



ZytoFast
human Ig-kappa Probe
(Digoxigenin-işaretli)

REF T-1115-400  40 (0.4 ml)

İnsan Ig-kappa (κ) mRNA'sının
kromojenik *in situ* hibridizasyon (CISH) ile
kalitatif tespiti için



Vücut dışında kullanılan (*in vitro*) tıbbi tanı cihazı
98/79/EC AB Yönetmeliğine göre

1. Kullanım amacı

ZytoFast human Ig-kappa Probe (PF30), insan Ig-kappa (κ) hafif zincir mRNA'sının lenfomalar gibi formalin-fikse, parafine gömülü örneklerde kromojenik *in situ* hibridizasyon (CISH) ile kalitatif tespitinde kullanılmak içindir.

ZytoFast human Ig-kappa Probe, poliklonal ve monoklonal lenfoid proliferasyonlar arasında ayırım yapılmasına yardımcı olması için tipik olarak ZytoFast human Ig-lambda Probe (PF31) ile birlikte kullanılır.

ZytoFast human Ig-kappa Probe; ZytoFast PLUS CISH Implementation Kit AP-NBT/BCIP (Ürün No. T-1061-40), ZytoFast PLUS CISH Implementation Kit HRP-DAB (Ürün No. T-1063-40), ya da ZytoFast PLUS CISH Implementation Kit AP-Permanent Red (Ürün No. T-1151-40) isimli ZytoFast PLUS CISH Implementation Kit'lerinden biri ile kombine olarak kullanılmak içindir.

Sonuçların yorumlanması hastanın diğer klinik ve patolojik verileri dikkate alınarak hastanın klinik geçmişi kapsamında yetkin bir patoloj tarafından yapılmalıdır.

2. Klinik bağlantısı

B hücreleri (B lenfositleri olarak da bilinir) kemik iliğinde lenf kök hücrelerinden gelişir. Her B hücresi klonu birbirinin aynısı olan iki ağır ve birbirinin aynısı olan iki hafif zincirden meydana gelen kendine has bir antikor molekülü eksprese eder. Hafif zincirler ya κ - ya da λ -tipidir. Kappa-lambda oranının belirlenmesi neoplastik ve reaktif lenfoid proliferasyonların ayırt edilmesinde fayda sağlar. Batı dünyasının en yaygın hematolojik malinliği olan malin melanomda κ veya λ hafif zincirlerin poliklonal ekspresyonunun monoklonal ekspresyonunun aksine, bir reaktif hiperplazi gösterdiği düşünülür. Ig- κ ve Ig- λ 'nın immünohistokimya ile tespit edilmesi genellikle aşırı zemin boyanması gösterirken *in situ* hibridizasyon gerçekten de zemin boyanması olmayan bir sinyal avantajı sağlayarak belli bir lenfosit popülasyonunun klonallığının güvenli ve basit bir şekilde analiz edilmesine izin verir.

3. Test prensibi

Kromojenik *in situ* hibridizasyon (CISH) tekniği hücre preparatlarında spesifik nükleik asit dizilerinin tespit edilmesine ve görüntülenmesine imkan verir. CISH problemleri denenen hapten-işaretli nükleotid fragmentleri ve preparatlardaki komplementer hedef dizileri birlikte denatüre edilirler ve sonrada hibridizasyon ile birbirine kaynamaları sağlanır. Daha sonra, spesifik olmayan ve bağlanma yapmamış prob fragmentleri güçlü yıkama adımları ile ortamdan uzaklaştırılır. İşaretli probun dupleks oluşumu sekonder polimerize enzim-konjuge antikorlar tarafından tespit edilen primer (işaretsiz) antikorlar kullanılarak görüntülenebilir. Kromojenik substratlar ile meydana gelen enzimatik reaksiyon renkli çöktürmelerin oluşmasına yol açar. Hibridize olmuş probun hücre çekirdeğinin bir çekirdek boyası ile zıt boyanmasından sonra ışık mikroskopunda görüntülenebilir.

