

Vysis CCND1 Break Apart FISH Probe Kit

pl

Vysis CCND1 Break Apart FISH Probe Kit

REF 5N38-20

49-7503/R02

B5N38P

Objaśnienia użytych symboli



Wytwórca



Numer katalogowy



Kod partii



Wyrób medyczny do diagnostyki *in vitro*



Przechowywać w temp. -20°C lub niższej.



Uwaga: Sprawdź w dołączonej dokumentacji.



Data ważności



Przechowywać w ciemności.



Sprawdź w ulotce.



Autoryzowany przedstawiciel

Przeznaczenie

Dwukolorowa sonda rearanżacyjna typu *break apart* do fluorescencyjnej hybrydacji *in situ* CCND1 Dual Color Break Apart Rearrangement Probe przeznaczona jest do wykrywania rearanżacji chromosomowych, które zachodzą w obszarze genu Cyclin D1 (CCND1) na chromosomie 11q13.

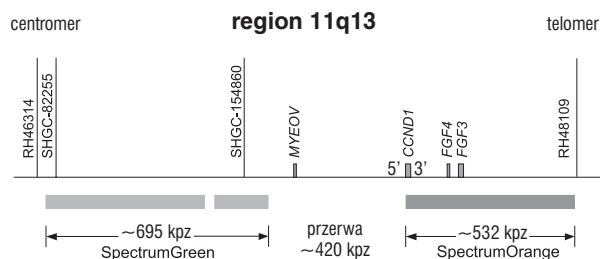
Wprowadzenie

Chłoniak z komórek płaszczka (ang. *mantle cell lymphoma*, MCL) jest agresywną formą chłoniaka z komórek B i najczęściej charakteryzuje się nadekspresją genu CCND1, spowodowaną translokacją t(11;14) (q13;q32).¹ Stwierdzono, że nadekspresja genu CCND1, wynikająca z nieprawidłowości chromosomowych, takich jak translokacje, lub przyrostu danego obszaru, występuje w szpiczaku mnogim (ang. *multiple myeloma*, MM) oraz chłoniaku z komórek płaszczka (MCL).² Sondę CCND1 Dual Color Break Apart Rearrangement Probe zastosowano przy identyfikacji rearanżacji w regionie pęknięć genu CCND1 w przypadku chłoniaka z komórek płaszczka (MCL).³

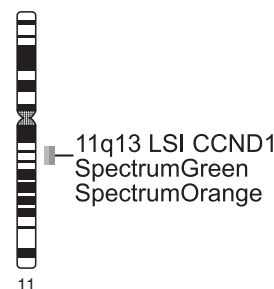
Opis sondy

Wyznakowana na zielono (SpectrumGreen) sonda jest zlokalizowana centromerycznie względem genu CCND1 i obejmuje obszar o wielkości około 695 kbp (chr11:68042961-68737635; March 2006 assembly)⁴ z obszarem niewyznakowanym (przerwą) o długości około 30 kbp (chr11:68539031-68568590; March 2006 assembly)⁴.

Wyznakowana na pomarańczowo (SpectrumOrange) sonda obejmuje obszar o wielkości około 532 kbp (chr11:69162485-69694376; March 2006 assembly)⁴ i pokrywa gen CCND1.



LSI CCND1 Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe



Odczynniki

1. Vysis LSI CCND1 Dual Color Break Apart Rearrangement Probe (nr części: 30-231031)

(1 fiołka, 20 µl w jednej fiołce). 225 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).

Karty charakterystyki substancji niebezpiecznych (MSDS) dla wszystkich zawartych w zestawie odczynników są dostępne w Dziale Obsługi Klienta firmy Abbott Molecular.

Zasady przechowywania

Zestaw sond Vysis CCND1 Break Apart FISH Probe Kit należy przechowywać w temp. -20°C, bez dostępu światła.

Warunki transportowania

Zestaw sond Vysis CCND1 Break Apart 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 Działem Obsługi Klienta firmy Abbott Molecular.

