



ZytoLight

SPEC EWSR1/FLI1 TriCheck Probe

REF Z-2183-50



5 (0.05 ml)

Floresan *in situ* hibridizasyon (FISH) ile EWSR1-FLI1 yeniden düzenlenmelerinin kalitatif tespiti için



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

1. Kullanım amacı

ZytoLight SPEC EWSR1/FLI1 TriCheck Probe (PL141) formalin-fikse, parafine gömülü örneklerde 22q12.2'deki insan EWSR1 genini ve 11q24.3'teki insan FLI1 genini içeren yeniden düzenlenmelerin 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 patolojist tarafından yapılmalıdır.

2. Klinik bağlantısı

22q12.2 kromozom bölgesini içeren translokasyonlar Ewing sarkomu veya periferik primitif nöroektodermal tümör (PNET) sahibi hastaların %90-95'inde bulunur. Ewing sarkomu çocuklarda ve genç yetişkinlerde ikinci en yaygın, son derece malin kemik tümörüdür. EWSR1 gen bölgesini içeren en sık translokasyon 22q12.2'de EWSR1 genini FLI1 lokusunun yanına taşıyan t(11;22)(q24;q12.2)'dir. FLI1, transkripsiyon faktörlerinin ETS ailesinin bir üyesidir. EWSR1 daha az sıklıkla, FLI1 ile yakın ilişkili olan ama 21q22.2'de yer alan bir transkripsiyon faktörü olan ERG ile de füzyon yapabilir. Prognoz ve uygun tedavi için Ewing sarkomu/PNET'i klasik nöroblastomdan, Wilms tümöründen ve rabdomyosarkomdan ayırt etmek önemlidir. Histopatoloji tanısı ile kombine olarak EWSR1 yeniden düzenlenmesinin floresan *in situ* hibridizasyon (FISH) ile tespiti Ewing sarkomu/PNET tanısının doğrulanmasında kullanılabilir.

3. Test prensibi

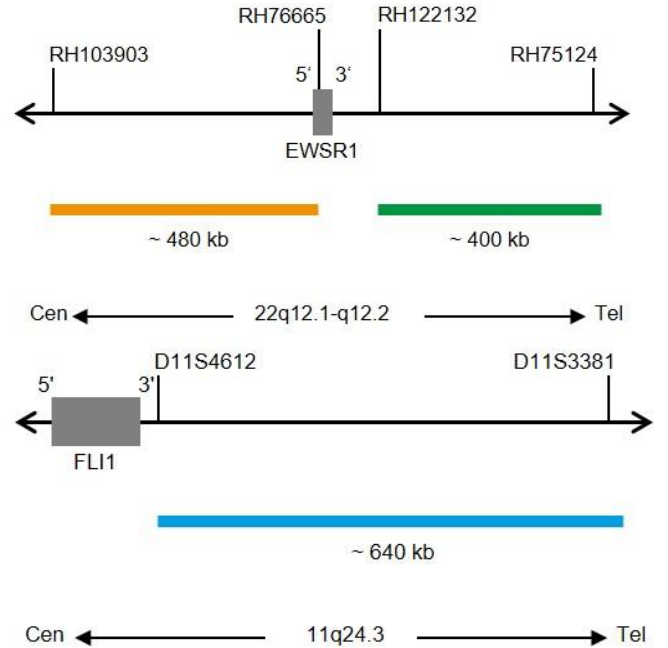
Floresan *in situ* hibridizasyon (FISH) tekniği hücre preparatlarında spesifik nükleik asit dizilerinin tespit edilmesine ve görüntülenmesine izin verir. FISH probları denen floresan işaretli DNA fragmentleri ve bunların preparatlardaki komplementer hedef DNA iplikleri birlikte denatüre edilir ve sonra da hibridizasyon sırasında kaynaşmaları sağlar. 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 EWSR1/FLI1 TriCheck Probe şunları içerir:

- ZyGreen (eksitasyon 503 nm/emisyon 528 nm) işaretli polinükleotidler (~10 ng/μl), 22q12.2* (chr22:29,779,841-30,179,900) konumunda bulunan EWSR1 kırılma noktası bölgesinin distalindeki dizileri hedef alır (bknz. Şekil 1).
- ZyOrange (eksitasyon 547 nm/emisyon 572 nm) işaretli polinükleotidler (~4.5 ng/μl), 22q12.1-q12.2* (chr22:29,191,431-29,673,440) konumunda bulunan EWSR1 kırılma noktası bölgesinin proksimalindeki dizileri hedef alır (bknz. Şekil 1).
- ZyBlue (eksitasyon 418 nm/emisyon 467 nm) işaretli polinükleotidler (~37 ng/μl), 11q24.3* (chr11:128,707,454-129,346,602) konumunda bulunan FLI1 kırılma noktası bölgesinin distalindeki dizileri hedef alır (bknz. Şekil 1).
- Formamid tabanlı hibridizasyon tamponu

*Human Genome Assembly GRCh37/hg19'a göre.



