



ZytoLight

SPEC WT1 Dual Color Break Apart Probe

REF Z-2142-50



5 (0.05 ml)

Floresan *in situ* hibridizasyon (FISH) ile 11p13'teki WT1 genini içeren translokasyonların kalitatif tespiti için



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

1. Kullanım amacı

ZytoLight SPEC WT1 Dual Color Break Apart Probe (PL99) formalin-fikse, parafine gömülü örneklerde 11p13'teki WT1 genini içeren translokasyonların floresan *in situ* hibridizasyon (FISH) ile kalitatif tespitinde kullanılmak içindir. Bu prob ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit (Ürün No. Z-2028-5/-20) 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

WT1 geni 11p13'te yer alır ve hücreSEL veya kromozomal kapsama bağlı olarak bir transkripsiyon aktivatörü ya da represörü olarak çalışan bir zinc-finger DNA-bağlayıcı proteini kodlar. Tümör baskılayıcı gen WT1'de inaktive edici mutasyonlar Wilm's tümörü olan hastalarda ve sporadik kanserlerin bir alt kümesinde tanımlanmıştır. Bununla birlikte, desmoplastik küçük yuvarlak hücreli tümörlerde (DSRCT) WT1 genini etkileyen tekrarlayan translokasyonlar bulunmuştur. DSRCT, esas olarak erkek ergenleri ve genç yetişkinleri etkileyen son derece agresif bir mezenşimal tümördür. T(11;22)(p13;q12.2) translokasyonu gerçekten de test edilen tüm DSRCT'lerde tespit edilebilir ve sonucunda EWSR1 geninin potent transkripsiyon aktivatör kısmının ve WT1 geninin DNA-bağlayıcı zinc-finger kısmının füzyonu meydana gelir. EWSR1-WT1 kimerik proteini *in vitro* olarak hücreleri dönüştürebilme yeteneğinin gösterdiği üzere bir onkojen transkripsiyon faktörü olarak çalışır. EWSR1 yeniden düzenlenmeleri DSRCT'nin %90 kadarında ve de sıklıkla Ewing sakomu gibi diğer küçük yuvarlak mavi hücreli neoplazmlarda bulunurken WT1 translokasyonları yalnızca DSRCT'de bulunur. Bu yüzden, t(11;22)'nin floresan *in situ* hibridizasyon (FISH) ile tespiti DSRCT'nin ayırt edici tanısında değerli bir araçtır.

3. Test prensibi

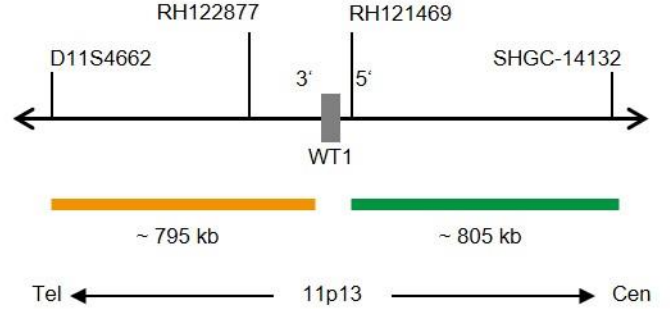
Floresan *in situ* hibridizasyon (FISH) tekniği hücre preparatlarında spesifik nükleik asit dizilerinin tespit edilmesine ve görüntülenmesine izin verir. FISH problemleri denen floresan işaretli DNA fragmentleri ve bunların preparatlardaki komplementer hedef DNA iplikleri birlikte denatüre edilir ve sonra da hibridizasyon sırasında kaynaşmaları sağlanır. Daha sonra da, spesifik olmayan ve bağlanma yapmayan prob fragmentleri güçlü yıkama adımları ile ortadan kaldırılır. DAPI ile DNA'nın zıt boyanmasının ardından, hibridize olmuş prob fragmentleri, FISH prob fragmentlerinin doğrudan işaretlendiği florokromlara spesifik eksitasyon ve emisyon filtreleri bulunan bir floresan mikroskobu ile görüntülenir.