Ostrzeżenia i środki ostrożności

IVD Wyrób medyczny do diagnostyki *in vitro*

Wyłącznie do diagnostyki *in vitro*

Bufor hybrydacyjny Vysis LSI/WCP został zaklasyfikowany według stosownych dyrektyw Wspólnoty Europejskiej (WE) jako: toksyczny (T) i drażniący (Xi). Jego użycie związane jest z czynnikami ryzyka (R) i wymaga zachowania zasad bezpieczeństwa (S):



- R41 Ryzyko poważnego uszkodzenia oczu.
R61 Może spowodować uszkodzenia płodu.
S45 W przypadku awarii lub wystąpienia złego samopoczucia należy niezwłocznie zasięgnąć porady lekarza - jeśli to możliwe, pokazać etykiety.
S53 Unikać narażenia - przed użyciem zapoznać się z instrukcją.

Przygotowanie odczynników

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

Roztwór 20X SSC

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

Roztwór płuczący 2X SSC/0,1% NP-40

Dokładnie wymieszać 100 ml roztworu 20X SSC (pH 5,3) z 850 ml oczyszczonej wody. Dodać 1 ml NP-40. Dokładnie wymieszać do całkowitego rozpuszczenia NP-40. Zmierzyć pH i doprowadzić je do wartości 7,0 ± 0,2 przy użyciu NaOH. Dodać oczyszczoną wodę do uzyskania końcowej objętości 1 litra. Wymieszać i przefiltrować przez filtr o wielkości porów 0,45 µm. Przechowywać w temperaturze otoczenia. Roztwór wyjściowy wylać po upływie 6 miesięcy lub wcześniej w przypadku stwierdzenia śladów zmętnienia lub zanieczyszczenia roztworu.

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

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

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

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

Roztwór płuczący 2X SSC/0,3% NP-40

Dokładnie wymieszać 100 ml roztworu 20X SSC (pH 5,3) z 850 ml oczyszczonej wody. Dodać 3 ml NP-40. Dokładnie wymieszać do całkowitego rozpuszczenia NP-40. Zmierzyć pH i doprowadzić je do wartości 7,0 do 7,5 przy użyciu NaOH. Dodać oczyszczoną wodę do uzyskania końcowej objętości 1 litra. Wymieszać i przefiltrować przez filtr o wielkości porów 0,45 µm. Przechowywać w temperaturze otoczenia. Roztwór wyjściowy wylać po upływie 6 miesięcy lub wcześniej w przypadku stwierdzenia śladów zmętnienia lub zanieczyszczenia roztworu.

Przechowywanie sondy LSI DNA: Sonda LSI DNA powinna być przechowywana w temp. -20 °C lub niższej, 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 przeemywania, należy przeprowadzać w ciemności.

Uwagi dotyczące procedury: Przed użyciem wszystkie odczynniki powinny zostać rozmrożone w temperaturze otoczenia, a następnie każdą próbkę należy odwirować przez 2-3 sekundy w standardowej, wysokoobrotowej mikrowirówce.

Pobranie i przygotowanie próbki do analizy

Utrwalone w formalinie i zatopione w parafinie próbki tkanek należy umieścić na szkiełkach z zastosowaniem standardowych procedur. W celu przygotowania próbek zatopionych w parafinie do analizy FISH próbki należy odparafinować i poddać obróbce wstępnej w celu optymalizacji penetracji tkanki oraz hybrydyzacji z użyciem standardowych procedur.

