



ZytoLight

SPEC NTRK1 Dual Color Break Apart Probe

| | | | |
|-----|------------|---|-------------|
| REF | Z-2167-50 | Σ | 5 (0.05 ml) |
| REF | Z-2167-200 | Σ | 20 (0.2 ml) |

A humán 1q23.1 kromoszóma régióban kódolt NTRK1 gén transzlokációjának kvalitatív kimutatása fluoreszcens *in situ* hibridizáció (FISH) módszerrel



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

1. Javasolt alkalmazás

A ZytoLight SPEC NTRK1 Dual Color Break Apart Probe (PL123) a humán 1q23.1 kromoszóma régióban kódolt NTRK1 gén transzlokációjának kvalitatív kimutatására szolgál fluoreszcens *in situ* hibridizáció (FISH) módszerrel formalinnal fixált, paraffinba ágyazott minták alkalmazására. A próbát a ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit (Kat. szám Z-2028-5/-20) készlet reagenssel kombinációban ajánlott használni.

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

2. Klinikai jelentőség

Az NTRK1 (1-es típusú neurotróf tirozin-kináz-receptor, TRKA vagy TRK) az idegi növekedési faktor (NGF) egy tirozin-kináz (TK) receptorát kódolja. Az NTRK1 génátrendeződéseket a papilláris pajzsmirigy carcinomák (PTC) körülbelül 12%-ában azonosították. A PTC az összes pajzsmirigyrák eset kb. 80%-át jelenti. Az NTRK1 átrendeződése az NTRK1 gén 3'-végének fúzióját eredményezi különböző aktiváló gének (TPM3, TPR vagy TFG) 5'-végével. Ezek a fúziós gének hibrid fehérjéket kódolnak, amik az NTRK1 TK doménjét és a partnerfehérjék N-terminálisában lévő coiled-coil doméneket tartalmazzák. Az NTRK1 génátrendeződésekről ismerjük, hogy szerepet játszanak a pajzsmirigy karcinogenezisében. Számos tanulmány kimutatta, hogy az NTRK1 génátrendeződések a betegség rosszabb klinikai lefolyásával járhatnak, összehasonlítva az NTRK1 átrendeződés-negatív PTC-kel. Az utóbbi időben az NTRK1 génátrendeződéseket tüdő adenocarcinómákban is azonosították. Az NTRK1-eredetű fúziós fehérjéket célzó különböző inhibitorok *in vitro* gátolják a fúziós géneket expresszáló sejtek proliferációját. Mindez felveti a fúziós gének mint potenciális terápiás célpontok lehetőségét. Ezért az NTRK1 génátrendeződések fluoreszcens *in situ* hibridizációval (FISH) történő kimutatása a pajzsmirigy karcinogenezis tanulmányozásának hasznos eszköze, továbbá prognosztikai és terápiás jelentőséggel is rendelkezhet.

3. Vizsgálati módszer

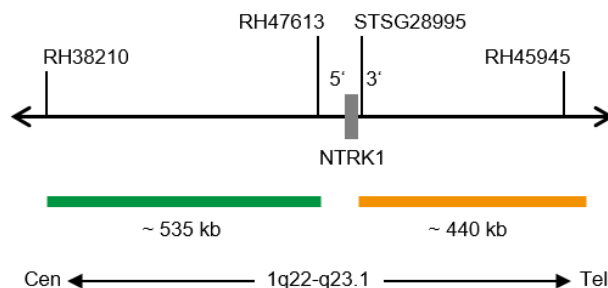
A fluoreszcens *in situ* hibridizáció (FISH) technika lehetővé teszi sejt preparátumok specifikus nukleinsav szekvenciáinak kimutatását és megjelenítését. A fluoreszcens jelölt DNS fragmensek, úgynevezett FISH próbák vagy szondák és azok komplementer cél-DNS szárai a készítményekben együttesen denaturálódnak, 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 fluorokróom molekulák segítségével excitációs és emissziós szűrőkkel felszerelt fluoreszcens mikroszkóppal vizualizálhatók.

