

Sondy LSI® DNA (ang. *Locus Specific Identifier*)

Odczynnik dla swoistego analitu (ang. *Analyte Specific Reagent, ASR*). Nie oszacowano danych analitycznych oraz nie podano szczegółowej charakterystyki odczynnika.

Sondy LSI zawierają sekwencje sond DNA, homologiczne do swoistych regionów DNA, sekwencji genów lub *loci*, oraz są bezpośrednio znakowane jednym z fluorochromów Vysis®. Sonda taka zawiera nieznakowane blokujące DNA, które służy do tłumienia sekwencji zawartych w *loci*, wspólnych dla innych chromosomów. Po przeprowadzeniu hybrydyzacji i wizualizacji, sondy te wykrywają specyficzne zmiany, takie jak amplifikacje, delecje lub translokacje, w określonych genach, *loci* lub chromosomach.

Odczynnik: ASR

Numer katalogowy: nr kat. odczynnika ASR znajduje się na buteleczce z odczynnikiem: 1N2320, 1N2420, 5J2779, 5J2707, 8N7820

Komponent	Ilość †	Skład	Warunki przechowywania
Sonda LSI DNA Odczynnik: Do użytku laboratoryjnego	20 µl	Znakowana fluorochromem sonda dla swoistego <i>loci</i> oraz blokujące DNA, zanurzone w buforze Tris-EDTA	–20 °C, bez dostępu światła
Bufor hybrydyzacyjny LSI/WCP®	150 µl	Siarczan dekstranu, formamid, SSC (pH 7,0)	–20 °C

Niektóre sondy LSI zawierają bufor hybrydyzacyjny LSI/WCP i są dostępne w opakowaniach o pojemności 200 µl.

Karty charakterystyki substancji niebezpiecznych (ang. *Material Safety Data Sheets, MSDS*) wszystkich dostarczonych odczynników dostępne są w Dziale Obsługi Klienta firmy Abbott.

Uniwersalne odczynniki wymagane, lecz nie dostarczone

20X SSC	Nr kat. 32-804850	500 g
barwnik DAPI II	Nr kat. 32-804831	2 x 500 µl (125 ng/ml)
NP-40	Nr kat. 32-804818	2 x 1000 µl
barwnik jodek propidyny (PI)	Nr kat. 32-804829	2 x 500 µl (400 µg/ml)
100% etanol (EtOH)		
12N HCl		
1N NaOH		
formamid, ultraczysty		
oczyszczona woda (destylowana lub dejonizowana)		

Ostrzeżenia i środki ostrożności: Fluorochromy są z łatwością degradowane przez ekspozycję na światło. Ograniczenie dostępu światła do wszystkich roztworów i preparatów zawierających fluorochromy zmniejsza tę degradację. Wszystkie etapy badania niewymagające światła do ich przeprowadzenia, takie jak inkubacje i przemywania, należy przeprowadzać w ciemności.

Warunki przechowywania odczynnika ASR: Odczynnik ASR należy przechowywać w temp. –20 °C, bez dostępu światła. Data ważności odczynnika ASR znajduje się na opakowaniu oraz na buteleczce.

Czystość i jakość odczynnika: Ogólna metoda oznaczania jakości odczynnika

Poniższa procedura została walidowana przy użyciu pochodzących z hodowli komórek limfocytów krwi obwodowej i służy do oznaczania jakości odczynników ASR.

Przygotowanie odczynników

UWAGA: Tam gdzie zaznaczono, przeprowadzać pomiar pH w temperaturze pokojowej. O ile nie wskazano inaczej, należy używać pHmetru z elektrodami szklanymi.

Roztwór 20X SSC

Dokładnie wymieszać 132 g 20X SSC w 400 ml oczyszczonej wody. Zmierzyć pH roztworu i doprowadzić do wartości pH 5,3 używając HCl. Dodać oczyszczoną wodę, aby uzyskać objętość końcową 500 ml. Uzyskany roztwór przechowywać w temperaturze pokojowej. Nie stosować dłużej niż 6 miesięcy od przygotowania lub w przypadku stwierdzenia zmętnienia bądź zanieczyszczeń.

Roztwór 2X SSC

Dokładnie wymieszać 100 ml 20X SSC (pH 5,3) z 850 ml oczyszczonej wody. Zmierzyć pH uzyskanego roztworu i doprowadzić do wartości pH $7,0 \pm 0,2$ używając NaOH. Dodać oczyszczoną wodę, aby uzyskać objętość końcową 1 litra. Uzyskany roztwór przechowywać w temperaturze pokojowej. Nie stosować dłużej niż 6 miesięcy od przygotowania lub w przypadku stwierdzenia zmętnienia bądź zanieczyszczeń.

Roztwór płuczący 2X SSC / 0,1% NP-40

Dokładnie wymieszać 100 ml 20X SSC (pH 5,3) z 850 ml oczyszczonej wody. Dodać 1 ml NP-40. Zmierzyć pH uzyskanego roztworu i doprowadzić do wartości pH $7,0 \pm 0,2$ używając NaOH. Dodać oczyszczoną wodę, aby uzyskać objętość końcową 1 litra. Uzyskany roztwór przechowywać w temperaturze pokojowej. Nie stosować dłużej niż 6 miesięcy od przygotowania lub w przypadku stwierdzenia zmętnienia bądź zanieczyszczeń.

