyszczenia roztworu. Roztwór używany w badaniu wymieniać po każdym dniu pracy.

## Pobranie i przygotowanie próbki do analizy

Limfocyty powinny być poddane hodowli, zebrane, utrwalone i umieszczone na szkiełkach mikroskopowych zgodnie z procedurami klasycznego badania cytogenetycznego.<sup>11</sup>

## Przygotowanie obszaru docelowego próbki

**Uwaga:** Przed zakończeniem czynności opisanych w kroku 4. rozpocząć procedurę Automatycznej denaturacji/hybrydyzacji sondy, aby zapewnić odpowiednią ilość czasu na rozmrożenie się materiałów.

1. Przenieść roztwór 2X SSC do kominka do barwienia.
2. Przed użyciem przenieść kominek do barwienia zawierający roztwór 2X SSC do gorącej łaźni wodnej na około 30 minut, aby upewnić się, że roztwór osiągnie temp.  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ .
3. Przy użyciu skalibrowanego termometru sprawdzić, czy temperatura roztworu 2X SSC wynosi  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ .
4. Zanurzyć dojrzałe już preparaty w roztworze 2X SSC o temp.  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  na 30 minut.
5. Przy użyciu pęsety wyjąć preparaty z roztworu 2X SSC, niezwłocznie przenieść je do kominków do barwienia zawierających 70% EtOH na co najmniej 2 minuty i poruszać nimi wewnątrz kominków przez 1 do 3 sekund. Po zanurzeniu preparatów w 70% EtOH przenieść je do kominków do barwienia zawierających 85% EtOH na co najmniej 2 minuty, a następnie do kominków zawierających 100% EtOH na co najmniej 2 minuty.

**Uwaga:** W każdym kominku nie zanurzać więcej niż czterech preparatów równocześnie.

6. Preparaty pozostawić do wyschnięcia.
7. Po odwodnieniu preparatu w EtOH można go umieścić na płycie grzejnej o temp.  $56^\circ\text{C}$  ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ) przez maksymalnie 2 minuty, aby zapewnić całkowite wysuszenie preparatu przed nałożeniem sondy.

**Uwaga:** Zostawić preparat(y) w 100% EtOH do momentu, w którym będzie możliwe wysuszenie wszystkich preparatów i nałożenie mieszaniny sondy.

## Automatyczna denaturacja/hybrydyzacja sondy

1. Wyjąć sondę(y) DNA, bufor hybrydyzacyjny LSI/WCP oraz oczyszczoną wodę z miejsca przechowywania i pozostawić je do czasu, aż osiągną temperaturę pokojową.
2. Mieszać sondę(y) DNA oraz próbki z buforem hybrydyzacyjnym LSI/WCP przy użyciu worteksu przez 2 do 3 sekund, a następnie wirować przez 2 do 3 sekund.
3. Przełączyć 7 µL bufora hybrydyzacyjnego LSI/WCP, 2 µL oczyszczonej wody oraz 1 µL sondy DNA do próbki mikrowirowniczej o poj. 1,5 mL.
4. Mieszaninę ponownie krótko zmieszać na worteksie i odwirować.
5. Przy użyciu pipety mikrolitrowej nałożyć 10 µL mieszaniny sondy na obszar docelowy próbki i niezwłocznie nałożyć szkiełko nakrywkowe tak, aby nie dopuścić do powstania pęcherzyków powietrza.
6. Uszczelnić szkiełko nakrywkowe przy użyciu elastycznego spojwa.
7. Przed wstawieniem preparatów umieścić dwa wkłady do kontroli wilgotności ThermoBrite® w szczeliny na pokrywie aparatu ThermoBrite. Wkłady umieścić w taki sposób, aby opierały się na wypustkach w pokrywie. Instrukcje dotyczące ponownego stosowania wkładów do kontroli wilgotności w kolejnych seriach oznaczeń, patrz Instrukcja obsługi ThermoBrite.
8. Po włożeniu wkładów do aparatu ThermoBrite nawilżyć je wodą destylowaną. Przed pierwszym użyciem każdy z wkładów nawilżyć destylowaną lub dejonizowaną wodą w objętości 8 do 10 mL.
9. Włączyć zasilanie systemu ThermoBrite Denaturation/Hybridization System („On”).

**Uwaga:** Główny wyłącznik zasilania aparatu ThermoBrite umieszczony jest na tylnym panelu. Aparat zasygnalizuje uruchomienie sygnałem dźwiękowym. Kiedy aparat osiągnie temp.  $37^\circ\text{C}$ , wyświetli się menu główne.