4. Mellékelt reagensek

A ZytoLight SPEC NTRK1 Dual Color Break Apart Probe készlet tartalmazza:

- ZyGreen (gerjesztő hullámhossz 503 nm/kibocsátási hullámhossz 528 nm) zöld festékkel megjelölt polinukleotidok (~10.0 ng/μl), amelyek cél szekvenciái a NTRK1 gén töréspont régiójától proximálisan helyezkednek el a 1q22-q23.1* (chr1:156,245,849-156,781,745) kromoszóma régióban (lásd 1. ábra).
- ZyOrange (gerjesztő hullámhossz 547 nm/kibocsátási hullámhossz 572 nm) narancssárga festékkel megjelölt polinukleotidok (~4.5 ng/μl), amelyek cél szekvenciái a NTRK1 gén töréspont régiójától disztálisan helyezkednek el a 1q23.1* (chr1:156,854,527-157,296,918) kromoszóma régióban (lásd 1. ábra).
- Formamid alapú hibridizációs puffer

*a Human Genome Assembly szerint GRCh37/hg19



1. ábra: SPEC NTRK1 Próba térkép (nem méretarányos)

A ZytoLight SPEC NTRK1 Dual Color Break Apart Probe készlet két kiszerelésben elérhető:

- Z-2167-50: 0.05 ml (5 reakció egyenként 10 μl térfogattal)
- Z-2167-200: 0.2 ml (20 reakció egyenként 10 μl térfogattal)

5. Szükséges, de nem biztosított anyagok

- ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit (Kat. szám Z-2028-5/-20)
- Pozitív és negatív kontroll minták
- Pozitívra töltött tárgylemezek
- Vízfürdő (37°C, 98°C)
- Hibridizációs kamra vagy fűtőblokk
- Hibridizációs pára kamra
- Szabályozható pipetták (10 μl, 25 μl)
- Festőedények vagy fűdők
- 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

Álló helyzetben 2-8°C között fénytől védve tárolandó. Erős fényt elkerülve használatos. Felhasználást követően azonnal a tárolási feltételek alkalmazandók. Ne használja a reagenseket a címkén feltüntetett lejárati időn túl. A termék a címkén feltüntetett lejárati ideig őrzi meg stabilitását megfelelően kezelés mellett.

7. Figyelmeztetések és óvintézkedések

- Használat előtt olvassa el a használati utasítást!
- Ne használja a reagenseket 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 felhasználhatók.
- A minták keresztzennyeződését kerülni kell, mert ez hibás eredményhez vezethet.
- A próbát ne tegye ki fénynek, különösen hosszabb ideig tartó erős fénynek, azaz minden lépést, ha lehetséges, sötétben és/vagy fényálló tartókban hajtsa végre!

Veszélyek és óvintézkedések:

A legfőbb veszélyt jelentő összetevő a formamid.



Veszély

| | |
|-----------|--|
| H351 | Feltehetően rákot okoz. |
| H360FD | Károsíthatja a termékenységet. Károsíthatja a születendő gyermeket. |
| H373 | Ismétlődő vagy hosszabb expozíció esetén károsíthatja a szerveket. |
| P201 | Használat előtt ismerje meg az anyagra vonatkozó különleges utasításokat. |
| P202 | Ne használja addig, amíg az összes biztonsági óvintézkedést el nem olvasta és meg nem értette. |
| P260 | A por/füst/gáz/köd/gőzök/permet belélegzése tilos. |
| P280 | Védőkesztyű/védőruha/szemvédő/arcvédő használata kötelező. |
| P308+P313 | Expozíció vagy annak gyanúja esetén: orvosi ellátást kell kérni. |
| P405 | Elzárva tárolandó. |

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 kontroll reakciók biztosításáért.
- A minta festése, különösen a jelintenzitás és a háttérfestés erőssége a festést megelőző mintakezeléstől és feldolgozástól függ. A minta nem megfelelő fixálása, fagyasztása, felolvasztása, mosása, szárítása, melegítése, metszése vagy más mintákkal és folyadékokkal való keresztzennyezése műtermékek vagy hamis eredmények kialakulásához vezethet. Ellentmondó eredmények eredhetnek a minta rögzítési és beágyazási eltéréseiből, valamint magában a mintában rejlő egyenlőtlen feltételekből.

