



**ZytoLight**

## **SPEC TERT Dual Color Break Apart Probe**

**REF** Z-2273-50

$\Sigma$  5 (0.05 ml)

Do jakościowej detekcji translokacji obejmującej region chromosomalny 5p15.33 zawierający gen TERT metodą fluorescencyjnej hybrydacji *in situ* (FISH)



Wyrób medyczny do diagnostyki *in vitro*  
zgodnie z dyrektywą 98/79/WE

### 1. Przeznaczenie

ZytoLight SPEC TERT Dual Color Break Apart Probe (PL229) jest przeznaczony do jakościowej detekcji translokacji obejmującej region chromosomalny 5p15.33 zawierający gen TERT w próbkach utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie metodą fluorescencyjnej hybrydacji *in situ* (FISH). Sonda jest przeznaczona do stosowania w połączeniu z zestawem ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit (Nr. kat. Z-2028-5/-20).

Interpretacja wyników musi być wykonana przez wykwalifikowanego patologa w kontekście klinicznej historii pacjenta w odniesieniu do pozostałych klinicznych i patologicznych danych pacjenta.

### 2. Znaczenie kliniczne

Gen TERT (odwrotna transkryptaza telomerazy, inaczej EST2, TCS1) koduje składnik odwrotnej transkryptazy, domenę katalityczną enzymu telomerazy. Telomerazy są niezbędne do utrzymania końców chromosomów i są nieaktywne w większości komórek somatycznych, ale są aktywne w komórkach nowotworowych. Przebudowa kontekstu genomowego, dzięki rearanżacjom 5p15.33, znosi wyciszenie transkrypcji genu TERT. Translokacje TERT są drugą częstą aberracją stwierdzaną w neuroblastomach. Te translokacje obserwuje się w regionie o długości 50 kbp proksymalnym lub rzadziej w regionie o długości 40 kbp dystalnym od genu. Molekularne badania genetyczne wykazały, że rearanżacje regionu chromosomalnego 5p15.33 występują wyłącznie w nerwiaku zarodkowym wysokiego ryzyka. Dlatego uważa się, że rearanżacje TERT definiują podgrupę neuroblastoma wysokiego ryzyka ze złym rokowaniem. Rearranżacje TERT stwierdza się w raku chromofobów z komórek nerkowych, chłoniakach niezłazniczych i chłoniakach z komórek płaszczka. FISH jest odpowiednim narzędziem do wykrywania tych przegrupowań TERT, a zatem może mieć znaczenie prognostyczne.

### 3. Zasada testu

Technika fluorescencyjnej hybrydacji *in situ* (FISH) umożliwia wykrywanie i wizualizację określonych sekwencji kwasów nukleinowych w preparatach komórkowych. Fluorescencyjnie oznakowane fragmenty DNA, nazwane sondami, i ich komplementarne docelowe nici DNA w preparatach są wspólnie denaturowane, a następnie łączą się podczas hybrydacji. Niespecyficzne i niezwiązane fragmenty sondy są usuwane przez stopniowe przemywanie. Po barwieniu kontrastowym DNA za pomocą DAPI, zhybrydowane fragmenty sondy są zwizualizowane za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego wyposażonego w filtry wzbudzenia i emisji specyficzne dla fluorochromów, którymi fragmenty sondy FISH zostały oznakowane.

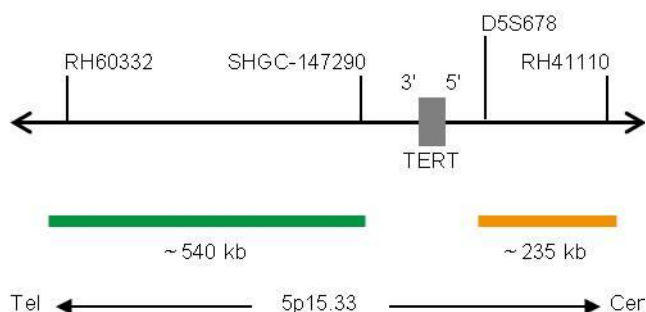
### 4. Dostarczone odczynniki

ZytoLight SPEC TERT Dual Color Break Apart Probe składa się z:

