

Vysis D5S23, D5S721/ CEP 9/CEP 15 FISH Probe Kit

pl

Vysis D5S23, D5S721/
CEP 9/CEP 15
FISH Probe Kit

REF 05N35-020

G60897R04

B5N35P

UWAGA: Zmiany wyróżniono kolorem szarym.

Objaśnienia użytych symboli	
	Producent
REF	Numer katalogowy
LOT	Numer partii
IVD	Wyrób medyczny do diagnostyki <i>in vitro</i>
	Przechowywać w temp. -20°C (± 10°C).
	Uwaga: Sprawdź w dołączonej dokumentacji.
	Zagrożenia biologiczne
	Niebezpieczeństwo
	Użyć przed
	Zajrzyj do instrukcji używania.
EC REP	Upoważniony przedstawiciel

Przewidziane zastosowanie

Zestaw sond Vysis D5S23, D5S721/CEP 9/CEP 15 FISH Probe Kit służy do wykrywania liczby kopii obszarów docelowych sond D5S23, D5S721, CEP 9 oraz CEP 15 zlokalizowanych odpowiednio w regionie 5p15.2, 9p11.1-q11.1 oraz 15p11.1-q11.1 przy użyciu fluorescencyjnej hybrydizacji *in situ* (FISH).

Wprowadzenie

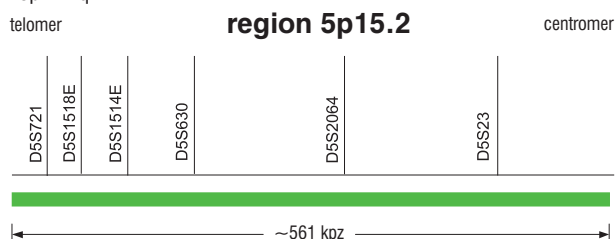
Hiperdiploidia stanowi jeden z podtypów anomalii cytogenetycznych szpikaczki mnogiego (ang. *Multiple Myeloma* (MM)), a pacjenci z hiperdiploidią mają lepsze rokowania niż pacjenci bez hiperdiploidii. W badaniu z udziałem 205 pacjentów chorych na szpikaczki mnogiego (MM) zestaw sond Vysis D5S23, D5S721/CEP 9/CEP 15 FISH Probe Kit zastosowano do wykrywania hiperdiploidii.¹ Sześciuset pięćdziesięciu siedmiu pacjentów biorących udział w badaniu IFM99 przeprowadzanym przez *Intergroupe Francophone du Myelome* zostało także poddanych badaniu pod kątem hiperdiploidii przy użyciu zestawu sond Vysis D5S23, D5S721/CEP 9/CEP 15 FISH Probe Kit. Spośród tych pacjentów 39% wykazało obecność hiperdiploidii.²

Opis sondy

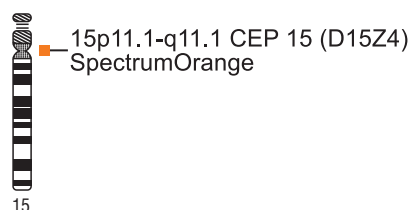
Wyznakowana na zielono (SpectrumGreen) sonda o wielkości około 561 kpz (chr5:9450109-10011407; March 2006 assembly)³ jest zlokalizowana na chromosomie 5p15.2

Wyznakowana na jasnoniebiesko (SpectrumAqua) sonda zawiera sekwencje alfa-satelitarne i jest specyficzna dla chromosomu 9p11.1-q11.1.

Wyznakowana na pomarańczowo (SpectrumOrange) sonda zawiera sekwencje alfa-satelitarne D15Z4 i jest specyficzna dla chromosomu 15p11.1-q11.1.



LSI D5S23, D5S721 SpectrumGreen Probe



Odczynniki

1. Vysis LSI D5S23, D5S721 SpectrumGreen/CEP 9 SpectrumAqua/CEP 15 SpectrumOrange Probes (nr produktu: 30-231021)

(1 fiołka, 20 µL w jednej fiołce). 292,5 ng/µL, sonda DNA znakowana fluoroforem oraz blokujące DNA w Tris-EDTA.

2. Vysis LSI/WCP Hybridization Buffer (nr produktu: 30-804824)

(1 fiołka, 150 µL w jednej fiołce). Siarczan dekstranu, formamid, SSC (pH 7,0).

Karty charakterystyki substancji niebezpiecznych dla wszystkich zawartych w zestawie odczynników są dostępne u przedstawiciela firmy Abbott Molecular.

Zasady przechowywania

Zestaw sond Vysis D5S23, D5S721/CEP 9/CEP 15 FISH Probe Kit musi być przechowywany w temp. -20°C (± 10°C) bez dostępu światła.

Warunki transportowania

Zestaw sond Vysis D5S23, D5S721/CEP 9/CEP 15 FISH Probe Kit jest transportowany w suchym lodzie.

Jeśli stan dostarczonych odczynników jest inny niż zalecany na etykiecie bądź odczynniki są uszkodzone, należy skontaktować się z przedstawicielem firmy Abbott Molecular.