Procedura

Wymagane materiały

- Vysis LSI CCND1 Dual Color Break Apart Rearrangement Probe
- Vysis LSI/WCP Hybridization Buffer

Materiały wymagane, lecz niedostarczone

- 12N HCl (do ustalenia pH roztworów płuczących)
- 1N NaOH (do ustalenia pH roztworów płuczących)
- Szklane kominki (naczynia Coplina)
- Skalibrowany termometr
- Pęseta
- Cylinder miarowy (1000 ml)
- Mieszadło magnetyczne
- Etanol
- Mikrowirówka
- Końcówki do pipet mikrolitrowych o zakresie od 1 do 10 µl
- Pipeta mikrolitrowa o zakresie od 1 do 10 µl
- pHmetr
- Odtłuszczone szkiełka mikroskopowe
- Oczyszczona woda
- Minutnik
- Wyrząsarka laboratoryjna (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 szklane: Do jednego kominka wlać 70 ml 100% EtOH, do drugiego - 70 ml 85% EtOH, a do trzeciego - 70 ml 70% EtOH. Używać w temperaturze otoczenia. Wylać po 7 dniach lub w przypadku nadmiernego rozcieńczenia bądź wyparowania roztworu.

Dla uzyskania optymalnego rezultatu należy upewnić się, czy odczynniki zostały przygotowane i są używane w odpowiednich temperaturach podanych w ulotce.

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. Umieścić kominki z roztworem w łaźni wodnej o temp. 73 ± 1 °C na ok. 30 minut przed użyciem w celu doprowadzenia roztworu do wymaganej temperatury.

1. Upewnić się, czy temperatura roztworu do denaturacji wynosi 73 ± 1 °C. Aby utrzymać właściwą temperaturę roztworu do denaturacji, należy zanurzać cztery preparaty równocześnie. Jeśli barwione są mniej niż cztery preparaty, należy dołożyć puste szkiełka o temperaturze otoczenia tak, aby razem było ich cztery.
2. Zanurzyć preparaty w roztworze do denaturacji na 5 minut.
UWAGA: Do jednego kominka nie należy wkładać więcej niż cztery preparaty równocześnie.
3. Odwoźnić 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. Składniki dla poszczególnych obszarów docelowych dodawać kolejno do próbki mikrowirowniczej w temperaturze otoczenia:
 - 7 µl buforu hybrydyzacyjnego LSI/WCP
 - 1 µl sondy
 - 2 µl oczyszczonej wody**UWAGA:** W celu przeprowadzenia równoczesnej hybrydyzacji dwóch lub trzech sond, każdej znakowanej innym fluoroforem, należy dodać 1 µl każdej sondy. Dopełnić oczyszczoną wodą w celu otrzymania wspólnej objętości sondy i wody równej 3 µl.
2. Probówkę poddać wirowaniu przez 1 do 3 sekund.
3. Zmieszać na wyrząsarce laboratoryjnej (typu worteks) i ponownie odwirować.
4. Umieścić probówkę w łaźni wodnej o temp. 73 ± 1 °C na 5 minut.
5. Wyjąć probówkę z łaźni wodnej.

- Umieścić probówkę na płycie grzejnej rozgrzanej do temp. 45 do 50 °C do momentu, w którym będzie możliwe nałożenie sondy na badane, docelowe DNA.
UWAGA: Jeśli preparaty są już gotowe w momencie zdenaturowania sondy, można zaaplikować sondę na docelowe DNA bezpośrednio po jej denaturacji.

Hybrydyzacja sondy do próbki docelowej

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

- Wyjąć preparaty ze 100% EtOH.
- Wysuszyć preparaty, opierając dolną krawędź szkiełka na bibule i wycierając do sucha spód szkiełka ręcznikiem papierowym.
- Umieścić preparaty na płycie grzejnej o temp. 45-50 °C dla odparowania resztek EtOH.
- Nałożyć 10 µl mieszaniny sondy na wybrany, docelowy region preparatu i natychmiast przykryć szkiełkiem nakrywkowym. Powtórzyć te czynności dla kolejnych obszarów docelowych.
- Uszczelnić szkiełko nakrywkowe przy użyciu elastycznego spoiwa.
- 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 hybrydyzacji.