- ZyGreen (wzbudzenie 503 nm/emisja 528 nm) wyznakowane polinukleotydy (~10.0 ng/ $\mu$ l), których docelowe sekwencje są zmapowane w 5p15.33\* (chr5:620,184-1,161,456) dystalnie do regionu punktu przerwania TERT (patrz Rys. 1).
- ZyOrange (wzbudzenie 547 nm/emisja 572 nm) wyznakowane polinukleotydy (~4.5 ng/ $\mu$ l), których docelowe sekwencje są zmapowane w 5p15.33\* (chr5:1,353,007-1,588,209) proksymalnie do regionu punktu przerwania TERT (patrz Rys. 1).

- Bufor do hybrydacji oparty na formamidzie

\* zgodnie z Human Genome Assembly GRCh37/hg19



Rys. 1: SPEC TERT Mapa sondy (bez skali)

ZytoLight SPEC TERT Dual Color Break Apart Probe jest dostępny w jednym rozmiarze:

- Z-2273-50: 0.05 ml (5 reakcji po 10  $\mu$ l każda)

### 5. Materiały wymagane, ale nie dostarczane

- ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit (Nr. kat. Z-2028-5/-20)
- Pozytywny i negatywny preparat kontrolny
- Szkiełka mikroskopowe, pozytywnie naładowane
- Łaźnia wodna (37°C, 98°C)
- Hybrydyzator lub płyta grzewcza
- Hybrydyzator lub komora wilgotnościowa w ciepłarni do hybrydacji
- Regulowane pipety (10  $\mu$ l, 25  $\mu$ l)
- Barwiacze
- Timer
- Skalibrowany termometr
- Etanol lub odczynnik alkoholowy
- Ksylen
- Dejonizowana lub destylowana woda
- Szkiełka nakrywkowe (22 mm x 22 mm, 24 mm x 60 mm)
- Rubber cement, np. Fixogum Rubber Cement (Nr. kat. E-4005-50/-125) lub podobny
- Odpowiednio utrzymany mikroskop fluorescencyjny (400-1000x)
- Olejek immersyjny zatwierdzony do mikroskopii fluorescencyjnej
- Odpowiedni zestaw filtrów

## 6. Przechowywanie i obsługa

Przechowywać w temperaturze 2-8°C w pozycji pionowej chroniąc przed światłem.

Używać chroniąc przed światłem. Powrót do warunków przechowywania natychmiast po użyciu. Nie należy używać odczynników po upływie terminu ważności podanego na etykiecie. Produkt jest stabilny do daty ważności podanej na etykiecie, gdy jest odpowiednio przechowywany.

## 7. Ostrzeżenie i środki ostrożności

- Przeczytaj instrukcję użytkowania przed użyciem!
- Nie stosować odczynników po przekroczeniu daty ważności!
- Produkt ten zawiera substancje (w małym stężeniu i objętości), które są szkodliwe dla zdrowia i potencjalnie zakaźne. Unikać jakiegokolwiek bezpośredniego kontaktu z odczynnikami. Podejmij odpowiednie środki ochronne (stosuj rękawiczki ochronne, okulary ochronne i odzież laboratoryjną)!
- Jeśli odczynniki wejdą w kontakt ze skórą, natychmiast ołucz skórę dużą ilością wody!
- Karta charakterystyki substancji niebezpiecznej jest dostępna na żądanie profesjonalnego użytkownika.
- Nie używaj ponownie odczynników.
- Unikaj krzyżowego zanieczyszczenia próbek, które może prowadzić do błędnych wyników.
- Sonda nie powinna być ekspozycja na światło, zwłaszcza silne światło, przez dłuższy okres czasu, np. wszystkie kroki powinny zostać wykonane, jeśli to możliwe, w ciemności i/lub używając pojemników odpornych na światło!

### Zwroty wskazujące rodzaj zagrożenia i określające środki ostrożności:

Składnik determinujący zagrożenie to formamid.



