



## FlexISH- Tissue Implementation Kit

**REF** Z-2182-5  $\Sigma$  5

**REF** Z-2182-20  $\Sigma$  20

Herhangi bir FlexISH probu kullanılan floresan *in situ* hibridizasyon (FISH) için



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

### 1. Kullanım amacı

FlexISH-Tissue Implementation Kit FlexISH problemleriyle birlikte formalin-fikse, parafine gömülü örneklerde translokasyonlar, delesyonlar, amplifikasyonlar gibi genetik anormalliklerin ve kromozomal anöploidilerin floresan *in situ* hibridizasyon (FISH) ile tespitinde kullanılmak içindir.

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

### 2. Klinik bağlantısı

Translokasyonlar, delesyonlar ve/veya amplifikasyonlar gibi genetik anormallikler çeşitli insan neoplazmaları ile ilişkilidir.

### 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

FlexISH-Tissue Implementation Kit şunları içerir:

Kod	Bileşen	Miktar		Ambalaj
		20	5	
PT1	<u>Heat Pretreatment Solution Citric</u>	500 ml	150 ml	Vidalı kapaklı şişe (büyük)
ES1	<u>Pepsin Solution</u>	4 ml	1 ml	Damlalıklı şişe, beyaz kapaklı
WB10	<u>5x FlexISH Wash Buffer</u>	500 ml	150 ml	Vidalı kapaklı şişe (büyük)
MT7	<u>DAPI/DuraTect-Solution</u>	0.8	0.2	Reaksiyon kabı, mavi kapak
	Kullanma Kılavuzu	1	1	

**Z-2182-20 (20 test):** ES1 ve MT7 bileşenleri 20 reaksiyon için yeterlidir. WB10 bileşeni her biri 70 ml olan 11x3 boyama kabı için yeterlidir. PT1 bileşeni her biri 70 ml olan 7 boyama kabı için yeterlidir.

**Z-2182-5 (5 test):** ES1 ve MT7 bileşenleri 5 reaksiyon için yeterlidir. WB10 bileşeni her biri 70 ml olan 3x3 boyama kabı için yeterlidir. PT1 bileşeni her biri 70 ml olan 2 boyama kabı için yeterlidir.

### 5. Gerekli diğer malzemeler

- FlexISH probu
- Pozitif ve negatif kontrol örnekleri
- Mikroskop lamları, pozitif yüklü
- Su banyosu (37°C, 98°C)
- Sıcak levha veya hibridizasyon cihazı
- Hibridizasyon etüvü + nemli kutu veya hibridizasyon cihazı
- Ayarlanabilir pipetler (10 µl, 30 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

Kitin bileşenleri 2-8°C'de saklanmalıdır. Ayrıca, DAPI/DuraTect-Solution (MT7) ışıktan koruyarak saklanmalıdır. Bileşenleri kullandıktan sonra hemen saklama koşullarına ulaştırın. Bu saklama koşullarına uyulursa kit en azından etiketi üzerinde yazılı son kullanma tarihine kadar performans kaybı olmaksızın çalışır. Reaktifleri etiketleri üzerinde belirtilen son kullanma tarihlerinden sonra kullanmayın.

### 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.
- Hibridizasyon ve yıkama adımları sırasında örneklerin kurumasına izin verilmemelidir!
- DAPI/DuraTect-Solution (MT7) uzun süreli olarak ışığa, özellikle de güçlü ışığa maruz kalmamalıdır, yani, tüm adımlar mümkün olduğu ölçüde karanlıkta ve/veya ışık geçirmez kutular içinde yürütülmelidir!

**PT1 ve WB10 için zararlılık ve önlem ifadeleri:**

Zararlılık belirleyici bileşen 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 247-500-7] ve 2-methyl-2H-isothiazol-3-one [EC no. 220-239-6] (3:1) maddelerinin karışımıdır.

**Uyarı**

H317	Alerjik cilt reaksiyonlarına yol açar.
P261	Tozunu/dumanını/gazını/sisini/buharını/spreyini solumaktan kaçın.
P272	Kirlenmiş kıyafetleri işyeri dışına çıkarmayın.
P280	Koruyucu eldiven/koruyucu kıyafet/göz koruyucu/yüz koruyucu kullanın.
P302+P352	DERİ İLE TEMAS HALİNDE İSE: Bol sabun ve su ile yıkayın.
P333+P313	Ciltte tahriş veya kaşıntı söz konusu ise: Tıbbi yardım/müdahale alın.
P362+P364	Kirlenmiş giysilerinizi çıkarın ve yeniden kullanmadan önce yıkayın.

