



**ZytoMation**

## **ROS1 Dual Color Break Apart FISH Probe**

**REF** Z-2298-5.1ML



20'ye kadar  
(5.1 ml)

Otomatik Bond sistemlerinde floresan *in situ* hibridizasyon (FISH) ile 6q22.1'deki insan ROS1 genini içeren translokasyonların kalitatif tespiti için



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

### 1. Kullanım amacı

**ZytoMation ROS1 Dual Color Break Apart FISH Probe (PL251)** formalin-fikse, parafine gömülü örneklerde 6q22.1'deki insan ROS1 genini içeren translokasyonların floresan *in situ* hibridizasyon (FISH) ile kalitatif tespitinde kullanılmak içindir. Bu prob, Leica Biosystems'ın otomatik Bond-MAX veya Bond III sistemlerinde **Bond FISH Kit** (DS9636) 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

ROS1 (ROS proto-onkogen 1, reseptör tirozin kinaz) geni 6q22.1'de bulunur ve bir reseptör tirozin kinazı kodlar. ROS1'i etkileyen translokasyonlar glioblastoma, kolangiokarsinom ve küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde (NSCLC) tespit edilmiştir. NSCLC'da birkaç ROS1 translokasyon partneri tespit edilmiştir ve bunların hepsinin sonucunda TPM3, SDC4, SLC34A2, CD74, EZR veya LRIG3 gibilerinin çeşitli kesilmiş formlarının ROS1'in kinaz kısmına füzyonu meydana gelir. NSCLC'da GOPC'nin de ROS1 ile füzyon yaptığı bulunmuştur. GOPC-ROS1 füzyonları 6q22.1'de yaklaşık 240 kb'ın interstitiyal delesyonu sonucunda meydana gelir. ROS1 yeniden düzenlenmelerinin, ALK yeniden düzenlenmesi bulunan NSCLC hastalarında gözlenene benzer farklı klinik özelliklere sahip bir moleküler NSCLC alt kümesini tanımladığı düşünülür. İlk kanıt, ROS1 kinaz inhibitörlerinin verilmesinin aktive edici ROS1 yeniden düzenlenmeleri bulunan NSCLC hastalarında çok etkili bir terapötik strateji sağlayabileceğini ileri sürer. Buna göre, ROS1 yeniden düzenlenmelerinin floresan *in situ* hibridizasyon (FISH) ile tespit edilmesi ROS1 kinaz hedefli terapilere yanıt vermesi olası hastaların belirlenmesinde yararlı bir araç olabilir.

### 3. Test prensibi

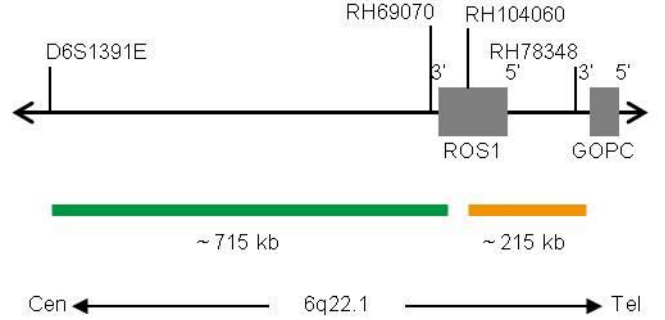
Floresan *in situ* hibridizasyon (FISH) tekniği hücre preparatlarında spesifik nükleik asit dizilerinin tespit edilmesine ve görüntülenmesine izin verir. FISH problemleri denen floresan işaretli DNA fragmentleri ve bunların preparatlardaki komplementer hedef DNA iplikleri birlikte denatüre edilir ve 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 zit 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

**ZytoMation ROS1 Dual Color Break Apart FISH Probe** şunları içerir:

- ZyGreen (eksitasyon 503 nm/emisyon 528 nm) işaretli polinükleotidler (~6,0 ng/μl) 6q22.1\* (chr6:116,912,298-117,627,255) konumunda bulunan ROS1 kırılma noktası bölgesinin proksimalindeki dizileri hedef alır (bknz. Şekil 1).
- ZyOrange (eksitasyon 547 nm/emisyon 572 nm) işaretli polinükleotidler (~2,5 ng/μl) 6q22.1\* (chr6:117,659,135-117,871,701) konumunda bulunan ROS1 kırılma noktası bölgesinin distalindeki dizileri hedef alır.
- Formamid tabanlı hibridizasyon tamponu

\*Human Genome Assembly GRCh37/hg19 'a göre.