### Niebezpieczeństwo

|           |  |
|-----------|--|
| H351      | Podejrzewa się, że powoduje raka.  |
| H360FD    | Może działać szkodliwie na płodność. Może działać szkodliwie na dziecko w tonie matki. |
| H373      | Może powodować uszkodzenie narządów poprzez długotrwałe lub powtarzane narażenie.      |
| P201      | Przed użyciem zapoznać się ze specjalnymi środkami ostrożności.                        |
| P202      | Nie używać przed zapoznaniem się i zrozumieniem wszystkich środków bezpieczeństwa.     |
| P260      | Nie wdychać pyłu/dymu/gazu/mgły/par/rozpylonej cieczy.                                 |
| P280      | Stosować rękawice ochronne/odzież ochronną/ochronę oczu/ochronę twarzy.                |
| P308+P313 | W przypadku narażenia lub styczenia: Zasięgnąć porady/zgłosić się pod opiekę lekarza.  |
| P405      | Przechowywać pod zamknięciem.  |

## 8. Ograniczenia

- Do zastosowań w diagnostyce *in vitro*.
- Tylko do użytku profesjonalnego.
- Interpretacja kliniczna jakiegokolwiek pozytywnego zabarwienia lub jego braku musi być wykonana w kontekście historii klinicznej, morfologii, innych kryteriów histopatologicznych, a także innych badań diagnostycznych. Obowiązkiem wykwalifikowanego patologa jest zaznajomienie się z sondami FISH, odczynnikami, panelami diagnostycznymi i metodami stosowanymi do wytwarzania barwionego preparatu. Barwienie musi być wykonane w certyfikowanym, licencjonowanym laboratorium pod nadzorem patologa, który jest odpowiedzialny za przeglądanie wybarwionych preparatów i zapewnienie odpowiedniej kontroli pozytywnej i negatywnej.

- Wybarwienie preparatów, szczególnie intensywność sygnału i barwienie tła, zależy od obróbki i przetwarzania próbki przed barwieniem. Nieodpowiednie utrwalenie, zamrażanie, rozmrażanie, płukanie, suszenie, podgrzewanie, krojenie lub zanieczyszczenie innym preparatem lub płynami może być źródłem artefaktów lub fałszywych wyników. Niespójne wyniki mogą być wynikiem różnych odmian metod utrwalania i zatapiania, a także obecności nieprawidłowości w próbce.

- Sonda powinna być użyta do detekcji loci opisanej w części 4 „Dostarczone odczynniki”.
- Wydajność została zatwierdzona przy użyciu procedur opisanych w niniejszej instrukcji użytkowania. Modyfikacje tych procedur mogą zmienić wydajność i muszą zostać zatwierdzone przez użytkownika.

## 9. Substancje zakłócające

Czerwone krwinki krwi obecne w próbce mogą wykazywać autofluorescencję, która utrudnia rozpoznawanie sygnału.

Następujące utrwalacze są niekompatybilne z FISH:

- Utrwalacz Bouin'a
- Utrwalacz B5
- Utrwalacze kwasne (np. kwas pikrynowy)
- Utrwalacz Zenker'a
- Alkohole (stosowane samodzielnie)
- Chlorek rtęci
- Utrwalacz formaldehyd/cynk
- Utrwalacz Holandesa
- Niezbuforowana formalina

## 10. Przygotowanie próbek

Zalecenia:

- Utrwalanie w 10% neutralnej buforowanej formalinie przez 24 h w temperaturze pokojowej (18-25°C).
- Rozmiar próbki  $\leq 0.5 \text{ cm}^3$ .
- Stosuj parafinę jakości premium.
- Zatapianie powinno się odbywać w temperaturze poniżej 65°C.
- Przygotuj skrawki o grubości 2-4  $\mu\text{m}$ .
- Stosuj szkiełka mikroskopowe pozytywnie naładowane.
- Utrwalaj przez 2-16 h w 50-60°C.

## 11. Obróbka wstępna produktu

Produkt jest gotowy do użycia. Nie jest wymagana rekonstrukcja, mieszanie lub rozcieńczanie. Przed użyciem przenieś sondę do temperatury pokojowej (18-25°C), chroniąc przed światłem. Przed otwarciem fiolki zamieszaj w wortexie i krótko odwiruj.