- A szondát csak a 4. "Mellékelt reagensek" fejezetben leírt lókuszkok kimutatásához szabad használni.

- 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 vörösvértetek 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
- Hollandi 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 reagens előkészítése

A termék azonnal felhasználható (RTU). Nem szükséges feloldani, átkeverni vagy tovább hígítani. Használat előtt hozza szobahőmérsékletre (18-25°C) fénytől védve. Mielőtt kinyitná a próbát tartalmazó fiólat vortexeléssel keverje össze és rövid ideig centrifugálja.

12. A vizsgálati eljárás

A minta előkezelése

A minta előkezelését (paraffin-mentesítés, proteolitikus emésztés) a ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit készlet használati utasításának megfelelően végezze.

Denaturáció és hibridizáció

1. Pipettázzon 10 μl próbát az előkezelt minták megfelelő területeire.
2. Helyezzen fel egy 22 mm x 22 mm-es üveg fedőlemezt a próbakeverékre (akadályozza meg a légbuborékok képződését) és tömítéssel zárja le a fedőlemezt.

Javasoljuk, hogy gumicementet (pl. Fixogum-ot) használjon a tömítéshez.

3. Helyezze be a tárgylemezeket fűtőblokkba vagy hibridizációs kamrába és denaturálja a mintákat 75°C-on 10 percen át.
4. Helyezze a tárgylemezeket hibridizációs páramrába és a hibridizációhoz inkubálja őket 37°C-on egy éjszakán át.

Lényeges, hogy a minták ne száradjanak ki a hibridizációs lépés folyamán.

Poszt-hibridizáció

Végezzen poszt-hibridizációs eljárást (mosást, háttérfestést és fluoreszcens mikroszkópos értékelést) a ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit készlet használati utasításának megfelelően.

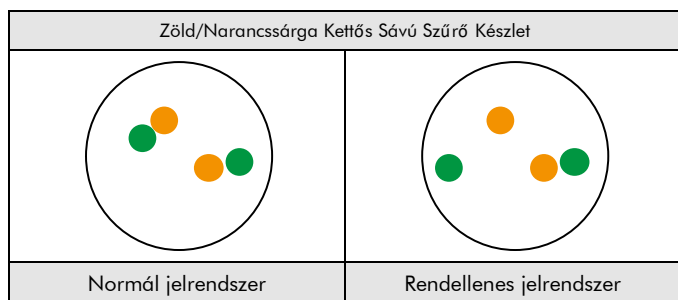
13. Az eredmények kiértékelése

Megfelelő fluoreszcencia szűrő készletek használatával a próbák hibridizációs jelei zöld (a NTRK1 gén töréspontjától proximálisan eső régió) és narancssárga (a NTRK1 gén töréspontjától disztálisan eső régió) színűnek látszódnak.

Normál jelrendszer: Normál sejtek NTRK1 transzlokáció nélküli, interfázisos sejtmagjaiban két zöld/narancssárga színű fúziós jel látható (lásd 2. ábra).

Rendellenes jelrendszer: A NTRK1 gén régióját érintő transzlokációt egy egymástól elkülönült zöld és narancssárga jel mutatja (lásd 2. ábra).

Az egymással átfedő jelek citromsárgának tűnhetnek.



2. ábra: Várt eredmények normál és rendellenes sejtmagok esetén

A kisebb deléciók, duplikációk vagy inverziók okozta genomális eltérések nehezen észlelhető jelmintázatokat eredményezhetnek.

Néhány abnormális mintában a fent leírt két típustól eltérő jelmintázat-eloszlás figyelhető meg, mely egyéb variáns génátrendezésre utal. Ezen nem várt szignál mintázatokat további vizsgálatokat igényelhetnek.