Płukanie preparatów

Przygotowanie roztworów płuczących:

- Wlać 70 ml 2X SSC/0,3% NP-40 do kominka szklanego. Umieścić kominiek w łaźni wodnej o temp. 73 ± 1 °C co najmniej 30 minut przed użyciem. Zużyć przygotowany roztwór tego samego dnia, resztę usunąć.
- Wlać 70 ml 2X SSC/0,1% NP-40 do kominka szklanego. Używać w temperaturze otoczenia. Zużyć przygotowany roztwór tego samego dnia, resztę usunąć.

UWAGA: Aby utrzymać właściwą temperaturę w roztworze 2X SSC/0,3% NP-40, należy płukać cztery preparaty równocześnie. Jeśli barwione są mniej niż cztery preparaty, należy dołożyć puste szkiełka o temperaturze otoczenia tak, aby razem było ich cztery.

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

- Usunąć spoiwo z preparatu, minimalnie poruszając szkiełko nakrywkowe, a następnie zanurzyć preparat w 2X SSC/0,1% NP-40. Powtórzyć ww. czynności z pozostałymi preparatami. Preparaty pozostawić w roztworze na 2 do 5 minut, aby szkiełka samoczynnie odstawały od preparatu.
- Zanurzyć szkiełko w 2X SSC/0,3% NP-40. Poruszać preparatami przez 1 do 3 sekund. Powtórzyć ww. czynności z pozostałymi preparatami.
- Wyjąć preparaty po 2 minutach.

UWAGA: Przed rozpoczęciem płukania następnych czterech szkiełek należy upewnić się, czy temperatura roztworu płuczącego wynosi 73 ± 1 °C.

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

Wizualizacja hybrydyzacji

- Wysuszyć preparaty na powietrzu, w ciemności.
- Nanieść 10 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 hybrydyzacji.

| Użycie filtra Vysis... | pozwala na równoczesne wzbudzenie i emisję fluoroforów... |
|------------------------|--|
| DAPI/Orange | DAPI i spektrum pomarańczowe (SpectrumOrange) |
| DAPI/Green | DAPI i spektrum zielone (SpectrumGreen) |
| Aqua/Green/Orange | spektrum jasnoniebieskie (SpectrumAqua), spektrum zielone (SpectrumGreen) i spektrum pomarańczowe (SpectrumOrange) |

| | |
|------------------------|--|
| DAPI/Orange/Green | DAPI, spektrum pomarańczowe (SpectrumOrange) i spektrum zielone (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 przynajmniej przez trzy tygodnie po hybrydyzacji.

Zastosowanie kodenaturacji

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

Warunki kodenaturacji zalecane w publikacjach są zróżnicowane w zakresie temperatury i czasu, w zależności od specyficznego zastosowania oraz typu badanej próbki. Opisanie 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 zastosowania osobnej denaturacji próbki badanej i jej odwodnienia przed nałożeniem sondy.

Przygotowanie preparatu do kodenaturacji

- Składniki dla poszczególnych obszarów docelowych dodawać kolejno do próbki mikrowirowniczej w temperaturze otoczenia:
7 µl buforu hybrydyzacyjnego LSI/WCP
1 µl sondy
2 µl oczyszczonej wody
- UWAGA:** W celu przeprowadzenia równoczesnej hybrydyzacji 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.
- Probówkę poddać wirowaniu przez 1 do 3 sekund.
- Zmieszać na wytrząsarce laboratoryjnej (worteks) i ponownie odwirować.
- Nałożyć 10 µl mieszaniny sondy na preparat i natychmiast przykryć szkiełkiem nakrywkowym.
- Uszczelnić szkiełko nakrywkowe przy użyciu elastycznego spoiwa.

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 ulotce.