10. Zaprogramować aparat ThermoBrite według poniższych parametrów:

- Denat Time: 2 minuty
- Denat Temp:  $73^\circ\text{C}$
- Hyb Time: 12 do 24 godzin
- Hyb Temperature:  $37^\circ\text{C}$

Denat = denaturacja

Hyb = hybrydyzacja

11. Gdy wyświetli się odpowiedni komunikat, umieścić szkiełka na powierzchni grzejnej aparatu ThermoBrite. Delikatnie przesunąć szkiełka w kierunku środka płyty, dopasowując krawędź szkiełka zgodnie z oznaczeniami na elemencie ustawiającym szkiełka. Matowa część szkiełka powinna wystawać poza krawędź powierzchni grzejnej. Upewnić się, czy szkiełka leżą płasko i czy są prawidłowo ustawione względem oznaczeń na elemencie ustawiającym szkiełka.

**Uwaga: Jeśli hybrydyzacji poddawanych jest mniej niż 12 preparatów, należy dołożyć pustych szkiełek tak, aby razem było ich 12.**

12. Zamknąć pokrywę aparatu ThermoBrite. Cursor powinien wskazywać linię „Run a PGM”. Nacisnąć klawisz „Enter”, aby potwierdzić wskazaną opcję.

#### Procedura płukania

1. Przebrać 70 mL 0,4X SSC/0,3% NP-40 oraz 70 mL 2X SSC/0,1% NP-40 do poszczególnych kominków do barwienia. Przenieść kominek do barwienia zawierający roztwór 0,4X SSC/0,3% NP-40 do gorącej łaźni wodnej co najmniej 30 minut przed użyciem. Używać 2X SSC/0,1% NP-40 w temperaturze pokojowej. Używać roztworów wyłącznie przez 1 dzień, a następnie wylać.
2. Przy użyciu skalibrowanego termometru sprawdzić, czy temperatura roztworu 0,4X SSC/0,3% NP-40 wynosi  $73 \pm 1^\circ\text{C}$ .
3. Wyjąć szkiełka z aparatu ThermoBrite.
4. Zdjąć szkiełka nakrywkowe z preparatu i natychmiast zanurzyć preparat w 0,4X SSC/0,3% NP-40. Poruszać preparatami wewnątrz kominka do barwienia przez 1 do 3 sekund. Powtórzyć ten proces z pozostałymi szkiełkami (łącznie nie więcej niż cztery). Rozpocząć odmierzenie czasu w momencie, kiedy wszystkie cztery szkiełka są zanurzone.

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

5. Wyjąć preparaty po 2 minutach  $\pm 30$  sekundach.
6. Zanurzyć preparaty w kominku do barwienia zawierającym roztwór 2X SSC/0,1% NP-40. Poruszać preparatami wewnątrz kominka do barwienia przez 3 do 5 sekund.
7. Wyjąć preparaty z 2X SSC/0,1% NP-40, jeśli od czasu ich zanurzenia upłynęło 5 do 60 sekund.

**Uwaga: W przypadku płukania dodatkowych preparatów należy upewnić się, czy temperatura roztworu płuczącego przed płukaniem wynosi  $73 \pm 1^\circ\text{C}$ .**

#### Procedura barwienia

1. Wysuszyć każdy preparat, opierając dolną krawędź szkiełka na bibule (lub odpowiedniku) i wycierając do sucha spód szkiełka (czyli tę stronę, która nie zawiera próbki).
2. Suszyć preparaty na powietrzu, w ciemności, wzdłuż dłuższej krawędzi szkiełka, aby ułatwić odparowanie próbki oraz zapobiec nagromadzeniu się roztworu 2X SSC/0,1% NP-40 przez maksymalnie 2 godziny.
3. Wyjąć barwnik kontrastowy DAPI II z miejsca przechowywania i pozostawić go do osiągnięcia temperatury pokojowej.
4. Mieszać barwnik kontrastowy DAPI II przy użyciu wortexu przez 2 do 3 sekund, a następnie wirować przez 2 do 3 sekund.
5. Przy użyciu pipety mikrolitrowej nanieść 10  $\mu\text{L}$  barwnika kontrastowego DAPI II na każdy obszar docelowy preparatu i przykryć szkiełkami nakrywkowymi. Czynność tę powtórzyć dla każdego preparatu.
6. Przed rozpoczęciem oględzin pod mikroskopem odstawić na co najmniej 10 minut w celu umożliwienia barwienia.