Ostrzeżenia i środki ostrożności

IVD Wyrób medyczny do diagnostyki *in vitro*

Wyłącznie do diagnostyki *in vitro*

Sondy Vysis LSI D5S23, D5S721 SpectrumGreen/CEP 9 SpectrumAqua/CEP 15 SpectrumOrange Probes



UWAGA: Preparat ten zawiera materiały pochodzenia ludzkiego i/lub potencjalnie zakaźne składniki. Nie istnieje żadna znana metoda badawcza, która mogłaby w pełni zagwarantować, że produkty pochodzenia ludzkiego lub inaktywowane mikroorganizmy nie będą źródłem zakażenia. Z tymi odczynnikami oraz próbkami pochodzenia ludzkiego należy obchodzić się jak z materiałem zakaźnym, przestrzegając procedur laboratoryjnych dotyczących bezpieczeństwa, jak np. procedur opisanych w publikacji „Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories”,⁵ standardach OSHA dotyczących patogenów przenoszonych drogą krwi (Standards on Bloodborne Pathogens),⁶ w dokumencie CLSI M29-A3⁷ oraz innych odpowiednich praktyk związanych z bezpieczeństwem biologicznym.⁸ A zatem wszystkie materiały pochodzenia ludzkiego należy traktować jako potencjalnie zakaźne. Do środków ostrożności należą między innymi następujące wskazania:

- Podczas pracy z badanymi próbkami lub odczynnikami nosić rękawice ochronne.
- Nie pipetować ustami.
- W miejscach, w których opracowuje się tego typu materiały, nie spożywać pokarmów, nie spożywać napojów, nie palić, nie nakładać makijażu ani szkieł kontaktowych.
- Wszelkie miejsca, w których doszło do rozlania się badanych próbek, wyczyścić i zdezynfekować przy pomocy prątkobójczego środka dezynfekującego, takiego jak 1,0% podchloryn sodu, lub innego odpowiedniego środka o podobnym działaniu.⁵
- Wszystkie potencjalnie zakaźne materiały odkazić, a następnie usuwać zgodnie z lokalnymi, jak i ogólnokrajowymi przepisami.⁸

Bufor Vysis LSI/WCP Hybridization Buffer

Składniki warunkujące stopień zagrożenia umieszczone na etykiecie:

- formamid

Zastosowanie mają poniższe ostrzeżenia:



Uwaga

H360	Może działać szkodliwie na płodność lub na dziecko w łonie matki.
P201	Przed użyciem zapoznać się ze specjalnymi środkami ostrożności.
P202	Nie używać przed zapoznaniem się i zrozumieniem wszystkich środków bezpieczeństwa.
P280	Stosować rękawice ochronne / odzież ochronną / ochronę oczu.
P308+P313	W PRZYPADKU narażenia lub styczości: Zasięgnąć porady/zgłosić się pod opiekę lekarza.
P405	Przechowywać pod zamknięciem.
P501	Zawartość / pojemnik usuwać zgodnie z miejscowymi przepisami.

UWAGA: Do wyłącznego stosowania przez użytkowników profesjonalnych. Składniki warunkujące stopień zagrożenia umieszczone na etykiecie: formamid.

Przygotowanie odczynników

UWAGA: Tam gdzie zaznaczono, przeprowadzać pomiar pH roztworów w temperaturze otoczenia. O ile nie wskazano inaczej, należy używać pHametri z elektrodą szklaną.

Roztwór 20X SSC

Dokładnie wymieszać 132 g roztworu 20X SSC z 400 mL oczyszczonej wody. Zmierzyć pH i doprowadzić je do wartości 5,3 przy użyciu HCl. Dodać oczyszczoną wodę do uzyskania końcowej objętości 500 mL. Wymieszać i przefiltrować przez filtr o wielkości porów 0,45 µm. Przechowywać w temperaturze otoczenia. Roztwór wyjściowy wylać po upływie 6 miesięcy lub wcześniej w przypadku stwierdzenia śladów zmętnienia lub zanieczyszczenia roztworu.

Roztwór płuczący 2X SSC/0,1% NP-40

Dokładnie wymieszać 100 mL roztworu 20X SSC (pH 5,3) z 850 mL oczyszczonej wody. Dodać 1 mL NP-40. Dokładnie wymieszać do całkowitego rozpuszczenia NP-40. Zmierzyć pH i doprowadzić je do wartości 7,0 ± 0,2 przy użyciu NaOH. Dodać oczyszczoną wodę do uzyskania końcowej objętości 1 litra. Wymieszać i przefiltrować przez filtr o wielkości porów 0,45 µm. Przechowywać w temperaturze otoczenia. Roztwór wyjściowy wylać po upływie 6 miesięcy lub wcześniej w przypadku stwierdzenia śladów zmętnienia lub zanieczyszczenia roztworu.

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

Dokładnie wymieszać 49 mL formamidu, 7 mL roztworu 20X SSC (pH 5,3) i 14 mL oczyszczonej wody w szklanym kominku do barwienia. Zmierzyć pH, używając pasków do pomiaru pH, aby stwierdzić, czy wartość pH mieści się w zakresie 7,0 do 8,0. Między użyciami przechowywać w zamkniętym naczyniu w temp. 2 do 8 °C. Wylać po upływie 7 dni.

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

Przygotować powyższe rozcieńczenia (v/v) 100% etanolu z użyciem oczyszczonej wody. Między użyciami przechowywać w zamkniętym naczyniu w temperaturze otoczenia. Roztwory wyjściowe wylać po upływie 6 miesięcy.