- 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.
- Ustawić temperaturę hybrydyzacji (*Hyb Temp*) na 37 °C, zaś czas hybrydyzacji (*Hyb Time*) - od 4 godzin do hybrydyzacji całonocnej.
- Po upływie czasu hybrydyzacji wypłukać preparaty z zastosowaniem szybkiej procedury płukania.
- Wysuszyć preparaty na powietrzu, w ciemności.
- 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 prawidłowym wzorem sygnału dla sondy Vysis CCND1 Dual Color Break Apart Rearrangement Probe są dwa sygnały fuzyjne. Translokacje, których wynikiem jest separacja sondy, mogą powodować powstanie jednego sygnału pomarańczowego, jednego sygnału zielonego i jednego sygnału fuzyjnego lub dwóch sygnałów pomarańczowych i dwóch sygnałów zielonych. Na utratę genu może także wskazywać jeden sygnał fuzyjny bez sygnału pomarańczowego czy zielonego. Analogicznie na zwiększenie liczby kopii genu mogą wskazywać wielokrotne sygnały fuzyjne. Mogą pojawić się też inne nieprawidłowe wzory sygnałów. Przy ich interpretacji przydatna może być analiza metafaz.

Ograniczenia stosowania

W przypadku analizy interfazy każde laboratorium powinno ustalić analityczną wartość normy dla punktu odcięcia (*cut-off*) dla żądanego wzoru sygnału nieprawidłowego.⁵

Wyniki sprawiające problemy w teście z kodenaturacją

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

| Problem | Możliwe rozwiązanie |
|---|--|
| Hybrydyzacja krzyżowa | Powtórzyć analizę z inną próbką, stosując jedną z poniższych modyfikacji: <ul style="list-style-type: none"> Podwyższyć temperaturę 2X SSC/0,3% NP-40 o 2 °C. W razie potrzeby kontynuować podwyższanie temperatury do czasu uzyskania akceptowanej intensywności sygnału. Obniżyć temperaturę denaturacji o 2 °C. |
| Słaby sygnał sondy | Powtórzyć analizę z inną próbką, stosując jedną z poniższych modyfikacji: <ul style="list-style-type: none"> Wydłużyć czas hybrydyzacji. Podwyższyć temperaturę denaturacji. Jeśli będzie to konieczne, kontynuować podwyższanie temperatury do czasu uzyskania zadowalającej morfologii. Wypłukać preparaty w 2X SSC/0,3% NP-40 w temp. 70 do 73 °C. |
| Sygnał rozproszony (<i>speckling</i>) | Powtórzyć hybrydyzację, stosując jedną z poniższych modyfikacji: <ul style="list-style-type: none"> Obniżyć temperaturę denaturacji o 2 °C. Skrócić czas denaturacji. <p>UWAGA: W razie potrzeby redukować temperaturę lub czas denaturacji do czasu uzyskania sygnału o akceptowanej intensywności.</p> <ul style="list-style-type: none"> Wypłukać preparaty w 2X SSC/0,3% NP-40 w temp. 73 do 76 °C. |
| Zła morfologia metafaz | Powtórzyć analizę z inną próbką, stosując jedną z poniższych modyfikacji: <ul style="list-style-type: none"> Obniżyć temperaturę denaturacji o 2 °C. Skrócić czas denaturacji. <p>UWAGA: W razie potrzeby redukować temperaturę lub czas denaturacji do czasu uzyskania sygnału o akceptowanej intensywności.</p> <ul style="list-style-type: none"> Preparaty poddać obróbce wstępnej: <ol style="list-style-type: none"> Przygotować roztwór 2X SSC/1% paraformaldehydu. Zanurzyć szkiełka w roztworze 2X SSC/1% paraformaldehydu na 1 minutę. Zanurzyć szkiełka kilka razy w oczyszczonej wodzie. Odwodnić szkiełka w szeregu EtOH (70%, 85%, 100%) po 1 minucie. Wysuszyć szkiełka i kontynuować procedurę przygotowania preparatu do kodenaturacji. |