Şekil 1: Üstte: SPEC EWSR1 Probe yapısı, Alttta: SPEC FLI1 Probe (ölçekli değildir)

ZytoLight SPEC EWSR1/FLI1 TriCheck Probe tek şekilde temin edilir:

- Z-2183-50: 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 lamları, 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 anlaşılmadan 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 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.
- 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 fiksatifi
- B5 fiksatifi
- Asidik fiksatifler (örn., pikrik asit)
- Zenker's fiksatifi
- Alkoller (tek başına kullanıldığında)
- Civa klorür
- Formaldehit/çinko fiksatifi
- Hollande's fiksatifi
- 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.

- Lamları bir sıcak levha üzerine ya da bir hibridizasyon cihazına yerleştirin ve örnekleri 75°C'de 10 dakika denatüre edin.
- Lamları 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 mikroskobu incelemesi) ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kits kullanma kılavuzuna göre yapın.

13. Sonuçların yorumlanması

Uygun filtre setleri kullanıldığında probun hibridizasyon sinyalleri yeşil (EWSR1 kırılma noktası bölgesinin distali), turuncu (EWSR1 kırılma noktası bölgesinin proksimali) ve mavi (FLI1 kırılma noktası bölgesinin distali) olarak gözlenir.

Normal durum: Normal hücrelerin veya FLI1-EWSR1 yeniden düzenlenmesi olmayan hücrelerin interfazlarında iki adet yeşil/turuncu birleşik sinyal ve iki mavi sinyal gözlenir (bknz. Şekil 2).

Anormal durum: Bir FLI1-EWSR1 füzyonu bir mavi sinyal ile birlikte bulunan bir ayrı turuncu sinyal ve ayrı bir yeşil sinyal ile belli olur. FLI1'in yer almadığı bir EWSR1 translokasyonu bir yeşil/turuncu birleşik sinyalin ayrılması ve ayrılan turuncu sinyalin bir mavi sinyal ile birlikte bulunmaması ile belli olur (bknz. Şekil 2).

Üst üste gelen yeşil ve turuncu sinyaller sarı sinyaller olarak görülebilir.

	Yeşil/Turuncu İki bant geçişli filtre seti	Mavi Tek bant geçişli filtre seti	Birleştirilmiş görsel veya üç bant geçişli filtre seti
Normal hücreler			
FLI1-EWSR1 füzyonu			
FLI1'in yer almadığı EWSR1 translokasyonu			

Şekil 2: Normal ve anormal hücre çekirdeklerinde beklenen sonuçlar

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 doğrulanmalıdır.

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: Probu 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 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 veya <u>ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit</u> 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 kurummasını 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 mikroskobu yanlış ayarlanmış	Doğru ayarlayın

Uygun olmayan filtre setleri kullanılmış	Probun 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/floroforların 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 ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit 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
Laminin 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	DAPI/DuraTect-Solution (ultra) (Ürün No. MT-0008-0.8) kullanın
DAPI inkübasyon süresi çok kısa	DAPI inkübasyon süresini ayarlayın

18. Literatür

- Berger M, et al. (2013) *PLoS One* 8: e56408.
- Bridge RS, et al. (2006) *Mod Pathol* 19: 1-8.
- de Alava E, et al. (1998) *J Clin Oncol* 16: 1248-55.
- Delattre O, et al. (1992) *Nature* 359: 162-5.
- Kievits T, et al. (1990) *Cytogenet Cell Genet* 53: 134-6.
- Lee J, et al. (2005) *Cancer Genet Cytogenet* 159: 177-80.
- Obata K, et al. (1999) *Genes Chromosomes Cancer* 25: 6-15.
- Romeo S & Dei Tos AP (2010) *Virchows Arch* 456: 219-34.
- Sandberg AA & Bridge JA (2000) *Cancer Genet Cytogenet* 123: 1-26.
- Wilkinson DG: In Situ Hybridization, A Practical Approach, *Oxford University Press* (1992) ISBN 0 19 963327 4.
- Zucman J, et al. (1993) *EMBO J* 12: 4481-7.

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 ZytoLight® ZytoVision GmbH'nin ticari markalarıdır.