4. Sağlanan reaktifler

ZytoLight SPEC WT1 Dual Color Break Apart Probe şunları içerir:

- ZyGreen (eksitasyon 503 nm/emisyon 528 nm) işaretli polinükleotidler (~10 ng/μl), 11p13* (chr11:32,492,523-33,297,615) konumunda bulunan WT1 kırılma noktası bölgesinin proksimalindeki dizileri hedef alır (bkz. Şekil 1).
- ZyOrange (eksitasyon 547 nm/emisyon 572 nm) işaretli polinükleotidler (~4.5 ng/μl), 11p13* (chr11:31,590,767-32,388,208) konumunda bulunan WT1 kırılma noktası bölgesinin distalindeki dizileri hedef alır (bkz. Şekil 1).
- Formamid tabanlı hibridizasyon tamponu

*Human Genome Assembly GRCh37/hg19 'a göre.



Şekil 1: SPEC WT1 Probe yapısı (ölçekli değildir)

ZytoLight SPEC WT1 Dual Color Break Apart Probe tek şekilde temin edilir:

- Z-2142-50: 0.05 ml (5 reaksiyon, her biri 10 μl)

5. Gerekli diğer malzemeler

- ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit (Ürün No. Z-2028-5/-20)
- Pozitif ve negatif kontrol örnekleri
- Mikroskop lamaları, pozitif yüklü
- Su banyosu (37°C, 98°C)
- Hibridizasyon cihazı veya sıcak levha
- Hibridizasyon cihazı veya hibridizasyon etüvünde nemli kutu
- Ayarlanabilir pipetler (10 μl, 25 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 floresan mikroskobu (400-1000x)
- Floresan mikroskobu için onaylanmış immersiyon yağı
- Uygun filtre setleri

6. Saklama ve kullanma koşulları

2-8°C'de dik olarak ve ışıktan koruyarak saklayın.

Işıktan koruyarak kullanın. 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!
- Profesyonel kullanıcılar için istedikleri takdirde ulaşabilecekleri bir güvenlik bilgi formu bulunmaktadır.
- Reaktifleri tekrar kullanmayın.
- Örnekler arasında çapraz kontaminasyon olmasından sakının, aksi halde hatalı sonuçlara yol açılabilir.
- Prob uzun süreli olarak ışığa, özellikle de güçlü ışığa maruz kalmamalıdır, yani, tüm adımlar mümkün olduğu ölçüde karanlıkta ve/veya ışık geçirmez kutular içinde yürütülmelidir!

Zararlılık ve önlem ifadeleri:

Zararlılık belirleyici bileşen Formamid'tir.



Tehlike

| | |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------|
| H351 | Kansere yol açma şüphesi var. |
| H360FD | Üremeye zarar verebilir. Doğmamış çocukta hasara yol açabilir. |
| H373 | Uzun süreli veya tekrarlı maruz kalma sonucu organlarda hasara yol açabilir. |
| P201 | Kullanmadan önce özel talimatları okuyun. |
| P202 | Bütün önlem ifadeleri okunup anlaşılardan elleçlemeyin. |
| P260 | Tozunu/dumanını/gazını/sisini/buharını/spreyini solumayın. |
| P280 | Koruyucu eldiven/koruyucu kıyafet/göz koruyucu/yüz koruyucu kullanın. |
| P308+P313 | Maruz kalınma veya etkileşme halinde İSE: Tıbbi yardım/bakım alın. |
| P405 | Kilit altında saklayın. |

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 FISH problemleri, reaktifler, tanı panelleri ve yöntemleri hakkında bilgi sahibi olmak yetkin bir patoloğun sorumluluğudur. Boyama işlemi onaylı ve lisanslı bir laboratuvar, 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 değişkenliklerden ve de örneğin kendi içinde olan düzensizliklerden meydana gelebilir.