Roztwór do denaturacji (70% formamid / 2X SSC)

W szklanym naczyniu Coplina dokładnie wymieszać 49 ml formamidu, 7 ml 20X SSC (pH 5,3) i 14 ml oczyszczonej wody. Zmierzyć pH używając pasków do pomiaru i upewnić się, że pH roztworu mieści się w przedziale 7,0–8,0. Przechowywać w zamkniętym naczyniu w temp. 2-8 °C. Nie stosować dłużej niż 7 dni, resztę usunąć.

Roztwory etanolu (70%, 85%, 100%)

Przygotować powyższe rozcieńczenia (v/v) ze 100% etanolu w oczyszczonej wodzie. Przechowywać w zamkniętym naczyniu, w temperaturze pokojowej. Nie stosować dłużej niż 6 miesięcy od przygotowania, resztę usunąć.

Roztwór płuczący zawierający formamid (50% formamid / 2 X SSC) do procedury płukania formamidem

Dokładnie wymieszać 105 ml formamidu, 21 ml 20X SSC (pH 5,3) oraz 84 ml oczyszczonej wody. Zmierzyć pH roztworu używając pasków do pomiaru i upewnić się, że pH roztworu mieści się w przedziale 7,0–8,0. Wlać jednakową ilość roztworu do każdego z trzech szklanych naczynek Coplina z pokrywkami. Oznaczyć naczynka jako "1," "2" i "3". Przechowywać w zamkniętym naczyniu w temp. 2-8 °C. Nie stosować dłużej niż 7 dni, resztę usunąć.

Roztwór płuczący 0,4X SSC / 0,3% NP-40 do szybkiej procedury płukania

Dokładnie wymieszać 20 ml 20X SSC (pH 5,3) z 950 ml oczyszczonej wody. Dodać 3 ml NP-40. Mieszać do całkowitego rozpuszczenia NP-40. Zmierzyć pH uzyskanego roztworu i doprowadzić do wartości pH 7,0- 7,5 używając NaOH. Dodać oczyszczoną wodę do uzyskania końcowej objętości 1 litra. Uzyskany roztwór przechowywać w temperaturze pokojowej. Nie stosować dłużej niż 6 miesięcy od przygotowania lub w przypadku stwierdzenia zmętnienia bądź zanieczyszczeń.

Uwagi dotyczące procedury: Przed użyciem wszystkie odczynniki powinny zostać rozmrożone w temperaturze pokojowej, a następnie każdą probówkę należy odwirować przez 2-3 sekundy w standardowej, wysokoobrotowej mikrowirówce.

Procedura oznaczania jakości odczynnika

Przygotować trzy naczynia Coplina: wlać 70 ml 100% EtOH do jednego naczynia, 70 ml 85% EtOH do drugiego i 70 ml 70% EtOH do trzeciego naczynia. Używać w temperaturze pokojowej. Wylać po 7 dniach lub w przypadku nadmiernego rozcieńczenia bądź wyparowania roztworu.

Dla uzyskania dobrego rezultatu należy upewnić się, czy odczynniki zostały przygotowane i są używane w odpowiednich temperaturach opisanych w ulotce.

Pomiar temperatury powinien być wykonany wewnątrz naczynia za pomocą skalibrowanego termometru.

Podczas wykonywania hybrydyzacji z równoczesnym użyciem sond CEP® i LSI w celu oznaczenia jakości odczynnika należy postępować zgodnie z protokołem ustalonym dla LSI.

Przygotowanie próbki docelowej

UWAGA: Roztwór do denaturacji umieszczony w naczyniach Coplina doprowadzić do temperatury pokojowej. Umieścić naczynka z roztworem w łaźni wodnej o temp. 73 ± 1 °C na ok. 30 minut przed użyciem, aby roztwór osiągnął wymaganą temperaturę.

1. Zaznaczyć obszar hybrydyzacji na preparacie przy użyciu znacznika z diamentową końcówką.
2. Upewnić się, że temperatura roztworu denaturującego wynosi 73 ± 1 °C.
3. Zanurzyć preparaty w roztworze denaturującym na 5 minut.

UWAGA: W naczyniu Coplina można jednocześnie zanurzyć nie więcej niż cztery (4) preparaty.

4. Odwadniać preparaty przez minutę w 70% EtOH, następnie przez 1 minutę w 85% EtOH i przez 1 minutę w 100% EtOH.

UWAGA: Pozostawić preparaty w 100% EtOH do momentu, w którym możliwe będzie wysuszenie wszystkich preparatów i nałożenie mieszaniny sondy.

Przygotowanie mieszaniny sond

UWAGA: Jeśli wykorzystywana jest sonda, która została wcześniej wymieszana z buforem hybrydyzacyjnym LSI /WCP, sondę tę należy doprowadzić do temperatury pokojowej, a następnie kontynuować procedurę począwszy od kroku 2. Jeśli wykorzystywana jest sonda, która wcześniej została wymieszana z buforem hybrydyzacyjnym LSI /WCP i była poddana denaturacji, sondę tę należy doprowadzić do temperatury pokojowej. Sondę odwirować i wytrząsać na wytrząsarce laboratoryjnej, a następnie kontynuować procedurę począwszy od kroku 1 etapu hybrydyzacji sondy do próbki docelowej.

