



ZytoLight

FISH-Tissue Implementation Kit

REF	Z-2028-5	Σ	5
REF	Z-2028-20	Σ	20

Fluoreszcens *in situ* hibridizációhoz (FISH) *ZytoLight* FISH próba alkalmazása esetén



In vitro diagnosztikai orvosi eszköz
a 98/79 / EK EU irányelv szerint

1. Javasolt alkalmazás

A *ZytoLight* FISH-Tissue Implementation Kit reagens készlet a *ZytoLight* FISH próbák alkalmazásával genetikai eltérések, mint pl. transzlokációk, deléciók, amplifikációk és kromoszóma aneuploidiak kimutatására használható formalinnal fixált, paraffinba ágyazott minták fluoreszcens *in situ* hibridizáció (FISH) vizsgálata során

Az eredmények értelmezését a beteg klinikai kórtörténetével összevetve kell elvégezni képzett patológus további klinikopatológiai véleményének figyelembe vételével.

2. Klinikai jelentőség

Genetikai eltérések, aberrációk mint pl. transzlokációk, deléciók és/vagy amplifikációk különböző humán daganatos megbetegedésekhez kapcsolhatók. Számos veleszületett rendellenességben figyelhetők meg a különböző kromoszómák aneuploidái.

3. Vizsgálati módszer

A fluoreszcens *in situ* hibridizáció (FISH) technika lehetővé teszi sejt preparátumok specifikus nukleinsav szekvenciáinak kimutatását és megjelenítését. A fluoreszcensen jelölt DNS fragmensek, úgynevezett FISH próbák vagy szondák és azok komplementer cél-DNS szálai a készítményekben együttesen denaturálódnak, majd a hibridizálás során összekapcsolódnak. Ezután a nem specifikus és a nem kötődött próba darabok magas stringenciájú mosási lépésekkel kerülnek eltávolításra. A DNS DAPI háttérfestését követően a hibridizált szonda fragmentumok a közvetlenül rájuk kapcsolt specifikus fluorokrom molekulák segítségével excitációs és emissziós szűrőkkel felszerelt fluoreszcens mikroszkóppal vizualizálhatók.

4. Mellékelt reagensok

A *ZytoLight* FISH-Tissue Implementation Kit készlet tartalma:

Kód	Összetevő	Mennyiség		Tároló
		5	Σ 20	
PT1	<u>Heat Pretreatment Solution Citric</u>	150 ml	500 ml	Csavar-tetős üveg (nagy)
ES1	<u>Pepsin Solution</u>	1 ml	4 ml	Cseppentő üveg, fehér tetővel
WB1	<u>Wash Buffer SSC</u>	210 ml	560 ml	Csavar-tetős üveg (nagy)
WB2	<u>25x Wash Buffer A</u>	50 ml	2x50 ml	Csavar-tetős üveg (közepes)
MT7	<u>DAPI/DuraTect-Solution</u>	0.2 ml	0.8 ml	Reakció tartály, kék tetővel
	Használati útmutató	1	1	

Z-2028-5 (5 teszt): Az **ES1** és az **MT7** összetevők 5 reakcióhoz elegendőek. A **WB2** összetevő 5x3db 70ml-es festőedénybe elegendő. A **PT1** összetevő 2db 70ml-es festőedénybe elegendő. A **WB1** komponens 3db 70ml-es festőedénybe elegendő.

Z-2028-20 (20 teszt): Az **ES1** és az **MT7** összetevők 20 reakcióhoz elegendőek. A **WB2** összetevő 11x3db 70ml-es festőedénybe elegendő. A **PT1** összetevő 7db 70ml-es festőedénybe elegendő. A **WB1** komponens 8db 70ml-es festőedénybe elegendő.