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

Dokładnie wymieszać 20 mL roztworu 20X SSC (pH 5,3) z 950 mL oczyszczonej wody. Dodać 3 mL NP-40. Dokładnie wymieszać do całkowitego rozpuszczenia NP-40. Zmierzyć pH i doprowadzić je do wartości 7,0 do 7,5 przy użyciu NaOH. Dodać oczyszczoną wodę do uzyskania końcowej objętości 1 litra. Wymieszać i przefiltrować przez filtr o wielkości porów 0,45 µm. Przechowywać w temperaturze otoczenia. Roztwór wyjściowy wylać po upływie 6 miesięcy lub wcześniej w przypadku stwierdzenia śladów zmętnienia lub zanieczyszczenia roztworu.

Przechowywanie sondy DNA LSI: Sonda DNA LSI powinna być przechowywana w temp. -20 °C (± 10 °C) bez dostępu światła.

Degradacja: Fluorofory szybko ulegają fotobłaknięciu. Ograniczenie dostępu światła do wszystkich roztworów i preparatów zawierających fluorofory zmniejsza tę degradację. Wszystkie kroki, które można wykonać bez dostępu światła, takie jak inkubacje i przemycanie, należy przeprowadzać w ciemności.

Uwagi dotyczące procedury: Przed użyciem wszystkie odczynniki powinny zostać rozmrożone w temperaturze otoczenia, a następnie każdą probówkę należy odwirować przez 2 do 3 sekund w standardowej mikrowirówce stołowej.

Pobranie i przygotowanie próbki do analizy

Komórki szpiku kostnego powinny zostać poddane hodowli, a następnie zbierane, utrwalane oraz umieszczane na szkiełkach mikroskopowych zgodnie ze standardowymi procedurami cytogenetycznymi.

Procedura

Wymagane materiały

- Vysis LSI D5S23, D5S721 SpectrumGreen/CEP 9 SpectrumAqua/CEP15 SpectrumOrange Probes
- Vysis LSI/WCP Hybridization Buffer

Materiały wymagane, lecz niedostarczone

- 12N HCl (do regulacji pH roztworów płuczących)
- 1N NaOH (do regulacji pH roztworów płuczących)
- Szklane kominki (naczynia Coplina)
- Skalibrowany termometr
- Pęseta
- Cylinder miarowy (1000 mL)
- Mieszałko magnetyczne
- Etanol
- Mikrowirówka

- Końcówki do pipet mikrolitrowych o zakresie od 1 do 10 μL
- Pipeta mikrolitrowa o zakresie od 1 do 10 μL
- Pehametr
- Odtłuszczone szkiełka mikroskopowe
- Oczyszczona woda
- Timer
- Worteks
- Łażnia wodna (37°C i 72°C)
- Mikroskop fluorescencyjny
- Inkubator o temp. 37°C
- 20X SSC
- NP-40
- Formamid ultraczysty
- Barwnik kontrastowy DAPI II
- Płyta grzejna do preparatów

Przygotować trzy kominki szklane: Do jednego kominka wlać 70 mL 100% etanolu, do drugiego - 70 mL 85% etanolu, a do trzeciego - 70 mL 70% etanolu. Używać w temperaturze otoczenia. Wylać po 7 dniach lub w przypadku nadmiernego rozcieńczenia bądź wyparowania roztworu.

Dla uzyskania optymalnego rezultatu należy upewnić się, czy odczynniki zostały przygotowane i są używane w odpowiednich temperaturach podanych w instrukcji używania.

Pomiar temperatury roztworów powinien być wykonany wewnątrz kominków przy użyciu skalibrowanego termometru.

Przygotowanie próbki docelowej

UWAGA: Kominki szklane zawierające roztwór do denaturacji doprowadzić do temperatury otoczenia. Umieścić kominki z roztworem w łaźni wodnej o temp. $73 \pm 1^{\circ}\text{C}$ na ok. 30 minut przed użyciem w celu doprowadzenia roztworu do wymaganej temperatury.

1. Upewnić się, czy temperatura roztworu do denaturacji wynosi $73 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Aby utrzymać właściwą temperaturę roztworu do denaturacji, należy zanurzać cztery preparaty równocześnie. Jeśli barwione są mniej niż cztery preparaty, należy dołożyć puste szkiełka o temperaturze otoczenia tak, aby razem było ich cztery.

2. Zanurzyć preparaty w roztworze do denaturacji na 5 minut.

UWAGA: Do jednego kominka nie należy wkładać więcej niż cztery preparaty równocześnie.

3. Odwodnić preparaty przez 1 minutę w 70% etanolu, następnie przez 1 minutę w 85% etanolu i 1 minutę w 100% etanolu.

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

Przygotowanie mieszaniny sondy

1. Składniki dla poszczególnych obszarów docelowych dodawać kolejno do próbki mikrowirowniczej w temperaturze otoczenia:

7 μL buforu hybrydazyjnego LSI/WCP

1 μL sondy

2 μL oczyszczonej wody

UWAGA: W celu przeprowadzenia równoczesnej hybrydazyjacji dwóch lub trzech sond, każdej znakowanej innym fluoroforem, należy dodać 1 μL każdej sondy. Dopełnić oczyszczoną wodą w celu otrzymania łącznej objętości sondy i wody równej 3 μL .

2. Probówkę poddać wirowaniu przez 1 do 3 sekund.
3. Wytężyć na wortexie i ponownie odwirować.
4. Umieścić probówkę w łaźni wodnej o temp. $73 \pm 1^{\circ}\text{C}$ na 5 minut.
5. Wyjąć probówkę z łaźni wodnej.
6. Umieścić probówkę na płycie grzejnej rozgrzanej do temp. 45 do 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.