| Problem | Możliwe rozwiązanie |
|-------------------------------|--|
| Zła morfologia metafaz (c.d.) | <ul style="list-style-type: none"> Jeśli morfologia metafaz nie poprawiła się, należy zmodyfikować użycie systemu ThermoBrite: <ol style="list-style-type: none"> Przygotować 280 µl roztworu do denaturacji 70% formamid/2X SSC (196 µl formamidu/28 µl 2X SSC/56 µl oczyszczonej wody). Uruchomić program <i>ThermoBrite Hold Temp</i> z temperaturą ustawioną na 73 °C. Umieścić 10 µl roztworu do denaturacji 70% formamid/2X SSC na każdy obszar docelowy i przykryć szkiełkiem nakrywkowym. Gdy system ThermoBrite osiągnie temp. 73 °C, należy umieścić szkiełka na powierzchni grzejnej. Zamknąć pokrywę. Wyjąć preparaty po 3 minutach. Usunąć szkiełko nakrywkowe. 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 niezadowalające rezultaty, jakie można uzyskać, stosując sondy LSI. Lista zawiera prawdopodobne przyczyny i sugestie, które mogą poprawić jakość uzyskanych wyników.

| Problem | Prawdopodobna przyczyna | Możliwe rozwiązanie |
|---------------------------------------|---|---|
| Zniekształcona morfologia chromosomów | Zbyt szybko wysuszone preparaty z naniesionym materiałem w trakcie przygotowywania | Podnieść temperaturę łaźni wodnej (następuje zwiększenie wilgotności) podczas nakapkiwania 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 ulotce. Upewnić się, czy temperatura roztworu do denaturacji przed zanurzeniem preparatów wynosi 73 ± 1 °C; obniżyć temperaturę do 72 °C. Skrócić czas denaturacji o 1 do 3 minut. |
| | Preparaty z naniesionym materiałem nie zostały całkowicie wysuszone przed zanurzeniem w roztworze do denaturacji. | Ogrzać preparaty do temp. 45 do 50 °C przed denaturacją lub odwodnić preparaty, płuczac je w szeregu EtOH (70%, 85%, 100%) po 1 minucie. |
| | Denaturacji poddano zbyt świeży materiał. | Pozostawić preparaty na co najmniej 24 godziny w temperaturze otoczenia, aby dojrzały. |

| Problem | Prawdopodobna przyczyna | Możliwe rozwiązanie |
|----------------------------------|--|---|
| Silne tło widoczne na preparacie | Szkiełka nie były dostatecznie odtłuszczone przed przygotowaniem preparatów. | Przed nakraplaniem zawiesiny dokładnie wyczyścić szkiełka, zanurzając je 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. |
| | Metafazy o dobrym rozproszeniu dojrzewały przez prażenie lub zawierają cytoplazmę. | Wydłużyć czas zanurzenia preparatu w roztworze do denaturacji preparatu do 10 minut. |
| | Nieodpowiedni sposób płukania preparatów po hybrydyzacji | Upewnić się, czy roztwory płuczące zostały wykonane zgodnie z zaleceniami podanymi w ulotce. Upewnić się, czy pH i temperatura roztworów płuczających są właściwe. Usunąć szkiełko nakrywkowe. Powtórzyć procedurę płukania. |
| | Roztwory płuczące były używane zbyt długo lub przechowywane w niewłaściwych warunkach. | Upewnić się, czy roztwory płuczące zawierające formamid są przechowywane w temp. 4 °C. Nie używać po upływie 7 dni lub w przypadku częstego stosowania. Usuwać 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 szklanym przed zanurzeniem preparatów wynosi 73 ± 1 °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 Działem Obsługi Klienta firmy Abbott Molecular, aby uzyskać protokół opisujący 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. |