1. Składniki dla poszczególnego obszaru docelowego dodawać kolejno do probówki do mikrowirówki w temperaturze pokojowej:

7 μ l buforu hybrydyzacyjnego LSI

1 μ l sondy

2 μ l oczyszczonej H₂O

UWAGA: W celu przeprowadzenia równoczesnej hybrydyzacji maksymalnie trzech sond, każdej znakowanej innym fluorochromem, należy dodać po 1 μ l każdej sondy. Dopełnić oczyszczoną wodą w celu otrzymania wspólnej objętości sondy i wody równej 3 μ l.

2. Odwirować probówkę przez 1-3 sekundy.
3. Zmieszać ma wytrząsarce laboratoryjnej (Vortex) i ponownie odwirować.
4. Umieścić probówkę w łaźni wodnej w temp. 73 ± 1 °C na 5 minut.
5. Wyjąć probówkę z łaźni wodnej.
6. Umieścić probówkę na płycie grzewczej rozgrzanej do temp. 45-50 °C do momentu, w którym będzie możliwe nałożenie sondy na badane, docelowe DNA.

UWAGA: Jeśli preparaty są już gotowe w momencie zdenaturowania sondy, można zaaplikować sondę na docelowe DNA bezpośrednio po jej denaturacji.

Hybrydyzacja sondy do próbki docelowej

UWAGA: Przygotować wilgotną komorę poprzez wyłożenie pudełka na preparaty papierowym ręcznikiem nasączonym wodą, na hermetycznym zbiorniku. Umieścić w inkubatorze, w temperaturze 37 °C.

1. Wyjąć preparaty ze 100% EtOH.
2. Wysuszyć wierzchnią stronę preparatów przez ostrożne dotykanie bibułą, natomiast spód preparatu wytrzeć suchym ręcznikiem papierowym.
3. Umieścić preparaty na płycie grzewczej o temp. 45-50°C w celu odparowania resztek EtOH.
4. Nałożyć 10 μ l mieszaniny sondy na wybrany, docelowy region preparatu i natychmiast przykryć szkiełkiem nakrywkowym. Powtórzyć te czynności na kolejnym wybranym obszarze.
5. Uszczelnić szkiełko nakrywkowe przy użyciu elastycznego spoiwa.
6. Umieścić preparaty w nagrzanej komorze wilgotnej, a następnie wstawić komorę do inkubatora, rozgrzanego do temp. 37 °C na 6-16 godzin. Dla większości sond LSI uzyskanie zadowalającego sygnału rozpoczyna się po 12-16 godzinnej hybrydyzacji.

Płukanie preparatów

Poniższe procedury różnią się pod względem ilości czasu wymaganego do przeprowadzenia płukania oraz wykorzystywanych odczynników. Procedura płukania czterech preparatów roztworem zawierającym formamid trwa około 45 minut. Szybka procedura płukania czterech preparatów trwa około 3 minuty. Niezależnie od zastosowanej procedury zwykle uzyskuje się porównywalne wyniki.

UWAGA: W przypadku wykorzystywania próbek utrwalonych w parafinie należy stosować szybką procedurę płukania. Zamiast roztworu 0,4X SSC/0,3% NP-40 należy stosować 2X SSC/0,3% NP-40.

Procedura płukania roztworem zawierającym formamid

Przygotowanie roztworu płuczącego:

- Naczynia Coplina zawierające 50% formamid/2X SSC i oznakowane jako "1," "2" i "3" doprowadzić do temperatury pokojowej. Naczynia umieścić w łaźni

Szybka procedura płukania

Przygotowanie roztworu płuczącego:

- Wlać 70 ml 0,4X SSC/0,3% NP-40 do naczynia Coplina. Umieścić naczynie w łaźni wodnej o temp. 73 ± 1 °C co najmniej 30 minut przed zastosowaniem. Zużyć

wodnej o temp. 46 ± 1 °C co najmniej 30 minut przed zastosowaniem w celu uzyskania właściwej temperatury roztworów.

- Wlać 70 ml 2X SSC do jednego naczynia Coplina oraz 70 ml 2X SSC/0,1% NP-40 do drugiego naczynia. Oba naczynia umieścić w łaźni wodnej o temp. 46 ± 1 °C co najmniej 30 minut przed zastosowaniem. Zużyć przygotowane roztwory tego samego dnia, resztę usunąć.

UWAGA: Dozwolone jest równoczesne płukanie maksymalnie czterów (4) preparatów. Rozpocząć odmierzenie czasu po zanurzeniu ostatniego preparatu.

1. Usunąć szkiełko nakrywkowe z preparatu i natychmiast zanurzyć go w naczyniu "1", zawierającym 50% formamid/2X SSC. Poruszać nimi przez 1-3 sekundy. Powtórzyć ww. czynności z pozostałymi preparatami.
2. Wyjąć preparaty po 10 minutach.
3. Zanurzyć preparaty w naczyniu "2", zawierającym roztwór płuczący. Poruszać nimi przez 1-3 sekundy. Wyjąć preparaty po 10 minutach.
4. Zanurzyć preparaty w naczyniu "3", zawierającym roztwór płuczący. Poruszać nimi przez 1-3 sekundy. Wyjąć preparaty po 10 minutach.
5. Zanurzyć preparaty w 2X SSC. Poruszać nimi przez 1-3 sekundy. Wyjąć preparaty po 10 minutach.
6. Zanurzyć preparaty w 2X SSC/0,1% NP-40. Poruszać nimi przez 1-3 sekundy. Wyjąć preparaty po 5 minutach.

przygotowany roztwór tego samego dnia, resztę usunąć.

