



ZytoMation

BCL6 Dual Color Break Apart FISH Probe

REF Z-2313-5.1ML

20 teste kadar
(5.1 ml)

3q27.3'teki insan BCL6 genini içeren translokasyonların floresan *in situ* hibridizasyon (FISH) ile otomatik Bond sistemlerinde kalitatif tespiti için



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

1. Kullanım amacı

ZytoMation BCL6 Dual Color Break Apart FISH Probe (PL267), formalin-fikse, parafine gömülü örneklerde 3q27.3'teki insan BCL6 genini içeren translokasyonların floresan *in situ* hibridizasyon (FISH) ile kalitatif tespitinde kullanılmak içindir. Bu prob Bond FISH Kit (DS9636) ile kombine olarak Leica Biosystems'in otomatik Bond-MAX veya Bond III sistemlerinde kullanılmak içindir.

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

2. Klinik bağlantısı

BCL6 proteini lenfoid gelişiminin ve işlevinin regülasyonunda yer alan bir transkripsiyonel baskılayıcı olarak iş görür. BCL6 gen bölgesinin kromozomal yeniden düzenlenmesinin difüz büyük B-hücreli lenfoma (DLBCL) ve foliküler lenfoma (FL) dahil olmak üzere non-Hodgkin lenfomanın (NHL) farklı tiplerinde meydana geldiği bulunmuştur. En yaygın BCL6 translokasyonu t(3;14)(q27;q32.3), IGH-BCL6 gen füzyonu ile sonuçlanır. Buna ek olarak, immünooglobulin (Ig) genlerini ve ayrıca birkaç non-Ig genini içeren 20'den fazla partner lokusu tanımlanmıştır. Bu translokasyonların sonucunda, yeniden düzenlenmiş BCL6 geni partner genin promotörünün kontrolü altına girer ve BCL6'nın ekspresyonu dereğüle olur. NHL'nin en yaygın histolojik alt tipi olan DLBCL'de tüm vakaların %20 ila %40'ında meydana gelen BCL6 translokasyonları en sık meydana gelen sitogenetik anormalliklerden biridir. Birçok çalışma BCL6 translokasyonu ile düşük toplam sağkalım arasında bir ilişki olduğunu bildirmiştir. Dahası, hem BCL6 hem de MYC yeniden düzenlenmeleri bakımından pozitif olan DLBCL'lerin son derece zayıf prognoza sahip oldukları gösterilmiştir. Bu nedenle, BCL6 yeniden düzenlenmelerinin floresan *in situ* hibridizasyon ile tespit edilmesi NHL hastalarının klinik akibetinin öngörülmesine yardım sağlayabilir.

3. Test prensibi

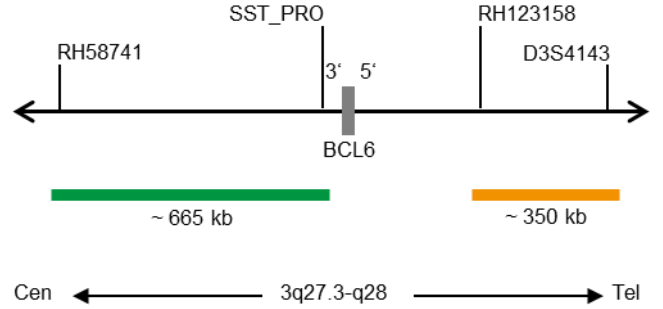
Floresan *in situ* hibridizasyon (FISH) tekniği hücre preparatlarında spesifik nükleik asit dizilerinin tespit edilmesine ve görüntülenmesine izin verir. FISH problemleri denen floresan işaretli DNA fragmentleri ve bunların preparatlardaki komplementer hedef DNA iplikleri birlikte denatüre edilir ve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

ZytoMation BCL6 Dual Color Break Apart FISH Probe şunları içerir:

- ZyGreen (eksitasyon 503 nm/emisyon 528 nm) işaretli polinükleotidler (~6.0 ng/μl), 3q27.3* (chr3:186,737,897-187,403,834) konumunda bulunan BCL6 kırılma noktası bölgesinin proksimalindeki dizileri hedef alır (bknz. Şekil 1).
- ZyOrange (eksitasyon 547 nm/emisyon 572 nm) işaretli polinükleotidler (~2.5 ng/μl), 3q27.3-q28* (chr3:187,744,962-188,097,195) konumunda bulunan BCL6 kırılma noktası bölgesinin distalindeki dizileri hedef alır (bknz. Şekil 1).
- Formamid tabanlı hibridizasyon tamponu

*Human Genome Assembly GRCh37/hg19 'a göre.



Şekil 1: SPEC BCL6 Probe yapısı (ölçekli değildir)

ZytoMation BCL6 Dual Color Break Apart FISH Probe tek şekilde temin edilir:

- Z-2313-5.1ML: 5.1 ml (20 reaksiyona kadar, her biri 240 μl)

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 başvurunuz.