| Problem | Prawdopodobna przyczyna | Możliwe rozwiązanie |
|--------------------------------------|--|--|
| Słaby sygnał lub brak sygnału (c.d.) | 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 odwozić preparaty, płuczając je w szeregu EtOH (70%, 85%, 100%) po 1 minucie. |
| | Materiał był uprzednio barwiony dla uzyskania prążków G. | Użycie preparatów uprzednio barwionych dla uzyskania prążków G może wymagać korekty procedury barwienia GTG i/lub protokołu hybrydyzacji. Dalsze informacje dotyczące tej procedury można uzyskać w Dziale Obsługi Klienta firmy Abbott Molecular. Ewentualnie wykonać preparatykę FISH na świeżym materiale. |
| | Sonda nie została dodana. | Przygotować nową mieszaninę sondy. Pozwolić, aby sonda całkowicie się rozmroziła. Wymieszać składniki na wytrząsarce laboratoryjnej lub używając pipety; krótko odwirować. Powoli pipetować sondę. |
| | Sonda, bufor hybrydyzacyjny lub mieszanina sondy nie były dobrze wymieszane przed użyciem. | Wymieszać składniki na wytrząsarce laboratoryjnej lub używając pipety; krótko odwirować. |
| | 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 pokojową. Pipetować powoli. |
| | 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 ± 1 °C. Denaturować sondę przez 5 minut. |

| Problem | Prawdopodobna przyczyna | Możliwe rozwiązanie |
|--------------------------------------|--|--|
| Słaby sygnał lub brak sygnału (c.d.) | 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% EtOH. Upewnić się, czy etanol został odparowany z preparatu przed nałożeniem sondy. Bezpośrednio po wyjęciu z łaźni wodnej o temp. $73 \pm 1^{\circ}\text{C}$ umieścić probówkę z mieszaniną sondy na płycie grzejnej o temp. 45 do 50°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 pohybrydizacyjnym 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. |
| | Nieodpowiednie warunki hybrydyzacji | Upewnić się, czy zastosowano wymagany czas i temperaturę hybrydyzacji. Upewnić się, czy temperatura w inkubatorze wynosi 37°C . Uszczelnić szkiełko nakrywkowe, nie pozostawiając luk. Wydłużyć czas hybrydyzacji. |
| | Nieprawidłowe warunki płukania lub roztwory płuczające | Upewnić się, czy roztwory płuczające zostały wykonane zgodnie z zaleceniami podanymi w ulotce. Upewnić się, czy temperatura roztworów płuczających podczas płukania była właściwa. Upewnić się, czy termometr i pHmetr są prawidłowo skalibrowane. |

| Problem | Prawdopodobna przyczyna | Możliwe rozwiązanie |
|--------------------------------------|--|--|
| Słaby sygnał lub brak sygnału (c.d.) | Nieprawidłowe warunki płukania lub roztwory płuczające (c.d.) | Usunąć szkiełko nakrywkowe przed zanurzeniem preparatu w roztworze płuczającym. |
| | Sondy lub badane próbki były przechowywane w niewłaściwych warunkach. | Nierozcieńczoną sondę należy przechowywać w temp. -20°C lub niższej, bez dostępu światła. Preparaty niepoddane hybrydyzacji i odwodnione można przechowywać w temp. -20°C lub niższej przez dłuższy czas, a w temperaturze otoczenia przez krótki czas. Preparaty poddane hybrydyzacji przechowywać do 3 tygodni w temp. -20°C lub niższej, bez dostępu światła. |
| | Użyty niewłaściwy barwnik kontrastowy Zbyt jaskrawy barwnik kontrastowy | Usunąć szkiełko nakrywkowe. Zanurzyć preparat na 5 minut w 2X SSC/0,1% NP-40 w temperaturze otoczenia; odwodnić preparat w szeregu EtOH (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. Użyć filtra właściwego dla zastosowanego fluoroforu. Dla uzyskania dalszych informacji skontaktować się z Działem Obsługi Klienta firmy Abbott Molecular. |
| | Konfiguracja mikroskopu lub obiektywów nie jest odpowiednia dla obserwacji rezultatów barwienia FISH lub filtry w mikroskopie są uszkodzone. | Skontaktować się z producentem mikroskopu. |
| Niska specyficzność sygnału | Sondy nieprawidłowo rozcieńczone; często zbyt duża ilość sondy w oznaczeniu. | Upewnić się, czy mieszanina sond została wykonana zgodnie ze wskazówkami podanymi w ulotce. |
| | Nieodpowiednie warunki hybrydyzacji | Upewnić się, czy temperatura w inkubatorze wynosi 37°C . Upewnić się, czy do mieszaniny sond dodano odpowiednią ilość buforu hybrydizacyjnego. |

