



## ZytoLight FISH-Cytology Implementation Kit

REF Z-2099-20

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-Cytology Implementation Kit reagens készlet a ZytoLight FISH próbák alkalmazásával genetikai eltérések, mint pl. transzlokációk, deléciók, amplifikációk és kromoszóma aneuploidiak kimutatására használható citológiai 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 aneuploidiai.

### 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 szárai 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 fluorokróm molekulák segítségével excitációs és emissziós szűrőkkel felszerelt fluoreszcens mikroszkóppal vizualizálhatók.

### 4. Mellékelt reagensok

A ZytoLight FISH-Cytology Implementation Kit készlet tartalma:

Kód	Összetevő	Mennyiség	Tároló
		$\Sigma$ 20	
ES2	<u>Cytology Pepsin Solution</u>	4 ml	Cseppentő üveg, átlátszó tetővel
WB5	<u>20x Wash Buffer TBS</u>	50 ml	Csavar-tetős üveg
PT4	<u>10x MgCl<sub>2</sub></u>	50 ml	Csavar-tetős üveg
PT5	<u>10x PBS</u>	50 ml	Csavar-tetős üveg
WB7	<u>Cytology Stringency Wash Buffer SSC</u>	500 ml	Csavar-tetős üveg (nagy)
WB8	<u>Cytology Wash Buffer SSC</u>	500 ml	Csavar-tetős üveg (nagy)
MT7	<u>DAPI/DuraTect-Solution</u>	0.8 ml	Reakció tartály, kék tetővel
	Használati útmutató	1	

**Z-2099-20 (20 teszt):** Az **ES2** és az **MT7** összetevők 20 reakcióhoz elegendőek. A **PT4**, **PT5**, **WB7** és **WB8** összetevők 7db 70ml-es festőedénybe elegendőek. A **WB5** komponens 14db 70ml-es festőedénybe elegendő.

### 5. Szükséges, de nem biztosított anyagok

- ZytoLight FISH próba
- Pozitív és negatív kontrol minták
- Pozitívra töltött tárgylemezek
- Vízfürdő (70°C)
- Hibridizációs kamra vagy fűtőblokk
- Hibridizációs párakamra
- Szabályozható pipetták (10  $\mu$ l, 25  $\mu$ l)
- Festőedények vagy fürdők
- Időzítő
- Kalibrált hőmérő
- Etanol
- 37%-os formaldehid, sav-mentes, vagy 10%-os formalin, semlegesre puffertelt
- 2x Sós-Nátruim Citrát (SSC), pl., 20x SSC Oldatból hígítva (Kat. Szám. WB-0003-50)
- 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 reagensekkel. 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 PT4, PT5, WB5, WB7 és WB8 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 keresztszennyezése 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.

## 10. A minták előkészítése

Inkubálja a lemezeket 2 percig 2x SSC oldatban 73°C-on közvetlenül a proteolízist megelőzőleg.

*Alternatív megoldásként mindezt a minták egy éjszakán át (12-16 óra) történő 37°C-os inkubálásával is végezhetjük.*

## 11. A reagensek előkészítése

A 20x Wash Buffer TBS (WB5), a 10x MgCl<sub>2</sub> (PT4) és a 10x PBS (PT5) reagenseket a 12. "A vizsgálati eljárás" utasításai szerint előkészíteni. A (PT4) és a (PT5) összetevők 2-8°C hőmérsékleten csapadékot képezhetnek. Használat előtt amennyiben szükséges, melegítse őket 10 percen át 37°C-on amíg a csapadék teljesen feloldódik. A készlet többi reagense felhasználásra kész. Nincs szükség feloldásra, keverésre vagy hígításra.