4. Sağlanan reaktifler

ZytoFast human Ig-kappa Probe (PF30) şunlardan oluşur:

- Ig-kappa hafif zincir sabit bölgelerini kodlayan mRNA dizilerini hedef alan digoksigenin-işaretli oligonükleotidler (~ 0,2 ng/µl).

ZytoFast human Ig-kappa Probe tek şekilde temin edilir:

- T-1115-400: 0.4 ml (40 reaksiyon, her biri 10 µl)

5. Gerekl diğer malzemeler

- ZytoFast PLUS CISH Implementation Kit AP-NBT/BCIP (Ürün No. T-1061-40) veya ZytoFast PLUS CISH Implementation Kit HRP-DAB (Ürün No. T-1063-40) veya ZytoFast PLUS CISH Implementation Kit AP-Permanent Red (Ürün No. T-1151-40)
- Pozitif ve negatif kontrol örnekleri
- Mikroskop lamaları, pozitif yüklü
- Su banyosu (55°C, 98°C)
- Hibridizasyon cihazı veya sıcak levha
- Hibridizasyon cihazı veya hibridizasyon etüvünde nemli kutu
- Ayarlanabilir, kalibre edilmiş pipetler (10 µl, 100 µl, 1000 µl)
- Boyama kapları veya banyoları
- Zaman Sayacı
- Kalibre edilmiş termometre
- Etanol veya reaktif dereceli alkol
- Ksilen
- Deiyonize veya distile su
- Lamel (22 mm x 22 mm, 24 mm x 60 mm)
- Lastik yalıtım solüsyonu, örn., Fixogum Rubber Cement (Ürün No. E-4005-50/-125) veya benzeri
- Uygun donanımlı ışık mikroskobu (100-200x)

6. Saklama ve kullanma koşulları

2-8°C'de dik olarak saklayın. Kullandıktan sonra hemen saklama koşullarına ulaştırın. Reaktifleri etiketleri üzerinde belirtilen son kullanma tarihlerinden sonra kullanmayın. Ürün, uygun şekilde kullanıldığında ve saklandığında etiketi üzerinde belirtilen son kullanma tarihine kadar kullanılabilir.

7. Uyarılar ve önlemler

- Kullanmadan önce kullanma kılavuzunu okuyun!
- Son kullanma tarihi gelen ürünleri kullanmayın!
- Bu ürün sağlığa zararlı ve potansiyel olarak enfeksiyöz maddeler içerir (düşük konsantrasyonlarda ve hacimlerde). Reaktiflere doğrudan temas etmekten sakının. Uygun önlemleri alın (tek kullanımlık eldiven, koruyucu gözlük ve laboratuvar giysileri giyin)!
- Reaktifler cilt ile temas ederse cildi derhal bol miktarda su ile yıkayın!
- Web sitemizde (www.zytovision.com) bir güvenlik bilgi formu bulunmaktadır.
- Reaktifleri tekrar kullanmayın.
- Örnekler arasında çapraz kontaminasyon olmasından sakının, aksi halde hatalı sonuçlara yol açabilir.
- Hibridizasyon ve yıkama adımları sırasında örneklerin kurumasına izin verilmemelidir.

PF30 için zararlılık ve önlem ifadeleri :

Bu prob 1272/2008 no'lu AB Düzenlemesine göre zararlı olarak sınıflandırılmaz.

