

# Vysis TP53/CEP 17 FISH Probe Kit

pl

Vysis TP53/CEP 17 FISH Probe Kit

**REF** 05N56-020

**G24230R04**

**B5N56P**

**UWAGA:** Zmiany wyróżniono kolorem szarym.

**Objaśnienia użytych symboli**

	Producent
<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 (± 5°C).
	Zagrożenie biologiczne
	Niebezpieczeństwo
	Uwaga: Sprawdź w dołączonej dokumentacji.
	Użyć przed
	Zajrzyj do instrukcji używania.
<b>EC REP</b>	Upoważniony przedstawiciel w krajach Wspólnoty Europejskiej

## Przewidziane zastosowanie

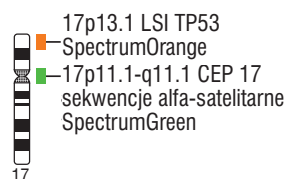
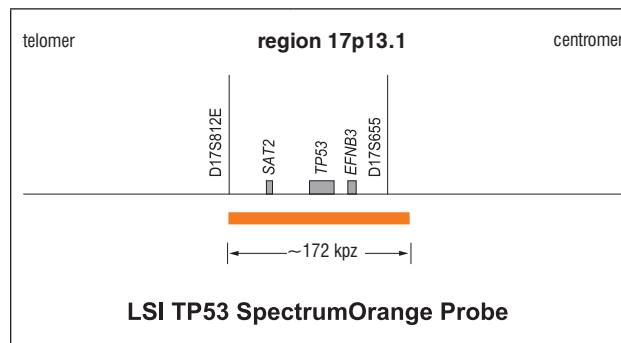
Zestaw sond Vysis TP53/CEP 17 FISH Probe Kit przeznaczony jest do wykrywania liczby kopii sekwencji docelowych sondy LSI TP53 zlokalizowanych na chromosomie 17p13.1 oraz sekwencji docelowych sondy CEP 17 zlokalizowanych na centromerze chromosomu 17.

## Wprowadzenie

Powtarzającą się delecją, która występuje w wielu typach białaczek, takich jak przewlekła białaczka limfatyczna (CLL) czy szpiczak mnogi, jest utrata obszaru 17p13 stanowiąca niekorzystny czynnik rokowniczy zarówno w przypadku przewlekłej białaczki limfatycznej (CLL), jak i szpiczaka.<sup>1,2</sup> Połączenie sond LSI TP53/CEP 17 używane jest do wykrywania utraty regionu TP53 w badaniach nad przewlekłą białaczką limfatyczną (CLL) oraz szpiczakiem.<sup>3-5</sup>

## Opis sondy

Wyznakowana na pomarańczowo (SpectrumOrange) sonda TP53 o wielkości około 172 kbp zawiera cały gen TP53 i jest zlokalizowana na chromosomie 17p13.1 (chr17:7435119-7606823 March 2006 UCSC Browser). Wyznakowana na zielono (SpectrumGreen) sonda CEP 17 jest sondą kontrolną, która hybrydyzuje do regionu centromerowego chromosomu 17p11.1-q11.1.



## Odczynniki

### 1. Vysis LSI TP53 SpectrumOrange Probe/CEP 17 SpectrumGreen Probe (nr części: 30-231062)

(1 fiołka, 20 µL w jednej fiołce). 450 ng/µL, sonda DNA znakowana fluoroforem oraz blokujące DNA w Tris-EDTA.

### 2. Vysis LSI/WCP Hybridization Buffer (nr części: 30-804826)

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

## Zasady przechowywania

Zestaw sond Vysis TP53/CEP 17 FISH Probe Kit należy przechowywać w temp. -20°C (± 5°C) bez dostępu światła.

## Warunki transportowania

Zestaw sond Vysis TP53/CEP 17 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 TP53 SpectrumOrange/CEP 17 SpectrumGreen

**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 tego typu 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 (*Standard on Bloodborne Pathogens*),<sup>8</sup> w dokumencie CLSI M29-A3<sup>9</sup> oraz innych równoważnych wytycznych.<sup>10</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>7</sup>
- Wszystkie potencjalnie zakaźne materiały odkazić, a następnie usuwać zgodnie z lokalnymi, jak i ogólnokrajowymi przepisami.<sup>10</sup>

#### Bufor Vysis LSI/WCP Hybridization Buffer



##### Niebezpieczeństwo

**Składniki warunkujące stopień zagrożenia umieszczone na etykiecie:** formamid

H360D	Może działać szkodliwie na dziecko w tonie matki.
P201	Przed użyciem zapoznać się ze specjalnymi środkami ostrożności.
P202	Nie używać przed zapoznaniem się i zrozumieniem wszystkich środków bezpieczeństwa.
P281	Stosować wymagane środki ochrony indywidualnej.
P308+P313	W PRZYPADKU narażenia lub styczności: Zasięgnąć porady/zgłosić się pod opiekę lekarza.
P405	Przechowywać pod zamknięciem.
P501	Usuwać produkt i jego opakowanie w bezpieczny sposób.