#### Procedura przechowywania

Preparaty poddane hybrydyzacji przechowywać w temp.  $-20^\circ\text{C}$  ( $\pm 10^\circ\text{C}$ ) bez dostępu światła. Preparaty mogą być przechowywane przez okres do 3 tygodni po nałożeniu barwnika kontrastowego DAPI II bez znaczącej utraty intensywności fluorescencji sygnałów.

#### Badanie preparatów

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 fluoroforów...
jednopasmowy filtr zielony (Green)	fluorofor zielony (SpectrumGreen)
jednopasmowy filtr pomarańczowy (Orange)	fluorofor pomarańczowy (SpectrumOrange)
dwupasmowy filtr pomarańczowy i zielony (Orange/Green v2)	fluorofor pomarańczowy (SpectrumOrange) i zielony (SpectrumGreen)
trójpasmowy filtr - DAPI, Green oraz Orange	DAPI, fluorofor pomarańczowy (SpectrumOrange) i zielony (SpectrumGreen)

Można także stosować filtry, które pod względem parametrów optycznych stanowią odpowiednik filtrów firmy Vysis. Na przykład kostka na filtr Chroma® 82000 stosowana wraz z filtrem 82102 jest odpowiednikiem filtra Vysis Orange/Green v2.

#### Interpretacja i raportowanie wyników

##### Kontrola jakości

##### Ocena jakości preparatu

Ocenę jakości hybrydyzacji preparatu przeprowadza się na podstawie poniższych kryteriów. Jeśli kryteria te nie zostaną spełnione, preparatu nie powinno się poddawać ocenie.

- Morfologia jąder komórkowych: Granice jąder komórkowych powinny być zazwyczaj wyraźne i znajdować się w nienaruszonym stanie.
- Tło: Tło powinno być ciemne lub czarne i stosunkowo wolne od fluoryzujących zanieczyszczeń czy zamięglenia.
- Intensywność sygnału sondy: Sygnały powinny być jasne, zwarte, okrągłe lub owalne, wyraźne i łatwe do oceny.

##### Liczenie sygnałów

Przy użyciu odpowiednich filtrów podanych powyżej każdy z dwóch laborantów określa i liczy wszystkie wzory sygnałów obecne w każdym 100 jądrach komórkowych. Pierwsza osoba liczy ilość sygnałów dla jąder po lewej stronie obszaru docelowego hybrydyzacji (możliwie najdokładniej), zaś druga osoba liczy ilość sygnałów dla jąder po prawej stronie obszaru docelowego hybrydyzacji (możliwie najdokładniej). Wskazówki dotyczące liczenia sygnałów dwukolorowych, patrz Tabela 1.

- Wybierać wyłącznie nienaruszone jądra, które nie są pofałdowane, nie zachodzą na siebie ani nie są przesłonięte przez zanieczyszczenia.
- Nie liczyć preparatów lub obszarów na preparacie, które uległy nadmiernej nieswoistej hybrydyzacji lub które posiadają wiele jąder o zbyt małej liczbie sygnałów lub nieemitujących żadnych sygnałów.
- Nie liczyć jąder z sygnałami zlepionymi lub niewyraźnymi.
- W danym jądrze intensywność sygnałów o tym samym kolorze może być różna. Dlatego też może być konieczne użycie odpowiedniego filtra jednopasmowego i/lub dostrojenie płaszczyzny ogniskowej.
- Stykające się sygnały o tym samym kolorze liczyć jako jeden sygnał, bez względu na wielkość. Jeżeli oddzielne sygnały są połączone niewielkim pasmem sygnału, takie sygnały liczyć jako jeden sygnał.
- Jeżeli jakakolwiek komórka wzbudza wątpliwości, czy należy ją policzyć, nie liczyć takiej komórki.



**Tabela 1. Wskazówki dotyczące liczenia sygnałów dwukolorowych**

Legenda: ○ = sygnał zielony

● = sygnał pomarańczowy

1		Nie liczyć. Jądra komórkowe zachodzą na siebie i całkowite obszary obu jąder komórkowych nie są widoczne.
2		Liczyć jako jeden sygnał pomarańczowy i jeden zielony. Sygnał pomarańczowy jest rozmyty.
3		Nie liczyć. Jądra znajdują się zbyt blisko siebie, aby określić ich granice.
4		Liczyć jako jeden sygnał pomarańczowy i jeden zielony. Sygnał pomarańczowy jest rozszczepiony.
5		Liczyć jako jeden sygnał pomarańczowy i dwa sygnały zielone. Jeden sygnał zielony jest rozszczepiony i sygnał pomarańczowy jest rozszczepiony.
6		Liczyć jako dwa sygnały pomarańczowe i dwa sygnały zielone.
7		Liczyć jako trzy sygnały pomarańczowe i dwa sygnały zielone.
8		Liczyć jako cztery sygnały pomarańczowe i trzy sygnały zielone.