- Wlać 70 ml 2X SSC/0,1% NP-40 do naczynia Coplina. Używać w temperaturze pokojowej. Zużyć przygotowany roztwór tego samego dnia, resztę usunąć.

UWAGA: Dla utrzymania właściwej temperatury 0,4X SSC/0,3% NP-40 należy płukać cztery preparaty równocześnie. Jeśli barwione są mniej niż cztery preparaty, należy dołożyć puste szkiełka o temperaturze pokojowej, tak aby razem było ich cztery.

Rozpocząć odmierzenie czasu w momencie, kiedy wszystkie szkiełka są zanurzone.

1. Usunąć szkiełko nakrywkowe z preparatu i natychmiast zanurzyć go w 0,4X SSC/0,3% NP-40. Poruszać nimi przez 1-3 sekundy. Powtórzyć ww. czynności z pozostałymi preparatami.
2. Wyjąć preparaty po 2 minutach.

UWAGA: Przed rozpoczęciem płukania następnych czterech szkiełek należy upewnić się, że temperatura roztworu wynosi 73 ± 1 °C.

3. Zanurzyć preparaty w 2X SSC/0,1% NP-40. Poruszać nimi przez 1-3 sekundy. Wyjąć preparaty po czasie od 5 sekund do 1 minuty.

Wizualizacja hybrydyzacji

1. Wysuszyć preparaty na powietrzu, w ciemności.
2. Nanieść 10 µl barwnika na obszar docelowy preparatu, a następnie nałożyć szkiełko nakrywkowe. Dla sond SpectrumGreen™ i SpectrumAqua™ można zastosować barwniki DAPI II lub PI, dla sond SpectrumOrange™ można zastosować wyłącznie barwnik DAPI II. W przypadku jednoczesnej hybrydyzacji wszystkich trzech fluorochromów należy stosować barwnik DAPI II.

Oglądać preparaty przy użyciu odpowiedniego zestawu filtrów w optymalnie ustawionym mikroskopie fluorescencyjnym. Wymienione poniżej filtry optyczne pozwolą na wizualizację fluorochromu użytego podczas hybrydyzacji.

Użycie filtra Vysis...	Pozwala na równoczesne wzbudzenie emisji fluorochromów...
DAPI/Orange	DAPI i spektrum czerwone/ pomarańczowe (SpectrumOrange)
DAPI/Green	DAPI i spektrum zielone (SpectrumGreen)
Aqua/Green/Orange	spektrum jasnoniebieskie (SpectrumAqua), spektrum zielone (SpectrumGreen) i spektrum czerwone/pomarańczowe (SpectrumOrange)
DAPI/Orange/Green	DAPI, spektrum czerwone/pomarańczowe (SpectrumOrange) i spektrum zielone (SpectrumGreen)
DAPI/Aqua/Green/Orange	DAPI, spektrum jasnoniebieskie (SpectrumAqua), spektrum zielone (SpectrumGreen) i spektrum czerwone/pomarańczowe (SpectrumOrange)

Przechowywanie: Preparaty przechować w temp. -20 °C i chronić przed dostępem światła.

Zastosowanie kodenaturacji

Kodenaturacja jest procesem, który upraszcza procedurę hybrydyzacji *in situ* (FISH) poprzez połączoną, jednoczesną denaturację próby i mieszaniny sondy. Zazwyczaj kodenaturacja jest przeprowadzana poprzez umieszczenie preparatu z badaną próbką i nałożoną sondą na płytce grzejnej lub w inkubatorze/suszarce, gdzie ustalono temperaturę właściwą dla denaturacji. Preparaty są zwykle wyjmowane po 2-10 minutach i umieszczane w inkubatorze, w temperaturze właściwej dla hybrydyzacji.

Warunki kodenaturacji zalecane w publikacjach są zróżnicowane w zakresie temperatury i czasu, w zależności od specyficznego zastosowania oraz typu badanej próbki. Tu opisane parametry są zalecane do użycia z systemem Vysis HYBrite™ Denaturation/Hybridization i przewidziane są dla uzyskania zestawu parametrów wyjściowych. W zależności od rodzaju badanych próbek może zaistnieć potrzeba dalszej optymalizacji. Efekt zastosowania kodenaturacji może różnić się od zastosowania osobnej denaturacji próbki badanej i jej odwodnienia przed nałożeniem sondy.

Przygotowanie preparatów do kodenaturacji

UWAGA: Jeśli wykorzystywana jest sonda, która wcześniej została wymieszana z buforem hybrydyzacyjnym LSI /WCP i poddana denaturacji, sondę tę należy doprowadzić do temperatury pokojowej, a następnie kontynuować procedurę począwszy od kroku 2 etapu hybrydyzacji sondy do próbki docelowej.

1. Składniki dla poszczególnego obszaru docelowego dodawać kolejno do próbki mikrowiorniczej, w temperaturze pokojowej:
 - 7 µl buforu hybrydyzacyjnego LSI/WCP
 - 1 µl sondy
 - 2 µl oczyszczonej wody

UWAGA: W celu przeprowadzenia równoczesnej hybrydyzacji maksymalnie trzech sond, każdej znakowanej innym fluorochromem, należy dodać po 1 µl każdej sondy. Dodać oczyszczoną wodę do otrzymania wspólnej objętości sondy i wody równej 3 µl.