| Problem | Prawdopodobna przyczyna | Możliwe rozwiązanie |
|--|--|---|
| Niska specyficzność sygnału (c.d.) | Zbyt niska temperatura płukania | Utrzymywać stałą temperaturę kąpeli w roztworach płuczających przez umieszczanie w kominku nie więcej niż czterech preparatów równocześnie; przed zanurzeniem następnej partii preparatów upewnić się, czy temperatura roztworu płuczającego jest prawidłowa. |
| | Za słabo działa roztwór płuczający. | Upewnić się, czy roztwory płuczające zostały wykonane zgodnie z zaleceniami podanymi w ulotce. UWAGA: Im niższe stężenie soli (SSC), tym wyższe stężenie formamidu i NP-40, a tym samym wzmożone działanie roztworu płuczającego. |
| Jaskrawy lub błady barwnik kontrastowy | Barwnik kontrastowy wygląda błado: próbka nie została całkowicie odwodniona przed nałożeniem barwnika lub olejek dostał się do barwnika. | Usunąć szkiełko nakrywkowe. Zanurzyć preparat na 5 minut w 2X SSC/0,1% NP-40 o temperaturze otoczenia; odwodnić preparat w szeregu EtOH (70%, 85%, 100%) po 1 minucie. Wysuszyć preparat na powietrzu i ponownie nałożyć barwnik kontrastowy. |
| | Niewłaściwe stężenie barwnika kontrastowego | Jeśli barwienie DAPI jest zbyt jaskrawe, przed nałożeniem na preparat rozcieńczyć barwnik roztworem przeciwdziałającym wyświecaniu (ang. <i>antifade solution</i> , nr kat. 06J29-010). |
| | Barwnik kontrastowy jest przeterminowany lub był zbyt długo poddany na działanie światła. | Barwnik przechowywać w temp. -20 °C lub niższej, chronić przed działaniem światła, również podczas stosowania. Upewnić się, czy nie minęła data ważności barwnika. |

Bibliografia

- Williams ME, Dreyling MH, Kahl BS, et al. Mantle cell lymphoma: report of the 2009 Mantle Cell Lymphoma Consortium Workshop. *Leukemia & Lymphoma*. 2010;51(3):390-8.
- Liebisch P, Döhner H. Cytogenetics and molecular cytogenetics in multiple myeloma. *Eur J Cancer*. 2006;42(11):1520-9.
- Bzorek M Sr, Petersen BL, Hansen L. Simultaneous phenotyping and genotyping (FICTION-methodology) on paraffin sections and cytologic specimens: a comparison of 2 different protocols. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2008;16(3):279-86.
- 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.

Pomoc techniczna:

W przypadku problemów technicznych prosimy o kontakt z Działem Obsługi Klienta firmy Abbott w Polsce pod numerem telefonu: (+48) 22 319 12 00 lub o odwiedzenie strony internetowej Abbott Molecular pod adresem <http://www.abbottmolecular.com>.

Sonda Vysis LSI CCND1 Dual Color Break Apart Rearrangement Probe objęta jest patentem europejskim EP 0 549 709 B1 przyznanym firmie Abbott Molecular.

CEP, LSI, WCP, Vysis, SpectrumGreen, SpectrumOrange, SpectrumAqua, SpectrumBlue, SpectrumGold oraz ThermoBrite są znakami towarowymi spółek należących do firmy Abbott podlegających różnym jurysdykcjom. Wszystkie pozostałe znaki towarowe stanowią własność poszczególnych firm.



Abbott Molecular Inc.
Des Plaines, IL 60018 USA



Abbott GmbH & Co. KG
Max-Planck-Ring 2
65205 Wiesbaden
Germany
+49-6122-580



© 2010 Abbott Laboratories
www.abbottmolecular.com
grudzień 2010