## 12. Procedura testu

### Obróbka wstępna próbki

Przygotuj obróbkę wstępną próbki (odparafinowanie, proteolizę) zgodnie z instrukcją użycia zestawu ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit.

### Denaturacja i hybrydyzacja

1. Nanieś pipetą 10  $\mu\text{l}$  sondy na każdy przygotowany wstępnie preparat.
2. Nakryj preparat szkiełkiem nakrywkowym 22 mm x 22 mm (unikaj zamknięcia błębi powietrza) i uszczelnij preparat.  
*Rekomendujemy stosowanie rubber cement (np. Fixogum) do uszczelniania preparatów.*
3. Umieść szkiełka na płycie grzewczej lub hybrydyzatorze i denaturuj preparaty przez 10 min w 75°C.
4. Przenieś szkiełka do komory wilgotnościowej i hybryduj przez noc w temperaturze 37°C (np. w ciepłarni hybrydyzatora).

*Istotne jest, aby próbki nie wysychały podczas etapu hybrydyzacji.*

### Obróbka po hybrydyzacji

Przygotuj obróbkę po hybrydyzacji (płukanie, barwienie kontrastowe, mikroskop fluorescencyjny) zgodnie z instrukcją użycia zestawu ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit.

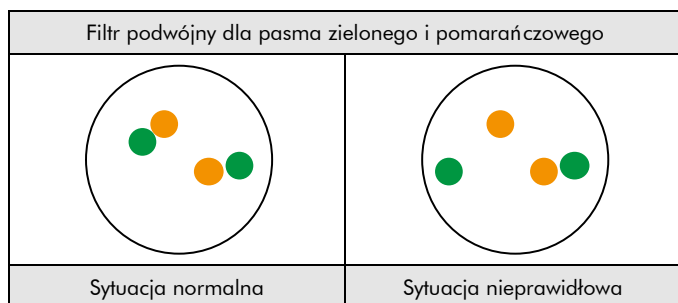
### 13. Interpretacja wyników

Przy użyciu odpowiednich zestawów filtrów, sygnały hybrydyzacji sondy są zielone (dystalnie do regionu punktu przerwania TERT) i pomarańczowe (proksymalnie do regionu punktu przerwania TERT).

**Sytuacja normalna:** W interfejsach normalnych komórek lub komórek bez translokacji obejmującej region genu TERT, pojawiają się dwa zielono-pomarańczowe sygnały fuzji (patrz Rys. 2).

**Sytuacja nieprawidłowa:** Jeden region genu TERT dotknięty translokacją jest wskazany przez jeden oddzielny zielony sygnał i jeden oddzielny pomarańczowy sygnał (patrz Rys. 2).

*Nakładają ce się sygnały mogą być wyswietlane jako zóte sygnały.*



Rys. 2: Oczekiwane wyniki w normalnych i nieprawidłowych jądrach komórkowych

Genomowe aberracje spowodowane małymi delecjami, duplikacjami lub inwersjami, mogą skutkować niepozornymi wzorcami sygnałów. Inny rozkład sygnału może być obserwowany w niektórych nieprawidłowych próbkach, co może skutkować innym wzorcem sygnału niż opisany powyżej, wskazując na wariantowe rearanżacje. Nieoczekiwane wzorce sygnału powinny zostać dalej zbadane.

#### Należy pamiętać:

- Z powodu zdekondensowanej chromatyny pojedyncze sygnały FISH mogą pojawić się jako małe skupienia sygnałów. Zatem, dwa lub trzy sygnały o tym samym rozmiarze, oddzielone odległością  $\leq 1$  średnicy sygnału, powinny być liczone, jako jeden sygnał.
- Nie należy oceniać jąder komórkowych zachodzących na siebie.
- Nie zliczać jąder komórkowych nadmiernie strawionych (rozpoznane jako ciemne obszary widoczne w jądrze komórkowym).
- Nie zliczać jąder komórkowych z silną autofluorescencją, co utrudnia rozpoznawanie sygnału.
- Negatywne lub nieoczekiwane wyniki mogą być wynikiem wielu czynników (patrz część 17).
- Aby poprawnie zinterpretować wyniki, użytkownik musi zatwierdzić ten produkt przed użyciem w procedurach diagnostycznych zgodnie z wytycznymi krajowymi i/lub międzynarodowymi.