2. Odwirować probówkę przez 1-3 sekundy.
3. Zmieszać ma wytrząsarce laboratoryjnej (Vortex) i ponownie odwirować.
4. Zaznaczyć obszar hybrydyzacji na preparacie przy użyciu znacznika z diamentową końcówką.
5. Nałożyć 10 µl mieszaniny sondy na preparat i natychmiast przykryć szkiełkiem nakrywkowym.
6. Uszczelnić szkiełko nakrywkowe przy użyciu elastycznego spoiwa.

Ustawianie parametrów aparatu HYBrite

W celu uzyskania dalszych informacji dotyczących użytkowania aparatu HYBrite należy korzystać z poradnika użytkownika HYBrite (*HYBrite™ User Guide*).

1. Zwilżyć wodą kawałek papierowego ręcznika i umieścić w kanale wzdłuż powierzchni grzejnych systemu HYBrite.
2. Dla hodowli limfocytów i szpiku kostnego ustawić temperaturę denaturacji (Melt Temp) na 75 °C przy czasie (Melt Time) 1 minuty. W przypadku próbek zatopionych w parafinie ustawić temperaturę (Melt Temp) na 85 °C, a czas (Melt Time) na 1 minutę.
3. Ustawić temperaturę hybrydyzacji (Hyb Temp) na 37 °C, czas hybrydyzacji (Hyb Time) od 4 godzin do hybrydyzacji całonocnej.
4. Po upływie czasu hybrydyzacji wypłukać preparaty używając szybkiej procedury płukania.
5. Wysuszyć preparaty na powietrzu, w ciemności.
6. Nanieść 10 µl barwnika kontrastowego na obszar docelowy, a następnie nałożyć szkiełko nakrywkowe.

Wyniki sprawiające kłopoty w teście z kodenaturacją

Morfologia chromosomów obserwowana po hybrydyzacji z użyciem kodenaturacji może różnić się od obrazu uzyskanego po nałożeniu sondy po uprzedniej denaturacji i odwodnieniu badanego preparatu.

Problem	Możliwe rozwiązanie
Hybrydyzacja krzyżowa	Powtórzyć analizę z inną próbką, stosując jedną z poniższych modyfikacji: <ul style="list-style-type: none">• Podwyższyć temperaturę 0,4X SSC/0,3% NP-40 o 2 °C. Jeśli będzie to konieczne, kontynuować podwyższanie temperatury do uzyskania akceptowanej intensywności sygnału.• Obniżyć temperaturę denaturacji o 2 °C.
Słaby sygnał sondy	Powtórzyć analizę z inną próbką, stosując jedną z poniższych modyfikacji: <ul style="list-style-type: none">• Wydłużyć czas hybrydyzacji.• Podwyższyć temperaturę denaturacji. Jeśli to konieczne, kontynuować podwyższanie temperatury do uzyskania nieakceptowalnej morfologii.• Wypłukać preparaty w 0,4X SSC/0,3% NP-40 w temp. 70-73 °C.

Sygnal rozproszony (<i>speckling</i>)	<p>Powtórzyć hybrydyzację, stosując jedną z poniższych modyfikacji:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Obniżyć temperaturę denaturacji o 2 °C. • Skrócić czas denaturacji. <p>UWAGA: Jeśli to konieczne, redukować temperaturę lub czas denaturacji do uzyskania sygnału o nieakceptowalnej intensywności.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Wypłukać, stosując 0,4X SSC/0,3% NP-40 w temp. 73-76 °C.
Zła morfologia metafaz	<p>Powtórzyć analizę z inną próbką, stosując jedną z poniższych modyfikacji:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Obniżyć temperaturę denaturacji o 2 °C. • Skrócić czas denaturacji. <p>UWAGA: Jeśli to konieczne, redukować temperaturę lub czas denaturacji do uzyskania sygnału o nieakceptowalnej intensywności.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Obróbka wstępna preparatów: <ol style="list-style-type: none"> 1. Przygotować roztwór 2X SSC/1% paraformaldehyd. 2. Zanurzyć szkiełka w roztworze 2X SSC/1% paraformaldehyd na 1 minutę. 3. Zanurzyć szkiełka kilka razy w oczyszczonej wodzie. 4. Odwodnić szkiełka w szeregu EtOH (70%, 85%, 100%) po 1 minucie. 5. Wysuszyć szkiełka i kontynuować z zastosowaniem <i>Procedury do kodenaturacji</i>. • Jeśli morfologia metafaz nie poprawiła się, należy zmodyfikować użycie przyrządu HYBrite: <ol style="list-style-type: none"> 1. Przygotować 280 µl roztworu do denaturacji 70% formamid/2X SSC (196 µl formamidu/28 µl 2X SSC/56 µl oczyszczonej wody). 2. Uruchomić program HYBrite Hold Temp z temperaturą ustawioną na 73 °C. 3. Umieścić 10 µl roztworu do denaturacji 70% formamid/2X SSC na każdy obszar docelowy i przykryć szkiełkiem nakrywkowym. 4. Gdy HYBrite osiągnie 73 °C, należy umieścić szkiełka na powierzchni grzejnej. Zamknąć pokrywę. 5. Wyjąć preparaty po 3 minutach. 6. Usunąć szkiełko nakrywkowe. 7. Kontynuować, stosując odwodnienie w trakcie <i>Przygotowania próbki docelowej</i> podczas procedury bez kodenaturacji.

Wskazówki i usuwanie problemów

Przy oglądaniu wyników analizy FISH należy sprawdzić, czy mikroskop jest właściwie ustawiony i czy funkcjonuje optymalnie.