8. Sınırlamalar

- Yalnızca vücut dışı (*in vitro*) tıbbi tanı amaçlı kullanım içindir.
- Yalnızca profesyonel kullanım içindir.
- Herhangi bir pozitif boyanmanın veya boyanma olmamasının klinik yorumlaması başka tanı testleri ile birlikte klinik geçmiş, morfoloji ve diğer histopatolojik kriterler kapsamında yapılmalıdır. Preparatın boyanmasında kullanılan CISH problemleri, reaktifler, tanı panelleri ve yöntemleri hakkında bilgi sahibi olmak yetkin bir patoloğun sorumluluğudur. Boyama işlemi onaylı ve lisanslı bir laboratuvarında, boyanmış lamaların incelenmesinden sorumlu olan ve pozitif ve negatif kontrollerin yeterliliğini garanti eden bir patoloğun gözetiminde yapılmalıdır.
- Örneğin boyanması, özellikle de sinyalin yoğunluğu ve zemin boyanması, örneğin boyamadan önce geçtiği işlem ve hazırlık süreçlerine bağlıdır. Kötü fiksasyon, dondurma, çözme, yıkama, kurutma, ısıtma, kesit alma veya diğer örneklerle ya da sıvılarla kontamine etme artefaktlara veya yanlış sonuçlara yol açabilir. Tutarsız sonuçlar fiksasyon ve gömme yöntemlerindeki değişikliklerden ve de örneğin kendi içinde olan düzensizliklerden meydana gelebilir.
- Problemler yalnızca 4. "Sağlanan reaktifler" bölümünde belirtilen hedef dizilerin tespit edilmesi için kullanılmalıdır.
- Ürünün performansı bu kullanma kılavuzunda tanımlanan prosedürler kullanılarak doğrulanmıştır. Bu prosedürlerde yapılan değişiklikler performansı değiştirebilir ve doğrulanması kullanıcı tarafından yapılmalıdır.

9. Etkileşimli maddeler

Aşağıdaki fiksatifler ISH ile uyumlu değildir:

- Bouin's fiksatif
- B5 fiksatif
- Asidik fiksatifler (örn., pikrik asit)
- Zenker's fiksatif
- Alkoller (tek başına kullanıldığında)
- Civa klorür
- Formaldehit/çinko fiksatif
- Hollande's fiksatif
- Tamponsuz formalin

10. Örneklerin hazırlanması

Öneriler:

- Örnekler arasında çapraz kontaminasyon olmasından sakının, aksi halde hatalı sonuçlara yol açılabilir.
- Oda sıcaklığında (18-25°C) 24 saat %10 nötral tamponlu formalin ile fiksasyon.
- Örnek büyüklüğü $\leq 0.5 \text{ cm}^3$.
- En üst kalitede parafin kullanın.
- Gömme işlemi 65°C'den daha düşük sıcaklıklarda yapılmalıdır.
- Mikrotom ile 3-5 μm kalınlığında kesitler alın.
- Pozitif yüklü mikroskop lamaları kullanın.
- 50-60°C'de 2-16 saat fikse edin.

11. Ürünün kullanıma hazırlanması

Ürün kullanıma hazırdır. Yeniden sulandırmaya, karıştırmaya veya dilüsyon yapmaya gerek yoktur. Kullanmadan önce probu hibridizasyon sıcaklığına (55°C) ulaştırın ve iyice karıştırın.

12. Çalışma prosedürü

Örneğin ön işlemi

Örneğin ön işlemini (örn: parafin giderme, proteoliz) ZytoFast PLUS CISH Implementation Kit kullanma kılavuzuna göre yapın.

Denatürasyon ve hibridizasyon

1. Ön işlemi yapılmış örneğin üzerine 10 μl prob pipetleyin.
2. Örnekleri 22 mm x 22 mm lamel ile kapatın (hava kabarcığı bırakmayın) ve lamelin yalıtımını sağlayın.
Yalıtım için lastik solüsyonu (örn: Fixogum) kullanılmasını öneririz.
3. Lamaları bir sıcak levha üzerine ya da bir hibridizasyon cihazına yerleştirin ve örnekleri 75°C'de 5 dakika denatüre edin.
4. Lamaları bir nemli kutuya aktarın ve 55°C'de 1 saat hibridize edin (örn: bir hibridizasyon etüvünde).

Hibridizasyon aşamasında örneklerin kurumaması gerekir.

Hibridizasyon sonrası ve tespit

Hibridizasyon sonrası işlemleri (yıkama, tespit, zıt boyama, kapama, mikroskop incelemesi) ilgili ZytoFast PLUS CISH Implementation Kit kullanma kılavuzuna göre yapın.