- Prob yalnızca 4. "Sağlanan reaktifler" bölümünde tanımlanan lokusların tespit edilmesi için kullanılmalıdır.
- Ürünün performansı bu kullanma kılavuzunda tanımlanan prosedürler kullanılarak doğrulanmıştır. Bu prosedürlerde yapılan değişiklikler performansı değiştirebilir ve doğrulaması kullanıcı tarafından yapılmalıdır.

9. Etkileşimli maddeler

Örnek içinde bulunan alyuvarlar otofloresan gösterebilir ve sinyalin tanınmasına engel olabilir.

Aşağıdaki fiksatifler FISH 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:

- Oda sıcaklığında 24 saat %10 nötral tamponlu formalin ile fiksasyon (18-25°C).
- Örnek büyüklüğü $\leq 0.5 \text{ cm}^3$.
- En üst kalitede parafin kullanın.
- Gömme işlemi 65°C'den daha düşük sıcaklıklarda yapılmalıdır.
- Mikrotom ile 2-4 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 probun oda sıcaklığına (18-25°C) ulaşmasına izin verin, ışıktan koruyun. Tüpü açmadan önce vorteks ile çalkalayın ve kısaca spin edin.

12. Çalışma prosedürü

Örneğin ön işlemi

Örneğin ön işlemini (parafin giderme, proteoliz) [ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit](#) kullanma kılavuzuna göre yapın.

Denatürasyon ve hibridizasyon

1. Ön işlemi yapılmış her bir örneğin üzerine 10 μl prob pipetleyin.
 2. Örnekleri 22 mm x 22 mm boyutlarında bir lamel ile kapatın (hava kabarcığı bırakmadan) 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 10 dakika denatüre edin.
 4. Lamaları bir nemli kutuya aktarın ve 37°C'de (örn. bir hibridizasyon etüvünde) gece boyu hibridize edin.

Hibridizasyon aşamasında örneklerin kurumaması gerekir.

Hibridizasyon sonrası

Hibridizasyon sonrası işlemleri (yıkama, zıt boyama, floresan mikroskopu incelemesi) [ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kits](#) kullanma kılavuzuna göre yapın.

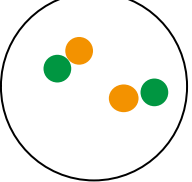
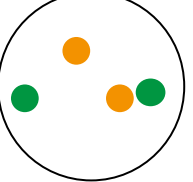
13. Sonuçların yorumlanması

Uygun filtre setleri kullanıldığında probun hibridizasyon sinyalleri yeşil (WT1 kırılma noktası bölgesinin proksimali) ve turuncu (WT1 kırılma noktası bölgesinin distali) olarak gözlenir.

Normal durum: Normal hücrelerin veya WT1 gen bölgesini içeren bir translokasyonu olmayan hücrelerin interfazlarında iki adet yeşil/turuncu birleşik sinyal gözlenir (bknz. Şekil 2).

Anormal durum: Bir translokasyondan etkilenmiş bir WT1 gen bölgesi ayrı bir yeşil sinyal ve ayrı bir turuncu sinyal olarak görülür (bknz. Şekil 2).

Üst üste gelen sinyaller sarı renkli sinyaller olarak görülebilir.

| Yeşil/Turuncu İki Bant Geçişli Filtre Seti | |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
|  |  |
| Normal durum | Anormal durum |

Şekil 2: Normal ve anormal hücre çekirdeklerinde beklenen sonuçlar

Küçük delesyonlar, duplikasyonlar veya inversiyonlardan kaynaklanan genomik anormallikler sonucunda dikkat çekmeyen sinyal modelleri meydana gelebilir.

Bazı anormal örneklerde yukarıda belirtilenden farklı bir sinyal modeli oluşturabilen başka sinyal dağılımları gözlenebilir ve bu varyant yeniden düzenlenmelerini gösterir. Beklenmeyen sinyal modelleri daha fazla araştırılmalıdır.