**Şekil 1: ROS1 Probe yapısı (ölçekli değildir)**

**ZytoMation ROS1 Dual Color Break Apart FISH Probe** tek şekilde temin edilir:

- Z-2298-5.1ML: 5,1 ml (her biri 240 μl olarak 20 reaksiyona kadar)

### 5. Gerekli diğer malzemeler

- Tam otomatik Bond-MAX sistemi (Leica Biosystems)
- **Bond FISH Kit** (DS9636)
- **DAPI/DuraTect-Solution** (MT-0007-0.8)
- Pozitif ve negatif kontrol örnekleri
- Mikroskop lamaları, pozitif yüklü
- Ayarlanabilir pipetler (25 μl, 1000 μl)
- Boyama kapları veya banyoları
- Zaman Sayacı
- Etanol veya reaktif dereceli alkol
- Deiyonize veya distile su
- Lamel (24 mm x 60 mm)
- Uygun donanımlı floresan mikroskobu (400-1000x)
- Floresan mikroskobu için onaylanmış immersiyon yağı
- Uygun filtre setleri

Gerekli diğer malzemeler hakkında daha fazla bilgi edinmek için ilgili tam otomatik boyama sisteminin kullanma kılavuzuna başvurun.

### 6. Saklama ve kullanma koşulları

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

İşıktan koruyarak kullanın. Kapağını açmadan önce şişeyi silkeleyerek sıvının kapaktan aşağı inmesini sağlayın. 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 manuel FISH prosedürlerinde kullanılmaz!
- 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 değişkenliklerden ve de örneğin kendi içinde olan düzensizliklerden meydana gelebilir.
- Prob yalnızca 4. "Sağlanan reaktifler" bölümünde tanımlanan lokusların tespit edilmesi için kullanılmalıdır.

- Ürünün performansı tam otomatik Bond-MAX sistemi (Leica) ve bu kullanma kılavuzunda tanımlanan prosedürler kullanılarak doğrulanmıştır. Bu prosedürlerde yapılan değişiklikler CE-IVD performansını değiştirebilir ve doğrulaması kullanıcı tarafından yapılmalıdır. Bu IVD ürün, yalnızca bu kullanma kılavuzunda belirtilen şekilde ve kullanım amacına uygun olarak kullanıldığında CE uygunluğuna sahiptir.

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

## 11. Ürünün kullanıma hazırlanması

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 nazıkçe silkeleyerek sıvıyı şişenin aşşağısında toplayın.

## 12. Çalışma prosedürü

ZytoMation ROS1 Dual Color Break Apart FISH Probe tam otomatik boyama sisteminde ilgili FISH kitleri ve FISH protokolleri ile kullanılmak içindir. Daha fazla bilgi için lütfen kullanılan sistemin kullanma talimatlarına başvurun.

### Örneğin ön işlemi

Örneğin ön işlemini (parafin giderme, proteoliz) tam otomatik boyama sisteminin kullanma kılavuzuna göre yapın.

*Örneğe bağlı olarak protokolda ayarlamalar yapmak gerekebilir. Önerilen protokollerin dışına çıkan protokollerin doğrulanması kullanıcı tarafından yapılmalıdır.*

### Denatürasyon ve hibridizasyon

Enzim sindirimi ve ısı ile ön işlem için kullanıcının örneğe bağlı olarak önceden doğruladığı koşullara uygun bir protokolü kullanın.

1. Örneklerin denatürasyonunu 75°C'de 20 dakika olarak ayarlayın.  
*Denatürasyon protokolü olarak otomatik Bond-MAX sisteminin kullanma talimatında anlatılan şekilde yeni bir protokol oluşturun.*
2. Örneklerin hibridizasyonunu 45°C'de 2 saat olarak ayarlayın.  
*Hibridizasyon protokolü olarak otomatik Bond-MAX sisteminin kullanma talimatında anlatılan şekilde yeni bir protokol oluşturun.*
3. Kullanma kılavuzuna uygun olarak lamaları, FISH problemlerini, dilüe enzimi ve **BOND FISH Kit'i** sisteme yükleyin.
4. Boyama işlemi tamamlandığında lamaları cihazdan alın. Lamaları ışıktan koruyun.
5. %70, %90 ve %100 etanolde birer dakika dehidrasyon yapın.
6. Örnekleri karanlık ortamda havada kurutun.

7. Lamaları üzerine 25 µl DAPI/DuraTect-Solution (MT7) pipetleyin. Hava kabarcığı bırakmadan örneği bir lamel ile (24 mm x 60 mm) kapatın. Karanlıkta 15 dakika inkübe edin.