Poniższa lista zestawia niezadowolające rezultaty, jakie można uzyskać stosując sondy LSI. Lista zawiera prawdopodobne przyczyny i sugestie, które mogą poprawić jakość uzyskanych wyników.

Problem	Prawdopodobna przyczyna	Możliwe rozwiązanie
Zniekształcona morfologia chromosomów	Zbyt szybko wysuszona próbka w trakcie przygotowywania	Podnieść temperaturę łaźni wodnej (następuje zwiększenie wilgotności) podczas nakapywania preparatów.
		Obniżyć temperaturę podgrzewania preparatów w trakcie przygotowywania próbki.
		Przedłużyć czas suszenia, co najmniej na całą noc w temperaturze pokojowej, a następnie pozwolić dojrzeć preparatom co najmniej 24 godziny w temperaturze pokojowej.
		Nie prażyć preparatów w wysokiej temperaturze.
	Nadmierna denaturacja próbki	Upewnić się, że roztwór do denaturacji został wykonany zgodnie z zaleceniami. Upewnić się, że temperatura roztworu do denaturacji przed zanurzeniem preparatów wynosi $73 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Obniżyć temperaturę do 72°C . Skrócić czas denaturacji o 1 - 3 minut.
Silne tło widoczne na preparacie	Preparaty z naniesionym materiałem nie zostały całkowicie wysuszone przed zanurzeniem w roztworze do denaturacji.	Ogrzać preparaty do $45-50^{\circ}\text{C}$ przed denaturacją lub odwodnić preparaty, płucząc je w szeregu alkoholi (70%, 85%, 100%) po 1 minucie.
	Denaturacji poddano zbyt świeży materiał.	Zostawić preparaty na co najmniej 24 godziny w temperaturze pokojowej.
	Szkiełka nie były dostatecznie oczyszczone przed wykonaniem preparatów.	Przed nakraplaniem zawiesiny dokładnie wyczyścić szkiełka zanurzając je w EtOH, a następnie dokładnie wytrzeć ściereczką bezpyłową.
	Resztki komórek na preparacie	Trzykrotnie przemyć peletkę komórek świeżym utrwalaczem przed powtórzeniem procedury nakraplania zawiesiny na szkiełko.
	Metafazy były rozpraszane przez prażenie lub zawierają cytoplazmę.	Wydłużyć czas zanurzenia preparatów w roztworze denaturującym do 10 minut.
	Preparaty zostały niedostatecznie wypłukane po	Upewnić się, czy roztwory płuczące zostały przygotowane zgodnie z zaleceniami.

Problem	Prawdopodobna przyczyna	Możliwe rozwiązanie
	hybrydyzacji.	<p>Upewnić się, czy pH i temperatura roztworów płuczących są właściwe.</p> <p>Usunąć szkiełko nakrywkowe. Powtórzyć procedurę płukania.</p> <p>Jeśli wykorzystywano szybką procedurę płukania, można zastosować procedurę płukania roztworem z formamidem.</p>
Silne tło widoczne na preparacie	Roztwór płuczący był używany zbyt długo lub przechowywany w niewłaściwych warunkach	<p>Upewnić się, że roztwór płuczący zawierający formamid jest przechowywany w 4 °C. Nie używać po upływie 7 dni lub w przypadku częstego stosowania. Usuwać wszystkie inne roztwory płuczące po 1 dniu.</p> <p>Upewnić się, czy pH roztworu płuczącego zawierającego formamid wykazuje pH 7,0-8,0.</p>
	Oglądanie efektu hybrydyzacji przy użyciu filtrów szerokopasmowych	Przetączyć na filtry o mniejszej szerokości pasma lub wielopasmowe dla zredukowania świecenia tła.
Słaby sygnał lub brak sygnału	Niewłaściwa denaturacja preparatów	<p>Upewnić się, że temperatura roztworu do denaturacji w naczyniu Coplina przed zanurzeniem preparatów wynosi 73 ± 1 °C.</p> <p>Podnieść temperaturę roztworu denaturującego do 74 °C.</p> <p>Wydłużyć czas inkubacji preparatów w roztworze do denaturacji o 2 do 4 minut.</p>
	Preparaty nie były wykonane w sposób odpowiedni dla procedury FISH.	Skontaktować się z Działem Obsługi Klienta firmy Abbott, aby uzyskać protokół opisujący sposób przygotowania próbki do FISH.
	Preparaty po nakraplaniu zawiesiny dojrzewały w nieodpowiednich warunkach.	Przed przeprowadzeniem procedury FISH przechować preparaty przez 24 godziny w temperaturze pokojowej.
	Preparaty z naniesionym materiałem nie zostały całkowicie wysuszone przed zanurzeniem w roztworze do denaturacji.	Ogrzać preparaty do 45-50 °C przed denaturacją lub odvodnić preparaty, płucząc je w szeregu alkoholi (70%, 85%, 100%) po 1 minucie.
	Materiał był uprzednio barwiony dla uzyskania prążków G.	Użycie preparatów uprzednio barwionych dla uzyskania prążków G może wymagać korekty procedury barwienia GTG i/lub