Lütfen dikkat edin:

- Kromatinin yoğunluğunu kaybetmesinden dolayı tek FISH sinyalleri küçük kümeler gibi görünebilir. Bu yüzden, aralarında 1 sinyal çapından daha düşük veya ona eşit mesafe bulunan aynı büyüklükteki iki veya üç sinyal tek sinyal sayılmalıdır.
- Üst üste olan hücre çekirdeklerini değerlendirmeyin.
- Aşırı sindirilmiş hücre çekirdeklerini (çekirdek içinde görülen karanlık alanlar sayesinde belli olur) saymayın.
- Güçlü otofloresan gösteren hücre çekirdeklerini saymayın; bunlar sinyal tanınmasına engel olurlar.
- Negatif veya spesifik olmayan bir sonuç çok sayıda etken sebebiyle meydana gelebilir (17. Bölüme bakınız).
- Sonuçları doğru yorumlamak için kullanıcı bu ürünü tanı prosedürlerinde kullanmadan önce ulusal ve/veya uluslararası yönergelerle göre doğrulamalıdır.

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: Örnek içindeki normal sinyal modeli gösteren neoplastik olmayan hücreler, örn., fibroblastlar.

Dış kontrol: Doğrulanmış pozitif ve negatif kontrol örnekleri.

15. Performans özellikleri

Doğruluk: Proben hibridizasyon lokasyonu karyotip olarak normal bir erkeğin metafaz yaymalarında değerlendirilmiştir. Test edilen tüm örneklerde prob yalnızca beklenen lokuslara hibridize olmuştur. Başka sinyal veya çapraz-hibridizasyon gözlenmemiştir. Bu yüzden doğruluk %100 olarak hesaplanmıştır.

Analitik duyarlılık: Analitik duyarlılık değerlendirmesinde prob, karyotip olarak normal erkeklerin metafaz yaymalarında değerlendirilmiştir. Test edilen tüm örneklerde tüm hücre çekirdeklerinde beklenen normal sinyal modeli gözlenmiştir. Bu yüzden analitik duyarlılık %100 olarak hesaplanmıştır.

Analitik özgüllük: Analitik özgüllük değerlendirmesinde prob, karyotip olarak normal erkeklerin metafaz yaymalarında değerlendirilmiştir. Test edilen tüm örneklerde tüm sinyaller yalnızca beklenen hedef lokuslara hibridize olmuş, başka lokusa olmamıştır. Bu yüzden 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 alınmamasına sebep olabilir.

Zayıf sinyaller veya hiç sinyal bulunmaması

| Olası sebep | Önlem |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Hedef dizi bulunmuyor | Uygun kontroller kullanın |
| Hücre veya doku örneği doğru fikse olmamış | Fiksasyon süresini ve fiksatif optimize edin veya <i>ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit</i> kullanma kılavuzunun "çalışma prosedürü" kısmında anlatılan fiksasyon sonrası adımı uygulayın |
| Isı ön işlemi, proteoliz, denatürasyon, hibridizasyon veya güçlü yıkama sıcaklığı doğru değil | Kullanılan tüm teknik araçların sıcaklığını kalibre edilmiş bir termometre ile kontrol edin |
| Proteolitik ön işlem doğru yapılmamış | Pepsin inkübasyon süresini optimize edin, gerekirse artırın veya azaltın |
| 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 kurumasını önlemek için lamel iyice yalıtılmalıdır (örn. Fixogum ile) |
| Çok düşük konsantrasyonlu güçlü yıkama tamponu | Güçlü yıkama tamponunun konsantrasyonunu kontrol edin |
| Eski dehidrasyon solüsyonları | Taze dehidrasyon solüsyonları hazırlayın |
| Floresan mikroskopu yanlış ayarlanmış | Doğru ayarlayın |
| Uygun olmayan filtre setleri kullanılmış | Proben florokromlarına uygun filtre setleri kullanın. <i>Üç bant geçişli filtre setleri tek veya iki bant geçişli filtrelere göre daha az ışık sağlar. Sonuç olarak, bu üç bant geçişli filtre setleri kullanıldığında sinyaller daha zayıf görünebilir</i> |
| Probların/floforların ışıktan zarar görmesi | Hibridizasyon ve yıkama adımlarını karanlıkta yapın |