5. Szükséges, de nem biztosított anyagok

- *ZytoLight* FISH próba
- Pozitív és negatív kontrol minták
- Pozitívra töltött tárgylemezek
- Vízfürdők (37°C, 98°C)
- Hibridizációs kamra vagy fűtőblokk
- Hibridizációs pára kamra
- Szabályozható pipetták (10 µl, 25 µl)
- Festőedények vagy fürdők
- Időzítő
- Kalibrált hőmérő
- Etanol
- Xilol
- Desztillált vagy ionmentesített víz
- Fedőlemezek (22 mm x 22 mm, 24 mm x 60 mm)
- Gumicement pl., Fixogum Rubber Cement (Kat. Szám. E-4005-50/-125) vagy hasonló ragasztó
- Megfelelően karbantartott fluoreszcens mikroszkóp (400-1000x)
- Fluoreszcens mikroszkópiához elfogadott immerziós olaj
- Megfelelő fluoreszcencia szűrő készletek

6. Tárolás és kezelés

A reagens készlet összetevőit 2-8°C között szükséges tárolni. A DAPI/DuraTect-Solution (MT7) fénytől védve tárolandó. Felhasználást követően azonnal a tárolási feltételek alkalmazandók. A tárolási feltételek betartása esetén a készlet teljesítmény-csökkenés nélkül működik a címkén feltüntetett lejárati ideig. Ne használja reagenseket a címkén feltüntetett lejárati időn túl.

7. Figyelmeztetések és óvintézkedések

- Használat előtt olvassa el a használati utasítást!
- Ne használja a reagenset a lejárati idő letelte után!
- Ez a termék olyan anyagokat tartalmaz (kis koncentrációban és térfogatban), amelyek az egészségre károsak és potenciálisan fertőzők. Kerülje a közvetlen érintkezést a reagenssel. Tegyen megfelelő védőintézkedéseket (használjon eldobható kesztyűt, védőszemüveget és laboratóriumi öltözetet)!
- Ha a reagens bőrrel érintkezik, azonnal öblítse le bő vízzel!
- Foglalkozásszerű felhasználók részére igény esetén anyagbiztonsági adatlapot biztosítunk.
- A reagens nem újra felhasználható.

- A mintákat ne hagyja kiszáradni a hibridizáció és a mosási lépések során!
- A DAPI/DuraTect-Solution (MT7) nem tehető ki fénynek, különösen hosszú időn keresztül tartó erős fénynek, azaz a lépéseket lehetőleg sötétben és/vagy a fényt kizáró tárolókban szükséges elvégezni!

Veszélyességi és óvintézkedésre vonatkozó utasítások a PT1, WB1 és WB2 összetevők esetében:

A veszélyt jelentő összetevő az alábbiak keveréke: 5-klór-2-metil-4-izotiazolin-3-on [EC. 247-500-7] és 2-metil-2H-izotiazol-3-on [EC. 220-239-6] (3: 1).



Figyelem

H317	Allergiás bőrreakciót válthat ki.
P261	Kerülje a por/füst/gáz/köd/gőzök/permet belélegzését.
P272	Szennyezett munkaruhát tilos kivinni a munkahely területéről.
P280	Védőkesztyű/védőruha/szemvédő/arcvédő használata kötelező.
P302+P352	HA BŐRRE KERÜL: Lemosás bő vízzel.
P333+P313	Bőrirritáció vagy kiütések megjelenése esetén: orvosi ellátást kell kérni.
P362+P364	A szennyezett ruhadarabot le kell vetni és újbóli használat előtt ki kell mosni.