Hybrydazyjacja sondy do próbki docelowej

UWAGA: Przygotować wilgotną komorę poprzez wyłożenie hermetycznego pojemnika na preparaty papierowym ręcznikiem nasączonym wodą. Umieścić w inkubatorze o temp. 37°C .

1. Wyjąć preparaty ze 100% etanolu.
2. Wysuszyć preparaty, opierając dolną krawędź szkiełka na bibule i wycierając do sucha spód szkiełka ręcznikiem papierowym.
3. Umieścić preparaty na płycie grzejnej o temp. 45 do 50°C na maksymalnie 2 minuty dla odparowania resztek etanolu.

4. Nałożyć 10 μL mieszaniny sondy na wybrany, docelowy region preparatu i natychmiast przykryć szkiełkiem nakrywkowym. Powtórzyć te czynności dla kolejnych obszarów docelowych.
5. Uszczelnąć szkiełko nakrywkowe przy użyciu kleju kauczukowego.
6. Umieścić preparaty w nagrzejanej komorze wilgotnej, a następnie wstawić komorę do inkubatora o temp. 37°C na 6 do 16 godzin.

Dla większości sond LSI uzyskanie zadowalającego sygnału rozpoczyna się po 12- do 16-godzinnej hybrydazyjacji.

Płukanie preparatu

UWAGA: Dla próbek uzyskanych z materiału zatopionego w parafinie należy zastąpić roztwór płuczający 2X SSC/0,3% NP-40 roztworem płuczającym 0,4X SSC/0,3% NP-40.

Przygotowanie roztworów płuczających:

- Wlać 70 mL 0,4X SSC/0,3% NP-40 do kominka do barwienia. Umieścić kominek w łaźni wodnej o temp. $73 \pm 1^{\circ}\text{C}$ co najmniej 30 minut przed użyciem. Zużyć przygotowany roztwór tego samego dnia, resztę usunąć.
- Wlać 70 mL 2X SSC/0,1% NP-40 do kominka do barwienia. Używać w temperaturze otoczenia. Zużyć przygotowany roztwór tego samego dnia, resztę usunąć.

UWAGA: Dla utrzymania właściwej temperatury roztworu 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 otoczenia tak, aby razem było ich cztery.

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

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

UWAGA: Przed rozpoczęciem płukania następnych czterech szkiełek należy upewnić się, czy temperatura roztworu płuczającego wynosi $73 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

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

Wizualizacja hybrydazyjacji

1. Wysuszyć preparaty na powietrzu, w ciemności.
2. Nanieść 10 μL barwnika kontrastowego DAPI II na obszar docelowy, a następnie nałożyć szkiełko nakrywkowe.

Oglądać preparaty przy użyciu odpowiedniego zestawu filtrów w optymalnie ustawionym mikroskopie fluorescencyjnym. Podane poniżej zestawy filtrów optycznych pozwolą na wizualizację fluoroforów użytych podczas hybrydazyjacji.

Użycie filtra Vysis...	pozwala na równoczesne wzbudzenie i emisję fluoroforów...
DAPI/Orange	DAPI i spektrum pomarańczowe (SpectrumOrange)
DAPI/Green	DAPI i spektrum zielone (SpectrumGreen)
Aqua/Green/Orange	spektrum jasnoniebieskie (SpectrumAqua), spektrum zielone (SpectrumGreen) i spektrum pomarańczowe (SpectrumOrange)
DAPI/Orange/Green	DAPI, spektrum pomarańczowe (SpectrumOrange) i spektrum zielone (SpectrumGreen)
DAPI/Aqua/Green/Orange	DAPI, spektrum jasnoniebieskie (SpectrumAqua), spektrum zielone (SpectrumGreen) i spektrum pomarańczowe (SpectrumOrange)

Przechowywanie: Preparaty przechowywane w temp. -20°C i chronione przed dostępem światła mogą być badane przynajmniej przez trzy tygodnie po hybrydazyjacji.

Zastosowanie kodenaturacji

Kodenaturacja jest procesem, który upraszcza procedurę fluorescencyjnej hybrydazyjacji *in situ* (FISH) poprzez połączoną, jednoczesną denaturację badanej próbki i mieszaniny sondy. Zazwyczaj kodenaturacja jest przeprowadzana poprzez umieszczenie preparatów z badaną próbką, z nałożonymi sondami i szkiełkami nakrywkowymi na płycie grzejnej lub w inkubatorze/suszarce, gdzie ustalono temperaturę właściwą dla denaturacji. Preparaty są zwykle wyjmowane po 2 do 10 minutach i umieszczane w inkubatorze, w temperaturze właściwej dla hybrydazyjacji.

Warunki kodenaturacji zalecane w publikacjach są zróżnicowane w zakresie temperatury i czasu, w zależności od specyficznego zastosowania oraz typu badanej próbki. Opisane tu parametry są zalecane do użycia z systemem Vysis ThermoBrite Denaturation/Hybridization System i stanowią zestaw parametrów wyjściowych. W zależności od rodzaju badanych próbek może zaistnieć potrzeba dalszej optymalizacji. Efekt hybrydyzacji z użyciem kodenaturacji może różnić się od efektu hybrydyzacji z zastosowaniem osobnej denaturacji próbki badanej i jej odwodnienia przed nałożeniem sondy.