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 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) üzerinde ve bu kullanma kılavuzunda tanımlanan prosedürler kullanılarak doğrulanmıştır. Bu prosedürlerde yapılan değişiklikler CE-IVD performansını değiştirebilir ve doğrulaması kullanıcı tarafından yapılmalıdır. Bu vücut dışı tanı cihazı (IVD) kullanım amacına uygun olarak ve kullanma kılavuzunda verilen şekilde kullanıldığı takdirde 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 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

ZytoMation BCL6 Dual Color Break Apart FISH Probe tam otomatik boyama sistemlerinde ilgili FISH kitleri ve FISH protokolleri ile kombine olarak kullanılmak içindir. Daha fazla bilgi edinmek için lütfen kullandığınız sistemin kullanma kılavuzuna başvurunuz.

Örneğin ön işlemi

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

Örnek tipine bağlı olarak protokolda düzenlemeler yapılması gerekebilir. Önerilen protokollerin dışına çıkan protokoller kullanıcı tarafından doğrulanmalıdır.

Denatürasyon ve hibridizasyon

Enzim ile sindirim veya ısı ile ön işlem için örneğe bağlı olarak kullanıcı tarafından daha önce doğrulanmış koşullara uygun bir protokol seçin.

1. Örneklerin denatürasyonunu 75°C'de 20 dakikaya ayarlayın.

Denatürasyon protokolü için otomatik Bond-MAX sisteminin kullanma talimatlarına göre yeni bir protokol oluşturun.

2. Örneklerin hibridizasyonunu 45°C'de 2 saate ayarlayın.

Hibridizasyon protokolü için otomatik Bond-MAX sisteminin kullanma talimatlarına göre yeni bir protokol oluşturun.

3. Lamları, FISH probunu, enzim solüsyonunu, BOND FISH Kit'i talimatlara uygun olarak sisteme yükleyin.
4. Boyama tamamlandığında lamları cihazdan çıkarın. Lamları ışıktan koruyun.
5. Lamları her birinde 1'er dakika olacak şekilde %70, %90 ve %100 etanol ile dehidre edin.
6. Örnekleri karanlık ortamda havada kurutun.
7. Lamların üzerine pipet ile 25 µl DAPI/DuraTect-Solution (MT7) koyun. Hava kabarcığı kalmamasına dikkat ederek lamları bir lamel ile (24 mm x 60 mm) kapatın. Karanlıkta 15 dakika bekletin.

Ucu kesilerek genişletilmiş bir pipet ucu kullanmak işi kolaylaştırabilir. Uzun süre işiğe maruz kalmasından sakının.

8. Lamları karanlıkta saklayın. Daha uzun süre için 2-8°C'de saklayın.
9. Örneklerin incelenmesi floresan mikroskopunda yapılır.

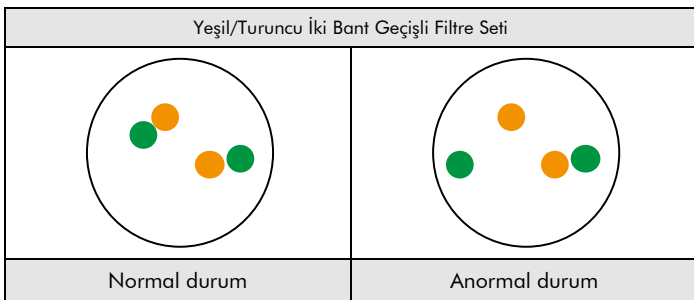
13. Sonuçların yorumlanması

Uygun filtre setleri kullanıldığında probun hibridizasyon sinyalleri yeşil (BCL6 kırılma noktası bölgesinin proksimali) ve turuncu (BCL6 kırılma noktası bölgesinin distali) olarak gözlenir.

Normal durum: Normal hücrelerin veya BCL6 gen bölgesini içeren bir translokasyonu olmayan hücrelerin interfazlarında iki adet yeşil/turuncu birleşik sinyal gözlenir (bkz. Şekil 2).

Anormal durum: Bir translokasyondan etkilenmiş bir BCL6 gen bölgesi aynı bir yeşil sinyal ve aynı bir turuncu sinyal olarak görülür (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 uluslararası yönergelere 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

Probu performans eşdeğeri olan IVD onaylı prob ile karşılaştırılarak belirlenmiştir. Uyum %100'dür.

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 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 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 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 <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
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	<u>DAPI/DuraTect-Solution (ultra)</u> (Ürün No. MT-0008-0.8) kullanın
DAPI inkübasyon süresi çok kısa	DAPI inkübasyon süresini ayarlayın

18. Literatür

- Akyurek N, et al. (2012) *Cancer* 118: 4173-83.
- Cady FM, et al. (2008) *J Clin Oncol* 26: 4814-9.
- Kievits T, et al. (1990) *Cytogenet Cell Genet* 53: 134-6.
- Ohno H (2004) *Histol Histopathol* 19: 637-50.
- Ohno H (2006) *J Clin Exp Hematop* 46: 43-53.
- 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.