8. Korlátozások

- *In vitro* diagnosztikai használatra.
- Csak szakképzett felhasználók részére.
- A pozitív reakció meglétének vagy hiányának klinikai értelmezését a klinikai kórtörténet, morfológia, egyéb hisztopatológiai kritériumok, valamint más diagnosztikai vizsgálatok függvényében végezze. A szakképzett patológus felelőssége a reakciók elkészítéséhez szükséges FISH szondák, reagensek, diagnosztikai panelek és módszerek megfelelő ismerete. A FISH festést egy hitelesített, szükséges engedélyekkel rendelkező laboratóriumban kell végezni, patológus felügyelete mellett, aki felelős a festett lemezek áttekintéséért és a megfelelő pozitív és negatív kontrol reakciók biztosításáért.
- A minta festése, különösen a jelintenzitás és a háttérfestés erőssége a festést megelőző mintakezeléstől és feldolgozástól függ. A minta nem megfelelő fagyasztása, felolvasztása, mosása, szárítása, melegítése vagy más mintákkal és folyadékokkal való keresztzennyezése műtermékek vagy hamis eredmények kialakulásához vezethet.
- A reagens teljesítménye a jelen használati utasításban leírt eljárások alkalmazásával került validálásra. Ezen eljárások módosítása a teljesítmény megváltozását okozhatja, amit a felhasználónak validálnia szükséges.

9. Interferenciát kiváltó anyagok

A mintában jelen lévő vörösvértestek autofluoreszcenciát mutathatnak akadályozva a megfelelő jelfelismerést.

Az alábbi fixálószer nem alkalmazhatóak FISH reakcióhoz:

- Bouin fixáló
- B5 fixáló
- Savas fixálószer (pl. pikrinsav)
- Zenker fixáló
- Alkohokok (önmagukban használva)
- Higanyklorid
- Formaldehid/cink fixáló
- Hollandé fixáló
- Nem pufferolt formalin

10. A minták előkészítése

Ajánlások:

- Fixálja a mintát 10%-os semlegesre pufferelt formalinban 24 órán át szobahőmérsékleten (18-25°C-on).
- A minta mérete $\leq 0.5 \text{ cm}^3$ legyen.
- Prémium minőségű paraffint használjon.
- A beágyazást 65°C alatti hőmérsékleten hajtsa végre.
- 2-4 μm vastagságú metszeteket készítsen.
- Pozitívan töltött tárgylemezeket használjon.
- Fixálja a metszetet a lemezre 2-16 órán át 50-60°C-os hőmérsékleten.

11. A reagensek előkészítése

A 25x mosó puffer (WB5) reagentst a 12. "A vizsgálati eljárás" utasításai szerint előkészíteni. A készlet többi reagense felhasználásra kész. Nincs szükség feloldásra, keverésre vagy hígításra.

12. Vizsgálati eljárás

12.1 1. nap

Előkészítő lépések

- (1) *Készítsen két etanol-sorozatot (70%, 90%, és 100% etanol-sorozat):* Hígítson 100%-os etanolt ionmentesített vagy desztillált vízzel. Ezek az oldatok megfelelő tárolóedényekben eltárolhatók és újra felhasználhatók
- (2) *Heat Pretreatment Solution Citric (PT1):* Melegítse elő 98°C-ra.
- (3) *Wash Buffer SSC (WB1):* Szobahőmérsékletre (RT) hozni.
- (4) *ZytoLight FISH Probe:* Használat előtt szobahőmérsékletre hozni és fénytől óvni.

Opcionális, amennyiben utó-fixálást végez:

(erősen ajánlott, ha a szövet rögzítése nem megfelelő)

Készítsen 1%-os Formaldehid oldatot a Formaldehyde Dilution Buffer Set készlet (PT-0006-100) használatával.

Előkezelés (deparaffinálás/proteolízis)

- (1) Inkubálja a lemezeket 10 percig 70°C-on (pl. fűtőblokkon).
- (2) Inkubálja a lemezeket xilolban 2x 10 percig.
- (3) Inkubáljon 100%, 100%, 90%, és 70% etanol-sorozatban, mindegyikben 5 percig.
- (4) Mossa a lemezeket 2x 2 percig ionmentesített vagy desztillált vízzel.
- (5) Inkubálja a lemezeket 15 percig az előmelegített Heat Pretreatment Solution Citric (PT1) reagensben 98°C-on.

Javasoljuk, hogy ne használjon egyszerre több mint nyolc lemezt festő edényenként.