13. Sonuçların yorumlanması

ZytoFast PLUS CISH Implementation Kit'leri kullanıldığında hibridize olmuş dioksijenin-işaretleli oligonükleotidler alkalın fosfataz (AP) ve NBT/BCIP ile tespit edildiğinde koyu mavi renkte, AP ve Permanent Red ile tespit edildiğinde parlak kırmızı renkte, ya da horseradish peroksidaz (HRP) ve DAB ile tespit edildiğinde kahverengi görünür.

Plazma B hücrelerinde bir pozitif reaksiyon sitoplazmik boyanma ile belli olur.

Normal lenf dokusunda kappa-lambda oranı kabaca 2:1'dir. Kappa-lambda oranı >3:1 veya <0,3:1 olduğu durumlar monoklonallığın göstergesidir.

Lütfen dikkat:

- Sinyallerin kolayca görülebilmesi için sinyallerin en az 100-büyütmeye görüntülenmesi gerekir.
- Nekroz, üst üste gelen hücre çekirdekleri, aşırı sindirilmiş hücre çekirdekleri ve zayıf sinyal yoğunluğu gösteren hücre çekirdekleri olan bölgeleri değerlendirmeyin.
- Çok sayıda etken negatif veya spesifik olmayan sonuçlara neden olabilir (16 "Sorun giderme" bölümüne bakın).
- Sonuçların doğru yorumlanması için kullanıcı bu ürünü tanı prosedürlerinde kullanmadan önce ulusal ve/veya uluslararası kılavuzlara göre doğrulanmasını yapmalıdır.

14. Önerilen kalite kontrol prosedürleri

İşlenen örneklerin ve test reaktiflerinin doğru performans gösterdiklerini izlemek için her deneye iç ve dış kontroller dahil edilmelidir. İç ve/veya dış kontroller uygun boyanma göstermezse hasta örnekleri ile alınan sonuçlar geçersiz kabul edilmelidir.

İç kontrol: Örnekte bulunan bir plazma B hücresi ya Ig-kappa ya da Ig-lambda boyanma modeli gösterecektir. Örnekte bulunan B hücresi tipinde olmayan hücreler bir boyanma modeli göstermeyecektir.

Dış kontrol: Doğrulanmış pozitif ve negatif kontrol örnekleri.

15. Performans Özellikleri

ZytoFast human Ig-kappa Probe performansı hafif zincir restriksiyon pozitif ve negatif doku örneklerinde kromojenik *in situ* hibridizasyon (CISH) yapılarak değerlendirilmiştir. ZytoFast human Ig-kappa Probe, Ig-lambda (λ) mRNA'sı tespiti için kullanılmıştır. Kullanılan doku örneklerinin hafif zincir restriksiyon durumu referans yöntemler kullanılarak bu çalışmadan önce değerlendirilmiştir.

Analitik duyarlılık: Analitik duyarlılık %100 olarak hesaplanmıştır.

Analitik özgüllük: Analitik özgüllük %100 olarak hesaplanmıştır.

16. Atık bertarafı

Reaktiflerin bertarafı yerel düzenlemelere uygun olarak yapılmalıdır.

17. Sorun giderme

Çalışma talimatlarına uyulmaması hatalı sonuçların alınmasına veya sonuç alınamamasına sebep olabilir.