Przygotowanie preparatu do kodenaturacji

1. Składniki dla poszczególnych obszarów docelowych dodawać kolejno do probówki mikrowirowniczej w temperaturze otoczenia:
7 µL buforu hybrydyzacyjnego LSI/WCP
1 µL sondy
2 µL oczyszczonej wody
- UWAGA:** W celu przeprowadzenia równoczesnej hybrydyzacji dwóch lub trzech sond, każdej znakowanej innym fluoroforem, należy dodać 1 µL każdej sondy. Dodać oczyszczoną wodę do otrzymania łącznej objętości sondy i wody równej 3 µL.
2. Probówkę poddać wirowaniu przez 1 do 3 sekund.
3. Wytrząsnąć na worteksie i ponownie odwirować.
4. Nałożyć 10 µL mieszaniny sondy na preparat i natychmiast przykryć szkiełkiem nakrywkowym.
5. Uszczelnić szkiełko nakrywkowe przy użyciu kleju kauczukowego.

Ustawianie parametrów systemu denaturacji/hybrydyzacji

Podane poniżej wskazówki dotyczą parametrów wyjściowych systemu ThermoBrite Denaturation/Hybridization System. W celu uzyskania dalszych informacji dotyczących obsługi systemu, patrz Instrukcja obsługi ThermoBrite.

Podczas pracy z systemem ThermoBrite może być konieczne dopasowanie warunków denaturacji i hybrydyzacji. Dalsze wskazania, patrz rozdziały dotyczące wykrywania i usuwania określonych problemów w niniejszej instrukcji używania.

1. Dla hodowli z limfocytów i szpiku kostnego ustawić temperaturę denaturacji (*Melt Temp*) na 73°C, zaś jej czas (*Melt Time*) - na 1 minutę. Dla próbek zatopionych w parafinie ustawić temperaturę denaturacji (*Melt Temp*) na 73°C, zaś jej czas (*Melt Time*) - na 5 minut.
2. Ustawić temperaturę hybrydyzacji (*Hyb Temp*) na 37°C, zaś czas hybrydyzacji (*Hyb Time*) - od 4 godzin do hybrydyzacji całonocnej.
3. Po upływie czasu hybrydyzacji wypłukać preparaty z zastosowaniem szybkiej procedury płukania.
4. Wysuszyć preparaty na powietrzu, w ciemności.
5. Nanieść 10 µL barwnika kontrastowego na obszar docelowy, a następnie nałożyć szkiełko nakrywkowe.

Procedury kontroli jakości

Równocześnie z próbkami pacjenta powinny być oznaczane kontrole: dodatnia i ujemna.

Oczekiwane rezultaty

Oczekiwany prawidłowy wzorek sygnału zestawu sond Vysis D5S23, D5S721/CEP 9/CEP 15 FISH Probe Kit są dwa sygnały zielone, dwa sygnały jasnoniebieskie i dwa sygnały pomarańczowe.

Jakikolwiek sygnał inny niż po dwa sygnały dla każdej sondy jest nieprawidłowy. Oczekiwany typowy nieprawidłowy wzór sygnału zestawu sond Vysis D5S23, D5S721/CEP 9/CEP 15 FISH Probe Kit w przypadku szpiczaka z hiperdiploidią to więcej niż dwa sygnały emitowane przez co najmniej dwie spośród trzech sond.¹ Mogą pojawić się też inne wzory sygnałów nieprawidłowych. Przy ich interpretacji przydatna może być analiza metafaz.

Ograniczenia stosowania

Dla badań interazy każde laboratorium powinno ustalić analityczną wartość normy dla punktu odcięcia (*cut-off*) dlażądanego wzoru sygnału nieprawidłowego. Jedną z metod, którą można w tym celu zastosować, opisali Wiktor i wsp.⁴

Wyniki sprawiające problemy w teście z kodenaturacją

Morfologia chromosomów obserwowana po hybrydyzacji z użyciem kodenaturacji może różnić się od obrazu uzyskanego dla preparatu badanego, poddanego denaturacji i odwodnieniu przed nałożeniem sondy.

Problem	Możliwe rozwiązanie
Hybrydyzacja krzyżowa	<p>Powtórzyć analizę z inną próbką, stosując jedną z poniższych modyfikacji:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Podwyższyć temperaturę 0,4X SSC/0,3% NP-40 o 2°C. W razie potrzeby kontynuować podwyższanie temperatury do czasu uzyskania akceptowalnej intensywności sygnału. • Obniżyć temperaturę denaturacji o 2°C.
Słaby sygnał sondy	<p>Powtórzyć analizę z inną próbką, stosując jedną z poniższych modyfikacji:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Wydłużyć czas hybrydyzacji. • Podwyższyć temperaturę denaturacji. Jeśli będzie to konieczne, kontynuować podwyższanie temperatury do czasu uzyskania zadowalającej morfologii. • Wypłukać preparaty w 0,4X SSC/0,3% NP-40 w temp. 70 do 73°C.
Sygnał 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: W razie potrzeby zredukować temperaturę lub czas denaturacji do czasu uzyskania sygnału o akceptowalnej intensywności.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Wypłukać preparaty w 0,4X SSC/0,3% NP-40 w temp. 73 do 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: W razie potrzeby zredukować temperaturę lub czas denaturacji do czasu uzyskania sygnału o akceptowalnej intensywności.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Preparaty poddać obróbce wstępnej: <ol style="list-style-type: none"> 1. Przygotować roztwór 2X SSC/1% paraformaldehydu. 2. Zanurzyć szkiełko w roztworze 2X SSC/1% paraformaldehydu na 1 minutę. 3. Zanurzyć szkiełko kilka razy w oczyszczonej wodzie. 4. Odwodnić szkiełko w serii płukań w etanolu (70%, 85%, 100%) po 1 minucie. 5. Wysuszyć szkiełko i kontynuować procedurę przygotowania preparatu do kodenaturacji. • Jeśli morfologia metafaz nie poprawiła się, należy zmodyfikować procedurę użycia systemu ThermoBrite: <ol style="list-style-type: none"> 1. Przygotować 280 µL roztworu do denaturacji, który stanowi 70% formamid/2X SSC (196 µL formamidu/ 28 µL 2X SSC/56 µL oczyszczonej wody). 2. Uruchomić program <i>ThermoBrite Hold Temp</i> z temperaturą ustawioną na 73°C. 3. Umieścić 10 µL roztworu do denaturacji, który stanowi 70% formamid/2X SSC, na każdy obszar docelowy i przykryć szkiełkiem nakrywkowym. 4. Gdy system ThermoBrite osiągnie temp. 73°C, należy umieścić szkiełko na powierzchni grzejnej. Zamknąć pokrywę. 5. Wyjąć preparaty po 3 minutach. 6. Usunąć szkiełko nakrywkowe. 7. Kontynuować etap dehydracji w procesie przygotowywania próbki docelowej dla przeprowadzenia procedury bez kodenaturacji.