- (6) Azonnal tegye át a tárgylemezeket ionmentesített vagy desztillált vízbe, mossa 2x 2 percig és folyassa le rólok a vizet.
- (7) Adjön (csepegtetve) Pepsin Solution (ES1) reagentst a mintákhoz és inkubálja őket párakamrában 15 percig 37°C-on.

Több tényezőből pl. a rögzítés jellegéből és időtartamától, a metszetek vastagságától és a szövet/sejtek jellegéből függően különböző inkubációs időkre lehet szükség. Iránymutatásként 2-30 perc inkubációs időt javasolunk a szövetmintákhoz és 2-15 percet a sejtmintákhoz. Általános szabályként azt javasoljuk, hogy elő vizsgálatokban ellenőrizze a proteolízis optimális idejét.

- (8) Mossa meg a lemezeket 5 percig Wash Buffer SSC (WB1) reagensben.

Opcionális, amennyiben utó-fixálást végez:

Inkubálja a lemezeket 15 percig 1%-os Formaldehid oldatban és ezt követően mossa meg 5 percig Wash Buffer SSC (WB1) reagensben.

- (9) Mossa a lemezeket 1 percig ionmentesített vagy desztillált vízzel.
- (10) Dehidratálás: 70%, 90% és 100% etanolban, mindegyikben 1 percig.
- (11) Szárítás levegőn.

Megjegyzés: Győződjön meg róla, hogy a szondák alkalmazása előtt a metszetek teljesen megszáradtak, mivel a maradék nedvesség csökkentheti a jelintenzitást és/vagy befolyásolhatja a szöveti morfológiát.

Denaturáció és hibridizáció

- (1) Pipetázzon 10 µl ZytoLight FISH Probe reagenst minden előkezelt mintára.

A próbát ne tegye ki hosszabb idejű, erős fénynek.

- (2) Fedje le a mintákat 22 mm x 22 mm fedőlemezzel (kerülje a csapdázott buborékok kialakulását) és ragassza le a fedőlemezt.

Gumicement (pl. Fixogum Rubber Cement) ragasztó használatát javasoljuk.

- (3) Helyezze a tárgylemezeket fűtőblokkra vagy hibridizátorra és denaturálja a mintákat 10 percig 75°C-on.

- (4) Tegye át a tárgylemezeket pára kamrába és egy éjszakán át hibridizálja őket 37°C-on (pl. hibridizációs pára kamrában).

Lényeges, hogy a szövet/sejtminták ne száradjanak ki a hibridizációs lépés során.

12.2 2. nap**Előkészítő lépések**

- (1) *Az 1x Wash Buffer A előkészítése:* Hígítson 1 rész 25x Wash Buffer A (WB2) reagenst 24 rész ionmentesített vagy desztillált vízzel. Töltsön meg három festőedényt az 1x Wash Buffer A reagenssel és melegítse elő 37°C-ra.
- (2) DAPI/DuraTect-Solution (MT7): Használat előtt szobahőmérsékletre hozni és fénytől óvni.

Poszt-hibridizáció és detektálás

- (1) Óvatosan távolítsa el a ragasztót.
- (2) Úsztassa le a fedőlemezt 37°C-os 1x Wash Buffer A reagensbe merítve 1-3 percig.
- (3) Mossa meg a lemezeket 37°C-os 1x Wash Buffer A reagensben 2x 5 percig.

Az 1x Wash Buffer A reagenst elő kell melegíteni. Szükség esetén ellenőrizze a hőmérsékletét.

- (4) Inkubálja a lemezek 70%, 90% és 100% etanolban, mindegyikben 1 percig.
- (5) Fénytől védve szárítsa meg levegőn a mintákat.
- (6) Pipetázzon 25 µl DAPI/DuraTect-Solution (MT7) reagenst a lemezekre. Kerülve a buborékképződést fedje le a mintákat fedőlemezzel (24 mm x 60 mm). Inkubálja sötétben 15 percig.