**Oświadczenie dotyczące karty charakterystyki:** Ważne informacje dotyczące bezpiecznego obchodzenia się z produktem, jego transportu i usuwania zawarte są w karcie charakterystyki.

**UWAGA:** Karty charakterystyki dla wszystkich odczynników zawartych w zestawie są dostępne na życzenie u przedstawiciela firmy Abbott Molecular.

#### 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 płuczający 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 płuczający 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 LSI DNA:** Sonda LSI DNA powinna być przechowywana w temp. -20 °C (±5 °C) bez dostępu światła.

**Degradacja:** Fluorofory szybko ulegają degradacji pod wpływem światła. 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 odczynników rozmrażać w temperaturze otoczenia, a następnie każdą probówkę odwirować przez 2 do 3 sekund w standardowej, wysokoobrotowej mikrowirówce.

##### 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 przy użyciu standardowych procedur cytoogenetycznych.

#### Procedura

##### Wymagane materiały

- Vysis LSI TP53 SpectrumOrange Probe/CEP 17 SpectrumGreen FISH Probe
- Vysis LSI/WCP Hybridization Buffer

##### Materiały wymagane, lecz niedostarczone

- 12N HCl (do regulacji pH roztworów płuczających)
- 1N NaOH (do regulacji pH roztworów płuczających)
- 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
- Odtuszczone 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 3 kominki do barwienia:** Do jednego kominka wlać 70 mL 100% etanolu, do drugiego - 70 mL 85% etanolu, a do trzeciego - 70 mL 70% etanolu. Używać w temperaturze otoczenia. Wylać po 7 dniach lub w przypadku nadmiernego rozcieńczenia bądź wyparowania roztworu.

Dla uzyskania optymalnego rezultatu 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 szklane zawierające roztwór do denaturacji doprowadzić do temperatury otoczenia. Przed użyciem umieścić kominki do barwienia z roztworem w łaźni wodnej o temp. 73 ± 1 °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 4 preparaty równocześnie. Jeśli barwionych jest mniej niż 4 preparaty, należy dołożyć pustych szkiełek o temperaturze otoczenia tak, aby razem było ich 4.
2. Zanurzyć preparaty w roztworze do denaturacji na 5 minut.  
**UWAGA: W jednym kominku do barwienia nie należy zanurzać więcej niż 4 preparaty równocześnie.**
3. Odwodnić preparaty przez 1 minutę w 70% etanolu, następnie przez 1 minutę w 85% etanolu i 1 minutę w 100% etanolu.  
**UWAGA: Zostawić preparaty w 100% etanolu do momentu, w którym będzie możliwe wysuszenie wszystkich preparatów i nałożenie mieszaniny sondy.**

#### Przygotowanie mieszaniny sondy

1. Składniki dla poszczególnych obszarów docelowych dodawać kolejno do próbki mikrowirowniczej w temperaturze otoczenia:  
7  $\mu\text{L}$  buforu hybrydacyjnego 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  $\mu\text{L}$  każdej sondy. Dodać oczyszczoną wodę do otrzymania łącznej objętości sondy i wody równej 3  $\mu\text{L}$ .**
2. Probówkę poddać wirowaniu przez 1 do 3 sekund.
3. Wytząsnąć na wórkę 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  $50^\circ\text{C}$  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 wytożenie hermetycznego pojemnika na preparaty papierowym ręcznikiem nasączonym wodą. Umieścić w inkubatorze o temp.  $37^\circ\text{C}$ .**

1. Wyjąć preparaty ze 100% etanolu.
  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  $50^\circ\text{C}$  na maksymalnie 2 minuty dla odparowania resztek etanolu.
  4. Nałożyć 10  $\mu\text{L}$  mieszaniny sondy na jeden docelowy region 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 nagrzanym 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 preparatów

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

Przygotowanie roztworów płuczających:

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

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

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 następnych 4 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. Poruszać preparatami przez 1 do 3 sekund. Wyjąć preparaty po upływie od 5 sekund do 1 minuty.