Wskazówki i usuwanie problemów

Przy oglądaniu wyników analizy FISH należy sprawdzić, czy mikroskop jest właściwie wyregulowany i czy działa optymalnie.

Poniższa lista zestawia niezadowalające 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 wysuszone preparaty z naniesionym materiałem w trakcie przygotowywania	Podnieść temperaturę łaźni wodnej (następuje zwiększenie wilgotności) podczas nakapowania preparatów. Obniżyć temperaturę płyty grzejnej do podgrzewania preparatów w trakcie przygotowywania próbki. Przedłużyć czas suszenia, co najmniej na całą noc w temperaturze otoczenia, a następnie pozwolić dojrzeć preparatom co najmniej 24 godziny w temperaturze otoczenia. Nie prażyć preparatów w wysokiej temperaturze.
	Nadmierna denaturacja próbki	Upewnić się, czy roztwór do denaturacji został wykonany zgodnie z zaleceniami podanymi w instrukcji używania. Upewnić się, czy temperatura roztworu do denaturacji przed zanurzeniem preparatów wynosi $73 \pm 1^\circ\text{C}$; obniżyć temperaturę do 72°C . Skrócić czas denaturacji o 1 do 3 minut.
	Preparaty z naniesionym materiałem nie zostały całkowicie wysuszone przed zanurzeniem w roztworze do denaturacji.	Ogrzać preparaty do temp. 45 do 50°C przed denaturacją lub odwodnić preparaty w serii płukań w etanolu (70%, 85%, 100%) po 1 minucie.
	Denaturacji poddano zbyt świeży materiał.	Pozostawić preparaty na co najmniej 24 godziny w temperaturze otoczenia, aby dojrzały.
	Szkłeczka nie były dostatecznie odtłuszczone przed przygotowaniem preparatów.	Przed nakrapianiem zawiesiny dokładnie wyczyścić szkiełko, zanurzając je w etanolu, a następnie dokładnie wytrzeć ściereczką bezpyłową.
Silne tło widoczne na preparacie	Resztki komórek na preparacie	Trzykrotnie przemyć peletkę komórek świeżym utrwalczem i powtórzyć procedurę nakrapiania zawiesiny na szkiełko.
	Płytki metafazowe dojrzewały przez prażenie lub zawierają cytoplazmę.	Wydłużyć czas zanurzenia preparatu w roztworze do denaturacji preparatu do 10 minut.
	Nieodpowiedni sposób płukania preparatów po hybrydyzacji	Upewnić się, czy roztwory płuczące zostały wykonane zgodnie z zaleceniami podanymi w instrukcji używania. Upewnić się, czy pH i temperatura roztworów płuczających są właściwe. Usunąć szkiełko nakrywkowe. Powtórzyć procedurę płukania.