A pipettahegy végének levágása és a nyílás méretének növelése könnyítheti a pipetázást. Kerülje a fénynek való hosszabb kitettséget.

- (7) A lemezeket sötétben kell tartani. Hosszabb idejű tárolás esetén helyezze őket 2-8°C-ra.
- (8) A reakciók kiértékelése fluoreszcens mikroszkópiát igényel. Az alábbi hullámhossz tartományokkal rendelkező szűrő készletek szükségesek:

Fluoreszcens festék	Excitáció	Emisszió
ZyBlue	418 nm	467 nm
ZyGreen	503 nm	528 nm
ZyGold	532 nm	553 nm
ZyOrange	547 nm	572 nm
ZyRed	580 nm	599 nm

13. Az eredmények kiértékelése

Normál sejtek kromoszóma eltérések nélküli interfázis vagy metafázis állapotában megfelelő szűrő készletek használatával próbánként két jel/fluoreszcens szignál látható. Kivéve az X és/vagy Y kromoszómákra specifikus próbák használatát, ami nulla vagy akár két jelet/fluoreszcens szignált mutathat próbánként a nemek függvényében. A kromoszóma eltérésekkel rendelkező sejtekben különböző jelmintázatok láthatók, akár interfázisban vagy metafázisban. Az eredmények értékelésével kapcsolatos további részletek a megfelelő szonda leírásában található.

14. Ajánlott minőségellenőrzési eljárások

A feldolgozott minták és a vizsgálati reagensek pontos hatékonyságának felmérése érdekében minden vizsgálathoz belső és külső kontrol festéseket kell végezni. Amennyiben a belső és/vagy külső pozitív kontrol reakciók nem mutatnak megfelelő festődést, akkor a beteg vizsgált mintájának eredményét érvénytelennek kell tekinteni.

Belső kontrol: Az elemzett mintában lévő nem neoplasztikus sejtek pl. fibroblasztok normál szignál mintázatot mutatnak.

Külső kontrol: Validált pozitív és negatív kontrol minták.

15. Teljesítményjellemzők

Olvassa el az adott szonda használati utasítását.

16. Hulladékkezelés

A reagensek hulladékként történő elhelyezését az országos szabályozásokkal összhangban kell elvégezni.

17. Hibaelhárítás

A használati utasítástól való bármilyen eltérés gyengébb vagy akár teljesen negatív festési eredményekhez vezethet.

Gyenge jel vagy nincs jel

Valószínűsíthető ok	Javasolt teendő
A célszekvencia nem kimutatható	Használjon megfelelő kontrolokat
A sejt- vagy szövetminta nem megfelelően fixálódott	Optimalizálja a rögzítési időt és rögzítőszerrel vagy végezzen utó-fixálást a „12. A vizsgálati eljárás” fejezetben leírtak alapján.
A melegítés előkezelési, az emésztési, a denaturációs, a hibridizációs vagy a magas stringenciájú mosás hőmérséklete nem megfelelő	Kalibrált hőmérővel ellenőrizze a használt műszaki berendezések hőmérsékletét
Nem megfelelő proteolitikus előkezelés	Optimalizálja a pepszines emésztés inkubációs idejét, szükség esetén növelje vagy csökkentse azt
A próbakeverék párologása	Hibridizációs pára kamra használata esetén a nedvesített csíkok/vízrel töltött tartályok használata kötelező. Hibridizációs fűtőblokk használata esetén gondoskodjon megfelelő páratartalomról. Ezenkívül a fedőlemezt teljesen le kell zárni, például Fixogum ragasztóval, a minta kiszáradását a hibridizáció során elkerülendő
A magas stringenciájú mosópuffer koncentrációja túl alacsony	Ellenőrizze a <u>Wash Buffer A</u> reagens koncentrációját
Régi dehidratáló oldatok	Készítsen friss dehidratáló oldatokat
A fluoreszcens mikroszkóp nem működik megfelelően	Ellenőrizze a mikroszkópot
Nem megfelelő szűrőkészletet használ	Használjon a fluorokrómoknak megfelelő szűrőkészleteket. <i>A hármas szűrőszett készletek kevesebb fényt biztosítanak, mint a mono- vagy kettős szűrők. Ennek következtében a jelek a hármas szűrőszett készlet használatával gyengébbek lehetnek</i>
A próbák/fluorokrómok fény által károsodhattak	A hibridizációt és a mosási lépéseket sötétben végezze