**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 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 değişkenliklerden ve de örneğin kendi içinde olan düzensizliklerden meydana gelebilir.
- Ürünün performansı bu kullanma kılavuzunda tanımlanan prosedürler kullanılarak doğrulanmıştır. Bu prosedürlerde yapılan değişiklikler performansı değiştirebilir ve doğrulanması kullanıcı tarafından yapılmalıdır.

**9. Etkileşimli maddeler**

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

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:

- 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  $\mu\text{m}$  kalınlığında kesitler alın.
- Pozitif yüklü mikroskop lamaları kullanın.
- 50-60°C'de 2-16 saat fikse edin.

**11. Ürünün kullanıma hazırlanması**

5x FlexISH Wash Buffer (WB10) 12. "Çalışma prosedürü" maddesine göre önceden hazırlanmalıdır. Kitin diğer tüm reaktifleri kullanıma hazırdır. Yeniden sulandırmaya, karıştırmaya veya dilüsyon yapmaya gerek yoktur.

**12. Çalışma prosedürü****12.1 Birinci gün**

Hazırlık adımları

- (1) *İki etanol serisi hazırlayın (%70, %90 ve %100 etanol solüsyonları):* %100 etanolü deiyonize veya distile su ile seyreltin. Bu solüsyonlar uygun kaplarda saklanabilir ve 160 adet lama kadar yeniden kullanılabilir.
- (2) Heat Pretreatment Solution Citric (PT1): Bir boyama kabını doldurun ve 98°C'ye ısıtın.
- (3) FlexISH Probe: Kullanmadan önce oda sıcaklığına getirin; ışıktan koruyun. Tüpü açmadan önce vorteks ile karıştırın ve kısaca spin edin.

**Ön işlemler (parafin giderme/proteoliz)**

- (1) Lamaları ksilen içinde 2x5 dakika inkübe edin.
- (2) Her birinde 2 dakika olmak üzere %100, %100, %90 ve %70 etanolde inkübe edin.
- (3) Deiyonize veya distile su ile 2x2 dakika yıkayın.
- (4) 98°C'ye önceden ısıtılmış Heat Pretreatment Solution Citric (PT1) içinde 20 dakika inkübe edin.

*Bir boyama kabında sekiz adetten fazla lam kullanılmamasını öneririz. Lamaları içine yerleştirdikten sonra Heat Pretreatment Solution Citric sıcaklığını kontrol edin ve solüsyonun sıcaklığı 95°C'ye ulaşmaz süreyi başlatın.*

- (5) Lamaları hemen deiyonize veya distile suya aktarın, 2x2 dakika yıkayın, suyunu üzerinden aktırın veya emdirerek alın.
- (6) Örneklerle Pepsin Solution (ES1) uygulayın (damlatarak) ve bir nemli kap içinde 37°C'de 15 dakika inkübe edin.

*Fiksasyonun yapısı ve süresi, kesitlerin kalınlığı ve örneklerin yapısı gibi birçok faktöre bağlı olarak farklı inkübasyon süreleri gerekebilir. Bir inkübasyon rehberi olarak 2-30 dakika inkübasyon süresi öneririz. Bir genel kural olarak, proteoliz için optimum sürenin ön denemeler ile belirlenmesini öneririz.*

- (7) Deiyonize veya distile suda 2x2 dakika yıkayın.
- (8) Dehidrasyon: her birinde 1 dakika olmak üzere %70, %90 ve %100 etanol ile yapın.
- (9) Kesitleri havada kurutun.

*Kesitlerin nemli kalması sinyal yoğunluğunu azaltabileceği ve/veya dokunun morfolojisini etkileyebileceği için prob uygulamasından önce kesitleri tamamen kuruttunuzdan emin olun.*

**Denatürasyon ve hibridizasyon**

- (1) Ön işleme yapılmış olan her örneğin üzerine 10 µl FlexISH Probe uygulayın.  
*Probu uzun süre ışığa maruz kalmamasından sakının.*
- (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 ya bir hibridizasyon cihazına ya da etüv içindeki bir nemli kutuya aktarın ve 37°C'de 2 saat ile 16 saat (yani gece boyu) arasında bir süre hibridize edin.

*Hibridizasyon aşamasında örneklerin kurumaması gerekir.*

**12.2 Birinci gün veya İkinci gün****Hazırlık adımları**

- (1) 1x FlexISH Wash Buffer hazırlanması: 1 birim 5x FlexISH Wash Buffer (WB10) solüsyonunu 4 birim deiyonize veya distile su ile seyreltin. Üç adet boyama kabını 1x FlexISH Wash Buffer ile doldurun, kaplardan birini kullanmadan önce 72°C'ye ısıtın ve diğer ikisini oda sıcaklığında tutun.
- (2) DAPI/DuraTect-Solution (MT7): Kullanmadan önce oda sıcaklığına getirin; ışıktan koruyun.