Problem	Prawdopodobna przyczyna	Możliwe rozwiązanie
Silne tło widoczne na preparacie (c.d.)	Roztwory płuczące były używane zbyt długo lub przechowywane w niewłaściwych warunkach.	Upewnić się, czy roztwory płuczące zawierające formamid są przechowywane w temp. 4°C . Nie używać po upływie 7 dni lub w przypadku częstego stosowania. Usuwać wszystkie inne roztwory płuczające po 1 dniu. Upewnić się, czy pH roztworów płuczających zawierających formamid wynosi 7,0 do 8,0.
	Oglądanie efektu hybrydyzacji przy użyciu filtrów szerokopasmowych	Przełączyć na filtry o mniejszej szerokości pasma (przepuszczające węższe spektrum) lub wielopasmowe (wielowzbudzeniowe) dla zredukowania świecenia tła.
Słaby sygnał lub brak sygnału	Niewłaściwa denaturacja preparatów	Upewnić się, czy temperatura roztworu do denaturacji w kominku szklanym przed zanurzeniem preparatów wynosi $73 \pm 1^\circ\text{C}$. Podnieść temperaturę roztworu denaturującego do 74°C . Wydłużyć czas zanurzenia preparatu w roztworze do denaturacji o 2 do 4 minut.
	Preparaty nie były wykonane w sposób odpowiedni dla procedury FISH.	Skontaktować się z przedstawicielem firmy Abbott Molecular, aby uzyskać protokół opisujący sposób przygotowania próbki dla FISH.
	Preparaty po nakrapianiu zawiesiny dojrzewały w nieodpowiednich warunkach.	Przed przeprowadzeniem procedury FISH przechować preparaty 24 godziny w temperaturze otoczenia, aby pozwolić im dojrzeć.
	Preparaty z naniesionym materiałem nie zostały całkowicie wysuszone przed zanurzeniem w roztworze do denaturacji.	Ogrzać preparaty do temp. 45 do 50°C przed denaturacją lub odwodnić preparaty w serii płukań w etanolu (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 protokołu hybrydyzacji. Dalsze informacje dotyczące tej procedury można uzyskać u przedstawiciela firmy Abbott Molecular. Ewentualnie wykonać preparatykę FISH na świeżym materiale.
Sonda nie została dodana.		Przygotować nową mieszaninę sondy. Pozwolić, aby sonda całkowicie się rozmroziła. Wymieszać składniki na wytrząsarce laboratoryjnej lub używając pipety; krótko odwirować. Powoli pipetować sondę.
	Sonda, bufor hybrydyzacyjny lub mieszanina sondy nie były dobrze wymieszane przed użyciem.	Wymieszać składniki na wytrząsarce laboratoryjnej lub używając pipety; krótko odwirować.

Problem	Prawdopodobna przyczyna	Możliwe rozwiązanie
Słaby sygnał lub brak sygnału (c.d.)	Sondy nieprawidłowo rozcieńczone do hybrydyzacji	Stosować objętości podane w procedurze testu w celu zachowania właściwych proporcji mieszaniny sondy (7 µL buforu hybrydyzacyjnego: 1 µL sondy: 2 µL oczyszczonej wody). Upewnić się, czy pipeta jest skalibrowana. Przed użyciem odczekać, aż bufor hybrydyzacyjny ulegnie całkowitemu rozmrożeniu i osiągnie temperaturę pokojową. Pipetować powoli.
	Sonda nieodpowiednio zdenaturowana UWAGA: Nie dotyczy sond zawieszonych w buforze hybrydyzacyjnym i poddanych denaturacji.	Upewnić się, czy temperatura łaźni wodnej zastosowana do denaturacji mieszaniny sondy wynosi $73 \pm 1^\circ\text{C}$. Denaturować sondę przez 5 minut.
	Sonda nie została naniesiona na obszar docelowy natychmiast po jej zdenaturowaniu.	Zaplanować procedurę tak, aby sonda została nałożona na obszar docelowy natychmiast po wyjęciu preparatów z 100% etanolu. Upewnić się, czy etanol został odparowany z preparatu przed nałożeniem sondy. Bezpośrednio po wyjęciu z łaźni wodnej o temp. $73 \pm 1^\circ\text{C}$ umieścić probówkę z mieszaniną sondy na płycie grzejnej o temp. 45 do 50°C . Przechowywać ją tam w trakcie nakładania mieszaniny sondy na preparat. Wykonywać procedurę na takiej tylko ilości 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 pohybrydyzacyjnym natychmiast zanurzyć preparat w roztworze płuczącym; dopiero później zdjąć szkiełko nakrywkowe z kolejnego preparatu.
	Pęcherzyki powietrza uwieszone pod szkiełkiem nakrywkowym podczas hybrydyzacji	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.

Problem	Prawdopodobna przyczyna	Możliwe rozwiązanie
Słaby sygnał lub brak sygnału (c.d.)	Nieodpowiednie warunki hybrydyzacji	Upewnić się, czy zastosowano wymagany czas i temperaturę hybrydyzacji. Upewnić się, czy temperatura w inkubatorze wynosi 37°C . Uszczelnić szkiełko nakrywkowe, nie pozostawiając luk. Wydłużyć czas hybrydyzacji.
	Nieprawidłowe warunki płukania lub roztwory płuczące	Upewnić się, czy roztwory płuczące zostały wykonane zgodnie z zaleceniami podanymi w instrukcji używania. Upewnić się, czy temperatura roztworów płuczących podczas płukania była właściwa. Upewnić się, czy termometr i pehametr są prawidłowo skalibrowane. Usunąć szkiełko nakrywkowe przed zanurzeniem preparatu w roztworze płuczącym.
	Sondy lub badane próbki były przechowywane w niewłaściwych warunkach.	Nierozcieńczoną sondę należy przechowywać w temp. -20°C ($\pm 10^\circ\text{C}$) bez dostępu światła. Preparaty niepoddane hybrydyzacji i odwodnione można przechowywać w temp. -20°C ($\pm 10^\circ\text{C}$) przez dłuższy czas, a w temperaturze otoczenia przez krótki czas. Preparaty poddane hybrydyzacji przechowywać do 3 tygodni w temp. -20°C ($\pm 10^\circ\text{C}$) bez dostępu światła.
	Użyty niewłaściwy barwnik kontrastowy Zbyt jaskrawy barwnik kontrastowy	Usunąć szkiełko nakrywkowe. Zanurzyć preparat na 5 minut w 2X SSC/0,1% NP-40 w temperaturze otoczenia; odwodnić preparat w serii płukań w etanolu (70%, 85%, 100%) po 1 minucie. Wysuszyć preparat na powietrzu i ponownie nałożyć barwnik kontrastowy.
	Oglądano wynik hybrydyzacji przy użyciu niewłaściwego zestawu filtrów.	Filtry wielopasmowe (wielowzbudzeniowe) dostarczają mniej światła niż filtry jednopasmowe, tak więc sygnał sondy może wydawać się słabszy. Użyć filtra właściwego dla zastosowanego fluoroforu. Dla uzyskania dalszych informacji skontaktować się z przedstawicielem firmy Abbott Molecular.
	Konfiguracja mikroskopu lub obiektywów nie jest odpowiednia dla obserwacji rezultatów barwienia FISH lub filtry w mikroskopie są uszkodzone.	Skontaktować się z producentem mikroskopu.