Zayıf sinyaller veya hiç sinyal bulunmaması

Olası sebep	Önlem
Hücre veya doku örneği doğru fikse olmamış	Fiksasyon süresini ve fiksatif optimize edin
Proteoliz, hibridizasyon, denatürasyon, güçlü yıkama veya antikör inkübasyonu sıcaklığı doğru değil	Kullanılan tüm teknik araçların sıcaklığını kalibre edilmiş bir termometre ile kontrol edin. Sıcaklığı kritik olan solüsyonlarda her zaman aynı sayıda lam kullanın.
Proteolitik ön işlem doğru yapılmamış	Fiksasyonun yapısı ve süresi, kesitlerin kalınlığı ve dokunun/hücrelerin yapısı gibi çok sayıda faktöre bağlı olarak farklı inkübasyon süreleri gerekebilir. Ön denemeler yaparak pepsin inkübasyonu için optimum süreyi belirleyin.
Hibridizasyon süresi çok kısa	Hibridizasyonu en az 1 saat yapın; gerekirse hibridizasyon süresini uzatın.
Çok düşük konsantrasyonlu yıkama tamponu	Yıkama tamponunun konsantrasyonunu kontrol edin.
Dehidrasyon solüsyonları eski	Taze dehidrasyon solüsyonları hazırlayın.
Prob buharlaşması	Bir hibridizasyon cihazı kullanırken ıslak şeritlerin / su dolu haznelerin kullanılması zorunludur. Bir hibridizasyon etüvü kullanırken bir nemli kutunun kullanılması gerekir. Ayrıca, hibridizasyon sırasında örneğin kurummasını önlemek için lamel iyice yalıtılmalıdır (örn. Fixogum ile)
Kromojenik substratın hazırlanması yeterli değil	Ürün No. T-1063-40 veya Ürün No. T-1151-40 kitleleri kullanılırsa: Renk substratlarını damlatarak değil pipet kullanarak hazırlayın.
Renk substratlarının inkübasyonu sıcaklığı doğru değil	Kullanılan tüm teknik araçların sıcaklığını kalibre edilmiş bir termometre ile kontrol edin.
Zıt boyama süresi çok uzun	Zıt boyama süresi örneğin yapısına bağlıdır ve buna göre optimize edilmelidir. Koyu zıt boyanma olmasından kaçının çünkü pozitif boyanma sinyallerini engelleyebilir.
Hedef dizi bulunmuyor	Pepsin inkübasyon süresini doğrulamak için ZytoFast 28S rRNA (+) Control Probe (PF50) gibi pozitif kontrol kullanın. Testin performansını doğrulamak için pozitifliği doğrulanmış doku kullanın.
Zıt boyamada mavileştirme düzgün yapılmamış	Ürün No. T-1063-40 veya Ürün No. T-1151-40 kitleleri kullanılırsa: Mavileştirme için soğuk akan çeşme suyu kullanın; ılık veya sıcak su ya da mavileştirme reaktifleri kullanmayın.

Sinyaller çok kuvvetli

Olası sebep	Önlem
Yapılan proteoliz ön işlemi çok uzun	Fiksasyonun yapısı ve süresi, kesitlerin kalınlığı ve dokunun/hücrelerin yapısı gibi çok sayıda faktöre bağlı olarak farklı inkübasyon süreleri gerekebilir. Ön denemeler yaparak pepsin inkübasyonu için optimum süreyi belirleyin.
Substrat reaksiyonu çok yoğun	Substrat inkübasyon süresini kısıtlayın; substrat solüsyonunu kullanma kılavuzunda verilen sıcaklığın üzerine ısıtmayın.

Sinyaller soluk veya birbirine girmiş

Olası sebep	Önlem
Uygun olmayan kapama solüsyonu kullanılmış	Yalnızca kit ile birlikte verilen veya kullanma kılavuzunda önerilen kapama solüsyonunu kullanın. Yabancı madde içermeyen solüsyonları kullanın; kapama bandı kullanmayın

Düzensiz veya yalnızca bazı kısımlarda çok hafif boyanma

Olası sebep	Önlem
Parafin giderme tamamlanmamış	Taze solüsyonlar kullanın; parafin giderme işleminin süresini kontrol edin
Reaktif hacmi çok düşük	Reaktif hacminin doku alanını kaplamaya yetecek miktarda olmasını sağlayın
Hibridizasyon öncesinde veya kapama sırasında hava kabarcıkları kalmış	Hava kabarcığı bırakmayın