Problem	Prawdopodobna przyczyna	Możliwe rozwiązanie
		<p>protokołu hybrydyzacji. Dla uzyskania dalszych informacji dotyczących tej procedury należy skontaktować się z Działem Obsługi Klienta firmy Abbott.</p> <p>Ewentualnie przygotować preparat ze świeżym materiałem.</p>
	Nie dodano sondy.	<p>Przygotować nową mieszaninę sond.</p> <p>Odczekać do całkowitego rozpuszczenia się sondy. Wymieszać składniki na wytrząsarce laboratoryjnej lub pipetą; krótko odwirować. Sondę rozpipetować powoli i ostrożnie.</p>
Słaby sygnał lub brak sygnału	Sonda, bufor hybrydyzacyjny lub mieszanina sondy nie były dobrze wymieszane przed użyciem.	Wymieszać składniki na wytrząsarce laboratoryjnej lub używając pipety; krótko odwirować.
	Niewłaściwe rozcieńczenie sondy do hybrydyzacji.	<p>Użyć objętości podanych w przepisie w celu zachowania właściwej proporcji (7 μl buforu hybrydyzacyjnego, 1 μl sondy, 2 μl oczyszczonej wody).</p> <p>Upewnić się, że pipeta jest dobrze skalibrowana.</p> <p>Pozwolić, aby bufor hybrydyzacyjny rozmroził się całkowicie oraz osiągnął temperaturę pokojową przed użyciem; pipetować powoli i ostrożnie.</p>
	Sonda nie jest dostatecznie zdenaturowana	<p>Upewnić się, czy temperatura łaźni wodnej używanej do denaturacji wynosi 73 ± 1 °C.</p> <p>Denaturować mieszaninę sondy przez 5 minut.</p>
	UWAGA: Nie dotyczy sond, które są dostarczone w buforze hybrydyzacyjnym i zdenaturowane.	
	Sonda nie została naniesiona na obszar docelowy natychmiast po jej zdenaturowaniu	<p>Zaplanować procedurę tak, aby sonda została nałożona na obszar docelowy bezpośrednio po wyjęciu preparatów ze 100% EtOH. Upewnić się, czy etanol został odparowany z preparatu przed nałożeniem sondy.</p> <p>Bezpośrednio po wyjęciu z łaźni wodnej o temp. 73 ± 1 °C, probówkę z mieszaniną sondy umieścić na płytce grzejnej w temp. 45-50 °C. Przechowywać ją tam w trakcie</p>

Problem	Prawdopodobna przyczyna	Możliwe rozwiązanie
		nakładania mieszaniny sondy na preparat.
		Wykonywać procedurę na takiej liczbie preparatów, która pozwoli na utrzymanie prawidłowych wartości temperatury i czasu trwania poszczególnych etapów.
	Przesuszenie mieszaniny sondy na preparacie	Po nałożeniu mieszaniny sondy natychmiast przykryć szkiełkiem nakrywkowym obszar docelowy preparatu.
		Po usunięciu szkiełka nakrywkowego przed płukaniem pohybrydizacyjnym, natychmiast zanurzyć preparat w roztworze płuczającym; dopiero później zdjąć szkiełko nakrywkowe z kolejnego preparatu.
	Pęcherzyki powietrza uwieszone pod szkiełkiem nakrywkowym podczas hybrydizacji.	Nałożyć szkiełko nakrywkowe dotykając najpierw powierzchni mieszaniny sondy nałożonej na preparat.
		Umieścić preparat na suszce (bibule) szkiełkiem nakrywkowym do dołu i bardzo delikatnie wycisnąć widoczne pęcherzyki.
	Nieodpowiednie warunki hybrydizacji.	Upewnić się, czy zastosowano wymagany czas i temperaturę hybrydizacji.
		Upewnić się, czy temperatura w inkubatorze wynosi 37 °C.
		Uszczelnić szkiełko nakrywkowe spoiwem, nie pozostawiając luk.
		Wydłużyć czas hybrydizacji.
	Nieprawidłowe warunki płukania lub nieprawidłowy roztwór płuczający	Upewnić się, czy roztwór płuczający został wykonany zgodnie z zaleceniem.
		Upewnić się, czy temperatura kąpieli podczas płukania była właściwa.
		Jeśli wykonywana jest procedura płukania formamidem, upewnić się, że pH roztworów płuczających mieści się w zakresie pH 7,0–8,0.
		Upewnić się, czy wykorzystywane termometry i pHmetry są prawidłowo skalibrowane.
		Usunąć szkiełko nakrywkowe przed zanurzeniem preparatu w roztworze

Problem	Prawdopodobna przyczyna	Możliwe rozwiązanie
		płuczającym.
	Sonda lub badana próbka były przechowywane w niewłaściwych warunkach	Nierozcieńczoną sondę należy przechowywać w temp. -20 °C, bez dostępu światła. Preparaty, które nie były poddane hybrydyzacji, należy przechowywać wysuszone w temp. -20 °C przez dłuższy czas, a w temperaturze pokojowej przez krótki czas. Preparaty poddane hybrydyzacji przechowywać do sześciu miesięcy w temp. -20 °C, bez dostępu światła.
	Zastosowano niewłaściwy barwnik kontrastujący Zbyt jaskrawy barwnik kontrastujący.	Usunąć szkiełko nakrywkowe. Zanurzyć preparaty na 5 minut w 2X SSC/0,1% NP-40 w temperaturze pokojowej; odvodnić preparat, płucząc w szeregu alkoholi (70%, 85%, 100%) po 1 minucie. Wysuszyć preparat na powietrzu i ponownie nałożyć barwnik.
	Oglądano wynik hybrydyzacji przy użyciu niewłaściwego zestawu filtrów	Filtry wielopasmowe dostarczają mniej światła niż filtry pojedyncze, tak więc sygnał sondy może wydawać się słabszy. Użyć filtra właściwego dla zastosowanego fluorochromu. Aby uzyskać dalsze informacje, należy skontaktować się z Działem Obsługi Klienta firmy Abbott.
	Konfiguracja mikroskopu lub obiektywów nie jest odpowiednia dla obserwacji rezultatów barwienia FISH lub filtry w mikroskopie są uszkodzone	Skontaktować się z producentem mikroskopu.
Niska specyficzność sygnału	Niewłaściwie rozcieńczone sondy; często za dużo sondy w próbce	Upewnić się, czy mieszanina sondy została wykonana zgodnie z przepisem.
	Nieodpowiednie warunki hybrydyzacji.	Upewnić się, czy temperatura w inkubatorze wynosi 37 °C. Upewnić się, czy bufor hybrydyzacyjny został dodany do mieszaniny sondy, czy dodano odpowiednią ilość buforu.
	Zbyt niska temperatura	Utrzymywać stałą temperaturę kąpeli w