*Ucu kesilerek genişletilmiş bir pipet ucu kullanılarak daha kolay pipetleme yapılabilir. Uzun süre ışığa maruz kalmasından sakının.*

8. Lamayı karanlıkta muhafaza edin. Uzun süreli saklama 2-8°C'de olmalıdır.
9. Örneğin incelenmesi floresan mikroskopunda yapılır.

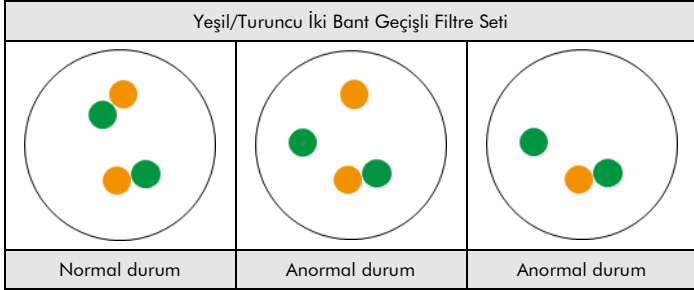
### 13. Sonuçların yorumlanması

Uygun filtre setleri kullanıldığında probun hibridizasyon sinyalleri yeşil (ROS1 kırılma noktası bölgesinin proksimali) ve turuncu (ROS1 kırılma noktası bölgesinin distali) olarak gözlenir.

**Normal durum:** Normal hücrelerin veya ROS1 gen bölgesini içeren translokasyonu olmayan hücrelerin interfazlarında iki yeşil/turuncu birleşik sinyal gözlenir (bkz. Şekil 2).

**Anormal durum:** Bir translokasyondan etkilenmiş bir ROS1 gen bölgesi ayrı bir yeşil sinyal ve ayrı bir turuncu sinyal le belli olur. İzole yeşil sinyaller ROS1 kırılma noktası bölgesinin distalindeki delesyonların veya bu kromozom bölgesini etkileyen dengesiz translokasyonların sonucudur (bkz. Şekil 2).

*Üst üste gelen sinyaller sarı renkli sinyaller olarak görülebilir.*



**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 uluslar arası 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

Proburn performansı eşdeğeri olan IVD onaylı FISH probu ile karşılaştırılarak belirlendi. %100 uyum görüldü.

**Doğruluk:** Doğruluk %100 olarak hesaplanmıştır.

**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 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
Proteolitik ön işlem doğru yapılmamış	Enzim konsantrasyonunu ve inkübasyon süresini optimize edin, gerekirse artırın veya azaltın
Eski dehidrasyon solüsyonları	Taze dehidrasyon solüsyonları hazırlayın
Floresan mikroskopu yanlış ayarlanmış	Doğru ayarlayın
Uygun olmayan filtre setleri kullanılmış	Proburn 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
Proteolitik ön işlem çok güçlü	Pepsin inkübasyon süresini azaltın

#### Doku morfolojisi bozulmuş

Olası sebep	Önlem
Hücre veya doku örneği doğru fikse olmamış	Fiksasyon süresini ve fiksatif optimize edin
Proteolitik ön işlem doğru yapılmamış	Enzim konsantrasyonunu ve inkübasyon süresini optimize edin, gerekirse artırın veya azaltın
Isı ön işlemi doğru yapılmamış	Isı ön işlemini optimize edin

#### 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 lamalar kullanın
Doku kesiti yeterince kurutulmamış	Boyamadan önce dokuların yeterince kuruması için süreyi ayarlayın

Doğru Şekilde n6tral tamponlanmamıŐ formalin ile fiksasyon yapılmıŐ	Yüksek kaliteli n6tral tamponlu formalin kullanın
---	---

#### 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

- Bergethon K, et al. (2012) *J Clin Oncol* 30: 863-70.
- Birchmaier C, et al. (1987) *Proc Natl Acad Sci* 84: 9270-74.
- Bos M, et al. (2013) *Lung Cancer* 81: 142-3.
- Kievits T, et al. (1990) *Cytogenet Cell Genet* 53: 134-6.
- Lee SE, et al. (2015) *Mod Pathol* 28: 468-79.
- Rikova K, et al. (2007) *Cell* 131: 1190-203.
- Rimkunas VM, et al. (2012) *Clin Cancer Res* 18: 4449-57.
- Suehara Y, et al. (2012) *Clin Cancer Res* 18: 6599-608.
- Takeuchi K, et al. (2012) *Nat Med* 18: 378-81.
- 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 ZytoMation® ZytoVision GmbH'nin ticari markalarıdır.