### Ograniczenia stosowania

Każde laboratorium powinno ustalić analityczną wartość normy dla punktu odcięcia (*cut-off*) dla każdego żadanego wzoru sygnału nieprawidłowego.<sup>12</sup>

Interpretacja wyników FISH powinna być dokonana przy użyciu stosownych kontroli i technik analitycznych, biorąc pod uwagę dane kliniczne i diagnostyczne.<sup>12</sup>

### Ograniczenia procedury

- Zestaw sond Vysis MDM2/CEP 12 FISH Probe Kit jest przeznaczony do stosowania w połączeniu z oznaczeniami dodatkowych biomarkerów, wynikami morfologii oraz innymi wynikami badań klinicznych.
- Jeśli dla danej próbki uzyskano niewielką ilość nieprawidłowych wzorów znakowania FISH, zaleca się, aby zastosować odpowiedni filtr jednopasmowy w celu potwierdzenia uzyskanego wyniku. W wyniku niezastosowania się do powyższego zalecenia może dojść do niedokładnej identyfikacji sygnałów.

### Oczekiwane rezultaty

Oczekiwanym wzorem sygnałów dla zestawów jąder komórkowych lub chromosomów metafazowych bez amplifikacji genu MDM2 są dwa sygnały pomarańczowe i dwa sygnały zielone. W przypadku amplifikacji genu MDM2 można uzyskać więcej niż dwa sygnały pomarańczowe, zaś w przypadku amplifikacji centromeru 12 można uzyskać więcej niż dwa sygnały zielone. W szczególności w przypadkach nietypowych wzorów sygnałów FISH w jądrach interfazowych podczas interpretacji wyników przydatna może być analiza metafaz metodą FISH.<sup>12</sup>

### Szczegółowa charakterystyka testu

#### Analityczna czułość i swoistość metafaz

Swoistość analityczna zdefiniowana jest jako odsetek sygnałów emitowanych przez sondy, które hybrydują do prawidłowego *locus* i nie hybrydują do żadnego innego miejsca. Czułość analityczna zdefiniowana jest jako odsetek obszarów docelowych chromosomów, dla których uzyskano oczekiwany wzór sygnałów.

Wartości swoistości analitycznych sond Vysis LSI MDM2 SpectrumOrange/CEP 12 SpectrumGreen dla odpowiadających im docelowych *loci* chromosomów zostały wyznaczone z użyciem chromosomów metafazowych przygotowanych z próbek krwi obwodowej pochodzących z hodowli pięciu preparatów o prawidłowym kariotypie. Miejsce hybrydyzacji dla każdego sygnału FISH na chromosomach 20 kolejnych jąder metafazowych na każdym z pięciu preparatów oceniono łącznie dla 200 *loci* docelowych.

Dla każdej sondy i badanej próbki zliczono ilość sygnałów FISH w chromosomach metafazowych, w których doszło do hybrydyzacji do prawidłowego *locus*, oraz ilość sygnałów FISH w chromosomach metafazowych, w których doszło do hybrydyzacji do nieprawidłowego *locus*.

Swoistość każdej sondy obliczono jako ilość sygnałów FISH uzyskanych w chromosomach metafazowych, w których doszło do hybrydyzacji do prawidłowego *locus*, podzieloną przez całkowitą ilość sygnałów FISH uzyskanych w chromosomach metafazowych poddanych hybrydyzacji, pomnożoną przez 100 w celu uzyskania wartości procentowej.

Wartości swoistości analitycznych sond Vysis LSI MDM2 SpectrumOrange oraz CEP 12 SpectrumGreen wyniosły 100%, jak pokazano w Tabeli 2.

Czułość każdej sondy obliczono jako ilość sygnałów FISH uzyskanych w chromosomach metafazowych, w których doszło do hybrydyzacji do prawidłowego *locus*, podzieloną przez łączną liczbę 200 docelowych *loci*, pomnożoną przez 100 w celu uzyskania wartości procentowej. Czułość analityczna sond Vysis LSI MDM2 SpectrumOrange oraz CEP 12 SpectrumGreen wyniosła 100%, jak pokazano w Tabeli 2.