## 12. Vizsgálati eljárás

### 12.1 1. nap

#### Előkészítő lépések

- Az 1x Wash Buffer TBS előkészítése: 1 rész 20x Wash Buffer TBS (WB5) hígítása 19 rész ionmentesített vagy desztillált vízzel.
- Az 1%-os Formaldehid Oldat előkészítése: 100 ml 1%-os formaldehid oldathoz összekeverünk 2,7 ml 37%-os savmentes formaldehidet vagy 25 ml semleges pufferelt formalint (4%-os formaldehid) 10 ml 10x MgCl<sub>2</sub>-vel (PT4) és 10 ml 10x PBS-sel (PT5), majd a térfogatot 100 ml-re kiegészítjük ionmentesített vagy desztillált vízzel. Keverjük össze alaposan.
- Etanol-sorozat készítése (70%-os, 90%-os és 100%-os etanol oldatok): Hígítsuk 7, 9 és 10 rész 100%-os etanolt 3, 1 és 0 rész ionmentesített vagy desztillált vízzel. Ezek az oldatok megfelelő tárolóedényekben eltárolhatók és újra felhasználhatók.

#### Előkezelés (proteolízis/utó-fixálás)

- (1) Adagoljunk (cseppenként) Cytology Pepsin Solution (ES2) a citológiai mintához és 10 percig inkubáljuk 37°C-on hibridizációs pára kamrában.

*Több tényezőtől, például a rögzítés jellegétől és időtartamától, valamint a sejtek természetétől függően különböző inkubációs időkre lehet szükség. A citológiai minták esetében 5-15 perc inkubációs időt ajánlunk. Általános szabályként azt javasoljuk, hogy elő vizsgálatokban ellenőrizze a proteolízis optimális idejét.*

- (2) Inkubálja a lemezeket 5 percig 1x Wash Buffer TBS-ben.
- (3) Inkubálja a lemezeket 5 percig 1% Formaldehid oldatban.
- (4) Inkubálja a lemezeket 5 percig 1x Wash Buffer TBS-ben.
- (5) Dehidratálás: 70%, 90% és 100% etanolban, mindegyikben 1 percig.

A minták szárítása levegőn, szobahőmérsékleten.

#### 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 5 percig 72°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 citológiai minták ne száradjanak ki a hibridizációs lépés során.*

### 12.2 2. nap

#### Előkészítő lépések

- Cytology Stringency Wash Buffer SSC (WB7): 70°C-ra előmelegíteni.
- Cytology Wash Buffer SSC (WB8): Szobahőmérsékletre hozni.
- DAPI/DuraTect-Solution (MT7): Használat előtt szobahőmérsékletre hozni és fénytől óvni.

#### Poszt-hibridizáció és detektálás

- (1) Óvatosan távolítsa el a ragasztót.
- (2) Óvatosan szedje le a fedőlemezt.
- (3) Mossa meg a mintákat a Cytology Stringency Wash Buffer SSC-ben (WB7) 2 percen át 70°C-on.

*A Cytology Stringency Wash Buffer SSC reagenst elő kell melegíteni. Szükség esetén ellenőrizze a hőmérsékletét.*

*Festőedényenként négy lemez használatát javasoljuk. Ha kevesebb, mint négy minta lemeze van, használjon üres lemezeket.*

- (4) Mossa meg a mintákat Cytology Wash Buffer SSC-ben (WB8) 1 perccel szobahőmérsékleten.

*A Cytology Wash Buffer SSC reagenst elő kell melegíteni. Szükség esetén ellenőrizze a hőmérsékletét.*

- (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 perccel.

*A pipettahegy végének levágása és a nyílás méretének növelése könnyítheti a pipettázást. 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 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
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 párolgása	Hibridizációs párákamra 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 magas stringenciájú mosópuffer 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

#### Keresztreakáló fluoreszcens jelek; magas háttérzaj

Valószínűsíthető ok	Javasolt teendő
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 magas stringenciájú mosópuffer 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 morfológia

Valószínűsíthető ok	Javasolt teendő
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

### 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](mailto:helptech@zytovision.com) címen.



ZytoVision GmbH  
Fischkai 1  
27572 Bremerhaven/ Németország  
Tel: +49 471 4832-300  
Fax: +49 471 4832-509  
[www.zytovision.com](http://www.zytovision.com)  
Email: [info@zytovision.com](mailto:info@zytovision.com)

### Védjegy:

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