Problem	Prawdopodobna przyczyna	Możliwe rozwiązanie
Niska specyficzność sygnału	Sondy nieprawidłowo rozcieńczone; często zbyt duża ilość sondy w oznaczeniu.	Upewnić się, czy mieszanina sond została wykonana zgodnie ze wskazówkami podanymi w instrukcji używania.
	Nieodpowiednie warunki hybrydizacji	Upewnić się, czy temperatura w inkubatorze wynosi 37 °C. Upewnić się, czy do mieszaniny sond dodano odpowiednią ilość buforu hybrydizacyjnego.
	Zbyt niska temperatura płukania	Utrzymywać stałą temperaturę kąpieli w roztworach płuczających przez umieszczanie w kominku nie więcej niż czterech preparatów równocześnie; przed zanurzeniem następnej partii preparatów upewnić się, czy temperatura roztworu płuczającego jest prawidłowa.
	Za słabo działa roztwór płuczający.	Upewnić się, czy roztwory płuczające zostały wykonane zgodnie z zaleceniami podanymi w instrukcji używania. UWAGA: Im niższe stężenie soli (SSC), tym wyższe stężenie formamidu i NP-40, a tym samym wzmocnione działanie roztworu płuczającego.
Jaskrawy lub błady barwnik kontrastowy	Barwnik kontrastowy wygląda błado: próbka nie została całkowicie odwodniona przed nałożeniem barwnika lub olejki dostał się do barwnika.	Usunąć szkiełko nakrywkowe. Zanurzyć preparat na 5 minut w 2X SSC/0,1% NP-40 o temperaturze otoczenia; odwodnić preparat w serii płukań w etanolu (70%, 85%, 100%) po 1 minucie. Wysuszyć preparat na powietrzu i ponownie nałożyć barwnik kontrastowy.
	Niewłaściwe stężenie barwnika kontrastowego	Jeśli barwienie DAPI jest zbyt jaskrawe, przed nałożeniem na preparat rozcieńczyć barwnik roztworem przeciwdziałającym wyświecaniu (ang. <i>antifade solution</i> , nr kat. 06J29-010).
	Barwnik kontrastowy jest przeterminowany lub był zbyt długo poddany na działanie światła.	Barwnik przechowywać w temp. -20 °C (± 10 °C), chronić przed działaniem światła, również podczas stosowania. Upewnić się, czy nie minęła data ważności barwnika.

Piśmiennictwo

1. Wuielleme S, Robillard N, Lode L, et al. Ploidy, as detected by fluorescence in-situ hybridization, defines different sub-groups in multiple myeloma. *Leukemia*. 2005;19:275-78.
2. Avet-Louiseau H, Attal M, Moreau P, et al. Genetic abnormalities and survival in multiple myeloma: the experience of the Intergroupe Francophone du Myelome. *Blood*. 2007;109:3489-95.
3. Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, et al. The Human Genome Browser at UCSC. *Genome Res*. 2002;12(6):996-1006
4. Wiktor AE, Van Dyke DL, Stupka PJ, et al. Preclinical validation of fluorescence in situ hybridization assays for clinical practice. *Genet Med*. 2006;8(1):16-23.
5. US Department of Health and Human Services. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*. 5th ed. Washington, DC: US Government Printing Office; December 2009. [Dostępne także w wersji online. *Wpisz> www.cdc.gov, wyszukaj>BMBL5>sprawdź rozdziały III oraz IV.*]
6. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration. 29 CFR Part 1910.1030. *Bloodborne Pathogens*.
7. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections: Approved Guideline – Third Edition*. CLSI Document M29-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2005.
8. World Health Organization. *Laboratory Biosafety Manual*. 3rd ed. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2004.

Pomoc techniczna:

Aby uzyskać pomoc techniczną, prosimy o kontakt z przedstawicielem firmy Abbott Molecular w Polsce lub o odwiedzenie strony internetowej firmy Abbott Molecular pod adresem www.molecular.abbott/portal.

Sondy Vysis LSI D5S23, D5S721 SpectrumGreen/CEP 9 SpectrumAqua/CEP 15 SpectrumOrange Probes chronione są patentem europejskim EP 0 549 709 B1 przyznany firmie Abbott Molecular.

CEP, LSI, WCP, Vysis, SpectrumGreen, SpectrumOrange, SpectrumAqua, SpectrumBlue, SpectrumGold oraz ThermoBrite są znakami towarowymi grupy spółek należących do firmy Abbott podlegających różnym jurysdykcjom.

Wszystkie pozostałe znaki towarowe stanowią własność poszczególnych firm.



Abbott Molecular Inc.
Des Plaines, IL 60018 USA



Abbott GmbH
Max-Planck-Ring 2
65205 Wiesbaden, Germany

© 2010, 2020 Abbott. Wszelkie prawa zastrzeżone.

www.abbottmolecular.com

lipiec 2020