**Tabela 2. Wyniki czułości i swoistości**

Liczba sygnałów w chromosomach metafazowych						
Sonda	Prawidłowy obszar docelowy do badania cyto-genetycznego	Ocze-kiwana	Hybrydyzacja do prawidłowego	Hybrydyzacja do nieprawidłowego	Czułość (%)	Swoistość (%)
			docelowego <i>locus</i>	docelowego <i>locus</i>		
MDM2	12q15	200	200	0	100	100
CEP12	12p11.1-q11	200	200	0	100	100

### Charakterystyka działania

Charakterystykę działania oceniono, badając szkiełka z prawidłowym i nieprawidłowym materiałem kontrolnym. Przebadano trzy nieprawidłowe (kontrola dodatnia ProbeChek) oraz trzy prawidłowe preparaty (jedna kontrola ujemna ProbeChek, jeden preparat prawidłowych męskich limfocytów i jeden preparat prawidłowych żeńskich limfocytów). Dla każdego badanego preparatu zliczono uzyskane wzory sygnałów z 200 nadających się do oceny jąder interfazowych. Każdy preparat był oceniany przez dwie osoby, z których każda dokonywała zliczeń dla 100 jąder, co łącznie dało liczbę zliczeń dla 200 jąder.

Tabela 3 przedstawia zakres od najniższej do najwyższej liczby zliczeń na 200 jąder dla każdego wzoru podanego w tabeli (bez uwzględnienia wszystkich zaobserwowanych wzorów sygnałów).\*

**Tabela 3. Zakres zaobserwowanych zliczeń (dla 200 jąder)**

Sygnał	2R2G	3R3G
prawidłowy nr 1	168-187	0-4
prawidłowy nr 2	182-187	2-4
prawidłowy nr 4	184-195	0-1
nieprawidłowy nr 3	159-163	11-29
nieprawidłowy nr 5	159-164	22-29
nieprawidłowy nr 6	152-163	11-28

\* Dane reprezentatywne. Wyniki uzyskane w poszczególnych laboratoriach mogą różnić się od podanych wartości.

## Piśmiennictwo

1. Chène P. Inhibiting the p53-MDM2 interaction: an important target for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(2):102-9.
2. Dewald GW, Brockman SR, Paternoster SF, et al. Chromosome anomalies detected by interphase fluorescence in situ hybridization: correlation with significant biological features of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Br J Haematol*. 2003;121(2):287-95.
3. Fink SR, Paternoster SF, Smokey SA, et al. Fluorescent-labeled DNA probes applied to novel biological aspects of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res*. 2005;29(3):253-62.
4. Nelson BP, Gupta R, Dewald GW, Paternoster SF, Rosen ST, Peterson LC. Chronic lymphocytic leukemia FISH panel: impact on diagnosis. *Am J Clin Pathol*. 2007;128(2):323-32.
5. Shanafelt TD, Witzig TE, Fink SR, et al. Prospective evaluation of clonal evolution during long-term follow-up of patients with untreated early-stage chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 2006;24(28):4634-41.
6. Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, et al. The human genome browser at UCSC. *Genome Res*. 2002;12(6):996-1006.
7. 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 rozdział III oraz IV.]
8. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration. 29 CFR Part 1910.1030. *Bloodborne Pathogens*.
9. 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.
10. World Health Organization. *Laboratory Biosafety Manual*. 3rd ed. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2004.
11. Barch MJ, Knusten T, Spurbeck JL. *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual*. 3rd ed. Philadelphia, PA: Lippincott-Raven Publishers; 1997.
12. Wiktor AE, Van Dyke DL, Stupca PJ, et al. Preclinical validation of fluorescence in situ hybridization assays for clinical practice. *Genet Med*. 2006;8(1):16-23.

## 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>.

E-mail: [molecularsupport@abbott.com](mailto:molecularsupport@abbott.com)


Zestaw sond Vysis MDM2/CEP 12 Probe Kit oraz inne sondy DNA FISH znakowane bezpośrednio są chronione amerykańskim patentem o nr 5 491 224 przyznany firmie Abbott Molecular. Znakowane bezpośrednio fluorescencyjne sondy LSI firmy Vysis są chronione patentami amerykańskimi o nr RE40 494, 6 596 479, 7 115 709, 5 756 696 oraz 6 607 877 przyznanymi firmie Abbott Molecular Inc. na mocy wyłącznej licencji przez *The Regents of the University of California*.

CEP, LSI, WCP, Vysis, SpectrumGreen oraz SpectrumOrange są znakami towarowymi grupy spółek firmy Abbott podlegających różnym jurysdykcjom.

Wszystkie pozostałe znaki towarowe stanowią własność poszczególnych firm.

 Abbott Molecular Inc.  
1300 E. Touhy Ave.  
Des Plaines, IL 60018 USA



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

© 2011, 2020 Abbott. Wszelkie prawa zastrzeżone.

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

czerwiec 2020