Problem	Prawdopodobna przyczyna	Możliwe rozwiązanie
	płukania	roztworze płuczącym przez umieszczanie w naczyniu Coplina nie więcej niż czterech preparatów równocześnie; przed zanurzeniem następnej partii preparatów, upewnić się, że temperatura roztworu płuczącego jest prawidłowa.
	Za słabo działa roztwór płuczący	Upewnić się, że roztwór płuczący został przygotowany zgodnie z zaleceniami. UWAGA: Niższe stężenie soli (SSC), a wyższe stężenie formamidu i NP-40, wzmacniają działanie roztworu płuczącego.
Jaskrawy lub blady barwnik	Barwnik wygląda blado: próbka nie została całkowicie odwodniona przed nałożeniem barwnika lub olejek dostał się do barwnika.	Usunąć szkiełko nakrywkowe. Zanurzyć preparat na 5 minut w 2X SSC/0,1% NP-40 w temperaturze pokojowej; odwodnić preparat płucząc w szeregu alkoholi (70%, 85%, 100%) po 1 minucie. Wysuszyć preparat na powietrzu i ponownie nałożyć barwnik.
	Niewłaściwe stężenie barwnika.	Jeśli barwienie DAPI jest zbyt jaskrawe, przed nałożeniem na preparat rozcieńczyć barwnik roztworem przeciwdziałającym wyświecaniu (<i>antifade solution</i> , nr kat. 32-804029).
	UWAGA: Barwnik kontrastujący DAPI I jest osiem razy bardziej skoncentrowany niż DAPI II.	
	Barwnik jest za stary lub był zbyt długo ekspozycyjny na światło.	Barwnik należy przechowywać w temp. –20 °C, bez dostępu światła. Podczas używania barwnika nie należy wystawiać go na działanie światła.
		Upewnić się, czy nie minęła data ważności barwnika.

Uwaga: Produkty Vysis LSI ASR zostały zoptymalizowane do identyfikacji chromosomalnych loci w komórkach interfazowych i metafazach limfocytów.

Bibliografia

Pinkel, D.; Straume, T.; Gray, J.W.: "Cytogenetic Analysis Using Quantitative, High Sensitivity Fluorescence Hybridization;" Proc. Natl. Acad. Sci. USA; Vol. 83: 2934–2938; May 1986.

Pinkel, D.; Gray, J.W.; Track, B.; van den Engh, G.; Fuscoe, J.; van Dekken, H.; "Cytogenetic Analysis by In Situ Hybridization with Fluorescently Labeled Nucleic Acid Probes;" Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.; 51: 151–157; 1986.

Pomoc techniczna: W przypadku problemów technicznych prosimy o kontakt z Działem Obsługi Klienta firmy Abbott pod numerem telefonu: + 22 606 10 57.

Adres wytwórcy:

Adres autoryzowanego przedstawiciela:

Abbott Molecular Inc.
1300 East Touhy Avenue
Des Plaines, IL 60018
Tel. (Stany Zjednoczone) : 800 553-7042
Tel.(poza Stanami Zjednoczonymi) : 224 361-7000
Fax: 224 361-7522
E-mail: help@abbottmolecular.com

ABBOTT
Max-Planck-Ring 2
65205 Wiesbaden
Germany
+49-6122-580

Stosowanie sond wykorzystujących metodę FISH z blokującym DNA oraz sond z unikalnymi sekwencjami, takich jak sondy Vysis LSI, jest chronione patentem amerykańskim 5,447,841, nadanym Uniwersytetowi Kalifornijskiemu (University of California), którego wyłącznym licencjonobiorcą jest Vysis. Bezpośrednio znakowane fluorescencyjne sondy Vysis LSI, CEP i WCP® chronione są patentem amerykańskim nr 5,491,224.

CEP®, LSI®, WCP® oraz Vysis® są zastrzeżonymi znakami handlowymi, a HYBrite™, SpectrumAqua™, SpectrumGreen™ i SpectrumOrange™ są znakami handlowymi firmy Vysis, Inc.

Odczynnik do swoistego analitu. Nie oszacowano danych analitycznych oraz nie podano szczegółowej charakterystyki odczynnika.

Nazwa firmy Vysis, Inc. została zmieniona na Abbott Molecular Inc.

©2006 Abbott Molecular Inc. 30-608314 Rev. H 3/2006