### 14. Rekomendowane procedury kontroli jakości

W celu monitorowania prawidłowego przygotowania próbek i odczynników testowych do każdego testu należy dołączyć kontrole wewnętrzne i zewnętrzne. Jeśli wewnętrzne i/lub zewnętrzne kontrole nie wykazują odpowiedniego zabarwienia, wyniki z próbkami od pacjentów muszą być uznane za nieważne.

**Kontrola wewnętrzna:** Nienowotworowe komórki w obrębie próbki, które wykazują normalny wzorzec sygnału, np. fibroblasty.

**Kontrola zewnętrzna:** Walidowane preparaty z kontrolą dodatnią i ujemną.

### 15. Charakterystyka wydajności

**Dokładność:** Lokalizacja hybrydyzacji sondy oceniana na metafazowych wymazach kariotypów normalnych samców. We wszystkich badanych próbkach sonda hybrydyzowała wyłącznie z oczekiwanymi loci. Nie zaobserwowano dodatkowych sygnałów ani krzyżowych hybrydyzacji. Dlatego dokładność została obliczona na 100%.

**Czułość i analityczność:** W celu oceny wrazliwości i analityczności sondy była oceniana na podstawie metafazowych wymazach kariotypów normalnych samców. Wszystkie jądra komórkowe wykazały oczekiwany prawidłowy wzorzec sygnału we wszystkich badanych próbkach. Dlatego czułość i analityczność została obliczona na 100%.

**Specyficzność i analityczność:** W celu oceny specyficzności i analityczności sondy była oceniana na podstawie metafazowych wymazach kariotypów normalnych samców. We wszystkich badanych próbkach sonda hybrydyzowała wyłącznie z oczekiwanymi loci i z innymi innymi loci. Dlatego specyficzność i analityczność została obliczona na 100%.

### 16. Utylizacja

Utylizacja odczynników musi odbywać się zgodnie z lokalnymi przepisami.

### 17. Rozwiązywanie problemów

Każde odchylenie od instrukcji obsługi może prowadzić do gorszych wyników barwienia lub braku zabarwienia.

#### Słabe sygnały lub brak sygnałów

| Możliwa przyczyna   | Działanie  |
|---|--|
| Niedostępna sekwencja docelowa  | Zastosuj odpowiednią kontrolę  |
| Komórka lub tkanka nie została prawidłowo utrwalona   | Zoptymalizuj czas utrwalania i utrwalacz lub zastosuj dodatkowy etap utrwalania jak to zostało opisane w "procedurze testu" w instrukcji użycia zestawu <i>ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit</i>  |
| Nieprawidłowa temperatura wstępnej obróbki ciepłej, proteolizy, denaturacji, hybrydyzacji, lub płukania | Sprawdź temperaturę wszystkich wykorzystywanych urządzeń technicznych za pomocą skalibrowanego termometru  |
| Proteolityczna obróbka wstępna nie została przeprowadzona prawidłowo                                    | Zoptymalizuj czas inkubacji pepsyny, wydłuż lub skróć jeśli to konieczne   |
| Odparowanie sondy   | Gdy używasz hybrydyzatora obowiązkowe jest stosowanie mokrych pasów / napełnionych wodą zbiorników. Gdy używasz ciepłarki wymagane jest użycie komory wilgotnościowej. W dodatku szkiełko nakrywkowe powinno być dokładnie uszczelnione, np. Fixogumem w celu zabezpieczenia przed wyschnięciem podczas hybrydyzacji |
| Zbyt niskie stężenie buforu płuczącego  | Sprawdź stężenie buforu płuczącego   |
| Stare roztwory do odwadniania   | Przygotuj świeże roztwory do odwadniania   |
| Nieprawidłowo ustawiony mikroskop fluorescencyjny   | Dostosuj poprawnie   |
| Stosowanie nieodpowiednich zestawów filtrów   | Stosuj zestawy filtrów odpowiednich do fluorochromów sondy.<br><i>Filtry z potrójnym pasmem zapewniają mniej światła w porównaniu z zestawami filtrów jedno lub dwupasmowymi.</i><br><i>W konsekwencji sygnały mogą wydawać się słabsze przy użyciu tych zestawów filtrów z potrójnym pasmem.</i>                    |
| Obraz sondy/fluorochromu nieprawidłowy  | Wykonaj etapy hybrydyzacji i płukania w ciemności  |