Kérjük, vegye figyelembe:

- A dekoncentrált kromatinszerkezet következtében egyes FISH jelek kis szignál klaszterekként jelentkezhetnek. Így kettő vagy három egyforma méretű szignál egymástól ≤ 1 szignál átmérő távolsággal elválasztva egy szignálnak számolandó.
- Ne értékeljen egymással átfedésben levő sejtmagokat.
- Ne számolja a túlemésztett sejtmagokat (amelyek a sejtmagon belüli sötét területek alapján ismerhetők fel).
- Ne számolja az erős autofluoreszcenciával rendelkező sejtmagokat, ami a jelek felismerését gátolhatja.
- Negatív vagy nem specifikus eredményt számos tényező kiválthat (lásd a 17. fejezetet).
- Az eredmények helyes interpretálása érdekében a terméket a diagnosztikai eljárásokban történő felhasználás előtt a felhasználónak validálnia kell a nemzeti és/vagy nemzetközi irányelvtől függően.

14. Ajánlott minőségellenőrzési eljárások

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

Belső kontroll: Az elemzett mintában lévő nem neoplastikus sejtek (pl. fibroblasztok) normál szignál mintázatot mutatnak.

Külső kontroll: Validált pozitív és negatív kontroll minták.

15. Teljesítményjellemzők

Pontosság: A próba hibridizációjának helyét normál férfi kariotípusú minták metafázis készítményein határozták meg. Minden vizsgált mintában a próba kizárólag a várt lókuszhoz hibridizálódott. Nem figyeltek meg további jeleket vagy kereszthibridizációt. Így a pontosság 100%-nak számítható.

Analitikai érzékenység: Az analitikai érzékenység meghatározásához a próba működését normál férfi kariotípusú minták metafázis készítményein határozták meg. Valamennyi sejtmag a várt normális jelmintázatot mutatta az összes vizsgált mintában. Ezért az analitikai érzékenységet 100%-osnak becsülték.

Analitikai specifitás: Az analitikai specifitás meghatározásához a próba működését normál férfi kariotípusú minták metafázis készítményein határozták meg. Minden vizsgált mintában a próbák csak a várt cél lókuszhoz hibridizálódtak, más lókuszhoz nem kötődtek. Ezért az analitikai specifitás 100%-nak számítható.

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 kontrollokat |
| A sejt- vagy szövetminta nem megfelelően fixálódott | Optimalizálja a fixálás idejét és a fixálószerrel vagy alkalmazzon utófixálási lépést a <u>ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit</u> kézikönyvének "vizsgálati eljárásában" leírtak szerint |
| 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 párolgása | Hibridizációs pára kamra használata esetén a nedvesített csíkok/vízrel töltött tartályok használata kötelező. Hibridizációs fűtőblokk használata esetén gondoskodjon megfelelő páratartalomról. Ezenkívül a fedőlemez 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 szűrő szett készletek kevesebb fényt biztosítanak, mint a mono- vagy kettős szűrők. Ennek következtében a jelek a hármas szűrő szett 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 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 szöveti morfológia

| Valószínűsíthető ok | Javasolt teendő |
|---|---|
| A sejt- vagy szövetminta nem megfelelően fixálódott | Optimalizálja a fixálás idejét és a fixálószer vagy alkalmazzon utófixálási lépést a <u>ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit</u> kézikönyvének "vizsgálati eljárásában" leírtak szerint |
| 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 tárgylemezeket |
| Túl erős proteolitikus előkezelés | Csökkentse a pepszines emésztés inkubációs idejét |

Gyenge háttérfestés

| Valószínűsíthető ok | Javasolt teendő |
|--|---|
| Alacsony koncentraciójú 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

- Alberti L, et al. (2003) *J Cell Physiol* 195: 168-86.
- Bongarzone I, et al. (1998) *Clin Cancer Res* 4: 223-8.
- Doebele RC, et al. (2013) *J Clin Oncol* 31 Suppl: Abstr. 8023.
- Greco A, et al. (2010) *Mol Cell Endocrinol* 321: 44-9.
- Kieivts T, et al. (1990) *Cytogenet Cell Genet* 53: 134-6.
- Musholt TJ (2000) *Surgery* 128: 984-93.
- Russell JP, et al. (2000) *Oncogene* 19: 5729-35.
- 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 help@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.