**Hibridizasyon sonrası ve tespit**

- (1) Lastik solüsyonunu veya yapıştırıcıyı dikkatlice sökün.
- (2) Oda sıcaklığındaki 1x FlexISH Wash Buffer içinde 1-2 dakika tutarak lamelleri çıkarın.  
*Lamelin daha kolay çıkmasını sağlamak için bu adım 37°C'de 2 dakika olarak yapılabilir.*
- (3) 72°C'deki 1x FlexISH Wash Buffer ile 10 dakika yıkayın.  
*1x FlexISH Wash Buffer önceden ısıtılmalıdır. Gerekirse bir termometre ile sıcaklığını kontrol edin. Bir boyama kabına sekiz adetden fazla lam koymayın.*
- (4) Oda sıcaklığında 1x FlexISH Wash Buffer ile 3 dakika yıkayın.
- (5) Lamaları her birinde 1 dakika olmak üzere %70, %90 ve %100 etanol içinde inkübe edin.
- (6) Örnekleri ışıktan korunaklı şekilde havada kurutun.
- (7) Lamalara pipetle 25 µl DAPI/DuraTect-Solution (MT7) uygulayın. Hava kabarcığı kalmamasına dikkat ederek örnekleri bir lamel ile (24 mm x 60 mm) kapatın. 15 dakika karanlıkta inkübe edin.  
*Kesilerek açıklığı genişletilmiş bir pipet ucu kullanmak pipetleme işlemini kolaylaştırabilir. Işığa uzun süre maruz kalmamasından sakının.*
- (8) Lamayı karanlıkta muhafaza edin. Uzun süre saklanmak istenirse 2-8°C'de saklanmalıdır.
- (9) Örnek materyalinin değerlendirmesi floresan mikroskopu ile yapılır. Aşağıdaki dalga boyu aralığındaki filtre setleri gereklidir:

Floresan boya	Eksitasyon	Emisyon
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. Sonuçların yorumlanması**

Uygun filtre setleri kullanıldığında normal hücrelerin veya kromozomlarında anormallik olmayan hücrelerin interfazlarında veya metafazlarında her prob/floresan işareti için iki sinyal görülür, ancak X ve/veya Y kromozomlarını hedef alan problemler bunun dışındadır; o durumda her prob/floresan işareti için sinyal cinsiyete bağlı olarak hiç bulunmayabilir ya da bir veya iki adet olabilir. Kromozomal anormallikleri olan hücrelerde interfazlarda veya metafazlarda farklı sinyal modeli görülebilir. Sonuçların yorumlanmasına dair ayrıntılar için lütfen ilgili probun kullanma kılavuzuna başvurun.

**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 boyama 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**

İlgili probun kullanma kılavuzuna başvurun.

**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
Hedef dizi bulunmuyor	Uygun kontroller kullanın
Hücre veya doku örneği doğru fikse olmamış	Fiksasyon süresini ve fiksatif optimize edin
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 kurummasını önlemek için lamel iyice yalıtılmalıdır (örn. Fixogum ile)
Çok düşük konsantrasyonlu FlexISH yıkama tamponu	FlexISH yıkama tamponunun konsantrasyonunu kontrol edin
Eski dehidrasyon solüsyonları	Taze dehidrasyon solüsyonları hazırlayın
Floresan mikroskopu yanlış ayarlanmış	Doğru ayarlayın
Uygun olmayan filtre setleri kullanılmış	Probu 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>
Problar/lamlar çalışırken çok güçlü ışığa maruz kalmış	Hibridizasyon ve yıkama adımlarını karanlıkta yapın

**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
Probu uygulanmasından önce yeterli kurutma yapılmamış	Havada kuruma süresini uzatın

**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 optimize edin
Alana düşen prob hacmi çok yüksek	Kesite/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
FlexISH yıkama tamponunun konsantrasyonu çok yüksek	FlexISH 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

**Sinyaller 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
Lamanın kaplanması uygun değil	Uygun lamlar (pozitif yüklü) 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**

- 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.

Uzmanlarımız sorularınızı yanıtlamaya hazırdır.  
Lütfen [helptech@zytovision.com](mailto: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](http://www.zytovision.com)  
E-postal: [info@zytovision.com](mailto:info@zytovision.com)

**Ticari markalar:**

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