#### Sygnały krzyżowe hybrydyzacji; wysokie tło

| Możliwa przyczyna                         | Działanie   |
|---|---|
| Niekompletne odparafinowanie              | Użyj świeżych odczynników; sprawdź czas usuwania parafiny |
| Zbyt silna proteolityczna obróbka wstępna | Zredukuj czas inkubacji z pepsyną                         |

|   |  |
|---|--|
| Zbyt duża objętość sondy w obszarze                             | Zredukuj objętość sondy na materiale/obszarze, rozprowadź sondę kroplami w celu uniknięcia lokalnej koncentracji |
| Szkiełka schłodzone do temperatury pokojowej przed hybrydyzacją | Przenieś szybko szkiełka do temperatury 37°C   |
| Zbyt wysokie stężenie buforu płuczącego                         | Sprawdź stężenie buforu płuczącego   |
| Zbyt niska temperatura płukania po hybrydyzacji                 | Sprawdź temperaturę; podnieś ją jeśli to konieczne   |
| Odwodnienie próbek pomiędzy poszczególnymi etapami inkubacji    | Zapobiegaj odwodnieniu próbek przez uszczelnienie szkiełek i przeprowadzanie inkubacji w wilgotnym środowisku    |

#### Zdegradowana morfologia tkanki

| Możliwa przyczyna  | Działanie  |
|--|--|
| Komórka lub tkanka nie zostały utrwalone prawidłowo                  | Zoptymalizuj czas utrwalania i utrwalacz lub zastosuj dodatkowy etap utrwalania jak to zostało opisane w "procedurze testu" w instrukcji użytkowania zestawu <u>ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit</u> |
| Proteolityczna obróbka wstępna nie została przeprowadzona prawidłowo | Zoptymalizuj czas inkubacji pepsyny, wydłuż lub skróć jeśli to konieczne   |
| Niewystarczające wysuszenie przed aplikacją sondy                    | Wydłuż suszenie  |

#### Zachodzące na siebie jądra komórkowe

| Możliwa przyczyna                   | Działanie                                      |
|-------------------------------------|--|
| Niewłaściwa grubość skrawków tkanek | Przygotuj skrawki o grubości 2-4 $\mu\text{m}$ |

#### Preparat spłynął ze szkiełka

| Możliwa przyczyna                         | Działanie                         |
|---|-----------------------------------|
| Szkiełka z nieodpowiednią powłoką         | Zastosuj odpowiednie szkiełka     |
| Zbyt silna proteolityczna obróbka wstępna | Zredukuj czas inkubacji z pepsyną |

#### Słabe barwienie kontrastowe

| Możliwa przyczyna                 | Działanie  |
|-----------------------------------|--|
| Niskie stężenie roztworu DAPI     | Zamiast tego użyj <u>DAPI/DuraTect-Solution (ultra)</u> (Nr. kat. MT-0008-0.8) |
| Zbyt krótki czas inkubacji z DAPI | Dostosuj czas inkubacji z DAPI   |

## 18. Literatura

- Davis CF, et al. (2014) *Cancer Cell* 26: 319-30.
- Kievits T, et al. (1990) *Cytogenet Cell Genet* 53: 134-6.
- Nagel I, et al. (2010) *Blood* 116: 1317-20.
- Schilling G, et al. (2013) *Leukemia Res* 37: 280-6.
- Pfeifer M, et al. (2015) *Nature* 526: 700-4.
- Wilkinson DG: *In Situ Hybridization, A Practical Approach*, Oxford University Press (1992) ISBN 0 19 963327 4.

Nasi eksperci są gotowi odpowiedzieć na Państwa pytania. Prosimy o kontakt [helptech@zytovision.com](mailto:helptech@zytovision.com)



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

#### Znaki towarowe:

ZytoVision® i ZytoLight® to znaki towarowe ZytoVision GmbH.