#### Wizualizacja hybrydyzacji

1. Wysuszyć preparaty na powietrzu, w ciemności.
  2. 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 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, fluorofor jasnoniebieski (SpectrumAqua), zielony (SpectrumGreen) oraz pomarańczowy (SpectrumOrange)

**Przechowywanie:** Preparaty przechowywane w temp.  $-20^\circ\text{C}$  ( $\pm 5^\circ\text{C}$ ) i chronione przed dostępem światła mogą być badane przez co najmniej 3 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, 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 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 dodawać kolejno do próbki mikrowirowniczej w temperaturze otoczenia:  
7  $\mu\text{L}$  buforu hybrydacyjnego 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  $\mu\text{L}$  każdej sondy. Dodać oczyszczoną wodę do otrzymania łącznej objętości sondy i wody równej 3  $\mu\text{L}$ .**

2. Probówkę poddać wirowaniu przez 1 do 3 sekund.
3. Wytząsnąć na wórkę 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 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 hybrydyzacji. 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 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.

#### Ograniczenia stosowania

Interpretacja wyników FISH powinna być dokonana przy użyciu stosownych kontroli i technik analitycznych, biorąc pod uwagę dane kliniczne i diagnostyczne.<sup>6</sup>

Każde laboratorium powinno ustalić analityczną wartość normy dla punktu odcięcia (*cut-off*) dla żądanego wzoru sygnału nieprawidłowego.

#### Oczekiwane rezultaty

W komórce z prawidłową liczbą kopii sekwencji docelowych sond LSI TP53/CEP 17 oczekiwanym wzorem sygnałów są 2 sygnały pomarańczowe i 2 sygnały zielone. W komórce z delecją TP53 można zaobserwować 1 sygnał pomarańczowy i 2 sygnały zielone. Mogą pojawić się też inne wzory sygnałów nieprawidłowych FISH i przy ich interpretacji przydatna może być analiza metafaz.

#### 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"> <li>• 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.</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 hybrydyzacji.</li> <li>• Podwyższyć temperaturę denaturacji. Jeśli będzie to konieczne, kontynuować podwyższanie temperatury aż do uzyskania akceptowalnej morfologii.</li> <li>• Wypłukać preparaty w 0,4X SSC/0,3% NP-40 w temp. 70 do 73°C.</li> </ul>

Problem	Możliwe rozwiązanie
Sygnał rozproszony ( <i>speckling</i> )	<p>Powtórzyć hybrydyzację, 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: Jeśli będzie to konieczne, zredukować temperaturę lub czas denaturacji aż do uzyskania sygnału o akceptowalnej intensywności.</b></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 inną 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: Jeśli będzie to konieczne, zredukować temperaturę lub czas denaturacji aż do uzyskania sygnału o akceptowalnej intensywności.</b></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 preparaty w serii płukaw w etanolu (70%, 85%, 100%) po 1 minucie.</li> <li>5. Wysuszyć szkiełka na powietrzu i kontynuować <b>przygotowanie preparatu do procedury kodenaturacji</b>.</li> </ol> </li> <li>• Jeśli morfologia metafaz nie poprawiła się, należy zmodyfikować procedurę użycia aparatu ThermoBrite: <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Przygotować 280 µL roztworu do denaturacji 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 70% formamid / 2X SSC na każdy obszar docelowy i przykryć szkiełkiem nakrywkowym.</li> <li>4. Gdy aparat ThermoBrite osiągnie temp. 73°C, umieścić szkiełka 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 <b>przygotowywania próbki docelowej</b> 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 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 próbek. 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 próbek	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 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 $50^\circ\text{C}$ przed denaturacją lub odwodnić preparaty, płuczac je w etanolu (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 nakrapianiem zawiesiny dokładnie wyczyścić szkiełka, zanurzając je w etanolu, a następnie dokładnie wytrzeć ściereczką bezpyłową.
	Resztki komórek na preparacie	Trzykrotnie przemyć peletkę komórek świeżym utrwalcaczem 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 do 10 minut.
	Nieodpowiedni sposób płukania preparatów po hybrydyzacji	Upewnić się, czy roztwory płuczające 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. $2$ do $8^\circ\text{C}$ . 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 $74^\circ\text{C}$ . 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 protokoły opisujące sposób przygotowania próbek 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 odwodnić preparaty, płuczac je w etanolu (70%, 85%, 100%) kolejno po 1 minucie.
	Materiał był uprzednio barwiony metodą GTG.	Użycie preparatów uprzednio barwionych do badania FISH z użyciem trypsyny i barwnika Giemsa może wymagać korekty procedury barwienia i/lub protokołu hybrydyzacji. Dalsze informacje dotyczące barwienia przed wykonanie badania 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 <b>UWAGA:</b> <b>Nie dotyczy sond zawieszonych w buforze hybrydyzacyjnym i zdenaturowanych.</b>	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 etanolu. 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 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 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.)	Nieprawidłowe warunki hybrydyzacji	Upewnić się, czy zastosowano wymagany czas i temperaturę hybrydyzacji. Upewnić się, czy temperatura inkubatora wynosi $37^\circ\text{C}$ . Dobrze uszczelnić szkiełko nakrywkowe przy użyciu spoiwa elastycznego, nie pozostawiając luk. Wydłużyć czas hybrydyzacji.
	Nieprawidłowe warunki płukania lub roztwory płuczające	Upewnić się, czy roztwory płuczające zostały wykonane zgodnie z zaleceniami podanymi w instrukcji używania. Upewnić się, czy temperatura roztworów płuczających podczas płukania była właściwa. Upewnić się, czy termometry i pehametry są prawidłowo skalibrowane. Usunąć szkiełko nakrywkowe przed zanurzeniem preparatu w roztworze płuczającym.
	Sondy lub badane próbki były przechowywane w niewłaściwych warunkach.	Nierozcieńczoną sondę przechowywać w temp. $-20^\circ\text{C}$ ( $\pm 5^\circ\text{C}$ ) bez dostępu światła. Preparaty niepoddane hybrydyzacji i odwodnione można przechowywać w temp. $-20^\circ\text{C}$ ( $\pm 5^\circ\text{C}$ ) przez dłuższy czas, a w temperaturze pokojowej przez krótki czas. Preparaty poddane hybrydyzacji przechowywać w temp. $-20^\circ\text{C}$ ( $\pm 5^\circ\text{C}$ ) 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 etanolu (70%, 85%, 100%) 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 hybrydyzacyjnego.
	Zbyt niska temperatura płukania	Utrzymywać stałą temperaturę kąpeli w roztworach płuczających przez umieszczanie w jednym kominku nie więcej niż 4 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. <b>UWAGA: Im niższe stężenie soli (SSC), tym wyższe stężenie formamidu i NP-40, a tym samym wzmożone działanie roztworu płuczającego.</b>
Jaskrawy lub blade 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 etanolu (70%, 85%, 100%) po 1 minucie. Wysuszyć preparat na powietrzu i ponownie nałożyć barwnik kontrastowy.
	Niewłaściwe stężenie barwnika kontrastowego <b>UWAGA: Barwnik DAPI I jest 8 razy bardziej stężony niż barwnik DAPI II.</b>	Jeśli barwienie jest zbyt jaskrawe, przed nałożeniem na preparat rozcieńczyć barwnik roztworem przeciwdziałającym wyświetaniu (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 (± 5 °C) bez dostępu światła, również podczas stosowania. Upewnić się, czy nie minęła data ważności barwnika.