Tutarsız sonuçlar

Olası sebep	Önlem
Probun uygulanmasından önce yeterli kurutma yapılmamış	Havada kuruma süresini uzatın
Pepsinin, antikörlerin ve/veya renk substratlarının uygulanmasından önce doku üzerinde çok fazla su/yıkama tamponu kalmış	Doku kesiti üzerindeki fazla sıvının emdirilerek veya lamı sallayarak giderilmesini sağlayın. Küçük miktardaki su/yıkama tamponu kalıntısı teste etki etmez
Dokunun fiksasyonu ve gömme yöntemlerinde değişiklikler var	Fiksasyon ve gömme yöntemlerini optimize edin
Doku kesiti kalınlığında değişiklikler var	Kesit almayı optimize edin

Doku morfolojisi bozulmuş

Olası sebep	Önlem
Hücre veya doku örneği doğru fikse olmamış	Fiksasyon süresini ve fiksatif optimize edin
Proteolitik ön işlem doğru yapılmamış	Pepsin inkübasyon süresini optimize edin

Kötü zemin

Olası sebep	Önlem
Güçlü yıkama sıcaklığı doğru değil	Kullanılan tüm teknik araçların sıcaklığını kalibre edilmiş bir termometre ile kontrol edin. Sıcaklığı kritik olan solüsyonlarda her zaman aynı sayıda lam kullanın. Sıcaklık inkübasyonu olan adımlarda sekizden fazla lam kullanılmamasını öneririz
Lamlar iyice yıkanmamış	Belirtilen adımlarda taze ve yeterli miktarda yıkama tamponu ve deiyonize veya distile su kullanın.
Kesitler hibridizasyon sırasında veya sonrasında bir zaman kurumuş	Kesitlerin kurumasını önleyin; nemli kutu kullanın; lameli düzgün şekilde yalıtın
Substrat inkübasyon süresi uzun	Substrat inkübasyon süresini düşürün
Parafin giderme tamamlanmamış	Taze solüsyonlar kullanın; parafin giderme işleminin süresini kontrol edin
Proteolitik ön işlem çok güçlü	Pepsin inkübasyon süresini optimize edin
Lamlar hibridizasyondan önce oda sıcaklığına soğutulmuş	Lamları çabucak hibridizasyon sıcaklığına aktarın
Doku-antikör etkileşimi	Doku-spesifik zemin boyanması olup olmadığını görmek için <u>ZytoFast RNA (-) Control Probe (PF33)</u> gibi negatif kontrol problemleri kullanın

Sinyaller üst üste gelmiş

Olası sebep	Önlem
Doku kesitlerinin kalınlıkları uygun değil	3-5 µm kalınlığında mikrotom kesitleri alın

Örnek lama iyi yapışmamış

Olası sebep	Önlem
Lamın kaplaması uygun değil	Uygun lamlar (pozitif yüklü) kullanın
Proteolitik ön işlem çok güçlü	Pepsin inkübasyon süresini düşürün

18. Literatür

- Erber WN, et al. (1993) *Pathology* 25: 63-7.
- Hieter PA, et al. (1980) *Cell* 22: 197-207.
- Hieter PA, et al. (1981) *Nature* 294: 536-40.
- Marti GE, et al. (2005) *Br J Haematol* 130: 325-32.
- McNicol AM, Farquharson MA (1997) *J Pathol* 182: 250-61.
- Pringle JH, et al. (1990) *J Pathol* 162: 197-207.
- Wilkinson DG: *In Situ Hybridization, A Practical Approach*, Oxford University Press (1992) ISBN 0 19 963327 4.

Uzmanlarımız sorularınızı yanıtlamaya hazırdır.
Lütfen helptech@zytovision.com adresine yazınız.



ZytoVision GmbH
Fischkai 1
27572 Bremerhaven/ Germany
Telefon: +49 471 4832-300
Faks: +49 471 4832-509
www.zytovision.com
E-postal: info@zytovision.com

Ticari markalar:

ZytoVision® ve ZytoFast® ZytoVision GmbH'nin ticari markalarıdır.