Keresztreagáló fluoreszcens jelek; magas háttérzaj

Valószínűsíthető ok	Javasolt teendő
A paraffin-mentesítés nem megfelelő	Használjon friss oldatokat; ellenőrizze a paraffin-mentesítés időtartamát
Túl erős proteolitikus előkezelés	Csökkentse a pepszines inkubáció idejét
Túlságosan nagy a próba mennyisége az adott területre	Csökkentse a próba mennyiségét a hibridizációs terület arányához mérten, cseppenként ossza szét a próbát elkerülve a túlkonzentrálódást
A tárgylemezek szobahőmérsékletűre hűltek a hibridizációt megelőzőleg	Tegye a tárgylemezeket mielőbb 37°C-ra
A magas stringenciájú mosópuffer koncentrációja túl magas	Ellenőrizze a <u>Wash Buffer A</u> reagens koncentrációját
A hibridizációt követő mosási lépés hőmérséklete túl alacsony	Ellenőrizze a hőmérsékletet; szükség esetén emelje azt
A minták kiszáradnak az egyes inkubációs lépések között	A fedőlemezek leragasztásával akadályozza meg a kiszáradást és az inkubációt nedvesített körülmények között végezze

Károsodott szöveti morfológia

Valószínűsíthető ok	Javasolt teendő
A sejt- vagy szövetminta nem megfelelően fixálódott	Optimalizálja a rögzítési időt és rögzítőszerrel vagy végezzen utó-fixálást a „12. A vizsgálati eljárás” fejezetben leírtak alapján.
Nem megfelelő proteolitikus előkezelés	Optimalizálja a pepszines emésztés inkubációs idejét, szükség esetén növelje vagy csökkentse azt
A minta elégtelen száradása a próba alkalmazása előtt	Növelje a levegőn történő száradás idejét

Átfedő sejtmagok

Valószínűsíthető ok	Javasolt teendő
A metszetek vastagsága nem megfelelő	Készítsen 2-4 μm vastagságú metszeteket

A metszet leúszik a tárgylemezről

Valószínűsíthető ok	Javasolt teendő
A tárgylemez bevonata nem megfelelő	Használjon megfelelő (pozitívan töltött) tárgylemezeket
Túl erős proteolitikus előkezelés	Csökkentse a pepszines emésztés inkubációs idejét

Gyenge háttérfestés

Valószínűsíthető ok	Javasolt teendő
Alacsony koncentrációjú DAPI oldat	Használja a <u>DAPI/DuraTect-Solution (ultra)</u> (Kat.szám MT-0008-0.8) terméket
A DAPI festés inkubációs ideje túl rövid	Állítsa be megfelelően a DAPI festés inkubációs idejét

18. Hivatkozások

- Kievits T, et al. (1990) *Cytogenet Cell Genet* **53**: 134-6.
- Wilkinson DG: In Situ Hybridization, A Practical Approach, Oxford University Press (1992) ISBN 0 19 963327 4.

Szakembereink készséggel válaszolnak kérdéseikre.
Vegye fel velünk a kapcsolatot a helptech@zytovision.com címen.



ZytoVision GmbH
Fischkai 1
27572 Bremerhaven/ Németország
Phone: +49 471 4832-300
Fax: +49 471 4832-509
www.zytovision.com
Email: info@zytovision.com

Védjegy:

A ZytoVision® és a ZytoLight® a ZytoVision GmbH védjegyei.