## Piśmiennictwo

- Shanafelt T, Geyer SM, and Kay NE. Prognosis at diagnosis: integrating molecular biologic insights into clinical practice for patients with CLL. *Blood*. 2004;103(4):1202-10.
- Avet-Loiseau H, Attal M, Moreau P, et al. Genetic abnormalities and survival in multiple myeloma: the experience of the Intergrupee Francophone du Myélome. *Blood*. 2007;109(8):3489-95.
- 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 leukaemia. *Br J Haematol*. 2003;121:287-95.
- Grever MR, Lucas DM, Dewald GW, et al. Comprehensive assessment of genetic and molecular features predicting outcome in patients with chronic lymphocytic leukemia: results from the US Intergrupee Phase III Trial E2997. *J Clin Oncol*. 2007;25(7):799-804.
- Fonseca R, Blood E, Rue M, et al. Clinical and biologic implications of recurrent genomic aberrations in myeloma. *Blood*. 2003;101(11):4569-75.
- Wiktor AE, Van DL, Stupca 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*, Fifth Edition. Washington, DC: US Government Printing Office, December 2009.
- US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration, 29 CFR Part 1910.1030, Occupational Safety and Health Standards: Bloodborne Pathogens.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Clinical Laboratory Waste Management: Approved Guideline—Third Edition*. CLSI Document GP5-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS): Wayne, PA; 2011.
- World Health Organization. *Laboratory Biosafety Manual*, Geneva: World Health Organization, 2004.


## Pomoc techniczna:

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


Zestaw sond Vysis LSI TP53/CEP 17 FISH Probe Kit oraz wiele innych bezpośrednio znakowanych sond DNA FISH jest chronionych patentem amerykańskim o nr 5 491 224 przyznany firmie Abbott Molecular. Bezpośrednio znakowane sondy fluorescencyjne Vysis LSI są chronione następującymi patentami amerykańskimi: RE 40 494, 6 596 479, 7 115 709, 5 756 696 oraz 6 607 877 przyznanymi na mocy wyłącznej licencji firmie Abbott Molecular Inc. przez *The Regents of the University of California*.

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.  
1300 East Touhy Avenue  
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](http://www.abbottmolecular.com)  
maj 2020