Çapraz hibridizasyon sinyalleri; kötü zemin

| Olası sebep | Önlem |
|---------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Parafin giderme tamamlanmamış | Taze solüsyonlar kullanın; parafin giderme işleminin süresini kontrol edin |
| Proteolitik ön işlem çok güçlü | Pepsin inkübasyon süresini azaltın |
| Alana düşen prob hacmi çok yüksek | Örneğe/alana düşen prob hacmini azaltın, bir yerde fazla olmasını önlemek için probu damlatarak dağıtın |
| Lamlar hibridizasyondan önce oda sıcaklığına soğutulmuş | Lamları çabucak 37°C'ye geçirin |
| Güçlü yıkama tamponunun konsantrasyonu çok yüksek | Güçlü yıkama tamponunun konsantrasyonunu kontrol edin |
| Hibridizasyonu takip eden yıkamanın sıcaklığı çok düşük | Sıcaklığı kontrol edin; gerekirse yükseltin |

| | |
|-----------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|
| İnkübasyon adımları arasında örnekler dehidre olmuş | Lamların yalıtımını sağlayarak ve inkübasyonu nemli ortamda yaparak dehidrasyon olmasını önleyin |
|-----------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|

Doku morfolojisi bozulmuş

| Olası sebep | Önlem |
|--------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Hücre veya doku örneği doğru fikse olmamış | Fiksasyon süresini ve fiksatif optimize edin veya <u>ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit</u> kullanma kılavuzunun "çalışma prosedürü" kısmında anlatılan fiksasyon sonrası adımı uygulayın |
| Proteolitik ön işlem doğru yapılmamış | Pepsin inkübasyon süresini optimize edin, gerekirse artırın veya azaltın |
| Probun uygulanmasından önce yeterli kurutma yapılmamış | Havada kuruma süresini uzatın |

Hücre çekirdekleri üst üste gelmiş

| Olası sebep | Önlem |
|--------------------------------------------|---------------------------------------------|
| Doku kesitlerinin kalınlıkları uygun değil | 2-4 µm kalınlığında mikrotom kesitleri alın |

Örnek lama iyi yapışmamış

| Olası sebep | Önlem |
|--------------------------------|------------------------------------|
| Lamın kaplaması uygun değil | Uygun lamlar kullanın |
| Proteolitik ön işlem çok güçlü | Pepsin inkübasyon süresini düşürün |

Zayıf zıt boyanma

| Olası sebep | Önlem |
|----------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|
| DAPI solüsyonunun konsantrasyonu düşük | <u>DAPI/DuraTect-Solution (ultra)</u> (Ürün No. MT-0008-0.8) kullanın |
| DAPI inkübasyon süresi çok kısa | DAPI inkübasyon süresini ayarlayın |

18. Literatür

- Gerald WL, et al. (1995) *Pro Natl Acad Sci USA* 92: 1028-32.
- Kievits T, et al. (1990) *Cytogenet Cell Genet* 53: 134-6.
- Kim J, et al. (1998) *Oncogene* 16: 1973-9.
- Ladanyi M, Gerald W (1994) *Cancer Res* 54: 2837-40.
- Wang ZY, et al. (1993) *J Biol Chem* 268: 9172-5.
- Wilkinson DG: *In Situ Hybridization, A Practical Approach*, Oxford University Press (1992) ISBN 0 19 963327 4.

Uzmanlarımız sorularınızı yanıtlamaya hazırdır.
Lütfen help@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 ZytoLight® ZytoVision GmbH'nin ticari markalarıdır.